



PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO OBTIDO DO *Pleurotus* sp E POTENCIAL USO COMO ADITIVO EM SILAGEM

Janaina Macieiro Bragatto¹, Erica Machado¹, Paula Toshimi Matumoto-Pintro²,
Lúcia Maria Zeoula¹

¹ Departamento de zootecnia –Universidade Estadual de Maringá–Maringá-PR

² - Departamento de agronomia–Universidade Estadual de Maringá – Maringá –
PR

lmzeoula@uem.br

Área: 5.04.00.00-2; Sub área: 5.04.03.02-8

Palavras-chave: fungo, manganês peroxidase , lignina

RESUMO

Objetivou-se, no presente estudo, avaliar a produção da enzima manganês peroxidase produzida pelo fungo da podridão branca em diferentes fontes de carbono (feno de coast cross e bagaço de cana) e tempos de cultivo (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 dias) e sua estabilidade em pH e temperatura. A atividade Manganês peroxidase (Mn peroxidase) foi determinada através da oxidação de MnSO₄ em Malonato de sódio na presença de H₂O₂. As variáveis foram analisadas pelo procedimento MIXED do Pacote Estatístico SAS. Os dados foram interpretados por uma análise de variância adotando-se um nível de significância de P<0,05 e o teste de média a ser realizado será o proposto por Tukey adotando 5% de probabilidade. A produção de enzima foi significativamente maior (P < 0,05) no tratamento em que foi utilizado feno de coast cross como fonte de carbono sendo sua produção estabilizada após o 10º dia de incubação dos fungos. A maior atividade da enzima se deu em pH 5,5 e a temperatura de 30 a 40º C.

INTRODUÇÃO

A produção de cogumelos ocorre, normalmente, em resíduos lignocelulósicos elaborados por subprodutos da agricultura e para disponibilizar fonte de carbono necessária para a obtenção de energia para o seu desenvolvimento, o fungo produz e secreta enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas, lignocelulolíticas e proteolíticas. Os fungos da podridão branca produzem uma variedade de enzimas extracelulares que atuam sinergicamente e eficientemente na degradação da lignina, dentre elas, a manganês peroxidase, que é uma enzima ligninolítica e foi reportado como a principal enzima envolvida na despolimerização da lignina (Sahoo e Gupta, 2005).

O aumento na digestibilidade da parede celular das forragens ensiladas com um complexo de enzimas lignofibrolíticas poderá disponibilizar mais energia





metabolizável para o ruminante. Desta forma, investigar as enzimas produzidas pelo fungo da podridão branca em diferentes fontes de carbono foi o objetivo deste estudo, e entre elas a produção da enzima manganês peroxidase quanto a sua estabilidade em pH e temperatura.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os cultivos do fungo foram realizados em frascos de erlenmeyer de 125mL contendo 50mL de meio de cultura líquido e 0,5g de fonte de carbono, os frascos foram fechados e esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos, em seguida, foram inoculados com um disco de 10mm de fungo crescidos em BDA e foram incubados em estufa agitadora sem iluminação com temperatura controlada de 28°C nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 dias. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas, fechadas e utilizadas para a quantificação da atividade enzimática.

A atividade Manganês peroxidase (Mn peroxidase) foi determinada através da oxidação de MnSO_4 em Malonato de sódio na presença de H_2O_2 . A proteína total para determinação da atividade enzimática específica foi determinada pelo método de Bradford (1976).

A determinação do pH ótimo foi realizada em solução tampão McIlvain com os valores de pH de 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5. Os experimentos foram realizados em tubos de ensaio de 5mL, em temperatura de 25°C e os testes de estabilidade com a temperatura foram realizados a 5, 15, 25, 30, 40, 50 e 60°C.

As variáveis foram analisadas pelo procedimento MIXED do Pacote Estatístico SAS (SAS, 2004) e os dados interpretados por uma análise de variância adotando-se um nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados observados na Tabela 1, o feno proporcionou maior produção da enzima manganês peroxidase quando comparado ao bagaço de cana. Em relação aos tempos de incubação, nota-se que até o 10º dia, a produção enzimática cresceu de forma linear e positiva e posteriormente se estabilizou.

De acordo com Kachlishvili (2005), o aumento de nitrogênio no meio favorece a produção de enzimas fibrolíticas e segundo Menezes (2009), a Manganês peroxidase é produzida como resultado do metabolismo secundário do fungo e é regulada pela concentração de carbono e nitrogênio do meio. Deste modo, a maior produção de manganês peroxidase quando se utilizou feno de coast cross em relação ao bagaço de cana-de-açúcar, como fonte de carbono para o desenvolvimento dos fungos, pode ser devido ao teor de proteína bruta do feno que é maior quando comparado ao bagaço de cana-de-açúcar (10,54% vs 3,93%). ..





Tabela 1. Atividade específica (U / mg de proteína), erro padrão da média (EPM), equação de regressão (ER) e valor de P para efeito quadrático da enzima manganês peroxidase produzida em diferentes fontes de carbono por *Pleurotus Ostreatus* em função do tempo

Fonte de carbono	Tempo de cultivo (dias)										EPM	ER
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20		
Bagaço de cana	0,0069	0,0148	0,0182	0,0289	0,0290	0,0289	0,0286	0,0281	0,0279	0,0289	0,1570	1
Feno Coast Cross	0,0147	0,0300	0,0581	0,0730	0,0758	0,0758	0,0761	0,0749	0,0749	0,0760	0,2455	2

1 - $Y = 0,0001 + 0,0042 x + 0,0001 X^2$ $R^2 = 0,9227$; 2 - $Y = 0,0051 - 0,0119X + 0,0004 X^2$ $R^2 = 0,9355$

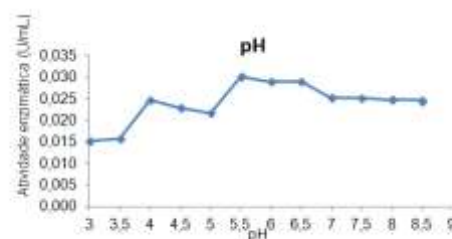


Figura 1. Atividade da enzima manganês peroxidase em diferentes faixas de pH (3 a 8,5).

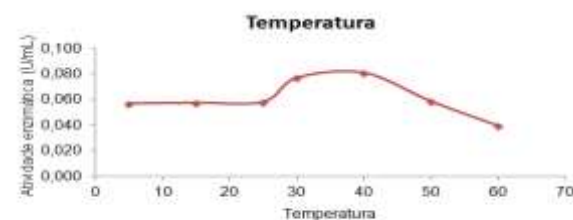


Figura 2. Atividade da enzima manganês peroxidase em diferentes faixas de temperatura (5 a 60°C).



FUNDAÇÃO
ARAUCÁRIA

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico

PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO
Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Ensino Superior



A enzima teve alta atividade de pH de 5,5 a 8,5, porém a maior atividade foi verificada em pH 5,5 com 0,03U/mL (Figura1). A temperatura em que a enzima teve maior atividade foi entre 30 a 40°C, e a atividade diminuiu com a elevação da temperatura (Figura2).

A temperatura e o pH tem grande influência sobre a velocidade das reações enzimáticas. A medida que a temperatura aumenta, ocorre maior interação entre as moléculas. Entretanto, temperaturas muito elevadas provocam o rompimento de ligações químicas e consequentemente, a desnaturação de enzima (SKOOG ET al., 2007).

CONCLUSÕES

Diante dos resultados observados pode-se concluir que o feno de coast cross proporcionou maior produção enzimática, provavelmente devido ao maior teor de nitrogênio em relação ao bagaço de cana e que a produção enzimática foi estabilizada após o 10º dia de incubação dos fungos. A enzima apresentou maior atividade em pH 5,5 e a temperatura de 30 a 40°C.

Tendo em vista que o principal objetivo é avaliar a produção e estabilidade enzimática com a finalidade de, posteriormente, utilizá-la como um aditivo em silagens, os resultados de pH e temperatura parecem satisfatórios.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa e à Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantization of microgram of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. *Estudos Tecnológicos*. V. 5, n. 1, p. 68-78, 2009.
- KACHLISHVILI, E.; PENNINCKX, M. J.; TSIKLARI, N.; ELISASHVILI, V. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by whiterot basidiomycetes under solid-state cultivation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 391-397, 2005.
- SAHOO, DK, GUPTA, R. (2005), Avaliação de microorganismos ligninolíticos para descolorimento eficiente de uma pequena fábrica de papel e celulose de efluentes. **Processo Biochem.**, 40, 1573-1578.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; STANLEY, R. C. **Fundamentos da Química Analítica**. Tradução da 8ª edição norte americana. São Paulo, Ed. Thomson, 2007.

