Produção da enzima peroxidase por fungos filamentosos isolados de solos de lavouras no estado de Goiás

Thales Antony de Assis Santos[1*] (PG), Thâmara Machado e Silva, Samantha Salomão Caramori, Solange Xavier dos Santos[1] (PQ).

antonythales@hotmail.com

Universidade Estadual de Goiás - Campus Henrique Santillo; Rodovia BR 153, 3105 - Fazenda Barreiro do Meio, Anápolis - GO, 75132-903.

Resumo: Este trabalho teve por objetivo investigar a produção da enzima peroxidase por fungos filamentosos isolados de solo de diferentes cultivos agrícolas no estado de Goiás: cana-de-açúcar convencional, orgânico e soja, procedentes dos municípios de Anicuns, Goiatuba, Morrinhos e Itumbiara. A partir da técnica de diluições seriadas foram obtidas 10 linhagens fúngicas pertencentes a nove gêneros distintos. Os fungos foram cultivados em farelo de trigo, e a atividade de peroxidase foi detectada através da análise dos extratos enzimáticos brutos, utilizando espectrofotometria, a partir da oxidação do Pirogalol. Todos os isolados fúngicos mostraram atividade de peroxidase, sendo que os níveis da produção da enzima variaram entre 0,52 a 4,23 UE/mL,sendo a linhagem TAS 06, obtida de solo de cultivo de cana-de-açúcar convencional em Itumbiara, a que apresentou maior produção. Os dados revelam perspectivas promissoras para o investimento em pesquisas nas fontes alternativas para obtenção de peroxidase por meio dos fungos estudados. Entretanto, ainda são necessários estudos direcionados à indução e otimização da produção desta enzima, pelas linhagens de fungos utilizadas neste trabalho.

Palavras-chave: Microrganismos de solo; Enzimas oxidativas; Potecial biotecnológico.

Introdução

O uso e a produção de enzimas como biocatalisadores industriais tem sido uma área em intensa expansão, tendo em vista a grande diversidade natural desses compostos, e também devido à disponibilidade de técnicas que extraem facilmente estas enzimas das mais diversas espécies de seres vivos, entre eles os fungos, principalmente aqueles encontrados nos solos, pois o solo atua como um grande “reservatório” dos mais diversos grupos fungos (ORLANDELL et al, 2012).

Muito dessa importância se deve à capacidade desses organismos de sintetizar enzimas despolimerizantes, que são lançadas no substrato (enzimas extracelulares). A indústria foi uma das primeiras a perceber o potencial econômico das enzimas produzidas por fungos de modo que elas têm sido utilizadas em diferentes setores industriais, em aplicações na fabricação de produtos biotecnológicos e na biorremediação (SILVA, 2011).

As enzimas mais utilizadas pela indústria são as chamadas “enzimas ligninolíticas”, compostas pela lacases, lignina peroxidase e manganês peroxidase,

que são enzimas oxi-redutoras, responsáveis pela redução e oxidação de vários substratos. São amplamente usadas na indústria de papel e celulose, pois atuam no branqueamento da matéria-prima utilizada para produzir o papel. E também são usados na biorremediação, devido a seu potencial no tratamento de efluentes da indústria têxtil e de celulose (SOUZA, 2012).

Este trabalho teve por objetivo investigar a atividade da enzima peroxidase por fungos filamentosos, isolados de solo de diferentes cultivos agrícolas no estado de Goiás.

Material e Métodos

Obtenção das amostras de solo

As amostras de solo foram obtidas a partir de coletas em diferentes cultivos agrícolas: cana-de-açúcar convencional, cana-de-açúcar orgânica e soja, em quatro municípios do Sul e Sudeste goiano: Anicuns, Morrinhos, Goiatuba e Itumbiara (Quadro 1).

Obtenção dos isolados fúngicos

As amostras passaram por uma série de diluições sucessivas a partir da adição de 1g de solo em 9 mL de Solução Fisiológica a 0,9% + Tween 80 a 0,02%. Em seguida uma alíquota de 100 µl da suspensão de solo na concentração 10^{-2} foi inoculada sobre a superfície de placas de Petri com meio de cultura BDA+ Cloranfenicol a 0,025 g/100 mL. As culturas foram incubadas em estufa BOD a 25°C.

A identificação taxonômica, ao nível de gênero foi baseada nas características morfológicas, considerando tanto o aspecto macro e microscópico da colônia, segundo a bibliografia pertinente.

Cultivo para produção de enzima

Os fungos foram cultivados a partir da inoculação de três discos de cultura fúngica em BDA de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro em erlenmeyers de 250 mL, contendo 5g de farelo de trigo; 10mL de solução de nutrientes (Sulfato de Amônio a 1% e Sulfato de Magnésio a 0,01%). As culturas foram incubadas em estufa BOD a 25° C, por 7 dias. O extrato enzimático bruto foi obtido a partir da adição de 40 mL de água destilada seguida descompactação do substrato, seguida de filtração.

Análise da atividade da peroxidase

O extrato enzimático bruto foi avaliado quanto à produção da enzima peroxidase, utilizando a espectrofotometria segundo o método de Halpin e Lee

(1987). A mistura de reação foi preparada em tubos de ensaio adicionando 2,4 mL de Pirogalol (preparado em tampão fosfato de sódio 0,1 mol/mL, e pH 6,0); e 0,1 mL da solução enzimática. A reação iniciou-se pela adição de 0,5mL de H_2O_2 a 0,05 mol/ L, e processou-se em 1 minuto, a 420 nm, considerando 0,1 absorvância /min o equivalente a uma unidade de enzima de peroxidase.

Resultados e Discussão

A habilidade de produção de peroxidase pelas linhagens estudadas é apresentada no quadro 1, no qual percebe-se que todos os fungos isolados apresentaram atividade de peroxidase, indicando seu potencial biotecnológico para a produção dessa enzima em larga escala. Cabe destaque para a linhagem TAS 06 (*Mortirella*), obtida de solo de cultivo de cana-de-açúcar convencional em Itumbiara, que apresentou o maior nível de atividade enzimática (4,23 U.E/mL)[1].

Esses resultados são indicativos de que o processo de indução e otimização da produção desta enzima em larga escala, devem passar por análises que levem em consideração, além do substrato, fatores como: umidade, temperatura e pH. Pois como indicado por REGINATO (1992), podem ocorrer oscilações nas atividades das enzimas ligninolíticas durante o crescimento de um fungo, e vários fatores, por exemplo, a variação do pH, pode causar a inativação de algumas enzimas e estimular a secreção de outras.

Considerações Finais

O teste utilizado mostrou que todas as linhagens analisadas apresentaram atividade de peroxidase, revelando perspectivas promissoras para o investimento em pesquisas com estas linhagens como fontes alternativas na produção destas enzimas em larga escala, otimizando-se as condições de cultivos, tais como: substrato, temperatura, pH.

[1] Unidade de enzima/mL considerado após 1min de reação 0,1 de absorvância, sendo a leitura feita no espectrofotômetro.

Quadro 1 – Produção de enzima peroxidase por fungos de solo de cultivos agrícolas em munícipios goianos.

Procedência do solo		**Gênero/ linhagem fúngica**	**Quantidade de Peroxidase (UE/mL)**
Cultivo agrícola	**Município**		
Cana-de-açúcar orgânica	Goiatuba	*Cladosporium* (TAS 03)	1,76
		Phytophthora (TAS 04)	1,28
Cana-de-açúcar convencional	Anicuns	*Penicillium* (TAS 02)	1,24
	Itumbiara	*Penicillium* (TAS 13)	0,97
		Aspergillus (TAS 14)	1,03
		Mortirella (TAS 06)	4,23
Soja	Morrinhos	*Chrysosporium* (TAS 01)	0,52
	Itumbiara	*Fusarium* (TAS 11)	1,48
	Goiatuba	*Cunninghamella* (TAS 09)	1,12

Agradecimentos

A Universidade Estadual de Goiás pela concessão da Bolsa de mestrado.

Referências

BAPTISTA, Nunes M. SANTOS, Queiroz A. ARRUDA, Castro F. GUSMÃO, Vanessa. F. *Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos*. Revista Scientia plena, vol. 8, n. 1, 2012.

HALPIN, B.E.; LEE, C.Y. Effect of blanching on enzyme activity and quality changes in green peas. Journal of Food Science, v. 52, n 4, p. 1002-1005, 1987.

ORLANDELLI, Ravely Casarotti. SPECIAN, Vânia. FELBER, Aretusa Cristina. PAMPHILE, João Alencar. *Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações*. Revista de Saúde e Biologia, vol.7, n.3, set.-dez. p.97-109, 2012.

REGINATTO, V. Estudo das enzimas produzidas por *Trlchoderma longibrachiatum* responsáveis pela degradação de materiais celulósicos**.** Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, p. 147, Campinas, 1992.

SILVA, Célia Maria de Souza Maganhotto. MELO, Itamar Soares. OLIVEIRA , Pablo Roberto. *Produção de enzimas ligninolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado.* Jaguariúna : Embrapa Meio Ambiente, 2004.

SILVA, M.G. ; D.G. Almeida ; R.C.M. Miranda ; C.C.S. Maciel1 ; GUSMÃO, N.B. *Produção da enzima lignina peroxidase por fungos filamentosos utilizando óleo diesel como substrato*. Revista Scientia plena, vol. 7, n. 10, 2011.

SOUZA, Vênia C. SILVA, Ricardo A. CARDOSO, Gleibson D. BARRETO, Artur F. *Estudos sobre fungos micorrízicos.* Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. Campina Grande. vol.10, n.10