

# Purificação de lacases PPO-I de *Botryosphaeria rhodina*

Francis Widmann Hiroito Obara<sup>1</sup>, Geni Varéa-Pereira<sup>1\*</sup>, Dalva Tomoe Miyagui<sup>1</sup> e Maria de Lourdes Corradi da Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Campus Universitário, Cx. Postal 6001, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Física, Química e Biologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rua Roberto Simonsen, 305, Cx. Postal, 467/468, 19060-900, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. \*Autor para correspondência. e-mail: gpvarea@uel.br

**RESUMO.** Lacases são glicoproteínas polifenol oxidases envolvidas na patogenicidade de alguns fungos e úteis em processos biotecnológicos. O ascomiceto ligninolítico *Botryosphaeria rhodina* tem sido estudado como produtor de exopolissacarídeos e de lacases PPO-I e PPO-II induzidas pelo álcool veratrílico. Como as lacases produzidas ainda não foram isoladas, o objetivo deste trabalho foi purificar lacases PPO-I e identificar os carboidratos constituintes da porção glicosídica. O fungo foi cultivado em meio mínimo de Vogel contendo 1% de glicose e 30,4 mM de álcool veratrílico, a 28°C e agitação de 180 rpm durante 4,5 dias. O extrato livre de células apresentou elevada concentração de carboidratos e de PPO-I estáveis a 4°C e -18°C durante 40 dias. Técnicas de ultrafiltração, cromatografia em gel Sephadex G-100 e em resina DEAE-Celulose purificaram lacases PPO-I com peso molecular de 113 kDa por eletroforese PAGE-SDS, contendo 40% de proteínas e 60% carboidratos identificados por HPAEC-PAD como fucose, galactose, manose, glicose e glucosamina.

**Palavras-chave:** lacase, glicoproteína, exopolissacarídeo, purificação, *Botryosphaeria rhodina*.

## **ABSTRACT. Purification of laccases PPO-I of fungus *Botryosphaeria rhodina*.**

Laccases are glycoprotein polyphenol oxidases which are involved in fungal pathogenicity and they are also useful for biotechnological applications. The ligninolytic ascomycete, *Botryosphaeria rhodina*, has been studied as producer of exopolysaccharide and PPO-I and PPO-II laccases induced by veratryl alcohol. However, as the induced laccases have not been isolated, the aim of this study was to purify the enzyme and to identify the carbohydrates constituents of the glycosidic moiety. The fungus was cultivated on broth Vogel, 1% glucose and 30.4mM veratryl alcohol during 4.5 days at 28°C/180 rpm. The extracellular fluid showed high carbohydrate concentration and the stability of PPO-I lacase under conditions of refrigeration and freezing at 4°C-18°C over 40 days. The purification was developed by ultrafiltration using a NMWL 100 and 30 kDa membrane, gelfiltration on Sephadex G-100, and ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose. The purified lacase was identified as a glycoprotein, weight molecular 113 kDa, consisting of 40% protein and 60% carbohydrate identified by HPAEC-PAD as fucose, galactose, mannose, glucose and glucosamine.

**Key words:** lacase, glycoprotein, exopolysaccharides, purification, characterization, *Botryosphaeria rhodina*.

## **Introdução**

As lacases p-difenol: oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2 são glicoproteínas polifenoloxidases envolvidas na degradação de lignina. Lacases produzidas por fungos isolados na natureza têm sido estudadas para utilização em diferentes processos biotecnológicos de biorremediação de xenobióticos (Wesenberg *et al.*, 2003) como a detecção e tratamento de poluentes fenólicos na forma de

biossensores (Rossato *et al.*, 2001; Freire *et al.*, 2002; Gomes e Rebelo, 2003; Quan *et al.*, 2004) e de enzima imobilizada em resina Eupergit®C (Hublik e Schinner, 2000). *Chaetomium thermophilum* isolados da compostagem de dejetos orgânicos sólidos humanos e animais produziram lacases termoestáveis (Chefetz *et al.*, 1998). Lacases produzidas por fungos responsáveis pela degradação branca da madeira *Pycnoporus cinnabarinus* e

*Phanerochaete chryosporium* foram ativas na transformação e degradação de corantes azofenóis (Schliephake et al., 2000) e ftalocianinas (Conneely et al., 2002), respectivamente, resultantes da coloração de fibras de algodão em indústrias têxteis. Lacases têm sido utilizadas, também, durante o processamento industrial de matérias-primas ligno-celulósicas, como o branqueamento de polpas de papel Kraft e produção de sucos de frutas, vinhos e cerveja (Gianfreda et al., 1999).

Leonowicz et al. (2001) revisaram as propriedades e a atividade de lacases fúngicas e concluíram que polímeros de celulose e de lignina são degradados simultaneamente por sistemas enzimáticos envolvendo reações de desmetilação catalisadas por lacases induzidas por radicais e mediadores de baixo peso molecular resultantes da ação inicial de lignina (LiP) e manganês peroxidases (MnP).

Lacases monoméricas, com peso molecular de 67 kDa, produzidas pelo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* foram purificadas através de fracionamento com sulfato de amônio a 80% de saturação, cromatografia de gelfiltração e troca-iônica (Hublik e Schinner, 2000). Procedimentos semelhantes e ultrafiltração foram empregados para purificar lacases do ascomiceto *Mauginiella* sp com massa molecular de 63 kDa e que apresentaram seis isoformas determinadas por espectrometria de massa (Palonen et al., 2003).

O ascomiceto *Botryosphaeria* sp (isolado MAMB-5) cresceu e produziu diferentes níveis de lacases em meios de cultivo contendo compostos relacionados à lignina (Dekker et al., 2002). Sob condições de aeração e na presença de álcool veratrílico, o mesmo isolado fúngico produziu exopolissacarídeos (EPS) do tipo  $\beta$ -glucana juntamente com duas lacases constitutivas distintas PPO-I com atividade ótima sobre 2,2'-azino-bis[3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid] (ABTS) em pH 3,0 e 50°C, e PPO-II ativa em pH 6,5 e 45°C sobre 2,6-dimethoxyphenol (DMP) (Dekker e Barbosa, 2001). Ambas lacases PPO-I e PPO-II foram induzidas acima dos níveis constitutivos em meios de cultivo contendo lignina kraft de madeira mole e álcool veratrílico (Dekker et al., 2001). O EPS ou "botriosferana", produzido pelo fungo, posteriormente identificado como *Botryosphaeria rhodina* (Garcia et al., 2004), foi caracterizado como um homopolissacarídeo ramificado contendo 98% de resíduos de glucose unidos por ligações  $\beta(1\rightarrow3)$  na porção linear e aproximadamente 22% de ligações  $\beta(1\rightarrow6)$  (Barbosa et al., 2003), e as condições de cultivo para produção máxima das lacases também já

foram otimizadas através de metodologia de superfície de resposta em meio de cultivo líquido a 28°C, aeração a 180 rpm, 30,4 mM de álcool veratrílico durante 4,5 dias para PPO-I e com 28 a 35 mM de álcool veratrílico por 4 a 5,5 dias para PPO-II (Vasconcelos et al., 2000). Porém essas lacases induzidas ainda não foram isoladas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi purificar e identificar os carboidratos constituintes da porção glicosídica da lacase PPO-I do fungo *Botryosphaeria rhodina* (MAMB-5) induzidas por álcool veratrílico. A estabilidade das lacases e as prováveis interações moleculares entre lacases e EPS também foram discutidas.

## Material e métodos

### Produção de lacases

O fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-5 foi cultivado a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob agitação a 180 rpm durante 4,5 dias em meio líquido de Vogel (1956), contendo glucose 1% (p/v) e álcool veratrílico na concentração de 30,4 mM (veratryl [3,4-dimethoxybenzyl] alcohol – Aldrich) como agente indutor (Vasconcelos et al., 2000). O cultivo foi interrompido através de centrifugação a 2000xg por 15 minutos. Após filtração em lâ de vidro, o sobrenadante foi dialisado exaustivamente (membrana de porosidade controlada NMWL 12 kDa – Sigma) contra água deionizada por 24 horas a 4°C. O extrato livre de células (ELC) foi analisado quanto à atividade de lacase PPO-I, proteínas e carboidratos, e utilizado para purificação das lacases.

### Ensaio enzimático

A atividade das lacases PPO-I foi determinada de acordo com Barbosa et al. (1996), utilizando o substrato artificial 2,2'-azino-bis[3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid] (ABTS – Sigma). A atividade foi expressa em unidades de lacases (U/mL) definidas como o número de  $\mu\text{moles}$  de ABTS oxidado ( $\epsilon = 36000 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) por minuto, por mL de solução de enzima.

### Determinação de proteínas e carboidratos

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976), usando solução padrão de albumina bovina. A determinação de carboidratos foi realizada pelo método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956) utilizando solução padrão de D-glucose.

### Purificação das lacases

Todas as etapas do isolamento das lacases foram realizadas a 4°C e acompanhadas por determinações de atividade de PPO-I, proteínas e carboidratos.

#### Ultrafiltração

Lacases PPO-I foram filtradas (Millipore modelo 8400) em membrana de exclusão molecular de 100 kDa (PBHK, polietersulfona-Millipore) a partir de 360 mL de ELC. O filtrado com atividade PPO-I foi concentrado por retenção em membrana de exclusão molecular 30 kDa (YM30, celulose regenerada-Millipore).

#### Cromatografia de exclusão molecular

A fração de lacases PPO-I retida e concentrada na membrana de 30 kDa (R30) foi aplicada em gel Sephadex G-100 empacotado em coluna de vidro (110 x 2 cm). A eluição das proteínas, em frações de 3 mL, foi realizada em tampão citrato-fosfato 40 mM pH 5,0 na velocidade de 0,3 mL/min e monitorada através da leitura de absorvância em 280 nm. As frações com atividade de PPO-I foram reunidas.

#### Cromatografia de troca-iônica

A fração obtida da cromatografia de exclusão molecular foi submetida à cromatografia de troca-iônica em resina DEAE-celulose empacotada em coluna de vidro (30 x 2,3 cm) e equilibrada com tampão citrato-fosfato 40 mM pH 5,0. A separação das proteínas foi obtida aplicando-se gradiente linear de concentração de 40 mM a 450 mM do mesmo tampão de equilíbrio, uma vez que PPO-I foi fortemente inibida por concentrações de ânions cloreto (Dekker *et al.*, 2000; Dekker e Barbosa, 2001). A eluição das proteínas, em frações de 1 mL, foi realizada a velocidade de 1,0 mL/min e a separação monitorada por meio de leitura espectrofotométrica a 280 nm. As frações, com atividade de PPO-I, foram reunidas e dialisadas como descrito anteriormente.

#### Eletroforese em poli(acrilamida)

A atividade de PPO-I foi demonstrada em eletroforese PAGE em condições nativas com 10% de acrilamida em tampão TRIS-Glicina e revelação através da incubação do gel em solução do substrato ABTS e tampão citrato-fosfato 120 mM, pH 3,0 a 50°C até o desenvolvimento da banda de atividade de coloração verde correspondente ao ABTS oxidado.

O peso molecular da lacase purificada foi

determinado utilizando gradiente de concentração de acrilamida de 5% a 18% a 180 mV em meio dissociante com dodecilsulfato de sódio (SDS) e mercaptoetanol (Laemmli, 1970). A estimativa do peso molecular foi realizada graficamente através da relação entre log do peso molecular e mobilidade relativa dos padrões de pesos moleculares 181,8 kDa; 115,5 kDa; 82,2 kDa; 64,2 kDa (banda de orientação rosa); 48,8 kDa; 37,1 kDa; 25,9 kDa; 19,4 kDa; 14,8 kDa; 6,0 kDa (Bench Mark Pre-stained ladder-Invitrogen). As bandas protéicas foram reveladas pela complexação com prata (Nielsen e Brown, 1984).

#### Identificação de monossacarídeos

A fração de lacases PPO-I obtida da cromatografia DEAE-celulose foi avaliada quanto à presença de monossacarídeos neutros e aminados por meio de cromatografia de troca aniônica de alta pressão (HPAEC) em sistema Dionex DX 500, com Detector de Amperometria Pulsada (PAD), coluna analítica CarboPac PA10 (4 x 250 mm) equipada com um guarda coluna AminoTrap (Dionex). As condições de eluição foram produzidas utilizando NaOH 14 mM a partir de H<sub>2</sub>O deionizada (eluente 1) e NaOH 0,2 M (eluente 2), com fluxo de 1,0 mL/min (Elifio *et al.*, 2000). A coluna foi regenerada após 20 minutos de corrida com 100% de eluente 2, seguida de 15 minutos em NaOH 14 mM antes da injeção de nova amostra. Alíquotas de PPO-I isoladas da DEAE-Celulose contendo 30 µg de carboidrato foram previamente submetidas à hidrólise ácida em bloco de aquecimento (Digi-Block) a 100°C durante 6 horas em ácido trifluoroacético 2 M (TFA-Merck) e HCl 4 M para liberação de monossacarídeos neutros e aminados, respectivamente (Corradi da Silva *et al.*, 2005). O hidrolisado foi completamente evaporado em centrífuga a vácuo (HETO mod DNA Plus), seguido por três ciclos de adição de 0,5 mL de H<sub>2</sub>O e completa evaporação.

#### Estabilidade das lacases

A estabilidade foi avaliada por meio da determinação da atividade, em alíquotas de ELC e da fração separada pela cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100 sob refrigeração a 4°C (refrigerador Cònsul), 20°C (Banho Maria termostatizado TECNAL TE-184), sob congelamento a -18°C durante 40 dias e em amostras de ambos extratos submetidos a congelamentos sucessivos.

## Resultados e discussão

### Purificação de PPO-I

A ultrafiltração do ELC separou a fração R100 constituída por 79% dos carboidratos e 59% de proteínas com pesos moleculares superiores ao limite de exclusão molecular da membrana 100 kDa empregada. O filtrado, resultante dessa membrana, foi posteriormente concentrado em membrana de exclusão molecular 30 kDa, obtendo-se a fração R30 contendo 13% dos carboidratos e 14% das proteínas presentes inicialmente no ELC (Tabela 1). Os resultados demonstraram a separação de grande parte dos carboidratos na fração R100, porém as lacases foram distribuídas em ambas frações, uma vez que os rendimentos de atividade PPO-I foram 47% e 38% para as frações R100 e R30, respectivamente. Considerando que a análise do ELC revelou teor de carboidratos totais 6,2 vezes superiores à concentração de proteínas (Tabela 1), ausência de carboidratos redutores (dados não mostrados), e que o fungo *B. rhodina* é produtor de EPS (Dekker e Barbosa, 2001), a distribuição de proteínas com atividade de PPO-I nas frações R100 e R30 pode estar relacionada com a formação de complexos de diferentes tamanhos entre as moléculas de lacases e EPS, pois, essas macromoléculas podem assumir pesos moleculares variáveis. A complexação PPO-I/EPS pode ser resultante de interações de natureza polar entre o grande número de grupamentos hidroxílicos livres das moléculas de glucose formadoras do EPS botriosferana (Barbosa *et al.*, 2003), e os grupamentos hidrofílicos das porções proteica e/ou glicosídica das lacases. Duas lacases extracelulares de *Botrytis cinerea* induzidas por suco de uva e ácido gálico apresentaram 16 e 20% de aminoácidos ácidos, respectivamente, e mais de 10% dos aminoácidos treonina e serina, demonstrando a presença de grupamentos ionizáveis e polares em moléculas de lacases (Marbach *et al.*, 1984).

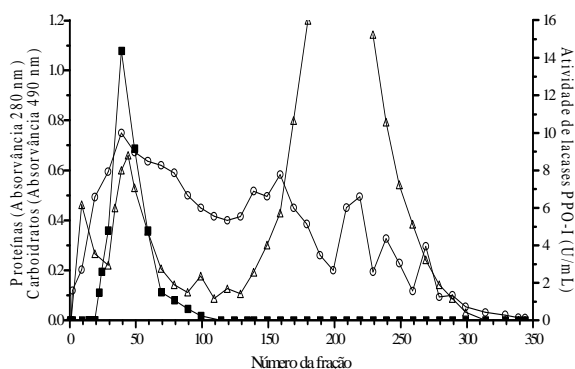
O perfil obtido pela cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex G-100 da fração R30

mostrou a separação de um pico inicial entre as frações 22 a 69 (Figura 1), contendo 1,3 mg de proteínas com elevada atividade de lacases PPO-I e 6,5 mg de carboidratos (Tabela 1), que reforçaram as discussões anteriores sobre a formação de complexos PPO-I/EPS com maiores pesos moleculares, e, portanto, com menor tempo de retenção na coluna. O perfil cromatográfico mostra também a eluição de carboidratos em todas as frações coletadas e um segundo pico (frações 140 a 280) contendo proteínas sem atividade de PPO-I (Figura 1) que não foi estudado neste trabalho.

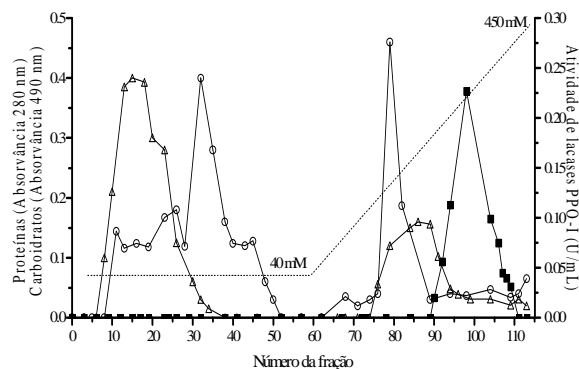
O perfil cromatográfico resultante da separação de proteínas da fração com atividade PPO-I proveniente da gel filtração e aplicada na resina DEAE-Celulose mostrou a desorção de uma fração com atividade PPO-I quando o gradiente linear de concentração do tampão citrato-fosfato alcançou cerca de 350 mM (Figura 2). As frações combinadas (91 a 110) apresentaram 0,13 mg de carboidratos e 0,08 mg de proteínas, equivalentes a 60% e 40%, respectivamente (Tabela 1). Os referidos percentuais indicaram que a proporção entre carboidratos e proteínas reduziu acentuadamente de 6,2, verificado inicialmente no ELC, para 1,6 na fração separada pela DEAE-Celulose, demonstrando que a elevação da força iônica do tampão de eluição pode ter interferido nas interações entre estas moléculas tornando a técnica eficiente para separação do complexo PPO-I/EPS. Por outro lado, a Tabela 1 mostra que a fração obtida pela cromatografia DEAE-Celulose apresentou considerável redução da atividade específica de PPO-I de 345 para 70, enquanto que durante as etapas de ultrafiltração e exclusão molecular, que separaram parcialmente os carboidratos das lacases, a atividade específica de PPO-I aumentou 9 vezes (de 38 para 345). Esses resultados demonstraram a influência do EPS sobre a atividade e/ou estabilidade das lacases PPO-I. Segundo Gianfreda *et al.* (1999), a redução da atividade das lacases isoladas parece estar relacionada com a separação do EPS, cuja função já foi referida como uma molécula de suporte e de proteção de lacases.

**Tabela 1.** Purificação de lacases PPO-I do fungo *Botryosphaeria rhodina* induzidas com álcool veratrílico.

Etapas da purificação	Prot. Total (mg)	Carb. Total (mg)	Relação carb./prot	Atividade total (U)	Ativ. Específica (U/mg)	Rendimento (%)			Fator purific.
						Prot	Carb.	Ativid	
ELC	32	199	6,2	1.217	38	100	100	100	1
Ultrafiltração									
R100	19	157	8	571	30	59	79	47	0,8
R30	4,4	26	6	467	106	14	13	38	2,8
Cromatografia Sephadex G-100	1,3	6,5	5	449	345	4	3,2	37	9
Cromatografia DEAE-Celulose	0,08	0,13	1,6	5,6	70	0,3	0,06	0,5	1,8



**Figura 1.** Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100 da fração R30 obtida pela ultrafiltração contendo 4,44 mg de proteínas e 26,17 mg de carboidratos. Proteínas ( $\Delta$ ), carboidratos ( $\circ$ ) e atividade de lacases PPO-I ( $\blacksquare$ ). Eluição em tampão citrato-fosfato 40 mM pH 5,0, fluxo 0,3 mL/min., frações de 3,0 mL. Frações reunidas de 22 a 69. Vo=120 mL definido em solução de blue-dextran 5 mg/mL não demonstrado no gráfico.

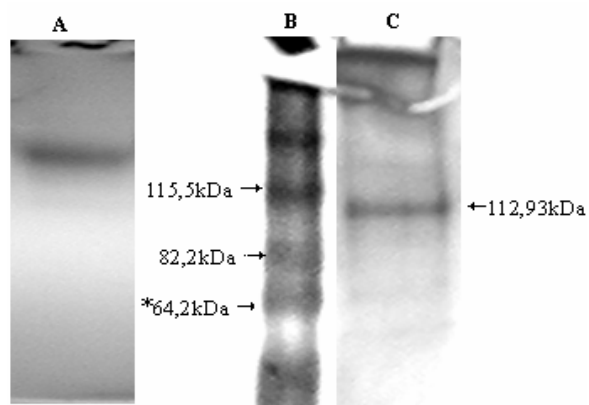


**Figura 2.** Cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose da fração obtida da Sephadex G-100 contendo 1,28 mg de proteínas e 6,48 mg de carboidratos totais. Proteínas ( $\Delta$ ), carboidratos ( $\circ$ ) e atividade de lacases PPO-I ( $\blacksquare$ ). Eluição em gradiente linear de concentração de tampão citrato-fosfato de 40 a 450 mM (.....) pH 5,0 a partir da fração 60, fluxo 1 mL/min., frações de 1,0 mL.

### Eletroforese PAGE

A eletroforese PAGE em condições nativas da fração obtida da cromatografia DEAE-Celulose revelou somente uma banda colorida correspondente ao substrato ABTS oxidado, indicando a presença de proteínas com atividade de lacases PPO-I (Figura 3A). Em condições dissociantes, a eletroforese PAGE também revelou uma banda de proteína com mobilidade relativa correspondente ao peso molecular estimado de 113 kDa (Figura 3B, C). Na literatura, encontramos relatos de lacases com pesos moleculares muito variados de 60 a 390 kDa (Call e Mücke, 1997; Wesenberg *et al.*, 2003), porém é necessário considerar que devido à interferência das cadeias glicosídicas, a ligação do SDS na glicoproteína é

menor em relação às proteínas padrão não glicosiladas, promovendo menor migração no gel poliácridamida e resultados de estimativas de peso molecular erroneamente mais elevados (Carlsson, 1993). Palonen *et al.* (2003), demonstraram que lacases deglicosiladas com endoglicosidases sofreram um decréscimo de apenas 5%-7% do peso molecular determinado por SDS-PAGE.

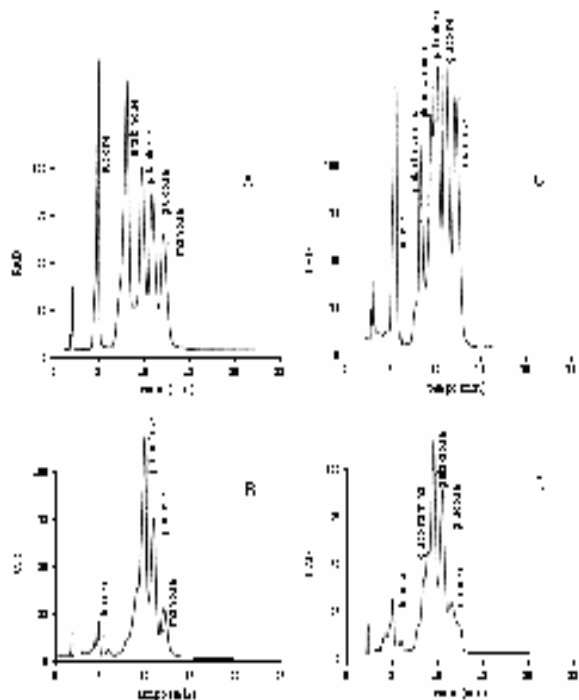


**Figura 3.** Eletroforese PAGE do extrato purificado de lacases PPO-I de *Botryosphaeria rhodina* induzidas em álcool veratrílico e purificadas. Condições nativas com 10% de acrilamida, tampão TRIS-glicina e revelação por incubação do gel em sol. de ABTS em tampão citrato-fosfato 120 mM pH 3,0/50°C (A); Condições desnaturantes em SDS-PAGE de 8 a 18% de acrilamida em tampão TRIS-HCl pH 8,9 e revelação por coloração nitrito de prata dos padrões de pesos moleculares 181,8 kDa; 115,5 kDa; 82,2 kDa; 64,2 kDa\* (banda de orientação rosa); 48,8 kDa; 37,1 kDa; 25,9 kDa; 19,4 kDa; 14,8 kDa; 6,0 kDa (B) e 20  $\mu$ g de PPO-I (C).

### Identificação de monossacarídeos

A análise cromatográfica em HPAEC-PAD para pesquisa de monossacarídeos neutros no hidrolisado da fração de lacases PPO-I obtida no último passo de purificação detectou componentes com tempos de retenção correspondentes aos padrões de fucose, galactose, glucose e manose (Figura 4 A, B). A mesma técnica cromatográfica foi utilizada para pesquisa de monossacarídeos aminados, obtidos por hidrólise apropriada, na fração de lacases. A detecção do componente com tempo de retenção correspondente à glucosamina (Figura 4 C, D) mostrou que a PPO-I isolada é, provavelmente, uma proteína de natureza glicoproteica, uma vez que os açúcares fucose e glucosamina são monossacarídeos comumente encontrados na porção carboidrato *N*- ou *O*- ligada as glicoproteínas (Montreuil *et al.*, 1994). Os monossacarídeos neutros e aminados identificados na fração isolada da DEAE-Celulose possivelmente correspondem ao percentual de carboidratos (60%, Tabela 1) discutidos

anteriormente. Duas formas moleculares de lacases extracelulares produzidas pelo fungo *Botrytis cinerea* continham arabinose, xilose, manose, galactose e glucose, e apresentaram 70% e 80% de carboidratos, dependendo do agente indutor empregado (Marbach *et al.*, 1984).

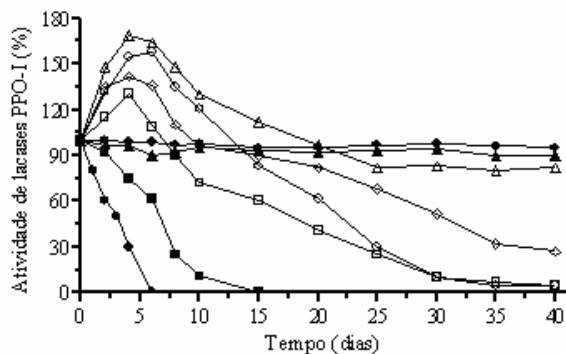


**Figura 4.** Análise por HPAEC/PAC das lacases PPO-I de *Botryosphaeria rhodina*, induzida e purificada após cromatografia em DEAE-Celulose. (A) Padrão de açúcares neutros; (B) produto da hidrólise ácida das lacases para açúcares neutros; (C); padrão de açúcares aminados e (D) produto da hidrólise ácida das lacases para açúcares aminados.

#### Estabilidade de PPO-I

Os resultados obtidos durante os testes de estabilidade (Figura 5) demonstraram que o ELC apresentou uma inesperada elevação de atividade de PPO-I até o 10º dia de armazenamento nas 4 condições de temperatura testadas. Após esse período, observou-se que o ELC apresentou estabilidade sob congelamento e 82% da atividade inicial no 20º dia sob refrigeração a 4°C. Considerando que, neste trabalho, o ELC apresentou teor de carboidratos muito superior ao teor de proteínas, e que a separação de grande parte desses carboidratos foi observada durante todas as etapas da purificação, os resultados da elevação da atividade de PPO-I, demonstrada pelo ELC durante os primeiros dias do teste de estabilidade, podem estar relacionados com a presença de EPS não complexados com as lacases, que poderiam,

inicialmente, ser responsáveis por impedimentos estéricos de contato entre o centro ativo da enzima e o substrato. Gil-ad *et al.* (2001) relataram que a hidrólise de  $\beta$ -glucanas produzidas pelo fungo *Botrytis cinerea* dobrou a atividade de lacases extracelulares, indicando, segundo os autores, que os exopolissacarídeos poderiam ser responsáveis pela formação de envoltórios de proteção responsáveis pela liberação das enzimas de ataque deste fungo fitopatogênico. Por outro lado, a Figura 5 mostra que a fração separada pela cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100, com menor teor de carboidratos, manteve pelo menos 90% de atividade a 4°C e -18°C durante os 40 dias do teste, demonstrando a influência do EPS complexado sobre a estabilidade das lacases PPO-I. Uma lacase de *Pleurotus ostreatus* induzida por ácido ligninosulfônico e imobilizada em Eupergit® perdeu somente 2% de atividade quando mantida a 4°C durante 10 dias (Hublik e Schinner, 2000). A temperatura de 20°C e a partir de três descongelamentos sucessivos promoveram drásticas reduções da atividade das lacases de ambos extratos analisados, quando comparados com as demais condições testadas.



**Figura 5.** Estabilidade de lacases PPO-I do fungo *Botryosphaeria rhodina* induzidas por álcool veratrílico. Extrato livre de células (marcadores vazios) e fração separada pela cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100 (marcadores preenchidos) sob refrigeração a 4°C ( $\diamond$   $\blacklozenge$ ), 20°C ( $\square$   $\blacksquare$ ); sob congelamento ( $\triangle$   $\blacktriangle$ ) e sob congelamentos sucessivos ( $\circ$   $\bullet$ ).

#### Conclusão

As condições de cultivo do fungo *Botryosphaeria* utilizadas neste trabalho produziram lacases PPO-I induzidas por álcool veratrílico com elevada estabilidade, quando complexadas ou imobilizadas em polissacarídeos extracelulares (EPS), também produzidos pelo fungo.

A utilização de métodos baseados na separação por pesos moleculares favoreceu a atividade das lacases PPO-I, possivelmente porque retiraram

excedentes de EPS produzidos pelo fungo, porém não complexados com as lacases, o que resultou em maior exposição das enzimas para o contato com o substrato. A elevação da força iônica desestabilizou prováveis interações de natureza polar responsáveis pela formação do complexo PPO-I/EPS e separou uma fração homogênea de glicoproteínas com peso molecular estimado de 113 kDa, contendo 60% de carboidratos, 40% de proteínas e os monossacarídeos fucose, galactose, manose, glucose e glucosamina constituindo a porção carboidrato da molécula. A fração homogênea apresentou, entretanto, baixa atividade PPO-I demonstrando a importância do EPS sobre a atividade e estabilidade dessas lacases.

### Agradecimentos

FWH, Obara agradece à Fundação Araucária/Pr e à Capes pela concessão da Bolsa de Mestrado. Os autores agradecem à PROPPG-UEL e à Fapesp pela concessão dos recursos financeiros, e aos professores Dra. Aneli de Melo Barbosa e Dr. Robert F. H. Dekker pelo fornecimento da cepa e das condições de cultivo do fungo *Botryosphaeria rhodina*.

### Referências

BARBOSA, A.M. *et al.* Veratryl alcohol as an inducer of laccase by ascomycete *Botryosphaeria* sp, when screened on polymeric dye poly R-478. *Let. Appl. Microbiol.*, Oxford, v. 23, p. 93-96, 1996.

BARBOSA, A.M. *et al.* Structural characterization of *Botryosphaeria*: a (1→3; 1→6)-β-D- glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 338, p. 1691-1698, 2003.

BRADFORD, M.M.A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

CALL, H.P.; MÜCKE, I. Minireview: history, overview and applications of mediated ligninolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym-Process). *J. Biotechnol.*, Amsterdam, v. 53, p. 163-202, 1997.

CARLSSON, S.R. Chapt 1. Isolation and Characterization of Glycoproteins. In: FUKUDA, M.; KOBATA, A. (Ed.). *Glycobiology – A Practical Approach*, 2 ed. New York: Oxford University Press, 1993.

CHEFETZ, B. *et al.* Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, DC, v. 64, p. 3175-3179, 1998.

CONNELLY, A. *et al.* Study of the white-rot fungal degradation of selected phthalocyanine dyes by capillary electrophoresis and liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 451, p. 259-270, 2002.

CORRADI da SILVA, M.L. *et al.* Purification and structural characterization of (1→3; 1→6)-β-D-glucans

(botryospheran) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon source: a comparative study. *Carbohydrate Polymers*. v. 61, n. 1, p. 10-17, 2005.

DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 28, p. 81-88, 2001.

DEKKER, R.F.H. *et al.* A simple method for monitoring chromatography column eluates for laccase activity during enzyme purification. *Biotechnol. Lett.*, Dordrecht, v. 22, p. 105-108, 2000.

DEKKER, R.F.H. *et al.* A new role for veratryl alcohol: regulation of synthesis of lignocellulose-degrading enzymes in the ligninolytic ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp.; influence of carbon source. *Biotechnol. Lett.*, Dordrecht, v. 23, p. 1987-1993, 2001.

DEKKER, R.F.H. *et al.* The effect of lignin-related compounds on the growth and production of laccases by the ascomycete, *Botryosphaeria* sp. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 30, p. 374-380, 2002.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination sugars and related substances. *Anal. Chem.*, Washington, DC, v. 28, p. 350-356, 1956.

ELIFIO, S.L. *et al.* A lectin from the lichenized basidiomycete *Dictynema glabratum*. *New Phytologist*, Cambridge, v. 145, p. 327-334, 2000.

FREIRE, R.S. *et al.* Electrochemical biosensor-based devices for continuous phenols monitoring in environmental matrices. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 1-9, 2002.

GARCIA, J.E. *et al.* GenBank; accession number: AY612337. April 29, 2004.

GIANFREDA, L. *et al.* Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*, v. 3, p. 1-25, 1999.

GIL-AD, N.L. *et al.* The possible function of the glucan sheath of *Botrytis cinerea*: effects on the distribution of enzyme activities. *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v. 199, p. 109-113, 2001.

GOMES, S.A.S.S.; REBELO, M.J.F. A new laccase biosensor for polyphenols determination. *Sensors*, v. 3, p.166-175, 2003.

HUBLIK, G; SCHINNER, F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of the phenolic pollutants. *Enzyme Microbiol. Technol.*, New York, v. 27, p. 330-336, 2000.

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

LEONOWICZ, A. *et al.* Fungal laccase: properties and activity on lignin. Review. *J. Basic Microbiol.*, Berlin, n. 3-4, p. 185-227, 2001

MARBACH, I. *et al.* Molecular properties of extracellular *Botrytis cinerea* laccase. *Phytochemistry*. New York, v. 23, n. 12, p. 2713-2717, 1984.

MONTREUIL *et al.* Chap 5 Glycoproteins p. 184, In:

- CHAPLIN, M.F.; KENNEDY, J.F. *Carbohydrate Analysis – A Practical Approach*. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1994.
- NIELSEN, B.L.; BROWN, L.R. The basis of colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, New York, v. 141, p. 311-315, 1984.
- PALONEM, H. *et al.* Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 33, p. 854-862, 2003.
- QUAN, De *et al.* Characterization of an amperometric laccase electrode covalently immobilized on platinum surface. *J. Electroanal. Chem.*, v. 561, n. 1, p. 181-189, 2004.
- ROSSATO, S.S. *et al.* Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 1-19, 2001.
- SCHLIEPHAKE, K. *et al.* Transformation and degradation of the diazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 27, p. 100-107, 2000.
- VASCONCELOS, A.F.D. *et al.* Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Proc. Biochem.*, London, v. 35, p.1131-1138, 2000.
- VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Genetic Bulletin*. v. 13, p. 42-43, 1956.
- WESEMBERG, D. *et al.* White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.*, New York, v. 22, p. 161-187, 2003.

Received on May 13, 2004.

Accepted on September 21, 2005.