

RODRIGO OTÁVIO DE FARIA

ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS E TIROSINASE DE
Lentinula boryana (BERK & MONT) PEGLER:
UM MACROFUNGO COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Tese de doutorado apresentada a
coordenação do Programa de pós-
graduação em Ciências: Bioquímica do
Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell

**Co-orientadores: Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki
Prof^ª. Dr^ª Nadia Krieger**

Curitiba
2008

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família pelo apoio.

Ao professor David pela orientação e pela paciência em corrigir meus trabalhos e relatórios, por me ensinar muito como escrever melhor.

Ao professor Guilherme pela amizade, confiança e por acreditar que poderíamos encontrar algo realmente novo.

Aos professores Miguel Nosedá e Joana pela dedicação em corrigir esta tese.

À professora Leda e a Dona Marilza pelos seus trabalhos na coordenação do curso de pós-graduação.

Aos amigos e colegas do laboratório, Marcelo Muller, Marcelo Barga, Wellington, Michael e Regiele.

Aos alunos de iniciação científica, Alexandre, Marcelo Fernandez, Ana Carolina e Francine.

À mestrandá Vivian pelo aprendizado compartilhado nos trabalhos com a tirosinase.

À Dra. Elaine pela grande ajuda e incentivo com os polissacarídeos.

Aos colegas do grupo de Química de Carboidratos, pelas várias vezes que me ajudaram com os trabalhos sobre polissacarídeos. Em especial: Tales, Juliana, Luciana, Marco, Ana Helena, Dirce, Daniel, Carol, Fhernanda, Andrea, Lucimara, Ricardo, Fernanda, Alan e outros.

Aos professores Gorin e Marcelo Iacomini e Miguel Nosedá pelo acesso aos laboratórios do Grupo de Química de Carboidratos.

Ao CNPq pela bolsa de Doutorado.

À técnica Rosane pelas análises do GCMS.

Aos meus grandes amigos Graciele Viccini, Lauro e Vassoler por todos os momentos compartilhados dentro e fora do departamento, por todas as nossas e conversas sobre a vida.

A todas as pessoas que ajudaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A Deus por continuar colocando pessoas boas e pacientes no meu caminho, pela saúde e por estar comigo sempre.

**Dedico esta tese a minha esposa
Samira ao meu filho Kalil, por serem
os amores da minha vida.**

“Sofremos demasiado pelo pouco que nos falta e alegriamo-nos pouco pelo muito que temos...”

(W. Shakespeare)

“A possibilidade de realizar um sonho é o que faz que a vida seja interessante.”

(Paulo Coelho)

“Sou um otimista. Não parece adiantar muito ser outra coisa qualquer. ”

(Sir Winston Churchill)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	pg ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
2.1 CONHECIMENTOS SOBRE O <i>Lentinula boryana</i>	1
2.2 POLISSACARÍDEOS DO GÊNERO LENTINULA.....	2
2.2.1 Polissacarídeos de <i>Lentinula edodes</i>	4
2.2.2 Polissacarídeos de <i>Lentinula boryana</i>	5
2.3 CRESCIMENTO DA FASE MICELIAL DO <i>L. boryana</i>	7
2.4 MELANINAS E TIROSINASE.....	8
2.4.1 Características químicas das melaninas.....	8
2.4.2 Melaninas e suas possíveis aplicações.....	10
2.4.3 Biossíntese de melanina e a tirosinase.....	10
2.4.4 Inibidores da Tirosinase de Cogumelos.....	13
2.4.5 Aplicações da Tirosinase de Cogumelos.....	15
2.4.5.1 Uso da Tirosinase de Cogumelo para a Produção L-DOPA.....	15
2.4.5.2 Uso da Tirosinase na Detecção e Quantificação de Compostos Fenólicos.....	18
2.4.5.3 Uso da Tirosinase na Remoção de Compostos Fenólicos e Bio-remediação.	19

2.4.5.4	Uso da Tirosinase na Produção de Biopolímeros com Ligações Cruzadas....	21
2.4.6	Produção, Purificação e Imobilização de Tirosinases de Cogumelos.....	21
2.4.6.1	Produção de Tirosinase em Cultura.....	22
2.4.6.2	Extração e Purificação da tirosinase de macrofungos.....	24
2.4.6.3	Imobilização da Tirosinase.....	24
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1	ORIGEM E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS UTILIZADAS.....	27
4.2	TÉCNICAS PARA CULTIVO DE <i>L. boryana</i> EM MEIO LÍQUIDO.....	27
4.2.1	Preparo do Inoculo.....	27
4.2.2	Cultivo em Meio Líquido com Agitação.....	28
4.2.3	Primeiro experimento de cultivo de <i>L. boryana</i> em meio líquido (Cultivo I).	29
4.2.4	Efeito da Alimentação de Glucose no Crescimento Micelial (Cultivo II).....	30
4.2.5	Composição Monossacarídica dos EPS Obtidos nos Cultivos (I, II).....	30
4.3	ESTUDOS QUÍMICOS DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>L. boryana</i>	31
4.3.1	Obtenção e Purificação do Exo-polissacarídeo produzido por <i>L. boryana</i>	31
4.3.2	Obtenção e Purificação de Polissacarídeo dos Corpos de Frutificação de <i>L. boryana</i> (Experimento I).....	31
4.3.3	Extração de Polissacarídeos dos Corpos de Frutificação de <i>L. boryana</i> (Experimento II)	32
4.3.4	Processo de Purificação de polissacarídeos do Extrato KOH 1%.....	33
4.3.5	Processo de Purificação de polissacarídeos do Extrato Aquoso 2.....	34
4.3.6	Processo de Purificação de Polissacarídeos do Extrato KOH 10%.....	34
4.3.7	Reprocessamento das Frações Solúveis e Precipitadas no Reativo de Felhing do Extrato KOH 1%	34

4.3.8	Análise Estrutural de Polissacarídeos.....	35
4.3.8.1	Determinação da Composição Monossacarídica dos Polissacarídeos.....	35
4.3.8.2	Análise das Ligações Glicosídicas dos Polissacarídeos por Metilação.....	35
4.3.8.2.1	Análise das Ligações Glicosídicas por Metilação pelo Método de Haworth..	36
4.3.8.3	Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN- ¹³ C).....	37
4.3.8.4	Precipitação de polissacarídeos com solução de Fehling.....	37
4.3.8.5	Degradação Parcial de Smith.....	37
4.3.8.6	Determinação da homogeneidade das frações por HPSEC.....	38
4.4	ESTUDOS SOBRE A TIROSINASE PRODUZIDA POR <i>L. boryana</i>	38
4.4.1	Ensaio de Atividade da Tirosinase no Extrato do Micélio.....	39
4.4.2	Determinação da Atividade de Tirosinase no Micélio de <i>L. boryana</i>	39
4.4.3	Comparação entre o Micélio Melanizado e Não Melanizado.....	39
4.4.4	Influência da Contaminação na Atividade de Tirosinase pelo Micélio de <i>L. boryana</i> em Meio Líquido.....	40
4.4.5	Efeito da Presença do Meio na Atividade de Tirosinase de <i>L. boryana</i>	40
4.4.6	Efeito da Temperatura na Atividade de Tirosinase de <i>L. boryana</i>	41
4.4.7	Efeito da Pré-incubação do Extrato em Diferentes Temperaturas na Atividade de Tirosinase de <i>L. boryana</i>	41
4.4.8	Efeito do pH na Atividade de Tirosinase de <i>L. boryana</i>	41
4.4.9	Efeito do Substrato (L-DOPA) na Atividade Enzimática do Extrato Bruto de <i>L. boryana</i>	42
4.4.10	Purificação da Tirosinase do Micélio de <i>L. boryana</i>	42
4.4.11	Eletroforese (SDS-PAGE).....	44
4.4.12	Determinação da Concentração de Proteínas.....	44
4.4.13	Efeito do Substrato (L-DOPA) na Atividade Catecolase da Tirosinase de <i>L. boryana</i>	44

4.4.14 Efeito do Captopril na Atividade da Tirosinase de <i>L. boryana</i>	45
4.4.15 Modelagem Matemática dos Dados Cinéticos da Tirosinase de <i>L. boryana</i> ..	45
4.4.16 Comparação do Modelo Matemático com os Dados Experimentais da Tirosinase de <i>L. boryana</i>	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 CULTIVO DE <i>L. boryana</i> EM MEIO LÍQUIDO	47
5.1.1 Primeiro Experimento - Cultivo Micelial de <i>L. boryana</i> em Meio Líquido (Cultivo I)	47
5.1.2 Efeito da Alimentação com Glucose no Cultivo de <i>L. boryana</i> em Meio Líquido (Cultivo II).....	50
5.1.3 Análise da Composição Monossacarídea dos EPS produzidos nos Cultivos I e II	53
5.2 ESTUDOS QUÍMICOS DOS POLISSACARÍDEOS de <i>L. boryana</i>	54
5.2.1 Estudos Químicos dos Polissacarídeos de <i>L. boryana</i> Produzidos em Meio Líquido.....	54
5.2.2 Polissacarídeos dos Corpos de Frutificação de <i>Lentinula boryana</i>	63
5.2.2.1 Obtenção e Purificação de Polissacarídeo dos Corpos de Frutificação de <i>L.</i> <i>boryana</i> (Experimento I)	63
5.2.2.2 Extração de Polissacarídeos dos Corpos de Frutificação de <i>L. boryana</i> (Experimento II)	70
5.2.2.2.1 Purificação de Polissacarídeos do Extrato KOH 1%.....	70
5.2.3 Processo de Purificação de polissacarídeos do Extrato Aquoso 2.....	84
5.2.4 Purificação e Caracterização de Polissacarídeos do Extrato KOH 10%.....	87
5.2.5 Reprocessamento das Amostras do Extrato KOH 1%.....	92
5.2.6 Atividades Biológicas e Outros Trabalhos com Polissacarídeos de <i>L.</i> <i>boryana</i>	92
5.3 ESTUDOS SOBRE A TIROSINASE PRODUZIDA POR <i>L. boryana</i>	97
5.3.1 Comparação Entre o Micélio Melanizado e Não Melanizado.....	97

5.3.2	Influência da Contaminação na Atividade da Tirosinase de <i>Lentinula boryana</i> Cultivado em Meio Líquido.....	98
5.3.3	Efeito da Drenagem do Meio de Cultivo na Atividade da Tirosinase de <i>L. boryana</i>	99
5.3.4	Efeito da temperatura durante o ensaio enzimático e determinação da estabilidade da enzima em temperaturas elevadas (pré-icubação).....	100
5.3.5	Efeito do pH na Atividade de tirosinase do micélio de <i>L. boryana</i>	102
5.3.6	Efeito da concentração de Substrato (L-DOPA) na Atividade Enzimática do Extrato Bruto de <i>L. boryana</i>	104
5.3.7	Processo de Purificação da Tirosinase de <i>Lentinula boryana</i>	105
5.3.8	Caracterização Cinética da Tirosinase Pré-purificada de <i>L. boryana</i>	110
5.3.9	Efeito do Captopril na Atividade da Tirosinase de <i>L. boryana</i>	119
6	CONCLUSÕES	123
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
	ANEXO A.....	139
	ANEXO B.....	144

LISTA DE FIGURAS

	pg
FIGURA 1- FOTOS DOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO E DO MICÉLIO DE <i>Lentinula boryana</i>	2
FIGURA 2- ESQUEMA DE REAÇÃO PARA FORMAÇÃO DE DOPA-MELANINA	11
FIGURA 3- ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE <i>L. boryana</i>	33
FIGURA 4- CRESCIMENTO MICELIAL E VARIAÇÃO DO pH DURANTE 56 DIAS, CULTIVO DE <i>L. boryana</i> EM MEIO LÍQUIDO	48
FIGURA 5- CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DURANTE 56 DIAS, CULTIVO DE <i>L. boryana</i> EM MEIO LÍQUIDO.	48
FIGURA 6- ESQUEMA PARA AVALIAR A INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE GLUCOSE NO DESENVOLVIMENTO MICELIAL DE <i>L. boryana</i> EM MEIO LÍQUIDO.	49
FIGURA 7- EFEITO DA ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE NA PRODUÇÃO DE MASSA MICELIAL DE <i>L. boryana</i> EM MEIO LÍQUIDO	51
FIGURA 8- RELAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E O CONSUMO DE GLUCOSE DE <i>L. boryana</i> EM MEIO LÍQUIDO COM ADIÇÃO DE GLUCOSE APÓS 22 DIAS DE CULTIVO	52
FIGURA 9- VARIAÇÃO DO pH NA PRESENÇA OU NÃO DE GLUCOSE NO MEIO DURANTE O CULTIVO DE <i>L. boryana</i> EM MEIO LÍQUIDO	52
FIGURA 10- INFLUÊNCIA DA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE GLUCOSE NA PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO-BASTÃO	53
FIGURA 11- ASPECTO GERAL DO POLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR <i>L. boryana</i> EM MEIO LÍQUIDO (NOVO CULTIVO)	55
FIGURA 12- ESPECTRO DE RMN- ¹³ C, DO EPS PRODUZIDO POR <i>L. boryana</i> EM MEIO LÍQUIDO	55
FIGURA 13- ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO DE EXO-POLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR <i>L. boryana</i> EM MEIO LÍQUIDO	56
FIGURA 14- ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA FRAÇÃO LbMIp EM. Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ (70 °C)	58

FIGURA 15- ESPECTRO DE RMN- ¹³ C, DA AMOSTRA LbMIp APÓS DEGRADAÇÃO PARCIAL DE SMITH EM. Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ (70 °C)	59
FIGURA 16- POSSÍVEL ESTRUTURA PARA α-(1→3)-XILOMANANA PRODUZIDA POR <i>L. boryana</i> EM MEIO LÍQUIDO.	61
FIGURA 17- POSSÍVEL ESTRUTURA PARA β-(1→3)-D-GLUCANA PRODUZIDA POR <i>L. boryana</i> EM MEIO LÍQUIDO	62
FIGURA 18- ESQUEMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE <i>L. boryana</i>	65
FIGURA 19- PERFIL DE ELUIÇÃO DAS AMOSTRAS PF2-CLbS, TZR-PF2-CLbS E TZR2-PF2-CLBS (HPSEC)	66
FIGURA 20- ESPECTRO DE RMN- ¹³ C FRAÇÃO TZR2-PF2-CLbS EM D ₂ O (70 °C)	66
FIGURA 21- ESPECTRO DE HMQC DA AMOSTRA TZR2-PF2-CLbS	67
FIGURA 22- ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DO EXTRATO KOH 1%	71
FIGURA 23- ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA FRAÇÃO CLbK1 EM. D ₂ O (70 °C)	73
FIGURA 24- ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA FRAÇÃO NPF-CLbK1	73
FIGURA 25- ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA FRAÇÃO PF2-CLbK1 EM. D ₂ O (70 °C)	74
FIGURA 26- ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA FRAÇÃO MR-PF2-CLbK1 EM D ₂ O (70°C)	74
FIGURA 27- PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES PF2-CbK1 E MR-CLbK1 (HPSEC-MALLS)	76
FIGURA 28- PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES ME-PF2-CLbK1 E QR-PF2-CLbK1 (HPSEC)	76
FIGURA 29- ESPECTRO DE RMN- ¹³ C FRAÇÃO ME-PF2-CLbK1 EM D ₂ O (70 °C)	77
FIGURA 30- ESPECTRO DE RMN- ¹³ C FRAÇÃO QR-PF2-CLbK1 EM D ₂ O (70 °C)	77
FIGURA 31- PERFIL DE ELUIÇÃO DA COLUNA DE DEAE-SEPHAROSE DA FRAÇÃO QR-PF2-CLbK1	79
FIGURA 32- PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES RETIDAS NA MEMBRANA DE 500 kDa E ELUÍDAS NA COLUNA DE TROCA IÔNICA	80

FIGURA 33- ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA AMOSTRA D0,0-QR-PF2-CLbK1 EM D ₂ O (70 °C)	80
FIGURA 34- ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA AMOSTRA D0,2-QR-PF2-CLbK1 EM D ₂ O (70 °C)	81
FIGURA 35- HMQC DA AMOSTRA D0,2-QR-PF2-CLbK1 EM D ₂ O (70 °C)	82
FIGURA 36- ESTRUTURA PROPOSTA PARA β(1→6)-GLUCANA ENCONTRADA NO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE <i>L. boryana</i>	83
FIGURA 37- ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA AMOSTRA PF2-WCLb	86
FIGURA 38- ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA AMOSTRA MR-WCLb-PF2	86
FIGURA 39- ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO PARA POLISSACARÍDEOS DO EXTRATO KOH 10%	88
FIGURA 40- ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA FRAÇÃO PA3-CLbK10 EM. Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ (70 °C)	90
FIGURA 41- ESPECTRO DE RMN- ¹³ C-DEPT DA FRAÇÃO PA3-CLbK10 EM. Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ (70 °C)	92
FIGURA 42- ESPECTRO DE HMQC DA FRAÇÃO PA3-CLbK10 EM Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ (70 °C)	92
FIGURA 43- ESQUEMA GERAL DOS EXPERIMENTOS COM OS POLISSACARÍDEOS DE <i>L. boryana</i>	94
FIGURA 44- ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS MICÉLIOS MELANIZADOS E NÃO MELANIZADOS E O EFEITO DA LIOFILIZAÇÃO NESTA ATIVIDADE.	98
FIGURA 45- EFEITO DA CONTAMINAÇÃO POR <i>L. edodes</i> NA ATIVIDADE DE TIROSINASE DE <i>L. boryana</i> EM MEIO LÍQUIDO	99
FIGURA 46- EFEITO DA INCLINAÇÃO DAS GARRAFAS DE ROUX NA ATIVIDADE DE TIROSINASE PELO MICÉLIO DE <i>L. boryana</i>	100
FIGURA 47- EFEITO DA TEMPERATURA DE REAÇÃO NA ATIVIDADE DA TIROSINASE DE <i>L. boryana</i> DO EXTRATO BRUTO	101
FIGURA 48- ESTABILIDADE TÉRMICA DA TIROSINASE DE <i>L. boryana</i> CONTIDA NO EXTRATO BRUTO.	102

FIGURA 49- CINÉTICA DE DESNATURAÇÃO A 60 °C DA TIROSINASE DO EXTRATO BRUTO DE <i>L. boryana</i>	103
FIGURA 50- EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO EXTRATO DE MICÉLIO DE <i>L. boryana</i>	104
FIGURA 51- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE DE TIROSINASE DO EXTRATO BRUTO DE <i>L. boryana</i>	105
FIGURA 52- ESQUEMA PARA PURIFICAÇÃO DE TIROSINASE DE <i>L. boryana</i>	106
FIGURA 53- ATIVIDADE DA TIROSINASE DAS FRAÇÕES OBTIDAS NAS COLUNAS SEPHADEX G 50 (A) E SEPHADEX G 100 (B)	107
FIGURA 54- ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS FRAÇÕES ELUÍDAS NA COLUNA DEAE-SEPHAROSE	108
FIGURA 55- ELETROFORESE GEL DESNATURANTE (SDS-PAGE) DAS ETAPAS DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE TIROSINASE DE <i>L. boryana</i>	109
FIGURA 56- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE L-DOPA NAS ATIVIDADES DAS TIROSINASES	112
FIGURA 57- MECANISMO DE REAÇÃO DA TIROSINASE DEFINIDO POR CABANES et al. MODIFICADA PARA INCLUIR O FENÔMENO DE INIBIÇÃO PELO SUBSTRATO	114
FIGURA 58- COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS EXPERIMENTAIS DA TIROSINASE COMERCIAL (SIGMA Co.) E DADOS OBTIDOS PELO MODELO PLOTADO EM FORTRAN	117
FIGURA 59- SIMULAÇÃO DA EQUAÇÃO DE INIBIÇÃO PELO SUBSTRATO DA TIROSINASE de <i>L. boryana</i>	119
FIGURA 60- EFEITO DO CAPTOPRIL NA ATIVIDADE CATECOLASE DA TIROSINASE DE <i>L. boryana</i>	120
FIGURA 61- INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CAPTOPRIL NA ATIVIDADE DA TIROSINASE DE <i>L. boryana</i>	121
FIGURA 62- COMPAÇÃO ENTRE O MODELO MATEMÁTICO E OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS NA CINÉTICA DA TIROSINASE	122

LISTA DE TABELAS

	pg
TABELA 1-PRODUTIVIDADE DE L-DOPA UTILIZANDO TIROSINASE IMOBILIZADA EM DIFERENTES SUPORTES	18
TABELA 2-DIFERENTES PROPORÇÕES DOS COMPONENTES A ATIVIDADE ENZIMÁTICA	42
TABELA 3-PROPORÇÕES DOS COMPONENTES PARA ATIVIDADE DA TIROSINASE	45
TABELA 4-COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDEA DOS POLISSACARÍDEOS-BASTÃO DE AMOSTRAS DOS CULTIVOS I E II	54
TABELA 5-COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS NO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR <i>L. boryana</i>	57
TABELA 6-ANÁLISE POR METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DO MEIO DE CULTIVO	59
TABELA 7-COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DA PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DO EXTRATO AQUOSO	64
TABELA 8-COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DO EXTRATO KOH 1%	72
TABELA 9-PURIFICAÇÃO POR DEAE-SEPHAROSE DA AMOSTRA QR-PF2-CLbK1	78
TABELA 10-METILAÇÃO DAS FRAÇÕES PURIFICADAS POR DEAE-SEPHADEX	79
TABELA 11-COMPARAÇÃO ENTRE VALORES DE ^1H E ^{13}C DA FRAÇÃO PA3-CLBK10 E A LITERATURA PARA α -(1 \rightarrow 3)-D-GLUCANAS	90
TABELA 12-ANÁLISE DO PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO DA TIROSINASE PRODUZIDA POR <i>Lentinula boryana</i>	108
TABELA 13-RELAÇÃO DE PARÂMETROS OBTIDOS POR CABANES et al. (1987) COM INCLUSÃO DA INIBIÇÃO PELO SUBSTRATO	114

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
\sim	Aproximadamente
^{13}C	Carbono treze
^1H	Próton
CH_3I	Iodeto de metila
CHCl_3	Clorofórmio
CuSO_4	Sulfato de cobre
D_2O	Óxido de deutério
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DOPA	Dihidroxifenilalanina
Gal	Galactose
GC- MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
Glc	Glucose
H_2O	Água
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy</i>
HPSEC- MALLS	Cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz (HPSECMALLS)
Hz	Hertz
IR	Índice de refração
J	Constante de acoplamento
kDa	Kilodaltons
KOH	Hidróxido de potássio
Man	Manose
Me_2SO	Dimetilsulfóxido
$\text{Me}_2\text{SO}-d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
MeOH	Metanol
NaB_2H_4	Boroidreto de sódio deuterado
NaBH_4	Boroidreto de sódio
NaIO_4	Periodato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
p/v	Peso/volume
rpm	Rotações por minuto
TFA	Ácido trifluoracético
v/v	Volume/volume
Xyl	Xilose

RESUMO

Foram realizados estudos para avaliar o potencial biotecnológico do macrofungo *Lentinula boryana*. A partir dos experimentos sobre cultivo em meio líquido foi possível verificar quais condições influenciam seu desenvolvimento, a produção de polissacarídeos e a atividade de tirosinase presente no micélio. Pela caracterização química do exopolissacarídeo (EPS) produzido pelo macrofungo em meio líquido, foi verificada a presença de uma β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana altamente ramificada em O-6 e uma α -(1 \rightarrow 3)-xilomanana. Polissacarídeos dos corpos de frutificação também foram isolados e caracterizados. No extrato aquoso foi encontrada uma fucomanogalactana com cadeia principal de galactopirranose com ligações do tipo α (1 \rightarrow 6) e substituições em O-4 por unidades de manose ou fucose. No extrato KOH 1% foi caracterizado uma β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana com ramificações em O-3. Por outro lado, no extrato KOH 10% foram encontradas uma α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana (pseudonigerana) e um α -(1 \rightarrow 3)-xilomanana com cadeia principal de manose ligada α -(1 \rightarrow 3) e substituições no O-4, similar ao encontrado no EPS. A análise da literatura demonstra que estes polissacarídeos têm potências aplicações como atividade anticancerígena ou então podem ser modificados quimicamente ampliando suas aplicações. Os estudos sobre a tirosinase de *L. boryana* mostraram que a enzima é mais ativa em condições amenas de temperatura e pH, não sendo resistente a temperaturas elevadas ou aos extremos de pH. O principal resultado sobre a tirosinase de *L. boryana* é que ela sofre inibição pelo substrato (L-DOPA), o que não havia sido reportado para outras tirosinases. A modelagem matemática desenvolvida adaptou um modelo proposto na literatura para contemplar a inibição pelo substrato. A modelagem matemática foi desenvolvida adaptando um modelo proposto na literatura para contemplar a inibição pelo substrato. Este modelo desenvolvido descreveu os resultados experimentais muito bem.

ABSTRACT

Studies were undertaken to evaluate the biotechnological potential of the macrofungus *Lentinula boryana*. Initially, appropriate conditions were identified for the production of biomass, polysaccharides and tyrosinase activity in liquid culture. The exopolysaccharides (EPS) produced in liquid culture were characterized as being a β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan that was highly branched in O-6 and a α -(1 \rightarrow 3)-xylomannan. Polysaccharides extracted from the fruiting bodies were also purified and characterized. An aqueous extract gave rise to a fucomannogalactan with a main chain consisting of galactopyranose linked α (1 \rightarrow 6), substituted at O-4 by mannose or fucose units. A 1% KOH extract gave rise to a β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan with branches at the O-3. On the other hand, a 10% KOH extract produced two main polysaccharides: an α -(1 \rightarrow 3)-D-glucan (pseudonigeran) and a α -(1 \rightarrow 3)-xylomannan with a main chain consisting of mannose linked α -(1 \rightarrow 3) with substitutions at O-4, this xylomannan being similar to that obtained in liquid culture. The literature suggests that these polysaccharides have potential applications as anticancer treatments and that their applications could be broadened after chemical modifications. The studies of the tyrosinase of *L. boryana* showed that the enzyme is most active in mild conditions of temperature and pH. It is not stable at high temperatures or at extremes of pH. The most important result obtained was that the tyrosinase of *L. boryana* suffers substrate inhibition in its reaction with L-DOPA. This has not been previously reported for other tyrosinases. A mathematical model of tyrosinase action from the literature was adapted to include the phenomenon of substrate inhibition. This modified model described the experimental results well.

1 INTRODUÇÃO

O trabalho relatado nesta tese é um aprofundamento do conhecimento sobre o macrofungo *Lentinula boryana* e seus produtos com possíveis aplicações biotecnológicas e teve sua origem em um projeto maior, coordenado pela Embrapa Florestas, em parceria com a UFPR e outras instituições, intitulado “Bioprospecção e Potencial de Uso da Macromicota do Estado do Paraná”. O estudo de *L. boryana*, isolado a partir de material silvestre encontrado na mata atlântica paranaense, iniciou-se no projeto de mestrado (FARIA, 2004), em que foram parcialmente caracterizados os polissacarídeos extraídos do corpo de frutificação e a melanina produzida pelo fungo em condições especiais de cultivo.

O trabalho realizado durante o mestrado (FARIA, 2004) deu subsídio para as duas grandes partes do presente trabalho. Primeiro, indicou que seria interessante caracterizar os polissacarídeos de *L. boryana* em mais detalhes, não somente aqueles presentes no corpo de frutificação, mas também os produzidos em cultivo submerso. Segundo, a presença de melanina foi uma indicação indireta de que o fungo produz tirosinase, uma enzima com aplicações biotecnológicas. Foi então decidido purificar e caracterizar a enzima.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONHECIMENTO SOBRE O MACROFUNGO *Lentinula boryana*

L. boryana é um fungo comestível, conhecido como Shiitake das Américas, que ocorre nas regiões subtropicais e tropicais do continente americano, desde o sudoeste dos Estados Unidos até a América do Sul. Por muito tempo foi conhecido pelo nome de *Lentinus cubensis* e, modernamente, seguindo a classificação de Pergler (1983), passou a ser chamado de *L. boryana* (GUZMÁN et al., 1993).

O volume de informação sobre *L. boryana* que pode ser encontrado na literatura indexada é bastante limitado, tanto que até pouco tempo atrás os conhecimentos sobre o cogumelo *L. boryana* eram restritos à sua classificação e a alguns trabalhos sobre o

crescimento micelial (GUZMÁN et al., 1993). Com os estudos realizados por Faria (2004) ampliou-se o conhecimento sobre o macrofungo. Na figura 1 estão demonstradas algumas fotos do cultivo em toras realizado pelos pesquisadores da Embrapa-Florestas Colombo-PR, também estão mostradas quatro placas de cultivo com micélio crescido sobre o meio sólido agar batata dextrose.



FIGURA 1- FOTOS DOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO E DO MICÉLIO DE *Lentinula boryana*

2.2 POLISSACARÍDEOS DO GÊNERO *LENTINULA*

2.2.1 Polissacarídeos do *Lentinula edodes*

A pesquisa bibliográfica realizada demonstrou que a grande maioria dos trabalhos sobre polissacarídeos do Gênero *LENTINULA* são trabalhos relacionados ao *L. edodes*. São relatados estudos sobre às diversas atividades biológicas como redução do colesterol do sangue e atividades anticancerígena (CHIHARA et al., 1970),

antitrombótica, antiparasitária e antiviral (JONG; BIRMINGHAM, 1993; KOGA, 1994; YAMAMOTO et al., 1997; WASSER; WEIS, 1999). Outros estudos são relacionados às estruturas químicas dos polissacarídeos presentes em *L. edodes*. Estes trabalhos sobre química de carboidratos mostraram que muitas destas atividades biológicas estão relacionadas às β -D-glucanas, e que seu potencial biológico varia conforme sua estrutura química, do grau de ramificação e da conformação helicoidal (revisado por BOHN; BEMILLER, 1995).

Os trabalhos mais antigos datam da década de 60 e 70. Em 1970, Chihara et al. (1970) isolaram e caracterizaram a lentinana, uma β -D-glucana (1 \rightarrow 3) com ramificações em C-6 por unidades de glucopiranosose β -(1 \rightarrow 6) sendo duas ligações (1 \rightarrow 6) glucopiranosídicas para cada cinco ligações (1 \rightarrow 3) (CHIHARA et al., 1970; MAEDA et al., 1988). Até os dias de hoje, a lentinana é a β -D-glucana mais estudada nos macrofungos.

Um grupo de pesquisa japonês, liderados por Mariko Shida, realizou diversos trabalhos sobre polissacarídeos de *L. edodes* (SHIDA et al., 1975; SHIDA et al., 1978; SHIDA et al., 1981). Foram feitas diferentes formas de extração e purificação, o que levou à obtenção de polissacarídeos distintos. Os corpos de frutificação secos de *L. edodes* (1 kg) foram extraídos com ácido tricloroacético, precipitados com metanol, lavados com éter, Cetavlon e tampão borato. Com isso foram purificados uma α -(1 \rightarrow 4)-D-glucana do tipo do glicogênio e uma heterogalactana constituída de uma cadeia principal de galactopiranosose com ligações do tipo α -(1 \rightarrow 6) com ramificações em O-2, substituídas por terminais de L-fucopiranosose ou D-manose (SHIDA et al., 1975).

Em 1978, este mesmo grupo publicou trabalho sobre outro polissacarídeo de *L. edodes*. Os corpos de frutificação foram extraídos com ácido tricloroacético e água fervente. O resíduo sólido da extração foi extraído com solução de hidróxido de sódio. Este último extrato foi submetido à cinco ciclos de precipitação com ácido acético e ressolubilização com solução de NaOH. O material foi purificado por precipitação fracionada com diferentes concentrações de metanol. O polissacarídeo obtido foi

caracterizado como uma D-glucana com unidades de glucopiranosose unidas por ligações do tipo α -(1→3) e α -(1→4), numa proporção de 5,3 para 1 (SHIDA et al., 1978).

No início da década de 80 um estudo realizado com o material insolúvel após uma extração exaustiva com álcali mostrou prováveis estruturas de diferentes polissacarídeos. As análises de metilação indicaram a presença de polissacarídeos altamente ramificados, por exemplo, uma glucana com ligações (1→6) e (1→3), numa razão de 2:1. Com uma hidrólise enzimática (β -1,3-glucanase), foi demonstrada uma heterogeneidade do esqueleto de glucanas. Na parte externa deste esqueleto foram encontradas principalmente glucanas com ligações do tipo β -(1→3) e β -(1→6), que são similares à lentinana. A parte intermediária do esqueleto de glucanas é composta principalmente de cadeias de glucose com ligações β -(1→6), com pequena quantidade de ramificações β -(1→3) e a parte mais interna deste esqueleto é composta por β -D-glucana altamente ramificada, com ligações β -(1→6) e β -(1→3) (SHIDA et al., 1981).

Além dos estudos sobre as estruturas químicas dos polissacarídeos de *L. edodes*, foi realizado uma série de estudos sobre as atividades biológicas destes polissacarídeos, como relatado anteriormente a maioria dos trabalhos envolvem atividades biológicas da β -glucana chamada lentinana.

A lentinana não é tóxica às células cancerígenas, mas estimula o sistema imune, que, por sua vez, combate o tumor. A β -D-glucana liga-se à superfície do linfócito ou em proteínas séricas específicas que ativam macrófagos, linfócitos T (*T-helper*), células assassinas naturais (*Natural Killers*) e outros efetores celulares.

A ação da lentinana em estimular o sistema imune abre possibilidade de seu uso em pacientes com câncer ou síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Estes pacientes imunologicamente debilitados sofrem com diversas infecções de microorganismos oportunistas, e desenvolvem doenças como candidíase, aspergilose, dermafítose e esporotricose. A lentinana, quando usada junto do AZT (3'-azido-3'-deoxitiamina), suprimiu a expressão superficial da imunodeficiência humana (WASSER; WEIS, 1999). Tanto a lentinana quanto a lentinana sulfatada mostraram potentes atividades anti-retroviral, resultando na inibição da replicação viral e na fusão celular. O tratamento da SIDA precisa incluir uma estratégia para estimular o sistema

imune, isto coloca a lentinana como um potencial candidato para este uso (WASSER; WEIS, 1999).

Além das glucanas provenientes dos corpos de frutificação de *L. edodes*, outros polissacarídeos provenientes do cultivo micelial do *L. edodes* foram obtidos e caracterizados quanto a suas propriedades químicas e biológicas.

Dois frações, contendo polissacarídeos foram obtidas a partir do micélio de *Lentinula edodes* cultivado em bagaço e fibra de arroz (LEM e LAP). LEM é o extrato do meio de cultura do *Lentinula edodes*, ou seja o extrato bruto e LAP é uma proteoglicana, açúcar:proteína (57:24), obtida por precipitação de LEM com etanol (SUGANO et al., 1984). Tanto o LEM quanto o LAP apresentaram diversas atividades biológicas entre elas a inibição da carcinogênese de fígado de rato, atividade imunopotencializadora, inibição da transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana (revisado por YAMAMOTO et al., 1997). Uma fração rica em lignina solúvel, proveniente de LEM, chamada JLS-18 demonstrou atividade específica frente ao vírus Herpes simplex Tipo I (HSV-I) muito superior ao LEM (YAMAMOTO et al., 1997). Outro composto derivado de LEM, rico em lignina, chamado EP3 apresentou atividade antiviral (*in vitro*) frente ao vírus Hepes simplex tipos I e II, contra vírus da pólio, e contra o vírus (WEE SORIMACHI, et al., 1997).

2.2.2 Polissacarídeos de *Lentinula boryana*

Os trabalhos realizados sobre os polissacarídeos de *L. boryana* limitam-se aos estudos realizados por Faria (2004). Foram feitos estudos comparativos sobre as características químicas dos polissacarídeos presentes nos corpos de frutificação de *L. boryana* com o seu congênere *L. edodes* (Shiitake). Nestes estudos foram comparadas as amostras obtidas em extração com água fervente. As amostras foram parcialmente purificadas por um processo de gelo e degelo, gerando frações insolúveis e solúveis na água fria. Os polissacarídeos destas duas frações pré-purificadas e as amostras brutas das extrações foram analisados quimicamente.

As análises por Cromatografia de exclusão estérica acoplada a detector de índice de refração (HPSEC) mostraram que, para ambos os macrofungos, as distribuições das macromoléculas foram heterogêneas, ou seja, há macromoléculas com diferentes massas moleculares nas amostras. Também foi verificado que suas macromoléculas se comportam de maneira similar frente à pré-purificação por gelo e degelo.

A partir da análise da composição monossacarídica das amostras verificou-se a predominância de três principais açúcares, manose, galactose e glucose. Para ambos os cogumelos, o processo de gelo e degelo propiciou um aumento na concentração do monossacarídeo glucose na fração insolúvel.

Os polissacarídeos foram analisados por metilação e a análise espectroscópica de ressonância magnética nuclear. As ligações glicosídicas dos polissacarídeos dos dois cogumelos eram bastante similares. Foi verificado que nas frações insolúveis em água gelada há uma grande proporção de uma β -D-glucana com ligações do tipo β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6).

Foi demonstrado que *L. boryana* apresenta polissacarídeos com estruturas químicas similares às daquelas de *L. edodes*, evidenciando a presença de uma ou mais β -D-glucanas. Estes estudos mostraram, de uma maneira geral, quais as características estruturais dos polissacarídeos. Os cogumelos utilizados durante estes estudos foram provenientes de um experimento de cultivo realizado pela Embrapa-Floresta, na primeira safra a quantidade de corpos de frutificação obtidos foi limitada, em decorrência deste fato houve uma limitação de material, que impossibilitou o isolamento e caracterização dos polissacarídeos (FARIA, 2004). Devido à falta de trabalhos relacionados à análise estrutural de polissacarídeos de *L. boryana*, na próxima seção serão relatadas referências relacionadas aos estudos sobre os polissacarídeos de seu congênere, *L. edodes*.

2.3 CRESCIMENTO DA FASE MICELIAL DO *L. boryana*

Os estudos sobre o crescimento micelial de macrofungos são importantes em dois aspectos: otimização da produção de cogumelos e a produção de compostos de interesse diretamente da fase micelial. Para obtenção do corpo de frutificação é necessário que ocorra um bom desenvolvimento micelial antes da frutificação propriamente dita. Portanto, sabendo as características fisiológicas dos microorganismos, podem ser obtidos melhores resultados na produção de cogumelos. Os corpos de frutificação têm compostos com propriedades interessantes, mas muitas vezes a sua obtenção é difícil e demorada. Muitas vezes estes compostos de interesse, como polissacarídeos e enzimas podem ser obtidos por cultivo em meio líquido, onde o tempo para desenvolvimento é reduzido. Frente a estes aspectos e para um melhor crescimento micelial, é necessário entender os fatores que influenciam a velocidade de crescimento.

Com relação às condições de cultivo de *L. boryana*, há relatos que mostram que este macrofungo cresce em condições similares ao *L. edodes* (Shiitake). Em trabalho realizado com diferentes cepas de *L. boryana* e *L. edodes* foi verificado que, na média, as cepas de *L. edodes* tiveram uma velocidade de crescimento radial maior que as de *L. boryana* (MATA et al., 2001). Algumas cepas de *L. boryana* apresentaram velocidades de crescimento semelhantes a algumas cepas de *L. edodes*, mostrando que há variação entre a velocidade de crescimento de cepas da mesma espécie. No trabalho de Faria (2004) foi verificado o comportamento de *L. boryana* cepa CNPF 24 (cepa nativa do Estado do Paraná). Estes estudos demonstraram que esta cepa de *L. boryana* possui uma velocidade de crescimento radial inferior à cepa L54 de *L. edodes*, e também foi verificada que esta cepa possui maior sensibilidade ao aumento de temperatura. Foi observado que em 20 e 22 °C o *L. boryana* (CNPF 24) teve seu melhor desenvolvimento micelial (FARIA, 2004). Neste mesmo experimento (FARIA, 2004) foi verificado que em 28 °C o crescimento foi baixo nos primeiros dias e após 7 dias ocorreu a produção e liberação de um pigmento escuro para o meio de cultivo.

2.4 MELANINAS E TIROSINASE

2.4.1 Características químicas das melaninas

De fato a melanina não é uma substância, mas sim um grupo de diversas substâncias todas com propriedades similares (LANGFELDER et al., 2003). As melaninas são compostos escuros geralmente pretos ou marrons, sendo macromoléculas formadas por polimerização oxidativa de compostos fenólicos e indólicos (LANGFELDER et al., 2003);(BUTLER; DAY, 1998). As melaninas são produzidas por microorganismos, animais, protozoários e plantas, e usualmente estão complexadas com proteínas ou carboidratos (BUTLER; DAY, 1998). Os dois mais importantes tipos de melaninas são as DHN-melaninas e as DOPA-melaninas. As DHN-melaninas são chamadas assim porque um dos intermediários da sua via sintética é o 1,8-dihidroxi-naphtaleno. a mesma forma, as DOPA-melaninas, recebem este nome por terem como precursor a L-3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA), figura 2 (LANGFELDER et al., 2003). Existem também as GHB-melaninas que têm como precursor o glutamyl-4-hidroxi-benzeno (BUTLER; DAY, 1998). Outras classificações são aplicadas às melaninas sendo também divididas em três grupos, as eumelaninas, as feomelaninas e as alomelaninas (BILISNKA, 1996). As eumelaninas são pigmentos negros ou marrons, geralmente insolúveis, formados por seqüências de reações oxidativas, a partir da tirosina, DOPA, dopamina ou outras catecolaminas. As feomelaninas são pigmentos de cores mais claras como vermelho ou amarelo, podem ser obtidas de maneira semelhante às eumelaninas, mas também têm como precursores a cisteína ou a glutadiona (BILISNKA, 1996);(RILEY, 1997). As alomelaninas são mais comuns no reino vegetal, esses pigmentos são formados a partir da polimerização oxidativa de substratos fenólicos como catecol (BILISNKA, 1996);(STAINSACK, 1998).

A relação entre as melaninas e o *L. boryana* foi verificado pela primeira vez durante os estudos sobre crescimento micelial relatado na seção 2.3. Nestes estudos foi verificado que no cultivo de *L. boryana* em BDA a 28 °C ocorria um baixo desenvolvimento micelial e alta produção de um pigmento escuro. Este pigmento purificado e submetido às análises espectroscópicas de infravermelho, ressonância

magnética nuclear e ressonância paramagnética eletrônica. Estas análises mostraram que o pigmento escuro era uma DOPA-melanina, sendo que a produção de melanina por *L. boryana* não tinha sido anteriormente relatada. Além das análises químicas, foram estudados fatores que influenciam a produção de melanina por *L. boryana* (FARIA, 2004). A produção de melanina pelo fator temperatura não havia anteriormente sido relatada para qualquer membro do gênero *Lentinula*.

Na ausência desta informação, observações com outros fungos podem ser relevantes. Por exemplo, *Streptomyces galbus* produz melanina em temperaturas mais elevadas que a temperatura ótima para o crescimento (revisado por BUTLER; DAY, 1998) o que é semelhante ao observado para o *L. boryana*. O estímulo na produção de melanina com o aumento da temperatura pode ser devido a uma característica química da mesma, que seria a retenção de água na forma de água de hidratação das moléculas, e isto poderia reduzir a perda de água das células fúngicas. Este efeito termoprotetor das melaninas em células fúngicas foi verificado em trabalhos com fungos mutantes albinos (*Monilinia fructicola*), em que se verificou que a resistência destes fungos mutantes frente ao aumento da temperatura foi inferior quando comparada à de fungos selvagens (BUTLER; DAY 1998; REHNSTROM; FREE, 1996).

Além do efeito da temperatura, foi verificado que a produção de melanina por *L. boryana* é influenciada pela presença de outros microorganismos (contaminantes) no meio de cultivo (bactérias e outros macrofungos) (FARIA, 2004). Acredita-se que a presença da melanina nas paredes celulares dos fungos também tem como função a proteção da célula contra a lise enzimática (quitinases e β -1,3-glucanases), por enzimas liberadas por outros microrganismos, uma vez que mutantes não produtores de melanina possuem menor resistência à lise enzimática quando comparados às estirpes selvagens (KUO; ALEXANDER, 1967; REHNSTROM; FREE, 1996; BUTLER; DAY, 1998).

Também foi verificado que a presença de oxigênio e a disponibilidade de nutrientes são importantes para a produção de melanina por *L. boryana*. A importância do oxigênio se deve ao fato que, durante a biogênese da melanina derivada da DOPA (dihidroxifenilalanina), ocorrem diversas etapas de oxidação onde o oxigênio molecular (O_2) é utilizado como um substrato (RILEY, 1997; BUTLER; DAY, 1998).

2.4.2 Melaninas suas possíveis aplicações

O interesse na melanina provém de seu potencial biotecnológico. Entre estas possibilidades de aplicação na medicina podem ser citadas:

- Adição em cremes e loções para o tratamento terapêutico de diversas lesões de pele, como psoríase, dermatite seborréica e eczema (OKUN; MILTON, 1976);
- No tratamento de doenças degenerativas, como doença de Parkinson, mal de Alzheimer, retinite pigmentosa, esquizofrenia e demência (BERLINER; ERWIN; MCGEE, 1993);
- Aplicação na inibição da angiogênese e da degeneração macular da retina (D'AMATO; ROBERT, 2003);
- Inibição da replicação do HIV *in vitro* por melaninas solúveis derivadas da L-tirosina e da L-DOPA (MONTEFIORE, 2001);
- Absorção de substâncias carcinogênicas (LARSSON; TJALVE, 1979).

2.4.3 Biossíntese de melanina e a tirosinase

Como visto, as melaninas, incluindo as DOPA-melaninas, possuem variadas propriedades que podem ser aplicadas de diversas formas. Uma das formas de se obter a melanina é por processo enzimático, que geralmente envolve a tirosinase. Esta enzima catalisa a oxidação da L-tirosina para seu correspondente dopaquinona, o qual é o primeiro passo para a biossíntese do pigmento melanina. A polimerização da dopaquinona resulta na formação da melanina.

A produção de uma DOPA-melanina por *L. boryana* sugeriu que este fungo também produz tirosinase. Tirosinase (EC 1.14.18.1; L-DOPA oxidoreductase, catecolase, difenoloxidase, polifenol oxidase PPO) catalisa as etapas de oxidação seqüencial com vários substratos fenólicos. A tirosinase é uma enzima bifuncional que oxida fenóis ou catecóis em seus *o*-difenóis correspondentes e oxida estes *o*-difenóis para produzir *o*-quinonas (ROOSEBOOM, et al., 2004; HAGHBEEN; TAN, 2003).

Uma visão geral das características bioquímicas da tirosinase macrofúngica mais estudada produzida por *Agaricus bisporus*, é aqui apresentada, embora também características de outras tirosinases fúngicas sejam mencionadas quando apropriado.

As primeiras investigações bioquímicas sobre a tirosinase datam de 1895 com o cogumelo *Russula nigricans*, que, quando cortado, inicialmente se torna vermelho, passando a preto quando em contato com o ar (SEO; SHARMA; SHARMA, 2003). Em plantas e fungos, as tirosinases ocorrem em várias isoformas: formas imaturas, formas maduras e latentes, e formas ativas. Sabe-se que existem estas isoformas, mas ainda não foi estabelecida a relação entre a descrição bioquímica e as características cinéticas das isoformas. Em cogumelos, em torno de 98 a 99% da tirosinase está na forma latente (SEO; SHARMA; SHARMA, 2003).

Assim como com outras tirosinases macrofúngicas, a tirosinase de *A. bisporus* é intracelular (SOLER-RIVAS et al., 1999; HAQ; ALI, 2006), é um heterotetrâmero com uma massa molecular aparente de 120 kDa, com duas cadeias polipeptídicas pesadas e duas leves (SEO; SHARMA; SHARMA, 2003; STROTHKAMP; JOLLEY; MASON, 1976). Observa-se que tirosinases de outros fungos possuem estruturas quaternárias diferentes: a tirosinase do cogumelo *Amanita muscaria* é um heterodímero com uma massa molecular de aproximadamente 50 kDa (MULLER et al., 1996), enquanto a tirosinase do fungo filamentoso *Neurospora crassa* é um monômero de 46 kDa (KUPPER et al., 1989).

O sítio ativo da tirosinase de *A. bisporus* contém dois sítios de ligação de cobre, Cu_A e Cu_B , os quais interagem com oxigênio molecular e resíduos de histidina (SEO; SHARMA; SHARMA, 2003). Conforme a valência do íon cobre e da ligação com o oxigênio molecular, este sítio ativo existe em três estados intermediários: *deoxy* ($CuI-CuI$), *oxy* ($CuII-O_2-CuII$) e *met* ($CuII-CuII$) (SÁNCHEZ-FERRER et al., 1995). Estes três estados determinam a capacidade da tirosinase de ligar-se aos seus substratos e, portanto, determinam a cinética da reação. A forma *met* da enzima predomina *in vivo* (JOLLEY et al., 1974). Esta forma pode se ligar a difenóis e, durante a reação subsequente, na qual ela oxida o difenol e libera *o*-quinona, é convertida na forma *deoxy*. A forma *deoxy* é capaz de ligar-se reversivelmente com oxigênio molecular,

produzindo a forma *oxy*, que pode agir em monofenóis e difenóis (SÁNCHEZ-FERRER et al., 1995; FENOLL et al., 2004).

Com respeito à cinética da reação, a segunda reação tipicamente segue a cinética e Michaelis-Menten, enquanto a análise da primeira reação é complicada pelo período *lag* durante o qual a enzima é convertida de sua forma *met* para sua forma *oxy*. A primeira etapa da reação pode sofrer inibição do substrato pela L-tirosina, o monofenol mais comumente utilizado para caracterizar sua cinética (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 1992).

2.4.4 Inibidores da Tirosinase de Cogumelos

Como visto na seção 2.4.3, as vias biossintéticas para a formação da melanina têm sido largamente investigadas (SÁNCHEZ-FERRER et al., 1995; SEO; SHARMA; SHARMA, 2003; FENOLL et al., 2004).

Muitas vezes durante a maturação ou colheita de plantas e cogumelos, ocorre escurecimento enzimático, o que causa perdas econômicas severas para a indústria de alimentos. Há diversos inibidores da tirosinase disponíveis no mercado, os mais comumente utilizados são os sulfitos. Inibidores da tirosinase, como a hidroquinona, também podem ser clinicamente usados para o tratamento de algumas disfunções associadas com a hiperpigmentação.

Estes inibidores podem ser sintéticos ou de fontes naturais, e podem inibir as atividades monofenolase ou difenolase ou mesmo ambas as atividades. Dos inibidores presentes nas plantas superiores, têm-se alguns flavonóides como kaempferol, quercetina, kurarinona e kushnol F (SEO; SHARMA; SHARMA, 2003). Outro importante grupo é o dos hidroxifenóis, que contém o ácido gálico, o qual ocorre como ésteres múltiplos com a D-glucose; estes ésteres são mundialmente utilizados na indústria de alimentos para inibir tirosinase e prevenir escurecimento. Vários derivados do ácido gálico têm sido isolados do chá verde, e alguns destes foram identificados como fortes inibidores da tirosinase (NO et al., 1999). Outro forte inibidor da tirosinase é o oxyresveratrol, que foi encontrado na amoreira branca

(*Morus alba*), e cuja atividade foi atribuída à presença de um número máximo de grupamentos hidroxila no anel (SHIN et al., 1998). O cuminaldeído (*p*-isopropilbenzaldeído) e o ácido cúmico (ácido *p*-isopropilbenzóico), provenientes de cominho foram identificados como potentes inibidores da tirosinase de cogumelo (KUBO; KINST-HORI, 1998).

Alguns compostos de fungos também têm sido reportados como inibidores da atividade da tirosinase. A metalotioneína de *Aspergillus niger* tem uma forte atividade anti-tirosinase por quelar o cobre presente no sítio ativo da enzima. Outro mecanismo possível para o efeito inibitório se deve à presença de aminoácidos contendo grupos sulfidrila na metalotioneína, o qual liga com *o*-quinonas para formar um tioéster sem coloração (GOETGHBEUR; KERMASHA, 1996; SEO; SHARMA; SHARMA, 2003). Trabalhos recentes mostraram que a agaritina proveniente de *A. bisporus* inibe a atividade da tirosinase *in vitro* e demonstrou inibição não competitiva de L-DOPA e inibição competitiva para L-tirosina (SEO; SHARMA; SHARMA, 2003).

Há diversos inibidores de origem sintética, dentre eles têm-se medicamentos como o captopril, uma droga antihipertensiva que também é capaz de prevenir a formação de melanina pela inibição irreversível de ambas as atividades monofenolase e difenolase, de maneiras competitivas e irreversíveis, respectivamente. O captopril também inibe a formação de melanina por gerar um conjugado sem cor com a *o*-quinona (ESPIN; WICHERS, 2001; SEO; SHARMA; SHARMA, 2003).

Outros compostos químicos, como o peróxido de hidrogênio, hidroxialanina, tiron, tióis, e ácidos carboxílicos aromáticos, têm sido reportados pela sua atividade antitirosinase. O peróxido de hidrogênio inativa a tirosinase de cogumelo de maneira bifásica em que a primeira fase é mais rápida que a segunda. A inativação da enzima pelo peróxido de hidrogênio depende da concentração e não depende do pH, e a inibição é mais rápida em condições anaeróbicas. Compostos queladores de cobre como o tropolone e a azida de sódio ou substratos análogos como a L-mimosina, L-fenilalanina, *p*-fluorfenilalanina e o benzoato de sódio protegem a enzima da inativação por H₂O₂. Compostos como a L-mimosina, ácido kójico, tropolone e resorcinol 4 substituído têm uma estrutura similar aos substratos fenólicos e mostram inibição competitiva com respeito a estes substratos e são conhecidos como inibidores

de ligação lenta. Os estudos sobre o mecanismo de reação destes inibidores sugerem que estes competem com a molécula de L-DOPA na ligação com a forma *oxy* da enzima, a qual é um intermediário obrigatório no *turnover* catalítico. Recentemente, o dimetil sulfito (DMS) foi caracterizado como sendo um inibidor da tirosinase e é o primeiro inibidor volátil da tirosinase. O DMS tem um papel fisiológico importante nos tecidos das plantas, inibe a tirosinase endógena, protegendo a planta de uma oxidação fenólica (SEO; SHARMA; SHARMA, 2003).

2.4.5 Aplicações da Tirosinase de Cogumelos

Os estudos iniciais das tirosinases de cogumelos foram motivados pelo desejo de entender e prevenir o escurecimento enzimático de cogumelos ou os vegetais, este escurecimento ocorre quando os alimentos são colhidos e manipulados e ocorrem na presença de ar. Recentemente o foco de estudo das tirosinases está voltado para seu uso em aplicações biotecnológicas e ambientais. As mais importantes aplicações da tirosinase são o seu uso na biossíntese de L-DOPA, a detecção e a quantificação de compostos fenólicos em águas, a remoção de compostos fenólicos de águas residuais e a formação de redes de proteínas ligadas (*Cross-linked protein*).

2.4.5.1 Uso da Tirosinase de Cogumelo para a Produção L-DOPA

Desde 1967, a L-DOPA (dihidroxi fenil-L-alanina) é a droga de preferência para o tratamento da doença de Parkinson (GELB; OLIVER; GILMAN, 1999). Ela também é usada para o controle do miocárdio após injúria neurogênica (HAQ; ALI; QADEER, 2002). O mercado mundial de L-DOPA é de aproximadamente 250 toneladas por ano (KOYANAGI et al., 2005). A maior parte da L-DOPA vendida é produzida a partir da vanilina e hidantoína por um processo químico que envolve oito passos de reação incluindo um de resolução enantiomérica, para separar os isômeros formados (REINHOLD; UTNE, 1987).

Alguns pesquisadores estudaram rotas biológicas para a produção de L-DOPA em sistemas que usam a célula inteira de diferentes microorganismos como

Escherichia coli (LEE et al., 1996), *Erwinia herbicola* (KOYANAGI et al., 2005) e *Aspergillus oryzae* (HAQ, ALI, QADEER, 2002; HAQ, ALI, 2006) para a transformação de L-tirosina em L-DOPA. Entretanto, a atividade específica destes processos é baixa, e tanto o substrato quanto o produto podem sofrer reações secundárias inadequadas e gerarem outros metabólitos (HAQ, ALI, QADEER, 2002).

O baixo desempenho destes sistemas de células inteiras estimulou pesquisas com a tirosinase em sistemas livres de células. A grande maioria dos estudos utiliza a tirosinase de cogumelo *A. bisporus*, comercializada pela companhia Sigma. As produtividades de L-DOPA que foram obtidas em batelada usando tirosinase imobilizada foram de 1,44 a 54 mg/(L.h) (Tabela 1) (PIALIS; SAVILLE, 1998; CARVALHO; ALVES; FREIRE, 2000; SEETHARAM; SAVILLE, 2002; HO; CHIOU; CHAO, 2003; ATEES et al, 2007). Infelizmente, estas produtividades são relativamente baixas, isto ocorre principalmente por dois fatores. Primeiro, a conversão de L-tirosina em L-DOPA adicionada é incompleta, sendo que menos de 30% é consumido durante o processo. Segundo, apesar de parte das reações secundárias com a tirosina serem evitadas em sistemas enzimáticos, parte da L-DOPA produzida é perdida com a segunda reação catalisada pela tirosinase, o que produz dopaquinona (Figura 2). Esta dopaquinona isomeriza espontaneamente para leucodopacromo, o qual reage com uma segunda molécula de dopaquinona, regenerando uma molécula de L-DOPA, mas também produzindo uma molécula de dopacromo, o qual polimeriza espontaneamente para produzir melanina. Para minimizar a produção de melanina O L-ascorbato de sódio é adicionado no meio de reação, este composto reduz a dopaquinona novamente em L-DOPA, numa reação não enzimática (Figura 2). Entretanto, em altas concentrações o ascorbato não só inibe a atividade de cresolase responsável pela síntese de L-DOPA, mas também inativa irreversivelmente a tirosinase. O L-ascorbato deve ser adicionado nas mesmas concentrações que a L-tirosina (PIALIS; SAVILLE, 1998). O problema é que o L-ascorbato é consumido durante o processo. Embora ele possa ser adicionado continuamente no meio reacional, procurando-se assim manter a sua concentração constante, isto não resolveria o problema, pois o acúmulo de fenóis no meio poderia ativar de qualquer maneira a via de formação da melanina (ROS et al., 1994).

Entre os resultados mostrados na tabela 1, destaca-se o trabalho de Ates et al. (2007). Os autores usaram tirosinase imobilizada em géis de alginato de cobre; trabalharam com um sistema contínuo em leito fixo e outro em reator simples de batelada. No leito fixo, eles obtiveram uma produtividade de 110 mg/(L.h) de L-DOPA quando o ar foi borbulhado no leito, esta produtividade foi 22 vezes maior que aquele que utilizou o reator em batelada, no qual o ar não foi borbulhado (ATES et al, 2007). O resultado de dois efeitos explica o porquê da grande produtividade no leito fixo com aeração. Primeiro, a relação entre a quantidade de enzima imobilizada e o meio de reação foi de 9,7 g para 2,4 mL no leito fixo e 2,4 g para 50 mL para o reator em batelada. A razão foi aproximadamente 80 vezes maior no leito fixo. Levando em conta que o tempo de residência foi aproximadamente 15 vezes menor no leito fixo, seria esperada uma produtividade aproximadamente 5 vezes maior no leito fixo do que no reator em batelada. Segundo, em estudos no leito fixo, o borbulhamento de ar propiciou uma produtividade 5 vezes maior do que na ausência de aeração. O aumento no grau de reação com a aeração ocorre devido à presença do oxigênio molecular, que é um substrato na reação. O produto destes dois efeitos é aproximadamente 25 vezes, bem próximo ao aumento de produtividade de 22 vezes que foi obtido experimentalmente.

Apesar do progresso na utilização da tirosinase na produção de L-DOPA, outro processo enzimático envolvendo a tirosina fenol liase (TPL) se mostrou mais eficiente. TPL transforma uma mistura de piruvato, amônia e catecol em L-DOPA, utilizando uma reação diferente. Uma vantagem é que esta enzima não possui a atividade de difenolase, portanto não reage com a L-DOPA produzida. A indústria Ajinomoto recentemente implantou um processo livre de células que usa a TPL de *Erwinia herbicola* e alcançou uma concentração de DOPA de 110 g/L após 36 horas de reação (SWISS INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, 2007).

TABELA 1. PRODUTIVIDADE DE L-DOPA UTILIZANDO TIROSINASE IMOBILIZADA EM DIFERENTES SUPORTES

Método de imobilização	Produtividade (mg/(L.h)	Fonte
Adsorção em nylon 6,6	33 (7 h em batelada)	(PIALIS; SAVILLE, 1998)
Aprisionamento em gel de alginato de cobre	4,5 (em reator de batelada) 110 (em leito fixo com aeração)	(ATES et al, 2007)
Adsorção em zeolitos	34 (7 horas em batelada)	(SEETHARAM; SAVILLE, 2002)
Adsorção em estireno de poliamino-poliestireno (PSNH) e estireno de polimetilclorido (PSCL)	1,4 para PSNH e 2,33 para PSCL em 30 °C 3,9 para PSNH em 60 °C 5,5 para PSCL em 70 °C (usando um reator em batelada)	(HO; CHIOU; CHAO, 2003)
Adsorção em suporte de quitosana	54 (com os flocos de quitosana usando gluteraldeido como agente ligante e em um reator em batelada)	(CARVALHO; ALVES; FREIRE, 2000)

2.4.5.2 Uso da Tirosinase na Detecção e Quantificação de Compostos Fenólicos

As indústrias têxtil, químicas, petroquímicas, mineradoras e de produção de papel produzem resíduos líquidos que muitas vezes contém fenóis e derivados de fenóis (LEE et al., 1996, YAMADA et al. 2005, CHIACCHIERINI; RESTUCCIA; VINCI, 2004). Leis ambientais cada vez mais rigorosas estão gerando uma necessidade do desenvolvimento de técnicas analíticas para o monitoramento rápido destes compostos. As análises tradicionalmente utilizadas são baseadas em métodos espectrofotométricos ou cromatográficos. As novas técnicas que estão sendo desenvolvidas incluem a eletroforese capilar, os imunoenaios e biossensores. Estes métodos apresentam maior especificidade e custos mais baixos, além de um rápido e simples processamento das amostras (YAMADA et al. 2005).

Novos biossensores, para a detecção de compostos fenólicos, são baseados na reação destes compostos com a tirosinase de cogumelo imobilizada. A imobilização é essencial porque assegura o contato entre a enzima e o detector de sinal e também previne que a enzima seja lavada do detector quando a leitura é feita em amostras aquosas (TEMBE et al., 2006). A detecção e a quantificação da reação com o biossensor são baseadas em diferentes princípios, como na detecção do consumo de oxigênio (CAMPANELLA; SAMMARTINO; TOMASSETTI, 1992), redução direta da *o*-quinona (LI et al. 1998; HALL; BEST, 1988; LUTZ et al., 1995; WANG; LU; LOPEZ, 1994; ÖNNERFJORD et al., 1995) ou redução da *o*-quinona usando um mediador redox como hexacianoferrato (BONAKDAR; VILCHEZ; MOTTOLA, 1998).

O maior obstáculo para a comercialização destes biossensores é a relativamente baixa estabilidade que a tirosinase imobilizada tem nas condições de operação e armazenamento. O principal fato que leva à instabilidade de biossensores com tirosinase é que as quinonas podem formar radicais intermediários, tanto nas reações enzimáticas quanto nas reações eletroquímicas, e estes radicais prontamente reagem e polimerizam para produzir compostos aromáticos que podem inativar a enzima e danificar o eletrodo (NISTOR et al., 1999).

Outro desafio para o desenvolvimento de biossensores é assegurar que as análises possuam um custo competitivo e que sejam adequadas para um grande número de amostras. Provavelmente a principal vantagem dos biossensores com tirosinase é que eles poderiam ser utilizados *in situ*, permitindo assim checagens rápidas das condições do ambiente ou resíduo analisado.

2.4.5.3 Uso da Tirosinase na Remoção de Compostos Fenólicos e Bio-remediação

A presença de compostos fenólicos em água potável e água de irrigação ou em terra cultivada representa um perigo significativo dos pontos de vista da saúde e ambiental. Nos últimos anos, métodos para a remoção e a transformação de compostos fenólicos têm recebido atenção. Numerosos métodos convencionais têm sido utilizados para remover fenóis de resíduos líquidos industriais, sendo estes métodos baseados em princípios químicos ou físicos como extração por solvente, oxidação química e

adsorção por carbono ativado (LEE; HONG; SUNG, 1996). Porém estes métodos geralmente envolvem altos custos de operação e não removem completamente os fenóis (LOH; TAN, 2000). Além disso, eles podem gerar problemas secundários em termos de efluentes. Por exemplo, os fenóis clorados que são produzidos pelos processos químicos podem ser mais tóxicos que os compostos originais (TOSCANO; COLARIETI; GRECO, 2003). Alguns métodos químicos e físicos, como oxidação e adsorção, têm seu custo justificado somente em águas com altas concentrações de fenol (LUKE; BURTON, 2001; SEETHARAM; SAVILLE, 2003).

Devido as desvantagens dos métodos físicos e químicos, métodos enzimáticos e microbiológicos têm sido investigados (CHIACCHIERINI; RESTUCCIA; VINCI, 2004). Processos enzimáticos têm ao menos três vantagens potenciais em relação a tratamentos biológicos convencionais. Primeiro, eles não necessitam de período de aclimatização. Segundo, eles sofrem menos que os microorganismos com relação a cargas elevadas de compostos tóxicos. Terceiro, eles são altamente específicos e não geram produtos colaterais indesejados (BEVILAQUA et al, 2002).

Métodos enzimáticos são baseados em enzimas oxidativas como peroxidases e fenoloxidasas (DURÁN; ESPOSITO, 2000). Peroxidases, apesar de utilizadas comercialmente, exigem peróxido de hidrogênio como um co-substrato, o que complica o processo e aumenta seus custos (IKEHATA; NICELL, 2000; ENSUNCHO; ALVAREZ-CUENCA; LEGGE, 2005). Fenoloxidasas incluem lacases e tirosinases. Estas apresentam a vantagem de poderem reagir com oxigênio molecular sem a necessidade de co-substratos, o que reduz os custos. Adicionalmente, quando tirosinases oxidam fenóis e outros compostos aromáticos em resíduos líquidos, tipicamente o produto oxidado será polimerizado, formando compostos insolúveis que podem ser removidos por filtração ou precipitação (CHIACCHIERINI; RESTUCCIA; VINCI, 2004).

Diversos estudos têm envolvido tirosinases de cogumelos para a remoção de fenóis de resíduos líquidos. Edwards et al. (1999) imobilizaram tirosinase de cogumelos comerciais em membranas polisulfonadas revestidas com quitosana por meio de um biorreator capilar e usaram este sistema para oxidar uma gama de fenóis presente em efluentes sintéticos e industriais. A remoção foi eficiente até mesmo em

baixas concentrações de fenol, o que tipicamente é uma dificuldade para métodos físicos e químicos. Adicionalmente, a quitosana adsorve *o*-quinonas geradas durante a reação, com isso reduz a inativação da enzima. Ensuncho et al. (2005) utilizaram tirosinase de *A. bisporus*, imobilizada em um suporte de quitosana-alginato, em biorreatores em escala de bancada e piloto, nos quais ar foi borbulhado no meio. Mais que 92% do fenol foi removido no reator em escala de bancada, e 60% no reator em escala piloto.

2.4.5.4 Uso da Tirosinase na Produção de Biopolímeros com Ligações Cruzadas

A indústria de alimentos tem interesse em desenvolver novos biopolímeros com propriedades específicas, para uso não somente como agentes emulsificantes e espessantes, mas também como componentes de alimentos de baixa caloria e reduzido teor de gordura. A formação de ligações cruzadas entre polímeros naturais pela tirosinase de cogumelos tem o potencial para produzir estes novos biopolímeros.

A tirosinase forma *o*-quinonas da tirosina e estas *o*-quinonas conseguem fazer ligações cruzadas entre proteínas, pela reação com seus grupos amino e sulfidril (MATHEIS; WHITAKER, 1987). Halaouli et al. (2005) utilizaram esta capacidade para formar uma rede de proteína da caseína, usando a tirosinase de *Pycnoporus sanguineus*. O ácido caféico foi oxidado pela tirosinase, a *o*-quinona formada agiu como adjuvante (*cross-linker*) na produção de conjugados de proteínas feitos com lisozima, alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina (THALMANN; LÖTZBEYER, 2002). Anghileri et al. (2007) empregaram tirosinase para produzir conjugados de sericina, um peptídeo encontrado nos resíduos líquidos das indústrias têxteis de seda.

Além disso, a tirosinase foi usada na produção de um biopolímero polissacarídeo-proteína a partir de gelatina e quitosana (CHEN et al., 2002). Neste processo, a tirosinase oxidou os resíduos de tirosina da gelatina, que então reagiram com os grupos amino disponíveis da quitosana. Os géis gelatina-quitosana formados apresentaram propriedades químicas e físicas diferentes dos géis de gelatina.

2.4.6 Produção, Purificação e Imobilização de Tirosinases de Cogumelos

Mesmo que seja pouco provável a viabilidade comercial do processo de produção de L-DOPA utilizando tirosinase, outras aplicações da tirosinase vêm sendo estudadas e criam potencialmente uma demanda para esta enzima. Tirosinases de cogumelos são candidatas naturais para o estabelecimento de um processo comercial, visto que muitos dos estudos laboratoriais envolveram enzimas deste grupo de organismos.

A presente seção resumidamente relaciona alguns dos trabalhos mais relevantes referentes à produção e purificação de tirosinase de cogumelos. Nos dias atuais muitos pesquisadores usam a tirosinase de fontes comerciais ou extraem a enzima dos corpos de frutificação dos cogumelos. A enzima vendida pela empresa Sigma é principalmente extraída do cogumelo *A. bisporus* e purificada como descrito por Kertesz e Zito (1965).

2.4.6.1 Produção de Tirosinase em Cultura

Uma vez que os estudos sobre as aplicações da tirosinase de cogumelo mostrem resultados promissores, grandes quantidades de tirosinase serão requeridas, portanto será necessário aperfeiçoar a produção de tirosinase a partir da cultura micelial, quer em cultura submersa quer em fermentação no estado sólido. Tais estudos não estão sendo feitos visando a produção de tirosinase, contudo diversos basideomicetos produtores de tirosinase estão sendo cultivados em biorreatores para a produção de outros produtos. O conhecimento gerado nestes estudos será útil caso seja decidido utilizar um destes macrofungos para a produção comercial de tirosinase.

Resultados qualitativos com culturas de basideomicetos em placas de Petri podem prover entendimentos sobre as condições necessárias para estimular a produção de tirosinase em cultivo submersos. Por exemplo, tirosinase esta envolvida na produção de DOPA-melanina e a produção desta melanina em placas pode ser estimulada por temperaturas altas ou pela presença de contaminantes no meio (SCORE; PALFREYMAN; WHITE, 1997; FARIA, 2004). Estes resultados sugerem que talvez

seja possível iniciar o crescimento micelial na temperatura ótima e mudar a temperatura de cultivo para estimular a produção de tirosinase; outra alternativa é adicionar extratos de organismos antagonistas no meio de cultura. Entretanto, tais estratégias ainda não foram testadas em cultivo submerso.

O único estudo reportado sobre a produção de tirosinase em cultura submersa de um basidiomiceto foi realizado por Halaouli, Asther e Kruus (2005), no qual foi produzida tirosinase intracelular de varias cepas de *Pycnoporus cinnabarinus* e *Pycnoporus sanguineus*, crescido em frascos de Erlenmeyer contendo um meio líquido de maltose, extrato de levedura, sais e vitaminas. *P. sanguineos* CBS 614.73 foi apontado como o melhor produtor de tirosinase, alcançando uma produtividade da atividade monofenolase de 45 U/(g.dia) e uma produtividade da atividade difenolase de 164 U/(g.dia) (U por gramas de extrato bruto por dia). A maior atividade de tirosinase foi alcançada depois de uma semana, quando a maltose foi totalmente consumida.

Apesar de não haver estudos focados na otimização da produção de tirosinase em culturas miceliais de basideomicetos, uma estratégia que inclui expressão heteróloga desta enzima já foi testada. Halalouli et al. (2006) notaram que *P. sanguineus* BRFM49 produzia tirosinase intracelular em níveis relativamente baixos. Estes autores clonaram o gene desta tirosinase em *Aspergillus niger*, a secreção da tirosinase foi estimulada pela fusão de uma pré-seqüência de glucoamilase de *A. niger* na região N-terminal da tirosinase. O *A. niger* recombinante foi capaz de produzir atividades de monofenolase e difenolase de 534 e 1,67 U/L (U por litro de meio de cultivo), respectivamente. Esta estratégia de expressão heteróloga parece ser promissora para a obtenção de altos níveis de tirosinase de cogumelos e a secreção da enzima para o meio de cultura facilita sua recuperação e purificação. Trabalhos com microfungos mostraram o potencial desta estratégia: Selinheimo et al. (2006) usaram o promotor *cbh1* para uma superexpressão homóloga do gene *tyr2* de *Trichoderma reesei*, obtendo concentrações de tirosinase de 1 g/L de meio de cultura.

2.4.6.2 Extração e Purificação da tirosinase de macrofungos

Quando a tirosinase é produzida a partir do corpo de frutificação ou por cultivo, são necessárias sua recuperação e purificação. No caso de corpos de frutificação, cogumelos congelados são homogeneizados em liquidificador e então passados por uma prensa francesa (*French press*) (BOUCHILLOUX; MCMAHILL; MASON, 1963; HOROWITZ; FLING; HORN, 1970). Acetona e sulfato de amônio em pó são adicionados para precipitar a enzima e outras proteínas (BOUCHILLOUX; MCMAHILL; MASON, 1963; HOROWITZ; FLING; HORN, 1970; MULLER, 1996; FARIA, 2004). O material é ressuspenso e passado por uma ou mais colunas cromatográficas, melhorando assim o grau de purificação. As colunas cromatográficas mais comumente utilizadas contêm hidroxapatita (BOUCHILLOUX; MCMAHILL; MASON, 1963), DEAE-Cellulose (FAN; FLURKEY, 2004; KATAN; GALUN, 1975) ou DEAE-Sepharose (HALAOULI; ASTHER; KRUUS, 2005), além destes, vários outros recheios têm sido usados, como resina de imunoafinidade (KHAN; AKHTAR; HUSAIN, 2005) e gel de Sephadex (MULLER et al., 1996, WICHERS; GERRITSEN; CHAPELON, 1996). SDS-PAGE é usado para monitorar a eficiência do processo durante os passos de purificação (MULLER et al., 1996; LAEMMLI, 1970). Até o momento não foi realizado nenhum estudo comparativo sobre os diferentes métodos, portanto é difícil definir qual seria o melhor protocolo de purificação da enzima.

2.4.6.3 Imobilização da Tirosinase

A maioria das aplicações da tirosinase requer a imobilização da enzima, o qual permite que a enzima seja utilizada repetidamente. É desejável que a preparação imobilizada possua uma alta estabilidade frente a desnaturantes químicos, mudanças de pH e altas temperaturas.

A maior produtividade em processo por batelada para a produção de L-DOPA foi obtida quando a tirosinase foi imobilizada por adsorção em várias formas de zeolito. Estes resultados não foram obtidos somente devido à grande área de superfície, mas também por que os zeolitos são excelentes seqüestradores de radicais

livres, o que aumenta a estabilidade da tirosinase (SEETHARAM; SAVILLE, 2002). Nos casos dos biossensores para fenóis e do tratamento de resíduos líquidos, a enzima tem sido imobilizada em vários suportes e eletrodos:

- Eletrodo de carbono vitrificado revestido com uma membrana de gel Al_2O_3 (LIU et al., 2000);
- Eletrodo de carbono vitrificado modificado com nanopartículas de ouro eletrodepositadas (SANZ et al., 2005);
- Eletrodo de pasta de carbono (LI et al., 1998; NISTOR et al., 1999; ORTEGA et al., 1994);
- Eletrodo de grafite (HALL; BEST; TURNER, 1988; YAROLOV et al., 1995);
- Eletrodo de grafite revestido com quitosana (WANG et al., 2002);
- Eletrodo de pasta de carbono com sua superfície modificada por eletropolimerização (BESOMBES et al., 1995);
- Eletrodo de compósito de pasta de carbono (VIDAL et al., 2006);
- Eletrodo de pasta de carbono com um filme de polivinil álcool (KIM et al., 2007).

Entretanto, alguns destes métodos de imobilização são complicados e não fornecem boa estabilidade a enzima ou sua adequada retenção (YAHSI, et al., 2005). Os eletrodos de grafite com tirosinase imobilizada são considerados os mais sensíveis, sendo capazes de detectar fenóis e catecóis em concentrações micromolares (SEO, SHARMA; SHARMA, 2003). Estes eletrodos combinam uma alta versatilidade com baixos custos, suas superfícies são facilmente regeneradas e o ruído é baixo (LUTZ et al., 1995; KIM et al., 2007).

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Esta tese almeja contribuir para uma avaliação do potencial biotecnológico do macrofungo neotropical *Lentinula boryana*, no que diz respeito a seus polissacarídeos e à enzima tirosinase, sendo que estes dois produtos têm aplicações importantes, conforme demonstrado na revisão. A revisão também demonstrou que existe uma literatura restrita sobre este fungo e seus produtos. No caso dos polissacarídeos, o único trabalho anterior com este fungo foi a dissertação de mestrado do próprio doutorando. No caso da tirosinase, não existe nenhum estudo anterior sobre a produção desta enzima pelo *Lentinula boryana*.

Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi o de aprofundar e ampliar a caracterização de polissacarídeos produzidos por *L. boryana*, bem como produzir e caracterizar a tirosinase do micélio do macrofungo.

Os objetivos específicos deste trabalho com o *L. boryana* foram:

- Verificar o crescimento micelial e a produção de exopolissacarídeos pelo macrofungo em meio líquido;
- Purificar e caracterizar estruturalmente estes exopolissacarídeos;
- Isolar e caracterizar os polissacarídeos presentes nos corpos de frutificação do cogumelo;
- Produzir, isolar e caracterizar e avaliar a cinética da tirosinase produzida pelo micélio do macrofungo.
- Modelar matematicamente a tirosinase, adaptando um modelo proposto na literatura às características encontradas na tirosinase do macrofungo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ORIGEM E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS UTILIZADAS

A linhagem do cogumelo *Lentinula boryana* utilizada nos trabalhos é proveniente da coleção de culturas de macrofungos da Embrapa Florestas-PR. Esta linhagem foi originalmente isolada no Laboratório de Microbiologia da Embrapa Florestas, a partir de material silvestre procedente do morro do Anhangava, município de Quatro Barras, Paraná, coletado e identificado pelo micólogo André de Meijer em 15 de agosto de 1999. A linhagem foi re-isolada, em 09 de setembro de 2002, do corpo de frutificação proveniente em tora de *Eucalyptus grandis*, de um experimento de produção instalado na Embrapa Florestas.

As culturas estoque foram mantidas em placas com meio ágar batata dextrose, adicionado de 2% de extrato de malte, sob refrigeração a 4 °C. A cada 90 dias as culturas foram repicadas para novas placas com o mesmo meio e incubadas a 20 °C, até a cobertura total da placa pelo micélio do macrofungo.

Os corpos de frutificação que foram utilizados nos experimentos de purificação e caracterização de polissacarídeos são originárias de cultivo em toras *Eucalyptus* spp. do experimento citado anteriormente.

4.2. TÉCNICAS PARA CULTIVO DE *L. boryana* EM MEIO LÍQUIDO

4.2.1 Preparo do Inóculo

O pré-inóculo foi preparado a partir de culturas estoque, mantidas em placas conforme descrito no item 4.1. Um novo meio, idêntico ao das culturas estoque, foi preparado, esterilizado e colocado em placas de Petri com 150 mm de diâmetro interno. Após a gelificação, foram inoculados nove discos (6 mm cada) da cultura estoque do fungo. Então as culturas foram incubadas no escuro a 20 °C. Após 14 dias as placas foram retiradas, nelas foram adicionados 15 ml de água destilada, em seguida foram feitas raspagens da superfície do micélio crescido com alça de platina em forma de triângulo. Esta suspensão de micélio foi transferida para um erlenmeyer de 250 ml

previamente esterilizado. A superfície do meio foi lavada com 15 ml de água destilada, sendo posteriormente adicionados à suspensão de micélio. Esta suspensão de micélio foi denominada de pré-inóculo.

O inóculo foi preparado utilizando um meio líquido proposto por FANG e ZHONG (2002) com algumas adaptações, os valores a seguir são referentes às concentrações dos substratos em g/L: glucose (Labsynth) 35,0; peptona (Biobrás) 5,0; extrato de malte (Biobrás) 5,0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Labsynth) 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Labsynth) 0,5; cloridrato de tiamina (Nuclear) 0,05. As diferenças entre o meio utilizado e o proposto pelos autores (FANG E ZHONG, 2002) foram a utilização de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ao invés de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e o uso de extrato de malte ao invés de extrato de levedura, devido ao melhor desenvolvimento do fungo com extrato de malte (FARIA, 2004). Todos os materiais foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. As soluções de glucose (10 ml) foram esterilizadas em tubos de ensaio e os demais substratos (80 ml) foram esterilizados em erlenmeyers de 250 mL. Após o resfriamento à temperatura ambiente, os substratos foram misturados e foram adicionados 10 mL do pré-inóculo. As culturas foram mantidas, sem agitação, no escuro a 20 °C por 25 dias. Estas culturas foram utilizadas como inóculo nos experimentos.

4.2.2. Cultivo em Meio Líquido com Agitação

Nestes experimentos, foram utilizados os mesmos procedimentos e o mesmo meio líquido descrito no item 4.2.1, com algumas alterações: foi utilizado como inóculo todo o micélio desenvolvido nos erlenmeyers de 250 mL (21 dias de cultivo sem agitação). O micélio foi separado do meio por filtração em peneira de aço inox. Este micélio, juntamente com 20 mL de água destilada estéril, foi colocado em liquidificador com copo de aço inoxidável e triturado por 7 segundos. Esta suspensão de micélio foi filtrada em peneira e o material foi coletado em proveta graduada. O volume de suspensão foi completado para 250 mL com água destilada. A suspensão de micélio foi transferida para erlenmeyer e foi chamado de inóculo. Foram utilizados 10 mL do inóculo para cada 90 mL de meio novo. Nestes experimentos os erlenmeyers

foram mantidos no escuro, sob agitação em agitador orbital (120 rpm), a 20 °C. Os tempos de cultivo variaram conforme o experimento.

4.2.3 Primeiro experimento de cultivo de *L. boryana* em meio líquido (Cultivo I)

Neste experimento inicial, foram analisados os seguintes parâmetros: crescimento micelial (massa micelial seca); consumo de glucose do meio; produção de exopolissacarídeos; atividade enzimática (tirosinase) do micélio; alteração do pH do meio de cultivo.

Foram preparados 24 erlenmeyers (250 mL), cada um com um volume total de meio de 90 mL, conforme descrito no item 4.2.1. Nestes frascos foram inoculados 10 mL de suspensão de micélio. Os frascos foram mantidos em agitação (120 rpm) e a cada 7 dias, três deles foram retirados e submetidos aos seguintes procedimentos:

- Determinação do pH do meio em pHmetro;
- Retirada de uma amostra do meio líquido (1,5 mL) para posterior quantificação da glucose, estas amostras foram armazenadas à -20 °C.
- O micélio do meio foi separado do meio por filtração em papel filtro sob pressão reduzida. O micélio, de cada frasco, foi lavado com 50 mL de água destilada, para retirada dos exopolissacarídeos a ele aderidos. O micélio foi seco por liofilização e sua massa determinada em balança analítica. Em seguida, o micélio foi armazenado a -20 °C, para posteriores análises.
- O meio de cultivo e a água de lavagem foram reduzidos de volume em rotavapor. Os polissacarídeos e demais macromoléculas do meio foram precipitados com 3 vezes o volume de etanol gelado. No momento da adição do etanol, foi observada a presença ou ausência de precipitados consistentes, ou seja, precipitados que poderiam ser retirados do meio enrolando-os em um bastão de vidro. Estes precipitados foram chamados de Polissacarídeos-bastão. Depois da adição do etanol gelado e da retirada do precipitado-bastão, a mistura foi mantida a -20 °C *overnight*. Após este período, o material precipitado remanescente foi separado do

meio por centrifugação. Este material precipitado foi chamado de Precipitado-centrifugação. Os precipitados obtidos foram lavados com etanol absoluto (99%) e então liofilizados, pesados e armazenados a -20°C . O somatório das massas do Polissacarídeo-bastão e do Precipitado-centrifugação foi denominado de Precipitado-total.

4.2.4. Efeito da Alimentação de Glucose no Crescimento Micelial (Cultivo II)

Os procedimentos utilizados foram iguais aos descritos nos itens 4.2.2. e 4.2.3., apenas foram feitos três tratamentos diferentes:

- No primeiro grupo de frascos o meio continha todos os nutrientes;
- No segundo grupo não foi adicionado a glucose ao meio;
- No terceiro grupo foi adicionado glucose (35 g/L), após 22 dias de cultivo.

Os primeiros três frascos (primeiro ponto) de cada tratamento foram retirados após oito dias de cultivo e os demais pontos foram retirados a cada sete dias. Neste experimento, foram avaliados os seguintes parâmetros: massa micelial seca, consumo de glucose, pH e produção de exopolissacarídeos.

4.2.5 Composição Monossacarídea dos EPS Obtidos nos Cultivos (I, II)

Foi determinada a composição monossacarídica dos polissacarídeos obtidos durante os Cultivos. Para isto foram selecionadas as amostras:

- CI35DF15 (Cultivo I);
- CII 36DF21; CII 36DF20; CII 36DF4 (Cultivo II);

4.3. ESTUDOS QUÍMICOS DOS POLISSACARÍDEOS DE *L. boryana*

4.3.1 Obtenção e Purificação do Exo-polissacarídeo produzido por *L. boryana*

O cultivo de *L. boryana* em meio líquido, conforme descrito no item 4.2.2., foi mantido em agitação por 30 dias consecutivos. Após este período, o micélio foi separado do meio por filtração sob pressão reduzida em papel de filtro qualitativo. O micélio foi lavado com água destilada três vezes. O meio de cultivo e a água de lavagem do micélio foram agrupados e reduzidos de volume em evaporador rotatório. O material foi submetido ao processo de gelo e degelo, resultando em uma fração solúvel em água e outra insolúvel. O material insolúvel foi dialisado por 24 horas em sacos de diálise MWCO (*molecular weight cut-off*) de 6 a 8 kDa. Este material foi denominado Extrato Bruto. O Extrato Bruto foi tratado com reativo de Fehling, conforme item 4.3.8.5. O material solúvel em Fehling foi submetido a 5 processos seguidos de gelo e degelo. O material precipitado foi solubilizado com solução 2 M de NaOH e novamente dialisado e liofilizado. O material foi congelado e degelado por mais cinco vezes. O processo de purificação foi monitorado por análise da RMN-¹³C e pela composição monossacarídica e HPSEC.

4.3.2 Obtenção e Purificação de Polissacarídeo dos Corpos de Frutificação de *L. boryana* (Experimento I)

Neste experimento os cogumelos secos e moídos (25 gramas) foram extraídos inicialmente com solução de metanol:clorofórmio (1:1) sob agitação, em temperatura ambiente, por 8 horas. O resíduo obtido foi extraído em água fervente por 2 h. O Extrato Aquoso 1 foi reduzido de volume em rotavapor e precipitado com 3 volumes de etanol absoluto. O precipitado foi separado do meio líquido por centrifugação, sendo posteriormente ressolubilizado em água e dialisado em membrana de diálise com poros de limite de exclusão de 6 a 8 kDa MWCO. A solução contendo os precipitados foi congelada e descongelada, gerando um sobrenadante e um precipitado em água fria (4 °C). O precipitado formado foi tratado com solução de Fehling,

conforme descrito no item 4.3.8.5. O material precipitado com reativo de Fehling foi novamente dialisado e submetido a um novo processo de gelo e degelo e outra precipitação com reativo de Fehling. Esta amostra, denominada PF2-CLbS, foi submetida a uma ultrafiltração em membrana com poros com limite de exclusão de 300 kDa. Esta ultrafiltração foi repetida com a fração retida na membrana. O material eluído no primeiro processo foi, então dialisado em membrana com limite de exclusão de 30 kDa. Neste processo de ultrafiltração, foi utilizado nitrogênio gasoso para fornecer a pressão necessária para a eluição da amostra pela membrana. O processo de purificação foi monitorado pela composição monossacarídica dos polissacarídeos obtidos, por RMN-¹³C e por HPSEC.

4.3.3 Extração de Polissacarídeos dos Corpos de Frutificação de *L. boryana* (Experimento II)

Neste Experimento II foram utilizados outros 100 g de cogumelos secos e moídos, estes cogumelos utilizados foram provenientes de uma outra colheita e ficaram armazenados em sacos plásticos lacrados e “sem” ar, na temperatura ambiente. O esquema do processo de extração utilizado está mostrado na figura 3. A amostra de cogumelos foi submetida a uma deslipidificação com solução de metanol:clorofórmio (1:1). O resíduo deste processo foi extraído com água fervente por diversas vezes até que não fosse verificado a presença de açúcares no extrato, o que foi monitorado pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O resíduo da extração com água fervente foi extraído com solução de KOH 1% fervente até reação negativa do extrato com fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O resíduo da extração anterior foi extraído com solução da KOH 10% até que não fosse verificada a presença de açúcares no extrato. Nas extrações com álcalis, foram adicionados 100 mg de boroidreto (NaBH₄).

Os extratos obtidos foram acidificados com ácido acético glacial, até pH 4,5. Quando ocorreu precipitação com ácido, a mistura foi centrifugada a 10.000×g. O material precipitado e o sobrenadante foram dialisados, congelados e liofilizados. Quando não ocorreu a precipitação com ácido acético, a solução foi dialisada e

reduzida de volume em rotavapor, estes extratos foram denominados Extrato Aquoso 2, Extrato KOH 1% e Extrato KOH 10%

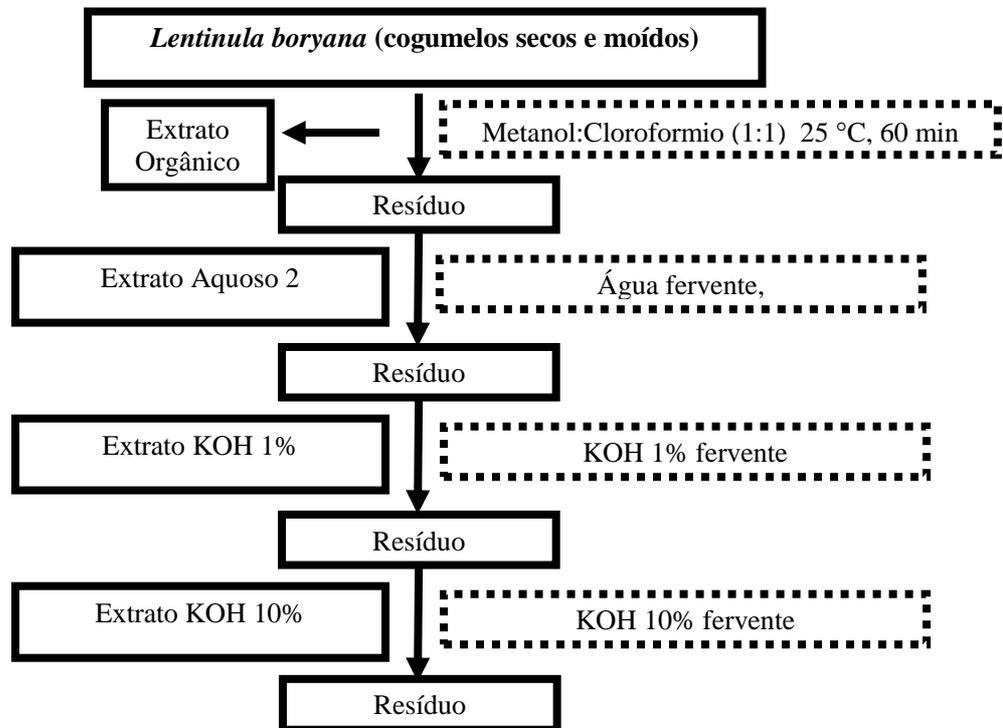


FIGURA 3- ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE *L. boryana*

4.3.4 Processo de Purificação de Polissacarídeos do Extrato KOH 1%

O Extrato KOH 1% foi submetido a procedimentos de purificação. O Extrato KOH 1% foi precipitado com etanol absoluto (3 volumes), foi submetido a um processo de gelo e degelo. O material solúvel no gelo e degelo foi precipitado com Reativo de Fehling (item 4.3.8.5). Após a segunda precipitação com reativo de Fehling, o material foi passado seqüencialmente em duas membranas de diálise com poros com limite de exclusão de 1000 kDa e 500 kDa. O material retido na segunda membrana (500 kDa) foi aplicado em uma coluna de DEAE-Sepharose, a qual foi eluída com água e concentrações crescentes de solução de NaCl. As frações obtidas foram analisadas quanto a composição monossacarídica dos polissacarídeos, por RMN-¹³C e por HPSEC.

4.3.5 Processo de Purificação de Polissacarídeos do Extrato Aquoso 2

O processo de purificação de polissacarídeos extraídos com água fervente foi similar ao utilizado com o extrato KOH 1%, apenas foi feita uma coluna de troca iônica após a diálise em membrana com poros com limite de exclusão de 1000 kDa.

4.3.6 Processo de Purificação de Polissacarídeos do Extrato KOH 10%

Diferentemente dos demais extratos, no Extrato KOH 10% ocorreu precipitação quando foi feita a adição de ácido acético até pH 4,5. O precipitado foi submetido ao processo de congelamento e degelo. A porção insolúvel na água fria (etapa anterior) foi solubilizada em solução de KOH 10% e precipitada novamente com ácido acético. O precipitado obtido foi solubilizado parcialmente com a solução A do reativo de Fehling. O precipitado e o sobrenadante foram separados por centrifugação a 8.000×g. Ao sobrenadante foi adicionada a Solução B de Fehling, gerando uma fração precipitada e outra solúvel no reativo de Fehling. A suspensão formada foi separada por centrifugação. O material solúvel foi novamente acidificado com ácido acético até pH 4,5. O precipitado obtido foi dialisado, liofizado e analisado por RMN-¹³C e metilação.

4.3.7 Reprocessamento das Frações Solúveis e Precipitadas no Reativo de Fehling do Extrato KOH 1%

Para melhorar o grau de purificação dos polissacarídeos presentes no extrato obtido com KOH 1%, as frações precipitadas e não precipitadas com reativo de Fehling foram novamente submetidas a um exaustivo processo de gelo e degelo. Este processo gerou amostras solúveis (PF-SOL e SF-SOL), amostras que formaram um gel (PF-GEL e SF-GEL) e amostras que ficaram insolúveis na forma de um pó no fundo dos recipientes (PF-PÓ e SF-PÓ). A amostra PF-PÓ foi submetida a mais dois processos de precipitação com reativo de Fehling, gerando frações solúveis e precipitadas. A amostra PF-SOL foi novamente precipitada com reativo de Fehling, foi

solubilizada em água e dialisada em membrana com poro com limite de exclusão de 30 kDa. A fração eluída nesta membrana foi aplicada em uma nova membrana de 10 kDa, gerando uma fração eluída e uma retida nesta membrana. A amostra SF-SOL foi submetida a mais dois processamento com reativo de Fehling. As frações de interesse foram as que não precipitaram com o reativo.

4.3.8 Análise Estrutural de Polissacarídeos

4.3.8.1 Determinação da Composição Monossacarídica dos Polissacarídeos

A amostra foi solubilizada em TFA (ácido trifluoracético) 1 M, e mantidas em estufa a 100 °C por doze horas (GORIN et al., 1996). Após hidrólise, a amostra foi evaporada à temperatura ambiente. O material hidrolisado, contendo monossacarídeos, foi ressolubilizado em água destilada e reduzido pela adição de boridreto de sódio, por 12 h à temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963a).. A redução foi terminada pela adição de resina catiônica até a neutralidade. Então o material foi lavado quatro vezes com metanol. Após esta etapa foi feita a acetilação dos derivados reduzidos com anidrido acético e piridina (1:1) (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Após 12 h a acetilação foi interrompida pela adição de gelo moído e os derivados acetilados foram extraídos com clorofórmio. Foram feitas diversas lavagens da fração clorofórmica com solução de sulfato de cobre 5% (p/v), até que não ocorresse alteração na coloração da solução de sulfato de cobre. Na fração clorofórmica foi adicionado carbonato de sódio anidro para a retirada da água. Esta fração foi filtrada e coletada em frasco de vidro. O frasco foi mantido aberto para evaporar o clorofórmio, os derivados foram solubilizados em acetona e analisados por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM), realizadas em um cromatógrafo a gás VARIAN, modelo 3.300 acoplado a um espectrômetro de massa de marca FINNIGAN MAT, modelo ITD 800, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) revestidas DB-225 ou DB 210 um. Os seus valores de R_f e seus perfis de fragmentação de massa foram comparados com padrões alditóis acetato (Sigma Co.). Foi utilizada a seguinte rampa de temperatura: elevação da temperatura em 50 °C por

um minuto, elevação até 220 °C (40 °C/min) e a temperatura foi mantida isotermicamente até o final da corrida (25 min). O hélio foi utilizado como gás de arraste (fluxo de 1 mL/min).

4.3.8.2 Análise das Ligações Glicosídicas dos Polissacarídeos por Metilação

Os polissacarídeos foram dissolvidos em DMSO e tiveram suas hidroxilas metiladas por iodeto de metila em meio fortemente básico (NaOH pulverizado). Após 12 h o processo de metilação foi interrompido pela adição de gelo moído e ácido acético. Os derivados metilados foram extraídos com clorofórmio. Após a lavagem com água destilada e a secura do material, foi feita a hidrólise com ácido fórmico 45% (v/v). A mistura foi mantida em estufa a 100 °C por 15 horas e depois deixada à temperatura ambiente em vidro de relógio até a secura. O material foi solubilizado em água e reduzido com boroidreto de sódio deuterado por 12 h à temperatura ambiente. O material foi lavado, acetilado e analisado conforme descrito no item 4.3.8.1, apenas a temperatura final da rampa foi de 215 °C foi (WOLFROM; THOMPSON, 1963b; CIUCANU; KEREK, 1984).

4.3.8.2.1 Análise das Ligações Glicosídicas por Metilação pelo Método de Haworth

Os materiais (10 mg) em estudo foram colocados em tubo de hidrólise e solubilizado em 3 mL de solução de NaOH 40% (m/v). Esta solução foi mantida sobre agitação constante e foram adicionados lentamente 0,5 mL de dimetil sulfato (DMS). Após 10 minutos de intervalo, foram adicionados outros 0,5 mL de DMS, este ciclo de intervalo e adição foi repetido 5 vezes. A reação foi mantida por 24 horas e então foram adicionados mais 3 mL da mesma solução de NaOH e foram repetidos os 5 ciclos de adição de DMS (HAWORTH, 1915). Após mais 24 h, o material foi neutralizado com ácido acético, foi seco em liofilizador e hidrolisado utilizando o método de Saeman (SAEMAN et al., 1954). O material foi solubilizado com 0,5 mL de uma solução de H₂SO₄ a 72% (v/v) e foram adicionados 4 mL de água destilada. A

hidrólise foi realizada em estufa a 100 °C por 14 horas. O material hidrolizado foi acetilado e analisado conforme descrito no item 4.3.8.1.

4.3.8.3 Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN-¹³C)

As amostras foram dissolvidas em D₂O ou DMSO (deuterado) conforme a análise. Então foram colocadas em tubos de RMN de 5 mm de diâmetro interno e os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 foram obtidos em espectrômetro BRUKER, Advance, DRX 400. Os espectros de RMN de ¹³C foram obtidos com o carbono desacoplado em 100.24 MHz, para o núcleo de ¹³C, sendo realizadas varreduras de 50 a 100 mil *scans*, utilizando o DMSO (δ_H 2.40, δ_C 39.70) ou acetona (δ_H 2.22, δ_C 30.20) como padrão interno.

4.3.8.4 Precipitação de polissacarídeos com solução de Fehling

Os polissacarídeos solúveis ou insolúveis no processo de gelo e degelo foram submetidos à purificação com reativo de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965). Este reativo consiste de duas soluções (A e B). A solução A é composta por tartarato de potássio e sódio e KOH, enquanto que a B consiste de sulfato de cobre. O material foi primeiramente solubilizado na solução A e em seguida foi adicionada a solução B. O precipitado foi separado por centrifugação. Tanto o precipitado quanto o sobrenadante foram dialisados em sacos de diálise com poros com limite de exclusão de 8 kDa. As amostras foram liofilizadas e analisadas conforme descrito no experimento específico.

4.3.8.5 Degradação Parcial de Smith

Os polissacarídeos foram dissolvidos em água e acrescidos de periodato de sódio (NaIO₄) até atingir uma concentração final de 0,05 M. A solução foi mantida por 72 h na ausência de luz. O processo de oxidação foi interrompido pela adição de etileno glicol e diálise exaustiva contra água corrente. A solução foi reduzida com NaBH₄ (pH 9-10) por 24 h (ABDEL-AKHER et al., 1952; DYER, 1956; HAY;

LEWIS; SMITH, 1965). Em seguida, a amostra foi tratada com resina catiônica (pH 7,0), dialisada por 48 h e submetida à hidrólise ácida parcial.

Os polissacarídeos previamente oxidados com NaIO_4 foram solubilizados em água, à hidrólise ácida parcial foi realizada pela adição de TFA até pH 2,0 e refluxo em banho com água fervente por 30 min. Então a amostra foi dialisada, em água corrente, em membranas com limite de exclusão de 2 kDa por 24 horas. A mistura foi liofilizada e a amostra foi armazenada numa temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para futuras análises.

4.3.8.6 Determinação da homogeneidade das frações por HPSEC

Para está análise as amostras foram dissolvidas em água MILLI-Q, filtradas em membranas MILLIPORE de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ e analisadas por cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência (HPSEC). As amostras foram solubilizadas em nitrito de sódio $0,1\text{ mol.L}^{-1}$ contendo azida de sódio (NaN_3) $0,2\text{ g.L}^{-1}$ ou água MilliQ para uma concentração final de 2 mg.mL^{-1} , sendo filtradas através de membrana de acetato de celulose com tamanho de poro equivalente a $0,22\text{ }\mu\text{m}$. Em seguida foram aplicadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS equipado com detector de índice de refração diferencial, modelo WATERS 2410, e com detector de espalhamento de luz em multiângulos WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP-F. Foram utilizadas, em série, 4 colunas de gel permeação WATERS com limites de exclusão de 1×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , 5×10^3 . O eluente utilizado foi uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) $0,1\text{ mol.l-1}$ contendo azida de sódio (NaN_3) $0,2\text{ g.L}^{-1}$, com fluxo de $0,6\text{ mL.min}^{-1}$, monitorado através de bomba peristáltica WATERS 515.

4.4 ESTUDOS SOBRE A TIROSINASE PRODUZIDA POR *L. boryana*

A tirosinase de *L. boryana* foi obtida a partir do seu micélio desenvolvido em meio líquido. Conforme descrito no item 4.2.2. Nesta seção será abordada a metodologia referentes a sua extração, purificação e caracterização da tirosinase de *L. boryana*.

4.4.1 Ensaio de Atividade da Tirosinase no Extrato do Micélio

Os ensaios foram feitos utilizando um volume final de 1,5 mL de meio reacional. Primeiramente foi adicionado 0,15 mL de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 6,8), 1,3 mL de solução de L-DOPA e, por último, 0,05 mL de extrato do micélio de *L. boryana*. A quantidade de L-DOPA adicionada foi calculada para dar uma concentração final de 10 mM ou outro valor, conforme descrito no experimento. A atividade enzimática foi determinada pela variação da absorbância (475 nm) em espectrofotômetro da marca Fento 700 *plus*. Os resultados estão apresentados em Unidades enzimáticas (U). Uma unidade enzimática foi definida como sendo equivalente a uma alteração de 0,01 unidades de absorbância a 475 nm por minuto. Estes procedimentos foram baseados nos ensaios de atividade descritos por Masamoto et al. (1980).

4.4.2 Determinação da Atividade de Tirosinase no Micélio de *L. boryana*

O micélio seco (20 mg) de *L. boryana* foi colocado em tubo de ensaio de parede espessa juntamente com 0,4 mL de tampão fosfato de sódio (50 mM) e cinco bolinhas de vidro. O micélio foi triturado em *vortex* por um minuto. O extrato obtido foi centrifugado em centrífuga de *Eppendorf* por 3 min a 13000 rpm. Então a atividade de tirosinase do sobrenadante foi analisada conforme descrito no item 4.4.1.

4.4.3 Comparação entre o Micélio Melanizado e Não Melanizado

Foi feito um cultivo em meio líquido como descrito no item 4.2.2. Após 21 dias de cultivo, em alguns frascos de cultivo o micélio de *L. boryana* ficou escuro, em outros frascos o micélio ficou claro. Foram retiradas amostras (10 g) de micélio úmido com diferentes colorações de micélio (claro e escuro). A metade destas amostras (5 g) foi liofilizada e outra metade foi suspensa em 10 ml de tampão fosfato (pH 6,8, 0,05 M), e passada em prensa francesa, gerando os extrato chamados de “Claro Fresco” e

“Escuro Fresco”. (BOUCHILLOUX; MCMAHILL; MASON, 1963; HOROWITZ; FLING; HORN, 1970). O micélio seco por liofilização foi passado em prensa francesa juntamente com 14,5 mL de tampão fosfato (pH 6,8, 0,05 M). Os extratos obtidos foram centrifugados e o sobrenadante foi coletado, gerando os extratos “Claro Liofilizado” e “Escuro Liofilizado”. As atividades enzimáticas dos micélios foram determinadas conforme descrita no item 4.4.1.

4.4.4 Influência da Contaminação na Atividade de Tirosinase pelo Micélio de *L. boryana* em Meio Líquido

O micélio de *L. boryana* foi preparado e cultivado em meio líquido conforme item 4.2.2. Após 9 dias de incubação a 20 °C em shaker a 120 rpm, 12 dos 24 frascos foram inoculados com um *plug* de BDA contendo uma cultura recente de *Lentinula edodes* e a temperatura foi alterada para 30 °C. A cada 2 dias, três frascos de cada tratamento foram retirados, o micélio foi drenado e liofilizado. A atividade de tirosinase do micélio foi analisada conforme descrito no item 4.4.2.

4.4.5 Efeito da Presença do Meio na Atividade de Tirosinase de *L. boryana*

Para verificar a influência da presença do meio de cultivo na produção de tirosinase por *L. boryana*, o micélio foi cultivado em erlenmeyers de 250 mL, mantidos em agitador orbital a 20 °C, conforme descrito no item 4.2.2. Após 21 dias, o micélio e o meio foram colocados assepticamente em quatro garrafas de Roux. As garrafas foram colocadas em estufa a 30 °C por sete dias. Após este período, duas garrafas foram inclinadas de forma que o meio de cultivo que envolvia o micélio ficasse afastado do mesmo. Após dois dias o micélio das garrafas foi coletado, o micélio foi seco em liofilizador e sua atividade foi determinada conforme item 4.4.2.

4.4.6 Efeito da Temperatura na Atividade de Tirosinase de *L. boryana*

Neste experimento, foram testadas as temperaturas de 20, 22, 25, 28, 30, 32, 35, 40, 42 e 45 °C. O substrato e o tampão foram colocados em tubo de ensaio e incubados nas temperaturas de reação por 2 min em banho de aquecimento. Após este período, foi adicionado o extrato do micélio. A mistura foi transferida para uma cubeta de vidro e foi feita a leitura em espectrofotômetro. Após esta leitura a cubeta era incubada no banho de aquecimento na temperatura testada. A cada minuto a cubeta era retirada e a absorbância era medida novamente. Foi feita uma relação entre a absorbância e o tempo em minutos e a atividade enzimática foi estimada pelo coeficiente angular da linha de tendência desta relação.

Foram utilizados nestes experimentos 25 µl de extrato de micélio melanizado, 1000 µl de L-DOPA (4 mg/ml) e 975 µl de tampão fosfato (pH 6,8, 0,05 M).

4.4.7 Efeito da Pré-incubação do Extrato em Diferentes Temperaturas na Atividade de Tirosinase de *L. boryana*

Foram feitos dois experimentos. No primeiro, diversas alíquotas de extrato de micélio melanizado foram incubadas durante 10 min nas temperaturas de 25 (temperatura ambiente), 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80 e 90 °C. No segundo, outras alíquotas foram pré-incubadas a 60 °C por 0, 1, 2, 5, 7 e 10 min.

Nestes dois experimentos, as atividades enzimáticas residuais foram determinadas conforme descrito no item 4.4.1, numa temperatura de 25 °C. Foram utilizados nestes experimentos 25 µl de extrato de micélio pré-incubado, 1000 µl de L-DOPA (4 mg/ml) e 975 µl de tampão fosfato (pH 6,8, 0,05 M).

4.4.8 Efeito do pH na Atividade de Tirosinase de *L. boryana*

Neste experimento foram determinadas as influências dos pHs 8,0; 7,6; 7,0; 6,6; 6,0; 5,6; 5,0; 4,6; 4,0; 3,6; 3,0 na atividade enzimática do extrato de micélio

melanizado. Para isto foram utilizados dois tampões: o citrato-fosfato (3,0 à 7,0) e o fosfato (6,0 à 8,0), os tampões foram preparados conforme descrito por Stoll e Blanchard (1990). A atividade enzimática foi determinada conforme descrito no item 4.4.1.

4.4.9 Efeito do Substrato na Atividade Enzimática do Extrato Bruto de *L. boryana*

Neste experimento, foram utilizados extratos de micélio melanizados e liofilizados preparados conforme descrito no item 4.4.2. A atividade enzimática foi determinada conforme descrito no item 4.4.1. As proporções de substrato, tampão e extrato de micélio estão descritos na tabela 2.

TABELA 2- DIFERENTES PROPORÇÕES DOS COMPONENTES A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Concentração final	SUBSTRATO (μL)	TAMPÃO (μL)	EXTRATO (μL)
3,95 mg/mL	1975	-	25 μl
2 mg/mL	1000	975 μl	25 μl
1 mg/mL	500	1475 μl	25 μl
0,5 mg/mL	250	1725 μl	25 μl
0,25 mg/mL	125	1850	25 μl
0,125 mg/mL	62,5	1912	25 μl

4.4.10 Purificação da Tirosinase do micélio de *L. boryana*

A cultura de micélio de *L. boryana* em meio líquido, conforme descrito no item 4.4.2, foi mantida no escuro e sob agitação por 18 dias em 20 °C, após este período os frascos foram transferidos para sala climatizada a 30 °C e mantidos sob agitação. Após certo período de 15 dias, quando os micélios ficaram escurecidos, os frascos foram retirados, foi feita a extração da tirosinase pela passagem do micélio e tampão em prensa francesa. O extrato obtido foi centrifugado e o sobrenadante foi separado. Este

extrato foi mantido sob agitação em banho de gelo e adicionado lentamente o sulfato de amônio moído até 60% de saturação. A solução foi mantida sob agitação por 18 horas, a 4 °C. A mistura foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado e o precipitado coletado.

Com o objetivo de aumentar o grau de purificação e retirar a melanina presente no precipitado, foram testadas diferentes técnicas. Na primeira técnica a amostra foi ressuspensa em tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 6,8), então foram adicionados dois volumes de acetona gelada (-10 °C) lentamente e sob agitação constante. A suspensão foi centrifugada em centrífuga refrigerada a -10 °C a 12.000×g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi solubilizado duas vezes com o mesmo tampão. A atividade enzimática foi determinada conforme o item 4.4.2 (HOROWITZ; FLING; HORN, 1970).

Em outras três tentativas para eliminar a melanina do extrato, a amostra foi solubilizada e aplicada em colunas de exclusão Sephadex G50 e G100 e uma coluna de troca iônica (DEAE Sepharose), todas de 20 mL de leito. As colunas de exclusão foram eluídas com tampão fosfato (0,05 M, pH 6,8) e a DEAE Sepharose foi eluída com um gradiente de NaCl de 0 a 1 M. As frações (3 mL) foram coletadas e suas atividades foram verificadas conforme o item 5.4.1.1.

Após estes testes iniciais, foi padronizado o processo de produção e purificação de tirosinase de *L. boryana*. Após a produção do micélio, extração em prensa francesa e a precipitação com sulfato de amônio a 60% de saturação, a amostra foi solubilizada em tampão e aplicada em coluna de troca iônica (DEAE Sepharose) com 50 mL de leito, foram feitas duas lavagens da coluna com tampão, então foram feitas eluições com água e com crescentes concentrações de NaCl (0,1-1,0 M). Foram coletadas frações de 5 mL. As atividades enzimáticas foram determinadas e as frações com atividade enzimática igual ou superior a 50% da atividade máxima foram agrupados. Estas frações tiveram seus volumes reduzidos por centrifugação em tubos CENTRICON-MILLIPORE com limite de exclusão de 5 kDa. As diferentes etapas do processo de purificação foram analisadas conforme sua atividade enzimática total, concentração de proteína, atividade específica, atividade recuperada e fator de

purificação. Também foi feita uma eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) para acompanhar as etapas de purificação, conforme item 4.4.11.

4.4.11 Eletroforese (SDS-PAGE)

A eletroforese realizada foi a do tipo SDS (SDS-PAGE), utilizando-se dodecil-sulfato de sódio como desnaturante. Para a confecção das placas de gel, foi utilizado um molde (duas placas de vidro e separadores de acrílico). O molde foi preenchido até 1 cm da borda superior com solução de acrilamida a 12,5% (gel de corrida). Após a polimerização, o molde foi completado com acrilamida a 4% (gel de alinhamento). Neste gel de alinhamento foi colocado um molde de acrílico, em formato de pente, para a formação dos poços onde foram aplicadas as amostras de proteínas. Após a corrida em cuba eletroforética, as placas de gel foram coradas com Coomassie Blue (Brilliant Blue R Sigma B 0630), 1 g; ácido acético glacial, 200 mL; álcool isopropílico, 300 mL; água bidestilada, 1.300 mL por 18 horas. O gel foi descorado com solução de metanol:ácido acético: água (3:1:6) (LAEMMLI, 1970).

4.4.12 Determinação da Concentração de Proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976) pela formação de um complexo com o corante Coomassie G.

4.4.13 Efeito do Substrato (L-DOPA) na Atividade Catecolase da Tirosinase de *L. boryana*

A atividade enzimática foi determinada conforme descrito no item 4.4.1. As proporções de substrato, tampão-fosfato de sódio (50 mM) e extrato de micélio/extrato da enzima comercial (SIGMA) estão descritos na tabela 3.

TABELA 3- PROPORÇÕES DOS COMPONENTES PARA ATIVIDADE DA TIROSINASE

CONCENTRAÇÃO FINAL (mM)	Solução L-DOPA(34,61 mM) em (μ l)	TAMPÃO (μ l)	EXTRATO (μ l)
0,25	10,8	1439,2	50,0
0,5	21,7	1428,3	50,0
1,0	43,3	1406,7	50,0
2,0	86,7	1363,3	50,0
3,0	130,0	1320	50,0
4,0	173,3	1276,7	50,0
5,0	216,7	1233,3	50,0
6,0	260,0	1190	50,0
8,0	346,7	1003,3	50,0
9,0	390,0	1060	50,0
10,0	433,3	1016,7	50,0
15,0	650,0	800	50,0
20,0	866,7	583,3	50,0
25,0	1083,3	366,7	50,0
30,0	1300,0	150	50,0

4.4.14 Efeito do Captopril na Atividade da Tirosinase de *L. boryana*

Para avaliar o efeito do captopril ([25]-N-mercapto-2-metil-propionil]-1-prolina) na atividade da tirosinase de *L. boryana*, foram feitos ensaios utilizando as concentrações de 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 20 e 30 mM de L-DOPA e concentrações de Captopril de 0, 50, 75, 100, 150, 200 μ M. Todas as concentrações de substrato foram avaliadas com todas as concentrações de Captopril. As condições de ensaios foram as mesmas descritas no item 4.4.1, a única diferença é que os 150 μ l de tampão fosfato foram substituídos por soluções adequadas de Captopril.

4.4.15 Modelagem Matemática dos Dados Cinéticos da Tirosinase de *L. boryana*

Para ajudar interpretar o efeito da concentração de substrato na atividade catecolase, utilizando tanto a tirosinase de *L. boryana* quanto à enzima comercial (SIGMA), um programa desenvolvido na linguagem FORTRAN foi utilizado para resolver um sistema de equações diferenciais, deduzidos do mecanismo apresentado por Cabanes et al. (1987), usando a sub-rotina DRKAS. Para uma maioria dos

parâmetros, os valores apresentadas por Cabanes et al, (1987) foram usados. Os parâmetros que não constavam no modelo deles foram usados para ajustar o modelo aos dados experimentais. A programação e ajuste dos dados foram realizados pelo mestrando em engenharia da UFPR Wellington Balmant.

4.4.16 Comparação do Modelo Matemático com os Dados Experimentais da Tirosinase de *L. boryana*

O modelo resolvido em FORTRAN, baseado em Cabanes et al. (1987), foi comparado com os dados experimentais obtidos com as seguintes concentrações de L-DOPA: 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 20 e 30 mM. Os ensaios cinéticos procederam-se conforme item 4.4.1 e as diluições a partir da solução de 30 mM ocorreram conforme tabela 3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CULTIVO DE *L. boryana* EM MEIO LÍQUIDO

Os experimentos sobre cultivo de *L. boryana* em meio líquido foram desenvolvidos com o intuito de obter micélio em quantidade suficiente para a produção de tirosinase, seção 5.3, e também para a obtenção de exopolissacarídeos (EPS) que foram utilizados nos experimentos relacionados à seção 5.2.1.

5.1.1 Primeiro Experimento - Cultivo Micelial de *L. boryana* em Meio Líquido (Cultivo I)

Este primeiro experimento serviu para caracterizar o perfil de crescimento micelial, o consumo de glucose e a produção de exopolissacarídeos, item 4.2.3.

Durante os primeiros 7 dias ocorreu pouco crescimento micelial e não houve variação significativa no pH (figura 4). Após o sétimo dia ocorreu decréscimo do pH de 6 para aproximadamente 3, observado no décimo quarto dia. Este comportamento do pH do meio já havia sido observado anteriormente para o cultivo de *L. boryana* em meio sólido (FARIA, 2004). Esta característica também foi por diversas vezes observada para outros basidiomicetos, e ocorre devido a produção e liberação de ácidos orgânicos, como ácido oxálico (CHANG; HAYES, 1978).

Com relação ao consumo de glucose, pode ser observado que entre o 7^o e o 14^o dia o micélio se desenvolveu de $0,4 \pm 0,5$ g/L para $3,1 \pm 0,6$ g/L (figura 4), no mesmo período a concentração de glucose permaneceu constante aproximadamente 43 g/L (figura 5). Este desenvolvimento micelial sem consumo de glucose indica que o microorganismo está utilizando outras fontes de carbono, provavelmente provenientes do extrato de malte e da peptona. Comportamento similar foi anteriormente relatado para o basidiomiceto *Ganoderma lucidum* (WAGNER et al., 2004).

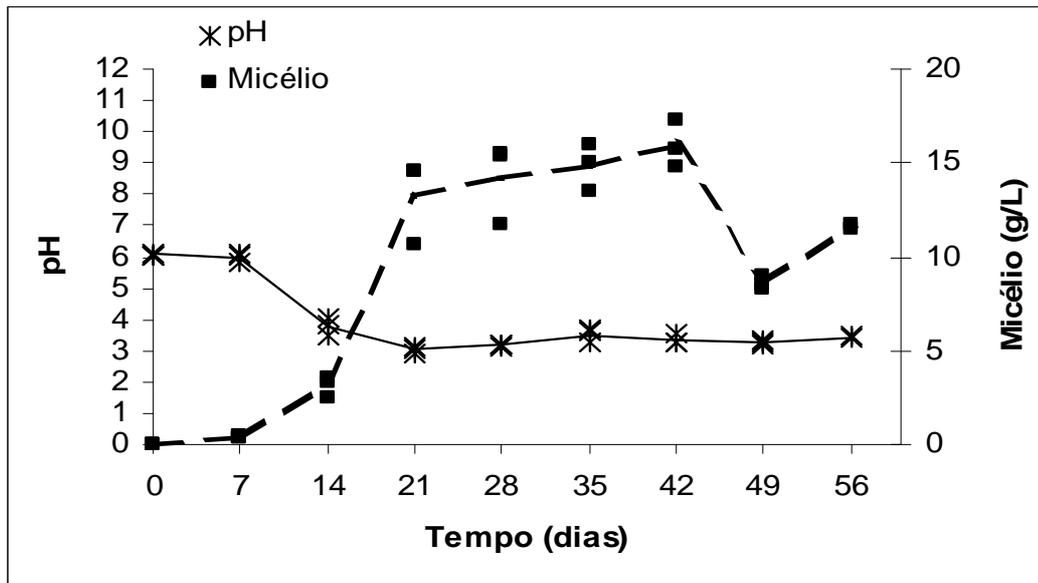


FIGURA 4- CRESCIMENTO MICELIAL E VARIAÇÃO DO pH DURANTE 56 DIAS, CULTIVO DE *L. boryana* EM MEIO LÍQUIDO

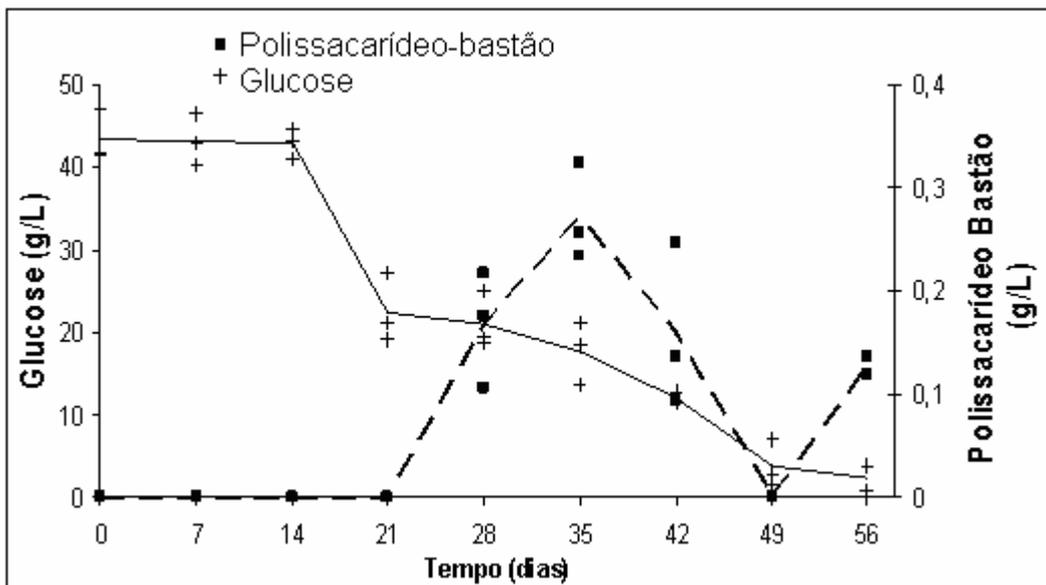


FIGURA 5- CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DURANTE 56 DIAS, CULTIVO DE *L. boryana* EM MEIO LÍQUIDO.

Entre o décimo quarto e o vigésimo primeiro dia ocorreu um crescimento rápido micélio passando de $3,1 \pm 0,6$ g/L a $13,2 \pm 2,3$ g/L, o que foi acompanhado de um

consumo elevado de glucose, que diminuiu de 43 g/L para $22,4 \pm 4,07$ g/L. Entre o vigésimo primeiro e o quadragésimo segundo dia o crescimento micelial ($13,2 \pm 2,3$ g/L para $15,9 \pm 1,2$ g/L) e o consumo de glucose ($22,4 \pm 4,07$ g/L para $12,0 \pm 1,57$) foram menores. Neste período, portanto, ocorreu um decréscimo na concentração de glucose de 10 g/L e o micélio aumentou sua concentração em aproximadamente 3 g/L. O coeficiente de rendimento de biomassa a partir de glucose foi, portanto 0,3 g/g. Entre o quadragésimo segundo e o quadragésimo nono dia, ocorreu uma diminuição da massa micelial, indicando lise celular.

Durante o cultivo foi acompanhada a produção de exopolissacarídeos pelo micélio de *L. boryana*, mas o meio utilizado possui outras macromoléculas como proteínas que são precipitadas juntamente com os polissacarídeos pela adição de etanol (item 4.2.3). Como esta precipitação conjunta, de polissacarídeos e proteínas, interfere a correta quantificação dos exopolissacarídeo, buscou-se meios alternativos os quais eram isentos de proteínas, mas não foram obtidos resultados satisfatórios no crescimento micelial (dados não mostrados). Para possibilitar a quantificação real do polissacarídeo produzido, foi feita uma diferenciação entre Polissacarídeo-bastão (retirado com bastão de vidro) o Precipitado-centrifugação que foi obtido após centrifugação da mistura de etanol e o meio, e o Precipitado-total (Polissacarídeo-bastão + Precipitado-centrifugação) conforme descrito no item 4.2.3.

Na figura 5 pode ser observado que até o vigésimo primeiro dia da fermentação o Precipitado-total permanece constante e não é possível obter o Polissacarídeo-bastão. No vigésimo oitavo dia foi obtido o Polissacarídeo-bastão, que também foi encontrado no trigésimo quinto e no quadragésimo segundo dia. Portanto a efetiva produção de EPS por *L. boryana* iniciou-se apenas no vigésimo oitavo dia.

Com visto a produção de Polissacarídeo-bastão ocorre na fase onde não ocorre muita variação na massa micelial (figura 4). Também pode ser observado que no quadragésimo nono dia, onde a massa micelial diminuiu bastante este Polissacarídeo-bastão não foi possível de ser obtido (figura 5).

5.1.2 Efeito da Alimentação com Glucose no Cultivo de *L. boryana* em Meio Líquido (Cultivo II)

Neste experimento, foi verificada a importância da adição de glucose no desenvolvimento de *L. boryana* e na produção de EPS, descrito no item 4.2.4. Foram utilizados três tratamentos diferentes, no primeiro grupo de frascos foram colocados todos os nutrientes do meio (FANG et al., 2002), no segundo grupo não foi adicionada a glucose em nenhum momento da fermentação e em um terceiro grupo foi feita a adição de glucose após 22 dias de fermentação, conforme esquema da figura 6.

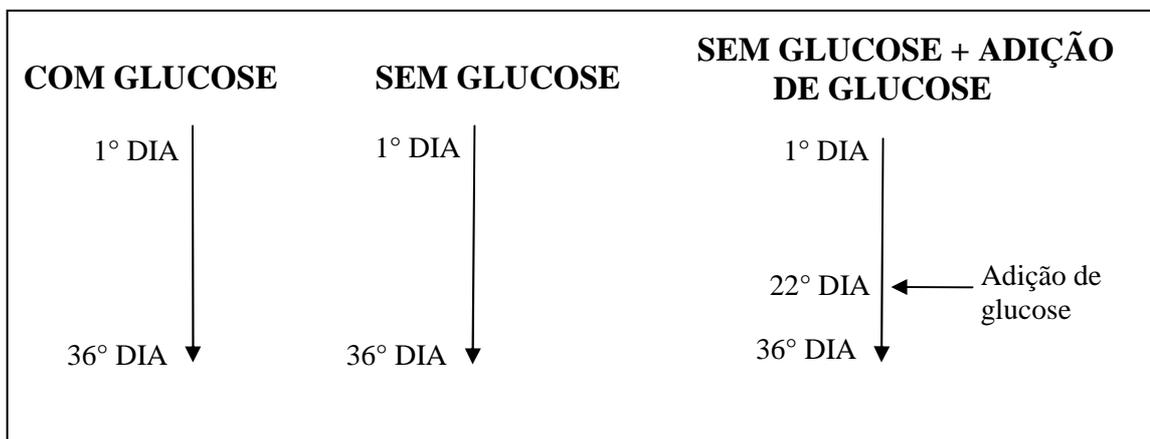


FIGURA 6- ESQUEMA PARA AVALIAR A INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE GLUCOSE NO DESENVOLVIMENTO MICELIAL DE *L. boryana* EM MEIO LÍQUIDO.

Nos primeiros 14 dias (figura 7) ocorreu pouca diferença entre o que o crescimento micelial dos frascos com e sem glucose e, assim como no Cultivo I, a glucose é pouco consumida nos primeiros 14 dias. Também pode ser observado que a glucose é parcialmente consumida logo após a sua adição, figura 8, mostrando assim sua importância para o desenvolvimento do micélio. Na ausência de glucose o micélio se desenvolveu fracamente, mas, após a adição ocorreu um forte crescimento micelial (figura 7). Com este experimento, ficou evidenciado que a presença ou ausência de glucose influencia o desenvolvimento micelial de *L. boryana*.

Os valores de pH dos meios diminuíram (figura 9). No 22º dia os valores encontrados foram de 3,0 com glucose e 3,7 sem glucose. Sete dias após a adição de glucose os valores de pH ficaram próximos a 3,0, portanto com a adição de glucose ocorreu uma diminuição do pH do meio, o que provavelmente está relacionado com o aumento da atividade metabólica e a maior produção de ácidos orgânicos como ácido acético, ácido succínico e ácido oxálico (CHANG; HAYES 1978).

Sobre a produção de Polissacarídeo-bastão, mostrado na figura 10, pode ser que a glucose é essencial para a sua produção. Nos frascos que foram alimentados com glucose no 22º dia, a produção de Polissacarídeo-bastão foi intensa, isto era esperado uma vez que na maioria das vezes EPS produzido por macrofungos é principalmente constituído por β -glucanas (WAGNER, 2003).

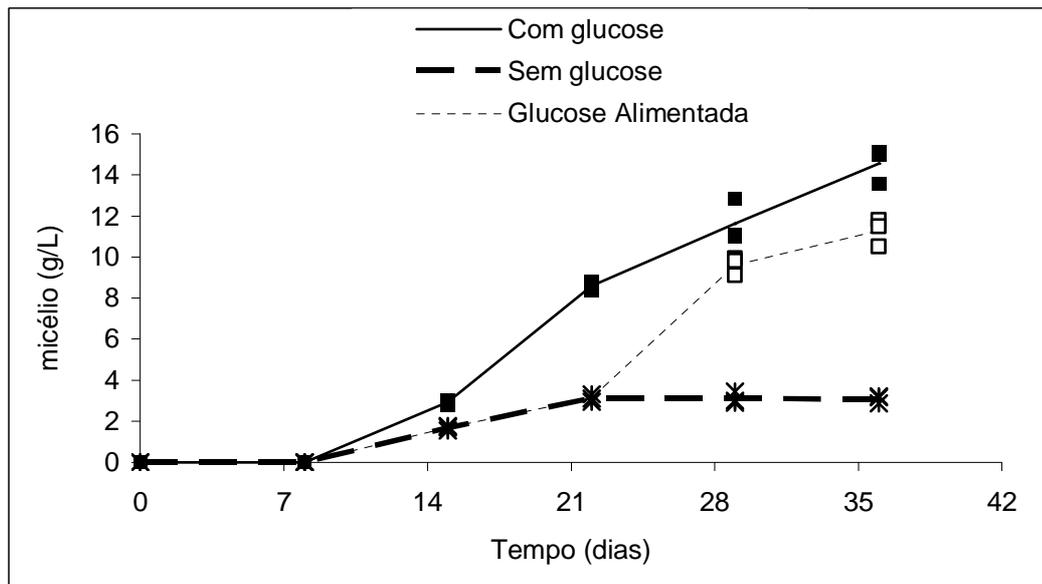


FIGURA 7- EFEITO DA ALIMENTAÇÃO DE GLUCOSE NA PRODUÇÃO DE MASSA MICELIAL DE *L. boryana* EM MEIO LÍQUIDO

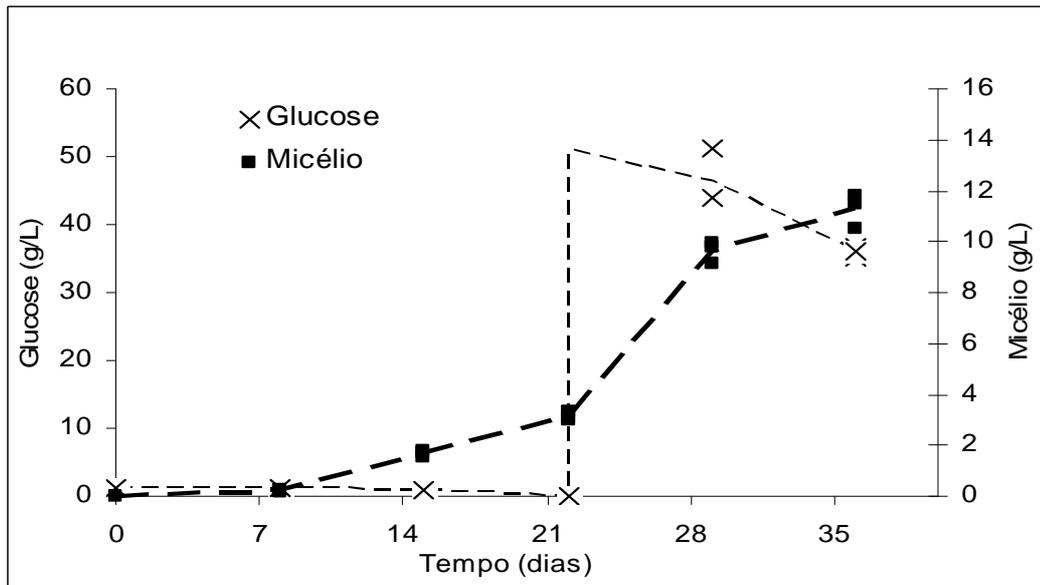


FIGURA 8- RELAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E O CONSUMO DE GLUCOSE DE *L. boryana* EM MEIO LÍQUIDO COM ADIÇÃO DE GLUCOSE APÓS 22 DIAS DE CULTIVO

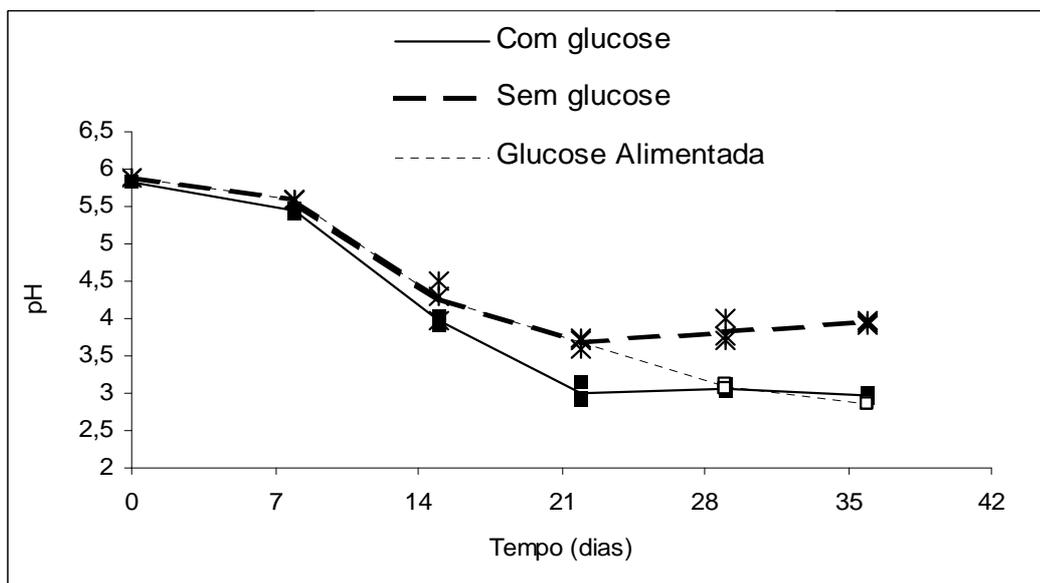


FIGURA 9- VARIAÇÃO DO pH NA PRESENÇA OU NÃO DE GLUCOSE NO MEIO DURANTE O CULTIVO DE *L. boryana* EM MEIO LÍQUIDO.

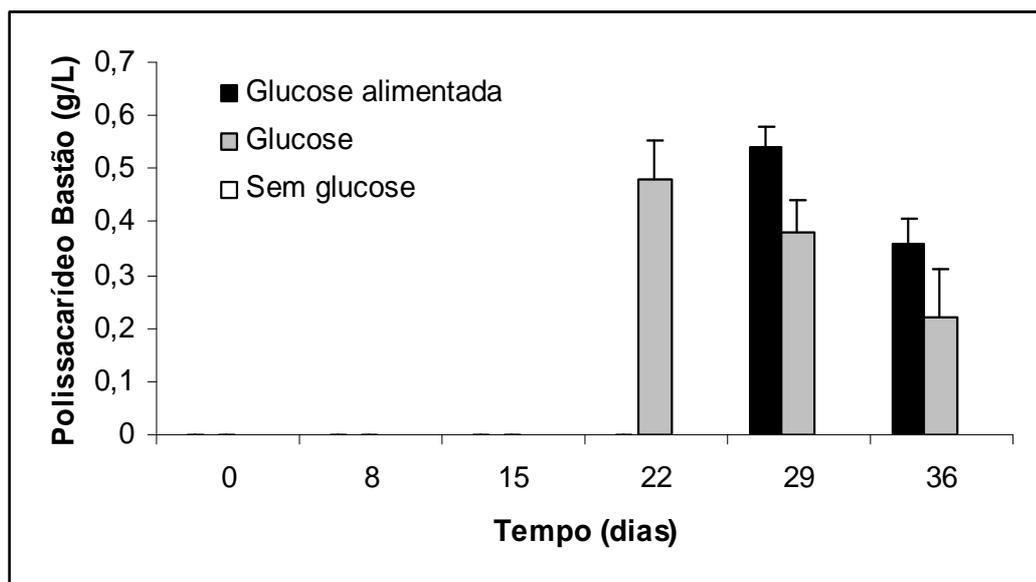


FIGURA 10- INFLUÊNCIA DA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE GLUCOSE NA PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO-BASTÃO.
Barras de erros referentes ao desvio padrão das amostras.

5.1.3 Análise da Composição Monossacarídea dos EPS produzidos nos Cultivos I e II

Os dados mostrados na tabela 4 são referentes à composição monossacarídica dos dois cultivos realizados. Os dados mostram uma predominância de manose e glicose.

TABELA 4- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDEA DOS POLISSACARÍDEOS-BASTÃO DE AMOSTRAS DOS CULTIVOS I E II

Frações	Rendimentos (g/L)	Monossacarídeos (mol %) ⁽¹⁾					
		Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
CI35DF15	0,33	0,7	tc	1,6	20,1	3,7	72,9
CII 36DF21	0,42	1,0	-	2,5	17,4	2,0	77,0
CII 36DF20	0,02	0,8	1,4	1,9	30,7	4,5	60,6
CII 36DF4	0,58	1,0	2,9	2,0	16,2	3,1	74,7

CI35DF15: Frasco 15, do 35º dia do cultivo I; CII 36DF21: Frasco 21, do 36º dia do Cultivo II (com glicose); CII 36DF20: Frasco 20, do 36º dia do Cultivo II (sem glicose); CII 36DF4: Frasco 4, do 36º dia do Cultivo II (com alimentação de glicose no 22º dia).

(1) Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução (NaB₂H₄) e acetilação.

5.2. ESTUDOS QUÍMICOS DOS POLISSACARÍDEOS de *L. boryana*

5.2.1 Estudos Químicos dos Polissacarídeos de *L. boryana* Produzidos em Meio Líquido

Durante os Cultivos I e II foi possível verificar que se o meio de cultivo fosse armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, quando descongelado ocorria a formação de um precipitado insolúvel. Então foi feita uma nova fermentação para obter o precipitado em quantidade suficiente para sua purificação e análise. Na figura 11 pode ser visualizado o gel de exopolissacarídeo formado após o gelo e degelo do meio de cultivo. Esta amostra foi submetida mais duas vezes ao processo de gelo e degelo. Para a análise por RMN- ^{13}C a amostra foi liofilizada e resolubilizada em dimetil sulfóxido deuterado, mas o polissacarídeo em solução de DMSO formou um gel bastante espesso, não sendo possível a obtenção do espectro de RMN- ^{13}C . Este fato já havia sido observado nas amostras de polissacarídeos dos cultivos anteriores. Com isto, foram feitas tentativas de diminuir a viscosidade do gel formado. A alternativa mais adequada foi solubilização com reativo A do reativo de Fehling seguida de uma tentativa de precipitação com o reativo B de Fehling (item 4.3.8.5). Com estes procedimentos não ocorreu precipitação dos polissacarídeos, entretanto houve um aumento da solubilidade (água e DMSO) do material, sendo possível à análise por RMN- ^{13}C . Não foi encontrada na literatura nenhuma explicação para este fato, mas é possível que a concentração elevada de álcali na Solução A de Fehling (KOH, 250 g/L) tenha desestabilizado a estrutura terciária dos polissacarídeos, aumentando sua solubilidade nos solventes (DMSO e água).

O espectro de RMN- ^{13}C , figura 12, mostrou sinais característicos de ligação glicosídica do tipo β -(1 \rightarrow 3), nas regiões de 102.9 ppm (C-1) e de 86.3 ppm (C-3). Os sinais na região de 68.5 ppm são referentes a C-6 ligado, enquanto o C-6 livre apresenta assinalamento em 60.9 ppm.

O resultado da análise da composição monossacarídica do EPS foi bastante similar aos dados encontrados para os polissacarídeos bastão obtidos nos dois primeiros cultivos (tabela 4), mostrando também uma predominância de glucose e

manose, 74 e 21%, respectivamente. Também foi verificada a presença de pequenas quantidades de galactose (1,25%) e xilose (3,5%). Apesar da quantidade significativa de manose encontrada (21,2%), não foi observado sinal de manose O-substituída no espectro de RMN-¹³C, isto pode ter ocorrido devido à maior quantidade da glucana.



FIGURA 11- ASPECTO GERAL DO POLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR *L. boryana* EM MEIO LÍQUIDO (NOVO CULTIVO)

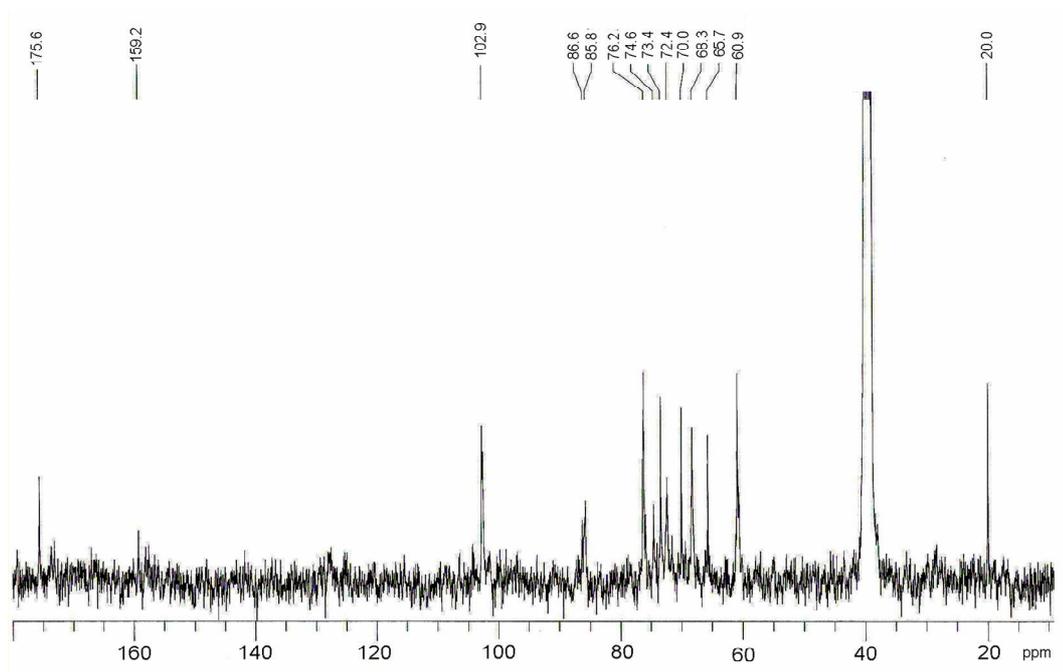


FIGURA 12- ESPECTRO DE RMN-¹³C, DO EPS PRODUZIDO POR *L. boryana* EM MEIO LÍQUIDO

O processo de precipitação com reativo de Fehling melhorou a solubilização dos polissacarídeos. Mesmo com esta melhora, os polissacarídeos obtidos apresentaram baixa solubilidade em água, dificultando a utilização de colunas de gel permeação no processo de purificação. Como alternativa para a purificação, foram feitos diversos processos de gelo e degelo. O esquema mostrado na figura 13 representa as etapas do processo de purificação de exopolissacarídeos de *L. boryana*, conforme descrito no item 4.3.1 dos materiais e métodos.

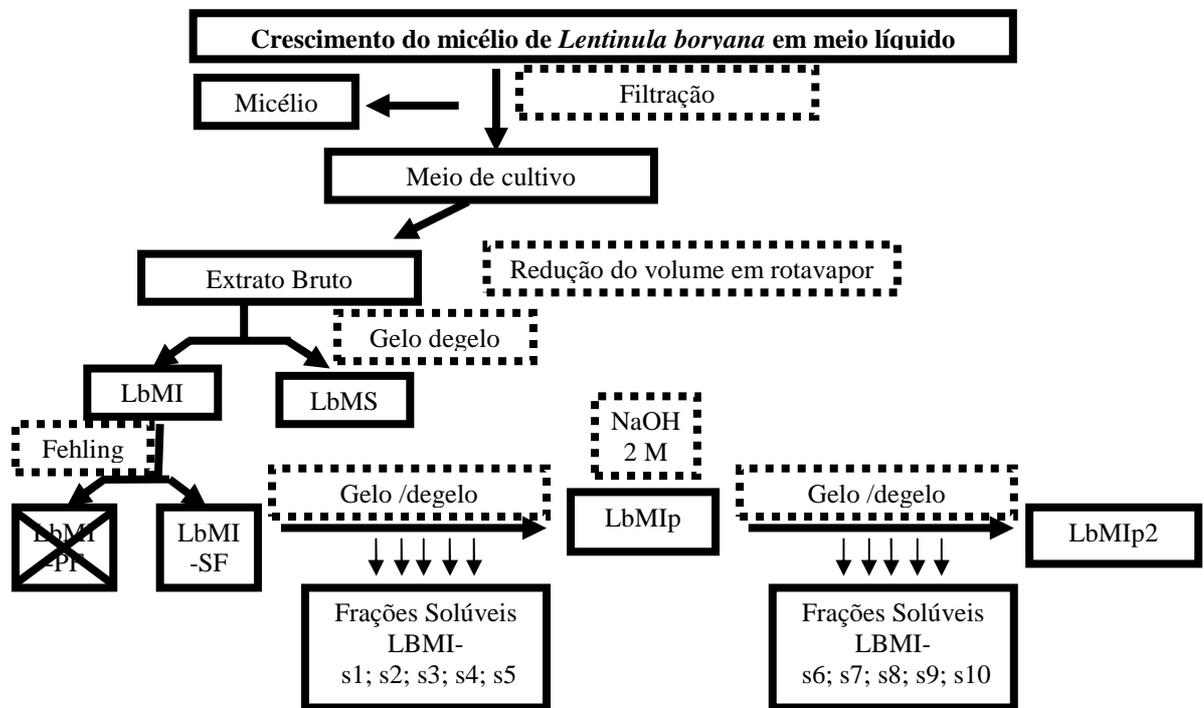


FIGURA 13- ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO DE EXO-POLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR *L. boryana* EM MEIO LÍQUIDO

LbMI: Precipitado do meio de cultivo precipitado no processo de gelo e degelo

LbMS: Material solúvel no processo de gelo e degelo

LbMI -SF: Precipitado do meio de cultivo não precipitado com reativo de Fehling

LbMI-(s1), (s2), (s3), (s4), (s5): Frações solúveis no processo de gelo e degelo

LbMI (p): Material precipitado obtido após cinco processos de gelo e degelo

LbMI (p2): Material precipitado obtido após dez processos de gelo e degelo

Na tabela 5 são observadas as alterações ocorridas na composição monossacarídica e nas massas dos precipitados e sobrenadantes dos processos de gelo e degelo. Como visto, o material solúvel no reativo de Fehling (LbMI-SF) é composto principalmente de glucose e manose. Também pode ser observado que com os cinco primeiros processos de gelo e degelo ocorreu um aumento na proporção de glucose de 76,7% (LbMI-SF) para 95,0% (LbMIp). Por outro lado, as primeiras frações solúveis (LbMI-s1 e LbMI-s2) apresentam maiores concentrações de manose que as demais.

Como visto o material insolúvel após cinco processos de gelo e degelo, apresentou 95% de glucose (LbMIp). Esta amostra foi solubilizada em NaOH (2 M) e, após diálise em água corrente, foram feitos outros cinco processos de gelo e degelo. Com estes procedimentos era esperado um aumento na proporção de glucose, mas as concentrações de glucose variaram de 95,0% no LbMIp para 88,2% no LbMIp2. Visto estes resultados as caracterizações químicas foram realizadas com a amostra submetida a cinco processos de gelo e degelo (LbMIp).

TABELA 5- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS NO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE EPS PRODUZIDOS POR *L. boryana*

Frações	Rendimentos %	Massa (mg)	Monossacarídeos (mol %) ⁽¹⁾			
			Xyl	Man	Gal	Glc
LbMI-SF	100	295,5	3,6	22,0	1,3	76,7
LbMI-s1	27,1	80,2	6,9	27,9	1,6	63,6
LbMI-s2	13,8	40,8	6,3	19,1	tc	74,0
LbMI-s3	18,5	54,6	2,1	7,1	-	90,8
LbMI-s4	5,0	14,8	2,9	5,4	-	91,7
LbMI- s5	4,3	12,8	2,9	6,0	-	91,1
LbMIp	31,3	92,4	0,3	4,7	-	95,0
LbMIp2	14,1	41,7	2,4	9,4	-	88,2

(1) Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução (NaB₂H₄) e acetilação.

tc: traço

ver lista de siglas da figura 13

O espectro de RMN-¹³C da amostra LbMIp, figura 14, mostra sinais na região de 103.0 e 86.0 ppm, os quais são respectivamente característicos de C-1 e C-3, de glucose, ligados em configuração do tipo β. O sinal em δ 68.5 é referente a C-6 ligado, já sinais de C-6 livre são visualizados na região de δ 61.1.

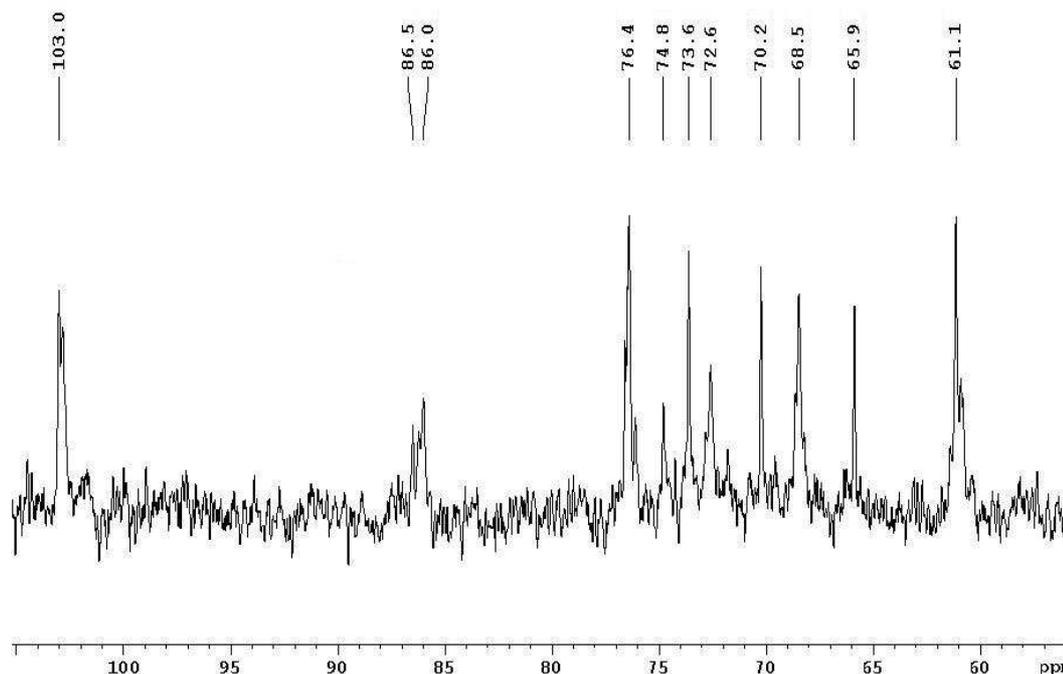


FIGURA 14- ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DA FRAÇÃO LbMIp EM $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ (70 °C)

A amostra LbMIp foi submetida a degradação parcial de Smith. A fração resistente a degradação (LbMIp Smith) apresentou como composição monossacarídica glucose (76%) e manose (24%). Portanto ocorreu um aumento na concentração de manose de 4,7% para 24%, isto mostra que a glucana presente não era apenas formada por ligações (1 \rightarrow 3) a qual é resistente a degradação parcial de Smith.

O espectro de RMN de carbono-13 de (LbMIp-Smith), apresentado na figura 15, possui 12 sinais. Os sinais com maior intensidade em δ 103.0, 86.2, 76.4, 72.9, 68.5 e 61.0 são referentes aos carbonos C-1, C-3, C-5, C-2, C-4, e C-6, respectivamente, de uma β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana. Estes deslocamentos concordam com assinalamentos descritos para outras β -(1 \rightarrow 3)-D-glucanas (CARBONERO et al., 2001). Através dos dados da literatura os demais sinais foram atribuídos. O sinal em δ 101.7 é referente a C-1 de manose piranosídica ligada em configuração do tipo α , o sinal em 78.7 é referente a C-3 ligado de manose piranosídica, enquanto os sinais 73.5; 69.4; 66.1 e 61.1 foram atribuídos aos C-5, C-2, C-4 e C-6 de unidades de manose piranosídica (SMIDERLE et al., 2006).

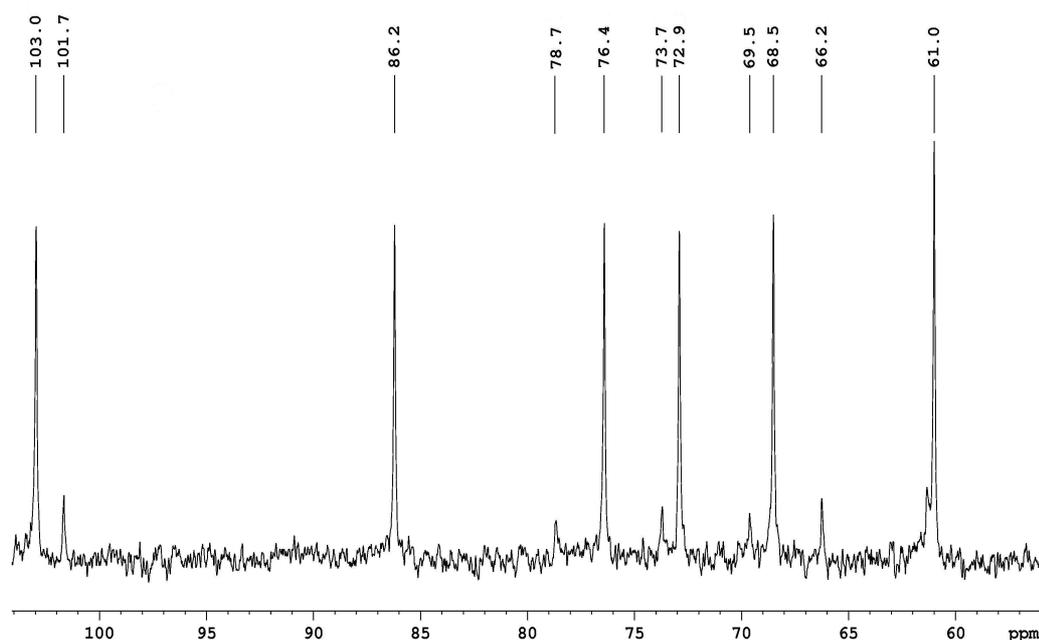


FIGURA 15- ESPECTRO DE RMN- ^{13}C , DA AMOSTRA LbMIp APÓS DEGRADAÇÃO PARCIAL DE SMITH EM $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ (70°C)

Os resultados de RMN- ^{13}C estão de acordo com a análise de metilação, tabela 6. As análises de metilação e RMN- ^{13}C das amostras LbMIp e LbMIp-Smith fornecem fortes indícios sobre os polissacarídeos presentes. A amostra (LbMIp-Smith) apresentou apenas derivados parcialmente metilados referentes às unidades de glucose e manose ligadas em O-3 (2,4,6- Me_3Glc e 2,4,6- Me_3Man). Como era esperado, com o processo de degradação parcial de Smith ocorreu uma diminuição dos derivados parcialmente metilados referentes aos terminais de xilose e de glucose (2,3,4- Me_3Xyl e 2,3,4,6- Me_4Glc), bem como ocorreu uma diminuição dos derivados referentes aos pontos de ramificação da manose e glucose (2,6- Me_2Man e 2,4- Me_2Glc).

Através da análise de metilação de LbMIp, pode ser observada a presença do terminal de xilose piranosídica (2,3,4- Me_3Xyl , 1,7%), de uma cadeia principal de manose piranosídica ligada em O-3 (2,4,6- Me_3Man , 3,4%) e unidades de manose piranosídica dissubstituída em O-3 e O-4 (2,6- Me_2Man , 2,5%) que são referentes aos pontos de ramificação da cadeia principal.

TABELA 6- ANÁLISE POR METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DO MEIO DE CULTIVO LÍQUIDO (MODIFICADO DE FANG; ZONG 2002)

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados ⁽¹⁾	LBMI mol %	LBMIP mol %	LBMI-Smith mol %	Tipo de ligação ⁽²⁾
2,3,4-Me ₃ Xyl	0,4	1,7	-	Xylp-(1→
2,3,4,6-Me ₄ Glc	19,1	29,1	0,9	Glc p-(1→
2,4,6-Me ₃ Glc	21,5	31,3	81,8	→3)-Glc p-(1→
2,4,6-Me ₃ Man	7,9	3,4	15,5	→3)-Man p-(1→
2,3,6-Me ₃ Glc	8,1	tc	-	→4)-Glc p-(1→
2,4,6-Me ₃ Gal	1,0	-	-	→3)-Gal p-(1→
2,6-Me ₂ Man	11,8	2,5	tc	→3,4)-Man p-(1→
2,6-Me ₂ Glc	6,3	-	-	→3,4)-Glc p-(1→
2,4-Me ₂ Glc	21,3	32,0	1,3	→3,6)-Glc p-(1→
2,4-Me ₂ Man	2,6	-	-	→3,6)-Gal p-(1→

(1) Analisado em GC-MS após metilação, hidrólise ácida total, redução (NaB₂D₄) e acetilação.

(2) Baseados nos derivados acetilados parcialmente *O*-metilados.

Estes resultados sugerem a presença de dois polissacarídeos, uma xilomanana e uma β -glucana. Estes polissacarídeos serão discutidos separadamente. Na figura 16 está representada a estrutura mais provável para a xilomanana produzida por *L. boryana*. Este polissacarídeo é composto por uma cadeia principal de manose piranosídica (figura 16-A) com ligações do tipo α -(1→3) e pontos de ramificação de O-4 manose ligadas (figura 16-B). Os dados de metilação sugerem que há dois pontos de ramificação a cada cinco unidades da cadeia principal, e provavelmente estes pontos de ramificação estão substituídos por terminais não redutores de xilose piranosídica (figura 16-C).

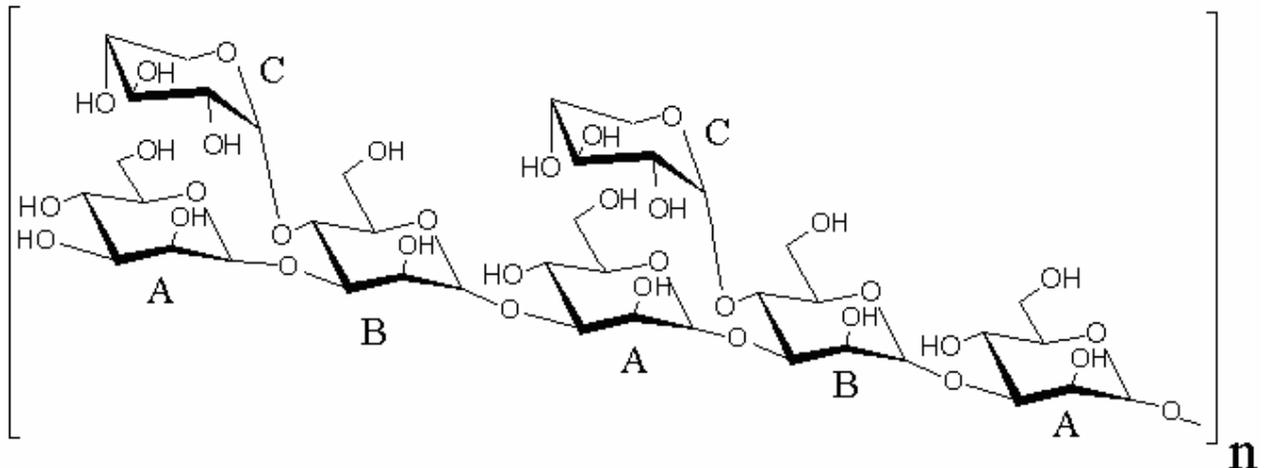


FIGURA 16- POSSÍVEL ESTRUTURA PARA α -(1 \rightarrow 3)-XILOMANANA PRODUZIDA POR *L. boryana* EM MEIO LÍQUIDO.

(A) \rightarrow 3)-Manp-(1 \rightarrow , (B) \rightarrow 3,4)-Manp-(1 \rightarrow , (C) Xylp-(1 \rightarrow

Não foi encontrado nenhum relato na literatura de estruturas similares a esta para qualquer fungo do gênero *Lentinula* (*Lentinus*), portanto este é o primeiro relato de uma xilomanana para o gênero *Lentinula*. Uma xilomanana foi isolada do micélio de *Armillaria mellea*, esta contém uma cadeia principal de manose com ligações do tipo α -(1 \rightarrow 3), substituída em O-4 por cadeias laterais de 4-O- β -D-Xylp-D-Xylp (BOUVENG; FRASER; LINDBERG, 1967). Também foi relatada uma α -(1 \rightarrow 3)-D-xilomanana de *Polyporus tumulosus*, mas esta possui uma cadeia principal de α -(1 \rightarrow 3)-D-manose piranosídica substituída em O-2 por cadeias laterais de xilobiose (revisado por BARRETO-BERGTER; GORIN, 1983). Após a degradação controlada de Smith, foi possível a visualização de sinais de ^{13}C , de manose, que são muito similares aos sinais de ^{13}C de xilomananas obtidas a partir de corpos de frutificação de *Flammulina velutipes* (SMIDERLE et al., 2006) e de glucoranoxilomanana de *Tremella mesenterica* (VINOGRADOV et al., 2004).

As análises das composições monossacarídicas (tabela 5) dos EPS produzidos por *L. boryana* mostraram que o EPS possui teores de manose e de xilose, respectivamente, de 21,2 e 3,5%, pressupondo que estes dois monossacarídeos compõem apenas esta xilomanana, então, aproximadamente um quarto do EPS produzido por *L. boryana* é composto desta xilomanana.

Como visto os resultados da composição monossacarídica mostram uma predominância da β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana em LBMIp, os resultados das análises de metilação não são diferentes. A metilação de LBMIp mostrou predominância de derivados referentes aos terminais não redutores de glucose (figura 17-C) (2,3,4,6-Me₄-Glc, 29,1%), a glucose O-3 ligada (figura 17-A) (2,4,6-Me₃-Glc, 31,3%) e glucose dissubstituída em O-3 e O-6 (figura 17-B) (2,4-Me₂-Glc, 32%). Como visto, estes derivados têm proporções bastante similares (~ 30%), isto indica que este exopolissacarídeo é bastante ramificado, possuindo uma proporção de um ponto de ramificação para cada duas unidades da cadeia principal.

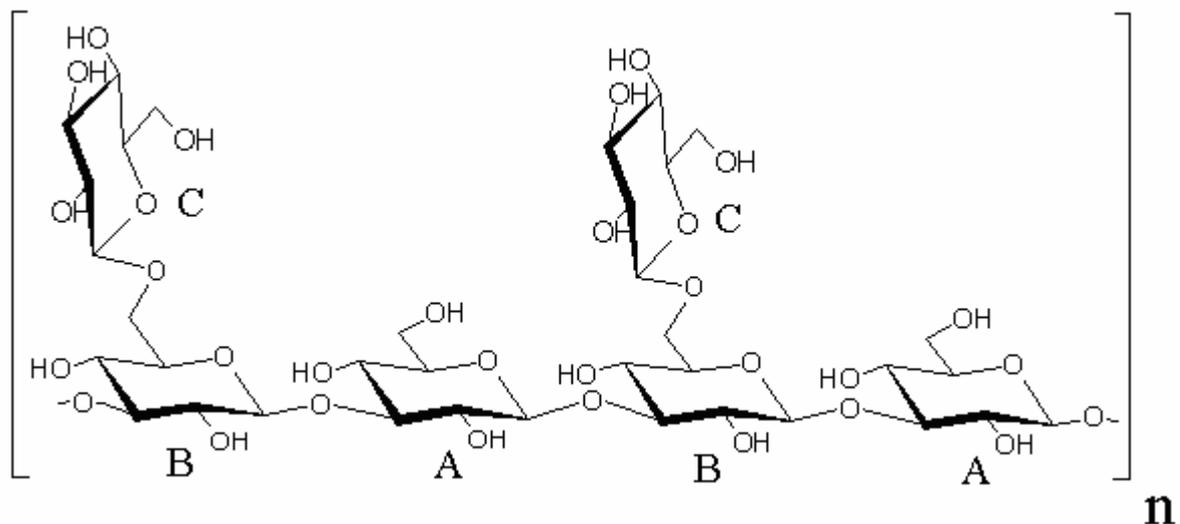


FIGURA 17- POSSÍVEL ESTRUTURA PARA β -(1 \rightarrow 3)-D-GLUCANA PRODUZIDA POR *L. boryana* EM MEIO LÍQUIDO

(A) \rightarrow 3)-Glc p -(1 \rightarrow (B) \rightarrow 3,6)-Glc p -(1 \rightarrow (C) Glc p -(1 \rightarrow

Na literatura são encontrados diversos trabalhos relacionados às β -(1 \rightarrow 3)-D-glucanas com ramificações em C-6 de fungos e macrofungos (CHIHARA et al., 1970; MAEDA et al., 1988; WASSER; WEIS, 1999). Desta gama de trabalhos foram selecionados alguns relacionados aos EPS de outros fungos para comparar os resultados obtidos com o EPS de *L. boryana*.

Uma das β -D-glucanas mais estudadas de fungos é a lentinana (β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana) de *Lentinula edodes*, este polissacarídeo possui uma cadeia principal

composta de unidades de glucose ligadas por ligações do tipo β -(1→3) com ramificações em O-6, sendo uma ramificação para cada cinco unidades da cadeia principal (SASSAKI; TAKASUKA, 1976). Um exopolissacarídeo similar à lentinana, com três ramificações para cada cinco resíduos da cadeia principal, chamado de pestalotana, foi caracterizado por Misaki et al. (1984), este polissacarídeo foi produzido em meio líquido por *Pestalotia sp.* 815.

A escleroglucana derivada de *Sclerotium glucanicum* tem massa molar entre $1,3 \times 10^5$ e $6,0 \times 10^6$ Da, as ramificações de glucose estão distribuídas regularmente a cada três unidades da cadeia principal. A escleroglucana obtida do *Sclerotium glucanicum* tem menor massa molar, aproximadamente $1,8 \times 10^4$ Da, possui uma ramificação para cada cinco ou seis unidades da cadeia principal de glucose. A epiglucana, de *Epicoccun nigrum*, também é uma β -D-glucana com esqueleto formado por ligações do tipo β -(1→3) com duas substituições em O-6 a cada três resíduos (CHEN; SEVIOUR, 2007).

Exopolissacarídeos produzidos por cultivo submerso de diferentes espécies de *Pleurotus* apresentaram composição e estrutura semelhantes. O polissacarídeo estudado apresentou baixa solubilidade em água, o que foi atribuído à elevada massa molecular. Com análises de metilação, RMN-¹³C e degradação parcial de Smith, foi possível a caracterização do mesmo como sendo uma β -(1→3)-D-glucana com uma ramificação em O-6 para cada duas ou três unidades da cadeia principal (GUTIÉRREZ, PRIETO, MARTINEZ, 1996).

5.2.2 Polissacarídeos dos Corpos de Frutificação de *Lentinula boryana*

5.2.2.1 Obtenção e Purificação de Polissacarídeos dos Corpos de Frutificação de *L. boryana* (Experimento I)

O esquema descrito na figura 18 é referente às etapas realizadas no processo de purificação de polissacarídeos obtidos a partir do corpo de frutificação de *L. boryana*. Neste primeiro experimento os polissacarídeos foram obtidos a partir de uma extração com água fervente por duas horas, gerando o Extrato Aquoso 1. A tabela 7 demonstra

a composição monossacarídica das frações obtidas neste processo. Como descrito no item 4.3.2, foi feito um trabalho inicial utilizando a fração solúvel no processo de gelo e degelo. As precipitações com reativo de Fehling fez com que ocorresse uma diminuição da concentração de glucose nas frações PF-CLbS e PF2-CLbS. O fato mais inusitado foi que com a ultrafiltração em membrana de 300 kDa diminuiu a proporção de glucose, tanto que foi possível detectar a presença da fucose, monossacarídeo que não havia sido detectado nas frações anteriores.

Com as análises de HPSEC, demonstradas na figura 19, foi possível verificar que a fração precipitada em Fehling (PF2-CLbS) apresentava-se heterogênea. Com a ultrafiltração ocorreu a predominância de um pico, mas a amostra ainda não estava homogênea. Na figura 20 é feita uma comparação das amostras retidas nas duas seqüências de ultrafiltração em membranas com poro com limite de exclusão de 300 kDa, onde pode ser observado uma diminuição de “contaminantes” da amostra, mas ainda a amostra continuava heterogênea. Devido a quantidade escassa de amostra, optou-se por fazer as caracterizações químicas da amostra retida por duas vezes na membrana de 300 kDa (TZR2-PF2-CLbS).

TABELA 7- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE *L. boryana*

Frações	Monossacarídeos (mol %) ⁽¹⁾				
	Fuc	Xyl	Man	Gal	Glc
CLbS			11,3	17,4	71,3
PF-CLbS			8,5	26,2	65,3
PF2-CLbS			13,9	36,3	49,8
TZR-PF2-CLbS	9,4	0,4	17,5	44,5	28,1
TZR2-PF2-CLbS	9,9		18,5	48,5	23,1
TZE-PF2-CLbS			5,5	26,5	68,0
TRE-PF2-CLbS			13,3	48,3	38,5

(1) Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução (NaBH₄) e acetilação.

Obs.: Ver lista de siglas figura 18

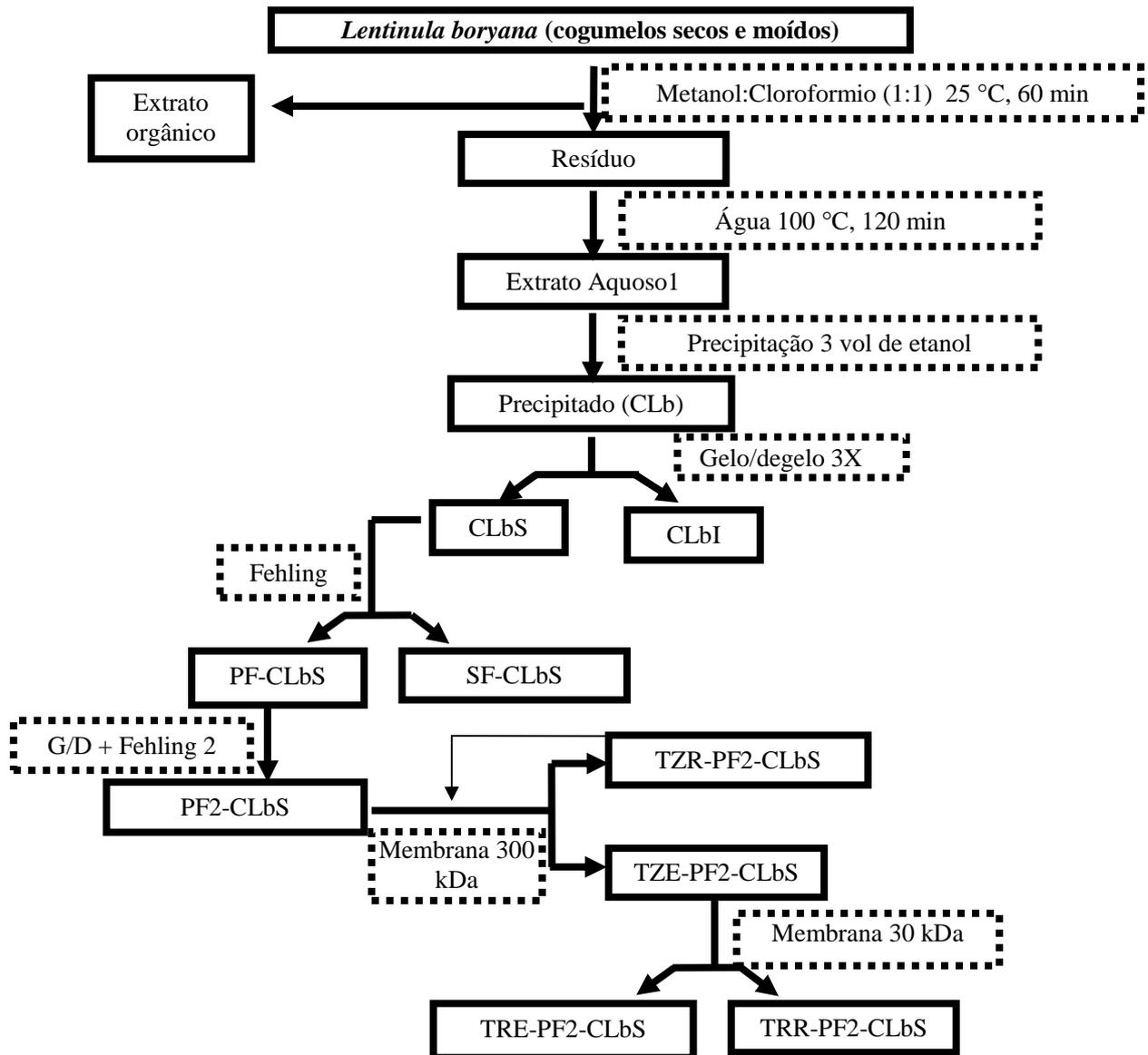


FIGURA 18- ESQUEMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE *L. boryana*

CLb: Precipitado etanólico;

CLbS: Fração solúvel no gelo e degelo;

CLbI: Fração insolúvel no gelo e degelo;

SF-CLbS: Fração não precipitada no reativo de Fehling

PF-CLbS: Fração precipitada no reativo de Fehling

PF2-CLbS: Fração precipitada duas vezes com reativo de Fehling

TZR-PF2-CLbS: Fração retida na membrana de diálise de 300 kDa (MWCO)

TZE-PF2-CLbS: Fração retida na membrana de diálise de 300 kDa (MWCO)

TRR-PF2-CLbS: Fração retida na membrana de diálise de 30 kDa (MWCO)

TRE-PF2-CLbS: Fração retida na membrana de diálise de 30 kDa (MWCO)

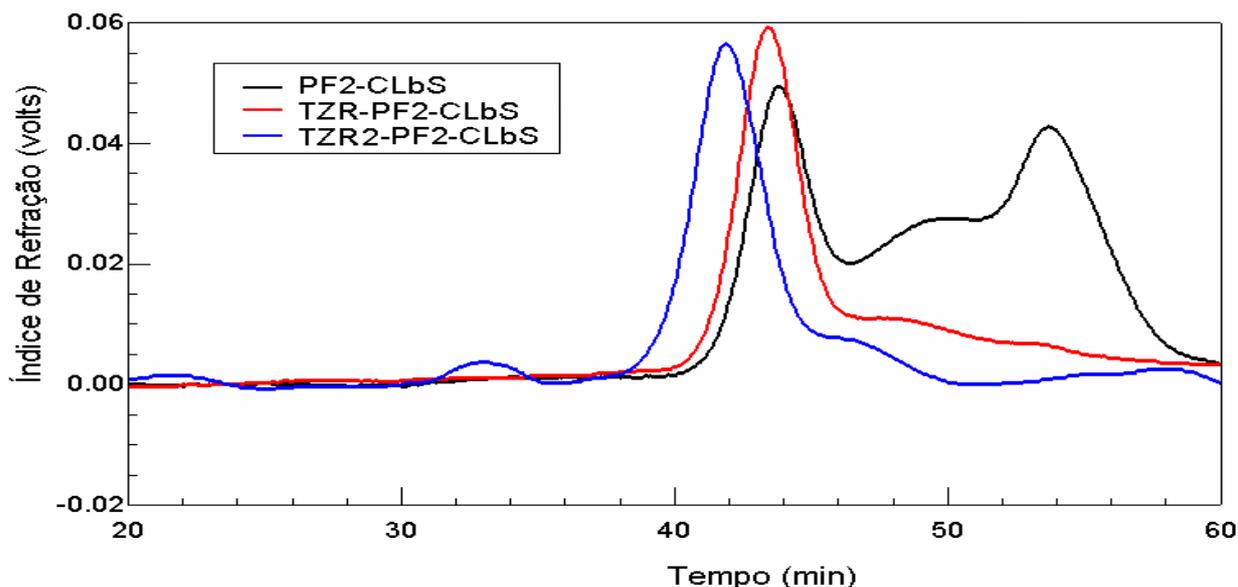


FIGURA 19 – PERFIL DE ELUIÇÃO DAS AMOSTRAS PF2-CLbS, TZR-PF2-CLbS E TZR2-PF2-CLbS (HPSEC)

PF2-CLbS– Fração solúvel no gelo e degelo precipitado com reativo de Fehling

TRZ-PF2-CLbS– Fração precipitado duas vezes com reativo de Fehling e retido na membrana de 300 kDa.

TRZ2-PF2-CLbS– Fração precipitado duas vezes com reativo de Fehling e retido duas vezes na membrana de 300 kDa

A análise de RMN de ^{13}C da amostra TRZ-PF2-CLbS (figura 20), indica a presença de C-1 de galactose piranosídica em configuração α na região de 98.7 ppm, em 67.2 ppm há um sinal de C-6 ligado. O sinal de C-1 de terminal redutor de α -D-manose é observado em 102.2 ppm e o C-1 de L-fucose tem 101.7 ppm. O sinal na região de 15.7 ppm é referente à CH_3 do terminal redutor de fucose. As análises de metilação indicaram a presença de derivados parcialmente metilados de 2,3,4-Me₃Fuc (12%) e 2,3,4,6-Me₄Man (21%), referentes aos terminais não redutores de fucose e manose, respectivamente. Foram detectados outros derivados referentes à cadeia principal de galactose ligada em O-6 (2,3,4-Me₃Gal, 32%) e pontos de ramificação galactose ligada em O-6 e O-2 (3,4-Me₂Gal, 35%). Portanto, as análises de metilação e RMN- ^{13}C indicam a presença de uma heterogalactana ou fucomanogalactana com cadeia principal formada por galatopiranosose com ligações do tipo $\alpha(1\rightarrow6)$. Esta cadeia principal é bastante ramificada em O-2 por terminais de manose ou fucose, sendo aproximadamente uma ramificação para cada duas unidades da cadeia principal.

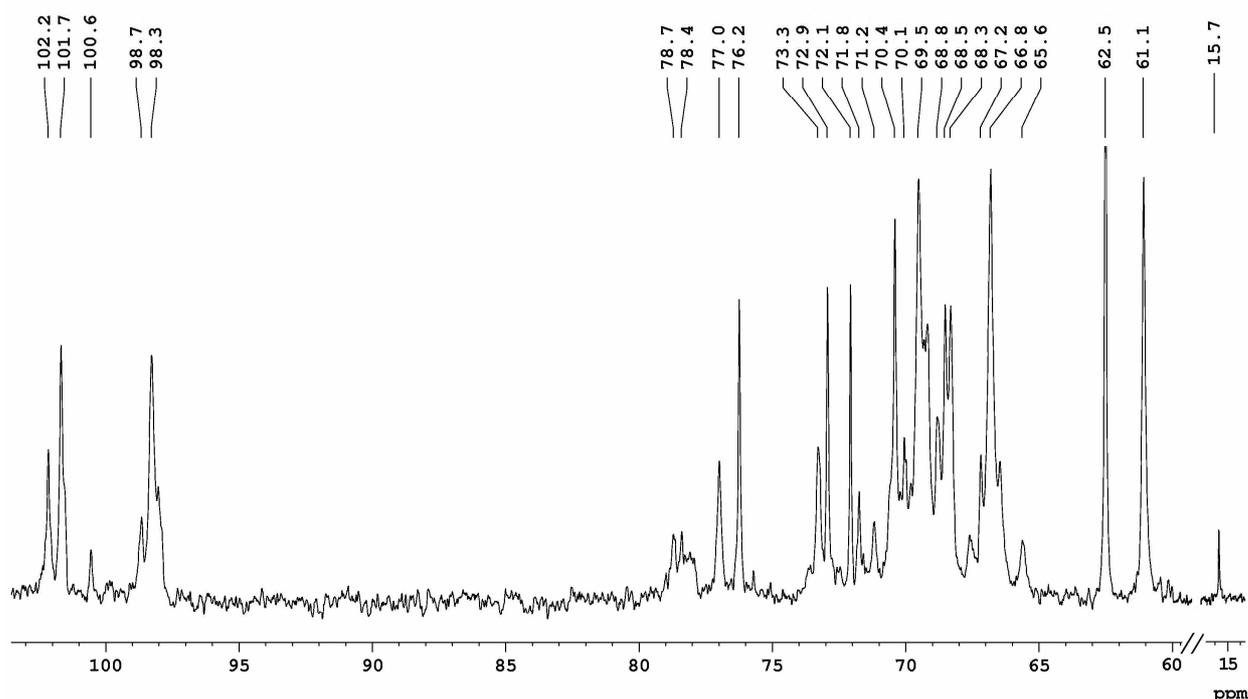


FIGURA 20- ESPECTRO DE RMN- ^{13}C FRAÇÃO TZR2-PF2-CLbS EM D_2O (70 °C)

A análise bidimensional de HMQC relaciona os sinais de carbono-13 com os de hidrogênio das moléculas em análise. Comparando os assinalamentos obtidos no experimento de HMQC, figura 21, com os dados da literatura, pode-se fazer as seguintes atribuições: Os sinais em 5.05/102.1 ppm são referentes a H-1/C-1 de unidades de manose piranosídica de terminais não redutores. Os sinais em 5.07/101.7 ppm H-1/C-1 são de unidades de fucose piranosídicas, a constante de acoplamento determinada foi de $J_{\text{C-1,H-1}} = 174$ Hz, este valor é característico de configuração α . Os assinalamentos em 5.11/98.7 e 4.98/98.6 ppm, com constantes de acoplamento de $J_{\text{C-1,H-1}} = 176$ Hz e $J_{\text{C-1,H-1}} = 175$ Hz, são referentes a H-1/C-1 de unidades de α -galactose piranosídica O-2 substituída e O-2,6 disubstituída, respectivamente. Os sinais em 3.97/77.3 ppm são referentes a H-2/C-2 de unidades de 2-O substituídas de galactose piranosídica. Em 3.72/73.6 há sinais de H-5/C-5 de terminais não redutores de manose, sinais em 3.89/67.3, 3.72/67.2 e 3.63/67.3 são referentes a H-6/C-6 de unidades de galactose O-6 substituída (ALQUINI et al., 2004). Sinais em 3.89/61.5 e 3.75/61.4 são H-6/C-6 de unidades de manose piranosídica de terminais não redutores, sinais em 3.55/62.9 e 3.63/62.9 são de H-6/C-6 terminais de α -manose (SMIDERLE et al., 2006).

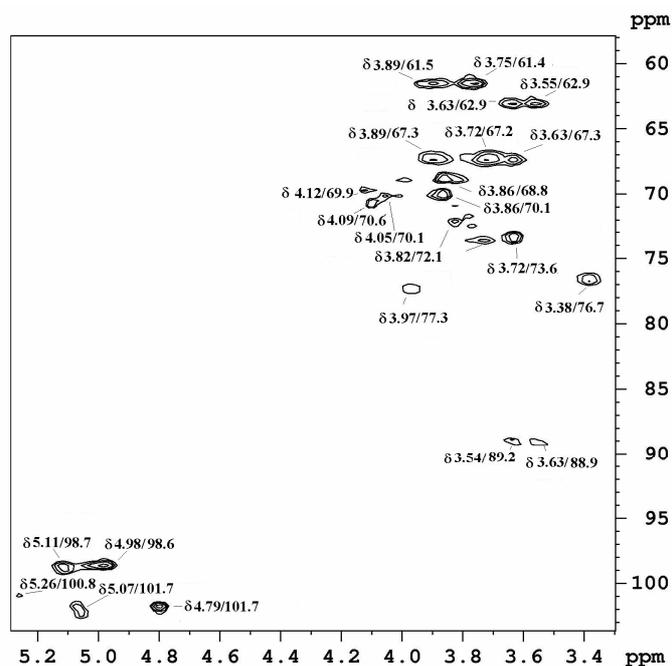


FIGURA 21- ESPECTRO DE HMQC DA AMOSTRA TZR2-PF2-CLbS

Assim como encontrado nos corpos de frutificação de *L. boryana*, as heterogalactanas têm sido caracterizadas em diversos basidiomicetos como *Ganoderma applanatum* (USUI; IWASAKI; MIZUNO, 1981), *Pleurotus ostreatoroseus*, *P. ostreatus* 'Florida' (ROSADO et al., 2003), *Fomitopsis pinicola* (USUI et al., 1981), *Lentinula edodes* (SHIDA et al., 1975), *Flammulina velutipes* (MUKUMOTO; YAMAGUCHI, 1997) *Armillaria mellea* (BOUVENG; FRASER; LINDBERG, 1967) e *Laetiporus sulphureus* (ALQUINI et al., 2004).

Em 1975 SHIDA et al. (1975), trabalhando com corpos de frutificação de *Lentinula edodes*, isolaram e caracterizaram uma heterogalactana constituída de uma cadeia principal de galactopiranosose com ligações do tipo α -(1 \rightarrow 6) com substituição no C-2 por unidades de L-fucopiranosose ou D-manose. Esta estrutura foi sugerida a partir dos dados de metilação, os quais foram basicamente os mesmos aos encontrados no presente trabalho para *L. boryana*, mas com proporções diferentes. Para o *L. edodes* foram encontradas maiores proporções de terminais de fucose (2,3,4-*O*-Me₃Fuc, 19,3%) que para terminais de manose (2,3,4,6-Me₄Man, 11,6%), enquanto para *L. boryana* as proporções encontradas para estes terminais eram de 12 e 21%, respectivamente. Também, para *L. edodes* foi verificada menor proporção de derivados parcialmente metilados disubstituídos (3,4- Me₂Gal, 27,1%) em comparação

a unidades da cadeia principal (2,3,4-Me₃Gal, 40,3%), já para *L. boryana* estas proporções de derivados se alteram para 35% e 32%, ou seja, a estrutura encontrada para o *L. boryana* é mais ramificada que a encontrada para *L. edodes*. Estes resultados mostram que, assim como o *L. edodes*, os corpos de frutificação de *L. boryana* possuem em sua composição uma fucomanogalactana composta por uma cadeia principal de α -(1→6) de galactose piranosídica com ramificações em O-2 com terminais de não redutores de manose e fucose, mas há diferenças nas proporções das ramificações e terminais não redutores.

Além desta estrutura de heterogalactana apresentada para os dois cogumelos do gênero *Lentinula*, outras variações são possíveis para cogumelos de diferentes espécies. No estudo realizado por Mukumoto e Yamaguchi (1997), foi relatado a estrutura de uma manofucogalactana do corpo de frutificação de *Flammulina velutipes*. A heterogalactana que foi obtida por extração com água fria e foi precipitada com acetona (50%), consiste em uma cadeia principal de α -(1→6)-D-galactose piranosídica com um ponto de ramificação a cada três unidades, nestas ramificações estão ligadas unidades de 3-O- α -D-manopiranosose-L-fucose ou L-Fucose. Como visto a heterogalactana de *L. boryana* também é mais ramificada que a de *Flammulina velutipes*.

Utilizando técnicas similares às aplicadas nos trabalhos com *L. boryana* uma heterogalactana foi isolada e caracterizada de *Laetiporus sulphureus*. Neste estudo, os corpos de frutificação desse cogumelo foram extraídos com água fervente, o extrato foi precipitado com etanol e os polissacarídeos foram isolados utilizando técnicas como gelo e degelo, precipitação com reativo de Fehling e ultrafiltração em membrana. Os resultados demonstram que o polissacarídeo isolado apresenta uma cadeia principal de α -(1→6)-D-galactose piranosídica, substituída em O-2 por unidades de O-3- α -D-Manp-L-fucose ou α -D-manopiranosose ou ainda em menor proporção por α -L-fucose. Este polissacarídeo demonstrou ser bastante ramificado com três pontos de ramificação a cada cinco unidades da cadeia principal (ALQUINI et al., 2004).

5.2.2.2 Extração de Polissacarídeos dos Corpos de Frutificação de *L. boryana* (Experimento II)

No primeiro experimento, apresentado na seção 5.2.2, o extrato foi obtido a partir de uma extração dos cogumelos secos (25 g) com água fervente por 2 h, item 4.3.2 dos materiais e métodos. Um novo experimento foi realizado utilizando outros corpos de frutificação secos (100 g), desta vez foi aplicada uma metodologia de extração exaustiva. Estes procedimentos de extração estão descritos em detalhe no item 4.3.3. Resumidamente foram feitos, sequencialmente, uma delipidificação com metanol:clorofórmio, uma extração exaustiva com água fervente, extrações exaustivas com solução de KOH a 1% e a 10% ferventes. Os extratos obtidos nestas extrações foram denominados Extrato Aquoso 2, Extrato KOH 1% e Extrato KOH 10%. Apesar do Extrato Aquoso 2 ter sido obtido antes do Extrato KOH 1%, os procedimentos de purificação e análise foram primeiramente realizados com os polissacarídeos do Extrato KOH 1%. Por este motivo nas próximas seções serão apresentados, nesta ordem, os resultados dos trabalhos com o Extrato KOH 1%, do Extrato Aquoso 2 e do Extrato KOH 10%.

5.2.2.2.1 Purificação de Polissacarídeos do Extrato KOH 1%

O esquema mostrado na figura 22 é referente aos procedimentos utilizados para purificação de polissacarídeos obtidos do Extrato KOH 1%. Na tabela 8 está demonstrada a composição dos polissacarídeos durante este processo. Pode ser observado que há predominância de glucose nas frações e que com a precipitação com reativo de Fehling ocorreu uma pré-purificação da glucana principal. A purificação foi melhorada pela passagem na membrana de diálise de 1000 kDa (ME-PF2-CLbK1), aumentando ainda mais a proporção de glucose na amostra. A amostra retida na membrana de 500 kDa de limite de exclusão (QR-PF2-CLBK1) apresentou em sua composição monossarídica apenas glucose, sugerindo a presença de uma ou mais glucanas.

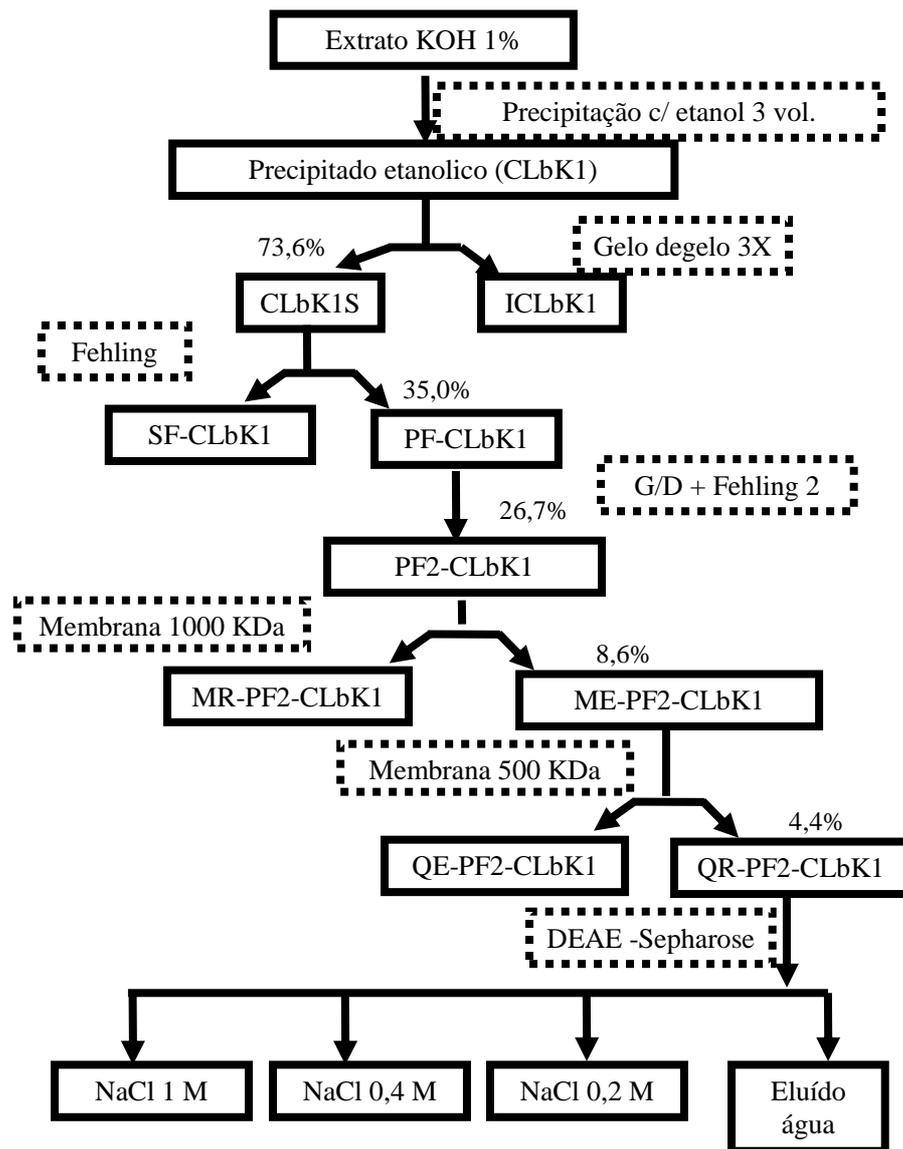


FIGURA 22- ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DO EXTRATO KOH 1%

CLbK1: Precipitado etanólico do extrato KOH 1% (22,6826 g);

CLbK1S: Fração solúvel no gelo e degelo (16,88 g) ;

ICLbK1: Fração insolúvel no gelo e degelo;

SF-CLbK1: Fração não precipitada no reativo de Fehling (3,599 g);

PF-CLbK1: Fração precipitada no reativo de Fehling (8,039 g);

PF2-CLbK1: Fração precipitada duas vezes com reativo de Fehling (6,114 g)

MR-PF2-CLbK1: Fração retida no saco de diálise de 1000 kDa (MWCO)

ME-PF2-CLbK1: Fração eluída no saco de diálise de 1000 kDa (MWCO)

QE-PF2-CLbK1: Fração eluída no saco de diálise de 500 kDa (303,9 mg)

QR-PF2-CLbK1: Fração retida no saco de diálise de 500 kDa (1,0175 g)

D0,0-QR-PF2-CLbK1: Fração eluída com água na coluna de DEAE-Sepharose (15,3 mg)

D0,2-QR-PF2-CLbK1: Fração eluída com NaCl (0,2 M) na DEAE-Sepharose (61,7 mg)

TABELA 8- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DO EXTRATO KOH 1%

Frações	Monossacarídeos (mol %) ⁽¹⁾						
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
CLbK1	-	-	1,3	-	4,5	3,7	90,4
CLbK1S	0,8	0,8	0,7	-	2,4	2,4	92,7
PF-CLbK1	1,5	0,5	-	-	1,4	2,2	94,4
NPF-CLbK1	3,6	1,0	3,2	2,5	8,6	3,4	77,6
PF2-CLbK1	-	1,2	-	-	4,1	8,5	86,1
ME-PF2- CLbK1	-	-	-	-	Tc	1,8	97,6
QR-PF2- CLbK1	-	-	-	-	Tc	tc	99,5
QE-PF2-CLbK1	tc	tc	-	-	1,17	13,9	84,3

(1) Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução (NaB₂H₄) e acetilação.

Obs.: Ver legenda de siglas figura 22

Os espectros de RMN de carbono-13 das frações: CLbK1, PF2-CLbK1 e MR-PF2-CLbK1, mostrados respectivamente nas figuras 23, 25 e 26, têm sinais característicos em 102,9 ppm de carbono anomérico de uma glucana com ligações β -(1 \rightarrow 6) na sua cadeia principal e assinalamentos em 85 ppm referente a ligação do tipo β -(1 \rightarrow 3). A figura 24 é referente a RMN-¹³C da fração não precipitada no reativo de Fehling e, além dos assinalamentos relacionados a β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana, possui em δ 99.4 sinal de C-1 em configuração α .

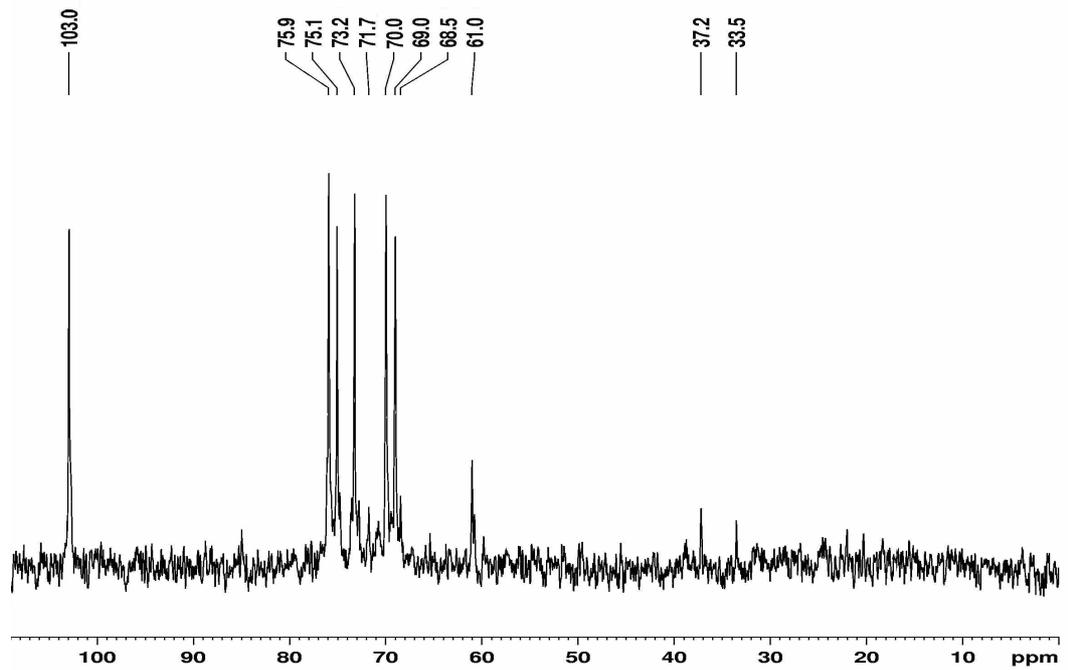


FIGURA 23- ESPECTRO DE RMN-¹³C DA FRAÇÃO CLbK1 EM D₂O (70 °C)

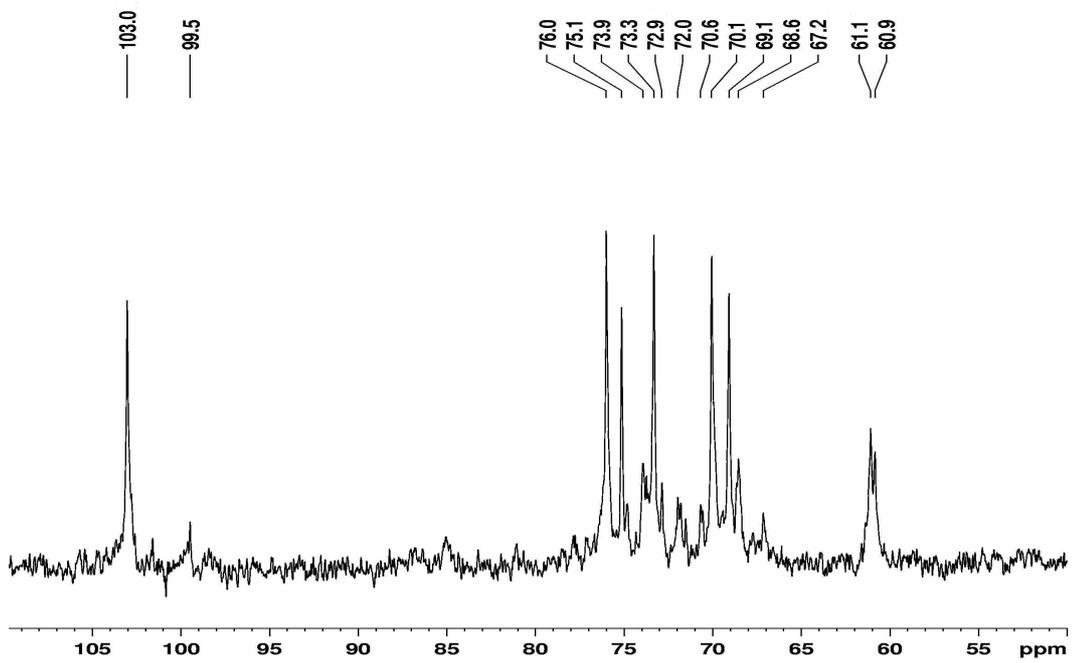


FIGURA 24- ESPECTRO DE RMN-¹³C DA FRAÇÃO NPF-CLbK1

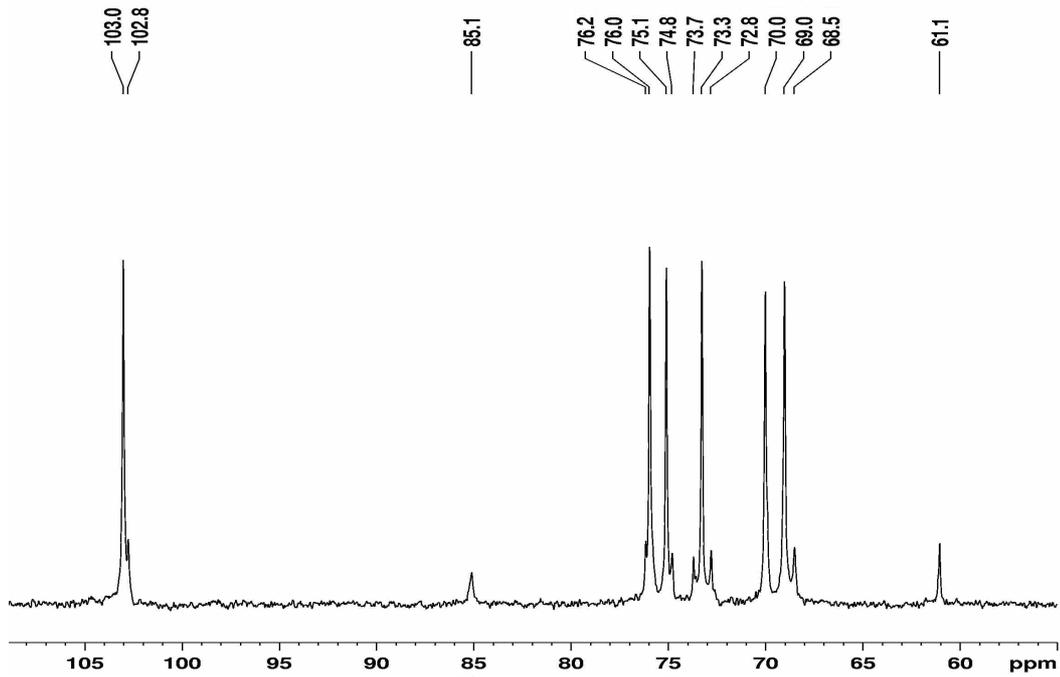


FIGURA 25- ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DA FRAÇÃO PF2-CLbK1 EM. D_2O (70 °C)

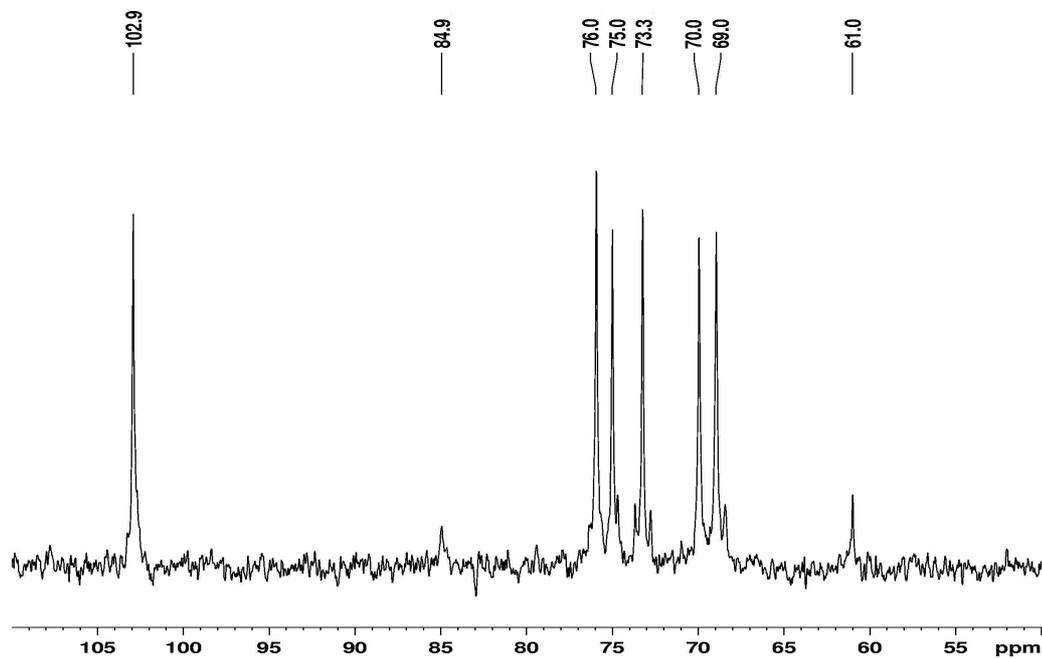


FIGURA 26- ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DA FRAÇÃO MR-PF2-CLbK1 EM D_2O (70°C)

O perfil de eluição da amostra precipitada com reativo de Fehling (PF2-CLbK1), figura 27, mostra que a amostra ainda não estava homogênea. Mesmo assim, foi feita uma metilação desta amostra (PF2-CLbK1) que mostrou derivados alditois acetato parcialmente metilados de glucose referentes a terminais não redutores (2,3,4,6-Me₄Glc, 14,1%), referentes a cadeia principal de glucose (1→6) ligada (2,3,4-Me₃Glc, 40,4%) e pontos de ramificação da cadeia em O-3 (2,4-Me₂Glc, 7,6%). Foi encontrado também derivado referente a glucose (1→3) ligada (2,4,6-Me₃Glc, 8,1%), que poderia ser proveniente de um polissacarídeo contaminante ou uma cadeia lateral ligada a cadeia do polissacarídeo principal. O processo de metilação também apresentou, numa proporção considerável, outros derivados referentes a terminais redutores de fucose (2,3,4-Me₃Fuc, 5,8%) e manose (2,3,4,6-Me₄Man, 6,6%), galactose ligada em O-6 (2,3,4-Me₃Gal, 9,2%) e galactose dissubstituída em O-6 e O-2 (3,4-Me₂Gal, 5,6%). Estes derivados são referentes à fucomanogalactana caracterizada anteriormente. Nesta mesma figura 27, pode-se observar que a amostra retida na membrana de 1000 kDa ficou menos heterogênea que a precipitada com reativo de Fehling. A figura 28 mostra que tanto a amostra eluída pela membrana de 1000 kDa (ME-PF2-CLbK1) quanto a amostra retida na membrana de 500 kDa (QR-PF2-CLbK1) possuíam um grau de homogeneidade bastante elevado, o que foi confirmado pelas análises de RMN-¹³C, figuras 29 e 30.

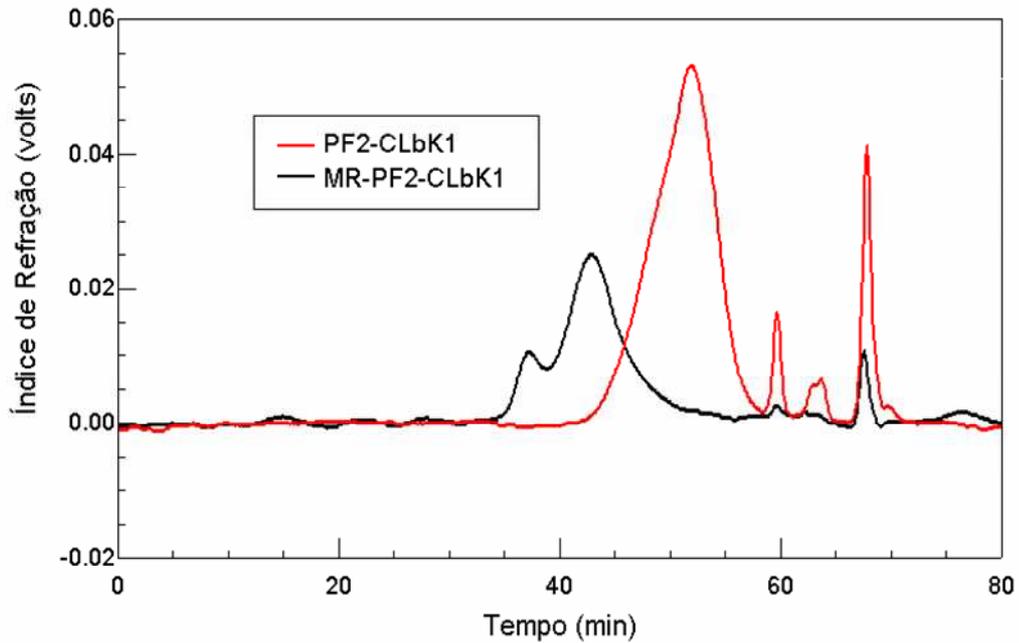


FIGURA 27- PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES PF2-CLbK1 E MR-CLbK1 (HPSEC)

PF2-CLbK1: Fração precipitada duas vezes com reativo de Fehling

MR-PF2-CLbK1: Fração retida no saco de diálise de 1000 kDa (MWCO)

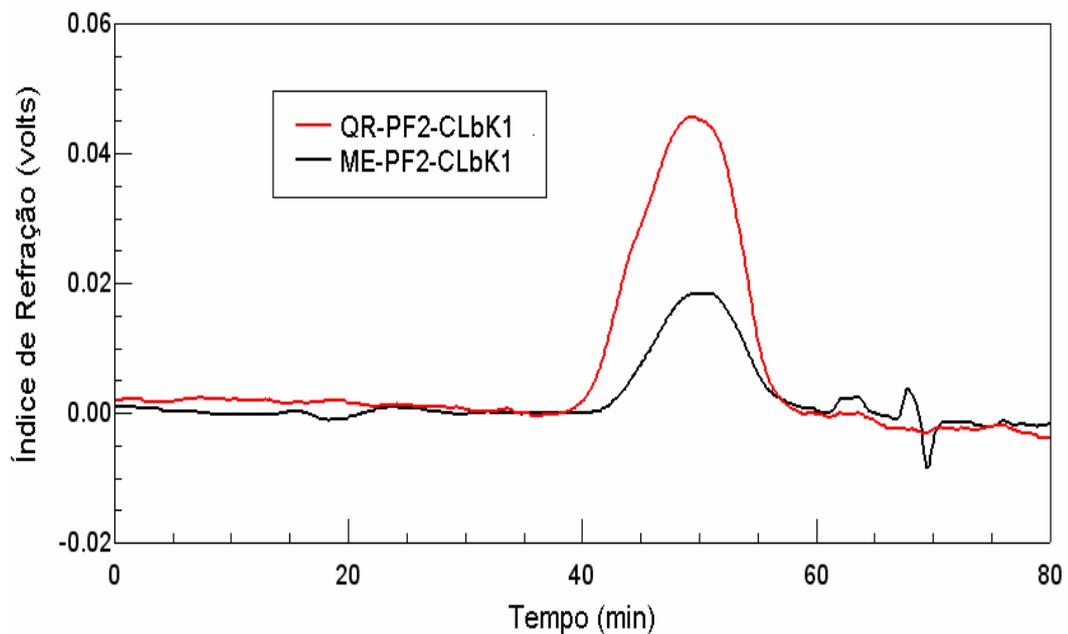


FIGURA 28 – PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES ME-PF2-CLbK1 E QR-PF2-CLbK1 (HPSEC)

QR-PF2-CLbK1–Fração precipitada duas vezes com reativo de Fehling eluído na membrana de 1000 kDa e retido na membrana de 500 kDa

ME-PF2-CLbK1 – Fração precipitado duas vezes com reativo de Fehling e eluído na na membrana de 1000 kDa.

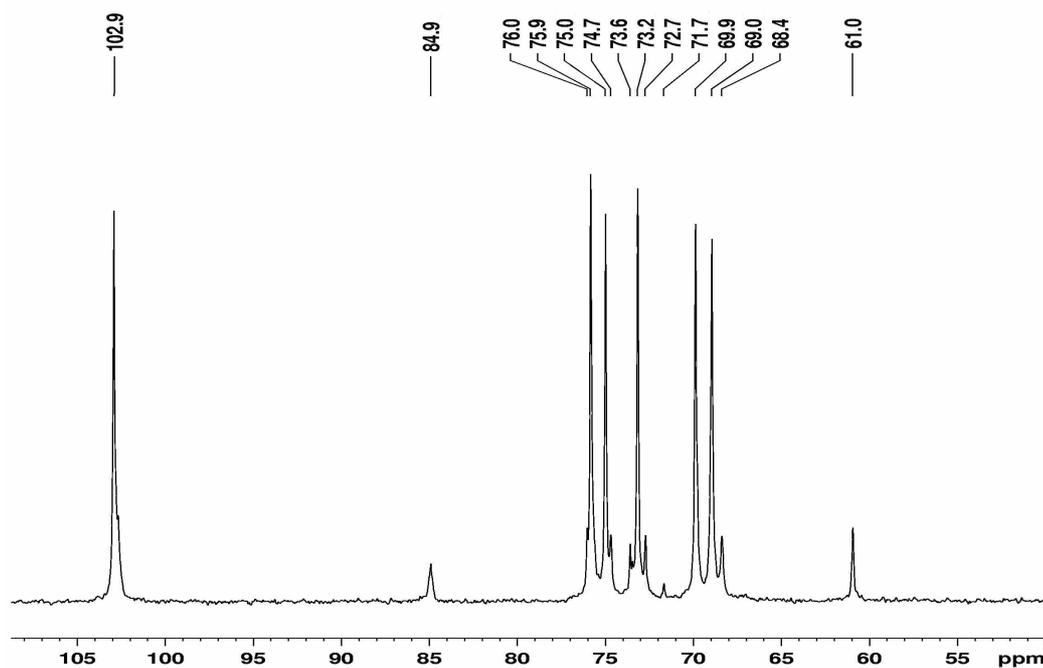


FIGURA 29 - ESPECTRO DE RMN-¹³C FRAÇÃO ME-PF2-CLbK1 EM D₂O (70 °C)

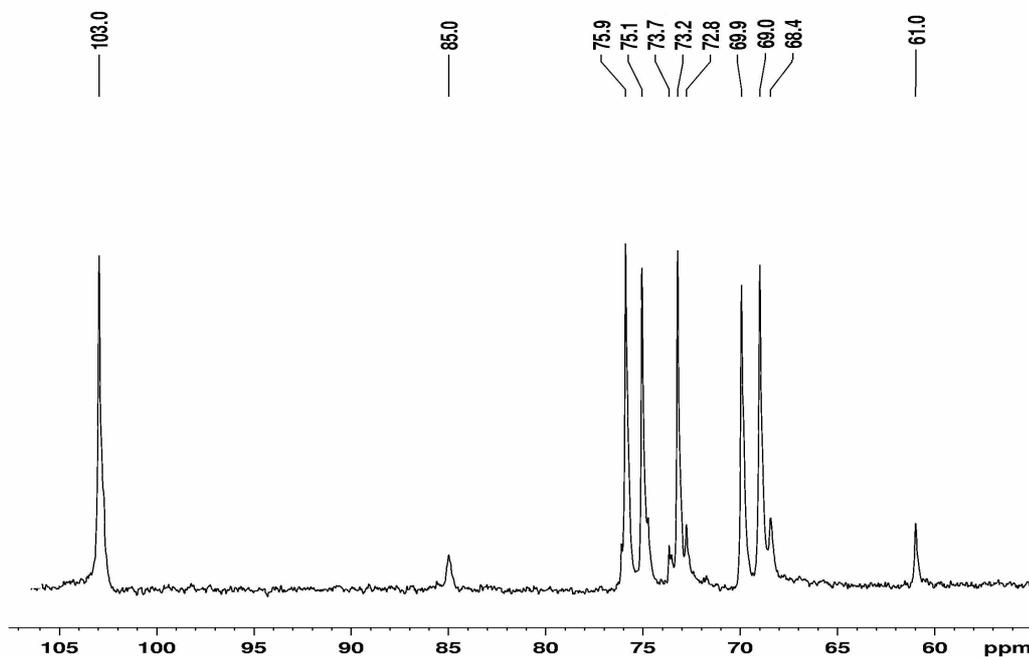


FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN-¹³C FRAÇÃO QR-PF2-CLbK1 EM D₂O (70 °C)

Para melhorar ainda mais o grau de purificação, foram usadas colunas de separação por troca iônica. A tabela 9 é referente às frações obtidas nas duas primeiras

colunas de DEAE-Sepharose que foram realizadas. Como pode ser observado, nos dois processos parte dos polissacarídeos foi eluída com apenas água e o restante dos polissacarídeos foi eluído com concentrações de NaCl (0,1 e 0,2 M).

TABELA 9- PURIFICAÇÃO POR DEAE-SEPHAROSE DA AMOSTRA QR-PF2-CLbK1

Primeira coluna de DEAE-Sepharose		Segunda coluna de DEAE-Sepharose	
Tubos - NaCl (M)	Abs (490 nm)	Tubos - NaCl (M)	Abs (490 nm)
0	0,631	0	0,533
0'	0,001	0'	0,036
0,1	0,71	0''	0,025
0,2	0,519	0'''	0
0,3	0,095	0,2	0,554
0,4	0,064	0,2'	0,607
0,5	0,063	0,4	0,064
1	0,062	1	0,025

A figura 31 mostra o padrão de eluição de uma terceira coluna de DEAE-Sepharose, e novamente o mesmo padrão de eluição foi observado. Nesta última coluna foram carregados 100 mg de amostra (QR-PF2-CLbK1), sendo que 16,3 mg foram eluídos com água e 82 mg foram eluídos com NaCl (0,2M).

Na figura 32 está representado a homogeneidade das frações retido na membrana de 500 kDa de poro de exclusão (QR-PF2-CLbK1), a fração eluída com água (D0,0-QR-PF2-CLbK1) e a fração eluída com NaCl (0,2 M) (D0,2-QR-PF2-CLbK1). Com essa análise pode ser observado que a fração QR-PF2-CLbK1 não está homogênea. Também pode ser observado que as frações eluídas com água e NaCl (0,2 M) estão homogêneas e são diferentes, sendo as moléculas contidas na fração eluídas com água são mais polidispersas.

Os espectros de RMN-¹³C das frações D0,0-QR-PF2-CLbK1 e D0,2-QR-PF2-CLbK1 mostram que estas são bastante similares, mas pode ser observado uma diminuição significativa do sinal na região de 85 ppm que é referente ao C-3 ligado em configuração β , figuras 33 e 34. As análises de metilação destas amostras, mostradas na tabela 10, confirmam que são moléculas distintas. A amostra D0,0-QR-PF2-CLbK1 mostrou ser composta por uma cadeia principal de glucose ligada em O-6 (2,3,4-

Me₃Glc, 98%). Também foi observada uma pequena proporção do derivado (2,4-Me₂Glc, 1,5%) referente à ramificação da cadeia em O-3.

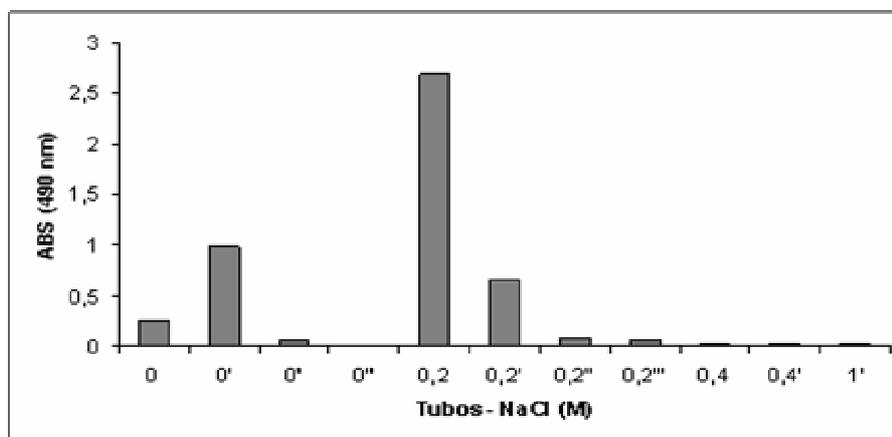


FIGURA 31- PERFIL DE ELUIÇÃO DA COLUNA DE DEAE-SEPHAROSE DA FRAÇÃO QR-PF2-CLbK1

TABELA 10- METILAÇÃO DAS FRAÇÕES PURIFICADAS POR DEAE-Sephadex

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados ⁽¹⁾	D0,2-QR-PF2-CLbK1 mol %	D0,0-QR-PF2-CLbK1 mol %	Tipo de ligação ⁽²⁾
2,3,4,6-Me ₄ Glc	13,8	tc	Glc _p -(1→
2,4,6-Me ₃ Glc	12,5	-	→3)-Glc _p -(1→
2,3,4-Me ₃ Glc	58,2	98,0	→6)-Glc _p -(1→
2,4-Me ₂ Glc	15,6	1,5	→3,6)-Glc _p -(1→

(1) Analisado em GC-MS após metilação, hidrólise ácida total, redução (NaB₂D₄) e acetilação.

(2) Baseados nos derivados acetilados parcialmente *O*-metilados.

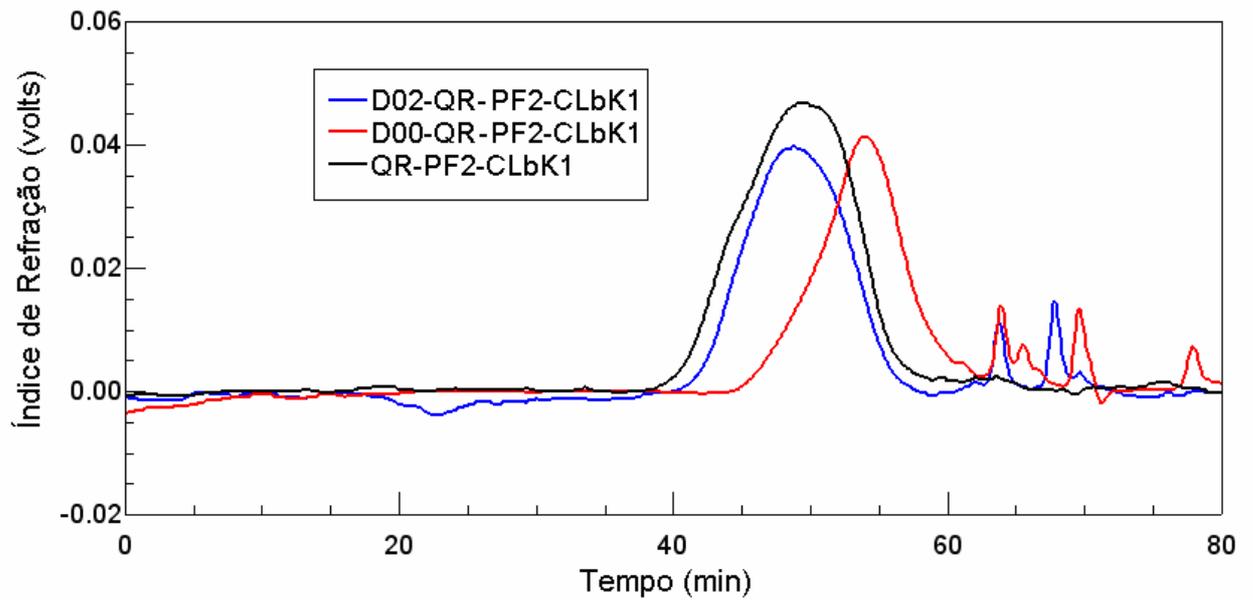


FIGURA 32- PERFIL DE ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES RETIDAS NA MEMBRANA DE 500 kDa E ELUÍDAS NA COLUNA DE TROCA IÔNICA

QR-PF2-CLbK1 – Fração precipitada duas vezes com reativo de Fehling eluído na membrana de 1000 kDa e
 D0,0-QR-PF2-CLbK1 – Fração eluída com água na coluna de DEAE-Sephrose
 D0,2-QR-PF2-CLbK1 – Fração eluída com NaCl (0,2 M) na coluna de DEAE-Sephrose

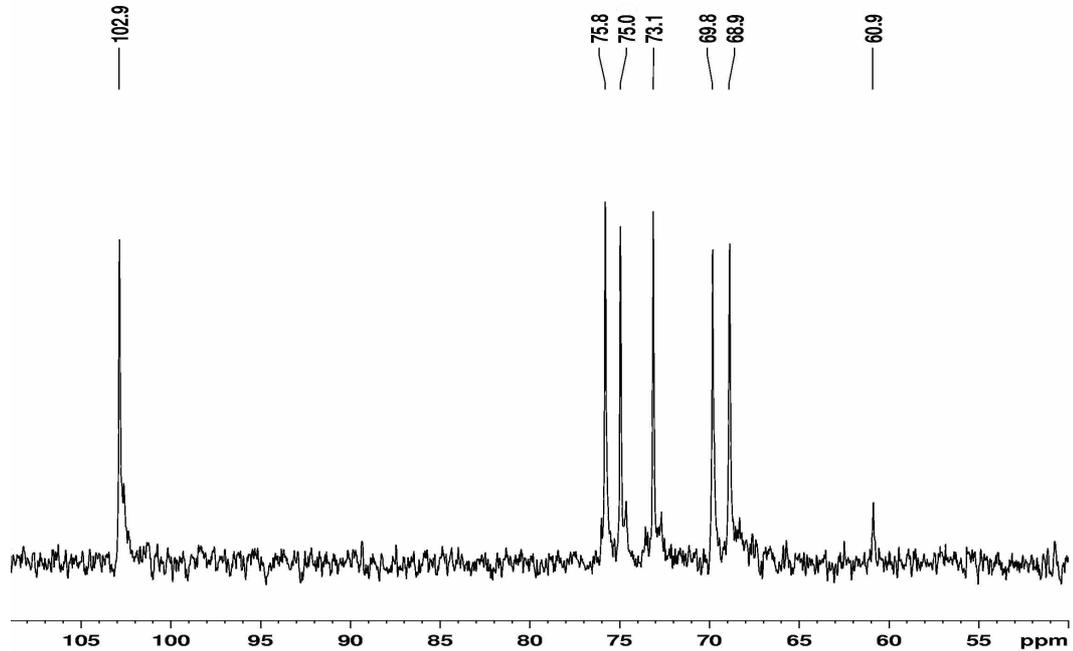


FIGURA 33- ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DA AMOSTRA D0,0-QR-PF2-CLbK1 EM D_2O (70 °C)

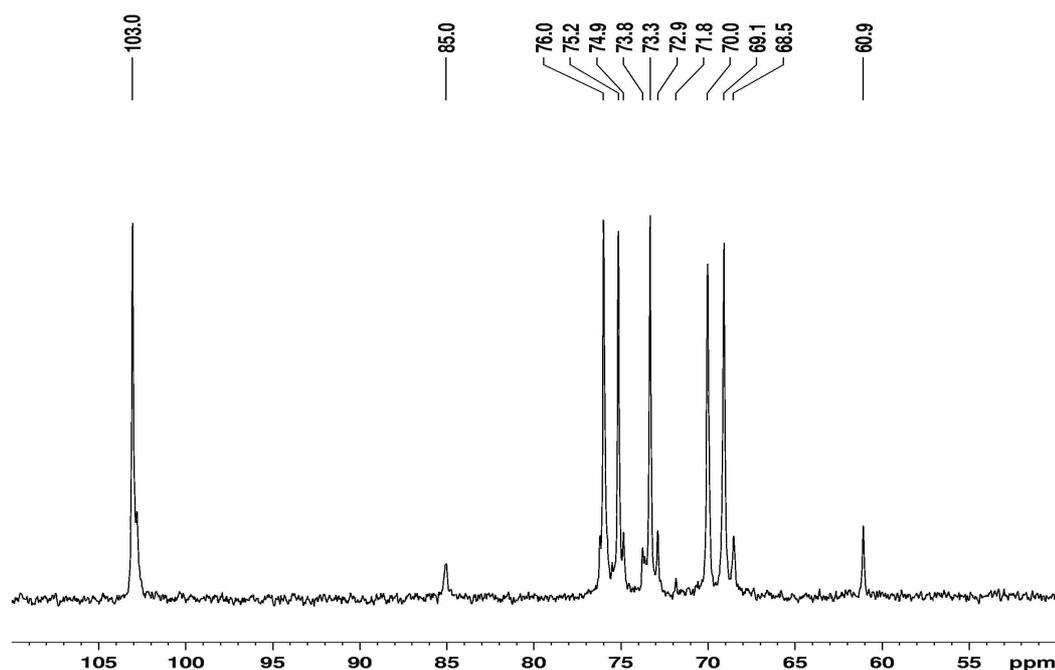


FIGURA 34- ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DA AMOSTRA D0,2-QR-PF2-CLbK1 EM D_2O (70 °C)

A amostra D0,2-QR-PF2-CLbK1 foi considerada pura e outras análises foram realizadas com a mesma. Como descrito na tabela 10, a amostra apresenta derivados parcialmente metilados referentes à terminal não redutor de glucose (2,3,4,6-Me₄Glc, 13,8%), referentes à cadeia principal de glucose ligada em O-6 (2,3,4-Me₃Glc, 58,2%), referentes aos pontos de ramificação da cadeia com glucose ligada em O-6 e O-3 (2,4-Me₂Glc, 15,6%) e referentes à cadeia lateral de glucose ligada em O-3 (2,4,6-Me₃Glc, 12,5%).

O espectro de RMN- ^{13}C (figura 34) contém seis sinais principais, muito semelhantes ao da pustulana descrito por SASSAKI et al (2002). Em campo baixo pode ser observado em δ 103.0 o sinal referente a C-1 de glucose ligada em configuração do tipo β . Os sinais em δ 69.1 e δ 60.9 são referentes à CH₂ de C-6 substituído e C-6 livre respectivamente, os quais foram confirmados pela inversão dos sinais correspondentes na análise de RMN- ^{13}C -DEPT (dados não mostrados). Os sinais observados em δ 73.3; 76.0; 70.0; 75.2 correspondem ao C-2, C-3, C-4 e C-5, respectivamente (SASSAKI et al., 2002).

Os resultados da análise de HMQC (figura 35) e sua comparação com os dados da literatura confirmam os assinalamentos obtidos por RMN-¹³C. O espectro de HMQC mostra sinal em δ 4.78/102.9 referente à H-1/C-1 do terminal de glucopiranosose, enquanto o sinal em δ 4.58/102.9 é referente à H-1/C-1 ligada. A configuração β foi evidenciada por estes sinais de H-1/C-1 em campo baixo. O sinal em δ 3.79/85.0 é referente à H-3/C-3 da unidade 3,6-O dissubstituída. O sinal em δ 3.55/76.0 e o sinal em δ 3.66/75.1 são referentes aos H-3/C-3 e H-5/C-5, respectivamente, das unidades O-6 ligada. O H-4/C-4 e o H-2/C-2 da unidade O-6 ligada estão assinalados em δ 3.53/70.1 e δ 3.42/73.3, respectivamente. Os sinais δ 4.24/69.0; 3.91/69.0 e δ 3.99/60.9; 3.79/61.1 são referentes a CH₂ de C-6 ligados e C-6 livres, respectivamente. Estes assinalamentos indicam a presença de uma β -(1→6)-D-glucana com ramificações do tipo β -(1→3) (OSAKU et al., 2002; SASSAKI et al., 2002; CARBONERO et al., 2006).

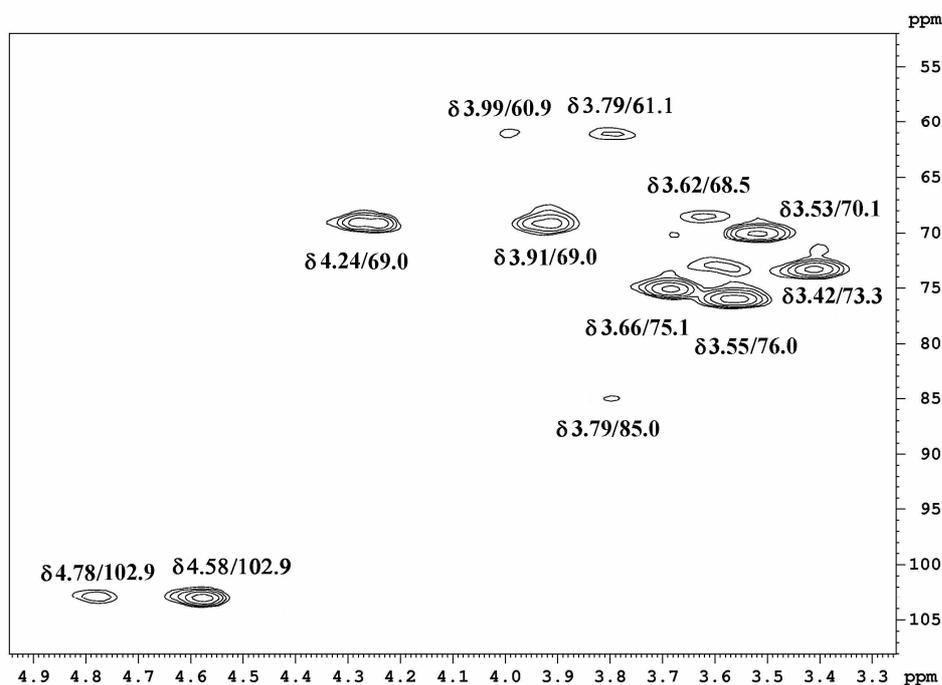


FIGURA 35- HMQC DA AMOSTRA D0,2-QR-PF2-CLbK1 EM D₂O (70 °C)

Na figura 36, está demonstrado possível estrutura do polissacarídeo encontrado. Esta estrutura foi baseada nos dados de metilação, RMN-¹³C e HMQC. O polissacarídeo encontrado é composto por uma cadeia principal de unidades

glucopiranosídicas com ligações do tipo β -(1 \rightarrow 6) (A), possui pontos de ramificação com substituição em O-3 (B), sendo aproximadamente um ponto de ramificação em cada cinco unidades da cadeia principal. Nestas ramificações provavelmente estão ligados dissacarídeos (C-D) de glucose ligadas por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 3).

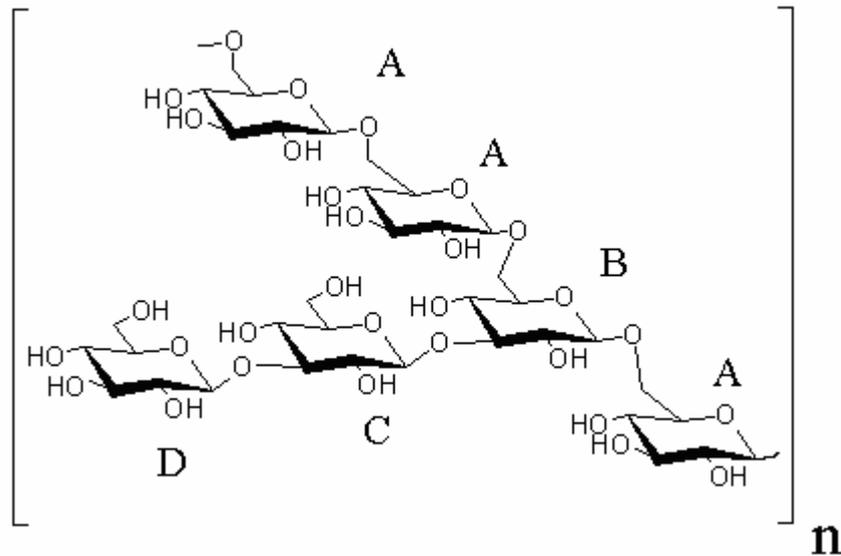


FIGURA 36- ESTRUTURA PROPOSTA PARA β -(1 \rightarrow 6)-D-GLUCANA ENCONTRADA NO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE *L. boryana*
(A) \rightarrow 6)-Glc p -(1 \rightarrow **(B)** \rightarrow 3,6)-Glc p -(1 \rightarrow **(C)** \rightarrow 3)-Glc p -(1 \rightarrow **(D)** Glc p -(1 \rightarrow

Há diversos trabalhos sobre polissacarídeos de basideomicetos principalmente as β -(1 \rightarrow 3)-D-glucanas. Já para polissacarídeos do tipo β -(1 \rightarrow 6)-D-glucanas a gama de trabalhos é mais restrita. Dong et al. (2002) isolaram e caracterizaram uma β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana muito similar ao encontrado para o *L. boryana*, a partir de corpos de frutificação de *Agaricus blazei* Murr (*Agaricus brasilienses*). Utilizando técnicas cromatográficas de separação (DEAE-Sephadex e cromatografia de gel permeação) foi possível isolar um polissacarídeo com massa estimada de $1,7 \times 10^5$ Da. Este polissacarídeo foi submetido a técnicas de metilação, degradação parcial de Smith, RNM- ^{13}C e foi caracterizado como sendo constituído por uma cadeia principal de β -(1 \rightarrow 6)-D-glucose com ramificação em O-3. Nesta ramificação há um dissacarídeo de glucose ligado por ligações β -(1 \rightarrow 3). Pelas proporções dos derivados parcialmente

metilados, foi estimado uma proporção de uma ramificação para cada três unidades de glucose da cadeia principal.

Para *L. edodes* foi verificada a presença de um polissacarídeo composto de uma cadeia principal de β -(1 \rightarrow 6) glucose com ramificações do tipo β -(1 \rightarrow 3), este polissacarídeo está presente na parte intermediária do esqueleto de glucanas (SHIDA et al., 1981). Os corpos de frutificação foram exaustivamente extraídos com álcali. O resíduo desta extração foi tratado com β -(1 \rightarrow 3)-glucanases e assim foi obtido a β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana, neste estudo não foi feita uma caracterização completa deste polissacarídeo.

5.2.3 Processo de Purificação de polissacarídeos do Extrato Aquoso 2

Utilizando o Extrato Aquoso 2, foram realizados diversos procedimentos de purificação como gelo e degelo, precipitação com reativo de Fehling e cromatografia de troca iônica (DEAE-SEPHAROSE). O processo de purificação foi acompanhado por análise da composição monossacarídica e RMN-¹³C. O esquema de purificação, a tabela 11 sobre a composição monossacarídica e a maioria dos espectros de RMN-¹³C estão apresentados no Anexo A. A análise da amostra PF2-WCLb (precipitada duas vezes pelo reativo de Fehling) resume os principais achados neste procedimento de purificação. A amostra apresentou como composição monossacarídica: fucose (3,2 %), manose (5,1 %), galactose (15,4 %) e glucose (76,3%). O espectro de RMN-¹³C da amostra PF2-WCLb (figura 37) apresentou os seguintes sinais, em δ 103.0 referente a C-1 de glucopiranosose em configuração β , em δ 85.0 referente a C-3 ligado, em δ 73.3, 76.2, 70.0, 75.1 referentes a C-2, C-3, C-4, C-5, respectivamente. Sinais em δ 69.5 e 61.1 referentes a C-6 ligado e ligado, respectivamente. Estes sinais são referentes à β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana com ramificações em O-3 apresentada na seção 5.2.3. São visualizados outros sinais de menor intensidade, o sinal em δ 101.6 é referente a C-1 de terminal de manopiranosose, o sinal em δ 98.4 é referente a C-1 de galactopiranosose em configuração α , estes dois sinais são similares aos encontrados para fucomanogalactana apresentado na seção 5.2.2.

Na figura 37 e 38 está demonstrado. a C-1 em β configuração (δ 103), C-3 ligado (δ 86), em δ 73; 76; 70; 75 respectivamente, C-6 ligado (δ 69) e C-6 livre (δ 61). Estes sinais são referentes à β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana com ramificações em O-3 apresentada na seção 5.2.3. Também é possível a visualização de sinais com pequena intensidade em δ 102, referente a C-1 de terminais de manose piranosídica, e em δ 98, referente a sinais de C-1 de galactose em α configuração. Provavelmente estes sinais são referentes à heterogalactana relatada anteriormente, seção 5.2.2. Era esperado que fosse possível o isolamento novamente desta heterogalactana, mas esta estava em concentrações menores do que o esperado. Os cogumelos utilizados neste Experimento II, foram desidratados e ficaram armazenados em sacos plásticos durante aproximadamente um ano antes de serem utilizados. Neste pode ter ocorrido algum tipo de degradação, como a enzimática, que diminui a concentração da heterogalactana. Este tipo de degradação foi relatado anteriormente para a Lentinana de *L. edodes* (MINATO et al, 1999).

Devido ao fato que os procedimentos utilizados não foram suficientes para purificar um polissacarídeo diferente aos descritos anteriormente e à pequena quantidade de amostra após estes procedimentos, decidiu-se não continuar os trabalhos com estas frações.

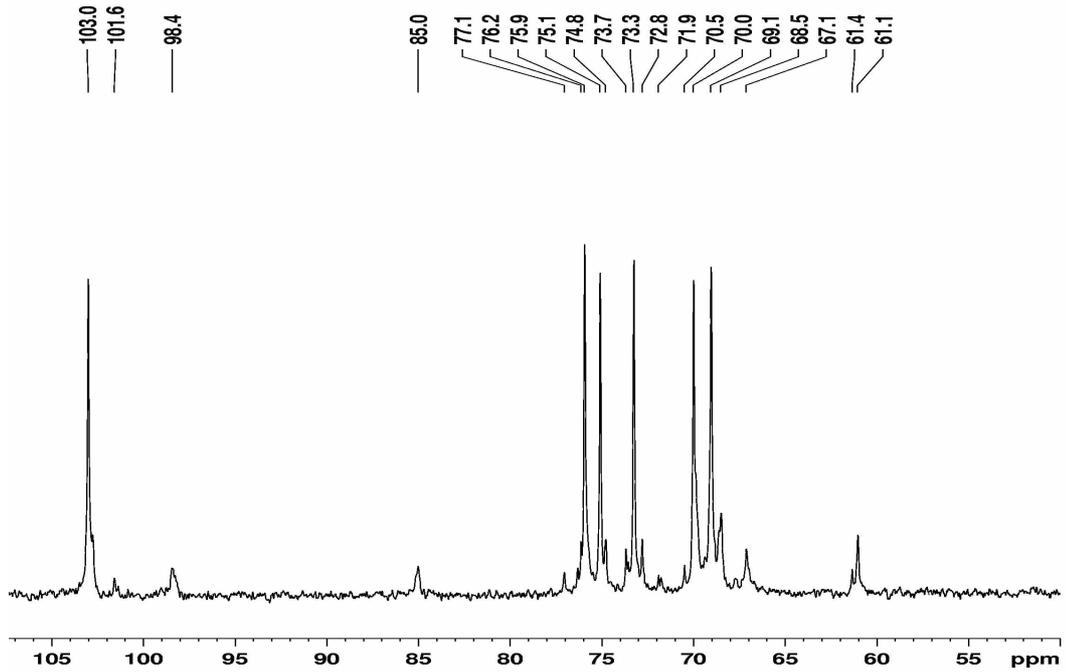


FIGURA 37- ESPECTRO DE RMN-¹³C DA AMOSTRA PF2-WCLb

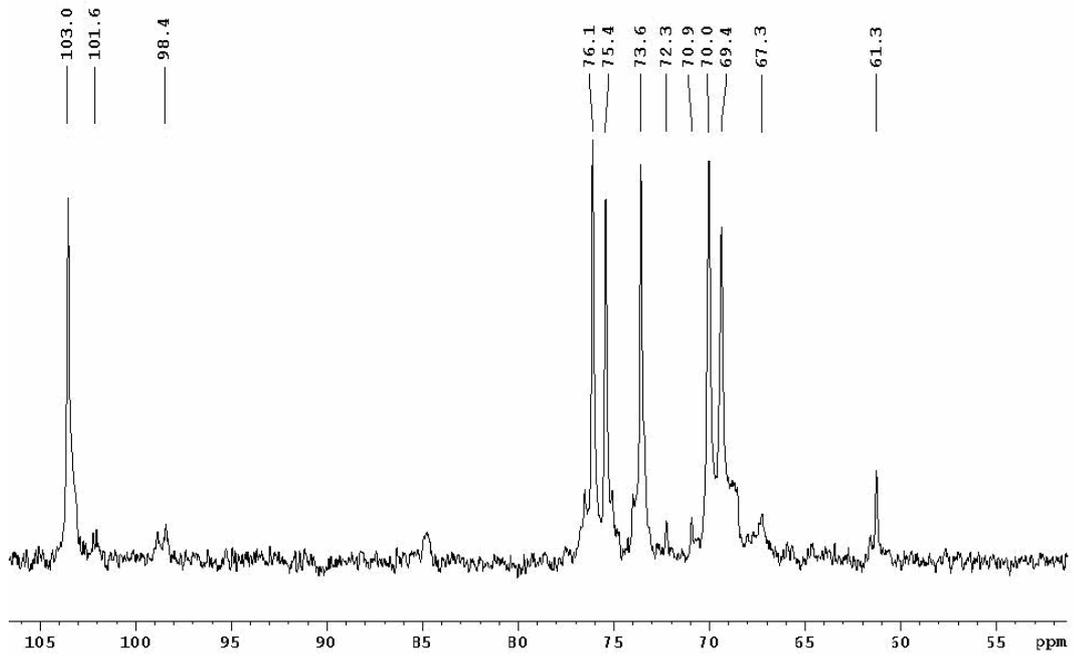


FIGURA 38- ESPECTRO DE RMN-¹³C DA AMOSTRA MR-WCLb-PF2

5.2.4 Purificação e Caracterização de Polissacarídeos do Extrato KOH 10%

Como explicado no item 4.3.6 dos materiais e métodos, os cogumelos foram extraídos com água fervente e solução de KOH (1%). O resíduo deste último processo foi extraído com KOH (10%) fervente até a exaustão. O extrato obtido foi denominado Extrato KOH 10%.

Na figura 39 está mostrado o esquema de purificação utilizado. O Extrato KOH 10% foi acidificado com ácido acético até pH 4,5. Diferentemente dos extratos Aquoso e KOH 1%, neste caso ocorreu precipitação de boa parte dos polissacarídeos. O precipitado obtido foi ressolubilizado e submetido a processo de gelo e degelo por três vezes. A fração insolúvel no gelo e degelo foi solubilizada em solução de KOH 10% e neutralizada novamente com ácido acético até pH 4,5. Numa nova etapa, foi feita a solubilização do material com solução A de Fehling, seguida de precipitação com solução B. Como o objetivo era procurar polissacarídeos diferentes aos anteriormente encontrados, optou-se por continuar os trabalhos com a fração não precipitada em Fehling. Uma terceira precipitação com ácido acético foi realizada, o precipitado obtido foi analisado por metilação, RMN-¹³C e HMQC-RMN.

A amostra PA3-CLbK10 apresentou como composição monossacarídica xilose (6,6%), manose (27,5%) e glucose (63,1%). As análises de metilação mostraram que a amostra é composta por pelo menos dois polissacarídeos, provavelmente uma xilomanana e uma glucana linear. Foram encontrados terminais de xilose piranosídica (2,3,4-Me₃Xyl, 5,3%), manose ligada em O-3 (2,4,6-Me₃Man, 13,3%) e pontos de ramificação de manose dissubstituída em O-3 e O-4 (2,6-Me₂Man, 6,6%). Também foram encontrados derivados parcialmente metilados referentes a terminal de glucose piranisídica (2,3,4,6-Me₄Glc, 2%) e glucose substituída em O-3 (2,4,6-Me₃Glc, 72,3%). Estes resultados sugerem a presença de dois ou mais polissacarídeos. Primeiro serão apresentados os resultados referentes à xilomanana e depois sobre a glucana (1→3) linear.

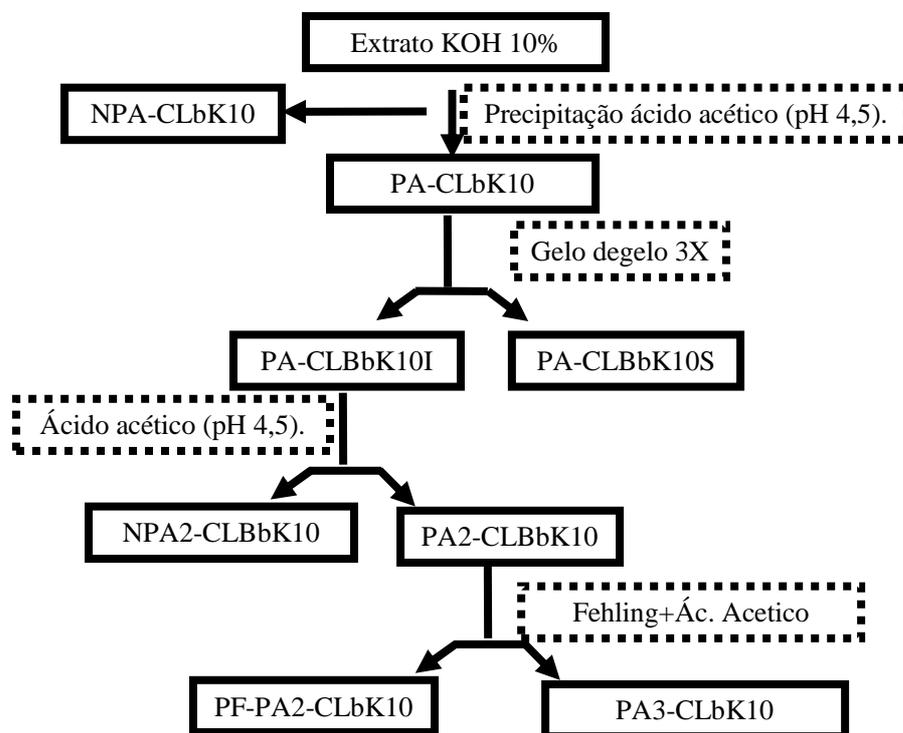


FIGURA 39- ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO PARA POLISSACARÍDEOS DO EXTRATO KOH 10%

NPA-CLbK10 (3,7738 g): Fração não precipitada com ácido acético (pH 4,5)

PA-CLbK10 (2,0164 g): Fração precipitada com ácido acético (pH 4,5)

PA-CLbK10I (1,5665 g): Fração insolúvel no gelo e degelo

PA-CLbK10S (240 mg): Fração solúvel no gelo e degelo

NPA2-CLbK10: Fração não precipitada com ácido acético no segundo ciclo

PA2-CLbK10 (1,6781 g) : Fração precipitada com ácido acético no segundo ciclo

PFPA2-CLbK10: Fração precipitada com reativo de Fehling

PA3-CLBK10: Fração não precipitada com reativo de Fehling e precipitada com ácido acético no terceiro ciclo

Apesar da amostra PA3-CLbK10 apresentar-se heterogênea, com a ajuda da literatura foi possível atribuir diversos sinais no espectro de RMN-¹³C (figura 40).

Com relação à xilomanana, foram visualizados sinais na região anomérica em δ 103.9 referente ao C-1 de unidades de xilose piranosídica (GORIN; MAZUREK, 1974) e sinal em δ 101.6 referente a C-1 das unidades de manose piranosídica. As configurações das ligações foram determinadas pelos valores das constantes de acoplamento ($J_{C-1,H-1}$). As unidades de xilose (H-1/C-1, 4.29/103.9) apresentaram

constante de acoplamento de $J_{C-1,H-1} = 160$ Hz, indicando configuração do tipo β . Já as unidades de manose (H-1/C-1, 4.99/101.2) apresentaram uma constante de acoplamento $J_{C-1,H-1} = 177$ Hz, que corresponde à configuração do tipo α (PERLIN; CASU, 1969).

Alguns sinais referentes às unidades de manose, presentes na amostra, são muito similares aos encontrados para a α -(1 \rightarrow 3)-xilomanana encontrada no exopolissacarídeo descrito anteriormente na seção 5.2.1. Na tabela 11 foi feita uma comparação dos dados obtidos para as duas xilomanas. Devido a menor concentração de terminais de xilose, houve uma dificuldade maior para o assinalamento dos carbonos destas unidades, mas provavelmente os sinais em δ 72.4, 76.7 e 69.7 são referentes a C-2, C-3 e C-4 de xilose piranosídica. O sinal em 65.5 é referente a CH₂ de C-5 de xilose, que foi confirmada pela inversão do sinal em RMN-¹³C-DEPT, figura 41.

Como visto pelos dados de metilação e RMN-¹³C, o polissacarídeo contido na amostra PA3-CLbK10 é formado por uma cadeia principal de manose piranosídica ligada por ligações do tipo α -(1 \rightarrow 3). Esta cadeia é altamente ramificada em O-4. Ocorre uma ramificação para cada três unidades da cadeia principal. Cada ponto de ramificação está substituído por um terminal de β -xilose piranosídica.

Como discutido anteriormente, não foram encontrados trabalhos sobre xilomananas de cogumelos do gênero *Lentinula*. Xilomananas foram encontradas em micélio de *Armillaria mellea* (BOUVENG; FRASER; LINDBERG, 1967), em *Polyporus tumulosus* (revisado por BARRETO-BERGTER; GORIN, 1983).

Além das α -(1 \rightarrow 3)-xilomananas, outras estruturas similares estão sendo encontradas e caracterizadas em basidiomicetos. Por exemplo, um polissacarídeo formado por unidades manopiranosídicas unidas por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4) foi obtido a partir de corpos de frutificação de *Ganoderma lucidum* (MIYAZAKI; NISHIJIMA, 1982), *Polyporus pinicola* (AXELSSON et al., 1969) e *Fomes annosus* (AXELSSON et al., 1971).

TABELA 11- COMPARAÇÃO DOS ASSINALAMENTOS ENCONTRADOS NO EPS E NA FRAÇÃO PA3-CLbK10

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
LbMlp-Smith ⁽¹⁾	101.7	69.5	78.7	66.2	73.7	61.2
PA3-CLbK10	101.7	69.7	78.7	66.2	73.6	61.3

(1) Assinalamentos referentes à xilomanana obtida no EPS produzido por *L. boryana*

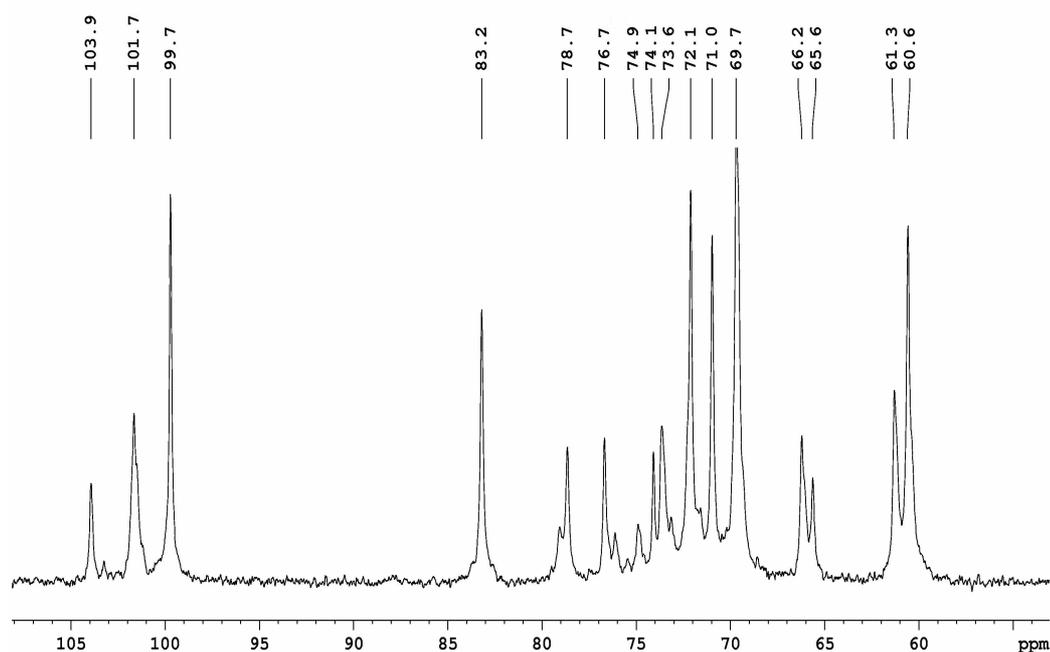


FIGURA 40- ESPECTRO DE RMN-¹³C DA FRAÇÃO PA3-CLbK10 EM. Me₂SO-*d*₆ (70 °C)

Além dos derivados referentes xilomanana, a análise de metilação apresentou 72,3% do derivado 2,4,6-Me₃Glc, que é referente a uma glucana (1→3) linear, as análises de RMN-¹³C da amostra corroboram. Os sinais majoritários no espectro de RMN-¹³C são sinais característicos de uma α-(1→3)-D-glucana. Em δ 99.3 é visualizado um sinal referente a C-1 de glucose piranosídica, a configuração do tipo α foi confirmada pela constante de acoplamento de $J_{C-1,H-1} = 174$ Hz. No espectro de RMN-¹³C, figura 41, é possível a visualização de sinais mais intensos que são referentes a esta α-glucana.

No espectro de HMQC, figura 41, praticamente apenas os sinais de H/C desta α-glucana estão presentes. Sinais em 5.13/99.3 são referentes a H-1/C-1, os sinais em

de 3.68/82.8 são referentes a H-3/C-3 de glucose (1→3) ligado, os sinais em 3.47/70.6, 3.48/69.4 e 3.89/71.8 são referentes respectivamente a H-2/C-2, H-4/C-4, H-5/C-5 de unidades de glucose piranosídica. Os sinais em 3.70/60.2 e 3.56/60.2 são de H-6/C-6. Na tabela 11 foi feita uma comparação dos dados obtidos na análise de HMQC com os dados da literatura. Pode ser observado que os sinais de RMN-¹³C obtidos neste trabalho são muito próximos aos obtidos por Huang et al. (2007) para uma α-(1→3)-D-glucana do micélio de *Poria cocos*. Os assinalamentos encontrados por Jin et al (2003) para os carbonos C-2, C-3, C-4 e C-5 são muito similares aos encontrados no presente trabalho, já os assinalamentos para C-1 e C-6 divergem substancialmente. No trabalho de Zhang et al. (2002) todos os assinalamentos são próximos aos encontrados para PA3-CLbK10, mas há um pequeno deslocamento para campo mais baixo em todos os sinais. No trabalho de Wang et al. (2007) os sinais de RMN-¹³C foram similares aos encontrados para o *L. boryana*, mas os sinais dos hidrogênios são muito semelhantes aos encontrados no espectro de HMQC, figura 42. Estas diferenças encontradas provavelmente têm relação com as condições em que foram feitas as análises, como à temperatura de análise e solvente utilizado.

TABELA 11- COMPARAÇÃO ENTRE VALORES DE ¹H E ¹³C DA FRAÇÃO PA3-CLBK10 E A LITERATURA PARA α-(1→3)-D-GLUCANAS

Fonte/Referência	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6 a/b
PA3-CLbK10	5.13	3.47	3.68	3.48	3.89	3.70/3.56
(WANG et al., 2007)	5.15	3.46	3.69	3.35	3.83	3.71/3.53
Fonte/Referência	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
PA3-CLbK10	99.3	70.6	82.8	69.4	71.8	60.2
(WANG et al., 2007)	101.2	71.9	83.6	73.6	71.4	62.0
(JIN et al., 2003)	101.3	70.8	82.7	69.9	71.7	61.9
(HUANG et al., 2007)	99.7	70.9	82.4	69.4	71.9	60.1
(ZHANG et al., 2002)	100.7	71.1	83.2	70.6	72.8	61.1

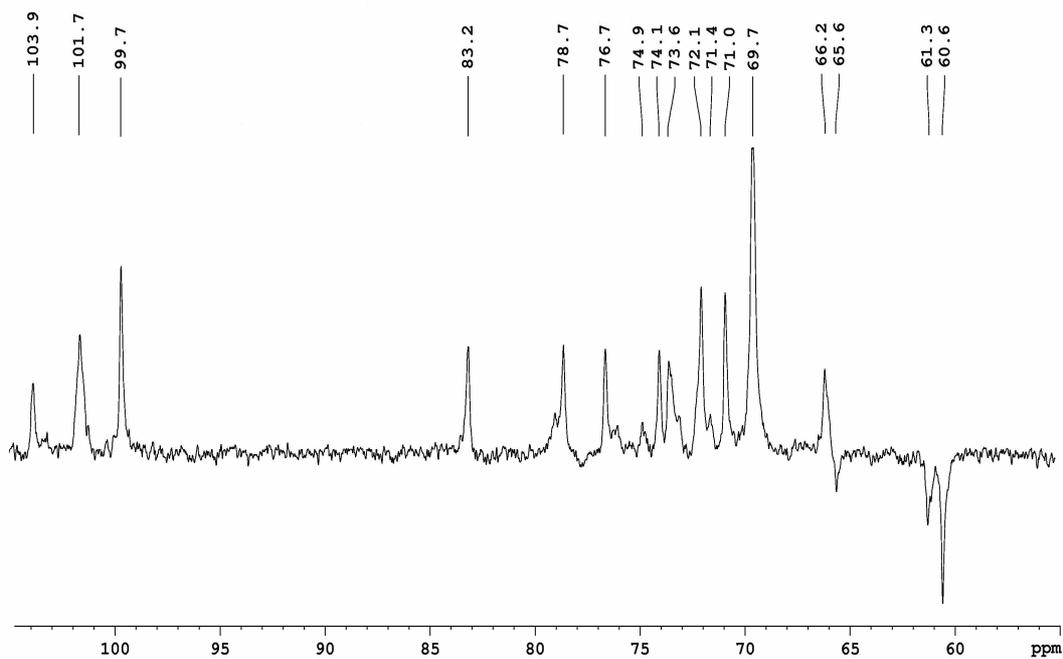


FIGURA 41- ESPECTRO DE RMN- ^{13}C -DEPT DA FRAÇÃO PA3-CLbK10 EM. $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ (70 °C)

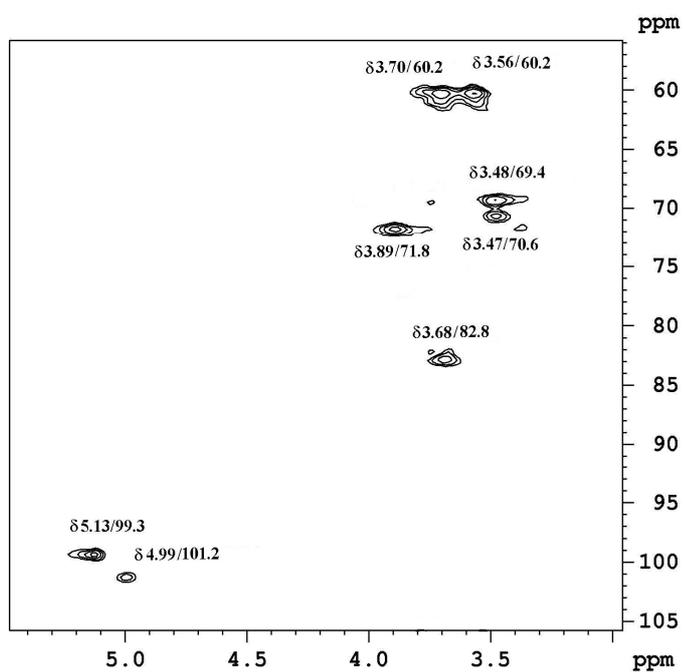


FIGURA 42- ESPECTRO DE HMBC DE PA3-CLbK10 EM $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ (70 °C)

Há diversos trabalhos na literatura sobre α -(1→3)-D-glucanas de diferentes fontes, como de fungos. Os principais polissacarídeos da parede celular dos fungos são a quitina e as β -glucanas, mas também as α -(1→3)-D-glucanas podem estar na constituição da parede celular de fungos e leveduras (JESMA; KREGER, 1979).

Shida et al. (1978), trabalhando com corpos de frutificação de *L. edodes*, isolaram e caracterizaram uma α -(1→3)-D-glucana a partir de um extrato alcalino. Zhang et al. (1999) reisolaram a mesma glucana e estudaram o seu peso molecular e as propriedades em soluções, para este estudo foram utilizadas técnicas de espalhamento de luz, osmometria por membrana, cromatografia de exclusão por tamanho e viscometria.

5.2.5 Reprocessamento das Amostras do Extrato KOH 1%

Como relatado no item 4.3.6, para melhorar o grau de purificação das amostras e encontrar novos polissacarídeos presentes, foi feito um reprocessamento das amostras precipitadas (PF-CLbk1) e solúveis (SF-CLbK1) no reativo de Fehling.

O reprocessamento das amostras precipitadas em Fehling não gerou resultados substancialmente diferentes aos apresentados anteriormente. Por este motivo estes resultados foram colocados no ANEXO B.

5.2.6 Atividades Biológicas e Outros Trabalhos com Polissacarídeos de *L. boryana*

Como apresentados nas seções anteriores, a partir de corpos de frutificação de *L. boryana* foram feitos diversos procedimentos de extração e purificação. O esquema mostrado na figura 43 relaciona os experimentos, os extratos e os principais resultados obtidos. Nesta seção estão apresentados alguns trabalhos relacionados às potenciais aplicações de polissacarídeos similares aos encontrados nos corpos de frutificação de *L. boryana*.

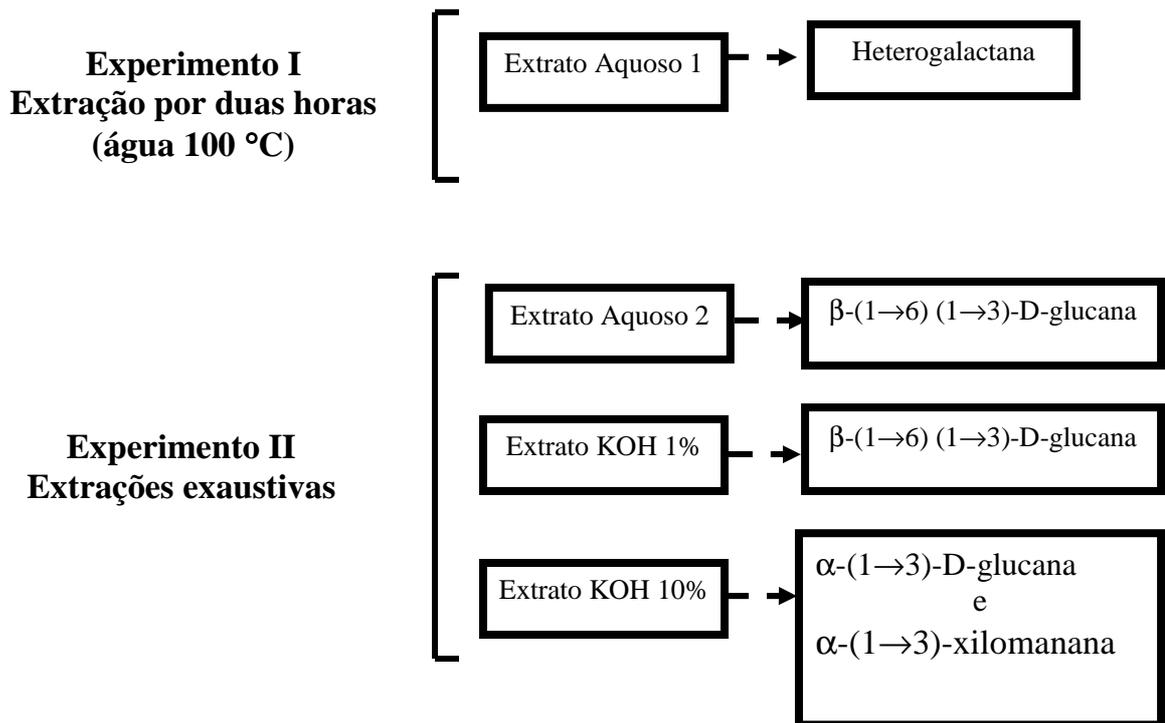


FIGURA 43- ESQUEMA GERAL DOS EXPERIMENTOS COM OS POLISSACARÍDEOS DE *L. boryana*

No Experimento I (figura 43) foi isolada e caracterizada uma fucomamogalactana com cadeia principal com unidades de galactopiranoses ligadas $\alpha(1\rightarrow6)$ substituídas em O-2 por terminais de manose e fucose.

Aqui são apresentados alguns trabalhos relacionados às potenciais aplicações das heterogalactanas de macrofungos. Dentre estes trabalhos pode-se destacar o estudo de Cho et al (1998), utilizando corpos de frutificação de *Fomitella fraxinea* estes pesquisadores isolaram e caracterizaram uma $\alpha(1\rightarrow6)$ -galactana substituída em O-2 por um dissacarídeo O-3- α -D-manopiranoses-L-fucose. A estrutura apresentou ser menos ramificada que as citadas anteriormente com aproximadamente um ponto de ramificação a cada três resíduos da cadeia principal. Neste mesmo trabalho, além da caracterização química da heterogalactana, foi investigada a atividade imunológica do polissacarídeo purificado (fomitellana A). Para isso foram feitos ensaios de proliferação celular direta (*in vitro*), associando ou não a agentes mitogênicos. Os resultados mostraram que a heterogalactana aumentou a proliferação de linfócitos, via a estimulação da síntese de DNA. Nos estudos com agentes mitogênicos, as

associações com lipopolissacarídeos (LPS) e concanavalina apresentaram os melhores resultados (CHO et al., 1998).

No Experimento II (figura 43) utilizando no Extrato Aquoso 2 e o Extrato KOH 1% foi isolado e caracterizado uma β -(1 \rightarrow 6) (1 \rightarrow 3)-D-glucana.

Trabalhos com β -(1 \rightarrow 6)-D-glucanas de *Agaricus blazei* (*A. brasiliensis*), extraídas em solução alcalina (NaOH 5%), mostraram atividades anti-tumorais para estes tipos de polissacarídeos (KAWAGISHI et al., 1989; MIZUNO et al., 1990).

Um estudo com polissacarídeos solúveis obtidas do micélio de *Phellinus linteus* mostrou atividade estimulatória sobre macrófagos. A estrutura do presente polissacarídeo foi deduzida por análises de metilação e os resultados sugeriram uma β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana com cadeias laterais com resíduos de β -(1 \rightarrow 3)-D-glucose (CHUNG; KIM, 2005). Um polissacarídeo com características similares a este foi obtido do micélio de *Agaricus blazei* Murill. Foram evidenciadas atividades anti-tumorais seletivas desta fração polissacarídica (CHUNG; CHO; KIM, 2005).

No mesmo Experimento II com o Extrato KOH 10% foram caracterizadas uma α -(1 \rightarrow 3)-xilomanana e uma α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana. Sobre alterações químicas e possíveis aplicações das α -(1 \rightarrow 3)-D-glucanas destacam-se os seguintes trabalhos:

O grupo de pesquisa formado por Zhang et al. (2002) fizeram a sulfatação de uma α -glucana de *L. edodes* e verificaram a influência do processo em propriedades físicas e químicas. O estudo de RMN-¹³C mostrou o surgimento de quatro novos sinais referentes C-2s' (δ 87.5), C-2s (δ 79.8), C-4s (δ 77.4) e C-6s (δ 61.3). Segundo os autores estes deslocamentos para campo mais baixo é resultado da sulfatação em O-2, O-4 e O-6. Além disto, os resultados deste trabalho indicaram que a sulfatação diminuiu a resistência do polissacarídeo em comparação ao não sulfatado.

A introdução de grupamentos carregados nas hidroxilas das α -glucanas aumenta a sua solubilidade em água e também sua atividade anti-tumoral (ZHANG; ZHANG; CHENG, 2002). Derivados sulfatados de α -(1 \rightarrow 3)-D-glucanas, provenientes dos corpos de frutificação de *Agrocybe cylindracea*, mostraram atividade anti-tumoral contra carcinoma ascítico de Ehrlich (ZHANG et al., 2000). A α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana extraída de *L. edodes* e seus derivados sulfatados foram avaliados com relação ao

tamanho da cadeia, características espectroscópicas e sobre a atividade anti-tumoral, os resultados demonstram que o processo de derivatização: diminui o tamanho da cadeia, aumentou a solubilidade em água e aumentou a atividade anti-tumoral contra o Sarcoma 180 (SURENJAV et al., 2006). Além da sulfatação, a carboximetilação de α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana de *Agrocybe cylindracea* aumentou a atividade antitumoral contra o Sarcoma 180 (KIHO et al., 1989).

Em trabalho realizado com α -(1 \rightarrow 3)-D-glucana de esporos de *Ganoderma lucidum*, foram feitas substituições químicas: Derivados como carboximetilados, carboximetilados e sulfatados, aminopropilados, hidroxietilados, sulfatados e benzilamidatos-carboximetilatos foram gerados com diferentes graus de substituição. Estes derivados foram avaliados com relação às propriedades químicas, espectroscópicas e imunoestimulatórias. Os melhores resultados foram obtidos com os derivados carboximetilados com baixos graus de substituição, estes derivados apresentaram excelentes resultados sendo mais solúveis em água e promovendo a proliferação dos linfócitos T e B (BAO et al., 2001).

Como visto há diversos trabalhos que mostram possibilidades para aplicações dos polissacarídeos obtidos de *L. boryana*. Isto demonstra que é interessante dar continuidade nos trabalhos com os polissacarídeos do macrofungo. Considerando que a β -(1 \rightarrow 6) (1 \rightarrow 3)-D-glucana está em altas concentrações nos extratos aquosos e alcalinos recomenda-se a continuidade dos trabalhos com estes polissacarídeos.

5.3 ESTUDOS SOBRE A TIROSINASE PRODUZIDA POR *L. boryana*

Os estudos sobre a tirosinase produzida pelo micélio de *L. boryana* foram estimulados pelo escurecimento do micélio, este escurecimento foi observado durante estudos sobre a influência da temperatura de cultivo no crescimento micelial deste fungo (FARIA, 2004). Como relatado na revisão bibliográfica, item 2.4, a produção de melanina usualmente está relacionada à atividade da enzima tirosinase. Inicialmente os trabalhos foram realizados com o intuito de determinar qual momento havia maior produção da enzima pelo micélio e como poderia ser otimizada esta produção. Para tanto, testes iniciais foram feitos para verificar se o micélio melanizado possui mais atividade de tirosinase que o micélio não melanizado, se a contaminação por outro microorganismo aumenta a atividade da enzima e se o micélio não submerso no meio líquido tem mais atividade que o micélio submerso no meio.

5.3.1 Comparação Entre o Micélio Melanizado e Não Melanizado

Neste experimento foi feita uma comparação entre micélios melanizados e não melanizados de *L. boryana*. Também foi verificada a influência da liofilização do micélio na atividade enzimática (tirosinase). A atividade da tirosinase do micélio foi determinada utilizando um extrato do micélio. Como os micélios frescos possuíam mais líquido que os micélios liofilizados, foram feitas correções nos volumes dos extratos do micélio liofilizado, adicionando-se o volume de tampão correspondente a perda de massa pela liofilização, conforme descrito no item 4.4.3 dos materiais e métodos.

Os resultados deste experimento estão mostrados na figura 44, onde pode ser observada que a atividade de tirosinase do micélio melanizado é muito superior ao do micélio não melanizado. Isto sugere que o escurecimento do micélio pode servir de indicativo visual de que o micélio está produzindo tirosinase, ou que então ocorreu um aumento da proporção da forma ativa da enzima em relação às demais formas (formas imaturas, formas maduras e latentes). Estes resultados levaram à utilização do extrato do micélio melanizado nos próximos experimentos. Com o presente experimento ficou

demonstrado que o processo de liofilização não influencia negativamente a atividade enzimática, portanto este processo de secagem foi utilizado nos demais experimentos.

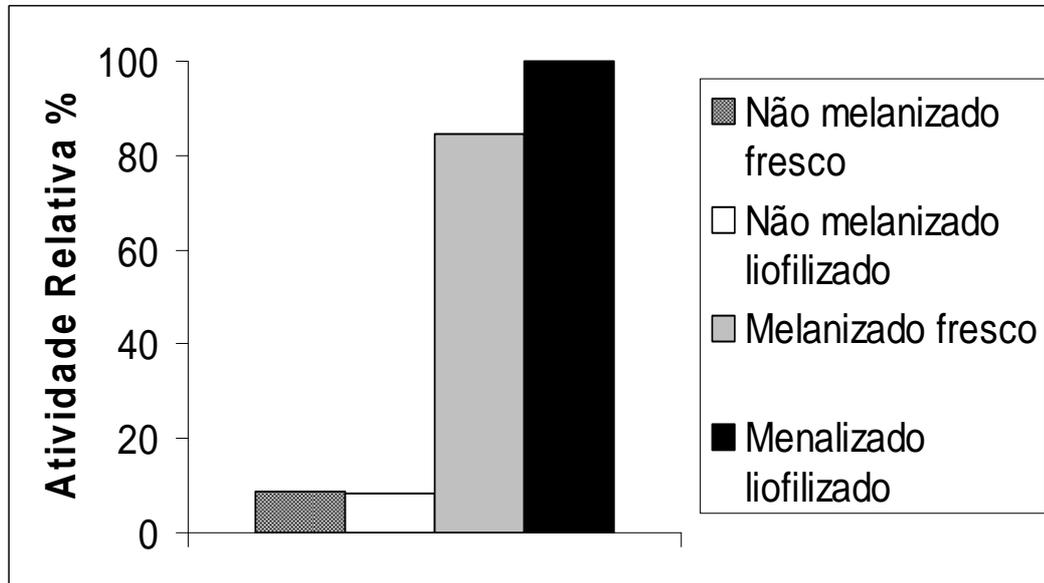


FIGURA 44- ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS MICÉLIOS MELANIZADOS E NÃO MELANIZADOS E O EFEITO DA LIOFILIZAÇÃO NESTA ATIVIDADE.

5.3.2 Influência da Contaminação na Atividade da Tirosinase de *Lentinula boryana* Cultivado em Meio Líquido

Durante os estudos prévios, verificou-se que, além da temperatura, a contaminação por outros microorganismos, como leveduras e outros macrofungos, estimulava a produção de melanina por *L. boryana* (FARIA, 2004). No presente experimento foi feito um cultivo líquido de *L. boryana* e após 9 dias de incubação, este cultivo foi “contaminado” com um *plug* de micélio de *L. edodes*. Os frascos então foram passados para 30 °C e a cada 2 dias, três frascos foram retirados e as atividades da tirosinase foi medida. Na figura 45 pode ser observado que não ocorreu diferença significativa entre os grupos contaminados e não contaminados. Este resultado é diferente ao esperado uma vez que resultados obtidos por Faria (2004) mostraram que o cultivo concomitante de *L. boryana* e *L. edodes* em meio sólido estimulava a produção de melanina pelo micélio de *L. boryana* (FARIA, 2004).

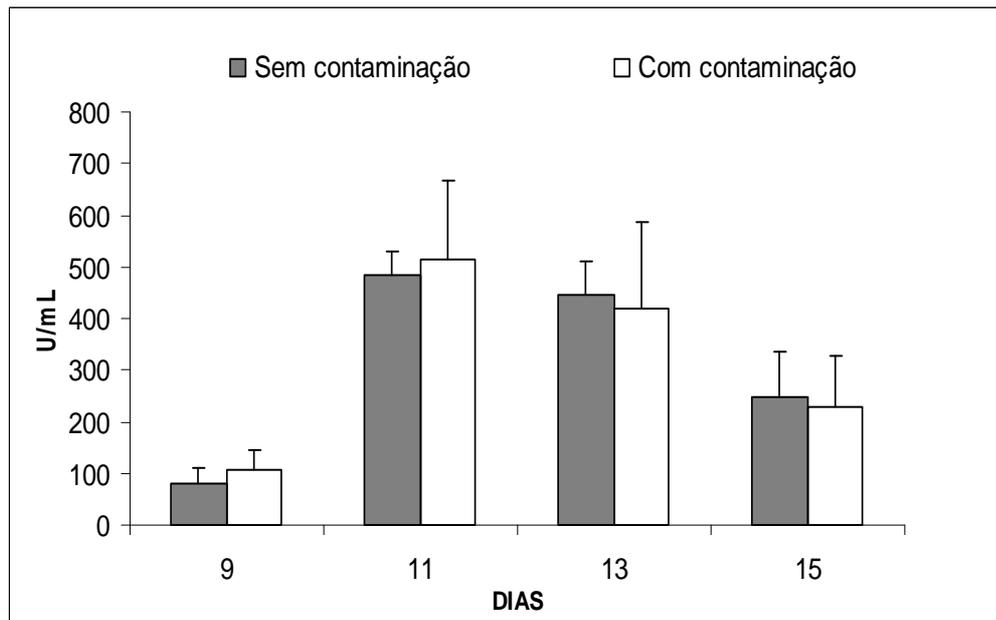


FIGURA 45- EFEITO DA CONTAMINAÇÃO POR *L. edodes* NA ATIVIDADE DE TIROSINASE DE *L. boryana* EM MEIO LÍQUIDO

5.3.3 Efeito da Drenagem do Meio de Cultivo na Atividade da Tirosinase de *L. boryana*

O objetivo deste experimento foi promover a produção de tirosinase por *L. boryana* sem a necessidade de se utilizar um contaminante como estímulo. Neste experimento o micélio foi crescido em condições de cultivo adequadas, depois o micélio foi drenado e transferido para garrafas de cultivo (Roux) e elevando a temperatura de 22 para 30 °C. Após sete dias foi observado que em nenhuma das garrafas o micélio apresentava sinais de escurecimento, então surgiu a hipótese que o meio poderia estar interferindo na atividade da tirosinase. Então foi feita a inclinação das garrafas sendo possível assim manter os micélios mais secos. Após dois dias foi verificado que apenas os micélios das garrafas que foram inclinadas estavam escurecidos. As atividades de tirosinase dos micélios foram determinadas e, como visto na figura 46, os micélios incubados nas garrafas de Roux sem o meio apresentaram quatro vezes mais atividade de tirosinase que os micélios incubados com o meio. É provável que a baixa atividade de tirosinase, produzida pelo micélio submerso no meio, não está relacionada aos componentes do meio, mas ao fato de

que o micélio submerso possui menos acesso ao oxigênio atmosférico, uma vez que o oxigênio é substrato para a tirosinase na oxidação de compostos fenólicos e está envolvido nos dois primeiros passos da biossíntese da melanina (SEO; SHARMA; SHARMA, 2003), figura 2.

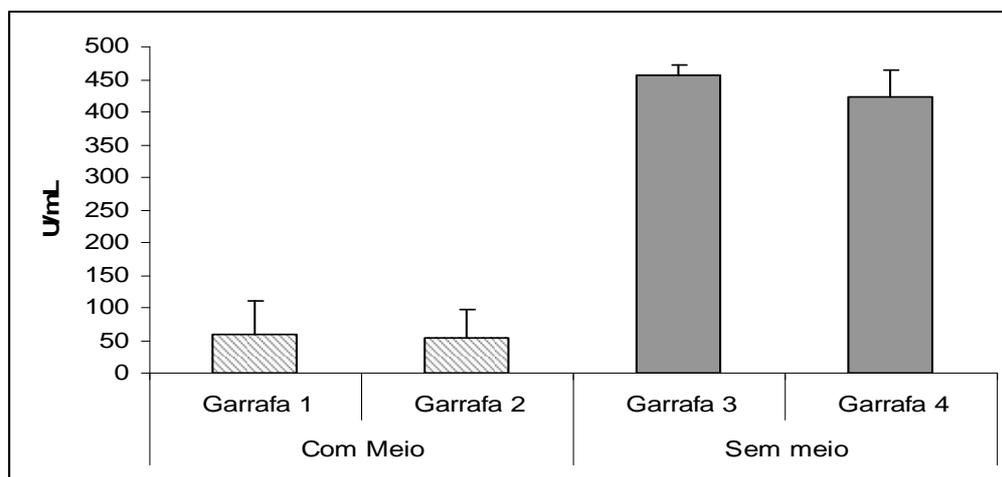


FIGURA 46- EFEITO DA INCLINAÇÃO DAS GARRAFAS DE ROUX NA ATIVIDADE DE TIROSINASE PELO MICÉLIO DE *L. boryana*

Com base nestes experimentos preliminares, foi estabelecido como seria a condição ideal produção de tirosinase para os estudos de purificação e caracterização. Inicialmente, o micélio foi crescido em meio líquido, sob agitação, a 20 °C, por 18 dias. Após este período foi aumentada a temperatura para 30 °C, os frascos foram retirados conforme os micélios ficavam escurecidos. Não foi aplicado a técnica de transferência do micélio para as garrafas de Roux, devido a risco de contaminação.

5.3.4 Efeito da temperatura durante o ensaio enzimático e determinação da estabilidade da enzima em temperaturas elevadas (pré-icubação)

Com os estudos iniciais foi definido como a enzima poderia ser obtida, então foram feitos experimentos para avaliar o efeito de condições físicas e químicas na atividade de tirosinase de *L. boryana*.

Nestes experimentos foi determinado qual é a influência da temperatura durante o ensaio enzimático. Também foi verificada a estabilidade do extrato de micélio, com

relação à atividade de tirosinase, frente a temperaturas elevadas em diferentes tempos de pré-incubação.

Na figura 47, pode-se observar que na faixa testada (20-45 °C) a temperatura não influencia drasticamente a atividade de tirosinase. Contudo em temperaturas mais baixas, como 20°C, a atividade é inferior a de temperaturas mais elevadas (40 °C).

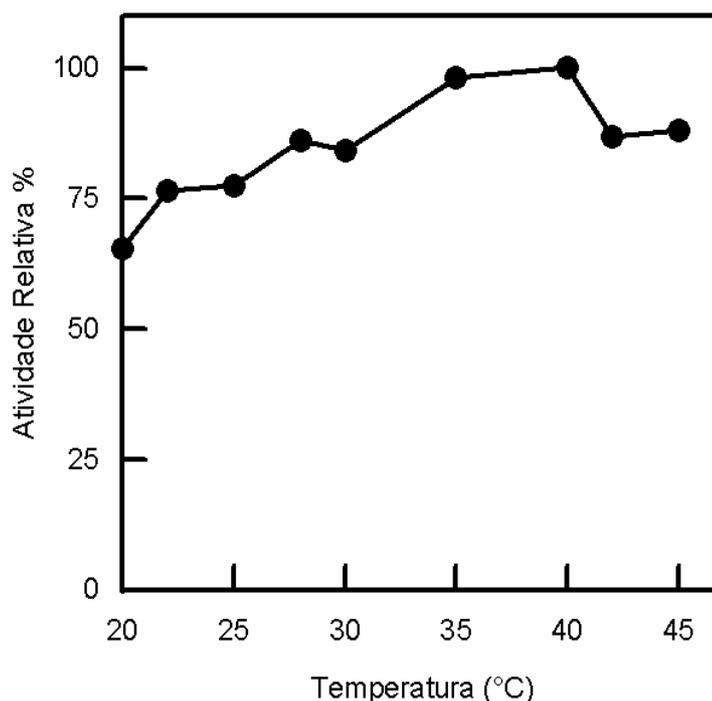


FIGURA 47- EFEITO DA TEMPERATURA DE REAÇÃO NA ATIVIDADE DA TIROSINASE DE *L. boryana* DO EXTRATO BRUTO

Para avaliar a estabilidade da enzima em temperaturas elevadas, foram feitas pré-incubações (10 minutos) do extrato contendo a enzima em diferentes temperaturas. Após este período a atividade foi determinada numa temperatura de 25 °C. Na figura 48 está mostrado o resultado deste experimento, onde pode ser observado que após 10 minutos da incubação a 40 °C, 90% da atividade original foi conservada, mas quando a temperatura foi aumentada para 60 °C cerca de 90% da atividade foi perdida em 10 minutos de incubação.

Então, foi feita a cinética de desnaturação da tirosinase presente no extrato de micélio na temperatura de 60 °C. O resultado, figura 49, mostra uma desnaturação bastante acentuada nos primeiros dois minutos, tanto que o tempo de meia vida da

enzima nesta temperatura foi estimado em 1,1 min. Nos tempos superiores a dois minutos a velocidade de desnaturação diminui significativamente.

Estes resultados demonstram que a tirosinase de *L. boryana* é pouco termoestável. Uma análise da figura 48 mostra que a tirosinase de *L. boryana* tem uma meia vida de 10 minutos em uma temperatura um pouco abaixo de 50 °C (a linha traçada demonstra a temperatura para o qual a pré-incubação de 10 minutos resultou em uma atividade residual de 50%). Portanto, a tirosinase de *L. boryana* é menos termoestável que a tirosinase de *Pycnoporus sanguineus*, sendo que o tempo de meia vida a 50°C calculado para a tirosinase deste fungo é de 120 minutos (HALAOULI; ASTHER; KRUUS, 2005).

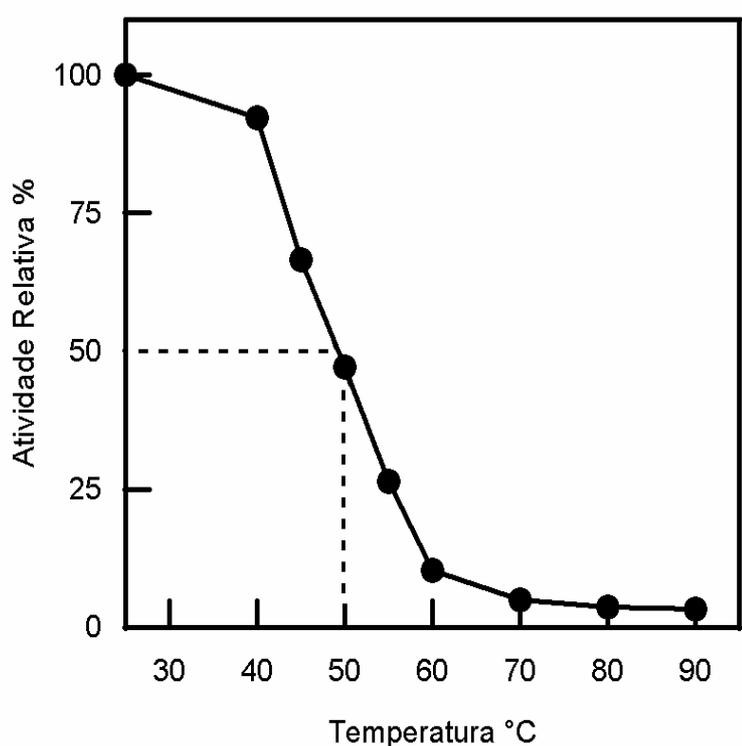


FIGURA 48- ESTABILIDADE TÉRMICA DA TIROSINASE DE *L. boryana* CONTIDA NO EXTRATO BRUTO.

Pré-incubação por dez minutos em diferentes temperaturas

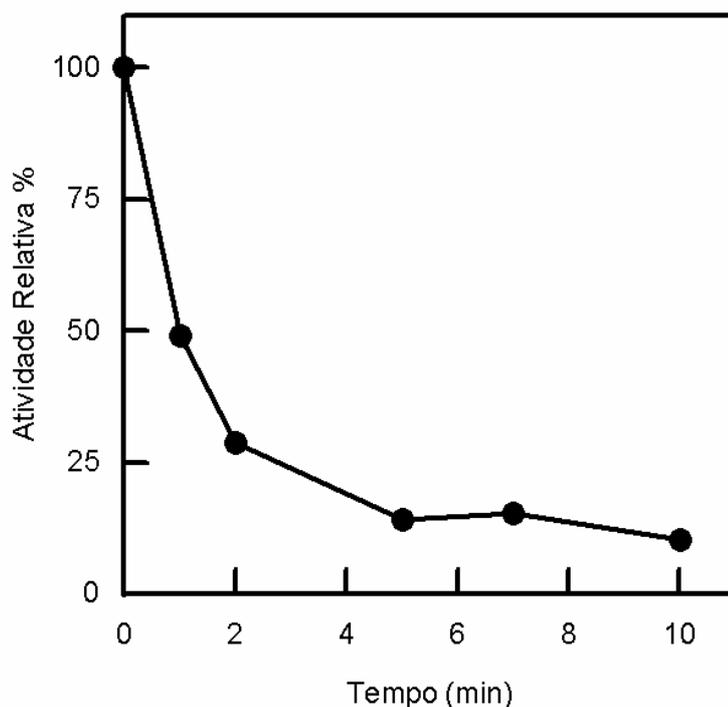


FIGURA 49- CINÉTICA DE DESNATURAÇÃO A 60 °C DA TIROSINASE DO EXTRATO BRUTO DE *L. boryana*

5.3.5 Efeito do pH na Atividade de tirosinase do micélio de *L. boryana*

Neste experimento foram testados valores de pH numa faixa de 3,0 a 8,0, para isso foram utilizados dois tampões, o citrato-fosfato e o fosfato. Nos pHs de 6,0, 6,6 e 7,0 foram testados os dois tampões, item 4.48, com isso foi possível verificar que não há influência dos componentes do tampão na atividade enzimática (figura 50).

Pode ser verificado que nos pHs próximos a 6,0 a atividade foi maior. Valores de pHs ótimo nas proximidades de 6 e 7 também foram encontrados para tirosinases de *Pycnoporus sanguineus* e de *A. bisporus* variedade Portobello (FAN; FLURKEY, 2004; HALAOULI; ASTHER; KRUUS, 2005). Diversos trabalhos, relacionados aos ensaios de atividade da tirosinase, utilizam diferentes tampões com pHs que variam entre 6,0 (RATCLIFFE, et al., 1994), 6,5 (LEEUWEN; WICHERS, 1999; KAHN; ANDRAWIS, 1985), 6,8 (MASAMOTO et al., 1980; MULLER et al., 1996; POMA et al., 1999) e 7,0 (ESPIN; WICHERS, 2001).

Também pode ser observado que extremos de pH diminuíram substancialmente a atividade. Em pH 4,6 a atividade permanece próxima a 75% da atividade máxima, já

em pH 3,6 este valor baixa para aproximadamente 20% da atividade máxima. Esta diminuição da atividade, em pHs abaixo de 4 foi verificada anteriormente em trabalho com tirosinase de *Agaricus bisporus* (MUNJAL; SAWHNEY, 2002).

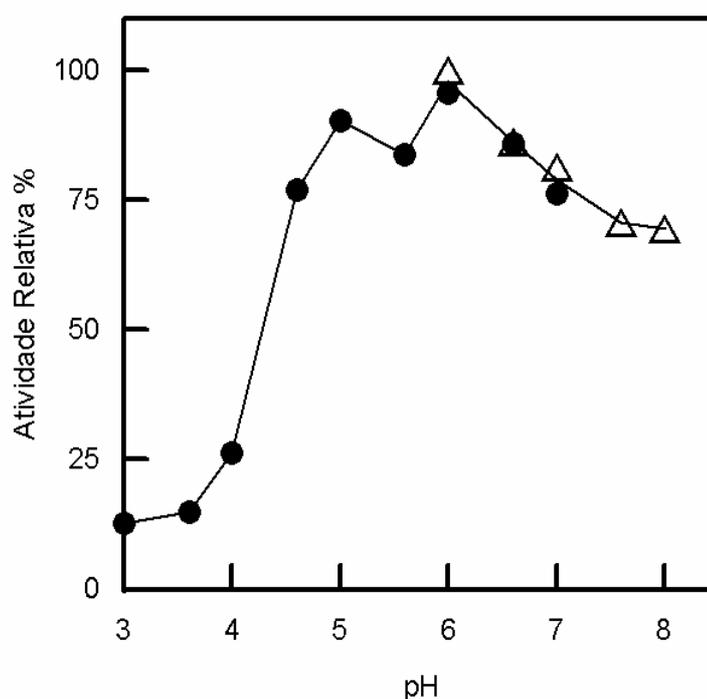


FIGURA 50- EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO EXTRATO DE MICÉLIO DE *L. boryana*

- tampão citrato-fosfato
- △ tampão fosfato de sódio

5.3.6 Efeito da concentração de Substrato (L-DOPA) na Atividade Enzimática do Extrato Bruto de *L. boryana*

Neste experimento foi verificada a influência do substrato na atividade enzimática do micélio de *L. boryana*. Na figura 51 está apresentado o melhor ajuste da equação de Michaelis-Menten aos dados obtidos. Neste gráfico pode ser observado que não ocorre um ajuste adequado da referida equação, principalmente com concentrações superiores a 10 mM de L-DOPA, onde ocorre um patamar de atividade. Este fato é contraditório ao encontrado na literatura que relata que a cinética da

tirosinase de cogumelos segue Michaelis-Menten (BENEDITO, et al., 1997; ESPIN; WICHERS, 2001; HALAOULI, et al, 2006).

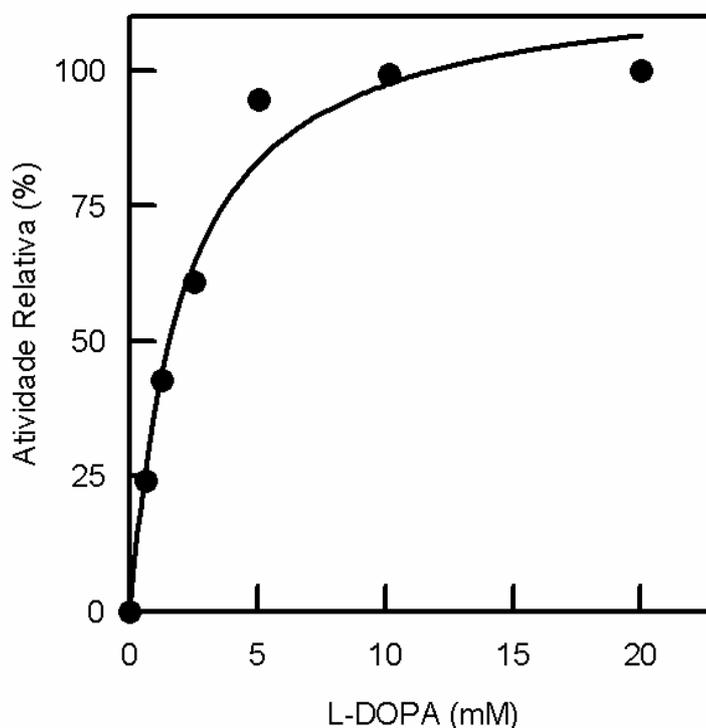


FIGURA 51- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE DE TIROSINASE DO EXTRATO BRUTO DE *L. boryana*

5.3.7 Processo de Purificação da Tirosinase de *Lentinula boryana*

Para uma melhor definição dos parâmetros cinéticos da tirosinase de *L. boryana*, foi essencial que os trabalhos fossem realizados com uma enzima com maior grau de pureza. Por este motivo procurou-se definir protocolos para purificação da enzima.

Na figura 52 está representado o esquema utilizado para obtenção de tirosinase de *L. boryana*. O micélio crescido em meio líquido, após melanização, foi separado do meio por filtração, congelado e liofilizado. O micélio foi então ressuspense em tampão fosfato de sódio (50 mM) e passado em prensa francesa. O extrato obtido foi centrifugado e as proteínas contidas no sobrenadante foram precipitadas com sulfato de amônio. Além de proteínas, o precipitado obtido possuía uma grande quantidade de melanina que dificultava a purificação. Foram então, feitos testes procurando separar a melanina das frações com atividade enzimática.

A precipitação das proteínas com acetona gelada é uma técnica usualmente aplicada na purificação de tirosinase de macrofungos (HORWITZ et al., 1970), mas no presente trabalho foi verificado que ocorre perda significativa da atividade enzimática com esta precipitação (dados não mostrados). Além desta perda de atividade, a técnica não foi eficiente para a retirada da melanina das frações ativas. Por estes motivos esta técnica foi descartada como alternativa no processo de purificação da tirosinase de *L. boryana*.

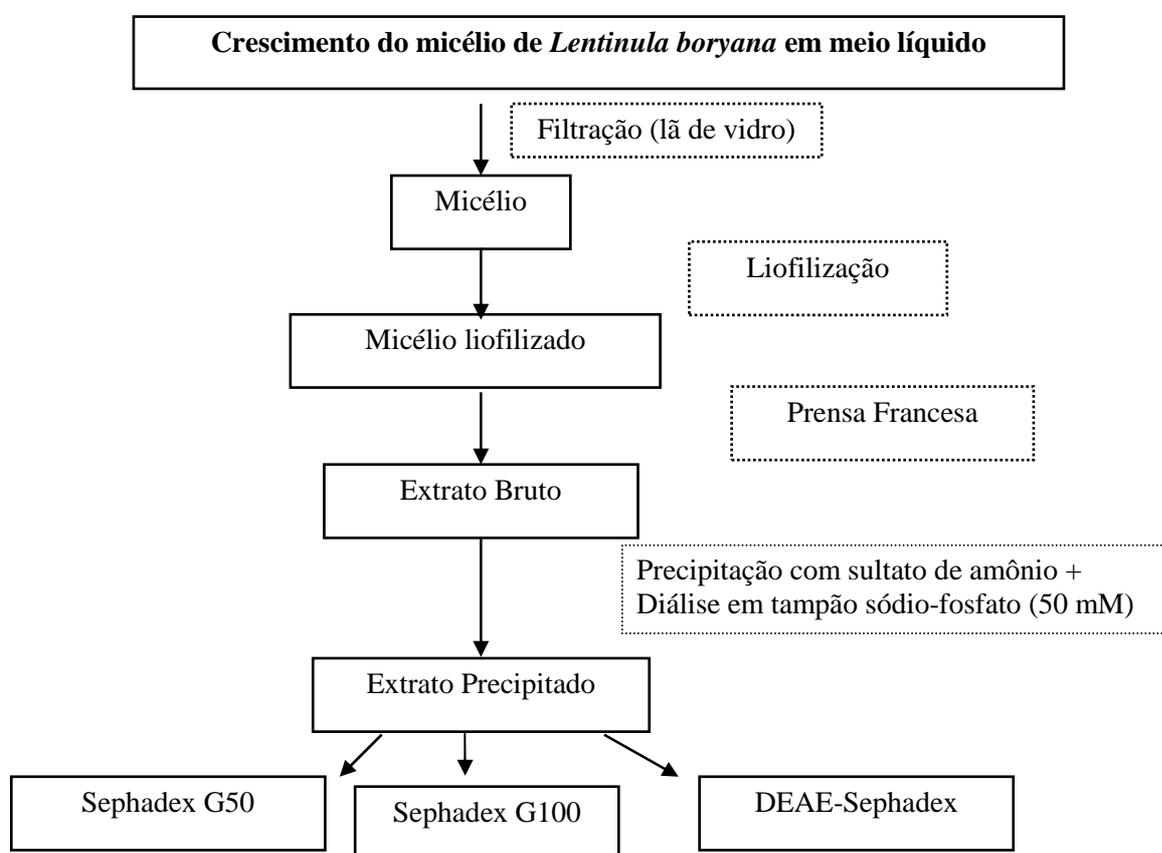


FIGURA 52- ESQUEMA PARA PURIFICAÇÃO DE TIROSINASE DE *L. boryana*

Foram feitas colunas cromatográficas de filtração em gel (Sephadex G50 e G100). Os perfis de eluição destas colunas estão demonstrados nas figuras 53 A e B. A quantidade relativa de melanina nas frações foi estimada pela absorbância inicial apresentada nos ensaios de atividade (ABS 475 nm - linhas tracejadas). Pode-se observar que as frações com maior atividade apresentaram quantidades consideráveis

de melanina. Portanto, estas técnicas não foram consideradas interessantes para a primeira etapa cromatográfica do processo de purificação da tirosinase de *L. boryana*.

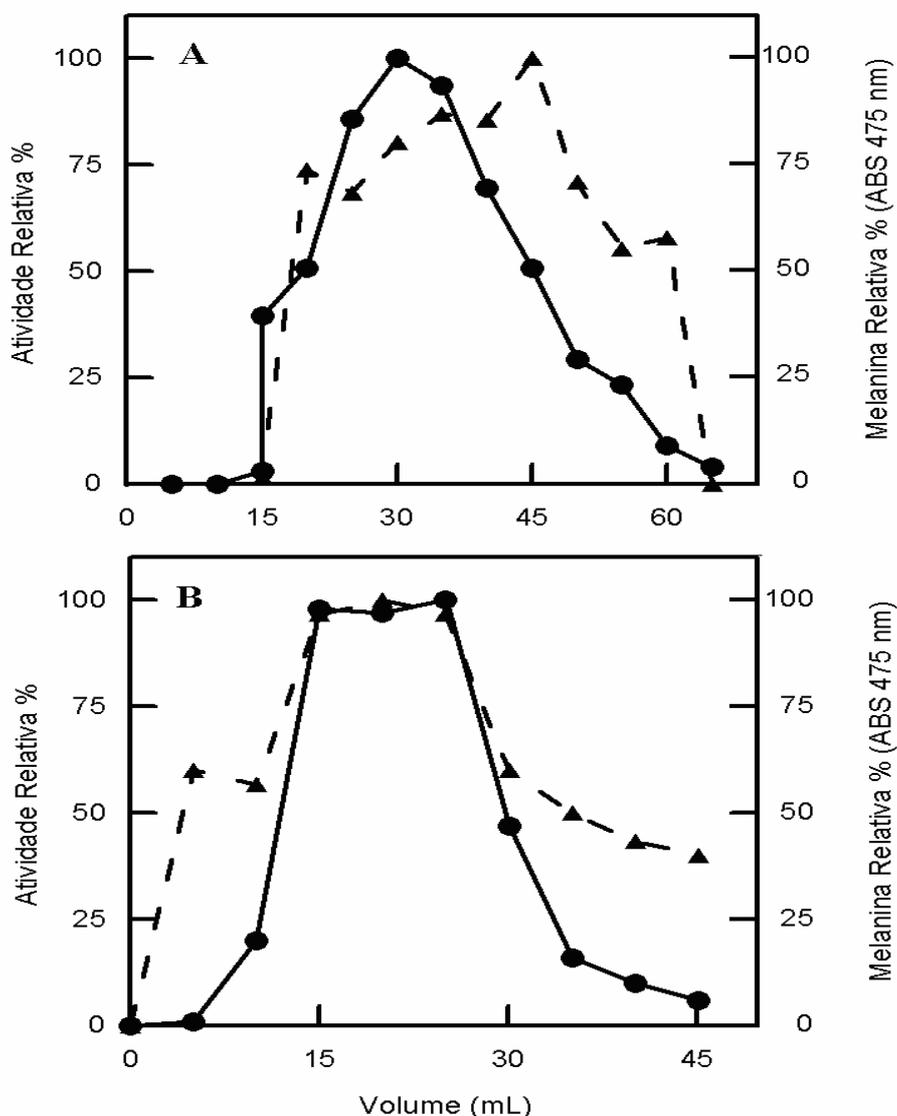


FIGURA 53- ATIVIDADE DA TIROSINASE DAS FRAÇÕES OBTIDAS NAS COLUNAS SEPHADEX G 50 (A) E SEPHADEX G 100 (B)

- Determinação das atividades de tirosinase
 -▲- Quantidade de Melanina Relativa (ABS - 475 nm)

Numa quarta tentativa de separar a melanina do extrato com atividade de tirosinase, uma alíquota do extrato foi aplicada em uma coluna de separação por troca iônica (DEAE-Sepharose). A coluna foi lavada com tampão fosfato e eluída com um gradiente de NaCl. A figura 54 mostra que as frações com maior atividade foram eluídas com uma concentração de 0,3 M de NaCl. A melanina ficou fortemente

aderida a coluna, não sendo liberada mesmo com NaCl (1 M). Esta liberação só foi possível com eluição com NaOH (1 M). Portanto, a utilização da coluna de separação por troca iônica mostrou-se eficiente para separar a melanina da tirosinase de *L. boryana*.

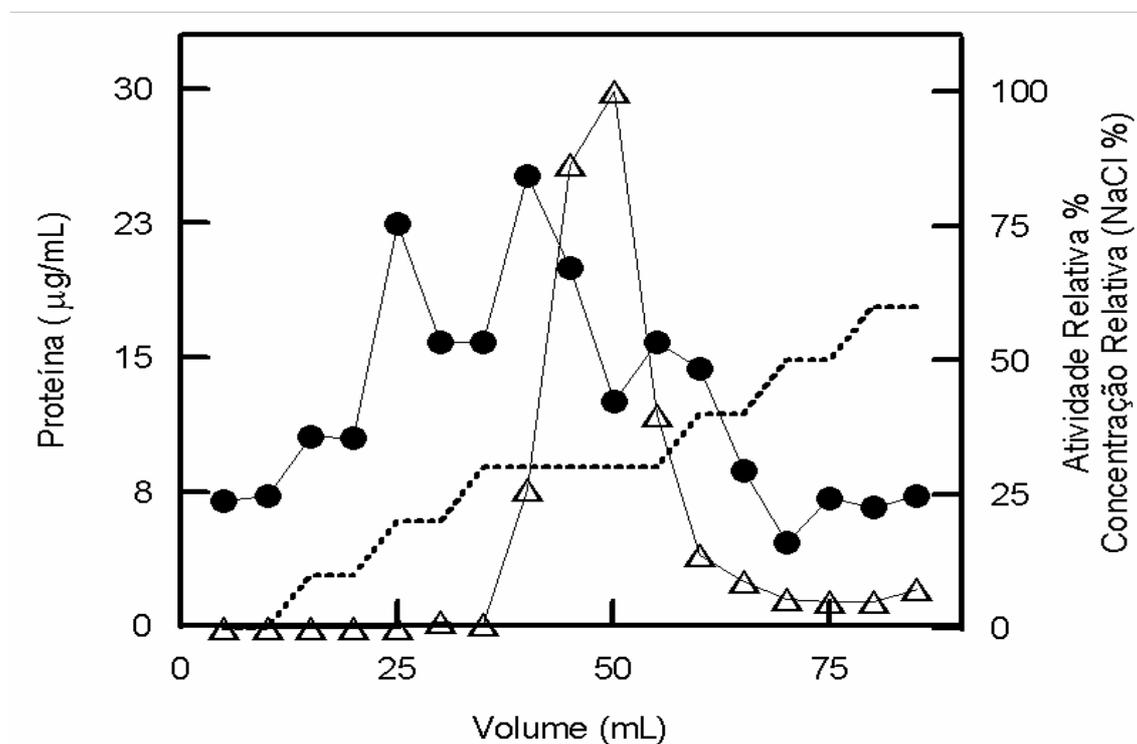


FIGURA 54- ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS* DAS FRAÇÕES ELUÍDAS NA COLUNA DEAE-SEPHAROSE

- Concentração de proteína determinada pelo método de Bradford, usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão
- △ Atividade Relativa de tirosinase
- Gradiente de NaCl expresso como % em que 100 % corresponde a 1M de NaCl

A tabela 12 resume os resultados obtidos no processo de purificação da tirosinase de *L. boryana*

O grau de pureza obtido nas três etapas foi demonstrado por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) e está apresentado na figura 55. Após a cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose) três bandas, com massas moleculares de aproximadamente 47, 27, 20 kDa, foram visualizadas.

TABELA 12- ANÁLISE DO PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO DA TIROSINASE PRODUZIDA POR *Lentinula boryana*

Etapa de purificação	Atividade Total (Unidades ¹)	Proteína ² (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Atividade Recuperada (%)	Fator de Purificação ³
Extrato bruto	23.700	1,140	20,8	100	1
Precipitação por (NH ₄) ₂ SO ₄	42.360	214	198	178	9,5
Cromatografia por troca iônica	7.874	71,1	110,7	33	5,3

1. Uma Unidade é equivalente 0,01 de alteração na absorbância (475 nm) por minuto usando DOPA (2 mg/mL) como substrato sob condições padrão.
2. Proteínas foram estimadas pelo método de Bradford.
3. O fator de purificação foi calculado pela relação entre a atividade específica da amostra e a atividade específica do extrato bruto.

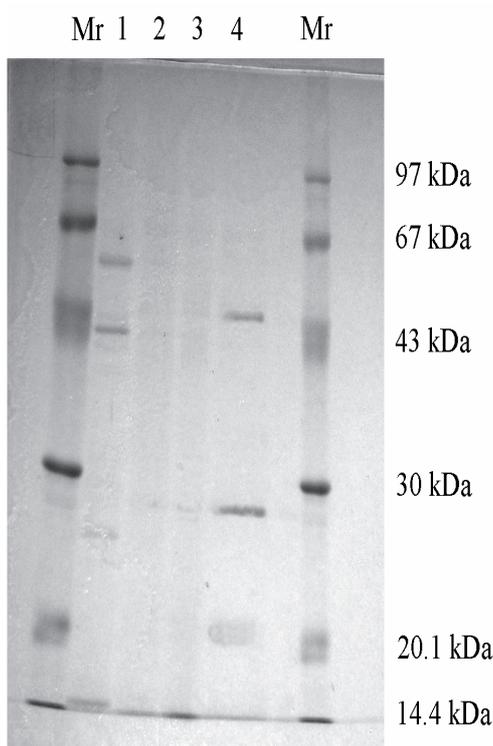


FIGURA 55- ELETROFORESE GEL DESNATURANTE (SDS-PAGE) DAS ETAPAS DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE TIROSINASE DE *L. boryana* (Mr) padrões de massas moleculares; (1) tirosinase comercial (Sigma Co.); (2) extrato bruto de *L. boryana*, (3) extrato precipitado com sulfato de amônio resuspenso e (4) frações com maior atividade na DEAE-Sepharose.

Tirosinases de outros organismos apresentaram bandas na eletroforese, muitas vezes, similares as encontradas para o *L. boryana*. A enzima de *A. biporus* é a tirosinase mais estudada e foi originalmente reportada como sendo uma proteína de 120 kDa com duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. As cadeias pesadas possuem 67 kDa de massa molar o mesmo valor encontrado para tirosinase de *L. boryana* (WICHERS, H. J.; GERRITSEN, Y. A. M.; CHAPELON, 1996). Em outro estudo foi relatado que a tirosinase obtida do micélio de *P. sanguineus* CBS 614.73 possui uma proteína monomérica com 45 kDa de massa molecular (HALAOULI; ASTHER; KRUUS, 2005), enquanto que as isoenzimas purificadas de corpos de frutificação de *L. edodes* possuem massas moleculares entre 48 e 50 kDa (KANDA et al, 1996). A tirosinase do cogumelo Portobella teve sua massa molar determinada por cromatográfica de exclusão por tamanho (Sephadex G-100). Por este método a massa encontrada foi de 41 kDa, mas por SDS-PAGE a massa molecular foi estimada em aproximadamente 43 e 48 kDa (ZHANG et al., 1999). Como visto, há variações nos massas molares calculadas para tirosinase de diferentes organismos, a tirosinase de *L. boryana* é similar às outras tirosinases de cogumelos.

5.3.8 Caracterização Cinética da Tirosinase Pré-purificada de *L. boryana*

Como visto na seção 5.3.6, a variação na concentração de L-DOPA provocou um efeito não usual na cinética da tirosinase de *L. boryana*. Para um aprimoramento do conhecimento da cinética da tirosinase de *L. boryana*, foram feitos novos experimentos. A determinação do efeito da concentração do substrato na velocidade inicial foi repetida, esta vez com a enzima pré-purificada (seção 5.3.7), e com a utilização de concentrações ainda maiores de L-DOPA. Os mesmos experimentos também foram realizados com a tirosinase de cogumelo comercial (Sigma Co.).

Os resultados em triplicata foram plotados em TKSOLVER. A equação de Michaelis-Menten (Eq. 1) e a equação de inibição pelo substrato (Eq. 2) foram ajustadas por regressão não-linear aos dados.

A equação de Michaelis-Menten (Eq. 1) relaciona a velocidade (V_0), a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e a concentração inicial de substrato $[S]$ com a constante de

Michaelis-Menten (K_m). O K_m de um substrato é a concentração do substrato na qual a velocidade inicial de reação equivale à metade da velocidade máxima.

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Eq.(1)}$$

A equação de inibição pelo substrato (Eq. 2) além de relacionar (V_0), (V_{\max}), $[S]$ e (K_M), inclui (K_i), que é o fator relacionado a inibição pelo substrato.

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}} \quad \text{Eq.(2)}$$

Na figura 56 (A) pode-se observar que a equação de Michaelis-Menten não se ajusta bem aos dados experimentais obtidos com a tirosinase de *L. boryana*. O que é mais notável é que em altas concentrações de substrato (20 a 30 mM) ocorre uma diminuição da atividade quando comparada a concentrações de substrato entre 5 e 10 mM. Por outro lado a equação de inibição pelo substrato ajustou-se bem aos dados.

Os valores dos parâmetros que deram o melhor ajuste da equação de inibição pelo substrato foram V_{\max} de 475 U/mL, K_m de 1,9 mM e K_i de 72 mM para tirosinase de *L. boryana*.

Os ensaios utilizando a tirosinase de cogumelo comercial (SIGMA Co.) foram realizados nas mesmas condições. Os gráficos apresentados na figura 56 (B) mostram que a equação de Michaelis-Menten ajusta bem a estes resultados, enquanto que a equação de inibição pelo substrato não obteve um ajuste aceitável. Os parâmetros encontrados para o ajuste da equação de Michaelis-Menten foram um V_{\max} de 208,1 U/mL e um K_m de 0,52 mM.

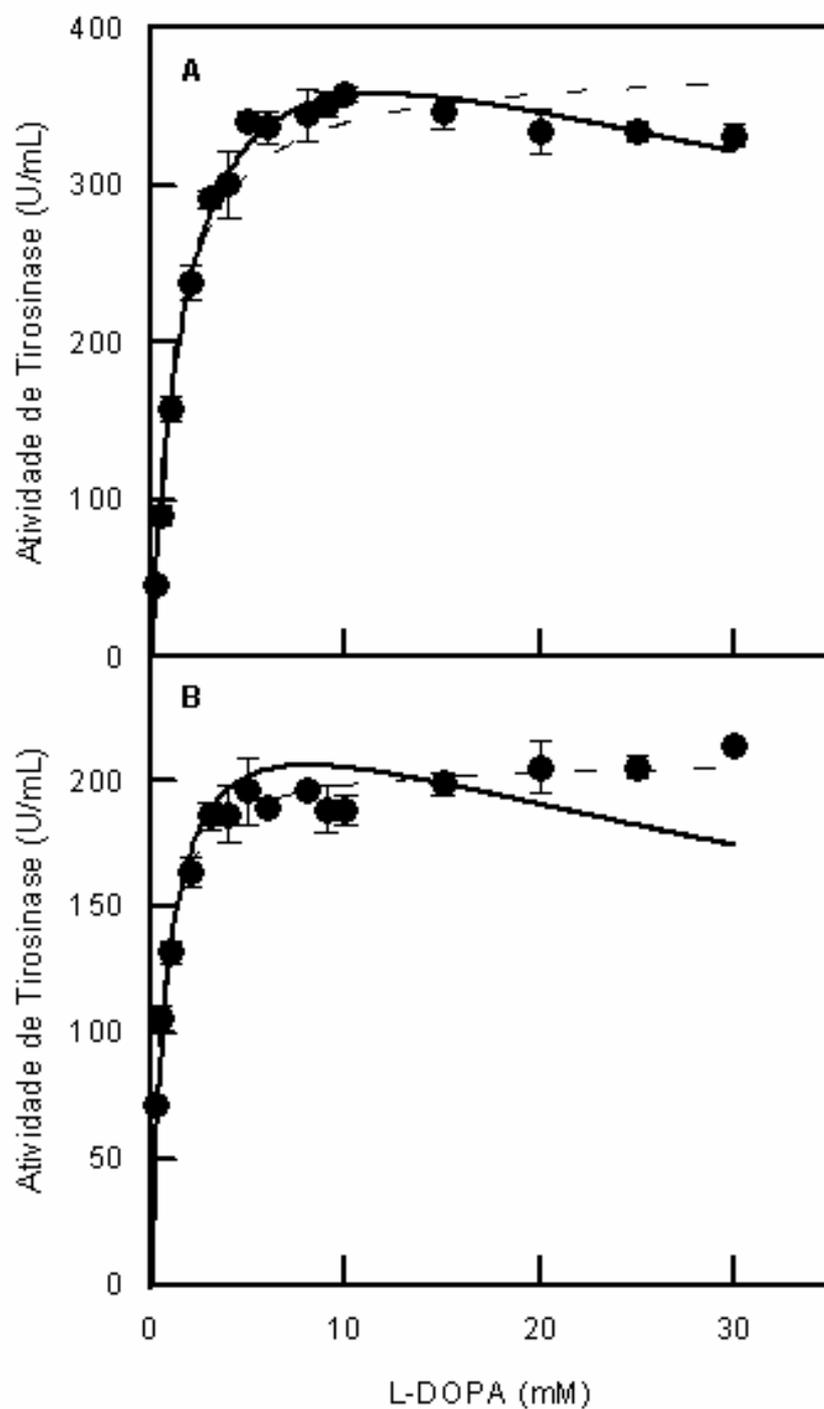


FIGURA 56- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE L-DOPA NAS ATIVIDADES DAS TIROSINASES

(A) Tirosinase de *L. boryana* (B) Tirosinase de cogumelo comercial (Sigma Co.)

--- Ajuste da equação de Michaelis-Menten por regressão não linear

— Ajuste da equação de inibição pelo substrato por regressão não linear

● Dados experimentais

Como relatado no item 5.3.6, na literatura foi reportado que, para a atividade de catecolase, as tirosinases seguem a cinética de Michaelis-Menten, mas como visto, a tirosinase de *L. boryana* segue a cinética de inibição pelo substrato. Com isso foi realizado um trabalho de modelagem matemática baseada no esquema da reação e os parâmetros apresentados por Cabanes et al. (1987) (figura 57; em preto). Estes autores propuseram um modelo cinético para a tirosinase de epiderme de rã, atuando sobre tirosina e L-DOPA. Também eles forneceram estimativas dos valores dos parâmetros do modelo. Ao modelo original foi adicionado, na parte que está relacionada à oxidação da L-DOPA, um mecanismo clássico que contempla a inibição pelo substrato (figura 57, em vermelho). Foi considerada a possibilidade de uma segunda molécula de substrato ligar-se ao complexo enzima-DOPA ($E_{met}D$, $E_{oxy}D$) já formado, resultando assim num complexo ternário ($E_{met}D_2$, $E_{oxy}D_2$) que é incapaz de catalisar a reação. Este esquema para a tirosinase é um pouco mais complexo que o modelo clássico de inibição pelo substrato, dado que a enzima pode estar tanto na forma *met* quanto na forma *oxy*. Foi pressuposto que as constantes relacionadas com a formação dos complexos $E_{met}D$ e $E_{oxy}D$ eram iguais ($k_{13} = k_{15}$) e que as constantes relacionadas com a dissociação destes complexos também eram iguais ($k_{14} = k_{16}$). Os valores dos parâmetros foram escolhidos para que as razões de k_{14}/k_{13} e k_{16}/k_{15} dessem um valor igual ao valor de K_i determinado anteriormente, ou seja, 72 mM (portanto $k_{14}/k_{13} = k_{16}/k_{15} = K_i = 72$ mM). Note-se que neste caso a magnitude dos k's em si não é importante, mas somente a razão importa.

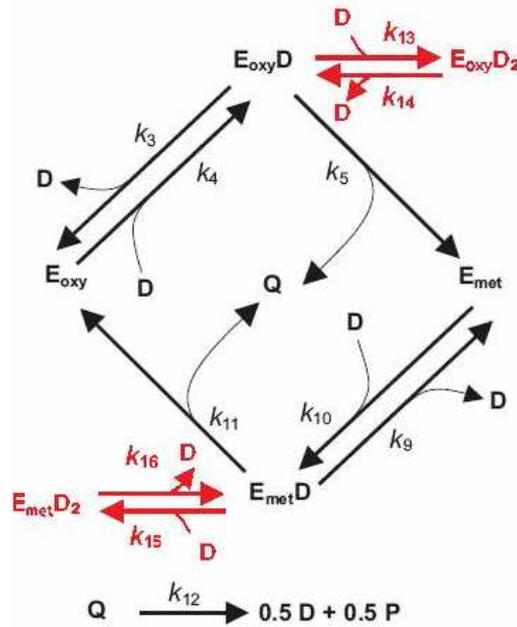


FIGURA 57- MECANISMO DE REAÇÃO DA TIROSINASE DEFINIDO POR CABANES et al. (1987) MODIFICADO PARA INCLUIR O FENÔMENO DE INIBIÇÃO PELO SUBSTRATO

Em preto Modelo de Cabanes et al. (1987); em vermelho inibição pelo substrato

T = tirosina; D = L-DOPA; Q = dopaquinona; E_{met} = met-tirosinase; E_{oxy} = oxi-tirosinase; e E_{oxy}D complexo entre oxi-tirosinase e L-DOPA; E_{met}D complexo entre met-tirosinase e L-DOPA; E_{oxy}D₂ e E_{met}D₂ complexos ternários entre a enzima e dois substratos.

A seguir estão relacionadas as equações diferenciais obtidas a partir do modelo proposto na figura 57:

$$\frac{d[D]}{dt} = -k_4[E_{oxy}][D] + k_3[E_{oxy}D] - k_9[E_{met}D] + k_{10}[E_{met}][D] + 0.5k_{12}[Q] - k_{13}[E_{oxy}D][D] + k_{14}[E_{oxy}D_2] - k_{15}[E_{met}D][D] + k_{16}[E_{met}D_2] \quad \text{Eq.(3)}$$

$$\frac{d[E_{oxy}]}{dt} = -k_4[E_{oxy}][D] + k_3[E_{oxy}D] + k_{11}[E_{met}D] \quad \text{Eq.(4)}$$

$$\frac{d[E_{met}]}{dt} = +k_9[E_{met}D] - k_{10}[E_{met}][D] + k_5[E_{oxy}D] \quad \text{Eq.(5)}$$

$$\frac{d[E_{oxy}D]}{dt} = +k_4[E_{oxy}][D] - k_3[E_{oxy}D] - k_5[E_{oxy}D] - k_{13}[E_{oxy}D][D] + k_{14}[E_{oxy}D_2] \quad \text{Eq.(6)}$$

$$\frac{d[E_{met}D]}{dt} = +k_{10}[E_{met}][D] - k_9[E_{met}D] - k_{11}[E_{met}D] - k_{15}[E_{met}D][D] + k_{16}[E_{met}D_2] \quad \text{Eq.(7)}$$

$$\frac{d[E_{oxy}D_2]}{dt} = +k_{13}[E_{oxy}D][D] - k_{14}[E_{oxy}D_2] \quad \text{Eq.(8)}$$

$$\frac{d[E_{met}D]}{dt} = +k_{15}[E_{met}D][D] - k_{16}[E_{met}D_2] \quad \text{Eq.(9)}$$

$$\frac{d[Q]}{dt} = +k_{11}[E_{met}D] + k_5[E_{oxy}D] - k_{12}[Q] \quad \text{Eq.(10)}$$

$$\frac{d[C]}{dt} = +0.5k_{12}[Q] \quad \text{Eq.(11)}$$

Estas equações foram resolvidas, usando os valores dos parâmetros fornecidos por Cabanes et al. (1987), na (tabela 13).

TABELA 13- RELAÇÃO DE PARÂMETROS USADOS NO MODELO INIBIÇÃO PELO SUBSTRATO

Parâmetros	Valores e unidades	
k_1	$25000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	CABANES et al. (1987)
k_2	10 s^{-1}	CABANES et al. (1987)
k_3	10 s^{-1}	CABANES et al. (1987)
k_4	$10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	CABANES et al. (1987)
k_5	10^2 s^{-1}	CABANES et al. (1987)
k_6	$5000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	CABANES et al. (1987)
k_7	10 s^{-1}	CABANES et al. (1987)
k_8	10^2 s^{-1}	CABANES et al. (1987)
k_9	5 s^{-1}	CABANES et al. (1987)
k_{10}	$106 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	CABANES et al. (1987)
k_{11}	10^2 s^{-1}	CABANES et al. (1987)
k_{12}	$0,41 \text{ s}^{-1}$	CABANES et al. (1987)
k_{13}	$0,001 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	Presente trabalho
k_{14}	$0,072 \text{ s}^{-1}$	Presente trabalho
k_{15}	$0,001 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	Presente trabalho
k_{16}	$0,072 \text{ s}^{-1}$	Presente trabalho

Na figura 58 é mostrado uma comparação das previsões do modelo sobre o perfil temporal da reação com os dados experimentais obtidos com concentrações de L-DOPA de 0,5 a 30 mM, utilizando como enzima a tirosinase comercial SIGMA. Para esta análise, foi considerado que inicialmente 10% da enzima tirosinase está em sua forma oxy-tirosinase e 90% na forma met-tirosinase. Nesta figura pode ser observado que, com exceção das menores concentrações de L-DOPA (0,5 e 1,0 mM), o modelo baseado nas equações e parâmetros de Cabanes et al. (1987) consegue prever velocidades iniciais bem próximas aos valores experimentais. Com estes resultados podemos concluir que o modelo é consistente com a cinética experimental da tirosinase comercial SIGMA.

Assim como para a tirosinase de cogumelo comercial (Sigma Co.), foi feita uma comparação entre os dados experimentais da tirosinase de *L. boryana* e as previsões do modelo matemático que contempla a inibição pelo substrato. Foi observado que também os ajustes do modelo aos dados experimentais foram melhores para concentrações maiores de L-DOPA que para as concentrações mais baixas como de 0,5 e 1,0 mM (dados não mostrados).

Na figura 59 está demonstrado o resultado final de todas as velocidades iniciais obtidas pelo FORTRAN e os dados experimentais. Como pode ser observado, as velocidades iniciais obtidas com o modelo matemático são muito próximas as obtidas nos experimentos no laboratório.

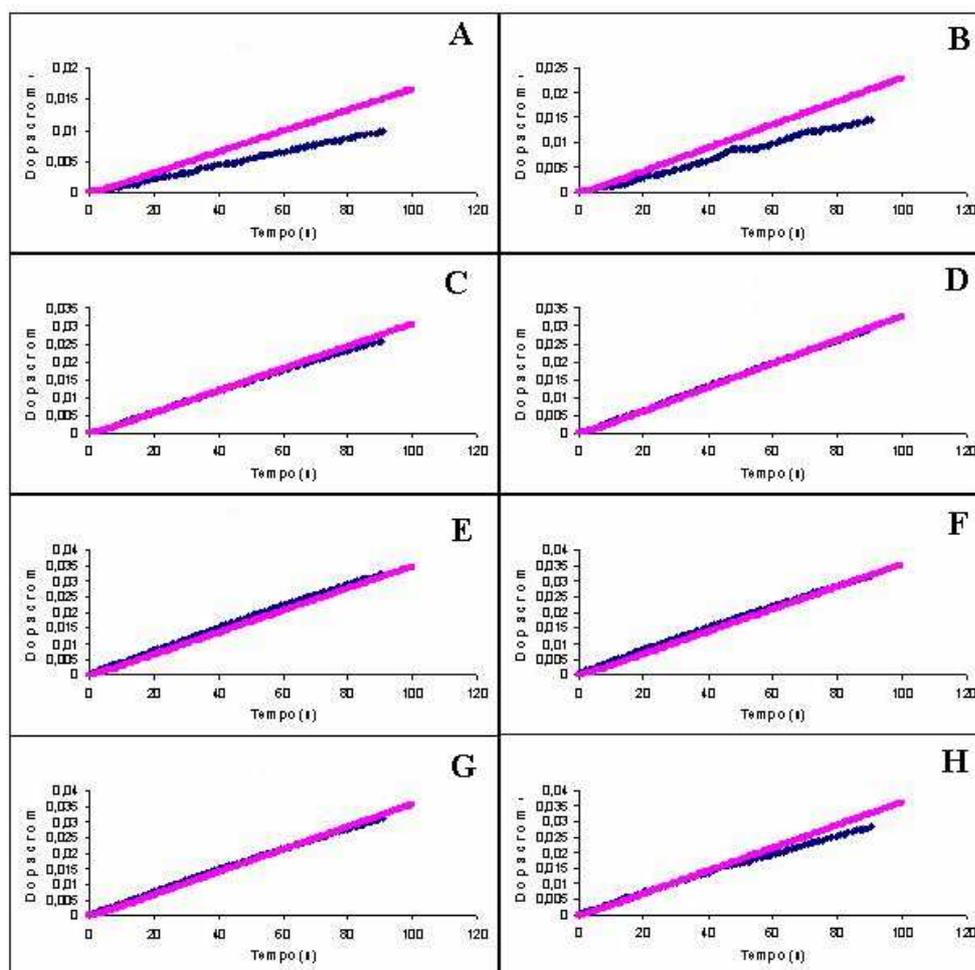


FIGURA 58- COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS EXPERIMENTAIS TIROSINASE COMERCIAL (SIGMA Co.) E DADOS OBTIDOS PELO MODELO PLOTADO EM FORTRAN

(-- --) dados experimentais utilizando DOPA como substrato; (—) modelo plotado em Fortran

DOPA (mM): (A) 0,5; (B) 1,0; (C) 3,0; (D) 5,0; (E)10,0; (F) 15,0; (G) 20,0 e (H) 30,0.

A inibição pelo substrato é o fato mais interessante obtido com os estudos sobre a tirosinase de *Lentinula boryana*, principalmente porque muitas tirosinases de cogumelos estão sendo caracterizadas, e a inibição pelo L-DOPA na atividade de catecolase não foi anteriormente relatada. Tipicamente as tirosinases de cogumelo seguem a cinética de Michaelis-Mentem, com valores de K_m que variam entre 1 e 10 mM (MULLER et al., 1996; ESPIN et al., 1998; ZHANG et al., 1999; HALAOULI; ASTHER; KRUUS, 2005). Por outro lado, tem sido reportado que a atividade de cresolase e catecolase da tirosinase de cogumelo comercial sofre inibição pelo substrato por L-tirosina e 4-metil-catecol (BRU et al., 1989; RODRIGUEZ-LOPEZ et al., 1992).

Foi interessante que a tirosinase de *L. boryana* mostrou inibição pelo substrato e a enzima comercial não. Um maior entendimento do porquê destas diferenças poderia ser alcançado com estudos sobre a ligação enzima-substrato. Por exemplo, em um estudo realizado com a enzima SULT1A1, Gamage et al. (2003) obtiveram a estrutura cristalina da enzima com seu sítio ativo ligado por duas moléculas de substrato (*p*-nitrofenol). Com um estudo deste tipo, poderia ser determinadas diferenças entre os sítios ativos das duas tirosinases (comercial e de *L. boryana*), as quais provavelmente são responsáveis por estes comportamentos distintos. Entretanto, primeiramente seria necessário identificar qual polipeptídeo ou polipeptídeos são responsáveis pela atividade de tirosinase. Observa-se que, após a coluna de DEAE-Sepharose, foram encontradas três bandas no SDS-PAGE. É possível que mais de uma banda mostre atividade de tirosinase, dado que Kanda et al. (1996) obtiveram duas frações diferentes com atividade após a cromatografia de troca iônica de um extrato de *L. edodes*. Foi feita eletroforese parcialmente desnaturante com as duas frações com atividade e foi observado que três bandas possuem atividade. Quando foi usada a eletroforese totalmente desnaturante (SDS-PAGE) as mesmas frações mostraram bandas em 15, 49 e 54 kDa para uma fração e 15, 50 e 55 kDa para a outra. Portanto, primeiramente seria necessário purificar totalmente esta enzima e avaliar as atividades das bandas da eletroforese, para então utilizar a cristalografia na elucidação do porque a tirosinase de *L. boryana* sofre inibição pelo substrato.

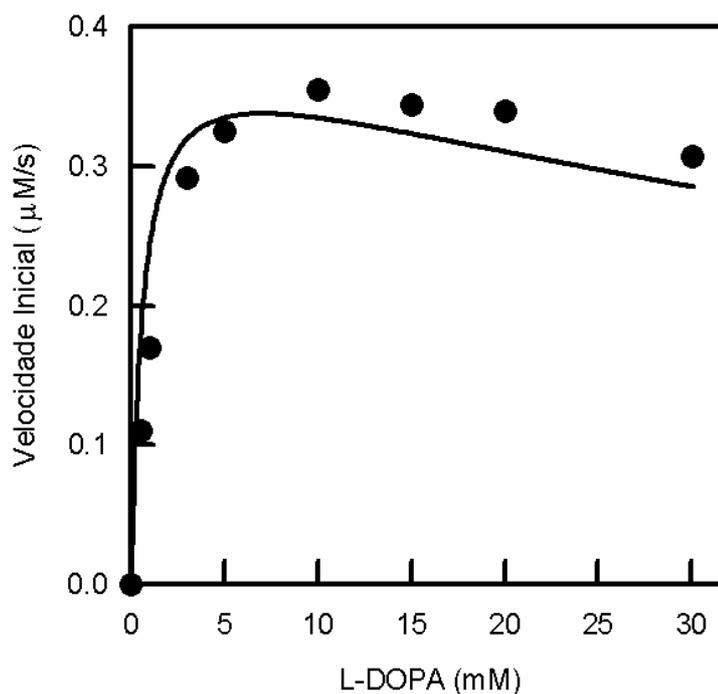


FIGURA 59- SIMULAÇÃO DA EQUAÇÃO DE INIBIÇÃO PELO SUBSTRATO DA TIROSINASE de *L. boryana*

● Dados experimentais

— Modelo de Cabanes et al. (1987) modificado para descrever a inibição pelo substrato

5.3.9 Efeito do Captopril na Atividade da Tirosinase de *L. boryana*

O estudo do efeito do captopril na atividade difenolase (L-DOPA como substrato) foi baseado no trabalho de Espín e Wichers (2001), onde foi demonstrado que o captopril ([25]-N-mercaptopropionil]-1-prolina) é um inibidor irreversível não-competitivo para a atividade monofenolase e um inibidor irreversível competitivo para a atividade difenolase da tirosinase (revisado por SEO; SHARMA; SHARMA, 2003).

A concentração de substrato utilizada para a comparação entre as diferentes concentrações de inibidor foi a de 10 mM (L-DOPA), justificado por essa concentração estar muito acima do K_m e ainda não sofrer inibição pelo substrato.

O monitoramento deste processo é dificultado devido a um seqüestro químico da dopaquinona formada durante a reação enzimática pelo Captopril, que resulta na

formação de um complexo sem cor e não mensurável nas condições de ensaio. Este seqüestro resulta em uma fase *lag* durante o qual a absorbância aumenta lentamente. Somente depois de todo o Captopril ser consumido é que pode ser observado o aumento efetivo na absorbância referente à geração de dopacromo pela reação. A velocidade da produção de dopacromo após a fase *lag* é proporcional à quantidade de tirosinase que não foi inibida irreversivelmente pelo Captopril.

Como pode ser observado na figura 60, quanto maior a concentração do inibidor, maior é a “fase *lag*”. Neste caso, do ensaio com o captopril, ficam definidas as velocidades iniciais após este período de “fase *lag*”.

Na figura 61 pode ser observado que a tirosinase de *Lentinula boryana* sofre forte influência do captopril e que, mesmo com a presença do inibidor, pode ser observado a inibição pelo substrato em concentrações elevadas (20 e 30 mM).

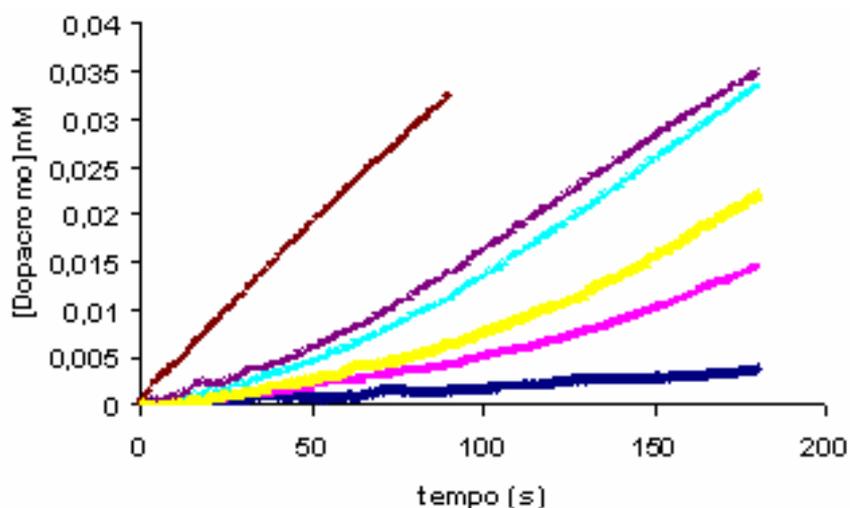


FIGURA 60- EFEITO DO CAPTOPRIL NA ATIVIDADE CATECOLASE* DA TIROSINASE DE *L. boryana*

Concentrações de Captopril (μM): (---) 0; (---) 50; (---) 75; (---) 100; (---) 150 e (---) 200

*L-DOPA (10Mm) usado como substrato

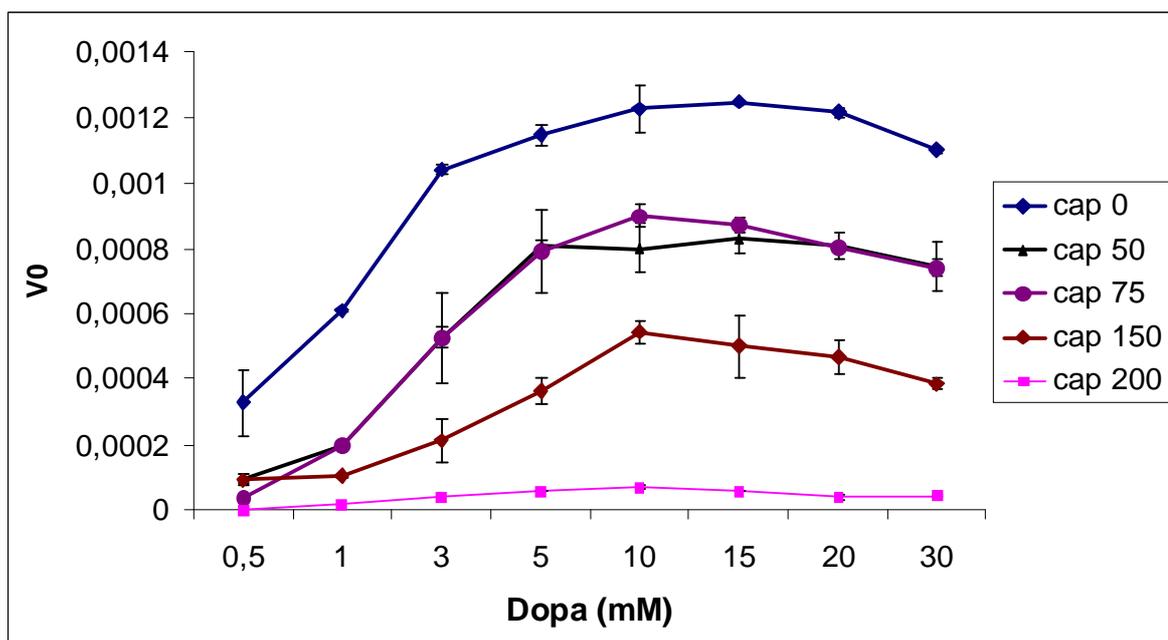


FIGURA 61- INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CAPTOPRIL NA ATIVIDADE DA TIROSINASE DE *L. boryana*

O modelo de Cabanes et al. (1987) foi novamente modificado, com a incorporação de equações para descrever os vários efeitos do Captopril, ou seja, a inibição direta nas duas formas da enzima (met; oxy) e o seqüestro da dopaquinona formada na reação.

Os novos parâmetros introduzidos foram $k_{i_{oxy}}$, a constante de inibição da oxy-tirosinase, $k_{i_{met}}$, a constante de inibição da met-tirosinase e k_{seq} , a constante de seqüestro da dopaquinona formada. Os valores dos parâmetros $k_{i_{oxy}}$, ($10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), $k_{i_{met}}$ ($10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) e k_{seq} ($14500 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) foram determinados utilizando um processo de ajuste, por tentativa e erro, do modelo aos dados experimentais. O modelo conseguiu descrever a fase *lag* (resultados não mostrados) e conseguiu prever razoavelmente bem a velocidade de reação na fase pós-*lag* em função de concentração de substrato (L-DOPA), para as três concentrações de Captopril usadas (Figuras 62 A, B, C). No entanto, algumas simulações não conseguiram ajuste adequado, em algumas concentrações de substrato.

Como relatado na revisão bibliográfica (item 2.5.2) interesse por inibidores da tirosinase é bastante elevado, principalmente pelo envolvimento desta enzima com o

escurecimento de cogumelos, frutas, cosméticos entre outros. A busca por novos inibidores e o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na inibição é constante, a modelagem matemática propicia um aprofundamento do entendimento da cinética da inibição.

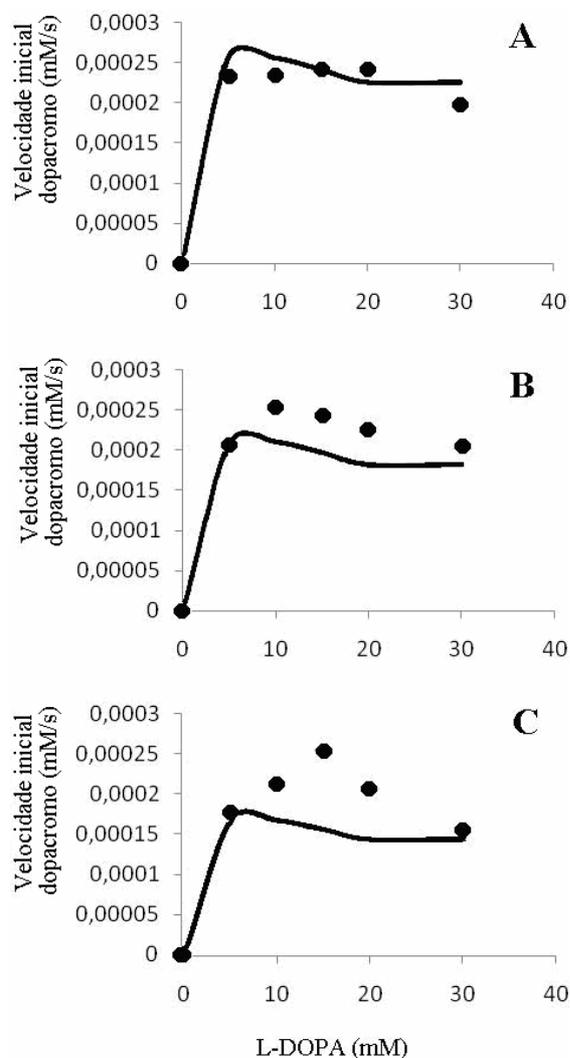


FIGURA 62- COMPARAÇÃO ENTRE O MODELO MATEMÁTICO E OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS NA CINÉTICA DA TIROSINASE

- Resultados experimentais
- Modelo de Cabanes et al. (1987) modificado para descrever a inibição pelo substrato e inibição por Captopril.

Captopril: (A) 50, 75 (B) E 100 μM (C).

6 CONCLUSÕES

Os estudos realizados nesta tese visaram a avaliação do potencial biotecnológico do macrofungo *Lentinula boryana*.

O cultivo em meio líquido mostrou a viabilidade de produção micelial, de tirosinase a partir do micélio e de exopolissacarídeos. Estes exopolissacarídeos foram caracterizados como α -(1 \rightarrow 3)-xilomanana e β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana altamente ramificada em O-6. Estes polissacarídeos têm potencial para apresentarem características reológicas interessantes, o que abre novas perspectivas de estudos com estes polissacarídeos. Com as informações apresentados aqui nesta tese é possível produzir e saber quais polissacarídeos estão sendo produzidos.

Os experimentos com os corpos de frutificação mostraram quatro polissacarídeos inéditos para esta espécie. Considerando as características químicas dos polissacarídeos e os dados da literatura, pode-se esperar que, ao menos, alguns destes polissacarídeos apresentem atividades biológicas interessantes. Estes dados certamente são demonstram um grande potencial biotecnológico para o *L. boryana*.

Diversas pesquisas buscam enzimas com propriedades especiais como termoestabilidade ou resistência a extremos de pH. Estas características não foram encontradas na tirosinase de *L. boryana*, mas foi demonstrado que esta tirosinase sofre inibição pelo substrato na reação com L-DOPA. Esta característica encontrada foi um achado cientificamente muito interessante, principalmente por que este fenômeno não havia sido relatado anteriormente para qualquer outra tirosinase.

Como conclusão final pode-se afirmar que com todas estas possibilidades apresentadas o *Lentinula boryana* é um macrofungo com potencial biotecnológico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J. K.; MONTGOMERY, R.; SMITH, F. A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 74, p. 4970-4971, 1952.

ALQUINI A. G.; CARBONERO, E. R.; ROSADO, F. R.; COSENTINO, C.; IACOMINI, M. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, p. 47-52, 2004.

ANGHILERI, A.; LANTTO, R.; KRUUS, K.; AROSIO, C.; FREDDI, G. Tyrosinase-catalyzed grafting of sericin peptides onto chitosan and production of protein-polysaccharide bioconjugates, **J. Biotechnol.** v. 127, p. 508-519, 2007.

ATES, S.; CORTENLIOGLU, E.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETOGLU, U. Production of L-DOPA using Cu-alginate gel immobilized tyrosinase in a batch and packed bed reactor, **Enzyme Microb. Technol.** v. 40, p. 683-687, 2007.

AXELSSON, K.; BJÖRNDAL, H.; LINDBERG, B. Structure of the fucoxylomannan from *Polyporus pinicola* (Fr.). **Acta Chem. Scand.** v. 23, p. 1597-1600, 1969.

AXELSSON, K., BJÖRNDAL, H., SVENSSON, S., HAMMARSTRÖM, S., Polysaccharides elaborated by *Fomes annosus* (Fr.) Cooke. **Chem. Scand.** v. 25, p. 3645-3650, 1971.

BAO, X.; DUAN, J.; FANG, X.; FANG, J. Chemical modifications of the (1→3)- α -D-glucan from spores of *Ganoderma lucidum* and investigation of their physicochemical properties and immunological activity. **Carbohydrate Research**, v. 336, p. 127-140, 2001.

BARRETO-BERGTER, E.; GORIN, P. A. J. Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v. 41, p. 67-103, 1983.

BENEDITO E.; JIMÉNEZ-CERVANTES C.; PÉREZ D.; CUBILLANA J.D.; SOLANO F.; JIMÉNEZ-CERVANTES J.; MEYER ZUM GOTTESBERGE A.M.; LOZANO J.A.; GARCÍA-BORRÓN J.C. Melanin formation in the inner ear is catalyzed by a new tyrosine hydroxylase kinetically and structurally different from tyrosinase. **Biochim Biophys Acta**, v. 1336, p. 59-72, 1997.

BERLINER, D. L. Berliner; R. L. Erwin; D. R. McGee. **Methods of treating Parkinson's disease using melanin.** Int. A61K 037/00. U. S. n. 5,210,076, November 5, 1990, May 11, 1993.

BESOMBES, J. L.; COSNIER, S.; LABBE, P.; REVERDY, G. A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides, **Anal. Chim. Acta**, v. 311, p. 255-263, 1995.

BEVILAQUA, J. V.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SANT-ANNA, G. L. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments, **Braz. J. Chem. Eng.** v. 19, p. 151-158, 2002.

BILINSKA, B. Progress of infrared investigations of melanin structures. **Spectrochimica Acta**, v. 52, p. 1157-1162, 1996.

BOHN, J.A.; BEMILLER, J. N. (1→3)- β -D-glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships **Carbohydrate Polymers**, v.28, p.3-14, 1995

BONAKDAR, M.; VILCHEZ, J.L.; MOTTOLA, H.A. Bioamperometric sensors for phenol based on carbon paste electrodes, **J. Electroanal. Chem.** v. 266, p. 47-55 (1989).

BOUCHILLOUX, S.; MCMAHILL, P.; MASON, H.S. The multiple forms of mushroom tyrosinase - Purification and molecular properties of enzymes, **J. Biol. Chem.** v. 238, p. 1699-1707, 1963.

BOUVENG, H.O., FRASER, R.N. AND LINDBERG, B. Polysaccharides elaborated by *Armillaria mellea* (Tricholomataceae) part II. Water-soluble mycelium polysaccharides. **Carbohydr. Res.** v. 4, p. 20-31, 1967.

BRADFORD, M. M. A Rapid And Sensitive Method For The Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 1976.

BRU, R.; SANCHEZ-FERRER, A.; GARCÍA-CARMONA, F. Characteristics of tyrosinase in AOT-isooctane reverse micelles, **Biotechnol. Bioeng.** v. 34, p. 304–308, 1989.

BUTLER, M. J.; DAY, A. W. Fungal melanins: A review. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 1115–1136, 1998.

CABANES, J.; GARCIA-CÁNOVAS, F.; LOZANO, J. A.; GARCIA-CARMONA, F. A kinetic study of the melanization pathway between L-tyrosine and dopachrome. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 923, p. 187-195, 1987.

CAMPANELLA, L.; SAMMARTINO, M. P.; TOMASSETTI, M. New enzyme sensor for phenol determination in non-aqueous an aqueous medium, **Sens. Actuator B-Chem.** v.7, p. 383-388, 1992.

CARBONERO, E.R., SASSAKI, G.L., STUELP, P.M., GORIN, P.A.J., WORANOVICZ-BARREIRA, S.M., IACOMINI, M. Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *Cladonia*: significance as chemotypes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.194, p. 65–69, 2001.

CARBONERO, E.R.; SMIDERLE, F.R.; GRACHER, A.H.P.; MELLINGER, C.G.; TORRI, G.; AHTI, T.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Structure of two glucans and a galactofuranomannan from the lichen *Umbilicaria mammulata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 13–18, 2006.

CARVALHO, G. M. J.; ALVES, T. L. M.; FREIRE, D.M.G. L-DOPA production by immobilized tyrosinase, **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 84, p. 791-800, 2000.

CHANG, S. T.; HAYES, W. A. The biology and cultivation of edible mushrooms, San Diego, California, ACADEMIC PRESS INC. (LONDON) LTD. p. 445-459, 1978.

CHEN, T.; EMBREE, H.D.; WU, L.Q.; PAYNE, G. F. In vitro protein–polysaccharide conjugation: Tyrosinase-catalyzed conjugation of gelatin and chitosan, **Biopolymers**, v. 64, p. 292–302, 2002.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal β -(1→3), (1→6)-glucans. **Mycological research**, v. 3, p. 635 – 652 , 2007.

CHIACCHIERINI, E. RESTUCCIA, D. VINCI, G. Bioremediation of food industry effluents: Recent applications of free and immobilised polyphenoloxidases, **Food Sci. Technol. Int.** v. 10, p. 373-382, 2004.

CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y. Y.; ARAI, Y.; FUKUOKA F. Fractionation and Purification of the Polysaccharides with Marked Antitumor Activity, Especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (An Edible Mushroom). **Cancer Research**, v. 30, p. 2776-2781, 1970.

CHO, S-M.; KOSHINO, H.; YU, S-H.; YOO, I-D. A mannofucogalactan, fomitellan A, with mitogenic effect from fruit bodies of *Fomitella fraxinea* (Imaz.) **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p.13-18, 1998.

CHUNG, HY.; CHO, YJ.; KIM, T. Isolation and characterization of a water-soluble polysaccharide from the mycelia of solid cultured *Agaricus blazei* murill **Food Science and Biotechnology**, v. 14, p. 259-262, 2005.

CHUNG, HY.; KIM, T. Isolation and characterization of a water-soluble polysaccharide from the mycelia of solid cultured *Phellinus linteus* **Food Science and Biotechnology**, v. 14, p. 783-787, 2005.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v. 131, p. 209-217, 1984.

D'AMATO, R. J. D'Amato. **Use of melanin for inhibition of angiogenesis and macular degeneration.** Int. A61K 038/00. U.S. n. 6,525,019. September 28, 2001, February 25, 2003

DONG, Q.; YAO, J.; YANG, X-T.; FANG, J-N. Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1417–1421, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review, **Appl. Catal. B-Environ.** v. 28, p. 83-99, 2000.

DYER, J. R. Use of periodate oxidations in biochemical analysis. **Methods Biochem. Anal.**, v. 3, p. 112-149, 1956.

EDWARDS, W.; LEUKES, W.D.; ROSE, P.D.; BURTON, S.G.; Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-coated polysulphone capillary membranes for improved phenolic effluent bioremediation, **Enzyme Microb. Technol.** v. 25, p. 769-773, 1999.

ENSUNCHO, L.; ALVAREZ-CUENCA, M.; LEGGE, R.L. Removal of aqueous phenol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-phase fluidized bed reactor, **Bioprocess. Biosyst. Eng.** v. 27, p. 185-191, 2005.

ESPIN, J. C.; VAN LEEUWEN, J.; WICHERS, H. J. Kinetic study of the activation process of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by serine proteases **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47(9), p. 3509-3517, 1999c.

ESPIN, J. C.; WICHERS, H. J. Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). kinetic properties of the SDS-activated isoform **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47(9), p. 3518-3525, 1999a.

ESPIN, J. C.; WICHERS, H. J. Kinetics of activation of latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by benzyl alcohol **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3503-3508, 1999b.

ESPIN, J. C.; WICHERS, H. J. Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1554, p 289-300, 2001.

FAN, Y. FLURKEY, W.H. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms, **Phytochemistry**, v. 65, p. 671-678, 2004.

FANG, Q.H.; ZHONG, J.J. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 769-774, 2002.

FARIA, R. O. **Avaliação do potencial biotecnológico de *Lentinula boryana* (BERK & MONT) PEGLER**. Curitiba, 2004. 102 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FARIA, R.O. MOURE, V.R. BALMANT, W. AMAZONAS, M.A.L. KRIEGER, N. MITCHELL, D.A. The tyrosinase produced by *Lentinula boryana* (Berk. & Mont.) Pegler suffers substrate inhibition by L-DOPA, **Food Technol. Biotechnol.**

FENOLL, L.G. PEÑALVER, M.J. RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N. VARÓN, R. GARCÍA-CÁNOVAS, F. TUDELA, J. Tyrosinase kinetics: Discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates, **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 36, p. 235-246, 2004.

GAMAGE, N.U. DUGGLEBY, R.G. BARNETT, A.C TRESILLIAN, M. LATHAM, C.F. LIYOU N.E., MCMANUS, M.E. MARTIN, J. Structure of a human carcinogen-converting enzyme, SULT1A1 - Structural and kinetic implications of substrate inhibition. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 7655-7662, 2003.

GELB, D.J. OLIVER, E. GILMAN, S. Diagnostic criteria for Parkinson disease, **Arch. Neurol.** v. 56, p. 33-39, 1999.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ¹³C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methylglycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 53, p. 1212–1223, 1975.

GORIN, P. A. J.; TEIXEIRA, A. Z.; TRAVASSOS, L. R.; LABOURIAU, M. L. S.; IACOMINI, M. Characterization of carbohydrate components of an unusual hydrogel formed by seed coats of *Magnoia pubescens* (Tingui). **Carbohydr. Res.**, v. 282(1), p. 325-333, 1996.

GUTIÉRREZ, A.; PRIETO, A.; MARTINEZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus* **Carbohydrate Research**, v. 281, p. 143-154, 1996.

GUZMÁN, G., et al. **EL CULTIVO DE LOS HONGOS COMESTIBLES**, México, D. F: Instituto Politecnico Nacional, p. 150-153, 1993

HAGHBEEN, K.; TAN, E.W. Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates **Analytical Biochemistry**, v. 312(1), p. 23-32, 2003.

HALAOULI, S.; ASTHER, M.; KRUIUS, K. Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications, **J. Appl. Microbiol.** v. 98, p. 332-343, 2005

HALAOULI, S.; RECORD, E.; CASALOT, L.; HAMDI, M.; SIGOILLOT, J.C.; ASTHER, M.; LOMASCOLO, A. Cloning and characterization of a tyrosinase gene from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*, and overproduction of the recombinant protein in *Aspergillus niger*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 70, p. 580-589, 2006.

HALAOULI, S.; ASTHER, M.; SIGOILLOT, J-C.; HAMDI, M.; LOMASCOLO, A. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 219-232, 2006.

HALL, G.F. BEST, D.J. TURNER, A.P.F. Amperometric enzyme electrode for the determination of phenols in chloroform, **Enzyme Microb. Technol.** v. 10, p. 543-546, 1988.

HAQ, I.U. ALI, S. QADEER, M.A. Biosynthesis of L-DOPA by *Aspergillus oryzae*, **Bioresour. Technol.** v. 85, p. 25-29, 2002.

HAQ, I.U. ALI. S. Mutation of *Aspergillus oryzae* for improved production of 3, 4-dihydroxy phenyl-L-alanine (L-DOPA) from L-Tyrosine, **Braz. J. Microbiol.** v. 37, p. 78-86, 2006.

HAWORTH, W. N. A new method of preparing alkylated sugars. **Journal of the Chemical Society**, v. 107, p. 8-16, 1915.

HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 357-360, 1965.

HO, P.Y. CHIOU, M.S. CHAO, A.C. Production of L-DOPA by tyrosinase immobilized on modified polystyrene, **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.111, p. 139-152, 2003.

HOROWITZ, N. H.; FLING, M.; HORN, G. Tyrosinase (*Neurospora crassa*). **Methods in Enzymology-Metabolism of Amino Acids and Amines Part A**, v. 17, p. 615-620, 1970.

HUANG, Q.; JIN, Y.; ZHANG, L.; CHEUNG, P.C.K.; KENNEDY, J. F. Structure, molecular size and antitumor activities of polysaccharides from *Poria cocos* mycelia produced in fermenter. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 324–333, 2007

IKEHATA, K. NICELL, J.A. Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols, **Bioresour. Technol.** v. 74, p. 191-199, 2000.

JESMA, J.; KREGER, D. R. Polymorphism in crystalline $\alpha(1\rightarrow3)$ -D-Glucans from fungal cell-walls. **Carbohydrate Research**, v. 71, p. 51–64, 1979.

JIN, Y.; ZHANG, L.; CHEN, L.; CHEN, Y.; CHEUNG, P. C. K.; CHE, L. Effect of culture media on the chemical and physical characteristics of polysaccharides isolated from *Poria cocos* mycelia. **Carbohydrate Research**, v. 338, p.1507-1515, 2003.

JOLLEY, R.L. EVANS, L.H. MAKINO, N. MASON, H.S. Oxytyrosinase, **J. Biol. Chem.** v. 249, p. 335-345, 1974.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 36-38, 1965.

JONG, S. C.; BIRMINGHAM, J. M. Medicinal and Therapeutic Value of the Shiitake Mushroom. **Advances in applied Microbiology**, v. 39, p. 159-184, 1993.

KAHN V.; ANDRAWIS A. Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone. **Phytochemistry** v. 24, p. 905–908, 1985.

KANDA, K. SATO, T.; ISHII, S.; ENEI, H.; EJIRI, S. Purification and properties of tyrosinase isozymes from the gill of *Lentinus edodes* fruiting body, **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 60, p. 1273–1278 1996.

KATAN, T. GALUN, E. A rapid and efficient method for the **purification of tyrosinase** from *Neurospora*, **Anal. Biochem.** v. 67, p. 485-492, 1975.

KAWAGISHI, H.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; MIZUNO, T. Fraction and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydr. Res.** v. 186, p. 267–273, 1989.

KERTESZ, D. ZITO, R. Mushroom polyphenol oxidase I - Purification and general properties, **Biochim. Biophys. Acta**, v. 96, p. 447-462, 1965.

KHAN, A.A. AKHTAR, S. HUSAIN, Q. Simultaneous purification and immobilization of mushroom tyrosinase on an immunoaffinity support, **Process Biochem.** v. 40, p. 2379-2386, 2005.

KIHO, T.; YOSHIDA, I.; NAGAI, K.; UKAI, S.; HARA, C. (1→3)- α -D-glucan from an alkaline extract of *Agrocybe cylindracea*, and antitumor activity of its O-(carboxymethyl)ated derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 189, p. 273–279, 1989.

KIM, G.Y. CUONG, N.M. CHO, S.H. SHIM, J. WOO, J.J. MOON, S.H. Improvement of an enzyme electrode by poly(vinyl alcohol) coating for amperometric measurement of phenol, **Talanta**, v. 71, p. 129-135, 2007.

KOYANAGI, T. KATAYAMA, T. SUZUKI, H. NAKAZAWA, H. YOKOZEKI, K. KUMAGAI, H. Effective production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR, **J. Biotechnol.** v. 115, p. 303-306, 2005.

KUBO, I.; KINST-HORI, I. Tyrosinase inhibitors from cumin. **J. Agric. Food Chem.** v. 46, 5338-5341, 1998.

KUO, M.-J.; ALEXANDER, M. Inhibition of the lysis of fungi by melanins. **Journal of Bacteriology**, v. 94(3), p. 624-629, 1967

KUPPER, U. NIEDERMANN, D.M. TRAVAGLINI, G. LERCH, K. Isolation and characterization of the tyrosinase gene from *Neurospora crassa*. **J. Biol. Chem.** v. 264, p. 17250–17258, 1989.

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

LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGE, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, p. 143-158, 2003.

LEE, S.G. HONG, S.P. SUNG, M.H. Removal and bioconversion of phenol in wastewater by a thermostable β -tyrosinase, **Enzyme Microb. Technol.** v. 19, p. 374-377, 1996.

LEE, S.G. RO, H.S. HONG, S.P. KIM, E.H. SUNG, M.H. Production of L-DOPA by thermostable tyrosine phenol-lyase of a thermophilic Symbiobacterium species overexpressed in recombinant *Escherichia coli*, **J. Microbiol. Biotechnol.** v. 6, p. 98-102, 1996.

LEEUWEN, J.V.; WICHERS, H.J. Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies **Mycol. Res.** v.103, p. 413-418, 1999.

LI, J. CHIA, L.S. GOH, N.K. TAN, S.N. Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for the determination of phenolic compounds, **Anal. Chim. Acta**, v. 362, p. 203-211, 1998.

LIU, Z. LIU, B. KONG, J. DENG, J. Probing trace phenols based on mediator-free alumina sol-gel derived tyrosinase biosensor, **Anal. Chem.** v. 72, p. 4707-4712, 2000.

LOH, K.C.. TAN, C.P.P. Effect of additional carbon sources on biodegradation of phenol, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 64, p. 756-763, 2000.

LUKE, A.K. BURTON, S.G. A novel application for *Neurospora crassa*: Progress from batch culture to a membrane bioreactor for the bioremediation of phenols, **Enzyme Microb. Technol.** v. 29, p. 348-356, 2001.

LUTZ, M. BURESTEDT, E. EMNEUS, J. LIDEN, H. GOBHADI, S. GORTON, L. MARKO-VARGA, G. Effects of different additives on a tyrosinase based carbon-paste electrode, **Anal. Chim. Acta**, v. 305, 8-17, p. 2005.

MAEDA, Y. Y.; WATANABE, S. T.; CHIHARA, C.; ROKUTANDA, M. Denaturation and renaturation of β -1,6; 1,3-Glucan, Lentinan, associated with expression of T-Cell-mediated Responses. **Cancer Research**, v. 48, p. 671-675, 1988.

MASAMOTO, Y.; IIDA, S.; KUBO, M. Inhibitory effect of Chinese crude drugs on tyrosinase. **Planta Med.** v. 40, p. 361-365, 1980.

MATA, G.; DELPECH P.; SAVOIE J. M. Selection of strains of *Lentinula edodes* and *Lentinula boryana* adapted for efficient mycelial growth on wheat straw. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 18, p. 118-122, 2001.

MATHEIS, G. WHITAKER, J.R. Enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods, **J. Food Biochem.** v. 11, p. 309-327, 1987.

MINATO K, MIZUNO M, TERAJ H, TSUCHIDA H. Autolysis of lentinan, an antitumor polysaccharide, during storage of *Lentinus edodes*, shiitake mushroom **J Agric Food Chem.** v. 47(4), p.1530, 1999.

MISAKI A, KAWAGUCHI K, MIYAJI H, NAGAE H, HOKKOKU S, KAKUTA M, SASAKI T. Structure of Pestalotan, A highly branched (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan elaborated by *Pestalotia* sp-815, and the enhancement of its antitumor-activity by polyol modification of the side-chains **Carbohydrate Research**, v. 129, p. 209-227, 1984.

MIYAZAKI, T., NISHIJIMA, M.,. Structural examination of an alkaliextracted, water-soluble heteroglycan of fungus *Ganoderma lucidum*. **Carbohydr. Res.** v. 109, p. 290-294, 1982.

MIZUNO, T. Shiitake, *Lentinus edodes*: Functional proprieties for medical and food purposes, **Food Reviews International**, v.11(1), p. 111-128, 1995.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from ‘‘Himematsutake’’, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agric. Biol. Chem.** v. 54, p.2889–2896, 1990.

MONTEFIORI, D.C.; ZHOU; J.Y. Selective antiviral activity of synthetic soluble L-tyrosine and L-dopa melanins against human immunodeficiency virus in vitro. **Antiviral Research**, v. 15(1), p. 11-26, 1991.

MUKUMOTO, T.; YAMAGUCHI, H. The chemical structure of a mannofucogalactan from the fruit bodies of *Flammulina velutipes* (Fr.) Sing. **Carbohydr. Res.** v. 59, p. 614–621, 1997.

MULLER, L.A. RINZ, U. ZRÝD, J.P. Characterization of a tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis, **Phytochemistry**, v. 42, p. 1511-1515, 1996.

MUNJAL, N.; SAWHNEY, S. K. Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30(5), p. 613-619, 2002.

NISTOR, C. EMNEUS, J. GORTON, L. CIUCU, A. Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds, **Anal. Chim. Acta**, v. 387, p. 309-326, 1999.

NO, J. K. et al. Inhibition of tyrosinase by green tea components. **Life Sciences**, v. 65(21), p. PL241-PL246, 1999.

OKUN, M. R. Okun; **Method of treating psoriasis**. Int. A01N 009/24, A61K 031/12, U.S. n. 3,987,202 December 23, 1974 October 19, 1976

ÖNNERFJORD, P. EMNÉUS, J. MARKO-VARGA, G. GORTON, L. Tyrosinase graphite-epoxy based composite electrodes for detection of phenols, **Biosens. Bioelectron.** v. 10, p. 607-619, 1995.

ORTEGA, F. DOMÍNGUEZ, E. BURESTEDT, E. EMNÉUS, J. GORTON, L. MARKO-VARGA, G. Phenol oxidase-based biosensors as selective detection units in column liquid chromatography for the determination of phenolic compounds, **J. Chromatogr.** v. 675, p. 65-78, 1994.

OSAKU, C.A.; SASSAKI, G.L.; ZANCAN, GT.; IACOMINI, M. Studies on neutral exopolysaccharides produced by the ectomycorrhiza *Thelephora terrestris*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 216, p. 145-149, 2002.

PERLIN, A. S.; CASU, B. Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of D-glucose-¹³C. **Tetrahedron Letters**, v. 34, p. 2919–2924, 1969.

PIALIS, P. SAVILLE, B.A. Production of L-DOPA from tyrosinase immobilized on nylon 6,6: Enzyme stability and scaleup, **Enzyme Microb. Technol.** v. 22, p. 261-268, 1998.

POMA, A.; PACIONI, G.; COLAFARINA, S.; MIRANDA, M. Effect of tyrosinase inhibitors on *Tuber borchii* mycelium growth in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, p. 69-75, 1999.

RATCLIFFE, B.; FLURKEY, WH.; KUGLIN, J.; DAWLEY, R. Tyrosinase, Laccase, and Peroxidase in Mushrooms (*Agaricus*, *Crimini*, *Oyster*, ad *Shiitake*). **Journal of Food Science**. V.59, n.4, 1994.

REHNSTROM, A.L.; FREE, S.J. The isolation and characterization of melanin-deficient mutants of *Monilinia fructicola* **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 321-330, 1996.

REINHOLD, D.F. UTNE, T. ABRAMSON, N.L. **Process for L-Dopa**. United States Patent 4716246 (1987).

RILEY, P.A. Melanin. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 29, p. 1235-1239, 1997.

RODRIGUEZ-LOPEZ, J. N.; TUDELA, J.; VARÓN, R.; GARCIA-CARMONA, F.; GARCIA-CÁNOVAS, F. Analisis of a Kinetic Model for Melanin Biosynthesis Pathway. **Journal of Biological Chemistry**. V. 267, p. 3801-3810, 1992.

ROOSEBOOM, M.; COMMANDEUR, J.N.M.; VERMEULEN, N.P.E. Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs **Pharmacological Reviews**, v. 56(1), p. 53-102, 2004.

ROS, J.R. RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N. GARCÍA-CÁNOVAS, F. Tyrosinase: Kinetic analysis of the transient phase and the steady-state, **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1204, p. 33-42, 1994.

ROSADO, F.R., CARBONERO, E.R., CLAUDINO, R.F., TISCHER, C.A., KEMMELMEIER, C. AND IACOMINI, M. The presence of partially 3-Omethylated mannogalactan from the fruit bodies of edible basidiomycetes *Pleurotus ostreatoroseus* and *P. ostreatus* 'Florida'. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 221, p. 119-124, 2003.

SAEMAN, J. F.; MOORE, W. E.; MITCHELL, R. L.; MILLET, M.A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tech. Assoc. Pulp Pap. Ind.**, v. 37, p. 336-343, 1954.

SÁNCHEZ-FERRER, A. RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N. GARCÍA-CÁNOVAS, F. GARCÍA-CARMONA, F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism, **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1247, p. 1-11, 1995.

SANZ, V.C. MENA, M.L. GONZALEZ-CORTES, A. YANEZ-SEDENO, P. PINGARRON, J.M. Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes - Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines, **Anal. Chim. Acta**, v. 528, p. 1-8, 2005.

SASAKI, T.; TAKASUKA, N.; Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. **Carbohydrate Research**, v. 47, p. 99–104, 1976.

SASSAKI, G.L.; FERREIRA, J.C.; BLANKO-GLIENKE, C.; TORRI, G.; TONI, F.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Pustulan and branched L-galactofuranan from the phytopathogenic fungus *Guignardia citricarpa*, excreted from media containing glucose and sucrose. **Carbohydr. Polym.** v. 48, p. 385-389, 2002.

SCORE, A.J. PALFREYMAN, J.W. WHITE, N.A. Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions, **Int. Biodeterior. Biodegrad.** v. 39, p. 225-233, 1997.

SEETHARAM, G. SAVILLE, B.A. L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite, **Enzyme Microb. Technol.** v. 31, p. 747-753, 2002.

SEETHARAM, G.B. SAVILLE, B.A. Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports, **Water Res.** v. 37, p. 436-440, 2003.

SELINHEIMO, E. SALOHEIMO¹, M. AHOLA, E. WESTERHOLM-PARVINEN, A. KALKKINEN, N. BUCHERT, J. KRUUS, K. Production and characterization of a secreted, C-terminally processed tyrosinase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*, **FEBS Journal**, v. 273, p. 4322–4335, 2006.

SEO, S. Y.; SHARMA, V. K.; SHARMA, N. Mushroom tyrosinase: Recent prospects **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51(10), p. 2837-2853, 2003.

SHIDA, M.; HARYU, K.; MATSUDA, K. On the heterogalactan from the fruit body of *Lentinus edodes*. **Carbohydrate Research**, v. 41, p. 211-218, 1975.

SHIDA, M.; UCHIDA, T.; MATSUDA, K. A (1→3)-alpha-D-glucan isolated from fruit bodies of *Lentinus edodes*. **Carbohydrate Research**, v. 60(1), p. 117-127, 1978.

SHIDA, M.; USHIODA, Y.; NAKAJIMA, T.; MATSUDA, K. Structure of the alkali-insoluble skeletal glucan of *Lentinus edodes*. **Journal of Biochemistry**, v. 90, p. 1093-1100, 1981.

SHIN, N. H.; RYU, S. Y.; CHOI, E. J.; KANG, S. H.; CHANG, I. M.; MIN, K. R.; KIM, Y. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 243, p. 801-803, 1998.

SMIDERLE, F. R. CARBONERO, E.R.; MELLINGER, C.G.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Structural characterization of a polysaccharide and a β -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2189–2196, 2006.

SOLER-RIVAS, C. JOLIVET, S. ARPIN, N. OLIVIER, J.M.. WICHERS, H.J. Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*, **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 23, p. 91-614, 1999.

STAINSACK, J. **Estudos de estruturas de melaninas sintéticas através da interação com íons metálicos paramagnéticos**. Curitiba, 1998.102 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

STOLL, V. S.; BLANCHARD, J. Buffers: Principles and Practice, **Methods in Enzymology**, v. 182, p. 24-38, 1990.

STROTHKAMP, K.G. JOLLEY, R.L. MASON, H.S. Quaternary structure of mushroom tyrosinase, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 70, p. 519-524, 1976.

SURENJAVA, U.; ZHANGA, L.; XUA, X.; ZHANGA, X.; ZENG, F. Effects of molecular structure on antitumor activities of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans from different *Lentinus edodes*. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 97–104, 2006.

Swiss Industrial Biotechnology, Swiss Biotech Association, Bern, Switzerland disponível em:

<http://www.swissbiotechassociation.ch/files/membersadd/O.Ghisalba.pdf>), acesso em 25 de janeiro de 2007.

TEMBE, S. KARVE, M. INAMDAR, S. HARAM, S. MELO, J. D'SOUZA, S.F. Development of electrochemical biosensor based on tyrosinase immobilized in composite biopolymeric film, **Anal. Biochem.** v. 349, p. 72-77, 2006.

THALMANN, C.R. LÖTZBEYER, T. Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase, **Eur. Food Res. Technol.** v. 214, p. 276-281, 2002.

TOSCANO, G.; COLARIETI, M.L.; GRECO, G. Oxidative polymerisation of phenols by a phenol oxidase from green olives, **Enzyme Microb. Technol.** v. 33, p. 47-54, 2003.

USUI, T., HOSOKAWA, S., MIZUNO, T., SUZUKI, T., & MEGURO, H. Investigation of the heterogeneity of heterogalactan from the fruitbodies of *Fomitopsis pinicola*, by employing concanavalin A–sephalose affinity chromatography. **J. Biochem.** v. 89, p. 1029–1037, 1981a.

USUI, T., IWASAKI, Y., & MIZUNO, T. Isolation and characterization of two kinds of heterogalactan from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum* by employing a column of concanavalin A–shephalose 4B. **Carbohydr. Res.** v. 92, p. 103–113, 1981b.

VIDAL, J.C.; ESTEBAN, J.; GIL, J.R.; CASTILLO, S. A comparative study of immobilization methods of a tyrosinase enzyme on electrodes and their application to the detection of dichlorvos organophosphorus insecticide, **Talanta**, v. 68, p. 791-799, 2006.

VINOGRADOV, E., PETERSEN, B.O., DUUS, J., WASSER, S. The structure of the glucuronoxylomannan produced by culinary-medicinal yellow brain mushroom (*Tremella mesenterica* Ritz.: Fr., Heterobasidiomycetes) grown as one cell biomass in submerged culture. **Carbohydr. Res.** v. 339, p. 1483–1489, 2004.

WAGNER, R. **Aspectos morfológicos e fisiológicos do crescimento de *Ganoderma lucidum* em cultivo submerso.** Curitiba, 2003.102 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

WANG, G.; XU, J.J.; YE, L.H.; ZHU, J.J.; CHEN, H.Y. Highly sensitive sensors based on the immobilization of tyrosinase in chitosan, **Bioelectrochemistry**, v.57, p. 33-38, 2002.

WANG, T. DENG, L.; LI, S.; TAN, T. Structural characterization of a water-insoluble (1→3)- α -D-glucan isolated from the *Penicillium chrysogenum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 133–137, 2007

WASSER, S.; WEIS, A. L. Therapeutic Effects of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: A Modern Perspective. **Critical Reviews in Immunology**, v. 19, p. 65-96, 1999.

WICHERS, H.J.; GERRITSEN, Y.A.M.; CHAPELON, C.G.J. Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*, **Phytochemistry**, v. 43, p. 333-337, 1996.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, WHISTLER, R. L.; WOLFRON, M. L.A. Reduction with sodium borohydride. In (eds.) **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 65-68, 1963(a).

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Ed.). **Meth. Carbohydr. Chem**, v. 2, p. 211-215, 1963(b).

YAHSI, A. SAHIN, F. DEMIREL, G. TUMTURK, H. Binary immobilization of tyrosinase by using alginate gel beads and poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels **Int. J. Biol. Macromol.** v. 36, p. 253–258, 2005.

YAMADA, K. AKIBA, Y. SHIBUYA, T. KASHIWADA, A. MATSUDA, K. HIRATA, M. Water purification through bioconversion of phenol compounds by tyrosinase and chemical adsorption by chitosan beads, **Biotechnol. Prog.** v. 21, p. 823–829, 2005.

YAROLOV, A.I. KHARYBIN, A.N. EMNÉUS, J. MARKO-VARGA, G. GORTON, L. Flow-injection analysis of phenols at a graphite electrode modified with co-immobilised lactase and tyrosinase, **Anal. Chim. Acta**, v. 308, p. 137–144, 1995.

YAMAMOTO Y, SHIRONO H, KONO K, OHASHI. Immunopotentiating Activity of the Water-soluble Lignin Rich Fraction Prepared from LEM - The extract of the Solid Culture Medium of *Lentinus edodes* Mycelia. **Bioscience Biotech. Biochem.**, v. 61(11), p. 1909–1912, 1997.

ZHANG, P.; ZHANG, L.; CHENG, S. Chemical and molecular weights of α -(1→3)-D-glucan from *Lentinus edodes*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.63 (7), p. 1197–1202, 1999.

ZHANG, L. N.; ZHANG, M.; ZHOU, Q.; ZENG, F. B. Solution properties of antitumor sulfated derivative of α -(1→3)-D-Glucan from *Ganoderma lucidum*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 64, p. 2172–2178, 2000.

ZHANG, P.; CHEUNG, P. C. K. Evaluation of sulfated *Lentinus edodes* α -(1→3)-D-glucan as a potential antitumor agent. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 66(5), p. 1052–1056, 2002a.

ZHANG, P.; ZHANG, L.; CHENG, S. Solution properties of an α -(1→3)-D-glucan from *Lentinus edodes* and its sulfated derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 155–160, 2002b.

ANEXO A

Purificação de polissacarídeos obtidos do Extrato Aquoso 2

Como relatado no item 4.3.5 dos materiais e métodos, os corpos de frutificação de *L. boryana* foram extraídos com água fervente até resultado negativo no teste de fenol sulfúrico. Este extrato foi reduzido de volume e precipitado com etanol (três volumes), o precipitado obtido foi submetido a um processo de purificação o qual inclui congelamento e degelo, precipitação com solução de Fehling, membranas de exclusão por tamanho molecular e cromatografia em coluna de troca iônica (DEAE-Sephrose), conforme representado na figura A-1.

Na tabela A-1 pode ser observado o acompanhamento das composições monossacarídicas das amostras obtidas durante o processo de purificação. As análises de RMN-¹³C (Figuras A-3, A-4, A-5 e A-6), mostraram sinais principais relacionados a C-1 em β configuração (δ 103), C-3 ligado (δ 86), C-2, C-3, C-4, C-5 em δ 73; 76; 70; 75 respectivamente, C-6 ligado (δ 69) e C-6 livre (δ 61). Estes sinais são referentes à β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana com ramificações em O-3 apresentada na seção 5.2.3. Também é possível a visualização de sinais com pequena intensidade em δ 102, referente a C-1 de terminais de manose piranosídica, e em δ 98, referente a sinais de C-1 de galactose em α configuração. Provavelmente estes sinais são referentes à heterogalactana relatada anteriormente, seção 5.2.2. Devido ao fato que os procedimentos utilizados não foram suficientes para purificar um polissacarídeo diferente aos descritos anteriormente e à pequena quantidade de amostra após estes procedimentos, decidiu-se não continuar os trabalhos com estas frações.

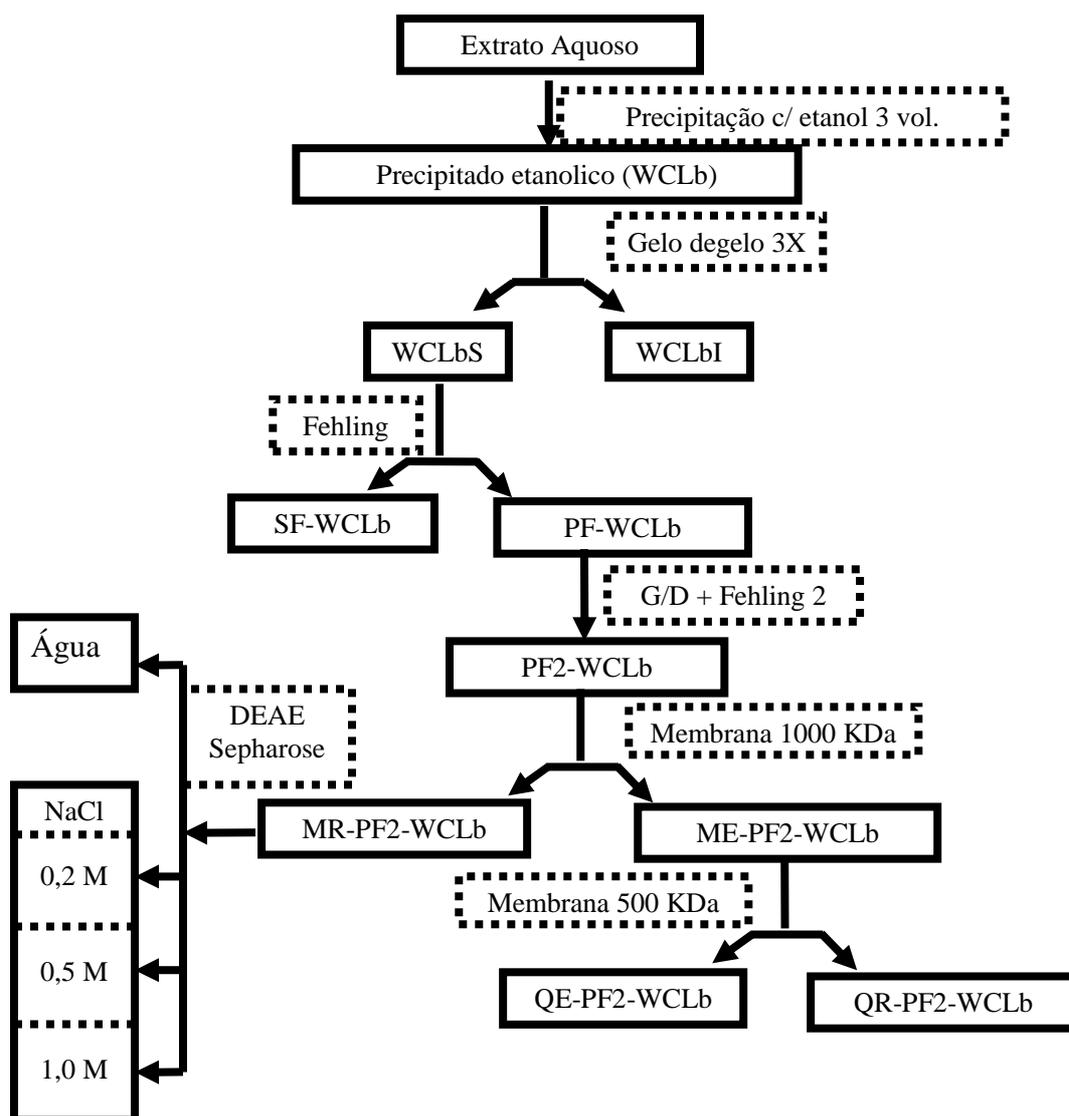


FIGURA A-1 ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO PARA POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS COM ÁGUA FERVENTE PROVENIENTES DOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE *L. boryana*

WCLb: Precipitado etanólico do extrato aquoso (6,9805 g);

WCLbS: Fração solúvel no gelo e degelo (2,050 g);

SF-WCLb: Fração não precipitada no reativo de Fehling (753 mg);

PF-WCLb: Fração precipitada no reativo de Fehling (1,2975 g)

PF2-WCLb: Fração precipitada duas vezes com reativo de Fehling (462,9 mg)

MR-PF2-WCLb: Fração retida no saco de diálise de 1000 kDa (74,3 mg)

ME-PF2-WCLb: Fração eluída no saco de diálise de 1000 kDa (305,3 mg)

QE-PF2-WCLb: Fração eluída no saco de diálise de 500 kDa (100,5 mg)

QR-PF2-WCLb: Fração retida no saco de diálise de 500 kDa (200,5)

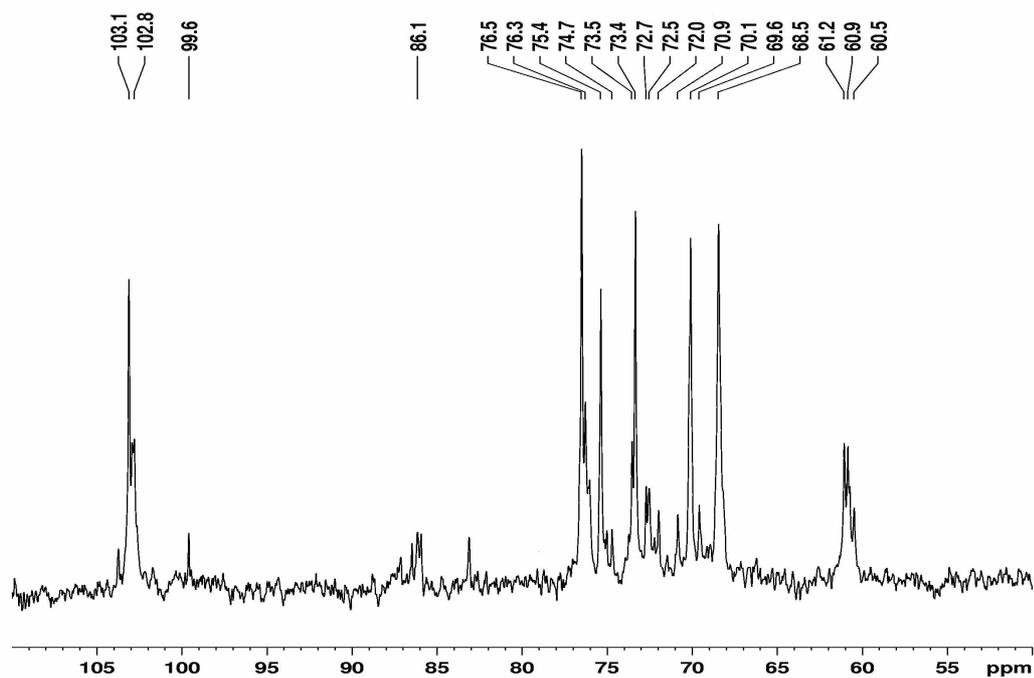
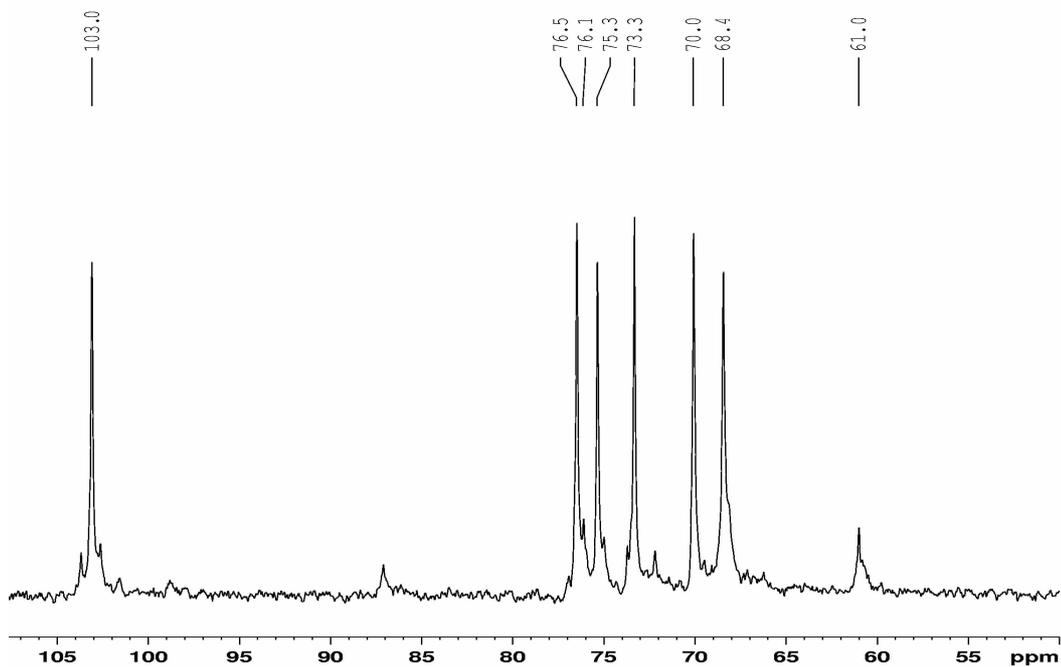
D15-MR-WCLb (8,5 mg)

D1117-MR-WCLb (11,0 mg)

D1821-MR-WCLb (7,8 mg)

TABELA A-1. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE O PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DO EXTRATO AQUOSO DE *L. boryana*

Frações	Composição monossacarídica						
	Ram	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
WCLb			1,31		4,49	3,70	90,484
WCLbS			0,44	0,35	6,17	8,96	84,07
SF-WCLb	1,16	1,27	1,123	0,68	5,70	6,64	83,55
PF-WCLb					4,98	15,16	79,85
PF2-WCLb		3,16			5,12	15,44	76,28
NPF-WCLb	0,32	1,75			3,47	8,65	85,81
MR-PF2-WCLb	0,98	3,51	0,84		8,51	27,72	58,44
ME-PF2-WCLb	2,13	5,63	0,80		10,61	14,84	65,62
QR-PF2-WCLb		2,82	0,74	0,31	4,06	12,33	79,55
D15-MR-WCLb	0,98	10,37			15,37	37,30	35,99
D1117-MR-WCLb	0,68	1,70			2,82	4,59	90,22
D1821-MR-WCLb					7,85	16,41	75,74

FIGURA A-2 ESPECTRO DE RMN-¹³C DA AMOSTRA PG-WCbFIGURA A-3 ESPECTRO DE RMN-¹³C DA AMOSTRA WCLb-PF

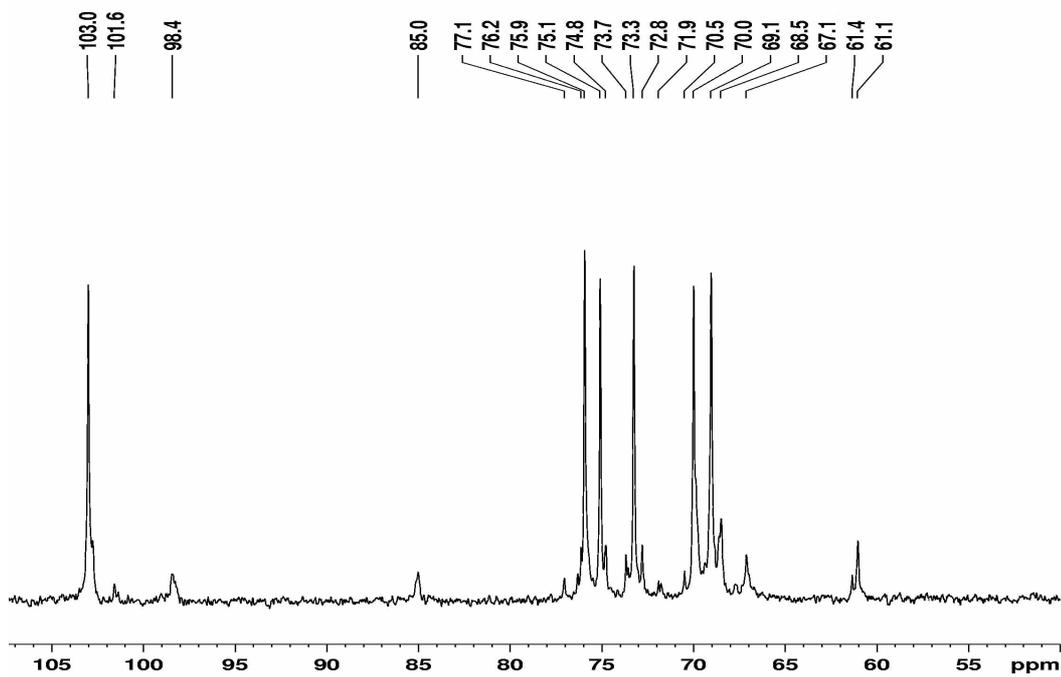


FIGURA A-4 ESPECTRO DE RMN-¹³C DA AMOSTRA PF2-WCLb

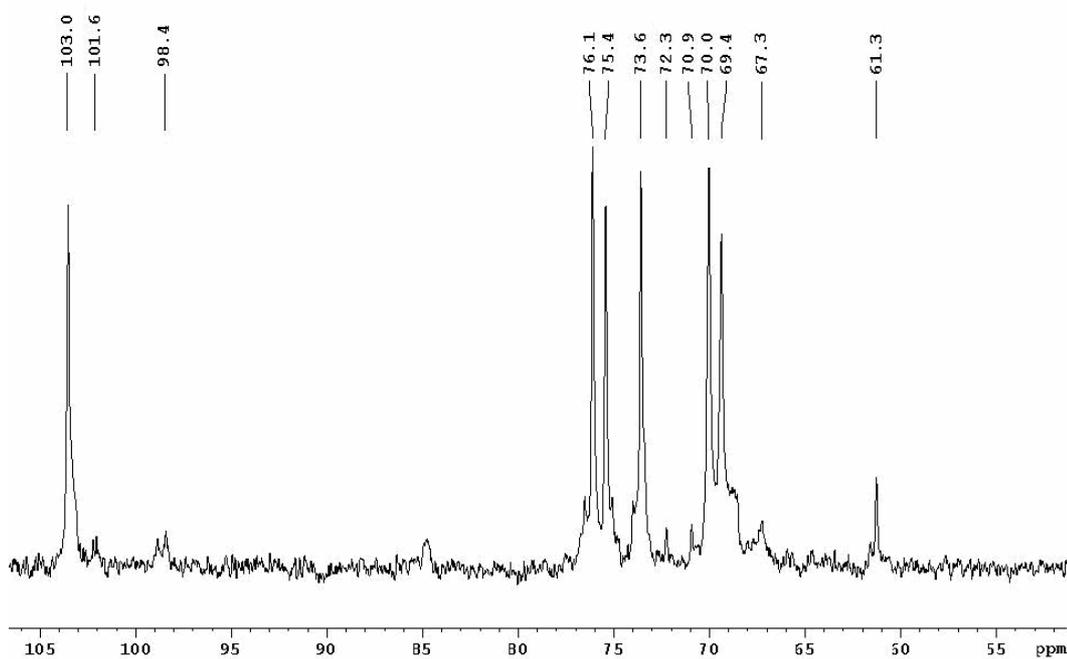


FIGURA A-5 ESPECTRO DE RMN-¹³C DA AMOSTRA MR-WCLb-PF2

ANEXO B

Reprocessamento das amostras do Extrato KOH 1% – frações precipitadas no reativo de Fehling

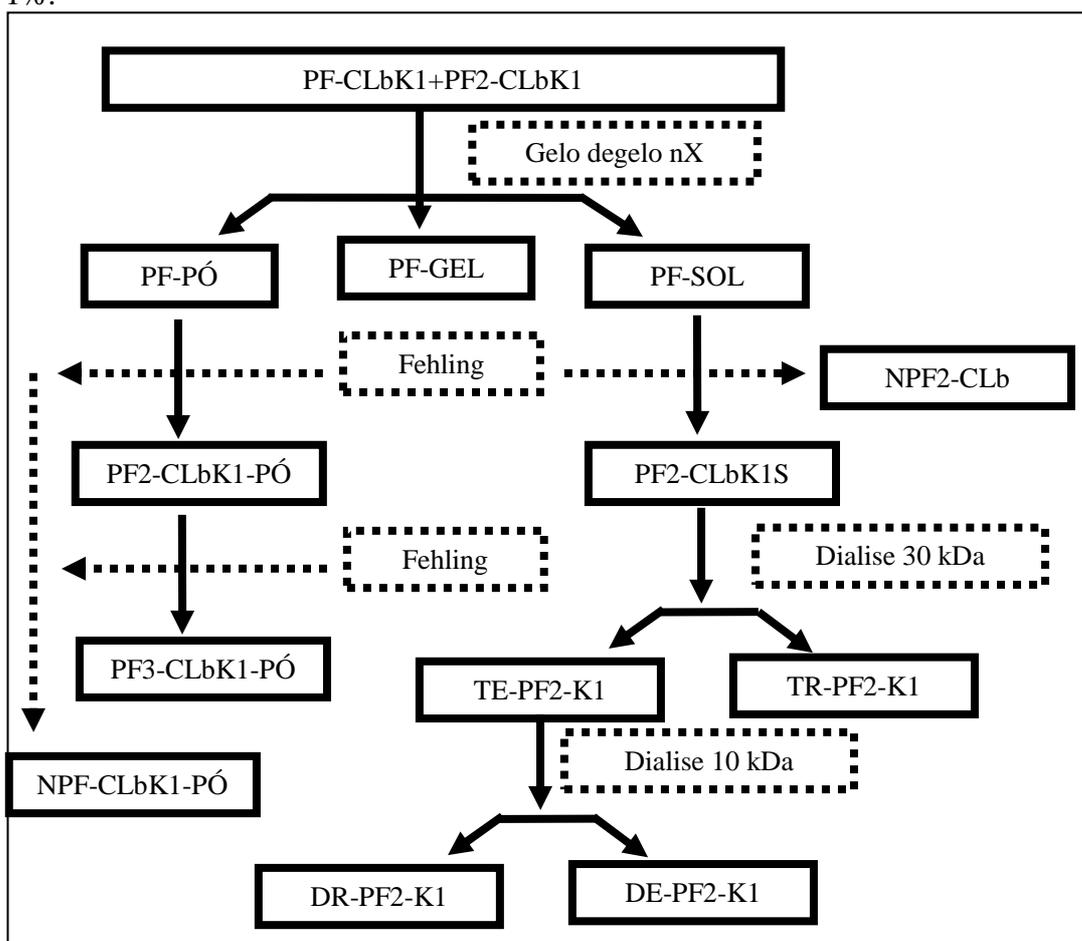
Para melhorar o grau de purificação dos polissacarídeos presentes no extrato obtido com KOH 1%, as frações precipitadas e não precipitadas com reativo de Fehling foram novamente submetidas a um exaustivo processo de gelo e degelo. Este processamento gerou amostras que ficaram solubilizadas (PF-SOL e SF-SOL), amostras que formaram um gel (PF-GEL e SF-GEL) e amostras que ficaram insolúveis na forma de um pó no fundo dos recipientes (PF-PÓ). A amostra PF-SOL foi novamente precipitada com reativo de Fehling, foi solubilizada em água e dialisada em membrana de diálise com poro de exclusão de 30 kDa. A fração eluída nesta membrana foi aplicada em uma nova membrana de 10 kDa, gerando uma fração eluída e uma retida nesta membrana. Estes procedimentos estão resumidos na figura B-1.

O acompanhamento do processo de purificação foi feito por análises da composição monossacarídica das amostras PF2-CLbK1, TE-PF2-K1 e DR-PF2-K1, (tabela B-1), onde pode ser observado que, com a passagem por membranas seletivas, ocorreu um aumento da proporção de glucose passando de aproximadamente 95 % para 98 % para as amostras PF2-CLK1 e DR-PF2-K1 respectivamente. Com as análises de HPSEC-MALLS, pode ser observado uma melhora significativa da homogeneidade das amostras (Figura B-2) e que a amostra DR-PF2-K1 apresenta homogênea. Também as análises de RMN-¹³C e HMQC mostram melhora da purificação da amostra durante o processamento (figuras B-3, B-4, B-5 e B-6). Estas análises, juntamente com a metilação da amostra DR-PF3-K1, demonstram a presença de uma β -(1→6)-D-glucana com ramificações em O-3, a qual foi descrita mais em detalhe na seção 5.2.3 da tese.

A amostra PF-PÓ foi submetida a mais dois processos de precipitação com reativo de Fehling, gerando frações solúveis e precipitadas. Como as frações obtidas não eram solúveis em água, os procedimentos da purificação não puderam ser acompanhados por HPSEC-MALLS, apenas por composição monossacarídica e

RMN-¹³C. Apesar das amostras não serem solúveis em água, as análises de RMN-¹³C e metilação mostraram que este polissacarídeo era a mesma β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana encontrada anteriormente, item 5.2.3.

FIGURA B-1. ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS PROVENIENTES DE FRAÇÕES PRECIPITADAS EM FEHLING DO EXTRATO KOH 1%.



- PF-CLbK1: Fração precipitada no reativo de Fehling (5,29 g)
 PF2-CLbK1: Fração precipitada duas vezes com reativo de Fehling
 PF-SOL: Fração reprocessada solúvel no processo de gelo e degelo (1,04 g)
 PF2-CLbK1S: Fração reprocessada precipitada duas vezes com Fehling (495 mg)
 TE-PF2-K1: Fração reprocessada eluída no saco de diálise de 30 kDa (412 mg)
 TR-PF2-K1: Fração reprocessada retida no saco de diálise de 30 kDa (44 mg)
 DE-PF2-K1: Fração reprocessada eluída no saco de diálise de 10 kDa
 DR-PF2-K1: Fração reprocessada retida no saco de diálise de 10 kDa (216 mg)
 PF-PÓ: Fração reprocessada precipitada na forma de pó no processo de gelo e degelo
 PF2-PÓ: Fração reprocessada de precipitada no reativo de Fehling
 PF3-PÓ: Fração reprocessada de precipitada duas vezes no reativo de Fehling (1,985 g)

TABELA B-1. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE O REPROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PRECIPITADAS EM FEHLING DO EXTRATO KOH 1%

Composição monossacarídica							
Frações	Ram	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
PF2-CLbK1	1	0,5	1,1	0,5	1	1,5	94,5
TE-PF2-K1	tc	tc	0,5	0,5	2	6,1	90
DR-PF2-K1		tc			tc	1	98,5

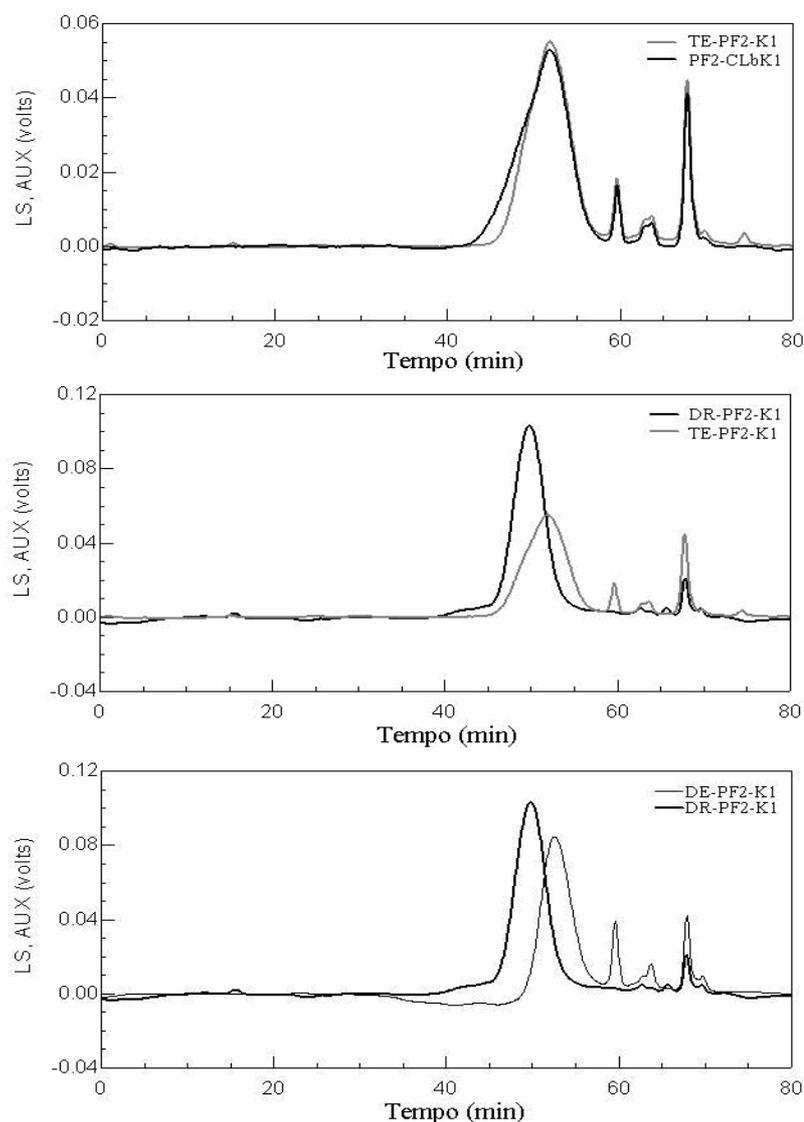
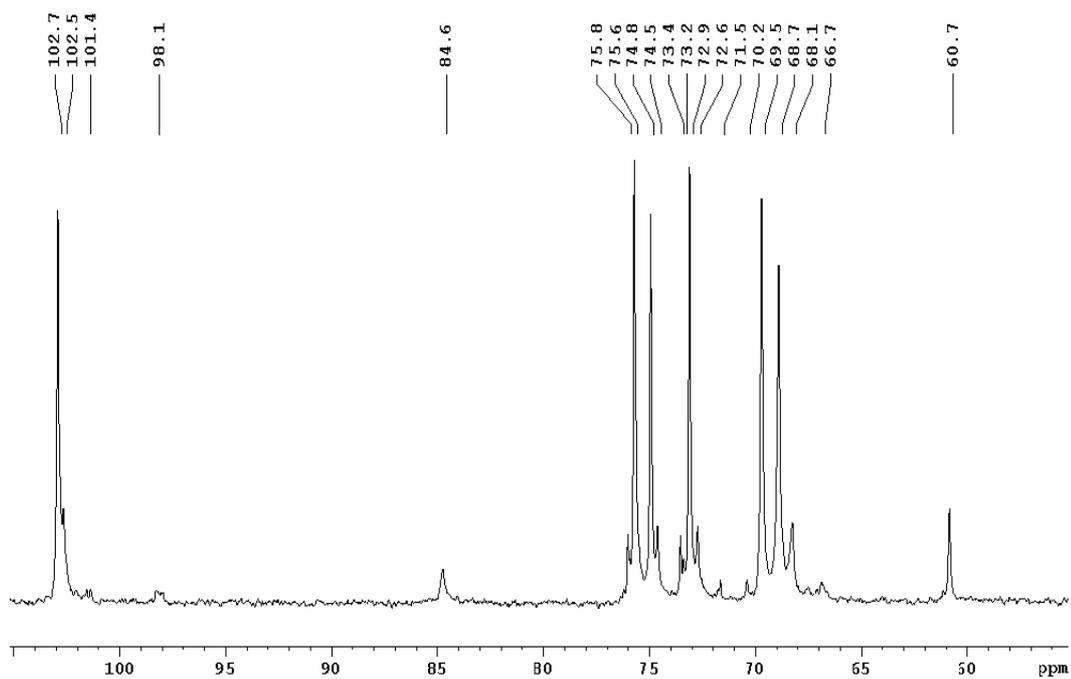
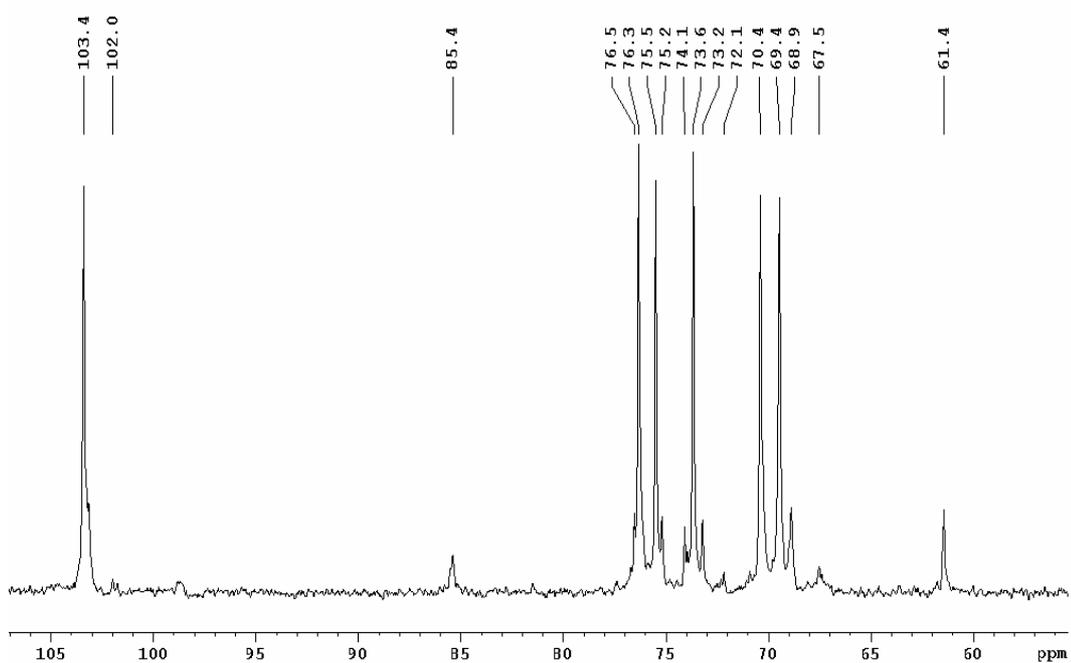


FIGURA B-2. ANÁLISE COMPARATIVA DE HOMOGENEIDADE POR HPSEC-MALLS DAS AMOSTRAS PF2-CLbK1, TE-PF2-K1, DE-PF2-K1 E DR-PF2-K1.

FIGURA B-3. RMN- ^{13}C DA AMOSTRA PF2-CLbK1 DISSOLVIDA EM D_2O FIGURA B-4. RMN- ^{13}C DA AMOSTRA TE-PF2-CLbK1 DISSOLVIDA EM D_2O

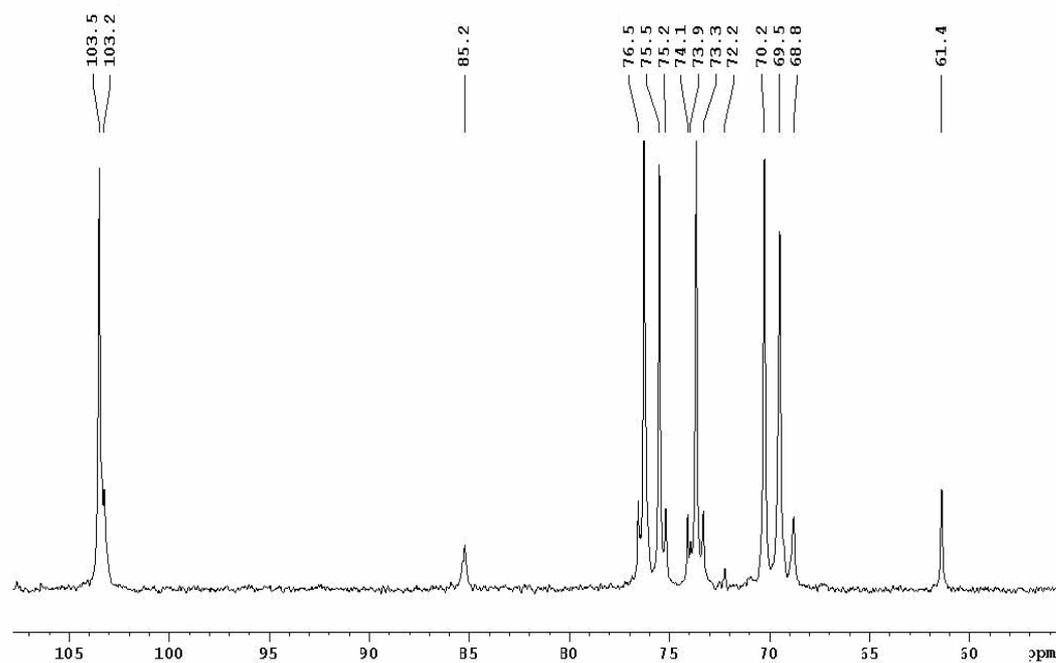


FIGURA B-5. RMN- ^{13}C DA AMOSTRA DR-PF2-CLbK1 DISSOLVIDA EM D_2O

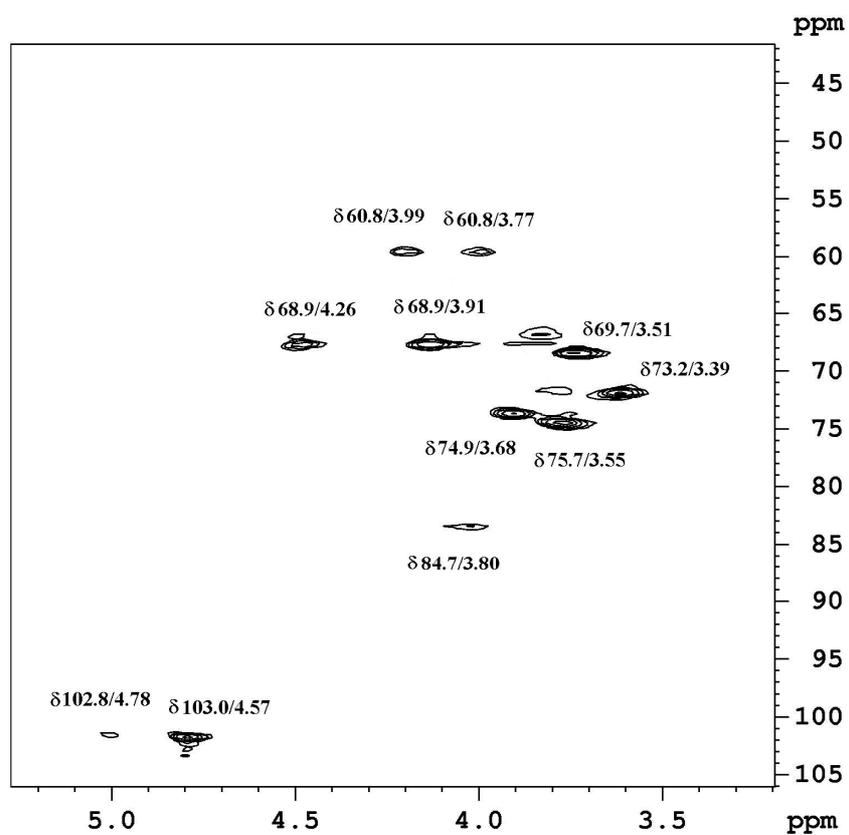


FIGURA B-6. HMQC DA AMOSTRA DR-PF2-CLbK1 VALORES DE δ C/H

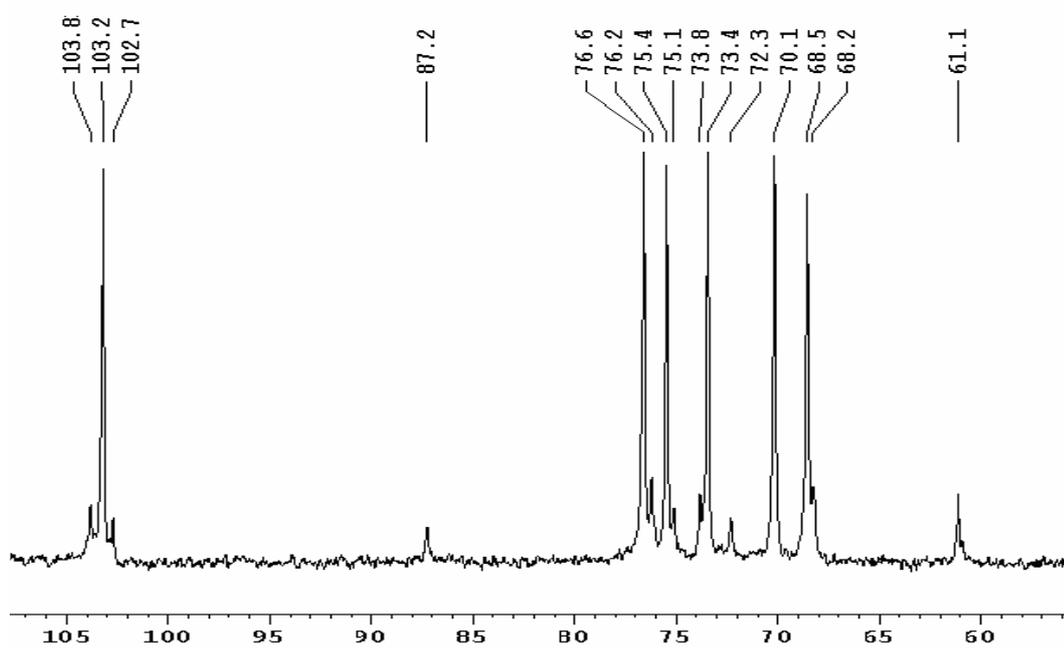


FIGURA B-7. RMN- ^{13}C DA AMOSTRA PF3-CLBK1-PÓ DISSOLVIDA EM DMSO- D_6

The Biotechnological Potential of Mushroom Tyrosinases

Rodrigo Otávio de Faria¹, Vivian Rotuno Moure¹, Maria Angela Lopes de Almeida Amazonas², Nadia Krieger³ and David Alexander Mitchell^{1*}

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Cx. P. 19046, Centro Politécnico, Curitiba 81531-990, Paraná, Brazil

²Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Florestas, Cx. P. 319, Colombo 83411-000, Paraná, Brazil

³Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Cx. P. 19081, Centro Politécnico, Curitiba 81531-990, Paraná, Brazil

Received: May 15, 2007

Revised version: June 15, 2007

Accepted: June 22, 2007

Summary

Over the last decade there has been a significant interest in developing biotechnological applications of tyrosinases. These applications include the production of L-DOPA (3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine) from L-tyrosine, the production of cross-linked protein networks for use as novel food additives and the detection of phenolic compounds in wastewater or their removal from it. Much of the research into these applications has involved mushroom tyrosinases. We review the potential biotechnological applications of mushroom tyrosinases and evaluate the state of knowledge about their production, recovery and immobilization. We conclude that much more research is necessary in these areas if mushroom tyrosinases are to fulfill their biotechnological potential.

Key words: mushroom tyrosinase, *Agaricus bisporus*, biosensors, cross-linked biopolymers, phenol removal, submerged culture

Introduction

Tyrosinase (EC 1.14.18.1; tyrosine, L-DOPA: oxygen oxidoreductase; catecholase; diphenol oxidase; polyphenol oxidase – PPO) is a copper-containing enzyme that catalyzes sequential oxidation steps with various phenolic substrates. In the first reaction, often referred to as the »monooxygenase« or »cresolase« activity, a hydroxyl group is introduced into the *ortho* position of the aromatic ring while in the second reaction, often referred to as the »diphenolase« or »catecholase« activity, the *o*-dihydroxy compound produced in the first reaction is oxidized to an *o*-quinone. Both reactions involve molecular oxygen (1). These activities can be used as the basis for several biotechnological applications (2).

Although tyrosinases are widely distributed in microorganisms, plants and animals, much of the current interest in the development of biotechnological applications has focused on the use of mushroom tyrosinases. Several aspects of mushroom tyrosinases have been extensively reviewed, such as their biochemical characteristics, their roles in the metabolism of the producing organism and some of their potential biotechnological applications (3). However, relatively little attention has been given to the production and purification of mushroom tyrosinases and a realistic appraisal of their biotechnological potential. This review addresses these issues.

*Corresponding author; Phone: ++55 41 3361 1658; Fax: ++55 41 3266 2042; E-mail: davidmitchell@ufpr.br

Biochemical Characteristics of Mushroom Tyrosinases

In this section we give a brief overview of the biochemical characteristics of the most studied macrofungal tyrosinase, namely that produced by *Agaricus bisporus*, although characteristics of other fungal tyrosinases are mentioned as appropriate.

As with other macrofungal tyrosinases, the tyrosinase of *A. bisporus* is intracellular (4,5). It is a heterotetramer with an apparent molecular mass of 120 kDa with two heavy and two light polypeptide chains (3,6). Note that tyrosinases from other fungi have different quaternary structures: the tyrosinase from the macrofungus *Amanita muscaria* is a heterodimer with a molecular mass of about 50 kDa (7), while that of the filamentous fungus *Neurospora crassa* is a 46-kDa monomer (8).

The active site of the tyrosinase of *Agaricus bisporus* contains two Cu binding sites, Cu_A and Cu_B, which interact with molecular oxygen and histidine residues (3). Depending on the copper-ion valence and the linking with molecular oxygen, this active site exists in three intermediate states: deoxy (CuI–CuI), oxy (CuII–O₂–CuII) and met (CuII–CuII) (9). These three states determine the ability of tyrosinase to bind to its substrates and therefore determine the reaction kinetics. The met form of the enzyme is predominant *in vivo* (10). This form can bind diphenols and, during the subsequent reaction in which it oxidizes the diphenol and releases the *o*-quinone, is converted into the deoxy-form. The deoxy-form is able to bind reversibly with molecular oxygen, producing the oxy-form, which can act on both monophenols and diphenols (9,11).

With respect to the reaction kinetics, the second reaction typically follows Michaelis-Menten kinetics, while analysis of the first reaction is complicated by the lag period during which the enzyme is converted from the met to the oxy form (9). The first reaction step may suffer substrate inhibition by L-tyrosine, the monophenol most commonly used to characterize its kinetics (12), while substrate inhibition of the second reaction by L-DOPA (3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine) has also been reported (13).

Applications of Mushroom Tyrosinases

Initial studies of tyrosinases were motivated by a desire to understand and to prevent the enzymatic brown-

ing that occurs in the presence of air when mushrooms, fruits or vegetables are cut or bruised. This phenomenon is intimately linked to the action of tyrosinase and causes severe economic losses in the food industry. Recently the focus has moved to the biotechnological and environmental applications of tyrosinases, and macrofungal tyrosinases have commonly been chosen for these studies. The most important of the applications being investigated are the biosynthesis of L-DOPA, the detection and quantification of phenolic compounds in water samples, the removal of phenolic compounds from wastewaters and the production of cross-linked protein networks.

Use of mushroom tyrosinases for L-DOPA production

Since 1967, L-DOPA has been the preferred drug for treatment of Parkinson's disease (14). It is also used for controlling the myocardium following neurogenic injury (15). The world market for L-DOPA is about 250 tons per year (16). Most of the L-DOPA sold commercially is produced from vanillin and hydantoin by a chemical process that involves eight reaction steps, one of which is an optical resolution (17).

Several investigators have studied biological routes for production of L-DOPA. For example, systems involving whole cells of *Escherichia coli* (18), *Erwinia herbicola* (16) or *Aspergillus oryzae* (5,15) have been used to transform L-tyrosine into L-DOPA in the laboratory. However, the specific activities in these processes are low and both the initial substrate (L-tyrosine) and the desired product (L-DOPA) suffer side reactions that produce other metabolites (15).

The poor performance of whole-cell systems stimulated researchers to use tyrosinases in cell-free systems. So far all studies have involved mushroom tyrosinase obtained from Sigma. The productivities of L-DOPA that have been obtained in batch reactors using immobilized tyrosinase range from 1.44 to 54 mg/(L·h) (Table 1) (19–23). Unfortunately, these productivities are still relatively low, which is due to two factors. Firstly, the conversion of the added L-tyrosine is incomplete, with less than 30 % of it being consumed during the process. Secondly, although side reactions with L-tyrosine are avoided in these enzymatic systems, some of the L-DOPA that is produced is lost in a second tyrosinase-catalyzed reaction that produces dopaquinone (Fig. 1). This dopaquinone isomerizes spontaneously to leukodopachrome, which in turn reacts with a second dopaquinone mole-

Table 1. Productivities obtained for L-DOPA production using immobilized mushroom tyrosinase

Immobilization method	Productivity/(mg/(L·h))	Source
Adsorption on nylon 6,6	33 (using a single 7-h batch experiment)	(19)
Entrapment in copper-alginate gels	4.5 (in batch reactor) 110 (in packed bed reactor when air was used)	(20)
Adsorption on sodium aluminosilicate and calcium aluminosilicate (two separate forms of zeolite)	34 (using a single 7-h batch)	(21)
Adsorption on polystyrene-polyamino styrene (PSNH) and polymethylchloride styrene (PSCL)	1.4 for the PSNH and 2.33 for the PSCL at 30 °C 3.9 for the PSNH at 60 °C 5.5 for the PSCL at 70 °C (using a batch reactor)	(22)
Adsorption on chitosan-based support	54 (on chitosan flakes using glutaraldehyde as crosslinking agent and using a batch reactor)	(23)

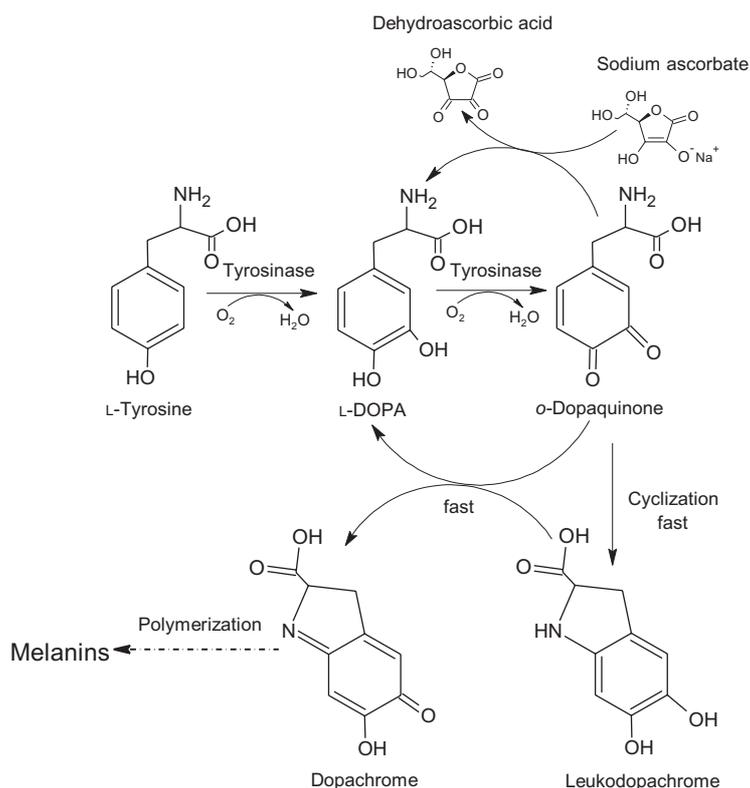


Fig. 1. Mechanism by which tyrosinase converts L-tyrosine firstly to L-DOPA and then to *o*-dopaquinone. Also shown are the spontaneous chemical reactions that lead to conversion of the *o*-dopaquinone into dopachrome and melanins and to the regeneration of L-DOPA from *o*-dopaquinone if L-ascorbate is added to the reaction mixture

cule, regenerating one molecule of L-DOPA but also producing a dopachrome molecule, which then polymerizes spontaneously to produce melanin. L-ascorbate is added to the reaction medium in an attempt to minimize melanin production. It acts by reducing dopaquinone back to L-DOPA, in a non-enzymatic reaction (Fig. 1). However, since high concentrations of L-ascorbate not only inhibit the cresolase activity responsible for L-DOPA synthesis but also irreversibly inactivate the tyrosinase, the L-ascorbate is added in the same concentration as L-tyrosine (19). The problem is that the L-ascorbate is consumed continuously during the process. Although it could be continuously fed into the medium in order to maintain its concentration constant, the problem would not be solved because the continued accumulation of diphenols would activate the melanin formation pathway anyway (24).

Amongst the results shown in Table 1, those of Ates *et al.* (20) deserve special mention. They used tyrosinase immobilized in Cu-alginate gels in continuous and batch systems. In a continuous packed-bed, they obtained a productivity of 110 mg/(L·h) when air was bubbled through the bed, this productivity being 22-fold greater than that in a batch reactor through which air was not bubbled (20). The product of two effects explains the much greater productivity in the aerated packed-bed. Firstly, the ratio of immobilized enzyme preparation to reaction medium was 9.7 g to 2.4 mL in the packed bed and 2.4 g to 50 mL in the batch reactor (*i.e.* it was about 80 times higher in the packed bed), while the residence time was approximately 15 times shorter in the packed bed. This combination of higher enzyme concentration but shorter

residence time would be expected to give an approximately 5-fold higher productivity in the packed bed. Secondly, the bubbling of air was important, since the packed-bed had a 5-fold greater productivity when it was aerated compared to when it was not. The increase in reaction rate with aeration occurs because molecular oxygen is a substrate in the reaction.

Despite the progress in tyrosinase-based production of L-DOPA, this process will probably never be commercialized, since an enzymatic process involving another enzyme, tyrosine phenol-lyase (TPL), appears to have better potential. TPL transforms a mixture of pyruvate, ammonia and catechol into L-DOPA in a different reaction. It has the advantage that it does not have a diphenolase activity and so does not react with the L-DOPA that it produces. Ajinomoto Co. recently implanted a cell-free process that uses the TPL from *Erwinia herbicola* and results in an L-DOPA concentration of 110 g/L after 36 h (25).

Detection and quantification of phenolic compounds

Wastewaters containing phenols and phenolic derivatives are generated by the textile, coal, chemical, petrochemical, mining and paper industries, amongst others (18,26,27). Increasingly strict environmental laws are providing an impetus for the development of analytical techniques for fast monitoring of these compounds. Traditionally, analysis has been based on spectrophotometric or chromatographic methods. New techniques that are currently being developed include capillary electrophoresis, immunoassays, and biosensors. They potentially pro-

vide better specificity, lower costs, and faster and simpler sample processing (26).

Biosensors are currently being developed for the detection of phenolic compounds, based on the reaction of these compounds with an immobilized mushroom tyrosinase. Immobilization is essential because it ensures intimate contact between the enzyme and the underlying signal detector and also prevents the enzyme from being washed off the electrode when readings are made in aqueous samples (28). The detection and quantification of the reaction within the biosensor can be based on various different principles, such as detection of oxygen consumption (29), direct reduction of liberated *o*-quinone (30–34) or reduction of the *o*-quinone using a redox mediator such as hexacyanoferrate (35).

Despite the intensive research into biosensors based on mushroom tyrosinase, a major obstacle to commercialization of these biosensors is the relatively poor stability that the immobilized tyrosinase has under operational and storage conditions. The instability of tyrosinase biosensors is mainly due to the fact that quinones can form intermediate radicals in both the enzymatic and electrochemical reactions and these radicals readily react and polymerize to produce aromatic compounds that can inactivate the enzyme and foul the electrode (36).

Another challenge is to ensure that the analyses are cost-competitive and suitable for processing large numbers of samples. Probably the main advantage of tyrosinase-based biosensors would be the possibility to determine the levels of phenolic compounds *in situ*, allowing on-the-spot checks.

Removal of phenolic compounds and bioremediation

The presence of phenolic compounds in drinking and irrigation water or in cultivated land represents a significant health and environmental hazard. In recent years, methods for the removal and transformation of phenolic compounds have received attention. Numerous conventional methods have been used to remove phenols from industrial wastewaters, these methods being based on chemical or physical principles such as solvent extraction, chemical oxidation and adsorption onto activated carbon (37). However, these methods typically involve high capital and operating costs and do not remove the phenol completely (38). Further, they can generate secondary effluent problems. For example, the chlorinated phenols that are produced by chemical processes can be more toxic than the original compounds (39). Some chemical and physical methods, such as oxidation and adsorption, work cost-effectively only in waters with high phenol concentrations (40,41).

Due to the disadvantages of physical and chemical methods, microbial and enzymatic methods have been investigated (27). Enzymatic processes have several potential advantages over conventional biological treatments. Firstly, they do not need an acclimatization period. Secondly, they suffer less from charge shocks and toxic compounds than microorganisms do. Finally, they are highly specific and do not generate undesired side products (42).

Enzymatic methods are based on oxidative enzymes such as peroxidases and phenoloxidases (43). Peroxida-

ses require hydrogen peroxide as a co-substrate, which complicates the process and increases costs (44). They are used commercially, but the costs of these processes are high (44,45). Phenoloxidases include laccases and tyrosinases. These have the advantage that they can react with molecular oxygen without the need for externally-supplied co-substrates, which leads to lower costs. Further, when tyrosinases oxidize phenols and other aromatic compounds in wastewaters, typically the oxidized product will polymerize to insoluble compounds that can be removed by filtration or precipitation (27).

Due to these features, tyrosinases have been studied for phenol removal from wastewaters. Several studies have involved mushroom tyrosinases. For example, Edwards *et al.* (46) immobilized commercial mushroom tyrosinase on chitosan-coated polysulphone capillary membranes within a capillary bioreactor and used this system to oxidize a range of phenols present in synthetic and industrial effluents. The removal was efficient even at low phenol concentrations, which typically cause problems for physical and chemical methods. Further, the chitosan adsorbed *o*-quinones generated during the reaction, thereby helping to reduce enzyme inactivation. In another example, Ensuncho *et al.* (44) used *Agaricus bisporus* tyrosinase, immobilized on a chitosan-alginate support, in both bench-scale and pilot-scale bioreactors in which air was bubbled through the system. More than 92 % of the phenol was removed in the bench-scale reactor and 60 % in the pilot-scale reactor.

Production of cross-linked biopolymers

The food industry has an interest in developing new biopolymers with special properties, for use not only as emulsifying and thickening agents, but also in low-calorie and low-fat foods. The cross-linking of natural polymers by mushroom tyrosinase has the potential to produce such new biopolymers.

Tyrosinase forms *o*-quinones from tyrosine and these *o*-quinones cross-link proteins by reacting with their amino and sulfhydryl groups (47). Halaoui *et al.* (48) used this capability to form a cross-linked protein network from casein using the tyrosinase from *Pycnoporus sanguineus*. Caffeic acid was supplied as an external phenolic source that was oxidized by the tyrosinase, with the *o*-quinone product then acting as the cross-linker in the production of protein-protein conjugates made with lysozyme, α -lactalbumin and β -lactoglobulin (49). Anghileri *et al.* (50) used tyrosinase to produce conjugates from sericin, a peptide found in the wastewater of silk textile industries.

In addition, a polysaccharide-protein biopolymer was obtained from gelatin and chitosan by tyrosinase cross-linking (51). In this process, the tyrosinase oxidized tyrosine residues of the gelatin, which then reacted with the available amino groups of the chitosan. The gelatin-chitosan gels formed had chemical and physical properties that were different from those of gelatin gels.

Production, Purification and Immobilization of Mushroom Tyrosinases

Although it is unlikely that a commercial process will be established for the tyrosinase-based production of L-DOPA, other applications of tyrosinase that are currently under study do have the potential to create a large demand for the enzyme. Mushroom tyrosinases would seem to be natural candidates for the establishment of commercial processes, based on the fact that many of the laboratory studies have involved enzymes from this group of organisms. The current section briefly outlines the current state of the art in relation to production and purification of mushroom tyrosinases.

Traditional methods for obtaining mushroom tyrosinase

To date many researchers have either bought tyrosinase from commercial sources or extracted the enzyme themselves from fruiting bodies. The enzyme sold by Sigma Co. is mainly extracted from *Agaricus bisporus* and purified as described by Kertesz and Zito (52). Those researchers who extract tyrosinase from the fruiting body typically buy mushrooms at local markets. In this case it is important to select fruiting bodies that are young, white and fresh (52).

Production of tyrosinase in culture

If the applications of mushroom tyrosinases currently being studied become so successful that large amounts of enzyme are required, then it will be necessary to optimize tyrosinase production in mycelial culture, either by submerged culture or by solid-state fermentation. Such studies have not yet been done, although several tyrosinase-producing basidiomycetes have been cultured in bioreactors for the production of other products, providing experience that will be useful if a decision is made to develop a process using one of these macrofungi.

Qualitative results from agar plate cultures of basidiomycetes may give insights into the conditions necessary to stimulate tyrosinase production in submerged culture. For example, tyrosinase is involved in the production of DOPA-melanins, and the production of these melanins in agar plate cultures may be stimulated by incubation above the optimal growth temperature or by the presence of competing microorganisms (53,54). These results suggest that, depending on the producing organism, it might be appropriate either to start the culture at the optimal temperature for growth and later increase the incubation temperature to stimulate tyrosinase production or to add extracts of antagonistic organisms to the culture broth. However, such strategies have not yet been tested in liquid cultures.

The only reported study of tyrosinase production by submerged culture of a basidiomycete was undertaken by Halaoui *et al.* (48), who produced intracellular tyrosinases from various strains of *Pycnoporus cinnabarinus* and *Pycnoporus sanguineus*, grown in Erlenmeyer flasks in a liquid medium containing maltose, yeast extract, salts and vitamins. *P. sanguineus* CBS 614.73 was identified as the best tyrosinase producer, reaching monophenolase and diphenolase productivities, based on the protein in the

crude extract, of 45 and 164 U/(g·day), respectively. The highest tyrosinase activity was reached after one week, when maltose was totally consumed.

Although there have been no studies aiming to optimize the production of tyrosinase in mycelial cultures of basidiomycetes, a heterologous expression strategy has been tried. Halalouli *et al.* (55) noted that their strain of *P. sanguineus* BRFM49 produced an intracellular tyrosinase at relatively low levels. They cloned the gene for this tyrosinase into *Aspergillus niger*, with the presequence of the glucoamylase from *A. niger* being used to target secretion. Their recombinant *A. niger* was able to produce monophenolase and diphenolase activities in the culture broth of 534 and 1.67 U/L, respectively. This strategy of heterologous expression offers promise for obtaining high levels of mushroom tyrosinases and the secretion of the enzyme into the culture medium facilitates recovery and purification. Work with a microfungus shows the potential of this approach: Selinheimo *et al.* (56) used the *cbh1* promoter for the homologous superexpression of the *Trichoderma reesei* *tyr2* gene, obtaining tyrosinase concentrations of up to 1.0 g/L in the culture medium.

Extraction and purification

When tyrosinase is produced in the fruiting body or by fermentation, it is necessary to recuperate and purify it. In the case of the fruiting body, frozen mushrooms are homogenized in a blender and then passed through a French press (57,58). Acetone or ammonium sulfate is added to precipitate the enzyme and other proteins (7, 52,57,58). The resuspended precipitate is passed through one or more chromatography columns for further purification. The most commonly used columns contain hydroxylapatite (57), DEAE-cellulose (59,60) or DEAE Sepharose (48), although various other packings have been used, including an immunoaffinity resin (61) and a Sephadex size exclusion gel (7,62). SDS-PAGE is used to monitor efficiency during the purification steps (7,63). A comparative study has not been undertaken, so it is not possible to define an efficient standardized purification protocol.

Immobilization

Most applications of tyrosinase typically require immobilization, to enable the enzyme to be used repeatedly. It is desirable for the immobilized preparation to have a high stability against chemical denaturants, pH change and high temperature.

The highest productivities in batch processes for L-DOPA production were obtained when the tyrosinase was immobilized by adsorption on various forms of zeolite. Not only do these supports possess a high surface area, but also they are excellent free radical scavengers that enhance tyrosinase stability (21). In the case of phenol biosensors and wastewater treatment processes, the enzyme has been immobilized on various supports: an Al₂O₃ sol-gel membrane overlaid on a glassy carbon electrode (64), a glassy carbon electrode modified with electrodeposited gold nanoparticles (65), a carbon-paste electrode (30,36,66), a graphite electrode (31,67), chitosan (68), a glassy carbon electrode with its surface modified by

electropolymerization of a mixture of enzyme and amphiphilic pyrrolylalkylammonium tetrafluoroborate monomers (69), carbon-paste composites (70), and a carbon paste electrode with a poly(vinyl alcohol) film on its surface (71). However, some of these immobilization methods are rather complicated and do not give good enzyme stability or retention (72). Immobilization of tyrosinase on solid graphite electrodes leads to the most sensitive electrodes, capable of detecting micromolar concentrations of phenol and catechol (3). These electrodes combine high versatility with low cost, the surfaces are easily renewed and the noise and background currents are low (32,71).

In order to be able to select an adequate immobilization method for a particular application, it would be necessary to have a broad database about the performance of different immobilized tyrosinase preparations in different applications. Although the work cited above does represent the initial steps in this direction, our current knowledge is not sufficient to allow us to reach this ideal.

Conclusions

Although the use of tyrosinases to produce L-DOPA will probably not compete with the enzymatic process based on tyrosine phenol-lyase, other applications, such as the detection and removal of phenols and the production of cross-linked protein networks, will probably lead to increased demands for tyrosinase. In order to satisfy these demands, it will be necessary to develop processes for the production of tyrosinases by submerged culture. Given that many of the studies that have aimed to develop applications have been undertaken with mushroom tyrosinases, it would not be surprising if mushrooms were chosen for such production processes. Unfortunately, our current state of knowledge about the production by submerged culture and the recuperation, purification and immobilization of mushroom tyrosinases is limited. Also, although the heterologous expression approach could work well, it has not been widely investigated for tyrosinase production. Much more research and development work will be required before successful large-scale production processes can be established.

Acknowledgements

Rodrigo Faria, Vivian Moure, Nadia Krieger and David Mitchell thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for research scholarships. The authors thank the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) for financial support.

References

1. K. Haghbeen, E.W. Tan, Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates, *Anal. Biochem.* 312 (2003) 23–32.
2. S. Halaoui, M. Asther, J.C. Sigoillot, M. Hamdi, A. Lomascolo, Fungal tyrosinases: New prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications, *J. Appl. Microbiol.* 100 (2006) 219–232.
3. S.Y. Seo, V.K. Sharma, N. Sharma, Mushroom tyrosinase: Recent prospects, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 2837–2853.
4. C. Soler-Rivas, S. Jolivet, N. Arpin, J.M. Olivier, H.J. Withers, Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*, *FEMS Microbiol. Rev.* 23 (1999) 591–614.
5. I.U. Haq, S. Ali, Mutation of *Aspergillus oryzae* for improved production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) from L-tyrosine, *Braz. J. Microbiol.* 37 (2006) 78–86.
6. K.G. Strothkamp, R.L. Jolley, H.S. Mason, Quaternary structure of mushroom tyrosinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70 (1976) 519–524.
7. L.A. Muller, U. Rinz, J.P. Zrýd, Characterization of a tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis, *Phytochemistry*, 42 (1996) 1511–1515.
8. U. Kupper, D.M. Niedermann, G. Travaglini, K. Lerch, Isolation and characterization of the tyrosinase gene from *Neurospora crassa*, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 17250–17258.
9. A. Sánchez-Ferrer, J.N. Rodríguez-López, F. García-Cánovas, F. García-Carmona, Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism, *Biochim. Biophys. Acta*, 1247 (1995) 1–11.
10. R.L. Jolley, L.H. Evans, N. Makino, H.S. Mason, Oxytyrosinase, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 335–345.
11. L.G. Fenoll, M.J. Peñalver, J.N. Rodríguez-López, R. Varón, F. García-Cánovas, J. Tudela, Tyrosinase kinetics: Discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 235–246.
12. J.N. Rodríguez-López, J. Tudela, R. Varón, F. García-Carmona, F. García-Cánovas, Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 3801–3810.
13. R.O. Faria, V.R. Moure, W. Balmant, M.A.L. Amazonas, N. Krieger, D.A. Mitchell, The tyrosinase produced by *Lentinula boryana* (Berk. & Mont.) Pegler suffers substrate inhibition by L-DOPA, *Food Technol. Biotechnol.* 45 (2007) 334–340.
14. D.J. Gelb, E. Oliver, S. Gilman, Diagnostic criteria for Parkinson disease, *Arch. Neurol.* 56 (1999) 33–39.
15. I.U. Haq, S. Ali, M.A. Qadeer, Biosynthesis of L-DOPA by *Aspergillus oryzae*, *Bioresour. Technol.* 85 (2002) 25–29.
16. T. Koyanagi, T. Katayama, H. Suzuki, H. Nakazawa, K. Yokozeki, H. Kumagai, Effective production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR, *J. Biotechnol.* 115 (2005) 303–306.
17. D.F. Reinhold, T. Utne, N.L. Abramson, Process for L-dopa. *United States patent 4716246* (1987).
18. S.G. Lee, H.S. Ro, S.P. Hong, E.H. Kim, M.H. Sung, Production of L-DOPA by thermostable tyrosine phenol-lyase of a thermophilic *Symbiobacterium* species overexpressed in recombinant *Escherichia coli*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 6 (1996) 98–102.
19. P. Pialis, B.A. Saville, Production of L-DOPA from tyrosinase immobilized on nylon 6,6: Enzyme stability and scale-up, *Enzyme Microb. Technol.* 22 (1998) 261–268.
20. S. Ates, E. Cortenlioglu, E. Bayraktar, U. Mehmetoglu, Production of L-DOPA using Cu-alginate gel immobilized tyrosinase in a batch and packed bed reactor, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 683–687.
21. G. Seetharam, B.A. Saville, L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite, *Enzyme Microb. Technol.* 31 (2002) 747–753.
22. P.Y. Ho, M.S. Chiou, A.C. Chao, Production of L-DOPA by tyrosinase immobilized on modified polystyrene, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 111 (2003) 139–152.

23. G.M.J. Carvalho, T.L.M. Alves, D.M.G. Freire, L-DOPA production by immobilized tyrosinase, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84 (2000) 791–800.
24. J.R. Ros, J.N. Rodríguez-López, F. García-Cánovas, Tyrosinase: Kinetic analysis of the transient phase and the steady-state, *Biochim. Biophys. Acta*, 1204 (1994) 33–42.
25. *Swiss Industrial Biotechnology*, Swiss Biotech Association, Bern, Switzerland (<http://www.swissbiotechassociation.ch/files/membersadd/O.Ghisalba.pdf>).
26. K. Yamada, Y. Akiba, T. Shibuya, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Hirata, Water purification through bioconversion of phenol compounds by tyrosinase and chemical adsorption by chitosan beads, *Biotechnol. Progr.* 21 (2005) 823–829.
27. E. Chiacchierini, D. Restuccia, G. Vinci, Bioremediation of food industry effluents: Recent applications of free and immobilised polyphenoloxidases, *Food Sci. Technol. Int.* 10 (2004) 373–382.
28. S. Tembe, M. Karve, S. Inamdar, S. Haram, J. Melo, S.F. D'Souza, Development of electrochemical biosensor based on tyrosinase immobilized in composite biopolymeric film, *Anal. Biochem.* 349 (2006) 72–77.
29. L. Campanella, M.P. Sammartino, M. Tomassetti, New enzyme sensor for phenol determination in non-aqueous and aqueous medium, *Sens. Actuat. B-Chem.* 7 (1992) 383–388.
30. J. Li, L.S. Chia, N.K. Goh, S.N. Tan, Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for the determination of phenolic compounds, *Anal. Chim. Acta*, 362 (1998) 203–211.
31. G.F. Hall, D.J. Best, A.P.F. Turner, Amperometric enzyme electrode for the determination of phenols in chloroform, *Enzyme Microb. Technol.* 10 (1988) 543–546.
32. M. Lutz, E. Burestedt, J. Emneus, H. Liden, S. Gobhadi, L. Gorton, G. Marko-Varga, Effects of different additives on a tyrosinase based carbon-paste electrode, *Anal. Chim. Acta*, 305 (1995) 8–17.
33. J. Wang, F. Lu, D. Lopez, Tyrosinase-based ruthenium dispersed carbon-paste biosensor for phenols, *Biosens. Bioelectron.* 9 (1994) 9–15.
34. P. Önnérjörd, J. Emnéus, G. Marko-Varga, L. Gorton, Tyrosinase graphite-epoxy based composite electrodes for detection of phenols, *Biosens. Bioelectron.* 10 (1995) 607–619.
35. M. Bonakdar, J.L. Vilchez, H.A. Mottola, Bioamperometric sensors for phenol based on carbon paste electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 266 (1989) 47–55.
36. C. Nistor, J. Emneus, L. Gorton, A. Ciucu, Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds, *Anal. Chim. Acta*, 387 (1999) 309–326.
37. S.G. Lee, S.P. Hong, M.H. Sung, Removal and bioconversion of phenol in wastewater by a thermostable β -tyrosinase, *Enzyme Microb. Technol.* 19 (1996) 374–377.
38. K.C. Loh, C.P.P. Tan, Effect of additional carbon sources on biodegradation of phenol, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64 (2000) 756–763.
39. G. Toscano, M.L. Colarieti, G. Greco, Oxidative polymerisation of phenols by a phenol oxidase from green olives, *Enzyme Microb. Technol.* 33 (2003) 47–54.
40. A.K. Luke, S.G. Burton, A novel application for *Neurospora crassa*: Progress from batch culture to a membrane bioreactor for the bioremediation of phenols, *Enzyme Microb. Technol.* 29 (2001) 348–356.
41. G.B. Seetharam, B.A. Saville, Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports, *Water Res.* 37 (2003) 436–440.
42. J.V. Bevilacqua, M.C. Cammarota, D.M.G. Freire, G.L. Sant-Anna, Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments, *Braz. J. Chem. Eng.* 19 (2002) 151–158.
43. N. Durán, E. Esposito, Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review, *Appl. Catal. B-Environ.* 28 (2000) 83–99.
44. L. Ensuncho, M. Alvarez-Cuenca, R.L. Legge, Removal of aqueous phenol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-phase fluidized bed reactor, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 27 (2005) 185–191.
45. K. Ikehata, J.A. Nicell, Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols, *Bioresour. Technol.* 74 (2000) 191–199.
46. W. Edwards, W.D. Leukes, P.D. Rose, S.G. Burton, Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-coated polysulphone capillary membranes for improved phenolic effluent bioremediation, *Enzyme Microb. Technol.* 25 (1999) 769–773.
47. G. Matheis, J.R. Whitaker, Enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods, *J. Food Biochem.* 11 (1987) 309–327.
48. S. Halaouli, M. Asther, K. Kruus, Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications, *J. Appl. Microbiol.* 98 (2005) 332–343.
49. C.R. Thalmann, T. Lötzbeyer, Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase, *Eur. Food Res. Technol.* 214 (2002) 276–281.
50. A. Anghileri, R. Lantto, K. Kruus, C. Arosio, G. Freddi, Tyrosinase-catalyzed grafting of sericin peptides onto chitosan and production of protein-polysaccharide bioconjugates, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 508–519.
51. T. Chen, H.D. Embree, L.Q. Wu, G.F. Payne, *In vitro* protein-polysaccharide conjugation: Tyrosinase-catalyzed conjugation of gelatin and chitosan, *Biopolymers*, 64 (2002) 292–302.
52. D. Kertesz, R. Zito, Mushroom polyphenol oxidase I – Purification and general properties, *Biochim. Biophys. Acta*, 96 (1965) 447–462.
53. R.O. Faria, Evaluation of the biotechnological potential of *Lentinula boryana* (BERK & MONT) PEGLER, *MSc Thesis*, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil (2004) (in Portuguese).
54. A.J. Score, J.W. Palfreyman, N.A. White, Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 39 (1997) 225–233.
55. S. Halaouli, E. Record, L. Casalot, M. Hamdi, J.C. Sigoillot, M. Asther, A. Lomascolo, Cloning and characterization of a tyrosinase gene from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*, and overproduction of the recombinant protein in *Aspergillus niger*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70 (2006) 580–589.
56. E. Selinheimo, M. Saloheimo, E. Ahola, A. Westerholm-Parvinen, N. Kalkkinen, J. Buchert, K. Kruus, Production and characterization of a secreted, C-terminally processed tyrosinase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*, *FEBS J.* 273 (2006) 4322–4335.
57. S. Bouchilloux, P. McMahon, H.S. Mason, The multiple forms of mushroom tyrosinase – Purification and molecular properties of enzymes, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 1699–1707.
58. N.H. Horowitz, M. Fling, G. Horn, Tyrosinase (*Neurospora crassa*), *Methods Enzymol.* 17 (1970) 615–620.
59. Y. Fan, W.H. Flurkey, Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms, *Phytochemistry*, 65 (2004) 671–678.
60. T. Katan, E. Galun, A rapid and efficient method for the purification of tyrosinase from *Neurospora*, *Anal. Biochem.* 67 (1975) 485–492.

61. A.A. Khan, S. Akhtar, Q. Husain, Simultaneous purification and immobilization of mushroom tyrosinase on an immunoaffinity support, *Process Biochem.* 40 (2005) 2379–2386.
62. H.J. Wichers, Y.A.M. Gerritsen, C.G.J. Chapelon, Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*, *Phytochemistry*, 43 (1996) 333–337.
63. U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970) 680–685.
64. Z. Liu, B. Liu, J. Kong, J. Deng, Probing trace phenols based on mediator-free alumina sol-gel derived tyrosinase biosensor, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4707–4712.
65. V.C. Sanz, M.L. Mena, A. Gonzalez-Cortes, P. Yanez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes – Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines, *Anal. Chim. Acta*, 528 (2005) 1–8.
66. F. Ortega, E. Domínguez, E. Burestedt, J. Emnéus, L. Gorton, G. Marko-Varga, Phenol oxidase-based biosensors as selective detection units in column liquid chromatography for the determination of phenolic compounds, *J. Chromatogr.* 675 (1994) 65–78.
67. A.I. Yaropolov, A.N. Kharybin, J. Emnéus, G. Marko-Varga, L. Gorton, Flow-injection analysis of phenols at a graphite electrode modified with co-immobilised lactase and tyrosinase, *Anal. Chim. Acta*, 308 (1995) 137–144.
68. G. Wang, J.J. Xu, L.H. Ye, J.J. Zhu, H.Y. Chen, Highly sensitive sensors based on the immobilization of tyrosinase in chitosan, *Bioelectrochemistry*, 57 (2002) 33–38.
69. J.L. Besombes, S. Cosnier, P. Labbe, G. Reverdy, A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides, *Anal. Chim. Acta*, 311 (1995) 255–263.
70. J.C. Vidal, S. Esteban, J. Gil, J.R. Castillo, A comparative study of immobilization methods of a tyrosinase enzyme on electrodes and their application to the detection of dichlorvos organophosphorus insecticide, *Talanta*, 68 (2006) 791–799.
71. G.Y. Kim, N.M. Cuong, S.H. Cho, J. Shim, J.J. Woo, S.H. Moon, Improvement of an enzyme electrode by poly(vinyl alcohol) coating for amperometric measurement of phenol, *Talanta*, 71 (2007) 129–135.
72. A. Yahsi, F. Sahin, G. Demirel, H. Tumturk, Binary immobilization of tyrosinase by using alginate gel beads and poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels, *Int. J. Biol. Macromol.* 36 (2005) 253–258.

The Tyrosinase Produced by *Lentinula boryana* (Berk. & Mont.) Pegler Suffers Substrate Inhibition by L-DOPA

Rodrigo Otávio de Faria¹, Vivian Rotuno Moure¹, Wellington Balmant¹,
Maria Angela Lopes de Almeida Amazonas², Nadia Krieger³ and
David Alexander Mitchell^{1*}

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Cx. P. 19046, Centro Politécnico, Curitiba 81531-990, Paraná, Brazil

²Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Florestas, Cx. P. 319 Colombo 83411-000, Paraná, Brazil

³Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Cx. P. 19081, Centro Politécnico, Curitiba 81531-990, Paraná, Brazil

Received: May 15, 2007

Revised version: June 15, 2007

Accepted: June 22, 2007

Summary

We undertook a preliminary characterization of the tyrosinase produced by a strain of *Lentinula boryana* from Brazil, with a view to evaluate its potential for biotechnological applications. The enzyme was similar to other fungal tyrosinases in many respects. When the crude extract was characterized, the tyrosinase activity was optimal at pH=6 and was not particularly thermostable, with half-lives of about 10 min and 1 min at 50 and 60 °C, respectively. We purified the enzyme with ammonium sulfate precipitation followed by ion exchange chromatography on a DEAE Sepharose column, obtaining a yield of 33 % and a 5.3-fold enrichment. The purified preparation gave three bands on SDS-PAGE, with molecular masses of 20, 27 and 47 kDa. This preparation showed substrate inhibition kinetics with L-DOPA (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine), with a K_M of 1.9 mM and a K_I of 72 mM. Under the same reaction conditions, a commercial mushroom tyrosinase followed Michaelis-Menten kinetics, with a K_M of 0.51 mM. Although the present study did not identify properties that would make the tyrosinase of *L. boryana* more suitable in biotechnological applications than tyrosinases from other mushrooms, it has made a contribution by showing that the enzyme suffers substrate inhibition by L-DOPA, something that has not previously been reported for mushroom tyrosinases.

Key words: tyrosinase, *Lentinula boryana*, substrate inhibition, 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine, L-DOPA

Introduction

Lentinula boryana is an edible fungus, often referred to as American shiitake, that grows in tropical and subtropical regions of the American continent, from the south-east of the United States of America to South America (1). During recent studies of a strain of *L. boryana* from Brazil, we noted the production of a dark pigment, which

was characterized as a DOPA-melanin (2). Since the production of DOPA-melanin is a strong indication that the producing organism also produces the enzyme tyrosinase, we tested the mycelium for tyrosinase activity. The test result was positive.

Tyrosinase (EC 1.14.18.1; tyrosine, L-DOPA:oxygen oxidoreductase; catecholase; diphenol oxidase; polyph-

*Corresponding author; Phone: ++55 41 3361 1658; Fax: ++55 41 3266 2042; E-mail: davidmitchell@ufpr.br

nol oxidase) is a bifunctional copper-containing enzyme. In its first reaction with a phenolic substrate, it introduces a hydroxyl group into the *ortho* position of the aromatic ring. This activity is referred to as the monooxygenase or cresolase activity. In its second reaction, tyrosinase oxidizes the *o*-dihydroxy compound produced in the first reaction to an *o*-quinone. This activity is referred to as the diphenolase or catecholase activity (3). These activities have recently become of interest for use in several biotechnological applications (4–6). For example, the cresolase activity of tyrosinase has been used to produce L-DOPA (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine) from tyrosine, L-DOPA being important in the treatment of Parkinson's disease. There has also been recent interest in the development of biosensors for phenolic compounds that work on the basis of the reaction of these compounds with immobilized tyrosinase (4,5). This idea has been extended to the development of systems in which immobilized tyrosinase is used to remove phenolic compounds from wastewaters (6).

In the present work, as an initial step in evaluating the biotechnological potential of the tyrosinase of *L. boryana*, we undertook a preliminary characterization of the enzyme. Although the enzyme did not have characteristics that would make it more suitable for biotechnological applications than other mushroom tyrosinases, it did show an interesting difference with respect to its kinetics, namely the fact that it suffered substrate inhibition with L-DOPA.

Materials and Methods

Microorganism

The strain used in this work, *Lentinula boryana* CNPF 24, originally isolated from a collection made in the Atlantic Forest in the Brazilian State of Paraná, came from the macrofungi culture collection of Embrapa Florestas, Paraná, Brazil, where it was inoculated into logs of *Eucalyptus grandis* and then re-isolated from a fruiting body. The mycelium used in this work was maintained on potato dextrose agar (PDA) plates and stored at 4 °C.

Production and extraction of tyrosinase

Mycelium of *L. boryana* was scraped from a plate with a wire loop and inoculated into 250-mL conical flasks containing 50 mL of a medium, modified from Fang and Zhong (7), which contained, in g/L of distilled water: glucose 35, peptone 5, malt extract 5, NaH₂PO₄·H₂O 1, MgSO₄·7H₂O 0.5 and thiamin chloride 0.05. Flasks were incubated in an orbital shaker at 120 rpm and 21 °C for 21 days. The mycelium from each flask was then recovered by filtration through a metal sieve and transferred into a 500-mL conical flask containing 100 mL of the same medium. These flasks were incubated in an orbital shaker at 120 rpm and 30 °C until the mycelium became dark (approximately 15 days). The dark mycelium was recovered by filtration through Qually filters of 14- μ m pore size under vacuum and then lyophilized. The lyophilized mycelium was resuspended in phosphate buffer (0.05 M, pH=6.8) and then passed three times through a French press at 1000 psi. The extract obtained in this

step was centrifuged at 5000 \times g in a Hitachi Himac (CR 21E) centrifuge. The supernatant after centrifugation represented the crude extract.

Purification of the crude extract

The crude extract was maintained on ice with agitation and ammonium sulfate was added slowly until 60 % of saturation. The solution was agitated overnight at 4 °C and then centrifuged at 10 000 \times g. The supernatant was discarded. The precipitate was resuspended in phosphate buffer (0.05 M, pH=6.8) and then dialyzed against the same buffer with a 6 kDa molecular mass cut-off dialysis membrane. The resulting preparation will be hereafter referred to as the dialyzed resuspended precipitate. A 5-mL sample of this dialyzed resuspended precipitate was applied to a 5 \times 15 cm column containing DEAE Sepharose, equilibrated with phosphate buffer (0.05 M, pH=6.8) and then eluted with a stepwise gradient of NaCl (0 to 1.0 M in the same buffer). Fractions of 5 mL were collected. The fractions with the highest activity were pooled and then concentrated at 4000 \times g in Centricon tubes (exclusion limit of 5 kDa).

Analytical methods

The catecholase activities of the tyrosinase purified from *L. boryana* and of that purchased from Sigma-Aldrich Co. (Steinheim, Germany, hereafter referred to as commercial mushroom tyrosinase) were determined based on the method of Masamoto *et al.* (8), in which the formation of the final dopachrome product was monitored spectrophotometrically at 475 nm. The assay mixture contained an L-DOPA (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine, Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Germany) concentration of 10 mM. The standard assay was done in 0.05 M phosphate buffer at pH=6.8 and 25 °C. In all cases initial velocities were calculated, the values being determined by adjusting a polynomial to the data and determining the tangent at zero time. A unit of activity (U) was defined as a variation of 0.01 in A₄₇₅ per minute. In some cases activities were expressed as percentages of the highest enzyme activity obtained in the assay. The kinetic constants were determined using L-DOPA concentrations ranging from 0.25 to 30 mM.

SDS-PAGE was performed according to Laemmli (9), with 4.5 % (mass per volume) polyacrylamide in the stacking gel and 12.5 % in the separation gel. Molecular mass markers from 14.4 to 97 kDa (Amersham Pharmacia Biotech) were used. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R250.

Protein concentrations in fractions were determined by the Bradford method (10). Bovine serum albumin was used to construct the standard curve.

Numerical methods

Nonlinear regression was undertaken using the subroutine NLRG of TKSolver (Universal Technical Systems). This subroutine uses the Levenberg-Marquardt algorithm of nonlinear optimization, which begins by using the steepest descent method but later switches to the Newton method to ensure rapid convergence (11).

Two equations were adjusted to the data, namely the classical Michaelis-Menten equation:

$$v_o = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad /1/$$

and the equation for substrate inhibition,

$$v_o = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}} \quad /2/$$

The set of ordinary differential equations that constituted the mathematical model (presented later) was solved using the FORTRAN subroutine DASSL, which uses the backward differentiation method (12). The initial velocities were determined for the simulated reaction profiles in the same manner as described above for the experimental profiles.

Results

Characterization of the crude extract

Initially, we determined the effect of temperature and pH on the stability and activity of tyrosinase in the crude extract. Temperature had relatively little effect on the initial velocity over the range of 20 to 45 °C (Fig. 1). In the case of pH, the maximal activity occurred at pH=6 (Fig. 2). The relative activity remained high as the pH was decreased to 4.6; at this pH it was still above 70 %. However, at still lower pH values the relative activity fell sharply. Above pH=6, it fell relatively slowly, being approximately 70 % at pH=8.

The tyrosinase activity was not particularly thermostable. Fig. 3 shows the residual activity after a 10-minute incubation in 0.05 M phosphate buffer at pH=6.8, at temperatures ranging from 25 to 90 °C. At 25 °C the residual activity was 100 %. At 40 °C the residual activity was still above 90 %, but for higher temperatures the residual activity fell sharply, being around 10 % at 60 °C.

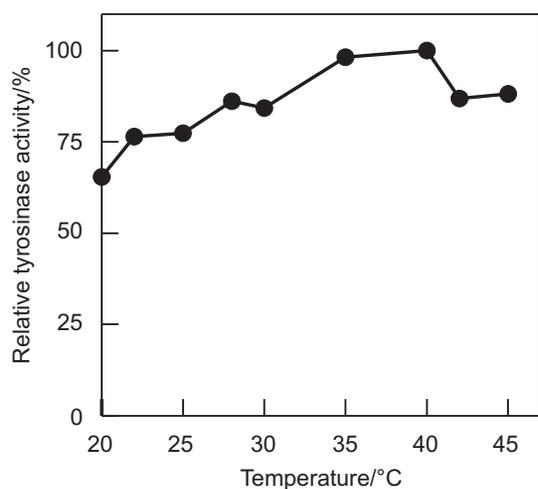


Fig. 1. Effect of temperature on the tyrosinase activity within the crude extract prepared from *L. boryana* CNPF 24. Assays were done in phosphate buffer (0.05 M, pH=6.8). The activity of the sample incubated at 40 °C was taken as 100 %

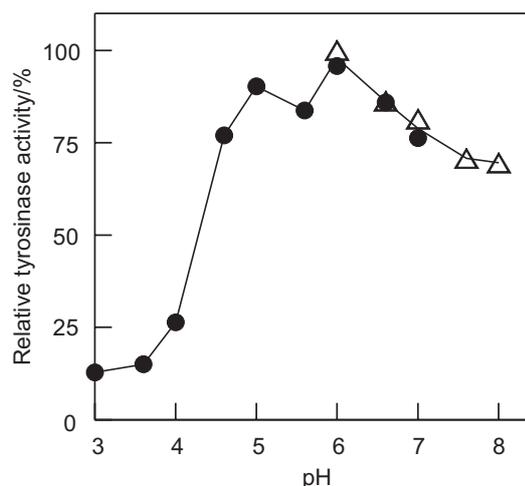


Fig. 2. Effect of pH on the tyrosinase activity within the crude extract prepared from *L. boryana* CNPF 24. Assays were done at 25 °C. The activity of the sample incubated at pH=6 in phosphate buffer was taken as 100 %. Key: (Δ) phosphate buffer (50 mM) and (\bullet) citrate-phosphate buffer (0.05 M)

Fig. 4 shows the kinetics of denaturation at 60 °C. Over the first two minutes the denaturation followed first order kinetics, with a half-life of 1.1 min, however, at longer times the residual activity was higher than a first order decay model would predict. A temperature of 25 °C was chosen for future assays since the enzyme shows good stability at this temperature over the duration of activity assays.

Partial purification of tyrosinase

We decided to purify the enzyme further before characterizing its kinetics. To purify the enzyme, we re-suspended the precipitate obtained after ammonium sulfate fractionation and dialyzed it. This dialyzed re-

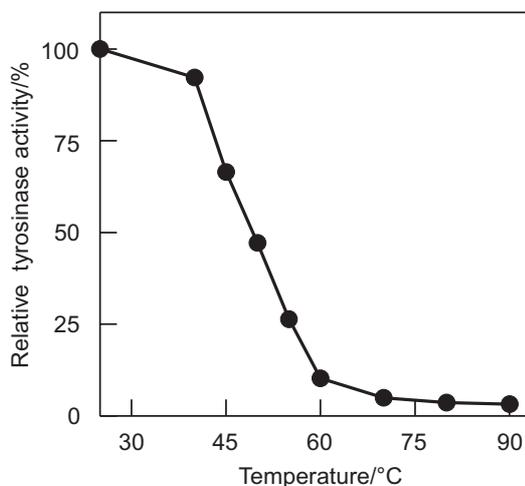


Fig. 3. Stability of the tyrosinase activity within the crude extract prepared from *L. boryana* CNPF 24 as a function of temperature. Samples of the enzyme were incubated at pH=6.8 in phosphate buffer (0.05 M) at the given temperature for 10 min before the residual activity was determined. The activity of the original sample was taken as 100 %

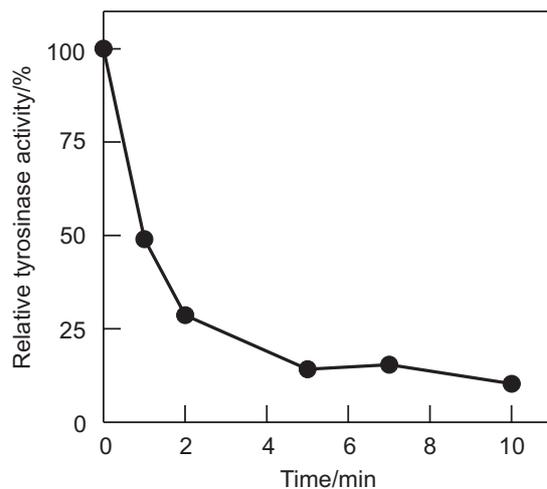


Fig. 4. Denaturation kinetics at 60 °C of the tyrosinase activity within the crude extract prepared from *L. boryana* CNPF 24. The enzyme was incubated in phosphate buffer (0.05 M, pH=6.8)

suspended precipitate still contained melanin. It was applied to a DEAE-Sepharose column and eluted with a stepwise-increasing NaCl gradient. The enzyme was eluted at 0.3 M NaCl (Fig. 5). This step separated the tyrosinase from the melanin, since the melanin remained in the column, not being eluted even at 1 M NaCl. In fact, the melanin was only eluted when 1 M NaOH was passed through the column.

This two-step purification scheme, involving ammonium sulfate precipitation and ion-exchange chromatography, resulted in a partially purified tyrosinase preparation, obtained by pooling fractions 9, 10 and 11 of Fig. 5 (*i.e.* the eluate between 40 and 55 mL). The total activity in this preparation was 33 % of that present in the

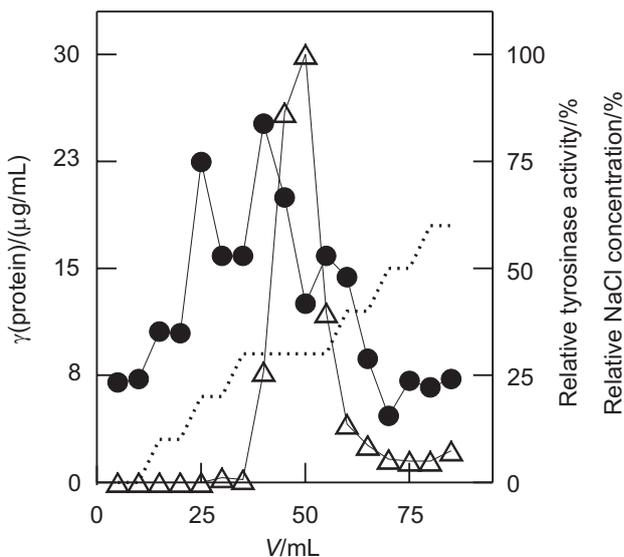


Fig. 5. Elution profile obtained after ion-exchange chromatography of the dialyzed resuspended precipitate obtained from *L. boryana* CNPF 24. Key: (Δ) tyrosinase activity, expressed as a percentage of the fraction with the highest activity; (●) protein concentration; (---) NaCl gradient expressed as a percentage, with 100 % of the gradient corresponding to an NaCl concentration of 1 M

crude extract. The specific activity was improved 5.3-fold, from 20.8 to 110.7 U/mg of protein. SDS-PAGE of this preparation gave three bands, with approximate molecular masses of 20, 27 and 47 kDa (Fig. 6).

Effect of substrate concentration on the partially purified tyrosinase

The effect of substrate concentration on initial velocity was tested for the partially purified tyrosinase and the commercial mushroom tyrosinase. In the case of the tyrosinase from *L. boryana*, the Michaelis-Menten equation (Eq. 1) was not able to fit adequately to the data (Fig. 7A). In fact, at the highest substrate concentrations the activity decreased, suggesting substrate inhibition. The equation for substrate inhibition adjusted well to the data, with a K_M of 1.9 mM and a K_I of 72 mM. On the other hand, the commercial enzyme followed classical enzyme kinetics, with a K_M of 0.51 mM (Fig. 7B).

Kinetic modeling of the substrate inhibition of the tyrosinase of *L. boryana*

Cabanes *et al.* (13) proposed a kinetic model for the action of frog epidermis tyrosinase on tyrosine and L-DOPA and provided estimates of the parameters of the model. We extended the part of their model that describes oxidation of L-DOPA by the inclusion of the classical mechanism that underlies the substrate inhibition equation, namely the ability of a second substrate molecule to bind to the enzyme-substrate complex to produce a ternary complex that is unable to catalyze the reaction. Note that tyrosinase can be in either of two forms, namely

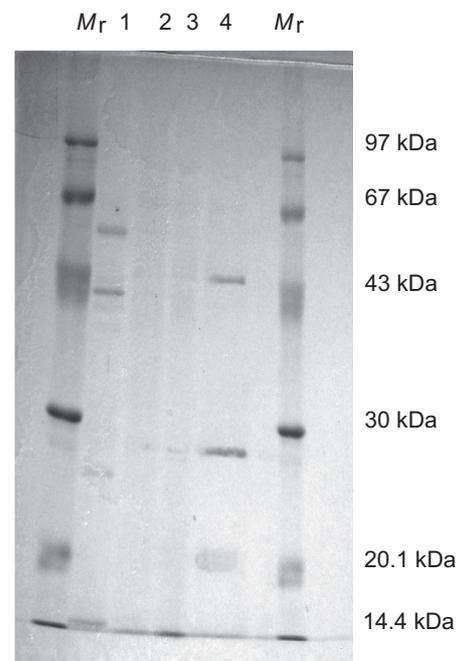


Fig. 6. SDS-PAGE of partially purified *L. boryana* CNPF 24 tyrosinase. Key: lane 1 is the commercial mushroom tyrosinase (Sigma Co.); lane 2 is the crude extract obtained from *Lentinula boryana* CNPF 24; lane 3 is the resuspended precipitate; lane 4 is the pool of fractions 9, 10 and 11 obtained after ion-exchange chromatography. The two lanes marked M_r correspond to molecular mass markers (Amersham Pharmacia Biotech)

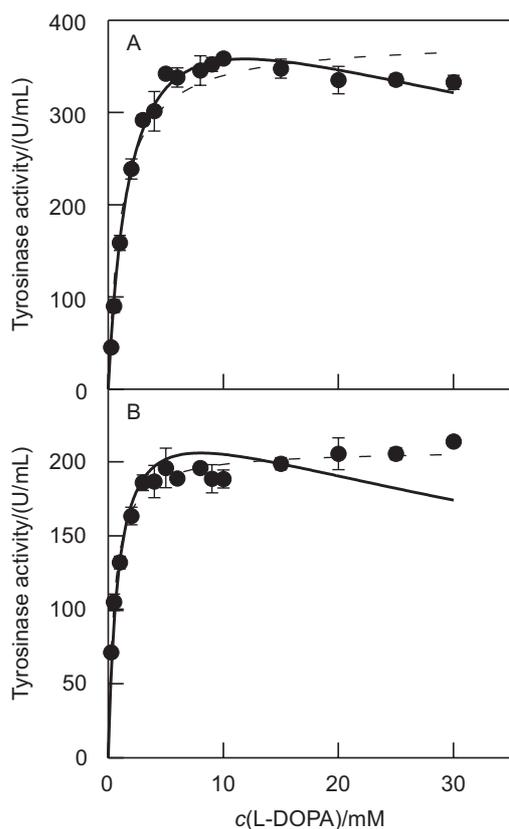


Fig. 7. Effect of substrate concentration on the initial velocities for reaction with L-DOPA of (A) the partially purified *L. boryana* CNPF 24 tyrosinase and (B) the commercial mushroom tyrosinase. Assays were done at pH=6.8 and 25 °C. In both cases the symbols represent the experimental data, the solid line represents the best fit of the substrate inhibition equation (Eq. 2) and the dashed line represents the best fit of the Michaelis-Menten equation (Eq. 1)

E_{met} and E_{oxy} , both of which can bind L-DOPA (represented by D in this scheme). We assumed that both the $E_{met}D$ and the $E_{oxy}D$ complexes were able to bind an extra molecule of D, which results in the reaction scheme shown in Fig. 8.

This scheme is described by the following set of differential equations:

$$\begin{aligned} \frac{d[D]}{dt} &= k_3[E_{oxy}D] - k_4[E_{oxy}][D] \\ &\quad - k_{10}[E_{met}][D] + k_9[E_{met}D] + 0.5k_{12}[Q] \quad /3/ \\ &\quad - k_{13}[E_{oxy}D][D] + k_{14}[E_{oxy}D_2] \\ &\quad - k_{15}[E_{met}D][D] + k_{16}[E_{met}D_2] \end{aligned}$$

$$\frac{d[E_{oxy}]}{dt} = k_3[E_{oxy}D] + k_{11}[E_{met}D] - k_4[E_{oxy}][D] \quad /4/$$

$$\frac{d[E_{met}]}{dt} = k_9[E_{met}D] - k_{10}[E_{met}][D] + k_5[E_{oxy}D] \quad /5/$$

$$\begin{aligned} \frac{d[E_{oxy}D]}{dt} &= k_4[E_{oxy}][D] - k_3[E_{oxy}D] - k_5[E_{oxy}D] \\ &\quad - k_{13}[E_{oxy}D][D] + k_{14}[E_{oxy}D_2] \quad /6/ \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[E_{met}D]}{dt} &= k_{10}[E_{met}][D] - k_9[E_{met}D] - k_{11}[E_{met}D] \\ &\quad - k_{15}[E_{met}D][D] + k_{16}[E_{met}D_2] \quad /7/ \end{aligned}$$

$$\frac{d[E_{oxy}D_2]}{dt} = k_{13}[E_{oxy}D][D] - k_{14}[E_{oxy}D_2] \quad /8/$$

$$\frac{d[E_{met}D_2]}{dt} = k_{15}[E_{met}D][D] - k_{16}[E_{met}D_2] \quad /9/$$

$$\frac{d[Q]}{dt} = k_{11}[E_{met}D] + k_5[E_{oxy}D] - k_{12}[Q] \quad /10/$$

$$\frac{d[P]}{dt} = 0.5k_{12}[Q] \quad /11/$$

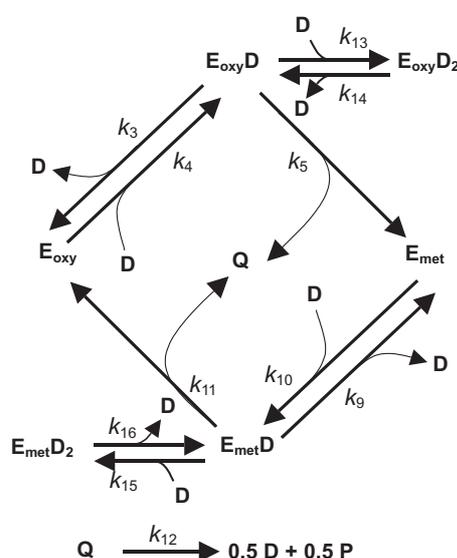


Fig. 8. The scheme for reaction of tyrosinase with L-DOPA, modified from Cabanes *et al.* (13) in order to include substrate inhibition. Note that the enzyme can be in either of two forms, E_{met} or E_{oxy} , both of which are capable of binding L-DOPA. Key: D is L-DOPA, P is the final product, dopachrome, Q is the intermediate product, dopaquinone; $E_{oxy}D$ and $E_{met}D$ are the catalytic enzyme-substrate complexes; $E_{oxy}D_2$ and $E_{met}D_2$ are the complexes that result from the binding of a second L-DOPA molecule to the enzyme-substrate complexes. These ternary complexes cannot catalyze the reaction

These equations were solved numerically, using the parameter values listed in Table 1. In the case of the constants associated with the formation of the $E_{met}D_2$ and $E_{oxy}D_2$ complexes, it was assumed that the fundamental velocity constants were the same, independently of the enzyme being in the met or oxy form (*i.e.* $k_{13}=k_{15}$ and $k_{14}=k_{16}$), and that in both cases the ratio of the dissociation constant to the complex formation constant was equal to 72 (*i.e.* $k_{14}/k_{13}=k_{16}/k_{15}=K_I=72$ mM). When this model was used to simulate the reactions, the predicted initial velocities were very close to the experimental values (Fig. 9).

Discussion

Many of the characteristics of *L. boryana* tyrosinase are similar to those of other mushroom tyrosinases and

Table 1. Values of the kinetic constants in the model used to describe substrate inhibition (see Fig. 8)

Kinetic constant*	Value and units	Source
k_3	10 s^{-1}	(13)
k_4	$10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	(13)
k_5	10^2 s^{-1}	(13)
k_9	5 s^{-1}	(13)
k_{10}	$10^6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	(13)
k_{11}	10^2 s^{-1}	(13)
k_{12}	0.41 s^{-1}	(13)
k_{13}	$0.001 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	this work
k_{14}	0.072 s^{-1}	this work
k_{15}	$0.001 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	this work
k_{16}	0.072 s^{-1}	this work

*The same numbering system is used as that used by Cabanes *et al.* (13). Since they also included the reaction with L-tyrosine in their model, they had kinetic constants that are not included in the current model (namely k_1 , k_2 , k_6 , k_7 and k_8)

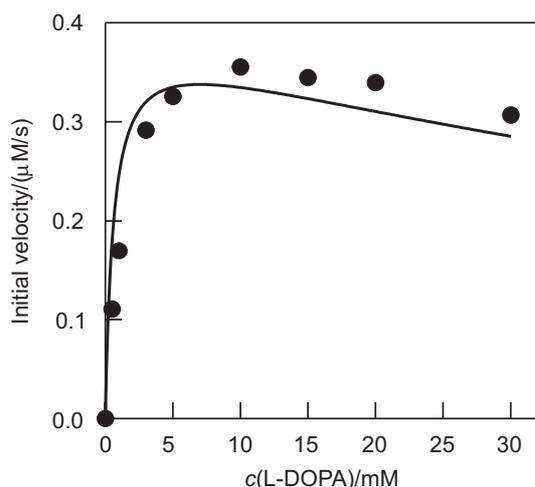


Fig. 9. Simulation of substrate inhibition of the *L. boryana* tyrosinase. Key: (●) experimental results; (—) predictions of the model of Cabanes *et al.* (13), modified to describe substrate inhibition

therefore we did not identify properties that would make it more suitable for biotechnological applications than other tyrosinases. A pH optimum in the vicinity of 6 to 7 was also found for the tyrosinases of *Pycnoporus sanguineus* and *Portabella* mushrooms (a large, brown variety of *Agaricus bisporus*) (14,15). The tyrosinase from *L. boryana* is less thermostable than that from *P. sanguineus*. The *P. sanguineus* enzyme had a half-life of 120 min at 50 °C (14), whereas Fig. 3 suggests that the 10-minute incubation time represented the half-life at 50 °C for the *L. boryana* enzyme.

The most interesting feature of the *L. boryana* tyrosinase identified in the current work is the occurrence of substrate inhibition in the reaction with L-DOPA. Although many mushroom tyrosinases have been kineti-

cally characterized, substrate inhibition of the catecholase activity with L-DOPA has not previously been reported. Typically, studies with L-DOPA as the substrate have shown that mushroom tyrosinases follow Michaelis-Menten kinetics, with K_M values varying from about 1 to 10 mM (14,16–18). On the other hand, the cresolase and catecholase activities of commercial mushroom tyrosinase have been reported to suffer substrate inhibition by L-tyrosine and 4-methylcatechol, respectively (19,20).

We were able to modify the model of tyrosinase kinetics proposed by Cabanes *et al.* (13) to describe substrate inhibition. In fact, the modified model fitted reasonably well to our data when we used the same values for the fundamental constants as they did, at least for those reaction steps that are common. This may appear surprising, since the two tyrosinases are from widely different sources, ours being from a mushroom while that of Cabanes *et al.* was from frog epidermis. However, the good fit is a coincidence that owes itself to the fact that our enzyme had a similar K_M to that of the frog epidermis enzyme.

It is interesting that the *L. boryana* tyrosinase shows substrate inhibition by L-DOPA whereas the commercial mushroom tyrosinase does not. An understanding of the reasons underlying this difference would only be possible with studies of substrate binding, such as that undertaken by Gamage *et al.* (21) with the enzyme SULT1A1; they obtained crystal structures in which a second molecule of the substrate, in this case *p*-nitrophenol, had bound to the active site. Such a study would identify the differences in the structures of the active sites of the two enzymes that are responsible for the different kinetic behavior. However, first it would be necessary to identify in which polypeptide or polypeptides the tyrosinase activity resides. Note that our finding of three bands in the SDS-PAGE after ion-exchange chromatography is not without precedent and that it is possible that more than one will show tyrosinase activity. Kanda *et al.* (22) obtained two activity peaks after ion exchange chromatography of an extract from *Lentinula edodes*. When the fractions corresponding to each peak were analyzed by partially denaturing SDS-PAGE, both had three bands that showed tyrosinase activity. Fully denaturing SDS-PAGE of the same fractions gave bands at 15, 49 and 54 kDa for one fraction and 15, 50 and 55 kDa for the other.

Acknowledgements

Rodrigo Faria, Vivian Moure, Nadia Krieger and David Mitchell thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for research scholarships. The authors thank the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) for financial support.

References

1. G. Guzmán, G. Mata, D. Salmones, C. Soto-Velazco, L.G. Dávalos, Cultivation of edible fungi. With special attention to tropical and subtropical species in agro-industrial by-products and residues, IPN, Mexico, D.F., Mexico (1993) 150–153 (in Spanish).

2. R.O. de Faria, Evaluation of the biotechnological potential of *Lentinula boryana* (BERK & MONT) PEGLER, *MSc Thesis*, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil (2004) (in Portuguese).
3. K. Haghbeen, E.W. Tan, Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates, *Anal. Biochem.* 312 (2003) 23–32.
4. S.Y. Seo, V.K. Sharma, N. Sharma, Mushroom tyrosinase: Recent prospects, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 2837–2853.
5. S. Halaouli, M. Asther, J.C. Sigoillot, M. Hamdi, A. Lomascolo, Fungal tyrosinases: New prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications, *J. Appl. Microbiol.* 100 (2006) 219–232.
6. R.O. de Faria, V.R. Moure, M.A.L.A. Amazonas, N. Krieger, D.A. Mitchell, The biotechnological potential of mushroom tyrosinases, *Food Technol. Biotechnol.* 45 (2007) 287–294.
7. Q.H. Fang, J.J. Zhong, Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*, *Process Biochem.* 37 (2002) 769–774.
8. Y. Masamoto, S. Lida, M. Kubo, Inhibitory effects of chinese crude drugs on tyrosinase, *J. Med. Plant Res.* 40 (1980) 361–365.
9. U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970) 680–685.
10. M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
11. P.E. Gill, W. Murray, Algorithms for the solution of the nonlinear least-squares problem, *SIAM J. Numer. Anal.* 15 (1978) 977–992.
12. L.R. Petzold, K.E. Brenan, S.L. Campbell: *Numerical Solution of Initial-Value Problems in Differential-Algebraic Equations*, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, NY, USA (1989).
13. J. Cabanes, F. García-Cánovas, J.A. Lozano, F. García-Carmona, A kinetic study of the melanization pathway between L-tyrosine and dopachrome, *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* 923 (1987) 187–195.
14. S. Halaouli, M. Asther, K. Kruus, Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications, *J. Appl. Microbiol.* 98 (2005) 332–343.
15. Y. Fan, W.H. Flurkey, Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms, *Phytochemistry*, 65 (2004) 671–678.
16. L.A. Muller, U. Rinz, J.P. Zrýd, Characterization of a tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis, *Phytochemistry*, 42 (1996) 1511–1515.
17. J.C. Espin, P.A. Garcia-Ruiz, J. Tudela, F. Garcia-Canovas, Study of stereospecificity in mushroom tyrosinase, *Biochem. J.* 331 (1998) 547–551.
18. X.D. Zhang, J. van Leeuwen, H.J. Wichers, W.H. Flurkey, Characterization of tyrosinase from the cap flesh of portabella mushrooms, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 374–378.
19. J.N. Rodríguez-López, J. Tudela, R. Varón, F. García-Carmona, F. García-Cánovas, Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 3801–3810.
20. R. Bru, A. Sanchez-Ferrer, F. García-Carmona, Characteristics of tyrosinase in AOT-isooctane reverse micelles, *Biotechnol. Bioeng.* 34 (1989) 304–308.
21. N.U. Gamage, R.G. Duggleby, A.C. Barnett, M. Tresillian, C.F. Latham, N.E. Liyou, M.E. McManus, J. Martin, Structure of a human carcinogen-converting enzyme, SUL1A1 – Structural and kinetic implications of substrate inhibition, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 7655–7662.
22. K. Kanda, T. Sato, S. Ishii, H. Enei, S. Ejiri, Purification and properties of tyrosinase isozymes from the gill of *Lentinus edodes* fruiting body, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60 (1996) 1273–1278.