

## **Influência da Composição do Meio de Cultura na produção de Enzimas Ligninolíticas e de Protease por Fungos Marinhos**

**<sup>1</sup>Ramon Peres Brexó, <sup>2</sup>Michel R. Z. Passarini, <sup>1,2</sup>Lara Durães Sette**

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Microbiologia, LAMAI, Universidade Estadual Paulista - UNESP, 13506-700 Rio Claro – SP., Brasil. E-mail: ramonbiounesp@gmail.com

<sup>2</sup>Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias – CPQBA-UNICAMP.

### **RESUMO**

*O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de enzimas ligninolíticas em diferentes condições após 7, 14 e 21 dias de cultivo visando avaliação da aplicabilidade dos fungos marinhos D4 e M34 em processos ou ambientes salinos. A enzima lignina peroxidase (LiP) apresentou atividade máxima de 1,24 U/L para D4 e 2,83 U/L para M34 após 21 dias de cultivo em meio MA2%+3%NaCl enquanto que o pico de produção de manganês peroxidase (MnP) foi de 7,62 U/L para D4 e 6,84 U/L para M34 após 7 dias de cultivo em meio MA2%+3%NaCl. Em adição, o fungo marinho M36 identificado como *Purpureocillium lilacinum* foi avaliado quanto à produção de proteases utilizando desenho experimental.*

**Palavras-chave:** Enzimas, Ligninases, Fungos Marinhos, Protease, Biotecnologia

### **INTRODUÇÃO**

Fungos lignolíticos são taxonomicamente diversos e a maioria pertence à subdivisão Basidiomycotina, sendo divididos em três classes: fungos de degradação branda, fungo de degradação marrom e os fungos de degradação branca<sup>1,2</sup>. As enzimas produzidas por esses fungos são mais efetivas para degradar lignina e compostos similares tais como poluentes ambientais, em condições onde os níveis nutricionais estão escassos<sup>3,4</sup>, o mesmo acontece para a produção e excreção de proteases<sup>5,6,7</sup> sendo uma característica vantajosa para as cepas que habitam ambientes altamente contaminados e que apresentam produtividade muito baixa devido a toxicidade de alguns tipos de organopoluentes<sup>3</sup>. As enzimas ligninolíticas LiP e MnP atuam por reações catalíticas dependentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que auxiliam a oxidação do anel e clivagem dentro de dímeros de lignina<sup>4</sup>. Os micro-organismos por produzirem uma maior variedade de proteases específicas se comparados a plantas e animais, são considerados como fontes promissoras desta enzima<sup>8</sup>. Devido a grande diversidade bioquímica das proteases, facilidade na manipulação das mesmas e, considerando o fato da produção fungica ser de fácil obtenção e recuperação, tais enzimas são favorecidas em diversas aplicações biotecnológicas<sup>9</sup>. De acordo com Kaushik e Malik<sup>10</sup>, diferentes estudos mostram que os fatores bióticos e abióticos podem alterar a produtividade enzimática sendo o pH, concentração do contaminante ou substrato, meio de cultivo, agitação e temperatura, os principais fatores analisados. Em adição, Kumar e Takagi<sup>9</sup> afirmam que alguns micro-organismos produtores de baixas quantidades de enzimas podem através de métodos simples como a utilização de meio de cultura específico e otimizado, aumentar significativamente o seu rendimento enzimático. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi a obtenção de novos recursos genéticos a serem aplicados em processos

que requeiram a tolerância à salinidade, bem como a obtenção de condições de cultivo que favoreçam e justifiquem a aplicação biotecnológica das enzimas estudadas.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os dois fungos marinhos (M34 e D4) avaliados quanto à capacidade de produção de enzimas ligninolíticas foram cultivados em meio Ágar Malte 2% + 3% de NaCl dos quais 2 cilindros de 5 mm de diâmetro da margem das colônias foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de três diferentes meios líquidos: Malte 2%+3%NaCl, MA2% e água do mar artificial (ASW) composta de (g/L)<sup>11</sup>: 11,91g MgCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, 1,66g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,22g SrCl<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O, 26,319g NaCl, 4,409 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,745g KCl, 0,216g NaHCO<sub>3</sub>, 0,108g KBr, 0,029g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, acrescido de 20g malte. Os cultivos foram realizados em triplicata para a cada amostra e mantidos a 140 rpm e 28°C por 7, 14 e 21 dias.

A atividade da LiP foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS a partir do aldeído veratrílico produzido ( $\epsilon_{310}^{TM} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) na oxidação do álcool veratrílico que foi usado como substrato<sup>12</sup>. A MnP foi quantificada através da oxidação do vermelho de fenol a 610 nm ( $\epsilon_{610}^{TM} = 4.460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) descrito por Kuwahara et al.<sup>12</sup> Para a avaliação de diferentes fatores na atividade da protease produzida pelo fungo M36 foi utilizado um desenho experimental Plackett-Burman (PB) cujas variáveis e seus valores estão apresentadas na tabela 1.

O fungo foi cultivado no meio proposto por Radha et al.<sup>13</sup> e para a determinação da enzima foi utilizado o substrato azocaseína de acordo com o protocolo descrito por Charney e Tomarelli<sup>14</sup>. Para todas as enzimas estudadas, os extratos enzimáticos foram obtidos por meio de centrifugação em a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C. Todos os ensaios foram quantificados em triplicata.

**Tabela 1. Planejamento Plackett-Burman aplicado à produção de proteases pelo M36.**

	Nº de cilindros do inoculo	Glicose (g/L)	Amido (g/L)	Ext. Malte (g/L)	Extrato de soja (g/L)	Peptona (g/L)	Caseína (g/L)	Farinha arroz (g/L)	Farinha milho (g/L)	Farinha aveia (g/L)	ASW (mL)	pH
1	5	0	0	0	0,10 g	0	0	1,0g	1,0g	0	50mL	3
2	5	0,20 g	0	0	0	0,10 g	0	0	1,0g	1,0g	0	5
3	5	0,20 g	0,20 g	0	0	0	0,10 g	0	0	1,0g	50mL	3
4	5	0,20 g	0,20 g	0,40 g	0	0	0	1,0g	0	0	50mL	5
5	3	0,20 g	0,20 g	0,40 g	0,10 g	0	0	0	1,0g	0	0	5
6	5	0	0,20 g	0,40 g	0,10 g	0,10 g	0	0	0	1,0g	0	3
7	3	0,20 g	0	0,40 g	0,10 g	0,10 g	0,10 g	0	0	0	50mL	3
8	5	0	0,20 g	0	0,10 g	0,10 g	0,10 g	1,0g	0	0	0	5
9	5	0,20 g	0	0,40 g	0	0,10 g	0,10 g	0	1,0g	0	0	3
10	3	0,20 g	0,20 g	0	0,10 g	0	0,10 g	1,0g	1,0g	1,0g	0	3
11	3	0	0,20 g	0,40 g	0	0,10 g	0	1,0g	1,0g	1,0g	50mL	3
12	5	0	0	0,40 g	0,10 g	0	0,10 g	0	1,0g	1,0g	50mL	5
13	3	0,20 g	0	0	0,10 g	0,10 g	0,10 g	1,0g	0	1,0g	50mL	5
14	3	0	0,20 g	0	0	0,10 g	0,10 g	0	1,0g	0	50mL	5
15	3	0	0	0,40 g	0	0	0,10 g	1,0g	0	1,0g	0	5
16	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
17, 18 e 19	4	0,10 g	0,10 g	0,20 g	0,05 g	0,05 g	0,05 g	0,50 g	0,50 g	0,50 g	25mL	4

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados observados na tabela 2, para as duas cepas analisadas, o meio de cultivo contendo malte e cloreto de sódio foi o mais eficiente para estimular a produção das enzimas ligninolíticas estudadas, ressaltando a aplicabilidade destes fungos em processos ou ambientes salinos. O pico de produção de MnP foi entre os primeiros 7 dias, com valores de 7,62 U/L para a cepa D4 e 6,86 U/L para M34.

Quanto à produção de proteases ácidas, os resultados obtidos com o meio proposto por Radha et al.<sup>13</sup> aplicado ao Plackett-Burman, revelaram maiores atividades nos ensaios 7 e 11 e nos pontos centrais representados pelos ensaios 17, 18 e 19 (média de 13,7 U/L, tabela 3). Entretanto, esses resultados foram inferiores ao valor de 24 U/L obtido com o meio Savitha<sup>15</sup> modificado (enriquecido com 10g/L de peptona bacteriológica) utilizado no screening inicial, indicando que o meio mineral pode ser um indutor para a produção das proteases. De acordo com Radha et al.<sup>13</sup> e outros autores<sup>16,17</sup> o meio de cultura quando suplementado com fontes de nitrogênio orgânico, apresenta aumento na produtividade das proteases se comparado com fontes inorgânicas, relatando que a utilização de soja e caseína são as melhores fontes de azoto para a produção destas enzimas, e que em alguns casos a síntese foi máxima quando complementado com bagaço de sementes de soja utilizada para extração de óleo. Considerando os dados acima citados, o meio proposto por Radha<sup>13</sup> pode favorecer a produção das proteases, entretanto nas condições estudadas no presente trabalho, o meio Savitha<sup>15</sup> pode auxiliar no desempenho do fungo M36. Estes resultados servirão de base para a estruturação de novos experimentos utilizando desenho experimental.

**Tabela 2. Atividade de LiP e MnP em diferentes meios de cultura.**

	Meio de cultura	Dias	D4	M34
MnP (U/L)	MA 2% + 3% NaCl	7	7,623	6,86
		14	1,424	2,645
		21	0	1,569
	ASW	7	0,049	0
		14	0,019	0,199
		21	1,215	0,079
	MA 2%	7	0,019	3,358
		14	0	0,009
		21	0,279	2,431
LiP (U/L)	MA 2% + 3% NaCl	7	0	0
		14	0,473	0,333
		21	1,247	2,838
	ASW	7	0,868	0,626
		14	0,031	0
		21	0,001	0
	MA 2%	7	0	0,028
		14	0	0
		21	0,067	0

**Tabela 3. Atividade de proteases ácidas pelo M36 após aplicação do PB.**

Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Atividade Enzimática (U/L)	6,3	0,13	7,97	10,43	4,38	10,83	13,57	1,51	1,48	4,12
Amostra	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Atividade Enzimática (U/L)	13,68	7,35	8,53	1,42	1,14	0,03	13,23	13,21	14,53	

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente projeto evidenciam o potencial dos fungos marinhos para produção de enzimas de interesse ambiental e industrial com possível aplicação biotecnológica. Neste sentido, destacamos a importância de se realizar o desenho experimental, o qual permite a avaliação do efeito de cada variável na produção do composto desejado, bem como o ajuste "personalizado" para cada micro-organismo e processo.

## REFERÊNCIAS

- (1) DURAN, N.; ESPOSITO, E. *Biodegradação de Lignina e Tratamento de Efluentes por fungos ligninolíticos: atualização*. In Melo, IS, Azevedo, JL (Ed.) **Microbiologia Ambiental, CNPMA/EMBRAPA** Editora. p. 303-338. 2008.
- (2) SETTE, L.D.; OLIVEIRA, V.M.; RODRIGUES, M.F.A. *Microbial lignocellulolytic enzymes: industrial applications and future perspectives*. **Microbiology Australia**, 29:,18-20, 2008.
- (3) HAMMAN, S. *Bioremediation capabilities of white rot fungi*. Review **Article Spring**, p.12, 2004.
- (4) KIRK, T.K.; FARREL, R.L. *Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin*. **Annual Review of Microbiology**. 41: 465-505. 1987.
- (5) COHEN B.L. *Regulation of intracellular and extracellular neutral and alkaline proteases in *Aspergillus nidulans**. **J. Gen. Microbiol** 79: 311±32. 1973.
- (6) HARVEY L. M.; MCNEIL B.; BERRY D.R.; WHITE S. *Autolysis in batch cultures of *Penicillium chrysogenum* at varying agitation rates*. **Enzyme Microb Technol** 22: 448±458. 1998.
- (7) MCNEIL B.; BERRY D. R.; HARVEY L. M.; GRANT A.; WHITE S. *Measurement of autolysis in submerged batch cultures of *Penicillium chrysogenum**. **Biotech Bioeng** 57: 297±305. 1998.
- (8) DINIZ, F.M.; MARTIN, A.M. *Hidrolisado protéico de pescado* In: OGAWA, M. & MAIA, E.L. **Manual de Pesca. São Paulo: Varela**. 1999.
- (9) KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. *Microbial alkaline preteases: from a industrial view point*. **Biotechnology Advancy**, New York, 17: 561-594. 1999.
- (10) KAUSHIK, P.; MALIK, A.; *Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential*. **Environment International**, 35:127-141. 2009.
- (11) ARORA, D. S.; GILL, P. K. *Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase*. **Enzyme and Microbial Technology** 28: 602-605. 2001.
- (12) KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLO, M. H. *Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic culture of *Phanerochaete chrysosporium**. **FEBS Letters** 169: 247-250. 1984.
- (13) RADHA, S.; NITHYA, V. J. ; R. HIMAKIRAN BABU, R. ; SRIDEVI, A. ; PRASAD, N. B. L.; NARASIMHA G. *Production and optimization of acid protease by *Aspergillus spp* under submerged fermentation*. **Arch. Appl. Sci. Res.** 3 (2):155-163. 2011.
- (14) CHARNEY, J. & TOMARELLI, R.M. *A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice*. **J. Biol. Chemical.** v. 23, p. 501-505. 1947.
- (15) SAVITHA, J.; SRIVIDYA, S.; JAGAT, R.; PAYAL, P.; PRIYANKI, S.; RASHMI, G. W.; ROSHINI, K. T.; SHANTALA, Y. M. *Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase*. **African journal of biotechnology**. v. 6, n. 5, p. 564-568, mar. 2007.
- (16) NARAYANA, K. J. P.; VIJAYALAKSHMI M. *Production of Extracellular Protease by *Streptomyces albidoflavus**. **Asian Journal of Biochemistry**, 3: 198-202. 2008.
- (17) SHAHEEN, M., SHAH, A. A., HAMEED, A., HASAN, F. *Influence of culture conditions on production and activity of protease from *Bacillus subtilis* BS1*. **Pak. J. Bot.**, 40(3): 2161-2169. 2008.