



PRODUÇÃO DE ENZIMAS LACASE E CELULASE DO *PLEUROTUS sp* PARA USO EM CO-PRODUTOS LIGNOCELULÓSICOS

Talita Estéfani Zunino Santana¹ (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Érica Machado¹,
Paula Toshimi Matumoto Pintro², Lúcia Maria Zeoula¹ (Orientadora)
¹ Universidade Estadual de Maringá-Departamento de Zootecnia-Maringá/Pr
² Universidade Estadual de Maringá-Departamento de Agronomia-Maringá/Pr
lmzeoula@uem.br

Área: 5.04.00.00-2 Sub área: 5.04.03.02-8

Palavras-chave: Atividade enzimática específica, bagaço de cana de açúcar, feno de capim coast cross.

Resumo

Estudou-se a produção das enzimas (Lacase e Celulase) produzidas pelo *Pleurotus sp* em diferentes fontes de carbono (bagaço de cana de açúcar e feno de capim coast cross) em função do tempo de cultivo (0 a 20 dias). O isolado de *Pleurotus sp* foi propagado em placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). A atividade de lacase foi determinada através da oxidação de 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) - ABTS em solução tampão McIlvaine. A atividade da celulase foi determinada através da quantidade de oxidação do açúcar redutor produzido utilizando ácido dinitrosalicílico (DNS). O melhor valor obtido para atividade específica da lacase foi 22,6941 U mL⁻¹ de proteína no 10º dia de incubação em feno de capim coast cross (FCC). Para celulase o melhor valor de atividade enzimática foi 92,6569 U mL⁻¹ de proteína no 10º dia de cultivo também em feno de coast cross. Ambas as atividades enzimáticas estabilizaram-se após atingir o melhor valor de produção.

Introdução

O uso de resíduos lignocelulósicos remanescentes da agricultura é comumente utilizado na alimentação dos ruminantes. Entretanto, barreiras físicas aos processos fibrolíticos podem limitar a extensão da digestão no rúmen (Martins et al., 2006).

A utilização de enzimas fibrolíticas isoladas de culturas de fungos na alimentação de ruminantes tem mostrado resultados satisfatórios, como





aumentos na digestibilidade da matéria seca (MS) e da fibra em detergente neutro (FDN) (Hunt et al., 1995)

As lacases são enzimas que promovem a degradação de lignina e são comumente encontradas em *Pleurotus sp.* As celulasas são enzimas responsáveis pela degradação de celulose, principal composto presente nas células vegetais. Essas enzimas podem ser utilizadas de várias formas, desse modo, a procura por enzimas com ação eficiente sobre a fração fibrosa dos alimentos é cada vez maior.

Diante deste exposto, objetiva-se avaliar a produção e atividade das enzimas lacase e celulase produzidas pelo *Pleurotus sp.* em diferentes fontes de carbono em função do tempo de cultivo.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido nos laboratórios pertencentes aos Departamentos de Zootecnia e de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR. O micélio utilizado foi adquirido na empresa Brasmicel, Suzano – SP, a espécie adquirida foi a *Pleurotus ostreatus branco*. As fontes de carbono foram coletadas na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) e feitas às análises bromatológicas.

O *Pleurotus sp.* foi propagado em placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA), extrato de batata (2 g/L), dextrose (10 g/L) e ágar (15 g/L), que foram incubadas durante 7 dias. Os cultivos foram em triplicata e realizados em frascos erlenmeyer de 125mL, contendo 50mL de meio de cultivo e 0,5 g das fontes de carbonos, em seguida, foram inoculados com um disco de 10 mm de fungo PL crescidos em BDA. Os meios de cultivo inoculados foram incubados sem iluminação, em agitação orbital a 120rpm min⁻¹, em estufa agitadora com temperatura controlada em 28°C nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 dias.

A atividade da lacase foi determinada através da oxidação de 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfonato) - ABTS em solução tampão McIlvaine (ácido cítrico 100 mM, K₂HPO₄ 200 mM, pH 4.0). Em cada amostra foi utilizado 1,6 mL de solução Tampão McIlvaine pH 4,0 com 0,2 mL de solução ABTS 20 mM e 0,2 mL de amostra.

A atividade Celulase foi determinada através da quantidade de oxidação do açúcar redutor produzido a partir do ácido dinitrosalicílico (DNS). Para cada 0,250 mL de amostra foi utilizado 0,250 mL de carboximetilcelulose (0,5%





em solução tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,8) em 50°C por 30 minutos.

As análises das enzimas foram realizadas em triplicata e as atividades enzimáticas calculadas utilizando a média dos valores das leituras. Os dados obtidos foram submetidos a análise de regressão não linear. As variáveis foram analisadas pelo procedimento MIXED do Pacote Estatístico SAS.

Resultados e Discussão

A quantificação das atividades enzimáticas da lacase e da celulase diferiu entre as fontes de carbono feno de coast-cross e bagaço de cana (Figura 1).

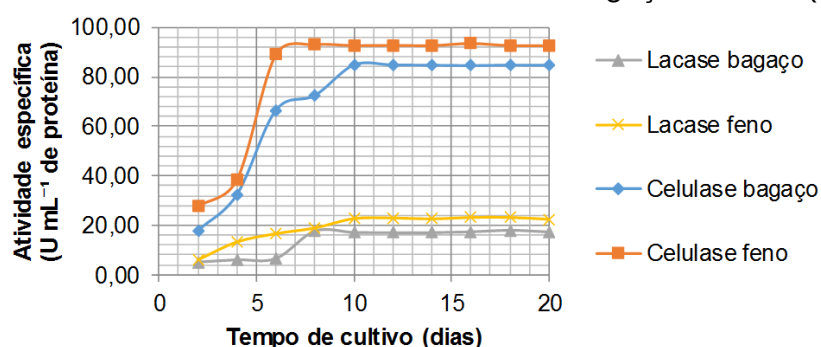


Figura 1 - Atividade específica (U mL^{-1} de proteína) das enzimas lacase e celulase produzidas em diferentes fontes de carbono por *Pleurotus ostreatus* em função do tempo

O comportamento da lacase e da celulase foram similares em ambas as fontes de carbono, onde o crescimento linear ocorreu até atingir o ponto máximo de atividade enzimática mantendo-se estável posteriormente. Este fato pode estar associado com a escassez nutricional e a produção de biomassa fúngica.

As variações na atividade lignolítica e de biossíntese de lacase pelos fungos, durante o cultivo em estado sólido, dependem do tipo de substrato utilizado. A restrição nutricional do bagaço pode explicar o comportamento da atividade enzimática da celulase e da lacase serem menores nesta fonte. Uma alternativa poderia ser consorciar o bagaço de cana com outros resíduos agrícolas, de forma a favorecer o desenvolvimento micelial fúngico. Soden & Dobson (2001), sugerem que o nitrogênio também pode regular a expressão de genes de lacase por meio de proteínas do tipo NIT2. Portanto, a maior atividade enzimática da lacase em fonte de carbono feno de coast





cross pode ser explicada pela maior quantidade de nitrogênio, proveniente da proteína bruta.

Houve maior atividade enzimática da celulase em relação a lacase nos dois meios de cultivo utilizados. O que pode ser justificado pelo fato da celulose estar maiores proporções (20-60%) nos substratos, seguida da hemicelulose e, por fim, da lignina.

A fonte de carbono feno de capim coast cross é mais rica em matéria orgânica, nitrogênio e carboidratos não fibrosos podendo justificar a maior titulação enzimática lacásica e celulásica neste substrato.

Conclusão

O feno de capim cost cross proporcionou maior atividade enzimática da lacase e da celulase. Os melhores valores de atividade específica das enzimas lacase e celulase foram obtidos entre 8 e 10 dias de incubação.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento do projeto. À Fundação Araucária, Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná pela concessão da bolsa de estudo.

Referências

HUNT, C. W. et al. Effect of fibrolytic enzyme additives on in vitro degradability of alfalfa and tall rescue. In: **Proceedings-american Society of Animal Science Western Section**, p. 349-352, 1995.

MARTINS, A. S. et al. Passage rate and ruminal parameters in cattle supplemented with fibrolytic enzymes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 1186-1193, 2006.

SODEN, D. M.; DOBSON, A. D. W. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. **Microbiology**, v. 147, n. 7, p. 1755-1763, 2001.

