

**SECREÇÃO DE LACASE UTILIZANDO A CEPA AMAZÔNICA *Trametes lactinea* ,  
SUPLEMENTADO COM O RESÍDUO DA CASCA DO *Astrocaryum aculeatum meyer*,  
COLETADOS NO MUNICÍPIO DE ALVARÃES /AM.**

Alcineide Rocha de Carvalho<sup>1</sup>; Andrey Azedo Damasceno<sup>2</sup>; Adriana da Silva Nunes<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduando de Licenciatura em Ciências Biológicas – UEA/CEST.

<sup>2</sup>Doutorando em Biotecnologia – PPGBIOTEC/UFAM

<sup>3</sup>Mestre em Biotecnologia – MBT/UEA

**RESUMO**

As enzimas do grupo oxiredutases apresentam potencial de aplicabilidade industrial notadamente nas áreas como biorremediação, indústria alimentícia e na indústria de celulose e papel. Neste contexto, e considerando a biodiversidade fúngica da região do Médio Solimões é imprescindível avaliarmos o potencial enzimático desses microrganismos. Poucos ou quase nenhum estudo foi realizado neste sentido com fungos dessa região, daí o interesse de avaliarmos o potencial enzimático dessa diversidade. Dentre as enzimas do grupo das oxiredutases (ligninolíticas) estão principalmente as lacases, ligninases, e peroxidases as quais apresentam grande potencial de uso industrial. Essas enzimas podem ser produzidas por fungos pertencentes a classes dos basidiomicetos, um grupo que apresenta boa representatividade na região. Para a realização da presente pesquisa, a coleta dos basidiocarpos foi realizada no mês de março de 2011, durante o período de verão no perímetro rural do município de Alvarães-AM. Para o isolamento fúngico, utilizou-se o meio sintético BDA, sendo retirados três fragmentos fúngicos de aproximadamente 5mm de diâmetro das bordas das placas e transferidos para o meio de cultivo composto por 1000 ml de água destilada estéril, 1g de glicose e farinha da casca da *Astrocaryum aculeatum meyer* na concentração 10g/L em erlenmeyer com capacidade de 150 ml, os quais posteriormente foram incubadas em estufa BOD em condição estacionária à temperatura de 30°C. A atividade de lacase da cepa *Trametes lactinea* foi na concentração de 2% de farinha da casca do *Astrocaryum aculeatum meyer* e quantificadas nos períodos de 03, 06 e 09 dias. Para determinação das atividades da enzima foi utilizado o aparelho espectrofotômetro de absorbância para leitura das amostras coletadas, para calcular a lacase, utilizou-se a metodologia proposta por Ander e Eriksson (1976). O método consiste na oxidação do substrato enzimático de siringaldazina para sua forma de quinona que apresenta absorção a 525 nm ( $\epsilon \Sigma = 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A cepa Amazônica *Trametes lactinea*, expressou uma excelente cinética enzimática no terceiro dia, evidenciando assim a interação fonte de carbono e a cepa avaliada, ressalta-se entretanto que sua maior atividade foi no nono dia obtendo um pico enzimático de 33,7 U/L.

Palavras-chave: Substrato ; Fungo; Enzima.

## ABSTRACT

The group enzymes oxiredutases have potential applicability especially in industrial areas such as bioremediation, food industry and in the pulp and paper industry. In this context, and considering the fungal biodiversity of the Middle Solimões is essential to evaluate the enzymatic potential of these microorganisms. Few or almost no study has been done in this connection with fungi that region, hence the interest of evaluating the enzymatic potential of this diversity. Among the group of enzymes oxiredutases (ligninolytic) are mainly laccases, ligninases and peroxidases which have great potential for industrial use. These enzymes are produced by fungi belonging to the Basidiomycetes classes, a group that exhibits good representativity in the region. For the realization of this research, the collection of basidiocarps was held in March 2011, during the summer in a rural area of the municipality of Alvarães-AM. For isolation fungal used the synthetic medium BDA being removed fungal three fragments of approximately 5mm diameter edges of the plates and transferred to culture medium composed of 1000 ml of sterile distilled water, 1 g of glucose and peel flour *Astrocaryum aculeatum meyer* concentration 10g / L erlenmeyer with a capacity of 150 ml, which were subsequently incubated in an environmental chamber in the stationary condition at a temperature of 30 ° C. The laccase of *Trametes lactinea* strain was at a concentration of 2% flour bark *Astrocaryum aculeatum meyer* and quantified in periods of 03, 06 and 09 days. To determine the activity of the enzyme was used device spectrophotometer absorbance reading of samples to calculate the laccase, we used the methodology proposed by Ander and Eriksson (1976). The method consists in the oxidation of syringaldazin enzyme substrate to form quinone which has absorption at 525 nm ( $\epsilon\Sigma = 65,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). The strain Amazon *Trametes lactinea* expressed an excellent enzyme kinetics on the third day, thus underlining the interaction carbon source and assessed strain, it is noteworthy however that his greatest activity was the ninth day getting an enzymatic peak of 33.7 U / L.

Keywords: Substrate; Fungus; enzyme.

## INTRODUÇÃO

O Brasil há uma grande diversidade natural, devido à sua extensão e à sua heterogeneidade de ecossistemas e dentre os organismos mais conhecidos estão plantas e os animais, mas há também uma grande variedade de protozoários, fungos, bactérias, entre outros. Na região Amazônica o clima quente e úmido é favorável à proliferação de linhagens microbianas, especialmente os fungos que se reproduzem com grande eficiência neste hábitat e isso pode ser constatado pela grande diversidade de espécies encontradas nesta região. Por esta razão a região Amazônica ainda abriga espécies desconhecidas de fungos com grande potencial biotecnológico que podem ser aplicados de forma benéfica ao homem (PUTZKE & PUTZKE, 2004).

Dentre os mais diversos microrganismos, encontram-se os fungos que desde a antigüidade são utilizados como alimentos, devido ao sabor agradável e às propriedades nutricionais e medicinais sendo importantes agentes em diversos processos industriais, como produção de enzimas, vitaminas, antibióticos, polissacarídeos, pigmentos, lipídeos e glicolipídeos. É comprovado que estes organismos produzem um elevado número de metabólicos com atividades antitumoral, antiviral, antiinflamatória, antitrombótica, citostática, hipoglicemia e antimicrobiana (PUTZKE, 2002). O basidiomiceto do gênero *Trametes* é provavelmente o mais ativamente investigado no filo *Basidiomycota* pelas aplicações biotecnológicas. A pesquisa está direcionada para o gênero *Trametes* principalmente pela sua utilização na biorremediação de solos. O gênero *Trametes* tem aproximadamente 335 espécies (NYANHONGO et al, 2007).

Com a crescente demanda mundial por enzimas industriais e terapêuticas, os fungos têm despertado a atenção de várias indústrias biotecnológicas ligadas a diversos setores da economia, pelo fato, de que as enzimas industriais são na sua maior parte, obtidas a partir de microorganismos (SANT' ANNA JR., 2001). As enzimas estão presentes em todas as células vivas, onde exercem a função de catalisadores das reações que compõem as vias catabólicas e anabólicas do metabolismo celular. Esses biocatalisadores são moléculas de proteínas e seu poder catalítico está associado a conformação nativa, que depende de condições específicas de pH, temperatura e força iônica do meio (MARTINEZ et al, 2005).

O crescente interesse a nível mundial pelas enzimas fúngicas deve-se ao fato do potencial de usá-las em várias aplicações industriais e tem crescido a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas. Dados do Ministério do Desenvolvimento e Comércio Exterior

do Governo Federal mostra que o mercado de enzimas no Brasil, no ano de 2005, foi de US\$ 95,7 milhões no total de importações, enquanto que as exportações foram de US\$ 5,4 milhões. Este cenário mostra que o mercado brasileiro é essencialmente importador, indicando desvantagens tecnológicas e estratégia em termos de produção e uso das enzimas no País a despeito de possuímos um imenso depositário de diversidade fúngica quase que totalmente desconhecida que é a Amazônia. Neste contexto, temos possibilidades de pesquisar alternativas de uso de novos microrganismos para produção de enzimas com grande potencial industrial, como é o caso da manganês-peroxidase, lacase objeto do presente estudo. Esta potencialidade industrial e biotecnológica, por si só justifica a presente pesquisa associada ao fato de estarmos pesquisando esse potencial em fungo onde inexistente qualquer pesquisa nesse sentido garantindo o ineditismo desta pesquisa. Busca-se também a formatação de obtenção dessas enzimas, o que levaria a um processo de patente desse processo. Em fim, a presente pesquisa objetiva, determinar a enzima produzida pela cepa Amazônica fungo *Trametes lactínea*, que apresentou resultados promissores de crescimento frente ao teste de Benvedamm, o que o credencia para estudo de produção e caracterização do coquetel enzimático ligninolítico tendo em vista o potencial de uso industrial dessas enzimas.

## MATERIAL E MÉTODO

A Coleta dos basidiocarpos foi realizada no mês de maio de 2011, durante o período de verão no perímetro rural do município de Alvarães-AM. Estes foram coletados e acondicionados em sacos de papel, previamente identificadas, registrados, anotados os substratos e encaminhadas ao laboratório de Biologia do Centro de Estudos Superiores de Tefé – CEST/Universidade do Estado do Amazonas – UEA, para então serem devidamente isolados e recebidos às respectivas metodologias e códigos de identificação, sendo que uma amostra foi enviada a coleção de Fungos do Mestrado em Biotecnologia para identificação taxonômica.

## PREPARO DO MEIO DE CULTURA

Utilizou-se o meio sintético BDA (Batata, Dextrose e Agar) Sintético, sendo 38g para 1.000 mL de água destilada e auxílio de um bastão de vidro foi dissolvido em Enlermeyer, de 1.000 ml. Posteriormente foi vedado e levado para autoclave a 121 °C por 20 min a 1 atm

para esterilização final. Posteriormente, o meio foi vertido em placas de Petri 90x15mm, dos basidiocarpos coletados foi retirada a amostra de fungo (30 mm), utilizada para inoculação, a qual passou por um procedimento de assepsia, que consta das seguintes etapas: mergulhar a amostra por 2 minutos em álcool 70%, em seguida em hipoclorito de sódio a 3%, logo após deixou-se o inóculo imerso por 2 minutos em água destilada. Esses procedimentos foram executados em ambiente estéril, (interior da câmara de fluxo laminar adaptado) Bononi e Trufem, (1985).

## ISOLAMENTO DOS FUNGOS

Após estes procedimentos as amostras inoculadas, seguindo a metodologia proposta por Castro e Silva (1996), foram colocadas em placas de Petri 90x15mm com meio com BDA (batata dextrose e ágar), posteriormente lacradas com fita plástica do tipo Parafilm e devidamente identificadas. As placas de Petri inoculadas foram incubadas em BOD (Baixa Demanda de Oxigenio), a 30° C ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) para o crescimento micelial.

## DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

### PREPARO DO SUBSTRATO

As cascas do *Astrocaryum aculeatum meyer*, foram lavados, colocados em estufa elétrica a 40° para eliminação da umidade, em seguida triturados em liquidificador industrial e passados em uma malha de 60 mesh. A farinha formada foi autoclavada a 1,5 atm a 121C<sup>0</sup> por 15' para eliminação de possíveis microrganismos presentes na casca. A “farinha” produzida foi utilizada como substrato de crescimento em meio líquido.

### MEIO DE CULTIVO

Foram retiradas três fragmentos fúngicos de aproximadamente 5mm de diâmetro das bordas das placas e transferidos para o meio de cultivo composto por 1000 ml de água destilada estéril, 1g de glicose e farinha da casca da castanha na concentração 10g/L em erlenmeyer com capacidade de 150 ml, os quais posteriormente foram incubadas em estufa BOD em condição estacionária à temperatura de 30°C, sendo que os experimentos foram realizados em triplicata.

## ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Foram determinadas as atividades de lacase dos fungos *Trametes lactinea* e na concentração de 2% de farinha da casca do *Astrocaryum aculeatum meyer* e testadas nos períodos de 03, 06 e 09 dias. Para determinação das atividades da enzima foi utilizado o aparelho espectrofotômetro de absorvância para leitura das amostras coletadas.

## ATIVIDADE DE LACASE

As alíquotas fúngicas foram enviadas ao Laboratório de Biorgânica da Universidade do Estado do Amazonas –UEA, Manaus sendo entregue a Professora MSc. Adriana da Silva Nunes, para serem determinadas em espectrofotômetro. A atividade da enzima lacase foi determinada em um comprimento de onda de 525 nm, específico para reação de oxidação da siringaldazina (SZKLARZ, et al. 2001). A metodologia utilizada foi segundo Ander e Eriksson (1976). O método consiste em oxidação do substrato enzimático de siringaldazina para sua forma de quinona que apresenta absorção a 525 nm ( $\epsilon\Sigma=65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). De acordo com a atividade enzimática, uma unidade ativa de lacase corresponde a quantidade de enzima necessária para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto. Para a determinação da atividade lacase, utilizou-se 1 ml de caldo de cultivo filtrado, 0,95 ml de substancia tampão de tartarato de sódio em pH 4,5, 1 ml de siringaldazina (solução indutora, estoque, concentração de 5 mg/10 ml de etanol) e 1 ml de água destilada.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

As necessidades nutritivas dos micro-organismos são basicamente as mesmas que as de todos os seres vivos, que, para renovarem seu protoplasma e exercerem suas atividades, exigem fontes de energia e fontes de carbono. Nas condições artificiais do laboratório o crescimento dos fungos é conseguido pela semeadura dos mesmos em meios de cultura, e dada à variedade de tipos nutritivos, é fácil compreender que alguns meios de cultura são melhores para uns tipos de fungos, e não tão eficientes para outros. Isso nos mostra que para se obter determinado produto do fungo, deve-se cultivá-lo no meio de cultura que lhe dê os nutrientes necessários para seu crescimento e produção dos metabólitos de interesse. Os nossos resultados estão de acordo com o relatado na literatura para os basidiomicetos estudados, cujo melhor crescimento micelial ocorre de modo geral nesta faixa ácida de pH 4 – 5 ( FONSECA, 2009);. Porém, esses dados estão em desacordo com Fang e Zhong (2002)

que obtiveram o crescimento micelial máximo com o basidiomiceto *Ganoderma lucidum* em pHs 6.0 – 6.5. É fundamental o estudo das condições de cultivo de espécies fúngicas, porque pode ocorrer incremento tanto da biomassa, quanto nos metabólitos secundários importantes em várias atividades biológicas dos fungos (NEPOMUCENA, 2010). Assim, foram pesquisados neste trabalho alguns fatores que podem potencializar a produção de enzimas obtidas a partir da cepa Amazônica *Trametes lactinea*, tais como as condições de crescimento, resíduo da casca do *Astrocaryum aculeatum meyer* que foram utilizadas como fonte alternativa de carbono e ainda faixa de pH. Ressalta-se, entretanto que alguns elementos são essenciais para o crescimento dos fungos. Carbono e nitrogênio são elementos essenciais no crescimento micelial dos fungos e estão diretamente relacionados a produção de biomassa destes microrganismos e secreção enzimática. As quantidades de carbono e nitrogênio necessárias mostram variações de acordo com a espécie e o meio estudado (GARCIA, 2006). A atividade enzimática foi calculada utilizando a metodologia proposta por Ander e Eriksson (1976).

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{\Delta \text{ABS} \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot R \cdot \Delta T}$$

onde:

$\varepsilon$  = coeficiente de absorção de cada substrato, conforme dados da literatura;

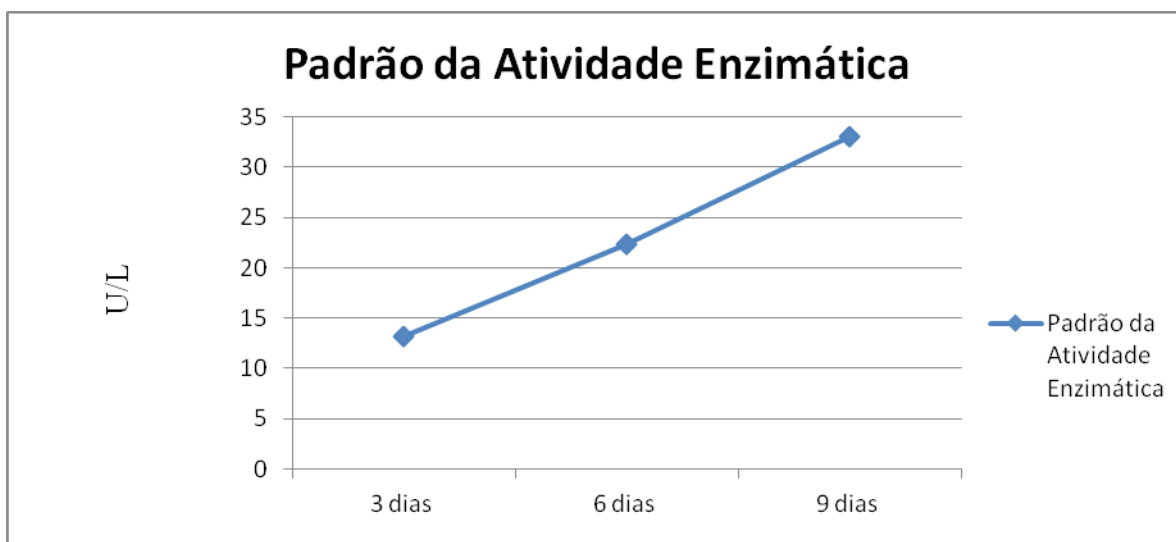
$\Delta \text{ABS}$  = Absorção final – Absorção inicial;

R = Volume em ml

$\Delta t$  = tempo de reação em minutos.

Na presente pesquisa foi possível realizar a determinação da cinética enzimática da enzima lacase obtida a partir da cepa do fungo *Trametes lactinea* sob a condição estacionária e 2% de suplemento de resíduo, isso fermentados em faixa de pH pré-estabelecido. O basidiomiceto *Trametes lactinea* produziu a enzima lacase após o terceiro dia de atividade, evidenciada um pico de 13,21 U/L da enzima, (figura 01), sendo que a presente enzima continuou a ser secretada por todo o período pré-estabelecido de 09 dias de avaliação, no sexto dia de atividade este pico foi potencializado, assumindo um valor de 22,3 U/L, e ainda na última leitura atingindo a cinética enzimática de 33,7. (Figura 01). Nossos dados estão de

acordo com a literatura que relata que muitos basidiomicetos produzem a *lacase* após 2 ou 3 dias de crescimento e têm um tempo bastante variável durante o qual a enzima continua a ser produzida (GARCIA, 2006 ). No entanto a presente pesquisa merece algumas considerações, como por exemplo: a faixa de pH, ótimo para basidiomicetos esta entre as faixas de 4 e 5, portanto estes organismos tem preferência por meios ácidos ( DAMASCENO 2009).



**Figura 01:** Atividade Enzimática de Lacase utilizando a cepa Amazônica *Trametes lactinea* a partir do meio nutricional contendo o resíduo da casca do *Astrocaryum aculeatum meyer*.

Nos últimos anos tem ocorrido um interesse maior na utilização eficiente de resíduos agroindustriais (PANDEY et al., 1992; ROSALES et al., 2002). Muitos bioprocessos têm sido desenvolvidos baseados nesses materiais como substratos em bioprocessos para produção de enzimas isoladas, ácidos orgânicos, etanol, cogumelos comestíveis, enzimas e metabólitos secundários biologicamente importantes (PANDEY et al., 1992; MASSADEH et al., 2001; LAUFENBERG et al., 2003). Ressalta-se ainda que possivelmente a casca do tucumã contenha substâncias macromoleculares que foram utilizadas como fonte de nutrientes, para isto as enzimas hidrolíticas, secretadas pelos fungos, hidrolisaram estas macromoléculas e liberaram, assim, pequenas moléculas solúveis que puderam ser utilizadas para o crescimento destes microrganismos (BUSWELL, 1991)

A partir do presente pesquisa foi possível verificar a possibilidade do uso de resíduos como fonte de carbono para cepas Amazônicas na determinação de enzimas de interesse biotecnológico. Apesar dos resultados favoráveis a pesquisa evidenciou algumas lacunas que devem incrementadas para o entendimento melhor do processo, como por exemplo, usar faixas de temperatura e pH diferentes, fontes de carbonos alternativas, ( resíduos regionais) ,



e ainda vale ressaltar que o presente estudo foi realizado em fase estacionária, por tanto possivelmente este resultado seria ainda potencializado caso realizado em fase de agitação, isso, vislumbrando possibilidade de um produto final.

## CONCLUSÃO

A cepa Amazônica *Tramets lactinea*, expressou uma excelente cinética enzimática a partir do terceiro dia .

Houve uma interação entre a Cepa Amazônica *Tramets lactinea* e sua respectiva fonte de carbono (*Astrocaryum aculeatum meyer*).

Seu melhor pico enzimático foi no nono dia de atividade obtendo a média de 33,7 U/L.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDER, P., ERIKSSON, K.-E., KOLAR, M.-C., KRINGSTAD, K., RANNUG, U., AND RAMEL, C. (1976). Studies on the Mutagenic Properties of Bleaching Effluents. *Svensk Papperstidn.* 80:454-459.

BUSWELL, J. A. Fungal degradation of lignin. In: ARORA, D. K.; BHARAT, R.; MUKERJI, K. G.; KNUDSEN, G. R. (1991); (Ed.). *Handbook of applied mycology: soil and plants.* New York: Marcel Dekker. p. 425- 480.

BUSWELL, (1991), J.A. Fungal degradation of lignin. In: ARORA, D.K. et al. *Handbook of applied mycology: Soil an plants.* New York: Marcel Dekker, vol. 1, p. 425-480,.

CASTRO E SILVA (1996), A. Micromorfologia da degradação de madeira da espécie amazônica *Hura creptans* L. Por fungos lignolíticos pertencentes a classe Hymenomyces. Tese de doutorado. Manaus: INPA/FUA.

DAMASCENO A. A. (2009). 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Otimização das condições de crescimento do fungo Amazônico *Panus Fasciatus*. (BLETER) SINGER 1965.

FANG, Q.H., ZHONG, J.J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal* 10: 61-65 (2002).

FONSECA, (2009), M.D.P. Produção de Enzimas Oxidativas por Fungos Amazônicos Degradores de Madeira. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), 99p.

G.S. NYANHONGO *et al.* (2007): Oxidoreductases from *Trametes* spp., *Food Technol. Biotechnol.* 45 (3) 250–268.

GARCIA, (2006) T. A. Produção e caracterização de duas *lacases* do Fungo *Pycnoporus sanguineus*, Tese de doutorado, Universidade de Brasília.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROM, (2003), M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; (B) Practical implementations *Bioresource Technology*, v.87, n.2, p.167-198.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYZTROEM, (2003), M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; practical implementation. *Bioresource Technology*. Essex, v 87, p. 167-198, .

MARTINEZ, A. T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUENÁS, F. J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTINEZ, M. J.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RIO, J. C., (2005) Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International microbiology the official journal of the Spanish*, 8(3), pp. 195-204.

MASSADEH, (2001), M. et al. Synergism of cellulose enzymes in mixed culture solid substrat fermentation. *Biotechnological Letters*, Hull, v. 23, p. 1771-1774.

MASSADEH, M.I.; YUSOFF, W.M.W.; OMAR, O.; KADER, J. Synergism of cellulase enzymes in mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters*, v.23, p.1771.1774, 2001.

NEPOMUCENA, R.M.P. Avaliação do potencial microbiano de crescimento e secreção de lacase do fungo Amazônico *Lentinus crinitus*. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (MBT), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), 2010, 140p.

PANDEY, (1999), A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Currente Sciences*, Bangalore, v. 77, p. 149-162,.

PUTZKE (2002), J. Os reinos dos fungos. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, vol. 1 e vol. 2.

PUTZKE, J; PUTZKE, M.T.L., (2004), Os Reinos dos Fungos. Vol. 2 Santa Cruz do Sul: EDUNISC.

ROSALES, E.; COUTO, R.; SAROMAN, (2002), A. New uses of food waste: application to lacase production by *Trametes hirsute*. Biotechnological Letters, Hull, v. 24, p. 701-704.

SANT'ANA, JR.; G.L (2001),. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA,U.; AQUARONE,E.; BORZANI,W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial: Engenharia e Bioquímica, vol. 2, 1ª ed.. São Paulo, UdgardBluche, p.351-356.

SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A. (1989). Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. Mycologia, 81:234-240.