



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Efeito de concentrações de glicose e caseína na produção de fenoloxidasas de *Marasmiellus palmivorus* VE111 em biorreator com agitação mecânica

Willian Daniel Hahn Schneider<sup>1</sup>, Roselei Claudete Fontana<sup>1</sup>, Aldo José Pinheiro Dillon<sup>1</sup>,  
Simone Mendonça<sup>2</sup>, Félix Gonçalves de Siqueira<sup>2</sup>, Marli Camassola<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia

<sup>2</sup>Embrapa Agroenergia – Brasília

Caixa Postal 1352 – 95070-560 Caxias do Sul – RS - E-mail: willianschneiderwhs@yahoo.com.br

#### RESUMO

Neste trabalho, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de glicose e caseína na produção de fenoloxidasas de *Marasmiellus palmivorus* VE111 em biorreator com agitação mecânica. Verificou-se que menores concentrações de glicose (5 g/L e 10 g/L) proporcionaram maiores atividades de peroxidases totais (1285 U/mL) e lacases (3420 U/mL), respectivamente, enquanto que uma maior concentração de glicose (30 g/L) favoreceu a produção de manganês peroxidases (59 U/mL). O pH ótimo de reação da melhor condição testada (5 g/L de glicose e 1,8 g/L de caseína) é igual a 3,5 e a temperatura ótima de reação igual a 40 °C. Observou-se a manutenção de 50% da atividade de lacase por 6 h de incubação a 50 °C, nos testes de termoestabilidade.

**Palavras-chave:** *Marasmiellus palmivorus*, fenoloxidasas, biorreator, fontes de carbono e fontes de nitrogênio.

#### INTRODUÇÃO

Os basidiomicetos são os únicos organismos capazes de decompor eficientemente a lignina. Espécies do gênero *Phanerochaete*, *Pleurotus* e *Trametes* são os mais estudados nesta área. Nestes estudos, é possível verificar que parâmetros avaliativos como a fonte de carbono e nitrogênio empregada influenciam na quantidade de enzimas produzidas.

*Marasmiellus palmivorus* é um macrofungo pertencente ao filo basidiomycota. No entanto, há poucos estudos na literatura sobre o uso deste fungo na produção de enzimas ligninolíticas. Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de glicose e caseína na produção de fenoloxidasas por *M. palmivorus* VE111 quando cultivado em biorreator com agitação mecânica.

#### MATERIAL E MÉTODOS

##### Microrganismo

Para a produção de fenoloxidasas foi empregado o fungo *M. palmivorus* VE111 pertencente à Coleção de Microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassa do Instituto de Biotecnologia, da Universidade de Caxias do Sul.

##### Planejamento experimental

Após estudos prévios de avaliação de diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose e glicerol) e nitrogênio (peptona e caseína) na produção de fenoloxidasas de *M. palmivorus* VE111 realizados em frascos, um planejamento experimental foi realizado para avaliar as concentrações mais adequadas de glicose e caseína na produção de enzimas. O meio de cultivo foi composto por concentrações de glicose e caseína indicadas no delineamento composto central rotacional (DCCR) fatorial 2<sup>2</sup>, com 10 mL da solução mineral de Mandels e Reese (1957) e caldo de batata para completar o volume de 100 mL.

##### Produção de enzimas em biorreator

Realizado o planejamento experimental, ensaios em biorreator com agitação mecânica, em regime descontínuo, foram conduzidos de acordo com as melhores condições indicadas pelo planejamento experimental. O meio de cultivo em biorreator foi o mesmo que o



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

empregado nos ensaios em frascos. O volume operacional foi de 5 L, a 28 °C, sem controle de pH e saturação de oxigênio mínima de 30%.

### **Crescimento, pH e consumo das fontes de carbono**

As amostras foram centrifugadas a  $9600 \times g$ , durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado para determinação de pH, atividades enzimáticas e consumo de glicose. O consumo de glicose foi realizado em HPLC em coluna Aminex HPX-87H, a 60 °C, 5 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (fase móvel), e fluxo de 0,6 mL/min. A massa micelial foi usada para determinação de crescimento, de acordo com o método de Rapp *et al.* (1981), com modificações. Nos experimentos em biorreator, alíquotas de 10 mL foram coletadas e a massa micelial usada para determinar o crescimento fúngico.

### **Atividades enzimáticas**

A atividade de lacases foi determinada segundo Wolfenden & Wilson (1982), empregando ABTS 5 mmol/L como substrato. As peroxidases totais foram dosadas empregando-se a mesma metodologia das determinações de lacase, utilizando ABTS mmol/L como substrato, entretanto com a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mmol/L (Heinzkill *et al.*, 1998). A atividade de manganês peroxidases foi determinada pelo método proposto por Kuwahara *et al.* (1984), utilizando-se o vermelho de fenol 0,1% (m/v) como substrato.

### **Caracterização de lacases**

O extrato bruto enzimático da melhor condição dos ensaios em biorreator foi empregado para a caracterização enzimática de lacases. Para avaliar o pH de reação foram utilizados os tampões acetato de sódio, citrato de sódio e Mc'Ilvaine. Estes tampões foram preparados em faixas de pH de 3,0 a 8,0. Os testes de temperatura de reação e a termoestabilidade enzimática foram conduzidos com o tampão que proporcionou maior atividade enzimática no teste de pH de reação (tampão Mc'Ilvaine). As temperaturas de reação empregadas foram 20, 25, 30, 35 e 40 °C. A termoestabilidade enzimática de lacases foi realizada a 20, 30, 40, 50 e 60 °C, durante 72 h de incubação, sendo coletas realizadas em 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h de incubação.

### **Zimograma de lacases**

O extrato bruto de cada pico enzimático dos ensaios realizados foi submetido a um zimograma de lacases. O SDS-PAGE foi realizado de acordo Laemmli (1970) e revelação do gel de acordo com Yaver *et al.* (1996).

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **Produção de fenoloxidasas de *M. palmivorus* VE111 em biorreator**

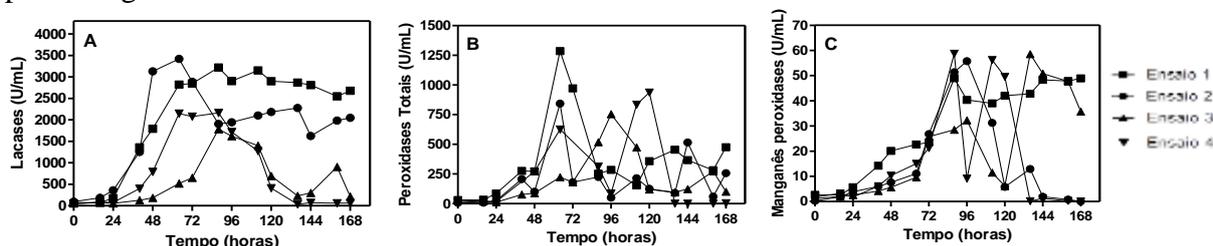
A partir da análise dos resultados do gráfico de superfície de resposta foram realizados os seguintes ensaios em biorreator: ensaio 1 (5 g/L de glicose e 1,8 g/L de caseína), ensaio 2 (10 g/L de glicose e 1,8 g/L de caseína), ensaio 3 (20 g/L de glicose e 1,5 g/L de caseína) e ensaio 4 (30 g/L de glicose e 1,5 g/L de caseína).

Verificou-se nos ensaios 1 e 2 (menores concentrações de glicose dentre as condições testadas) os maiores títulos de lacases (Figura 1-A). No ensaio 2, o pico enzimático foi detectado em 64 h de cultivo (3420 U/mL), observando-se uma queda brusca na atividade após o pico. No ensaio 2, as atividades foram crescentes até atingirem o pico enzimático em 88 h de cultivo (3219 U/mL), não apresentando quedas na produção da enzima até o final do cultivo. Os títulos enzimáticos de lacases obtidos neste estudo são superiores àqueles encontrados na literatura, como por exemplo, *Pleurotus ostreatus* – 874 U/mL – (Mazumder *et al.*, 2008) e *Trametes pubescens* – 333 U/mL – (Galhaup *et al.*, 2002).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Os ensaios 3 e 4, elaborados com uma maior quantidade de glicose, 20 e 30 g/L respectivamente, não favoreceram a produção elevada de lacases em comparação com os demais ensaios. No ensaio 3 obteve-se 1783 U/mL de lacases, enquanto que no ensaio 4 o pico foi igual a 2163 U/mL de lacases.

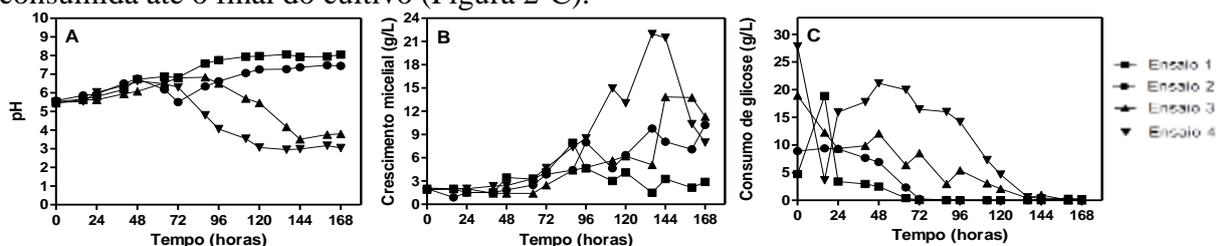


**Figura 1.** Atividades enzimáticas de lacases (A), peroxidases totais (B) e manganês peroxidases (C) de *Marasmiellus palmivorus* VE111 em biorreator com agitação mecânica. Ensaio 1 (5 g/L de glicose e 1,8 g/L de caseína), Ensaio 2 (10 g/L de glicose e 1,8 g/L de caseína), Ensaio 3 (20 g/L de glicose e 1,5 g/L de caseína) e Ensaio 4 (30 g/L de glicose e 1,5 g/L de caseína).

Observa-se uma queda no pH após 88 h de cultivo no ensaio 3 e após 72 h de cultivo no ensaio 4 (Figura 2-A). Também a partir desses pontos é possível observar diminuição na produção de lacases para essas duas condições de cultivo com maiores concentrações de glicose e, ao mesmo tempo, um incremento na produção de biomassa. Sugere-se que a queda no pH nessas condições ocorre devido ao consumo de amônia presente no meio de produção sob a forma de sulfato de amônio com a liberação de íons de  $H^+$  no meio (Bailey & Tahtiharju, 2003).

Observando os dados de crescimento micelial (Figura 2-B), constata-se que nos ensaios 3 e 4 foram obtidos os maiores valores de massa micelial, 14 g/L e 22 g/L, respectivamente. Assim sendo, as maiores concentrações de glicose favoreceram o maior crescimento do fungo e, em contrapartida, a menor produção de lacases.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a produção de lacases esteja associada ao crescimento, uma vez que a produção de lacases esteve diretamente associada à formação da biomassa e ao consumo de substrato. Para todos os ensaios realizados, a glicose foi consumida até o final do cultivo (Figura 2-C).



**Figura 2.** Variação de pH (A), crescimento micelial (B) e consumo de glicose (C) de *Marasmiellus palmivorus* VE111 cultivado em biorreator com agitação mecânica.

Com relação à produção de peroxidases totais (Figura 1-B), o ensaio 1 proporcionou maior título enzimático (1285 U/mL), enquanto que para manganês peroxidases, verificou-se no ensaio 4 a maior produção desta enzima (59 U/mL).

### Caracterização de lacases de *Marasmiellus palmivorus* VE111

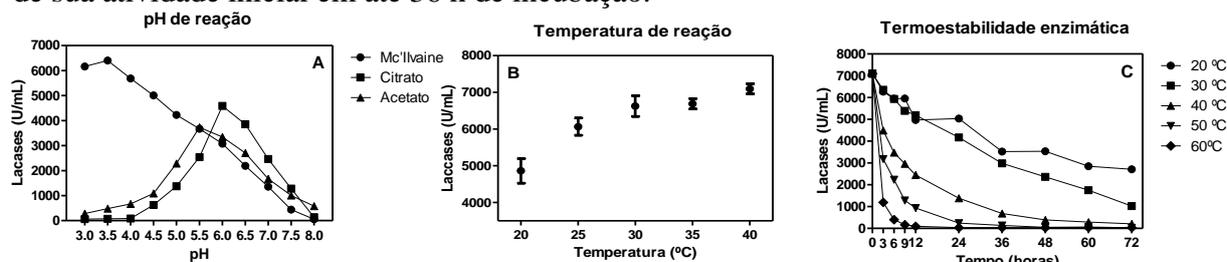
Optou-se em caracterizar o extrato bruto enzimático de lacases do ensaio 1 (88 h), uma vez que a produção enzimática manteve-se durante o cultivo, como também é o meio com menor concentração de glicose, sendo do ponto de vista econômico muito interessante. O tampão ideal para ensaios enzimáticos com lacases foi o tampão Mc'Ilvaine, sendo 3,5 o pH ideal para reação enzimática, atingindo 6402 U/mL de lacases (Figura 3-A). Estes dados foram semelhantes aos de Soden *et al.* (2002) que observaram um pH ótimo de 3,3 para a atividade de lacases em testes realizados com *Pleurotus sajor-caju* P32-1.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Com relação à temperatura de reação, verificou-se que entre as temperaturas avaliadas, 40 °C apresentou os maiores títulos enzimáticos de lacases (7051 U/mL). O mesmo aconteceu nos estudos de Murugesan *et al.* (2006) para *P. sajor-caju* e nos estudos de Fang *et al.* (2015) para *Ganoderma lucidum* 77002.

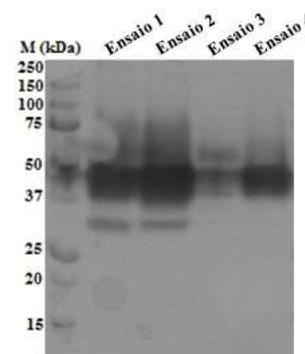
Quanto à estabilidade térmica das atividades de lacases, observou-se que a 50 °C, a enzima retém aproximadamente 50% de sua atividade inicial durante um período de incubação de até 6 h. Em temperaturas inferiores, como a de 30 °C, a enzima retém até 50% de sua atividade inicial em até 36 h de incubação.



### Zimograma de lacases do extrato bruto

No zimograma de lacases (Figura 4) observa-se uma banda entre 37 e 50 kDa nos picos enzimáticos de todas os ensaios realizados. No entanto, somente nos ensaios 1 e 2 uma banda a mais foi identificada, em torno de 30 kDa. Essas bandas podem ser isoenzimas que foram mais evidentes nas duas melhores condições de cultivo observadas (ensaios 1 e 2).

**Figura 4.** Zimograma dos picos de atividades de lacases observadas nos extratos brutos dos cultivos de *Marasmiellus palmivorus* VE111 em biorreator.



## CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou que os cultivos de *M. palmivorus* VE111 em biorreator com menores concentrações de glicose (5 g/L e 10 g/L) possibilitou maiores atividades para lacases e peroxidases totais, enquanto que a maior concentração de glicose (30 g/L) favoreceu a atividade de manganês peroxidases. Neste estudo, a produção de lacases apresentou uma cinética enzimática associada ao crescimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bailey MJ, Tahtharju J. (2003). Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. *Appl Microbiol Biotechnol.* 62:156-162.
- Fang Z, Liu X, Chen L, Shen Y, Zhang X, Fang W, Wang X, Bao X, Xiao Y. (2015). Identification of a laccase Glac15 from *Ganoderma lucidum* 77002 and its application in bioethanol production. *Biotechnol Biofuels.* 8:54.
- Galhaup C, Wagner H, Hinterstoisser B, Haltrich D. (2002). Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme Microb. Technol.* 30:529-536.
- Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, Anke T. (1998). Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (Family Coprinaceae). *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1601-1606.
- Kuwahara, M.; Glenn, J. K.; Morgan, M. A.; Gold, M. H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters.* 169: 247-250.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural preteins during the assembly of the head bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature.* 227: 680-685.
- Mandels M, Reese ET. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J Bacteriol.*73:269.
- Mazumber S, Bosel S, Bandopadhyay A, Alam S, Mukherjee M. (2008). Study of laccase production by *Pleurotus ostreatus* in a 5 L bioreactor and application of the enzyme to determine the antioxidant concentration of human plasma. *Lett. Appl. Microbiol.* 47:355-360.
- Soden DM, O'Callaghan J, Dobson ADW. (2002). Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiol.* 148: 4003-4014.
- Wolfenden RS, Wilson RL. (1982). Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* 02: 805-812.
- Yaver DS, Xu F, *et al.* (1996). Purification, characterization, molecular cloning and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 834-841.