

## Produção da enzima lignina peroxidase por fungos filamentosos utilizando óleo diesel como substrato

M.G. Silva<sup>1</sup>; D.G. Almeida<sup>1</sup>; R.C.M. Miranda<sup>2</sup>; C.C.S. Maciel<sup>1</sup>; N.B. Gusmão<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-Pe, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-Se, Brasil

maciel.carla@gmail.com

(Recebido em 02 de agosto de 2011; aceito em 10 de outubro de 2011)

---

A poluição por óleo diesel causa impacto ambiental. Neste contexto objetivou-se selecionar fungos que utilizem este petroderivado como fonte de carbono, transformando-o pela produção de lignina peroxidase. Foram selecionados microrganismos isolados de solo do Rio Beberibe-Recife-Pe produtores de polifenoloxidasas, sendo otimizadas as condições de cultivo para a produção da enzima através de Planejamento Experimental Fatorial Fracionado cujas variáveis avaliadas foram: ferro, glicose, inóculo e % diesel. Cerca de 56% dos fungos foram produtores de polifenoloxidasas. A maior produção de lignina peroxidase foi 3042 U/L e a glicose foi o único fator que influenciou na produção da enzima. Estes resultados são indicativos do uso potencial deste microrganismo para compor novas tecnologias para tratamentos de resíduos recalcitrantes.

Palavras-chave: polifenoloxidase, petroderivados, fungo filamentoso.

The diesel pollution causes environmental impact. In this context the objective was select fungi that use this petroderivative as carbon sources, transforming it into the production of lignin peroxidase. We selected microorganisms isolated from soil of Beberibe River-Recife-Pe polyphenol producers, and the optimal growing conditions for enzyme production by Fractional Factorial Design whose variables evaluated were: iron, glucose, inoculum and % diesel. About 56% of fungi were producers of polyphenol, the higher production of lignin peroxidase was 3042 U/L and glucose was the only factor that influenced the production of the enzyme. These results are indicative of the potential use of this microorganism to compose new technologies for treatment of recalcitrant residues.

Keywords: polyphenol, petroderivatives, filamentous fungi.

---

### 1. INTRODUÇÃO

Volumes elevados de petróleo e derivados são introduzidos nos ecossistemas, em especial nas etapas que envolvem a cadeia produtiva do petróleo como o transporte e o armazenamento [1]. O óleo diesel é o derivado do petróleo mais utilizado no mundo, sendo formado por uma mistura complexa de hidrocarbonetos como alcanos, aromáticos policíclicos e baixas concentrações de enxofre, nitrogênio e oxigênio, além de metais como chumbo, níquel, sódio, cálcio, cobre e urânio [2].

Em casos de contaminação ambiental, são utilizadas diversas estratégias de tratamento, sendo a biorremediação uma das alternativas que se destacam em virtude do reduzido impacto ao meio ambiente. Neste processo, utilizam-se microrganismos com capacidade metabólica de transformar ou degradar estes compostos [3].

Os fungos filamentosos têm se destacado nestes processos de biodegradação por sua capacidade de metabolizar polímeros complexos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e esta capacidade se deve à produção de enzimas extracelulares não específicas, tais como lignina peroxidases, manganês peroxidases e lacases, utilizadas na oxidação da lignina, um polímero que também apresenta estruturas aromáticas variáveis [4, 5, 6].

A lignina peroxidase (LiP), comumente isolada de fungos de degradação branca (podridão branca ou clara) e de degradação parda (podridão parda), é uma glicoproteína hémica que catalisa uma variedade de compostos fenólicos, não fenólicos, hidratos de carbono aromáticos e outros compostos que se encontram também na composição do óleo diesel [7,8].

Neste contexto, o presente trabalho objetiva selecionar um fungo potencialmente produtor de lignina peroxidase, bem como otimizar as condições para produção da mesma.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados inicialmente trinta e sete fungos filamentosos isolados do solo da margem do Rio Beberibe-Recife-PE. Estes microrganismos foram identificados por numeração crescente de um a 37. Atualmente, estes fungos encontram-se mantidos em meio extrato de malte Agar (MEA) na Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Para selecionar os fungos potencialmente produtores das enzimas polifenoloxidasas, foi usado o meio sólido Bushnell Hass, acrescido com (0,5%) de ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) [9]. Nestas condições, os fungos foram incubados a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1$  e ao longo de cinco dias foi observada a formação do halo em torno do micélio com coloração âmbar característico da "Reação de Bavendamm" [10].

Após esta seleção inicial, os fungos com potencial para a produção de polifenoloxidasas foram cultivados em meio Agar malte por 5 dias. Foram inoculados três discos de gelose de micélio (6 mm de diâmetro) de cada fungo, foram transferidos para frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de solução de Manachini [11] acrescida de ácido gálico 0,5% e incubados durante 72 horas a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1$  em condição estática. Após esse período, as amostras foram filtradas e o extrato enzimático submetido à análise da atividade da lignina peroxidase, de acordo com Maciel *et al.* (2010) [12]. A oxidação do álcool veratrílico foi verificada pela mistura reativa composta por 1mL de tampão tartarato de sódio 125mM pH3.0, 500  $\mu\text{L}$  de álcool veratrílico 10mM, 500  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 2mM e 500  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio e a aparência do aldeído veratrílico foi determinada a 310nm.

Os fungos produtores de lignina peroxidase foram avaliados quanto a sua capacidade de produzir a enzima utilizando o óleo diesel como substrato. Para isto, três discos de gelose (6mm de diâmetro) contendo micélio de fungo previamente crescido em meio extrato de malte Agar, foram inoculados em frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL de solução de Manachini, acrescido de 1% de óleo diesel e incubados durante 72 horas a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1$  em condição estática. Após esse período, as amostras de cada frasco foram filtradas e com o extrato enzimático foi avaliada a atividade da lignina peroxidase [12]. O óleo Diesel utilizado foi cedido pela Petrobras Transporte S.A. - TRANSPETRO.

O fungo que apresentou uma maior produção da enzima Lignina Peroxidase na presença do óleo diesel foi selecionado para otimização da produção da mesma. Para isto foi aplicado um Planejamento Experimental Fatorial Fracionado ( $2^{4-1}$ ) com dois níveis -1 e +1, e três repetições nos pontos centrais gerando onze condições experimentais obtidas pelo software Statistica 6.0 (Tabela 1). As variáveis foram: concentração de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), concentração de óleo diesel, concentração de glicose, e quantidade de inóculo fúngico como variáveis independentes e produção da enzima Lignina Peroxidase como variável resposta. Todos os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer contendo meio Bushnell Hass com as concentrações e condições estabelecidas de acordo com o planejamento experimental.

Tabela 1 – Matriz experimental do Planejamento Fatorial Fracionado ( $2^{4-1}$ )

Experimentos	Valores Reais				Valores codificados			
	FeCl <sub>3</sub> (g)	Glicose (g)	Inoculo (0,6mm)	Diesel (ml)	FeCl <sub>3</sub> (g)	Glicose (g)	Inoculo (0,6mm)	Diesel (ml)
1	0	0	1	1	-1	-1	-1	-1
2	0,01	0	1	5	1	-1	-1	1
3	0	0,5	1	5	-1	1	-1	1
4	0,01	0,5	1	1	1	1	-1	-1
5	0	0	5	5	-1	-1	1	1
6	0,01	0	5	1	1	-1	1	-1
7	0	0,5	5	1	-1	1	1	-1
8	0,01	0,5	5	5	1	1	1	1
9 (C)	0,005	0,25	3	3	0	0	0	0
10 (C)	0,005	0,25	3	3	0	0	0	0
11 (C)	0,005	0,25	3	3	0	0	0	0

Os resultados obtidos foram analisados através do teste *t* de Student com o auxílio do software Statística 6.0. Uma forma de identificar se um dado fator estudado ou interação entre os fatores são ou não significativos no processo consiste na análise de *t* de Student

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pouco mais da metade dos fungos (56,75%) foram produtores de polifenoloxidasas. A literatura aponta outros autores que selecionaram microrganismos produtores de lignina peroxidase utilizando ácido gálico como substrato para verificação da “Reação de Bavendamm” [12, 13]

Após verificar os fungos promissores quanto à produção das polifenoloxidasas, foi realizado a seleção quantitativa. Dos vinte e dois fungos selecionados previamente, sete fungos se destacaram com produção de lignina peroxidase acima de 4000U/L. Estes resultados foram analisados com base na análise de variância estatística realizada através do teste *t* de Student, com o auxílio do software Statística 6.0 com  $p \leq 0,05$ . A investigação da produção de lignina peroxidase para selecionar os fungos mais promissores utilizando um substrato padrão se torna importante para a comprovação da utilização do substrato xenobiótico como indutor da produção destas enzimas. Souza *et al.*, (2008) [14] selecionou fungos produtores de fenoloxidasas utilizando solução de Manachini com farelo de trigo (0,5%) como substrato indutor e obtiveram 30 fungos produtores das enzimas.

Dentre os fungos que apresentaram um maior potencial de produzir a enzima, os sete foram selecionados para a produção enzimática utilizando um xenobiótico como substrato. Na figura 1 pode-se observar a produção de lignina peroxidase após 3 dias de incubação utilizando o óleo diesel. O fungo que demonstrou um maior potencial na produção da enzima em estudo foi o FDG 08 com atividade de 2132U/L de enzima. Apesar da produção enzimática ter sido maior quando utilizou-se ácido gálico como substrato, o óleo diesel por ser um xenobiótico formado por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, representa um substrato indutor da produção de lignina peroxidase e evidencia o potencial destes fungos em produzir a enzima em diferentes substratos. De acordo com Silva *et al.*, (2003) a secreção dessas enzimas por fungos, provavelmente resulta de modificações fisiológicas características de mudança do metabolismo primário para secundário sob diferentes condições fisiológicas e tipo de substrato [15].

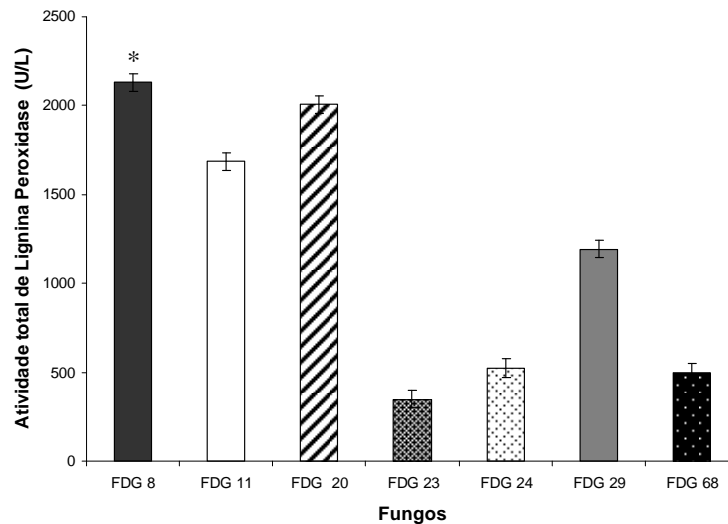


Figura 1 – Atividade da Lignina Peroxidase para os fungos selecionados após 3 dias de incubação utilizando o óleo diesel como substrato. \* =  $p < 0,02$ .

Após análise estatística dos resultados da atividade da enzima Lignina Peroxidase pelos fungos selecionados, os parâmetros significativos foram considerados, quando menores que 2%. Observou-se que ocorreu diferença estatística significativa entre o fungo FDG8 e os demais fungos testados ( $p < 0,02$ ). Utilizando a mesma metodologia empregada neste trabalho, Maciel *et al.* (2010) [12], investigaram a produção de lignina peroxidase por fungos isolados de ambientes contaminados com petroderivados em solução de Manachini obtendo valores de atividade enzimática entre 94 e 144U/L, bem inferiores aos encontrados no corrente trabalho. Caso esse valor calculado seja maior que o tabelado, entende-se que este fator ou interação é importante [16].

A análise estatística dos resultados obtidos no planejamento experimental revelou que nos experimentos *oito* e *nove* ocorreram a maior produção de lignina peroxidase: 3042U/L – sétimo dia e 2997U/L- quinto dia, respectivamente (figura 2). Para o experimento *oito*, verificou-se que para obtenção da maior produção possível, o experimento deveria ser conduzido até o sétimo dia ( $p=0,00023$ ). Como não houve diferença estatística entre os resultados obtidos no experimento *oito* e *nove* ( $p = 0,46570$ ), ambas as condições são favoráveis para a produção de lignina peroxidase. Analisando-se então a efetividade do processo, as condições do experimento *nove* são mais indicadas pois os constituintes do meio de cultivo Bushnell Hass estão reduzidos à metade, utiliza-se bem como menos inóculo e diesel. Estas características associadas à somente 5 dias de processo constituiriam vantagens para um processo de produção em larga escala. Os efeitos são definidos através da mudança ocorrida na resposta quando esta se move do nível baixo (-1) para o nível alto (+1). Esses efeitos podem ser classificados em duas categorias: efeitos principais e efeitos de interação [17]. Como previsto, os experimentos nove, dez e onze apresentaram resultados semelhantes, pois representavam os pontos centrais do planejamento preconizando as mesmas condições.

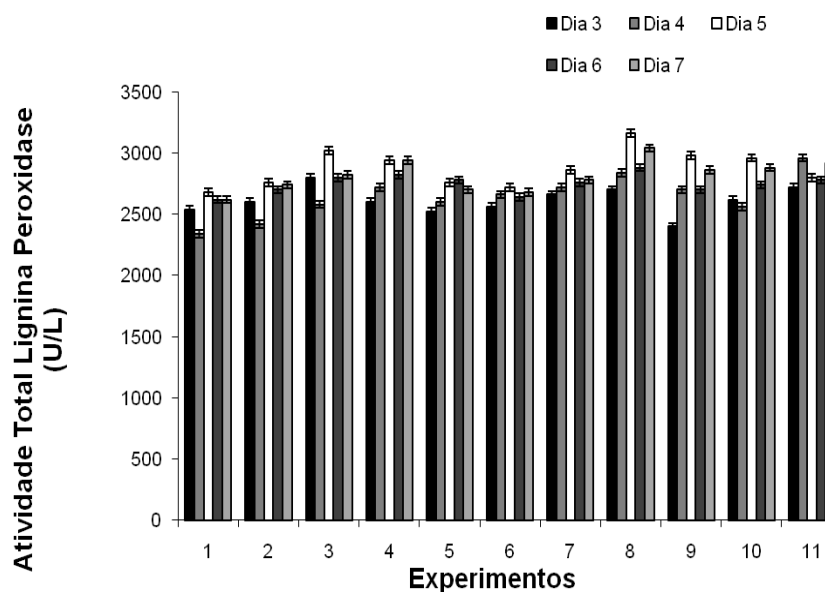
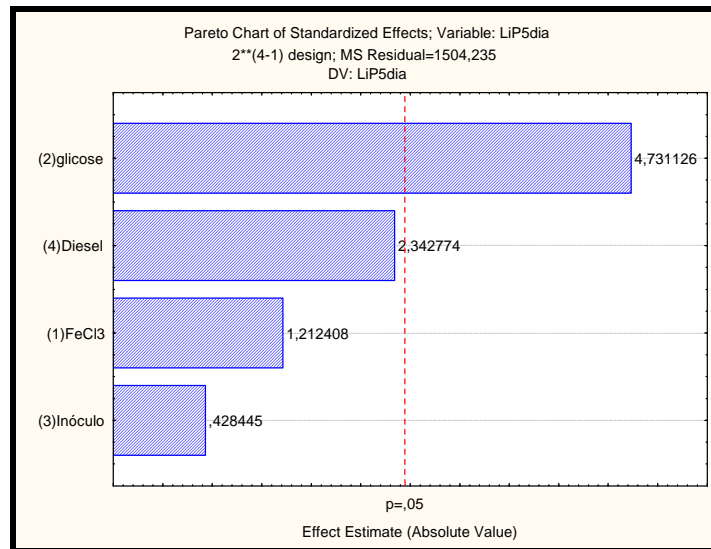


Figura 2 – Atividade total da enzima Lignina Peroxidase produzida pelo fungo selecionado nos onze experimentos estabelecidos pelo planejamento experimental do terceiro ao sétimo dia de processo.

Também de acordo com as análises estatísticas houve um aumento da síntese enzimática na presença de glicose, confirmando que esse substrato contribui positivamente para a produção da enzima. Vários autores estudaram o efeito de diferentes fontes de carbono como glicose, glicerol, xilose e dextrana e verificaram que a glicose foi a melhor fonte de carbono para a produção de fenoloxidas por *Trametes* sp. [18]. Com o propósito de compreender melhor o que foi dito nos parágrafos anteriores, é apresentado o gráfico de Pareto no quadro 1. Nesse gráfico podemos observar que além da glicose ser a variável que influencia no processo de síntese enzimática, ela age de modo positivo para que isso ocorra. Isso significa dizer que a concentração de glicose é significativa no processo, que ao passar do nível menor para o maior obtém-se um acréscimo na produção enzimática representado pelo valor 4,731126. Ao passo que o teor de óleo Diesel,  $\text{FeCl}_3$  e inóculo não foram significativos. Este fenômeno pode ser explicado pois a glicose é a fonte de carbono mais utilizada pelo diversos grupos de microrganismos, tanto no crescimento como co-fator enzimático na produção de diversas enzimas. Como as enzimas do aparato lignolítico estão associadas ao metabolismo primário a glicose é um fator determinante para uma boa produção das mesmas.

Os hidrocarbonetos podem servir como fonte de carbono para o desenvolvimento de microrganismos. No entanto há a necessidade de outros nutrientes, como glicose, nitrogênio e o fósforo e micronutrientes, como enxofre, ferro, magnésio, cálcio e sódio. A disponibilidade desses elementos varia em diferentes ambientes e podem ser adicionados para estimular o co-metabolismo, otimizando dessa forma a biodegradação [19]. Arora *et al.*, (2001) [20], obtiveram cerca de 0.39 U/mL a 0.94 U/mL de lignina peroxidase por *Phanerochaete chrysosporium*. No presente trabalho, com fungos filamentosos, foram obtidos valores maiores tais como 3042 U/L. Como também neste trabalho obtivemos atividades enzimáticas maiores, em um período de apenas 5 dias de incubação e utilizando óleo Diesel, no entanto, Silva *et al.*, (2007) [21], ao estudar a capacidade de biodegradação de resíduos agrícolas por fungos basidiomicetos, linhagens pertencentes ao gênero *Pleurotus* sp. observaram que a atividade máxima foi de 2,50 U/L em um período de 60 dias de incubação, considerando que as linhagens apresentaram baixa atividade.



Quadro 1- Gráfico de Pareto cuja variável dependente é a produção enzimática de Lignina Peroxidase.

#### 4. CONCLUSÃO

Os fungos isolados do solo do Rio Beberibe apresentam potencial biotecnológico para a produção de enzimas polifenoloxidasas. O óleo diesel foi utilizado por alguns fungos como substrato indutor na produção de lignina peroxidase, com destaque para o fungo FDG 8 que foi considerado o melhor produtor desta enzima. Com o planejamento fatorial, foi possível determinar que a adição de glicose ao processo promoveu uma otimização na produção da enzima por este fungo, enquanto que o ferro e a variação nas concentrações do inóculo ou do diesel não influenciaram. O fungo FDG 8 se mostrou promissor para a produção de Lignina peroxidase utilizando o óleo diesel como substrato e é indicado para a produção desta enzima em larga escala, bem como a estudos posteriores com outros substratos xenobióticos, a fim de se caracterizar sua versatilidade metabólica.

1. READMAN, J.W.; FILLMANN, G.; TOLOSA, I.; BARTOCCI, J.; VILLENEUVE, J.P.; CATINNI, C.; LEE, L.D. Petroleum and PAH contamination of the Black Sea - *Marine Pollution Bulletin*. 44 (1) 48 – 62, 2002.
2. ADAM, G., DUNCAN, H. J. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environ Geochem Hlth*. 21, 353-357. 1999.
3. MACIEL, CCS, SOUZA, C.S., SILVA, R. VILLELA, A.L.S., SOUSA, M.F.V.Q., GUSMAO, N.B. Degradação de querosene de aviação por *Penicillium* spp., *Diálogos em Ciência*. 8 (23): 69-75, 2010.
4. JOHNSEN, A. R. et al. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*. 133 (1):71-84, 2005.
5. KUNZ, A. et al. Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. *Química Nova*. 25(1): 78-82, 2002.
6. VAN DEN BRINK, H.J.M. et al. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal. Gen Biol*. 23:1-17, 1998.
7. MOREIRA, N.; SÉRGIO, L. Enzimas Lignolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. *Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente*. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 110p, 2006.
8. DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: Melo, I.S.; Azevedo, J. L.; (Eds.). *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA. Documentos. 11.:269-292, 1997.

9. ATLAS, R. M.; Bioremediation of petroleum pollutants. *International Bioremediation & Biodegradation*. 317-327, 1995.
10. CONCEIÇÃO, D. M.; ANGELIS, D. A.; BIDOIA, E. D.; ANGELIS, D. F. Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, 72(1): 99-106, 2005.
11. MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARINI, C. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters*. 9 (3): 219-224, 1987.
12. MACIEL, C.C.S.; SOUZA, M.A.; GUSMÃO, N.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Produção de enzimas do complexo lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. *Exacta*. 8 (3): 299-305, 2010.
13. COELHO, V. K. L. ; BAPTISTA, N. M. Q.; SILVA, D. D. L.; MIRANDA, R. C. M. ; SENA, K. X. F. R. ; GUSMÃO, N. B. G. Descoloração do corante índigo carmim por bactérias isoladas de ambientes contaminados por petroderivados. *Revista Diálogos e Ciências*. 4(14), 129-141, 2010.
14. SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A. ; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*. Campinas, 28: 116-124, 2008.
15. SILVA, C.M. M. de S. et al. Production of phenol-oxidases and peroxidases by fungi isolated from irrigated rice. *Brazilian Journal of Microbiology*. 34, 53-55, 2003.
16. BORGES, R. M. H.,. Biodegradação em solo argiloso contaminado com petróleo. Rio de Janeiro. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 92p, 2001.
17. BAPTISTA, S. J. Seleção das melhores condições de biodegradação de petróleo em solo argiloso. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 89p, 2003.
18. ALVES, F. Modelagem e simulação de biorreator operando com fungos *Trametes Versicolor* para produção de enzima lacase. *Dissertação de Mestrado*. Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, SP, 80p, 2010.
19. ROSATO, Y. B. Biodegradação do petróleo. apud MELO I. S & AZEVEDO, J. L. Microbiologia Ambiental. Jaguariúna. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*. 14:307-334, 1997.
20. ARORA, D. S.; GILL, P. K., Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme Microbiol Technology*. 28:602-605, 2001.
21. SILVA, V.L.M.M. GOMES, W.C. ALSINA, O.L. Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. *Revista eletrônica de Materiais e processos*. 2:27-32, 2007.