

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO E TEMPERATURA ÓTIMA PARA ATIVIDADE DE MANGANÊS PEROXIDASE PRODUZIDA POR *Trametes villosa*

Volnei Brito de Souza¹; Marília Lordêlo Cardoso²; Maria Gabriela Bello Koblitz³

1. Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduando em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: volnei15@gmail.com
2. Orientadora, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: lilaengal@yahoo.com.br
3. Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mkoblitz@uefs.br

PALAVRAS-CHAVES: manganês peroxidase, *Trametes villosa*, condições ótimas

INTRODUÇÃO

O fungo *Trametes villosa* é um basidiomiceto de podridão branca capaz de produzir enzimas extracelulares hidrolíticas (celulases e hemicelulases) e oxidativas (ligninolíticas) envolvidas na degradação dos componentes majoritários da madeira. As enzimas ligninolíticas têm diversas aplicações na biotecnologia, como degradação de corantes residuais da indústria têxtil e biopolpação. A manganês peroxidase (MnP) é a enzima ligninolítica extracelular mais comum produzida por quase todos os fungos de podridão branca, que pode ser produzida por cultivo em substratos ligninocelulósicos.

Por oxidar não especificamente uma variedade de substâncias fenólicas e não fenólicas, além de lignina, a MnP pode degradar também diversos poluentes tóxicos. Atualmente, a MnP é considerada a enzima chave na degradação de lignina e é produzida pela maioria dos fungos, mais frequentemente que lignina peroxidase, e sua produção por esses organismos depende de fatores ambientais, sendo fortemente regulada pelos nutrientes.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as condições ótimas de pH e temperatura para a atividade da enzima ligninolítica manganês peroxidase produzida por *Trametes villosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Atividade de Manganês Peroxidase

A atividade de manganês peroxidase foi determinada pela oxidação de vermelho de fenol na presença de peróxido de hidrogênio, segundo metodologia modificada de Kuwahara et al (1984). O meio reacional foi composto de: 500 µL de sobrenadante do extrato centrifugado, 50 µL de sulfato de manganês (2,0 mM), 200 µL de albumina bovina (0,5%), 50 µL de peróxido de hidrogênio (2mM) em tampão succinato de sódio (0,2 M; pH 4,5), 100 µL de lactato de sódio (0,25 M), 100 µL de vermelho de fenol (0,01%). A reação foi acompanhada pela leitura da absorbância a 610 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Cary 50 Varian), registrada a cada 10 segundos num tempo total de cinco minutos, e paralisada com 40 µL solução de hidróxido de sódio (2,0 M). Após a paralisação, a absorbância foi acompanhada por mais um minuto. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Cálculo da atividade específica

O teor de proteína bruta do extrato enzimático de manganês peroxidase foi determinado pelo método de Lowry. O método consistiu na reação de 500 µL do extrato bruto enzimático com 5 mL do reagente de Lowry por 10 minutos. Então, 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu foram adicionados e, após 10 minutos, procedeu-se à leitura da absorbância a 660 nm, em espectrofotômetro (UV-Vis). A atividade específica foi calculada pelo quociente da atividade enzimática pelo teor de proteína bruta do extrato. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Dertminação do pH ótimo

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

O pH ótimo foi avaliado pela variação do pH do meio reacional de 3,0 a 11,0, com intervalo de 1,0, incluindo o pH 4,5 utilizado na metodologia de detecção. A atividade enzimática e específica foi determinada conforme descrito anteriormente. A análise de variância, com teste de Tukey, foi realizada no software Sisvar (5.0) para comparação entre as médias.

Determinação da Temperatura ótima

O efeito da temperatura foi avaliado variando-se a temperatura de reação entre 20 e 90°C, com intervalo de 10°C. A atividade enzimática e específica foi determinada conforme descrito anteriormente. A análise de variância, com teste de Tukey, foi realizada no software Sisvar (5.0) para comparação entre as médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação do pH ótimo

A Tabela 1 apresenta o resultado da atividade de MnP determinada a diferentes valores de pH, para o extrato bruto obtido nas condições de cultivo otimizadas (umidade 80%, temperatura 20°C, pH 9,38 e 15 dias). Cada ponto representa a média de três replicatas. Os dados foram tratados no SISVAR (5.0) e pela análise de variância, houve diferença significativa, tendo o valor máximo no pH 4,5, o qual foi considerado, então, o pH ótimo para a atividade de MnP de *Trametes villosa*. A Figura 1 mostra o gráfico da atividade específica de MnP *versus* pH, com o pico em 4,5.

Tabela 1: Atividade de MnP a diferentes valores de pH do meio reacional

pH	MnP (U/L) (média ± desvio)
3,0	132,030 ± 20,001 ^a
4,0	81,253 ± 11,379 ^b
4,5	170,724 ± 1,022 ^c
5,0	63,961 ± 11,402 ^b
6,0	2,870 ± 0,495 ^d
7,0	3,423 ± 1,430 ^d
8,0	31,148 ± 23,212 ^d
9,0	19,277 ± 2,252 ^d
10,0	7,857 ± 0,255 ^d
11,0	18,299 ± 7,358 ^d

Médias com letras iguais não diferem entre si, segundo o teste de Tukey

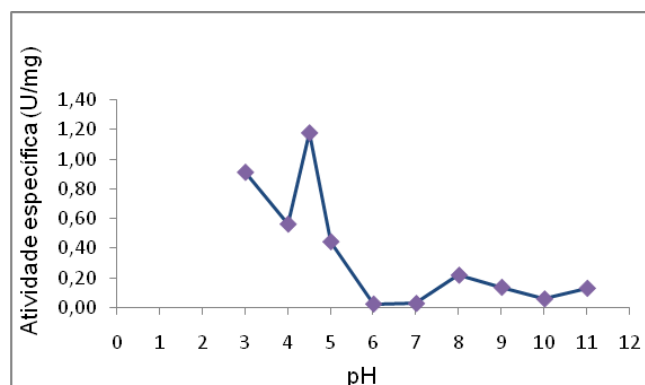


Figura 1: Variação da atividade específica de MnP com o pH reacional.

O pico que aparece no pH 8,0 poderia indicar a presença de isoenzimas que é muito comum em extratos brutos de MnP, contudo não houve diferença significativa entre a faixa de pH testada de 6,0 a 11,0.

Determinação da Temperatura ótima

A Tabela 2 apresenta o resultado da atividade de MnP a diferentes temperaturas de reação, para o extrato bruto obtido nas condições de cultivo otimizadas (umidade 80%, temperatura 20°C, pH 9,38 e 15 dias). Cada ponto representa a média de três replicatas. Os dados foram tratados no SISVAR (5.0) e pela análise de variância, não houve diferença significativa. A Figura 2 mostra o gráfico da atividade específica de MnP *versus* temperatura, cujos pontos ligados formam quase uma linha reta.

Tabela 2: Atividade de MnP a diferentes temperaturas de reação.

Temperatura (°C)	MnP (U/L) (média ± desvio)
20	186,330 ± 4,540 ^a
30	189,000 ± 2,405 ^a
40	189,667 ± 4,174 ^a
50	185,333 ± 2,860 ^a
60	186,667 ± 1,219 ^a
70	190,667 ± 13,515 ^a
80	170,667 ± 11,472 ^a
90	176,000 ± 5,508 ^a

Médias com letras iguais não diferem entre si, segundo o teste de Tukey.

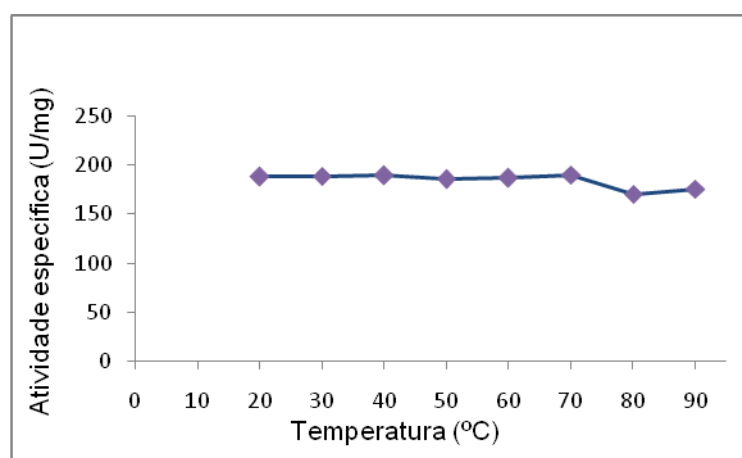


Figura 2: Variação da atividade específica de MnP com a temperatura reacional.

O resultado da determinação de temperatura ótima não esteve de acordo com o esperado, já que normalmente as enzimas apresentam um pico de atividade a uma dada temperatura. Uma vez que o tempo de reação é curto (apenas cinco minutos), a alta estabilidade do extrato bruto a diferentes temperaturas pode ter contribuído para este resultado.

CONCLUSÃO

O pH ótimo para a atividade de manganês peroxidase de *Trametes villosa* foi de 4,5.

A temperatura ótima não esteve de acordo com o esperado, o que pode ser explicado pela alta estabilidade do extrato bruto. Modificações na metodologia, como diluição do extrato bruto enzimático, ou alteração do tempo de reação poderá indicar resultados diferentes para a temperatura ótima.

REFERÊNCIAS

- ELISASHVILI, V., et al. 2007. Lentinus edodes and Pleurotus species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology*.
- KAPICH, A. N., et al. 2004. Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. *Enzyme and Microbial Technology*. 34, p. 187-195.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. N.; GOLD, M. H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett*;169:247–50.
- LEE, J. 2007. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*. 56, p.1-24.
- MARTÍNEZ, A. T. et al. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*. 8, p. 195-204.
- MARTÍNEZ, A. T. 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*. 30, p; 425-444.
- SONGULASHVILI, G. et al. 2007. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology*. 41, p. 57-61.
- TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. 2003. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13, p. 169-179.
- VALÁSKOVÁ, V. et al. 2007. Production of lignocellulose-degrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest. *Soil Biology and Biochemistry*. 39, p. 2651-2660.
- VARGAS-GARCÍA, M. C., et al. 2007. In vitro Studies on lignocellulose degradation by microbial strains isolated from composting processes. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 59, p. 322-328.