

OTIMIZAÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS PRODUZIDAS PELO FUNGO *Fomitella Supina*

**Jackeline Lays Guimarães Carneiro¹; Aristóteles Góes Neto²;
João Ronaldo Tavares de Vasconcelos-Neto³; Hélio Mitoshi Kamida⁴**

1. Bolsista PROBIC/CNPq, Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: jackielays@hotmail.com

2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: arigoesneto@gmail.com

3. Participantes do projeto, Doutorando em Biotecnologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ronaldoneto20@yahoo.com.br

4 Participantes do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mailhmkamida@terra.com.br

PALAVRAS-CHAVE: *Fomitella supina*, ligninases, biotecnologia

INTRODUÇÃO

Os fungos desempenham grande importância ecológica: são responsáveis pela ciclagem de diversas substâncias no meio, principalmente a madeira (através da decomposição da matéria orgânica). Neste contexto, a biodegradação de lignina (componente da madeira que apresenta maior resistência à biodegradação) é um dos mais importantes fatores determinantes da degradação da madeira e conseqüentemente do ciclo de carbono na biosfera (Camargo, 2003). Dentre os fungos, o grupo dos basidiomicetosafiloforóides, reúne uma grande diversidade de família, gêneros e espécies com grande importância biotecnológica devido a produção de enzimas extracelulares (Goés-neto, 1994; Landecker, 1990). Porém o conhecimento da diversidade de fungos no Brasil é ainda escasso, sendo geralmente restrito às áreas de estudo dos especialistas (Bicudo & Menezes 1996).

O trabalho teve o objetivo de realizar a otimização da produção de enzimas ligninolíticas de fungos basidiomicetos previamente selecionados e estudar alguns parâmetros de cultivo para otimizar a produção das enzimas ligninolíticas (lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase) pelos fungos coletados. A justificativa do presente trabalho reside no fato da escassez de inventários de fungos basidiomicetos em regiões do nordeste brasileiro e o pouco conhecimento do potencial biotecnológico deste grupo pela comunidade científica. Sabendo que grupos enzimáticos, produzidos por outros fungos do mesmo grupo, como as lacases e lignases possuem numerosas aplicações biotecnológicas na indústria química, de combustíveis, de alimentos, cervejarias, vinícolas, têxtil, papel e agricultura é de grande importância a investigação deste grupo de fungos.

MATERIAL E MÉTODOS:

Amostras:

Foram utilizados 28 espécimes de fungos basidiomicetosafiloforóides coletados dentro das Plantações Michelin, na chamada Reserva Plantações Michelin do Brasil no município de Ituberá no sul do Estado da Bahia a 200 km da cidade de Salvador-BA. Tais amostras encontram-se atualmente depositadas na Coleção de Cultura de micro-organismo da Universidade Estadual de Feira de Santana (CCMB) e os exemplares depositados no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS).

Seleção dos isolados quanto ao potencial enzimático

Para a seleção do isolado com melhor atividade ligninolítica as médias obtidas na seleção para enzimas ligninolíticas (realizado em anterior trabalho) foram submetidas à Análise de Variância (ANAVA) com aplicação do teste de Tukey com índice de significância de 5%.

Atividade Enzimática: Lacase, manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP) Estudo de parâmetro de otimização para produção enzimática

A partir da seleção realizada entre os fungos isolados aquele que apresentou melhor resultado para as enzimas ligninolíticas foi utilizado nas análises subseqüentes. Para indicar qual seria a melhor condição de cultivo onde o fungo apresentaria a maior excreção das enzimas LiP, MnP e Lacase foi utilizado um planejamento experimental multivariável através da aplicação do software Statística (6.0), na qual o software forneceu planilhas de ensaio e as superfícies de resposta. As variáveis estudadas foram: temperatura de incubação, pH inicial do meio, fonte de carbono e fonte de nitrogênio.

Determinação da atividade das enzimas de interesse

O fungo selecionado foi cultivado em meio para indução enzimática com a fonte de nitrogênio e carbono pré-estabelecidas no planejamento experimental (Fonte de Nitrogênio – 3g; K_2HPO_4 – 1g; KCl – 0,5g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01g; Fonte de Carbono – 5g; H_2O destilada - 1000mL) (*Czapek's solution Agar* modificado). O pH, temperatura, fonte de carbono e de nitrogênio foram ajustados de acordo com a tabela do planejamento experimental. Após o período de incubação de 7 dias as culturas foram filtradas em papel de filtro com poros de 14 μ m em sua grande maioria, em seguida este filtrado foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min sendo o sobrenadante utilizado para as determinações enzimáticas.

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação de siringaldazina, segundo metodologia modificada de Szklarz (1984). A atividade de LiP foi determinada pela oxidação de álcool veratrílico em presença de peróxido de hidrogênio, segundo Tien e Kirk (1984). 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).

Estudo de parâmetro de otimização para atividade enzimática pH ótimo

O estudo da influência do pH na oxidação do substrato específico (siringaldazina) para cada enzima pelo extrato enzimático foi conduzido com tampão citrato-fosfato (pH 3,0 a 6,0) e tampão fosfato (pH 7,0 a 8,0) a 50 mM e tampão Tris HCl (pH 9,0). As atividades enzimáticas foram determinadas como descrito na metodologia padrão, alterando-se apenas o tampão nos pH avaliados.

Temperatura ótima

A influência da temperatura na atividade enzimática do extrato bruto foi verificada na faixa de 20-90°C, utilizando um banho termostático próximo do espectrofotômetro. O extrato enzimático foi pré-incubado nas temperaturas de reação de 20 à 90°C por 10 minutos e, logo após, determinada atividade enzimática de fontes de carbono específicas. A atividade residual foi determinada empregando-se a metodologia padrão de oxidação de substrato específico para cada enzima.

RESULTADOS:

Estudo de otimização dos parâmetros para produção de enzimas

Após o processo de seleção o fungo *Fomitella supina* foi testado quanto a potencial atividade para as enzimas LiP, MnP e Lacase com parâmetros pré estabelecidos.

Atividade enzimática

A atividade para lacase foi a melhor entre as enzimas estudadas. Apresentando 250 U.L⁻¹ como maior atividade nos parâmetros de pH 4,0, tendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio, glicerol como fonte de carbono e temperatura de 35°C com 7 dias de incubação.

Segundo Hatvani&Mécs (2003), quando pesquisaram a atividade enzimática em *Lentinula edodes* crescendo em resíduo de malte, sob diferentes formas de incubação, no meio líquido, encontraram a maior atividade de lacase no 30º dia de incubação com aproximadamente 100 U.L⁻¹. Os resultados demonstram que dentre os parâmetros estudados a fonte de nitrogênio e o pH foram significativos para a atividade de lacase. Para a LiP e a MnPo experimento montado não apresentou resultados estatísticos significativos (R^2 inferior a 0,75 e F_{calc} não significativo em nível de 25%) . Contudo nestes casos a baixa correlação entre as variáveis estudadas e o fato da variabilidade entre os resultados não ser significativa, pode esta ligada as condições de cultivo. O fungo testado pode não produzir a enzima nas condições específicas (composição do meio, pH e temperatura) as quais foi submetido, mas em outras condições pode vir a expressar a atividade. Compostos fenólicos causam inativação da atividade de LiP e interferem na oxidação do álcool veratrílico por peroxidases, causando inibição competitiva pelo substrato enzimático (CAMELO et al. 1999). Nestas condições de cultivo torna-se necessária a utilização de outros substratos para a determinação da atividade de LiP

Determinação do pH ótimo:

Foi determinado como melhor pH para a atividade da lacase (utilizando como substrato a seringaldazina) produzida pelo fungo *Formitella supina* o pH 5,00 ocorrendo um decréscimo da atividade imediatamente abaixo ou acima destes pHs. No estudo de Garcia *et al.*, 2006 para a determinação do pH ótimo das lacases de *Pycnoporussanguineus* utilizando o mesmo substrato, o pH ótimo encontrado foi 4,8 para LAC 1 e 4,2 para LAC 2 sendo que LAC1 apresentou uma pequena mudança na taxa de oxidação da seringaldazina entre pH 4,2 e 5,0.

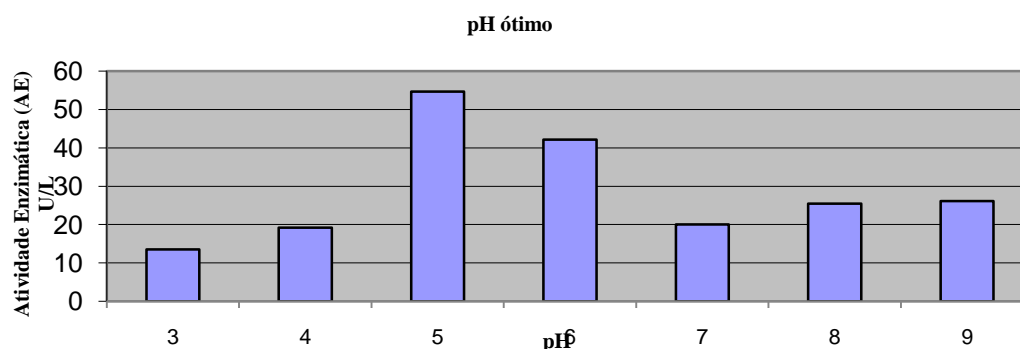


Figura 01: gráfico representando Atividade Enzimática X pH

Determinação da temperatura ótima.

Foi determinada 50° C como temperatura ótima para atividade da lacase produzida pelo fungo *Fomitella supina*, apresentando uma diminuição de atividade em temperaturas mais baixas e em tem mais altas que 50° C. Comparando com o estudo de Garcia *et al.* (2006) observa-se que o resultado encontrado apresenta a mesma temperatura ótima da Lac 2 de *Pycnoporussanguineus*(50°C).

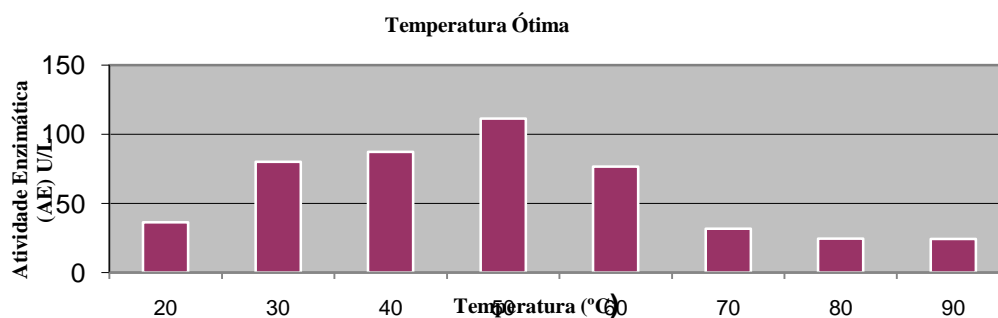


Figura 02: Gráfico representando Atividade Enzimática x Temperatura

CONCLUSÃO:

Entre os 28 fungos estudados, os 12 espécimes selecionados apresentaram potencial atividade enzimática o que revela um potencial biotecnológico latente nestes organismos. Contudo durante os estudos de parâmetros para a otimização o *Fomitellaspina* (fungo selecionado como tendo o maior potencial para produção de enzimas ligninol) apresentou atividade mensurável apenas para enzima lacase, sendo que LiP e MnP não apresentaram atividade satisfatória nas condições testadas. Duas hipóteses foram levantadas para a falta de atividade para essas enzimas. (i) as condições de cultivo não favoreceram a atividade dessas enzimas; (ii) Sucessão da atividade de diferentes enzimas em tempos diferentes durante a degradação do substrato na incubação, ou seja, o tempo destinado a incubação na indução da atividade enzimática pode ter favorecido a atividade da lacase (maior atividade) pois esta enzima normalmente é a primeira a acessar o substrato lignocelulolítico. Assim, a atividade para a lacase foi a melhor entre as enzimas estudadas. Nas condições de cultivo com pH 4,0, temperatura 35°C, tendo como fonte de nitrogênio extrato de levedura e fonte de carbono glicerol. O fungo *Fomitella supina* apresentou pH 5,00 como o melhor pH para atividade enzimática da lacase e 50°C como temperatura ótima para atividade da lacase.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BICUDO, C.E.M.; MENEZES, N.A. 1996. *Biodiversity in Brazil – a first approach*. CNPq
- CARAMELO, L.; MARTÍNEZ, M. J.; MARTINEZ, A. T.. A Search for Lignolytic Peroxidases in the Fungus *Pleurotuseryngii* Involving α -Keto- γ -Thiomethylbutyric Acid and Lignin Model Dimers. *Applied And Environmental Microbiology*, -----, v. 65, n. 3, p.916-922, 1999
- GARCIA, T. A. 2006. *Purificação e caracterização das lacases de Pycnoporussanguineus*. 2006. 126 f. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília.
- GÓES-NETO, A. 1994. *Diagnóstico da Biodiversidade de Macromicetos do Estado da Bahia: Evolução histórica e situação atual*. 1994. Monografia - Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia. Salvador.
- HATVANI, N.; MÉCS, I. 2003. Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, New York, v. 55, p.199-203.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*. v.169, p. 247-250.
- LANDECKER, E. M. 1990. *Fundamentals of the fungi*. 3. ed. New Jersey: prentice hall.
- SZKLARZ, G. et al. 1984. *Mycologia*, v. 81, p. 234
- TIEN, M.; KIRK, T.K. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂ requiring oxygenase. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, v. 81, p. 2280-2284.