

Avaliação da Produção de Lacase por *Ganodermalucidum* UEM na Presença de Indutores

**Bruna Polacchine da Silva¹, Caroline Aparecida Vaz de Araujo, Tatiane Brugnari¹,
Elidiane Andressa Rodrigues¹, Miguel Leal Neto¹, Rosane Marina Peralta¹**

¹Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Bioquímica
CEP87020-900 - Maringá- PR - E-mail: (brunapol@hotmail.com)

RESUMO

Lacase é uma fenoloxidase produzida por fungos ligninolíticos com aplicações em biorremediação e pré-tratamento de fibras lignocelulósicas. Sua produção pode ser estimulada por indutores no cultivo. Nosso objetivo foi avaliar o efeito de indutores na produção de lacase por Ganodermalucidum. O fungo foi cultivado em meio contendo glicose e nitrato de amônia suplementado ou não com etanol 3% (v/v), ácido gálico (1mM), CuSO₄ (0,4mM), e suas combinações: etanol 3% (v/v) + ácido gálico (1mM); etanol 3% (v/v) + CuSO₄ (0,4mM); ácido gálico (1mM) + CuSO₄ (0,4mM); etanol 3% (v/v) + ácido gálico (1mM) + CuSO₄ (0,4mM), a 28° C, sob agitação por 144h. Obteve-se máximo de lacases em indutor (67,15 ± 37,51 U.L⁻¹) após 96h, já com etanol a 3%, foi de 583,12 ± 140,7 U.L⁻¹ após 144h. Este resultado sugere potencial uso de etanol a 3% como indutor da produção de lacase por Ganodermalucidum.

Palavras-chave: *Ganodermalucidum*, lacase, indutores enzimáticos.

INTRODUÇÃO

A lacase (benzenodiol: oxigênio oxidorreductase, EC 1.10.3.2.) é uma polifenol oxidase que contém cobre na sua estrutura e catalisa a oxidação de uma série de substâncias inorgânicas e aromáticas (particularmente fenóis) com a concomitante redução do oxigênio a água. Estas enzimas atuam pela abstração de um elétron de fenóis, em função da redução de Cu²⁺ a Cu¹⁺ que, por sua vez, reduz O₂ a H₂O, permitindo que a enzima atue de forma cíclica (BORTOLAZZO et al., 2011; AGUIAR & FERRAZ, 2011). Devido à sua capacidade de degradar compostos fenólicos, a lacase pode ser aplicada em diversas áreas da indústria, tais como, descoloração de corantes têxteis, desintoxicação de águas residuais, degradação de pesticidas e herbicidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (WIDSTEN & KANDELBAUER, 2008).

O fungo *Ganodermalucidum* (Fr.) Krasté um basidiomiceto pertencente à família Ganodermataceae, conhecido por produzir elevadas quantidades de lacase em cultivos submersos e em estado estacionário. A produção e atividade da lacase é influenciada pela linhagem, composição do substrato e condições de cultivo do fungo (ELISASHVILI et al., 2008), além do tipo e concentração de indutores presentes no cultivo. Já se sabe que no gênero *Ganoderma*, pirogalol e ácido ferúlico são potentes indutores (ELISASHVILI et al., 2010), assim como o ácido gálico, xilidina, vanilina, alcoóis e CuSO₄ (MANAVALAN et al., 2013). Assim, considerando o grande potencial biotecnológico e elevado potencial de mercado da lacase, este trabalho busca estabelecer o melhor indutor para a produção desta enzima pelo fungo *Ganodermalucidum* em cultivos submersos.

**Universidade Estadual de Londrina - Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380 - Campus Universitário
Caixa Postal 10.011 CEP 86057-970 Centro de Ciências Exatas - Departamento de Bioquímica e
Biotecnologia Fone +55 (43) 3371.4270 - biq@uel.br**

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo e manutenção: O fungo *Ganodermalucidum* UEM, pertence à Coleção de Basidiomicetos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Universidade de Estadual de Maringá é mantido através de repiques periódicos em ágar-batata-dextrose.

Condições de cultivo com os indutores: Os cultivos submersos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 125 mL, com 25mL de meio basal (10g.L^{-1} de glicose e 2g.L^{-1} de nitrato de amônio mais solução mineral de Vogel(meio basal ou controle). Após autoclavação, os seguintes indutores foram adicionados sob condições estéreis: etanol 3% (v/v), ácido gálico (1mM) e CuSO_4 ($0,4\text{mM}$), e suas combinações: etanol 3% (v/v) + ácido gálico (1mM); etanol 3% (v/v) + CuSO_4 ($0,4\text{mM}$); ácido gálico (1mM) + CuSO_4 ($0,4\text{mM}$); e etanol 3% (v/v) + ácido gálico (1mM) + CuSO_4 ($0,4\text{mM}$). Três discos de micélio obtidos de placas de BDA foram utilizados como inóculo. Os frascos foram mantidos sob agitação de 120 rpm a 28°C , por 6 dias, sendo alíquotas de $500\mu\text{L}$ retiradas a cada 24h para determinação da atividade lacase.

Dosagem da lacase: A atividade da lacase foi mensurada com 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) em 50 mM de tampão acetato de sódio pH4.0, sendo a oxidação do ABTS determinada pelo aumento da absorbância a 420 nm ($\epsilon = 36\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A atividade enzimática foi determinada a 40°C e expressa em unidade enzimática internacional ($\text{U} = \mu\text{mol} \times 10\text{min}^{-1}$).

Análise estatística: Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados são expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas entre as médias foram determinadas utilizando two-way ANOVA ($p < 0,01$) utilizando o programa estatística GraphPrism 6.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a produção de lacase em função do tempo de cultivo nos meios controle e nos meios suplementados com diferentes indutores. Na ausência de indutor, máximo de lacase ($67,15 \pm 37,51\text{U.L}^{-1}$) foi obtido após 96 h de cultivo. Pode-se observar que dentre os indutores utilizados, os melhores resultados (em ordem decrescente) foram obtidos nos cultivos com etanol a 3% ($583,12 \pm 140,7\text{U.L}^{-1}$) após 144h de cultivo, CuSO_4 ($45,84 \pm 14,91\text{U.L}^{-1}$) e ácido gálico ($44,64 \pm 0,98\text{U.L}^{-1}$) após 48 h de cultivo. Este resultado pode ser justificado pelo efeito de alcoóis sobre a membrana fúngica, o que facilitaria a secreção desta enzima, além do estresse oxidativo provocado por este solvente, o que acarretaria uma indução da lacase (LEE et al., 1999).

Compostos fenólicos como ácido gálico e CuSO_4 também são descritos como indutores de lacases para diferentes fungos ligninolíticos (SOUZA et al., 2004). Para *G. lucidum*, entretanto, não mostraram eficiência na indução de lacases. Quando se associou ácido gálico e CuSO_4 ao etanol, os níveis de atividade lacase obtidos foram menores do que nos cultivos somente com etanol como indutor.

Não houve diferença significativa entre o controle e os cultivos suplementados com CuSO_4 e ácido gálico isoladamente, o que contraria os resultados obtidos por outros autores (MANAVALAN et al. 2013). Silva e colaboradores (2012) também obtiveram aumento significativo da produção de lacase por linhagens de *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus florida* com a adição de CuSO_4 na concentração de $150\mu\text{M}$ feita após 3 dias de cultivo, e não no início do processo fermentativo como em nosso experimento.

Universidade Estadual de Londrina - Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380 - Campus Universitário
Caixa Postal 10.011 CEP 86057-970 Centro de Ciências Exatas - Departamento de Bioquímica e
Biotecnologia Fone +55 (43) 3371.4270 - biq@uel.br

Com relação ao tempo de cultivo, os resultados foram variados de acordo com o indutor ou combinação deste. Para o etanol a 3%, após 72h de cultivo houve um aumento significativo da produção de lacase, e este aumento seguiu exponencialmente, resultado observado também em suas combinações com ácido gálico e CuSO_4 , ou com ambos, resultados estes que corroboram com Silva et al. (2012), o qual obteve pico máximo de produção de lacase após 12 dias de cultivo de *L.edodes*, *P.ostreatus* e *P.florida*. Já para o ácido gálico e CuSO_4 e a combinação deste, até 72h obtivemos produção de lacase similar ao controle, sendo esta inibida após este período.

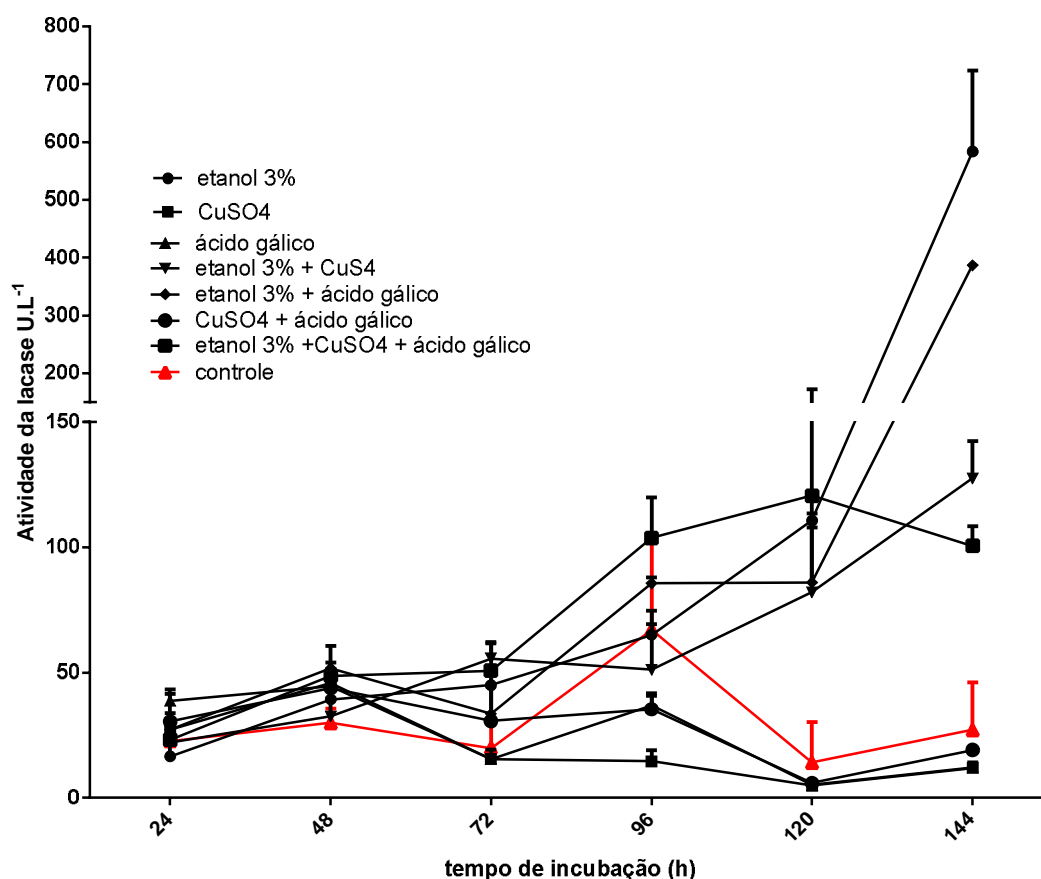


Figura 1: Atividade da lacase produzida por *Ganoderma lucidum* UEM obtida em meio basal e na presença de diferentes indutores e suas combinações em cultivos submersos. As culturas foram desenvolvidas a 120 rpm e 28° C.

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que para indução da produção de lacase, dentre os compostos analisados, a adição de etanol a 3% foi a mais eficiente, sendo exponencial a partir de 72h de cultivo, seguido de CuSO_4 e ácido gálico. Contudo, a associação dos indutores não teve um efeito aditivo de indução.

Agências de Fomento: Capes, CNPq.

Universidade Estadual de Londrina - Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380 - Campus Universitário
Caixa Postal 10.011 CEP 86057-970 Centro de Ciências Exatas - Departamento de Bioquímica e
Biotecnologia Fone +55 (43) 3371.4270 - biq@uel.br

REFERÊNCIAS

- Aguilar, A.; Ferraz, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, p. 1729-1738, 2011.
- Bortolazzo, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço-de-cana de açúcar**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- Elisashvili, V.; Penninckx, M.; Kachlishvili, E.; Tsiklauri, N.; Metreveli, E.; Kharziani, T.; Kvesitadze, G. ***Lentinusedodesand Pleurotusspecies lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition***. Bioresource Technology, v. 99, p. 457-462, 2008.
- Elisashvili, V.; Kachlishvili, E.; Kharziani, T.; Agathos, S.N. **Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes**, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, p. 1091-1096, 2010.
- Gao, D., Du, L., Yang, J., Wu, W.-M., Liang, H. **A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control**. Critical Reviews in Biotechnology. V. 30, p.70-77, 2010.
- Lee, I.Y.; Jung, K.H.; Lee, C.H.; Park, Y.H. **Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by the addition of ethanol**. Biotechnology Letters, v. 21, p. 965-968, 1999.
- Manavalan, T.; Manavalan, A.; Thangavelu, K.P.; Heese, K. **Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum***, Biochemical Engineering Journal, v. 70, p. 106-114, 2013.
- Silva, J.J. da; Santana, T.T.; Oliveira, A. C.C.; Almeida, P.H. de; Souza, S. G. H. de; Linde, G.A.; Colauto, N.B.; Valle, J. S. do. **Produção de laccase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com casca de café**. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, v. 15, n. 2, supl 1, p. 191-196, 2012.
- Souza, C.G.M.; Tychanovicz, G.K.; Souza, D.F.; Peralta, R.M. **Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds**. Journal of Basic Microbiology, v. 44, p. 129-136, 2004.
- Widsten, A.; Kandelbauer, A. **Laccase applications in the forest products industry: a review**. Enzyme and Microbial Technology, v. 42, p. 293-307, 2008.