

ESTUDO DE INDUTORES PARA A PRODUÇÃO DE LACASE POR *Pycnoporus sanguineus*

VALERIANO, Viviane Souto¹; **SILVA**, Anna Maria Ferreira²; **SANTIAGO**, Mariângela Fontes³; **GARCIA**, Telma Alves^{3,4}

Palavras-chave: Lacase, *Pycnoporus sanguineus*, etanol, 2,5-xilidina.

1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

Lacase (p-difenol: dioxigênio oxidoreductase – EC 1.10.3.2) é uma polifenol oxidase que atua sobre uma variedade de doadores de hidrogênio aromáticos e espécies inorgânicas, incluindo íons Mn^{+2} . O fungo *Pycnoporus sanguineus*, basidiomiceto da família Polyporaceae, é um eficiente produtor desta enzima e está sendo utilizado com sucesso na fermentação de resíduos agroindustriais e na descoloração de efluente Kraft, além de diferentes corantes (POINTING e VRIJMOED, 2000). A utilização de enzimas para o tratamento ou remoção de poluentes ambientais tem interesse crescente, pois apresenta alta eficiência, seletividade e reações ambientalmente saudáveis. A ampla gama de substratos sobre os quais a lacase pode atuar é uma característica que direciona para seu emprego na biorremediação de ambientes complexos como o efluente de indústrias farmacêuticas, que apresenta uma composição bastante variável em função da sazonalidade de produção. O efeito indutor de 2,5-xilidina foi descrito primeiramente por Fahraeus e colaboradores em 1958 sendo um dos indutores mais citados na literatura. O etanol que apresenta baixa toxicidade e custo, quando comparada à 2,5-xilidina, também tem apresentado bons resultados como indutor para produção de lacase e sua utilização é bastante interessante para aplicação industrial (LOMASCOLO et al., 2003). Como a aplicação de enzimas em processos biotecnológicos e ambientais requer um grande volume de enzima, o objetivo geral deste trabalho é realizar um estudo de indutores para produção de lacase por *P. sanguineus*.

2. METODOLOGIA

2.1 – Organismo e cultivo

O fungo *P. sanguineus* CCT-4518, obtido junto à Fundação André Tosello, Campinas/SP, foi mantido em Ágar Batata Dextrose (BDA), protegido da luz, à temperatura ambiente. Para obtenção das culturas a serem utilizadas para produção de lacase o crescimento se deu em meio BDA por 5 dias a 37°C.

2.2 - Produção de lacase

O meio de produção de lacase (MPL) foi constituído por extrato de malte (1,25 g.L⁻¹), $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ (0,0005 g.L⁻¹) e como indutor 50 - 200 mg.L⁻¹ de 2,5-xilidina ou 20 - 50 g.L⁻¹ de etanol. Frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de MPL foram inoculados com 5 discos de ágar com 7 mm retirado da região de crescimento mais recente do fungo em meio BDA. O material foi mantido a 28 - 30 °C, sob agitação constante de 140 rpm, sob proteção da luz. A produção de enzimas foi avaliada em intervalos regulares, durante até 21 dias.

2.3 - Ensaio enzimático para atividade de lacase

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação do substrato (ABTS 5mM) na presença de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,6. A reação ocorreu à temperatura ambiente e foi acompanhada espectrofotometricamente a 420 nm por 7 minutos. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol de substrato por minuto. A atividade de lacase foi calculada de acordo com a seguinte fórmula, modificada de Leonowicz e Grzywnowicz 1981:

$$U/L = \frac{\Delta A \cdot 10^6}{\epsilon \cdot \Delta t \cdot V}$$

onde:

ϵ = coeficiente de extinção molar do ABTS ($\epsilon_{420} = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

ΔA = aumento da absorvância no comprimento de onda específico

Δt = tempo de reação em minutos

V = volume em mL da solução enzimática, utilizado na reação

2.4 - Determinação da biomassa

A biomassa de *P. sanguineus* foi determinada através da filtração a vácuo do micélio em papel de filtro, com sucessivas lavagens com água destilada e secagem do mesmo em estufa a 80°C até peso constante. As determinações foram feitas em duplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de avaliar o efeito da 2,5-xilidina e do etanol sobre o crescimento e a produção de lacase por *P. sanguineus*, foram testadas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg . L⁻¹ de 2,5-xilidina e de 20, 30, 40 e 50 g . L⁻¹ de etanol. Com o uso da 2,5-xilidina observou-se um grande aumento na atividade enzimática, mesmo em concentrações mais altas que as normalmente empregadas (GARCIA et al., 2006) (Figura 1). A produção de lacase foi maior quando se adicionou ao meio 200 mg . L⁻¹ deste indutor, sendo a produção máxima (2019 U.L⁻¹) alcançada entre o 7° e 9° dia. O crescimento do fungo na presença de etanol apresentou bons resultados indutores para a produção de lacase. A melhor atividade enzimática (1035 U.L⁻¹) ocorreu entre o 13° e o 15° dia de crescimento com a concentração de 50 g . L⁻¹ de etanol. Para *Pycnoporus cinnabarinus* os melhores resultados foram obtidos com 35 mg . L⁻¹ deste indutor, havendo uma inibição da produção em concentrações maiores (LOMASCOLO et al., 2003). Quanto à biomassa, observou-se que, para ambos os indutores estudados, não houve uma relação direta com a produção de lacase (Figuras 3 e 4). Outro interessante aspecto observado quando o fungo *P. sanguineus* cresceu na presença destes indutores foi que com a 2,5-xilidina a produção de lacase coincidiu com a síntese de um pigmento alaranjado enquanto que com etanol, em concentrações superiores a 30 mg.L⁻¹, houve pequena alteração na coloração do meio durante o cultivo. A formação deste pigmento parece estar relacionada à síntese de melanina pelo fungo, que segundo Faure e colaboradores (1994) é inibida pelo etanol.

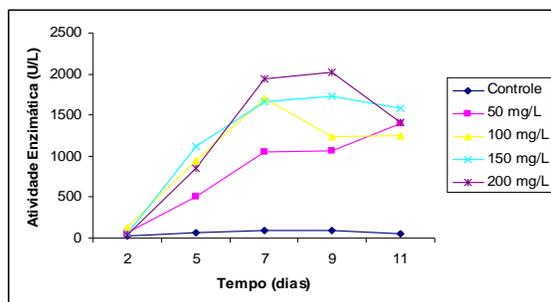


Figura 1. Produção de lacase na presença de diferentes concentrações de 2,5-xilidina.

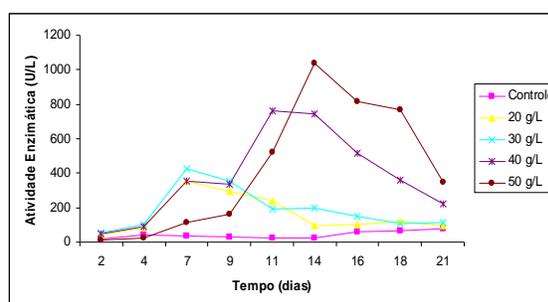


Figura 2. Produção de lacase na presença de diferentes concentrações de etanol.

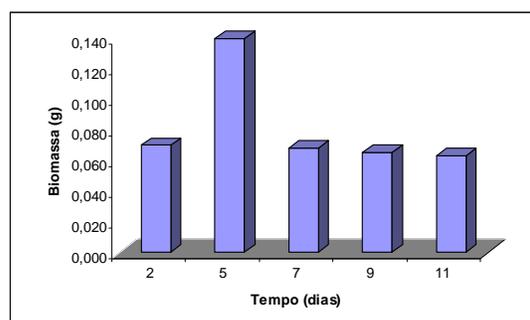


Figura 3. Biomassa utilizando 50 mg.L⁻¹ de 2,5-xilidina como indutor.

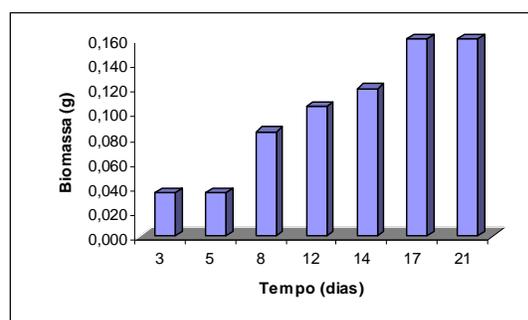


Figura 4. Biomassa utilizando 50 g/L de etanol como indutor.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos confirmam o importante papel indutor da 2,5-xilidina na produção de lacase e apresentam perspectivas bastante promissoras para o emprego do etanol como agente indutor desta enzima pelo *P. sanguineus*, considerando-se as vantagens econômicas e ambientais de seu uso. A provável inibição da formação de melanina na presença de etanol é outro dado importante a ser considerado, sendo interessante para estudo de descoloração de corantes industriais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FAURE, D.; BOUILLANT, M. L.; BALLY, R. Isolation of *Azospirillum lipoferum* 4T Tn5 mutants affected in melanization and laccase activity. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 60, p. 3413-3415, 1994.

GARCIA, T. A.; SANTIAGO, M. F. S.; ULHOA, C. J. Properties of laccases produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2,5-xylidine. *Biotechnology Letters*. v. 28, p. 633-636, 2006.

LEONOWICZ, A.; GRZYWNOWICZ, K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using seringaldazine as a substrate. *Enzyme Microbial Technology*. v. 3, p. 55-58, 1981.

LOMASCOLO, A.; RECORD, E.; HERPOËL-GIMBERT, I.; DELATTRE, M.; ROBERT, J. L.; GEORIS, J.; DAUVIRIN, T.; SIGOILLOT, J. C.; ASTHER, M. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. *Journal of Applied Microbiology*. v. 94, p. 618-624, 2003.

POINTING, S. B.; JONES, E. B. G.; VRIJMOED, L. L. P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. *Mycologia*. v. 92, n. 1, p. 139-144, 2000.

¹Aluna de Graduação. Faculdade de Farmácia – Laboratório de Enzimologia/UFG, vivi.souto@gmail.com

²Aluna de Graduação. Faculdade de Farmácia – Laboratório de Enzimologia/UFG, annamariaufg@yahoo.com.br

³Professora da Faculdade de Farmácia/UFG, mfs@farmacia.ufg.br

⁴Orientadora / Faculdade de Farmácia/UFG, telma@farmacia.ufg.br