OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS LACASE E MANGANÊS PEROXIDASE POR *PLEUROTUS SAJOR-CAJU* EM RESÍDUO DE *SYAGRUS CORONATA*

Jéssica Santana dos Santos¹ e Hélio Mitoshi Kamida²

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

2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: hmkamida72@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Pleurotus sajor-caju*.; *Syagrus coronata*; Enzimas ligninolíticas

INTRODUÇÃO

Atualmente vem sendo muito utilizado resíduos agroindustriais como substratos em bioprocessos, uma excelente alternativa, tendo em vista o baixo custo desses substratos, além de resolver problemas ambientais gerados pelo descarte inapropriado desses resíduos.

O gênero *Pleurotus* é relato como sendo eficientes colonizadores e degradadores de lignoceluloses. Estes fungos realizam a degradação enzimática da porção lignocelulósica dos substratos pela elaboração das enzimas como lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases que estão envolvidas na degradação de ligninoceluloses (Qinnghe et al., 2004; Palmieri et al., 2000). Os mesmos formam um grupo altamente degradativo que atuam sobre constituintes maiores de resíduos ligninocelulósicos, como a celulose, a hemicelulose e a lignina (Shishido, 1992). Muitos destes microrganismos são capazes de fazer a bioconversão desses substratos lignocelulósicos em compostos de fácil assimilação para o seu metabolismo, onde as enzimas hidrolíticas tem papel fundamental nessa bioconversão, e agem conjunta e sinergisticamente na formação de um complexo com várias enzimas (Valasková e Baldrian, 2006). Atualmente, estas enzimas são utilizadas em várias aplicações industriais e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas tem crescido rapidamente.

Neste contexto, a importância dessa pesquisa se dá pela vantagem ambiental da conversão de resíduos agroindustriais e na produção enzimática por fungos. A utilização de resíduos agroindustriais representa uma alternativa para as indústrias de biotecnologia obterem enzimas hidrolíticas e oxidativas com um custo mais baixo em relação às enzimas que estão no mercado.

MATERIAL E MÉTODOS

Aquisição, Preservação e Manutenção da Linhagem

A linhagem de *Pleurotus sajor-caju* foi obtida por doação da EMBRAPA/CENARGEN-DF, sendo preservada conforme metodologia de Castellani (1967) na CCMB-UEFS. Em seguida, mantida em meio BDA, incubada em BOD à 28±1°C na ausência de luz, sendo repicada mensalmente.

Coleta, Processamento e Armazenamento do Resíduo

O resíduo da palmeira *S. coronata* (bráctea) foi coletado no município de Feira de Santana-BA. Este, seco a temperatura ambiente, foi triturado em trituradora de forragem e em moinho de facas, sendo armazenados ao abrigo da luz e umidade.

Avaliação do crescimento micelial

O resíduo foi misturado de acordo com o planejamento experimental definido por meio do software Statistica, tendo como variáveis a temperatura e o pH. Para a avaliação do crescimento micelial, foram traçadas duas retas perpendiculares, medidas a cada 24h durante 5 dias. As análises foram feitas em triplicata.

Determinação da atividade enzimática das enzimas

A atividade das enzimas lacase e manganês peroxidase foram determinadas por leituras espectrofotométricas, em intervalo de 7 dias durante um período de 28 dias de incubação. A atividade da lacase foi determinada a 420 nm, empregando ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) como substrato enzimático (Han et al.,2005) e a de manganês peroxidase, a 610 nm, pela oxidação do vermelho de fenol (Kuwahara et al., 1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ENSAIO EM PLACA DE PETRI

Na tabela abaixo, observa-se o resultado do crescimento do fungo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes combinações das variáveis estudadas, no resíduo da bráctea de *Syagrus coronata*, durante 5 dias de cultivo.

Tabela 1- Valores médios de crescimento micelial de *Pleurotus sajor-caju* em resíduo de *Syagrus coronata* após 5 dias de cultivo.

ENSAIO	TEMPERATURA °C	pH	CRESCIMENTO MICELIAL (cm)
1	19,4	3,9	3,1
2	40,6	3,9	0,5
3	19,4	13,1	3,0
4	40,6	13,1	0,5
5	15	8,5	2,2
6	45	8,5	0,5
7	30	2	0,5
8	30	15	3,1
9	30	8,5	3,3
10	30	8,5	3,2
11	30	8,5	3,1

Através dos resultados obtidos verificou-se que o F calculado foi 5,85 e a porcentagem de variação 60% (tabela 2) indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e o previsto no modelo (tabela 1 e figura 1).

Tabela 2- Análise de variância para o substrato bráctea de *Syagrus coronata*

Fonte de Variação	S.Q	G. L	Q.M	F calculado
Regressão	9,93	2	4,97	5,85
Resíduos	6,78	8	0,85	
Total	16,71	10

Figura 1- Diagrama de Pareto para a otimização das condições de cultivo no resíduo de *Syagrus coronata*

A análise estatística apresentada na figura 2 demonstra que o pH, não interferiu significativamente no crescimento do fungo em placa. Porém a temperatura na faixa de 20 °C a 35 °C, apresentou-se como a região ótima de crescimento.

Figura 2- Curva de contorno em função das variáveis independentes do fungo *Pleurotus sajor-caju* em função do pH e temperatura.

FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA E ANÁLISE DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS

As condições escolhidas para avaliar a produção das enzimas na fermentação semissólida consistiam em uma temperatura a 30 °C e pH 8,5, condições essas significativas segundo o planejamento experimental feito em placa e a análise estatística.

ATIVIDADE DA ENZIMA LACASE

Os resultados apresentados no gráfico da figura 3 demonstram que houve atividade enzimática da lacase em todos os dias de incubação analisados. Apresentando picos de atividade enzimática no 28º dia de cultivo de 666,5 U/L.

Figura 3- Atividade das enzimas lacase e manganês peroxidase em resíduo de bráctea por *Pleurotus sajor-caju*

Segundo Alves (2010) o metabolismo primário, na ausência de indutores, produz pequenas concentrações de lacase sendo que a produção de enzimas ligninolíticas está associada com o metabolismo secundário. Sendo assim, a atividade enzimática da lacase em altas concentrações tem relação com o metabolismo secundário do fungo, que não é dependente do seu crescimento, mas sim de algum fator externo.

ATIVIDADE DA ENZIMA MANGANÊS PEROXIDASE

Os resultados apresentados no gráfico da Figura 3 atestam que em todos os períodos de incubação foram detectadas atividades enzimáticas de manganês peroxidase. Sendo que as atividades oscilaram entre 151,12 U/L (21º dia) e 51,12 U/L (28º dia). A atividade da MnP é produzida durante o metabolismo secundário e é regulada pelas concentrações de carbono e nitrogênio no meio de cultura. É cataliticamente dependente de H₂O₂ e íons Mn (II), e α cetoácidos que estabilizam a sua atividade oxidativa (Valasková, 2006).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos estudos vêm buscando estratégias sustentáveis para a utilização dos resíduos ligninocelulósicos gerados pelas atividades agroindustriais, tendo em vista que boa parte destes materiais são descartados no ambiente o que pode vir a causar possíveis danos. Os resultados obtidos neste trabalho sustentam o uso de resíduos lignocelulósicos do licuri (bráctea) como um substrato adequado para a produção das enzimas lacase e manganês peroxidase, ambas com grande potencial de uso em diferentes processos industriais, além do fungo *Pleurotus sajor-caju* ser um potencial produtor dessas enzimas.

REFERÊNCIAS

- 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.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **Instituto de Medicina Tropical**, Lisbon, 181-184, August, 1967.
- PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; FONTANELLA, B.; SANNIA, G. 2000. **Induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus* Appl and Environmental Microbiology.** 1:920-924.
- QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N.; CHENG, J.; QIUGANG, M. 2004. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**,39:561- 1566.
- SHISHIDO, K. 1992. The application of molecular genetics to oriental mushrooms. **Applied molecular genetics of filamentous fungi**, 9:201-213.
- VALASKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. 2006. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Pictoporus betulinus*. **Research in Microbiology**, 157(2):119-124.