

SELEÇÃO DE BASIDIOMICETO PRODUTOR DE LACASE, IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA E APLICAÇÃO NA DESCOLORAÇÃO DO REMAZOL BRILLIANT BLUE R

Hellora Gabriela Moura Correia (PIBIC/CNPq), Cristina Giatti Marques de Souza (Coorientadora), Rosane Marina Peralta (Orientadora). E-mail: rmperalta@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Área e sub área de conhecimento: Ciências Biológicas, Bioquímica/Bioquímica de Microrganismos

Palavras-chave: *Ganoderma lucidum*; CLEAs; corantes.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de lacase por *Ganoderma lucidum* usando resíduos agroindustriais e a eficiência da enzima imobilizada na descoloração do corante RBB-R. A atividade enzimática foi quantificada com ABTS e os extratos brutos foram precipitados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, acetona, etanol e PEG 4000, seguidos de reticulação com glutaraldeído para formar CLEAs. A descoloração do RBBR (100 ppm, pH 4,0) foi avaliada espectrofotometricamente (400–800 nm) após 24 h. Elevada quantidade de lacase foi produzida em meio sólido composto apenas por farelo de trigo (1.487,4 U/L). A precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ resultou em maior atividade (2.575,2 U/L). Na descoloração, apenas o extrato bruto foi eficaz, indicando dependência de cofatores e mediadores, íons metálicos ou sinergia com outras enzimas não precipitadas nas condições avaliadas.

INTRODUÇÃO

Os métodos convencionais empregados em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) mostram-se ineficazes na remoção de micropoluentes, o que resulta na contaminação de recursos hídricos. Nesse contexto, os fungos do filo Basidiomycota ganham destaque por produzirem enzimas lignocelulolíticas, como a lacase e a manganês peroxidase, capazes de degradar poluentes e corantes como o corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR) (Alves, 2017; Moda, 2003). A aplicação de enzimas livres na biotecnologia enfrenta obstáculos, como a dificuldade de recuperação e reuso e a baixa estabilidade operacional. Uma alternativa promissora é a técnica de agregados enzimáticos cruzados (CLEAs), que dispensa suportes sólidos. Esse método consiste na precipitação enzimática, utilizando sais ou solventes orgânicos, seguida da reticulação com glutaraldeído, conferindo maior estabilidade e atividade à enzima. A precipitação de proteínas é um processo de purificação proteica que utiliza como primeira etapa de concentração e eliminação de proteínas indesejáveis. Sais e solventes orgânicos são precipitantes, como sulfato de amônio, álcoois e acetona. Os agentes ativantes (reticuladores), como o

glutaraldeído, é o mais utilizado para a reticulação. Esta abordagem utiliza enzimas parcialmente purificadas para descolorir o RBBR, tratando efluentes têxteis. O objetivo deste trabalho foi selecionar fungo(s) do filo Basidiomycota, para produção de enzima lacase e testar diferentes agentes precipitantes para imobilizar a enzima, por meio da reticulação com glutaraldeído e avaliar o potencial em descolorir o RBBR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Dez basidiomicetos da coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Alimentos (LBM-DBQ/UEM) - *Pleurotus albidus*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula boryana*, *Xylaria globosa*, *Phellinus linteus*, *Amyloporus campbelli* e três isolados de *Trametes* sp. (CM, U15, A6) foram reativados em Ágar Rosa de Bengala e Ágar Extrato de Malte (MEA) a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7–14 dias. Os isolados não contaminados foram transferidos para meio de bagaço de cana e ágar, contendo 0,1% de guaiacol. Os cultivos para produção de lacase foram realizados em cinco meios à base de resíduos: 1) (EFT) - extrato de farelo de trigo 12%; 2) (EFA) - extrato de farelo de aveia 12%; 3) (FABP) - farelo de aveia (2 g) + bagaço de cana (4 g) + casca de pupunha (2g); 4) (FTBP) - farelo de trigo (2 g) + bagaço de cana (4 g) + casca de pupunha (2 g); 5) (FT) - farelo de trigo (8 g). Os meios sólidos foram umedecidos (80%) com meio mineral. Após autoclavagem, todos os meios foram inoculados com três discos de micélio e incubados em estufa a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, por 7 dias. Os meios sólidos foram homogeneizados com água destilada gelada, filtrados e centrifugados (5000 rpm, 4°C , 10 min). Meios líquidos foram filtrados em papel filtro e a vácuo. A atividade da lacase foi quantificada espectrofotometricamente (420 nm) usando ABTS como substrato em tampão acetato de sódio (pH 4,0, 50 mM, 40°C), após 5 min de reação. Os extratos brutos foram submetidos à precipitação usando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (75%, m/v), etanol (1:3,v/v) acetona (1:2,v/v) e PEG 4000 (5 g, p/v), os precipitados foram reticulados com glutaraldeído (500 μL , 150 mM) e os CLEAs foram lavados com o tampão da enzima. Com o RBBR a 100 ppm, tampão acetato pH 4,0 e aproximadamente 550 U/L de enzima imobilizada, livre e extrato bruto, obtida do cultivo de FT e da precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (75%), foi realizada a descoloração do corante. Para a enzima livre, após precipitação, o material foi dialisado por 24 horas, sob refrigeração. Para os controles, a enzima foi inativada por fervura. As amostras foram incubadas sob agitação (28°C , 80 rpm, 24h) e a descoloração foi monitorada por espectrofotometria (400-800 nm).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O guaiacol é um substrato cromogênico eficaz para detecção da atividade de fenol oxidases, entre elas, a lacase. A reação forma um halo de coloração marrom avermelhado sob e ao redor da colônia do fungo em meios suplementados (D'Souza *et al.*, 2006). Este método foi utilizado para identificação de lacases em sete isolados, (Tabela 1).

Tabela 1: Seleção de produtores de fenol oxidases em meio contendo guaiacol.

Número	Basidiomicetos isolados	Halo de oxidação (cm)
1	<i>Ganoderma lucidum</i>	2,20±0,050
2	<i>Phellinus linteus</i>	1,62±0,080
3	<i>Pleurotus albidus</i>	2,13±0,056
4	<i>Pleurotus ostreatus</i>	1,80±0,090
5	<i>Trametes</i> sp. A6	1,40±0,300
6	<i>Trametes</i> sp. CM	1,78±0,070
7	<i>Trametes</i> sp. U15	1,83±0,130

Valores representados como média ± desvio padrão dos halos de oxidação dos basidiomicetos

G. lucidum foi escolhido para obtenção de lacase. O fungo produziu mais lacase ($3.181,93 \pm 1204,16$ U/L) no cultivo sólido FABP, comparado ao FTBP (1.882 U/L $\pm 578,95$). Meios líquidos de aveia e trigo tiveram produção abaixo de 100U/mL (dados não mostrados). A maior produção da enzima nos meios sólidos pode ter sido devido à semelhança do substrato com o ambiente natural dos fungos, favorecendo o crescimento microbiano, já que ocorre a liberação gradual de nutrientes e melhor difusão de O_2 (Pandey, 2003). Ao meio de FABP foram adicionados agentes precipitantes. A precipitação do extrato bruto com $(NH_4)_2SO_4$ 75%, mostrou maior atividade ($1.287,74$ U/L), enquanto solventes orgânicos (acetona: $972,458$ U/L; etanol: $732,703$ U/L), foram menos eficientes devido à formação de um gel de polissacarídeos da aveia e da pupunha, que precipitaram. A substituição do meio de cultura para a produção da lacase por farelo de trigo sozinho (FT), favoreceu a produção da enzima e eliminou interferentes da aveia. A atividade média da lacase nos cultivos foi de $1.487,40 \pm 61,07$ U/L. A Figura 1A, mostra as atividades recuperadas dos processos de precipitação e imobilização. A descoloração do corante RBBR foi observada com o uso do extrato bruto (Figura 1B). Enzima livre e enzima imobilizada não mostraram efeito sobre o grupo cromóforo do corante. Provavelmente o processo de precipitação e diálise removeu componentes importantes, como enzimas auxiliares e mediadores fenólicos respectivamente. Há evidências de que o RBBR não pode ser descolorido sem mediadores apenas por lacases fúngicas puras (Qin *et al.*, 2019).

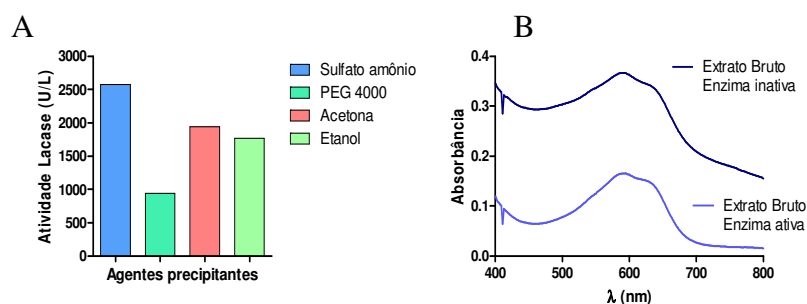


Figura 1 – Atividade da lacase após precipitação com diferentes agentes (A) e descoloração do corante RBBR pelo extrato bruto contendo lacase de *G. lucidum* (B)

CONCLUSÕES

Ganoderma lucidum destacou-se como melhor produtor de lacase entre os basidiomicetos testados tendo ótima produtividade da lacase em meio sólido, porém, o meio contendo aveia e casca de pupunha não proporcionou boa recuperação em solventes orgânicos devido à precipitação de polissacarídeos. A lacase produzida em meio composto por farelo de trigo teve maior atividade e rendimento. Na descoloração do RBBR o extrato bruto de farelo de trigo descoloriu melhor o corante que a enzima livre e a enzima imobilizada. Conclui-se que a elaboração de sistemas contendo mediadores são necessários para demonstrar o potencial das enzimas imobilizadas na biorremediação de corantes.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à PPG/UEM e ao LBM – DBQ-UEM, nossos agradecimentos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, C. R. **Estudo da comunidade de fungos gasteroides (Agaricomycetes, Basidiomycota) em três ecossistemas da Mata Atlântica da Região Sul do Brasil**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências – Botânica) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/234373>. Acesso em: 5 jun. 2025.
- D'SOUZA, D. T. *et al.* Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. **Enzyme Microb Technol**, v. 38, p. 504-511, 2006. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/222433207>. Acesso em 25 ago. 2025.
- MODA, E. M. Produção de *Pleurotus sajor-caju* em bagaço de cana-de-açúcar lavado e o uso de aditivos visando sua conservação “in natura”. 2003. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003. Acesso em 24 set. 2025
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 81–84, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X02001213>. Acesso em: 12 jul. 2025.
- QIN, P. *et al.* Optimization of laccase from *Ganoderma lucidum* decolorizing remazol brilliant blue R and Glac1 as main laccase-contributing gene. **Molecules**, v. 24, n.

34º Encontro Anual de Iniciação Científica
14º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



12 e 13 de novembro de 2025

21, p. 3914, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/21/3914>.
Acesso em: 12 ago. 2025.