

## Produção de Protease e Lacase por Basidiomicetos

**Fabiola Dorneles Inácio<sup>1,2</sup>, Paulo Bueno<sup>1</sup>, Sayuri Nichida<sup>1</sup>, Kevin Vernier<sup>2</sup>, Clara Alice Silva<sup>2</sup>, Rosane Marina Peralta<sup>1</sup>, e Cristina Giatti Marques de Souza<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Bioquímica

<sup>2</sup>Instituto Federal do Paraná – Campus Jacarezinho

CEP 86400-000 Jacarezinho – Paraná - E-mail: fabiola.inacio@ifpr.edu.br

### RESUMO

*Existe um crescente interesse pelas proteases devido à possibilidade de aplicação industrial das mesmas. Nas indústrias, as proteases contribuem para o desenvolvimento de processos ou produtos de alto valor agregado. Além disso, muitos produtos de ação fibrinolítica utilizados atualmente possuem efeitos colaterais indesejáveis. Este trabalho teve como objetivo estudar a produção de protease e lacase por basidiomicetos cultivados em resíduos agroindustriais. Além disso, foi avaliada a atividade fibrinolítica de um extrato enzimático bruto através de metodologia em placa. *P. pulmonarius*, *G. lucidum* e *Trametes sp.* produziram  $161,8 \pm 6,2$ ;  $175,6 \pm 2,0$  e  $192,5 \pm 2,6$  U/mL, respectivamente. O extrato bruto de *G. lucidum* apresentou atividade fibrinolítica, com formação de halo de hidrólise inclusive mais expressivo que na placa controle, com plasmina. Os dados obtidos devem ser considerados significantes pelo fato de que trabalhos recentes da literatura têm enfatizado tal capacidade proteolítica e fibrinolítica a partir de extratos enzimáticos purificados.*

**Palavras-chave:** enzimas, *Ganoderma*, atividade fibrinolítica, basidiomicetos, protease.

### INTRODUÇÃO

A proteólise é um processo essencial para todos os organismos vivos. Crescimento e morte celular, coagulação sanguínea e defesa imunológica são alguns exemplos da importância das proteases na manutenção da homeostase nos indivíduos<sup>1</sup>. As proteases são enzimas que catalisam reações hidrolíticas, onde as moléculas de proteínas são degradadas em peptídios e aminoácidos<sup>2</sup>. Existe um crescente interesse por tais enzimas devido à possibilidade de aplicação industrial das mesmas. Suas propriedades, como especificidade por substrato, temperatura e pH ótimos de atividade, mecanismo catalítico e estabilidade, diferem muito devido a esse grupo ser grande e complexo<sup>3</sup>.

Das enzimas industriais, 75% são hidrolases, sendo que as proteases representam aproximadamente 40% do total das hidrolases utilizadas na indústria e são responsáveis por aproximadamente 60% da venda total de enzimas no mundo<sup>2</sup>. Nas indústrias, as proteases contribuem para o desenvolvimento de processos ou produtos de alto valor agregado<sup>4</sup>. Além disso, muitos produtos farmacêuticos de ação fibrinolítica utilizados atualmente possuem efeitos colaterais indesejáveis, tais como hemorragia intestinal no tratamento via oral e baixa especificidade à fibrina, além de custos relativamente altos. Dessa forma, a atividade fibrinolítica de proteases produzidas por micro-organismos vem despertando maior interesse médico e comercial<sup>5</sup>.

Estudos recentes com espécies de *Pleurotus* mostraram que esse gênero é produtor de proteases que parecem participar do complexo mecanismo ligninolítico, degradando a enzima lacase em determinadas fases do crescimento fúngico<sup>6,7</sup>.

Este trabalho teve como objetivo estudar a produção de protease e lacase pelos basidiomicetos *Pleurotus pulmonarius*, *Ganoderma lucidum* e *Trametes* sp. cultivados em resíduos agroindustriais. Além disso, a partir da melhor produção proteolítica, foi avaliada a atividade fibrinolítica do extrato enzimático bruto de *G. lucidum*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cultivos

A partir de 3 discos de micélio com 10 mm de diâmetro dos basidiomicetos *P. pulmonarius*, *G. lucidum* e *Trametes* sp., foram realizados cultivos sólidos em frascos Erlenmeyers de 125 mL. Os cultivos foram compostos de meio mineral Vogel<sup>8</sup> e os seguintes resíduos agroindustriais: bagaço de milho, bagaço de cana e farelo de trigo. Os cultivos sólidos com cada substrato foram realizados com umidade inicial de 85% e incubados sem agitação em estufa a 28°C por tempos determinados (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 dias), e interrompidos com a adição de 20 mL de água destilada. Os filtrados foram considerados os extratos enzimáticos brutos. Após a condição de melhor produção de protease, o extrato bruto correspondente foi utilizado para um teste de atividade fibrinolítica.

### Atividades enzimáticas

A atividade de protease foi verificada usando-se caseína a 1% como substrato, preparada em tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,0<sup>9</sup>. Uma amostra (0,5 mL) do extrato bruto foi misturada ao substrato (0,5 mL). A mistura permaneceu incubada em banho-maria a 37°C por 20 min. Logo, 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,6 M foi acrescentado ao tubo de reação. Após 20 min em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min. Na sequência, 0,25 mL do sobrenadante foi homogeneizado com 0,650 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 0,5 M e 0,125 mL de Folin-Ciocalteu diluído quatro vezes. As amostras ficaram no escuro por 30 min e as leituras foram feitas a 660 nm. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade necessária para liberar 1 nmol de tirosina por minuto nas condições padronizadas. Lacase (foi determinada pelo acompanhamento da oxidação do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS) a 1 mM em tampão acetato 50 mM (pH 5,0), a 40°C por 5 min<sup>10</sup>.

### Atividade fibrinolítica

Em uma placa de Petri foi colocada uma solução de agarose a 1,2%, fibrinogênio humano a 0,4% e 20 U/ml de trombina humana. Após a formação do coágulo de fibrina, foram pipetados no centro da placa 20 µl do extrato bruto de *G. lucidum* cultivado em farelo de trigo por 4 dias. Como controle positivo foi utilizado plasmina humana (3U), enzima com atividade fibrinolítica conhecida, no lugar do extrato. As placas foram deixadas em repouso a 37°C por 5 horas para formação de um halo transparente em caso de resultado positivo, significando hidrólise da fibrina<sup>11</sup>. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fungos desenvolveram-se bem em todos os substratos testados, produzindo quantidades significativas das enzimas, com exceção de *Trametes* sp., que não produziu lacase e *G. lucidum*, que produziu baixas quantidades dessa enzima em bagaço de cana. Nas figuras 1 e 2 estão

apresentadas as curvas de crescimento de *P. pulmonarius* e *G. lucidum* nos resíduos bagaço de milho e farelo de trigo, respectivamente, onde a produção de protease atingiu os máximos valores ( $161,8 \pm 6,2$  U/mL e  $175,6 \pm 2,0$  U/mL, respectivamente). Foi observado o declínio abrupto da produção de lacase ao longo das curvas, que foi seguido pelo decaimento de protease, de forma mais branda. Esses resultados podem estar relacionados à idéia de que as proteases podem degradar a lacase em determinada fase do crescimento fúngico, porém, o estudo de outros parâmetros deve ser realizado para a confirmação deste evento.

Figura 1. Curva de crescimento de *Pleurotus pulmonarius* em bagaço de milho.

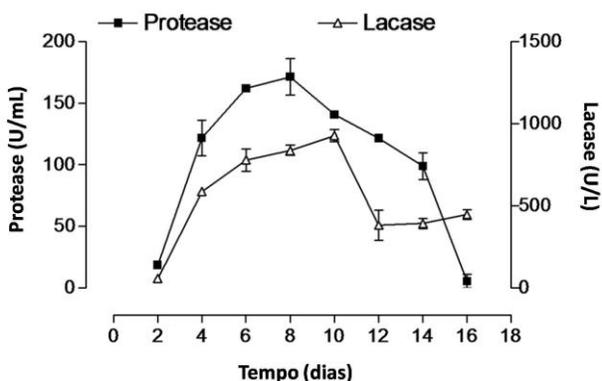


Figura 2. Curva de crescimento de *Ganoderma lucidum* em farelo de trigo.

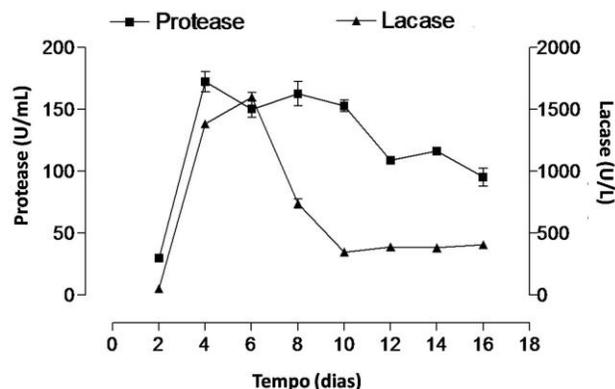
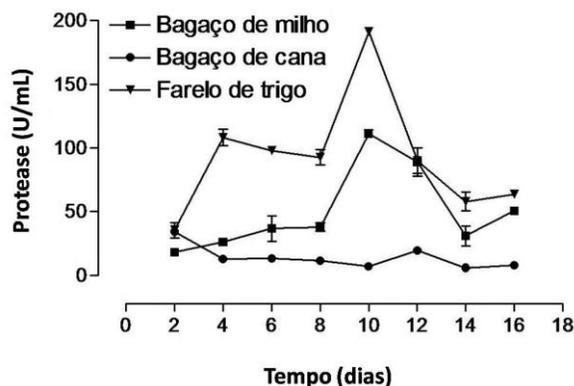


Figura 3. Produção de protease por *Trametes* sp. em resíduos agroindustriais.

*Trametes* sp. não produziu lacase nos substratos onde foi cultivado. Porém, a maior produção de protease foi observada por esse fungo ( $192,5 \pm 2,6$  U/mL) no décimo dia de cultivo (Fig. 3) em farelo de trigo.

A escolha do extrato enzimático bruto de *G. lucidum* cultivado no farelo de trigo para os testes de atividade fibrinolítica foi devido à alta produção proteolítica ( $175,6 \pm 2,0$  U/mL) em um curto período (4 dias). Houve formação de um halo transparente próximo ao local de pipetagem do extrato bruto, sendo esse halo, inclusive, mais expressivo do que na placa controle, contendo plasmina humana. Portanto, o extrato bruto de *G. lucidum* apresentou atividade fibrinolítica.



### CONCLUSÕES

Os basidiomicetos estudados neste trabalho foram bons produtores da enzima protease, que costuma ser mais explorada em estudos com ascomicetos. A atividade fibrinolítica do extrato bruto de *G. lucidum* deve ser considerada significativa pelo fato de que trabalhos recentes da literatura têm enfatizado tal capacidade a partir de extratos enzimáticos purificados. Dessa

forma, novos estudos merecem atenção neste aspecto, a fim de se conhecer melhor a propriedade fibrinolítica e buscar alternativas para sua utilização em tratamentos e terapias com baixo custo.

## REFERÊNCIAS

- (1) VANDEPUTTE-RUTTEN, L.; GROS, P. Novel proteases: common themes and surprising features. **Current Opinion Structural Biology**, v. 12, n. 6, p. 704-708, 2002.
- (2) SAID, D.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**, Editora Legis Summa, 2004.
- (3) RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p. 597-635, 1998.
- (4) SAVITHA, S.; SADHASIVAM, S.; SWAMINATHAN, K.; LIN, F. H. 2011. Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 2, p. 298-304, 2004.
- (5) PARK, S. E.; LI, M. H.; KIM, J. S.; SAPKOTA, K.; KIM, J. E.; CHOI, B. S.; YOON, Y. H.; LEE, J. C.; LEE, H. H.; KIM, C. S.; KIM, S. J. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from a culture supernatant of *Flammulina velutipes* mycelia. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 71, n. 9, p. 2214-2222, 2007.
- (6) CUI, L.; LIU, Q. H.; WANG, H. X.; NG, T. B. An alkaline protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 81-85, 2007.
- (7) CHA, W. S.; PARK, S. S.; KIM, S. J.; CHOI, D. Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6475-6481, 2010.
- (8) VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbiol Genet Bull**, v. 13, p. 42-47, 1956.
- (9) SUMANTHA, A.; DEEPA, P.; SANDHYA, C.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 5, p. 843-851, 2006.
- (10) PELÁEZ, F.; MARTÍNEZ, M. J.; MARTÍNEZ, A. T. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. **Mycological Research**, v. 99, n. 1, p. 37-42, 1995.
- (11) ASTRUP, T.; MÜLLERTZ, S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 40, n. 2, p. 346-351, 1952.