

Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos

N. M. Q. Baptista¹; A. C. Santos¹; F. V. F. Arruda²; N. B. Gusmão²

¹Programa de Pós-Graduação da Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, 51670-901, Recife-Pe, Brasil

²Laboratório de Fármacos e Ensaios Antimicrobianos, Universidade Federal de Pernambuco, 51670-901, Recife-Pe, Brasil

nel.20@hotmail.com

(Recebido em 08 de novembro de 2011; aceito em 13 de janeiro de 2012)

As enzimas são biocatalisadores utilizados em diferentes setores industriais, além de poder ser empregadas em estudos da biologia molecular, aplicações biomédicas, no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos biotecnológicos e no tratamento de resíduos, podendo ser considerado a produção dessas enzimas como, um dos maiores setores da indústria biotecnológica. Os fungos vêm sendo amplamente utilizados na produção de substâncias de interesse econômico, como: enzimas, antibióticos, vitaminas e esteroides. Este trabalho tem como objetivo produzir enzimas ligninolíticas, por *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune* isoladamente e em consórcio, utilizando o óleo diesel como substrato nos meios de cultura Sabouraud e Bushnell Haas. Para a montagem do consórcio foi utilizado a metodologia de planejamento experimental do tipo Central Composto Rotacional tendo como variável independente a quantidade de blocos de gelose que compunham o inóculo e variável independente a produção enzimática. A produção de lignina peroxidase e lacase no meio caldo Sabouraud pelo fungo *Penicillium commune*, atingiu 2.500 U/L e 1.947 U/L respectivamente, enquanto que no mesmo meio adicionado com óleo diesel o fungo *Penicillium commune* apresentou uma atividade de 4.620 U/L. Quando o teste foi realizado em meio Bushnell Haas acrescido de óleo diesel observou-se que a produção de lacase pelo *A. terreus* e *C. echinulata* foi de 18.970 U/L e 18.705 U/L respectivamente. Para os ensaios em consórcios a lignina peroxidase apresentou melhores produções nos ensaios 1 e 2 quando produziu respectivamente, 2.666 U/L e 2.683 U/L; seguido do ensaio 10 e 11, com 2.649 U/L e 2.655 U/L respectivamente. Os fungos utilizados no trabalho demonstraram capacidade de produzir as enzimas do complexo lignolítico utilizando óleo diesel como substrato nos meios de cultivo Sabouraud e Bushnell Haas, além de servir como base para a nutrição microbiana nos processos de descontaminação do ambiente.

Palavras-chave: Enzimas; fungos filamentosos; óleo diesel; consórcios

Enzymes are biocatalysts used in different industrial sectors, and can be used in studies of molecular biology, biomedical applications, the development of analytical methodologies in the manufacturing of technological products and waste treatment. Can be considered as the production of these enzymes, one of the largest sectors of the biotechnology industry. In this sense the fungi have been widely used in the production of substances of economic interest, such as enzymes, antibiotics, vitamins and steroids. This work aims to produce ligninolytic enzymes by *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata*, *Penicillium commune* alone and in partnership, using diesel oil as a substrate in the culture media Sabouraud Bushnell and Haas. To assemble the consortium was used the methodology of experimental design Central Composite Rotational type the independent variable the number of blocks that made up the independent variable inoculum and enzyme production. The production of lignin peroxidase and laccase in Sabouraud broth by the fungus *Penicillium commune* reached 2,500 U / L and 1947 U / L respectively, while in the same medium, supplemented with diesel fungus *Penicillium commune* had an activity of 4.62 U / L. When the test was conducted in Bushnell Haas medium plus diesel fuel was observed that the production of laccase by *A. terreus* and *C. echinulata* was 18,970 U / L and 18.705 U / L respectively. For the tests in consortia lignin peroxidase showed better yields in trials 1 and 2 respectively when produced, 2,666 U / L and 2683 U / L, followed by testing 10 and 11, with 2649 U / L and 2655 U / L respectively. The fungi used in the study showed the ability to produced enzymes of the complex lignolitic using diesel oil as a substrate in inthe culture medium Sabouraud and Bushnell Hass, as well as, serving as basis for nutriton microbial decontamination processes in the environment.

Keywords: enzymes; filamentous fungi; diesel; consortia

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores utilizados nas indústrias podendo ser empregadas na biologia molecular e aplicações biomédicas [1] no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos tecnológicos e no tratamento de resíduos [2]. A biocatálise é a aplicação de enzimas livres ou de células íntegras como agentes catalisadores [3]. Alguns autores preferem utilizar definições mais específicas e considerar a tecnologia enzimática como a aplicação competitiva de enzimas em bioprocessos de grande escala [4].

A biocatálise apresenta muitas aplicações em diferentes setores industriais e muitas são também as áreas do conhecimento com interface no desenvolvimento, aplicação e avanço da tecnologia enzimática [5]. Na indústria é amplamente vista como a “terceira onda” da biotecnologia, em seguida às farmacêuticas e agrícolas. No centro desta tecnologia estão os catalisadores biológicos, ou melhor, as enzimas industriais. [6]. Os catalisadores biológicos em geral são bastante atraentes para a aplicação industrial, principalmente pela sua ação eficiente e seletiva. As reações mediadas por biocatalisadores resultam em elevados rendimentos com excelentes níveis de pureza, e minimizam a formação de subprodutos. Todas essas vantagens asseguradas pelos biocatalisadores ocorrem em condições reacionais brandas.

A produção e o uso de biocatalisadores industriais é uma área em expansão pela grande diversidade natural de biocatalisadores e também devido à disponibilidade de técnicas modernas para o melhoramento e otimização na seleção, produção, estabilização e modificação das enzimas industriais. Estas técnicas possibilitam a inserção de novos biocatalisadores nos processos industriais por contribuírem também na viabilidade econômica. A utilização de enzimas como catalisador traz vantagens imediatas aos processos que as utilizam: sua especificidade minimiza a formação de subprodutos e as condições mais brandas de reação resultam num menor consumo energético, como: temperaturas entre 25° a 40°C, pressão atmosférica, e pH em torno da neutralidade [7].

Devido à importância das enzimas fenoloxidasas nosso trabalho objetiva verificar a produção das enzimas ligninolíticas, lignina peroxidase e lacase, por *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As linhagens utilizadas foram: *Aspergillus terreus* URM 6069, *Cunninghamella echinulata* (em processo de catalogação) e *Penicillium commune* (em processo de catalogação) previamente isolados do sedimento de manguezal no Recôncavo Baiano e mantidos no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. Todos os fungos foram mantidos no meio Ágar Sabouraud a temperatura 4°C.

Para verificar se as culturas puras eram potencialmente produtoras das enzimas lacase e lignina peroxidase inicialmente os fungos foram cultivados, separadamente, em meio Agar Sabouraud (Peptona 40,0g/L, Glicose 10,0g/L, Agar 15,0g/L, pH =7,0) durante 5 dias, após este período três blocos de gelose (Ø 6mm), foram transferidos para frascos de Erlenmeyer (500 mL) contendo 100 mL dos meios caldo Sabouraud; caldo Sabouraud acrescido de 7% óleo diesel e caldo Bushnell Haas (KH₂PO₄ 1g, K₂HP 1g, NH₄NO₃ 1g, MgSO₄.7H₂O 0,2g FeCl₃ 0,05g, CaCl₂.2H₂O 0,02g) também acrescido de 7% de óleo diesel. Para o meio Bushnell Haas o óleo diesel foi usado como única fonte de carbono. Todos os ensaios foram mantidos sob condições estáticas durante sete dias a temperatura 28°C (± 2°C). As amostras de Óleo diesel foram cedidas pela Transpetro S/A.

Para verificar a potencialidade da culturas consorciadas na produção das enzimas ligninolíticas, o mesmo foi formado utilizando um planejamento experimental fatorial tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2³ onde incluiu 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios conforme matriz apresentada na Tabela 1. Esse planejamento foi realizado com o auxílio do software StatSoft 6.0, onde a variável dependente foi a concentração de inóculos. O meio utilizado para esse experimento foi o Bushnell Haas acrescido de 7% de óleo diesel e mantidos durante sete dias a temperatura 28°C (± 2°C) sob condições estáticas.

Para determinação da atividade enzimática das duas enzimas testadas, após o período de cultivo, o micélio foi separado do líquido metabólito por filtração utilizando papel de filtro modelo faixa branca da marca Qualy.

A atividade da lacase foi determinada usando 2,2-azino-bis-etilbentiazolina (ABTS). A mistura foi utilizada usando 0.1 mL de tampão acetato de sódio a 0.1M (pH 5.0), 0.8 mL de uma solução de ABTS a 0.03% (m/v) e 0.1 mL do extrato enzimático e a leitura da absorbância a 420 nm. A atividade da lignina peroxidase-LiP foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico (1995). A mistura foi composta por 1 mL de tampão tartarato de sódio 125 mM (pH3.0), 500 µL de álcool veratrílico 10 mM, 500 µL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 500 µL de extrato enzimático. Com a adição do peróxido de hidrogênio a reação foi iniciada e a leitura feita a 310 nm. Uma unidade de cada enzima foi definida como 1,0 µmol de produto formado por minuto sob as condições do ensaio. Ambas as metodologias foram preconizadas por Buswell *et al.* [8]

As atividades enzimáticas, lignina peroxidase-LiP e lacase-Lac foram medidas em espectrofotometro com comprimento de onda 310nm e 420nm da marca Shimadzu-1240 UV/MINI.

Tabela 1: Matriz experimental obtida para a formação de consórcio utilizando planejamento experimental com as três linhagens.

Ensaio	Matriz codificada			Número de blocos de gelose (Ø6mm)		
	<i>C. echinulata</i>	<i>P. commune</i>	<i>A. terreus</i>	<i>C. echinulata</i>	<i>P. commune</i>	<i>A. terreus</i>
1	-1	-1	-1	2	2	2
2	1	-1	-1	4	2	2
3	-1	1	-1	2	4	2
4	1	1	-1	4	4	2
5	-1	-1	1	2	2	4
6	1	-1	1	4	2	4
7	-1	1	1	2	4	4
8	1	1	1	4	4	4
9	-1,68	0	0	1	3	3
10	1,68	0	0	5	3	3
11	0	-1,68	0	3	1	3
12	0	1,68	0	3	5	3
13	0	0	-1,68	3	3	1
14	0	0	1,68	3	3	5
15	0	0	0	3	3	3
16	0	0	0	3	3	3
17	0	0	0	3	3	3

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção das enzimas lignina peroxidase e lacase podem ser observadas nas figuras 1 e 2. O fungo *P. commune* apresentou maior produção para as duas enzimas, atingindo 2.500 U/L para lignina e 1.947 U/L para a lacase respectivamente.

Recentemente, os fungos do solo têm sido estudados em relação a sua capacidade de degradar os hidrocarbonetos e produzir enzimas ligninolíticas [9].

O óleo diesel é uma mistura complexa de alcanos e compostos aromáticos que frequentemente são reportados como contaminantes de solo através de derrames acidentais [10].

A contaminação dos solos pelo petróleo e seus derivados pode ser distribuída pelas três fases

do solo (gasosa, líquida e sólida), devido à volatilidade, à solubilidade e à carga iônica do contaminante gerando grande impacto ambiental [11].

A utilização da glicose como co-substrato nutricional junto com fontes de carbono mais complexas podem potencializar a produção de algumas enzimas. Quando utilizado meio de cultivo sabouraud a glicose foi utilizada como controle e óleo diesel como indutor da atividade enzimática, foi encontrado para lacase, atividades variando de 4.350U/L a 4.620U/L, destacando a mais alta produção para os fungos *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune*, com 4.620 U/L para ambos.

Diversos fatores influenciam a produção de lacase e conseqüentemente a formação de produtos. Pode-se destacar entre outros: a composição do meio de crescimento, tempo de cultivo, pH, razão carbono: nitrogênio, temperatura, natureza química do substrato, luminosidade e areação [12].

As funções biológicas da lacase nos micro-organismos ainda não estão muito claras. Em fungos há relatos sobre sua participação no rápido crescimento celular [13], esporulação [14] e degradação de lignina [15].

De acordo com Rothschild *et al.* [16] (2002) a atividade da Lipase e da Lacase tem sido relatada em alguns fungos da podridão branca.

Observou-se que a produção de lacase pelos fungos *A. terreus* 18.970 U/L e *C. echinulata* produziu 18.705 U/L destacando-se em comparação à produção da mesma enzima pelo *P. commune*, quando foram utilizados fenantreno e antraceno como substratos ocorreu à produção de lignina peroxidase por *Phanerochaete chrysosporium* e *P. ostreatus*, respectivamente. Resultados similares foram observados neste trabalho utilizando óleo diesel como substrato quando conseguiu obter o valor mais alto para *Cunninghamella echinulata* 2.594 U/L. Para Quarantino *et al.* [17] (2008), a produção de lacase por *Panus trigrinus* (linhagem 577.79) variou de 0,024 U/mL e 2,04 U/mL. Téllez -Téllez *et al.* [18] (2008), em ensaios de produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*, obteve 162U/mg de proteína. Maciel *et al.*[19] (2010) relataram que a melhor produção de lacase, 290 U/L, foi observada pelo fungo *Penicillium* sp.(F33), contudo os resultados aqui descritos foram superiores, 18.970 U/L.

O diesel é rapidamente biodegradado pelos micro-organismos de solo em processos de biorremediação combinados com bioventilação, bioestimulação e bioaumento [20].

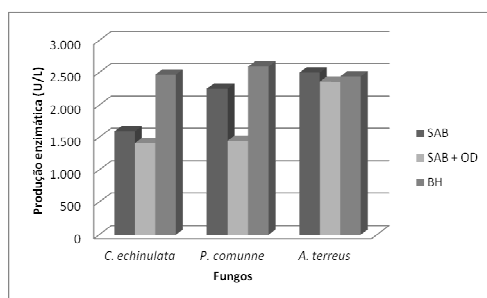


Figura 1: Produção da enzima lignina peroxidase pelos fungos *C. echinulata*, *P. commune* e *A. terreus*

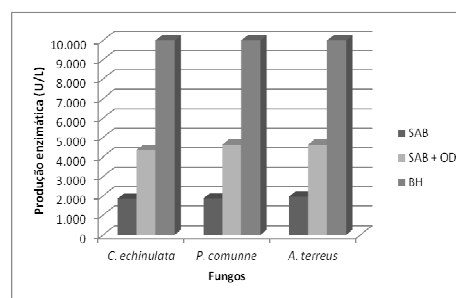


Figura 2: Produção da enzima lacase pelos fungos *C. echinulata*, *P. commune* e *A. terreus*

Os resultados para os ensaios em consórcios podem ser visualizados na figura 3. A lignina peroxidase apresentou melhores produções nos ensaios 1 e 2 quando produziram respectivamente, 2.666 U/L e 2.683 U/L; seguido dos ensaios 10 e 11, com 2.649 U/L e 2.655 U/L respectivamente.

Com relação aos ensaios em consórcio para lacase observa-se uma variação de 19.440U/L ensaio 3 a 12.620 U/L ensaio 7.

Consórcio significa a comunhão de interesse, a associação entre diferentes organismos. A interação entre diferentes micro-organismos, em condições de consórcio, como o cometabolismo ou antagonismo pode ser importante, e a biodegradação de compostos orgânicos tóxicos como os hidrocarbonetos pelo consórcio poderiam ser diferentes das de uma única cultura [21].

Um grupo variado de microrganismos destacam-se no processo de decomposição hidrocarbonetos derivados do petróleo, incluindo as bactérias representadas pelos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Microbacterium* e *Gordonia*, além de vários fungos dos gêneros *Cunninghamella*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Pleorotus*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Bjerkandera* e *Chrysosporium*. No entanto, à obtenção de 2 consórcios microbianos, têm-se mostrado mais efetivos na degradação destes compostos [22].

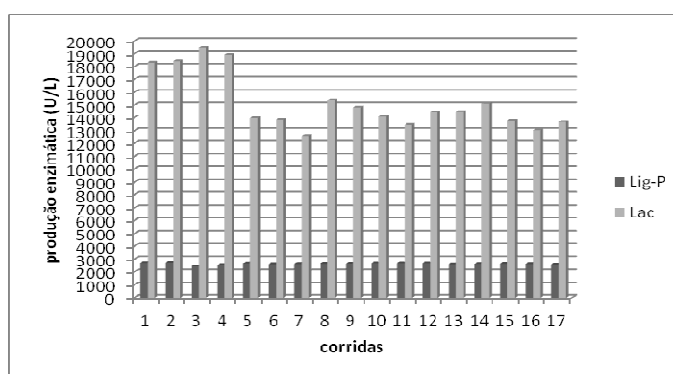


Figura 3: Produção das enzimas Lignina peroxidase e Lacase pelos consórcios de fungos preconizados pelo planejamento experimental.

Poucos são os trabalhos com consórcios somente de fungos, são mais frequentes os consórcios mistos de espécies de bactérias, ou de diferentes espécies de bactéria com dois ou três fungos [23]. Kataoka, [24] (2001) afirma que devido a uma grande dificuldade de análises de misturas complexas, a maioria dos trabalhos realizados sobre micro-organismos que degradam hidrocarbonetos têm sido realizados envolvendo o crescimento de um único micro-organismo sobre um único hidrocarboneto ou uma classe de hidrocarbonetos relacionados.

Lignina- peroxidase tem sido utilizada para mineralizar uma variedade de compostos aromáticos recalcitrantes como: hidrocarbonetos e corantes [25] Clemente *et al.* [26] (2001) investigaram a degradação de hidrocarbonetos por treze fungos deuteromicetos ligninolíticos e constataram que o grau de degradação varia de acordo as enzimas ligninolíticas.

A degradação microbiana por fungos ligninolíticos tem sido intensamente estudada nos últimos anos. Alguns fungos produzem enzimas extracelulares, tornando-os adequados para a degradação de compostos recalcitrantes.

Após a análise do planejamento experimental pode-se observar que as variáveis estudadas foram significativas apenas quando a variável resposta foi a produção da enzima lignina peroxidase. O gráfico de Pareto (figura4) mostra que o inóculo dos fungos *C. echinulata* e *P. commune* são estatisticamente significativos, porém pode-se visualizar que o inóculo do fungo *P. commune* exerce influência negativa no processo ou seja, quanto maior a quantidade de blocos menor a atividade enzimática.

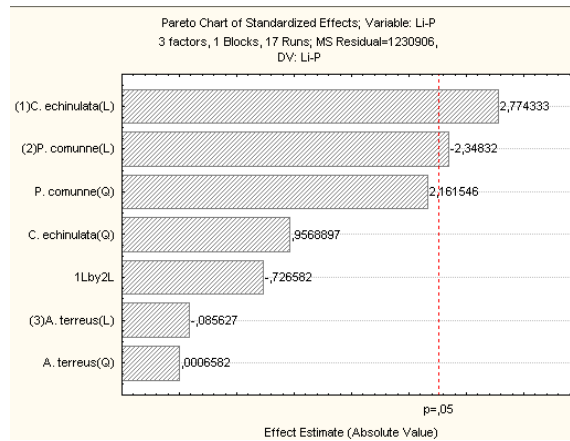


Figura 4: gráfico de Pareto representando os efeitos principais que influenciam no processo de produção da enzima lignina peroxidase.

Com a resposta do gráfico de Pareto o modelo foi reparametrizado e gerado o modelo predito a título de análise do cálculo da análise de variância e geração da superfície resposta. O modelo reparametrizado pode ser visualizado na figura 5.

$$Y = 2587.33 + 2765.62x_1 - 2504.96x_2$$

Figura 5: modelo predito gerado a partir da análise dos principais efeitos que influenciaram no processo.

Com o objetivo de se observar melhor os valores otimizados na produção da enzima lignina peroxidase foi gerado o gráfico superfície contorno (figura 6), onde pode-se visualizar que a tendência aos valores ótimos para o inóculo na obtenção de uma maior produção da enzima Li-P está em torno de dois a três blocos de gelose do fungo *C. echinulata*. Enquanto que quando a produção é realizada pelo fungo *P. comunne* o que pode-se visualizar é uma relação direta no aumento de blocos do inóculo com a diminuição da produção da enzima Li-P.

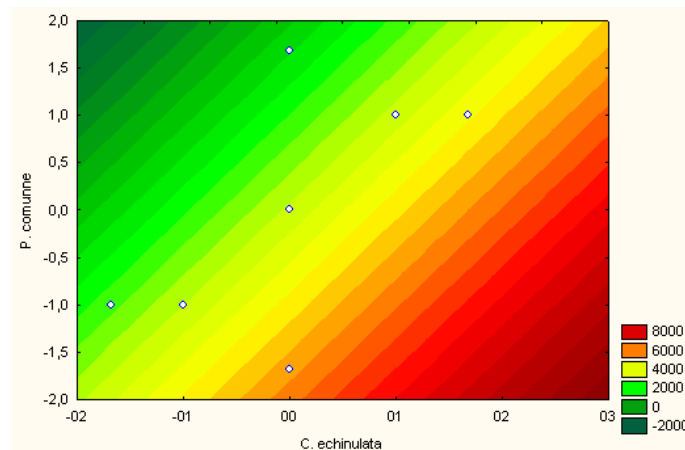


Figura 6: Gráfico superfície contorno demonstrando a tendência aos valores ótimos na produção da enzima Li-P pelos fungos *C. echinulata* e *P. comunne*.

4. CONCLUSÃO

Os fungos *C. echinulata*, *P. comunne* e *A. terreus* podem ser utilizados na produção de enzimas do complexo lignolítico, tanto individualmente quanto em consórcio, pois apresentaram altas taxas de produção além de poderem ser utilizados em processos de bioremediação de ambientes contaminados com resíduos de petróleo e/ou derivados.

1. EL TAYAR, N.; RUEY-SHIUAM, T.; TESSA, B.; CARUPT, P.A. Percutaneous of drugs: A quantitative structure-permeability relationship study. *Journal Pharmaceutical Science*. 80:744-749 (1991).
2. ITOH, T.; XIA, J.; MAGAVI, R.; NISHIHATA, T. & RYTTING, J.H. Use of snake as a membrane for "in vitro" percutaneous penetration studies: Comparison with human skin. *Pharmaceutical Research*, 7:1042-1047 (1990).
3. AIACHE, M.; CHANET, L.; BEYSSAC, E; HAIGER, M.J. *In vitro* permeation of progesterone from a gel through the shed skin of three different snake species. *International Journal of Pharmaceutical* 170:151-156 (1998).
4. PONGJANYAKUL, T.; PRAKONGPAN, S.; PRIPREM, A. Permeation studies comparing cobra skin with human skin using nicotine transdermal patches. *Drug Development Industrial Pharmacy* 26:635-642 (2000).
5. TAKAHASHI, K.; SAKANO, H.; RYTTING, J.H.; NUMATA, N.; KURODA, S.; MIZUNO, N. Influence of pH on the permeability of p-toluidine and aminopyrine through shed skin as a model membrane. *Drug Development Industrial Pharmacy* 27:159-164 (2001).
6. YATA, N.; NAKAMURA, Y.; MAKITA, H.; TANAKA T.; KURAMOTO, M. Characteristics of shed snake skin permeability to indomethacin and fatty alcohols. *Journal Pharmaceutical and Pharmacology* 48:680-684 (1996).
7. ARAÚJO, J.S. *Obtenção e avaliação de cremes transdérmicos contendo, fentanila, cetamina e clonidina no controle da dor crônica*. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Fármacos e medicamentos da Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências farmacêuticas Ribeirão Preto, 2004. 131p.
8. PRIPREM, A.; PRAKONGPAN, S.; PONGJANYAKUL, T. Permeation studies comparing cobra skin with human skin using nicotine transdermal patches. *Drug Development Industrial Pharmacy*. 26:635-642 (2000).