

# Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados

*Production of lignolitic system enzymes by filamentous fungi isolated from oil derivatives impacted sites*

Carla do Couto Soares Maciel

Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.  
Recife, PE [Brasil]  
maciel.carla@gmail.com

Minelli Albuquerque de Souza

Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.  
Recife, PE [Brasil]  
minellisousa@yahoo.com.br

Norma Buarque de Gusmão

Professor Doutor do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos e Professor Colaborador do Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.  
Recife, PE [Brasil]  
nbg@ufpe.br

Galba Maria de Campos-Takaki

Professor Colaborador do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE e Professor Adjunto IV do Núcleo de Pesquisa e Ciências Ambientais, Centro de Ciências e Tecnologia – Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP.  
Recife, PE [Brasil]  
galba\_takaki@yahoo.com.br

Fungos isolados de locais impactados por petróleo foram investigados quanto à produção de enzimas lignolíticas, utilizando óleo diesel como substrato. A produção de polifenoloxidasas foi verificada utilizando-se ácido gálico (0,5%). Os fungos selecionados foram inoculados em solução de Manachini e óleo diesel (1%), incubados a 30°C por 72 horas, avaliando-se produção de biomassa, pH e quantificação de lacase-LaC, lignina-LiP e manganês peroxidase-MnP, por meio da oxidação de ABTS, álcool veratrílico e vermelho fenol, respectivamente. A produção de biomassa variou entre 10,21 g/L a 1 g/L, e o pH entre 6,0 e 6,8. A maior produção de LiP ocorreu pela estirpe F25 (144 U/L). A maior atividade para MnP foi observada pelas estirpes F4, F11 e F25 (correspondendo a 56U/L, 51U/L e 60U/L, nessa ordem), e a maior atividade da LaC foi para F33 e F4 (respectivamente, 290U/L e 210U/L). As estirpes selecionadas demonstraram ser indicativas para o processo de otimização de enzimas lignolíticas, com posterior aplicação biotecnológica.

**Palavras-chave:** Fungos filamentosos. Lacase. Lignina peroxidase. Manganês peroxidase. Óleo diesel.

Fungal strains isolated from impacted sites by oil were investigated for the production of lignolitic enzymes using diesel oil as substrate. The production of polyphenoloxydase was detected using gallic acid (0.5%). The selected fungi were inoculated in Manachini solution added with diesel (1%), incubated at 30°C for 72 hours, to evaluate biomass production, pH and of laccase-Lac, lignin-LiP and manganese peroxidase-MnP by ABTS oxidation, veratryl alcohol and red phenol, respectively. The biomass production ranged from 10.21 g/L to 1 g/L, and pH between 6.0 to 6.8. The higher production of LiP was observed by the strain F25 (144 U/L). The highest MnP activity was observed for the strains F4, F11 and F25 (corresponding to 56U/L, 51U/L and 60U/L, respectively), and the highest activity of LAC was to F33 and F4, respectively (290U/L and 210U/L). The selected strains showed to be indicative for the optimization lignolitics enzymes process and subsequent biotechnological applications.

**Key words:** Filamentous fungi. Laccase. Lignin peroxidase. Manganese peroxidase. Diesel oil.





(0,01% v/v), acrescido de 500µL do extrato enzimático, lactato de sódio (0,25M), albumina bovina (0,5% p/v), MnSO<sub>4</sub> (2mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão fosfato citrato (20mM, pH 4,5). A leitura foi feita a 610 nm (BONUGLI-SANTOS et al., 2010).

### Determinação da produção de lignina peroxidase

Para a enzima lignina peroxidase, observou-se a oxidação do álcool veratrílico (10 mM), em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM), 1 mL de tampão fosfato citrato (125 mM, pH 3,0) e 500µL do extrato enzimático, sendo a oxidação observada a 310 nm (ARORA; GILL, 2001).

## 3 Resultados e discussão

### 3.1 Seleção de fungos produtores de polifenoloxidasas

Dentre os 34 fungos testados, 12 estirpes foram capazes de expressar halos indicativos da produção de polifenoloxidasas, sendo selecionadas, portanto para ensaios subsequentes de quantificação das enzimas (Tabela 1).

**Tabela1: Micro-organismos produtores de polifenoloxidasas e sua identificação**

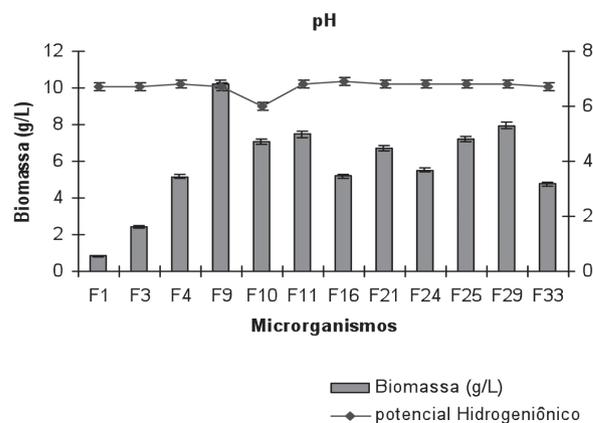
Identificação	Identificação	Local de isolamento
F1	<i>Aspergillus tamarii</i>	Lagoa da Barra, Suape (PE)
F3	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	
F4	<i>Curvularia lunata</i>	
F9	<i>Aspergillus sp.</i>	
F10	<i>Aspergillus sp.</i>	Mangue Branco (BA)
F11	<i>Paecilomyces sp.</i>	
F16	<i>Penicillium sp.</i>	
F21	<i>Penicillium sp.</i>	
F24	<i>Penicillium sp.</i>	
F25	<i>Penicillium sp.</i>	
F29	<i>Penicillium sp.</i>	
F33	<i>Penicillium sp.</i>	

Fonte: os autores.

### 3.2 Produção de biomassa pelos fungos selecionados

A produção de biomassa pelos 12 fungos selecionados no ensaio de produção da enzima polifenoloxidase revelou maior formação de biomassa para a amostra F9 que produziu 10,21 g/L  $\pm$  0,2, seguido de F29 (7,95 g/L  $\pm$  0,4) (Figura 1). Resultados inferiores foram obtidos por Quarantino et al. (2008), que demonstraram uma produção de biomassa de 1,8 g/L em ensaios de produção de lacase por *Panus tigrinus*. Téllez-Téllez (2008) observou 55 g/L de biomassa, utilizando glicose como fonte de carbono para a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*.

O pH dos meios apresentou um discreto aumento variando de 6,0 a 6,8, o que caracteriza um potencial hidrogeniônico próximo da neutralidade (Figura 1). Os fungos filamentosos são mais tolerantes as condições ácidas, os valores de pH podem variar de 6,0  $\pm$  0,08 e 8,0  $\pm$  0,05, sendo os mais favoráveis à ação degradadora de hidrocarbonetos. Nesse pH, observa-se um maior crescimento dos microrganismos, aumento da velocidade de degradação e, de acordo com vários autores, a acidez do meio em processo de degra-



**Figura 1: Biomassa (g/L) produzida por fungos filamentosos e pH quando crescidos em óleo diesel como uma única fonte de carbono, por 72 horas. Valores expressos em média + desvio-padrão**

Fonte: os autores.

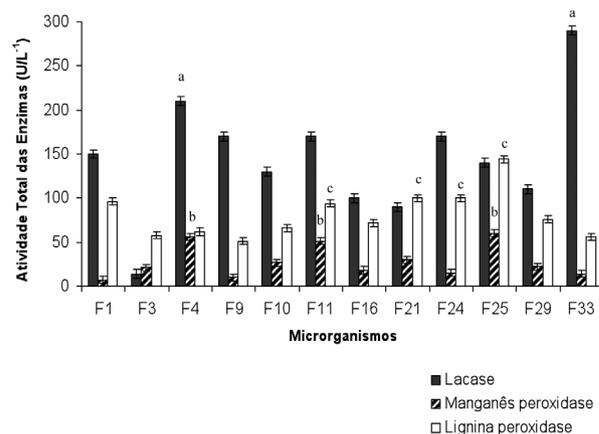
dação é indicativa da produção de ácidos intermediários, como o ácido oxálico (CERNIGLIA; SUTHERLAND, 2001; ALEXANDER, 1999; LEAHY; COLWELL, 1990).

A quantificação das enzimas está apresentada na Figura 2. Observou-se que a produção de lacase pelos fungos F33-*Penicillium* sp. ( $290\text{U/L} \pm 28$ ) e F4-*Curvularia lunata* ( $210\text{U/L} \pm 17$ ), destacando-se estatisticamente em comparação à produção da mesma enzima pelos demais fungos. Segundo Kim et al. (1998), quando foram utilizados fenantreno e antraceno como substratos ocorreu a produção de lignina peroxidase por *Phanerochaete chrysosporium* e *P. ostreatus*, respectivamente. Resultados similares foram observados utilizando óleo diesel. Para Quarantino et al. (2008), a produção de lacase por *Panus trigrinus* (linhagem 577.79) variou de  $0,024\text{ U/mL}$  e  $2,04\text{ U/mL}$ , corroborando resultados obtidos neste trabalho. Téllez-Téllez et al. (2008), em ensaios de produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*, obteve  $162\text{U/mg}$  de proteína. A melhor produção de lacase em atividade específica foi produzida por F10,  $193,9\text{ U/mg}$  de proteína, contudo os resultados aqui descritos foram superiores (Tabela 2).

O destaque na produção de manganês peroxidase foi:  $60\text{U/L} \pm 8$  produzidos por F25-*Penicillium* sp., cerca de  $56\text{U/L} \pm 6$  gerados por F4-*Curvularia lunata* e  $51\text{ U/L} \pm 4$  por F11-*Paecilomyces* sp.

Resultados semelhantes foram obtidos por Gomes et al. (2009), realizando descoloração de corantes, utilizando arroz como substrato, obtiveram  $0,6\text{ U/mL}$  de manganês peroxidase. Contudo, resultados superiores foram observados por Anastasi et al. (2009) em testes de degradação usando basidiomicetos em que houve produção de MnP em torno de  $124\text{ U/L}$ .

Os resultados obtidos, estatisticamente semelhantes para produção de lignina peroxidase, foram os seguintes: F11-*Paecilomyces* sp. ( $94\text{ U/L} \pm 9$ ), F21-*Penicillium* sp. ( $100\text{ U/L} \pm 22$ ), F24-*Aspergillus* sp. ( $100\text{ U/L} \pm 14$ ) e F25-*Penicillium* sp.



**Figura 2: Atividade total (U/L-1) de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase produzidas pelos fungos filamentosos. Valores foram expressos em média + desvio-padrão**

Fonte: os autores.

**Tabela 2: Produção das enzimas lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase pelos fungos selecionados, isolados de ambientes impactados por petroderivados**

Micro-organismos selecionados	Atividade total (U/L)			Atividade específica (U/mg proteína)		
	Lacase	Lignina peroxidase	Manganês peroxidase	Lacase	Lignina peroxidase	Manganês peroxidase
<i>Aspergillus tamarii</i> (F1)	150	96	7	20.2	12.9	0.9
<i>Curvularia lunata</i> (F4)	210	62	56	62.2	18.3	16.6
<i>Paecilomyces</i> sp. (F11)	170	94	51	36	19.8	10.7
<i>Penicillium</i> sp. (F21)	90	100	30	14.8	16.4	4.9
<i>Aspergillus</i> sp. (F24)	170	100	15	22.8	13.4	2
<i>Penicillium</i> sp. (F25)	140	144	60	12.4	12.8	5.3
<i>Penicillium</i> sp. (F33)	290	56	14	36.3	7	1.7

Fonte: os autores.

(144 U/L  $\pm$ 13). Gomes et al. (2009), em processos de descoloração de corantes, obtiveram 9 U/mL de lignina peroxidase, após cinco semanas de incubação. Anastasi et al. (2009), em seu estudo, observaram uma produção de LiP por Basidiomycetes em torno de 19 U/L. Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho para *Penicillium* sp. (F25), *Penicillium* sp (F21) e *Aspergillus* sp (F24) demonstraram ser superiores aos da literatura.

Os resultados obtidos são comparáveis ou superiores aos encontrados por Narkhede e Vidhale (2005) que observaram produção de polifenoloxidasas por *Curvularia lunata* LW6 isolada de efluente industrial. Espécies de *Paecilomyces* têm sido relatadas na literatura como degradadoras de substratos lignolíticos, havendo produção de polifenoloxidase (KLUCZEK-TURPEINEM et al., 2003). De acordo com Kluczek-Turpeinem et al. (2007), a secreção de enzimas degradadores de lignina constitui uma etapa central no metabolismo do carbono por *Paecilomyces* spp., representando um potencial importante para detecção dos níveis de expressão dessas enzimas.

## 4 Conclusões

Os fungos isolados de área contaminada por petroderivados com maior potencial biotecnológico foram *Aspergillus* sp., *Curvularia lunata*, *Paecilomyces* sp., e *Penicillium* sp., considerando a produção de enzimas do sistema lignolíticos. Dentre as enzimas estudadas, destacam-se as estirpes *Curvularia lunata*, *Paecilomyces*, considerando a maior atividade específica para lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase, sugerindo grande potencial para aplicação em processos de biorremediação. Nesse contexto, sugere-se ainda, que o potencial biotecnológico foi mediado pela presença de xenobióticos, induzindo a expressão das enzimas do sistema lignolítico por fungos fila-

mentosos adaptados a ambiente contaminado por petroderivado.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro concedido pelos órgãos de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

## Referências

- ALEXANDER, M. *Acclimatation, biodegradation and bioremediation*. California: Academic Press, 1999. cap. 3, p. 17-38.
- ANASTASI, A.; COPPOLA, T.; PRIGIONE, V.; VARESE, G. C. Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: role of laccases and peroxidases. *Journal of Hazardous Materials*, v. 165, p. 1229-1233, 2009.
- ARORA, D. S.; GILL, P. K., Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme Microbiol Technology*, v.28, p. 602-605, 2001.
- BONUGLI-SANTOS R. C.; DURRANT, L. R.; SILVA, M.; SETTE, L. D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 46, n. 1, p. 32-37, 2010.
- BOONCHAN, S.; BRITZ, M.L.; STANLEY, G.A. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal bacterium cocultures. *Applied Environmental Microbiology*, v. 66, p. 1007-1019, 2000.
- CETESB, 2008. Gerenciamento de Áreas Contaminadas no Estado de São Paulo. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas\\_contaminadas/texto\\_areas\\_cont\\_nov\\_08.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_08.pdf)>. Acesso em: 12 ago. 2010.
- COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. Minas Gerais: UFMG, 2006. 206 p. Tese (Doutorado)– Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia da UFMG, Minas Gerais, 2006.

- CONCEIÇÃO, D. M.; ANGELIS, D. A., BIDOIA, E. D., ANGELIS, D. F. Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. *Arq. Inst. Biol.*, v. 72, n. 1, p. 99-106, 2005.
- DE SOUZA, C. G.; PERALTA, R. M. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *Journal Basic Microbiology*, v. 43, p. 278-286, 2003.
- D'SOUZA, T. M.; MERRIT, C. S.; REDDY, C. A. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycetes *Ganoderma lucidum*. *Applied and environmental Microbiology*, v. 65, n. 12, p. 5307-5313, 1999.
- CERNIGLIA, C. E.; SUTHERLAND, J. B. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by lignolytic and non-lignolytic fungi. In: GADD, G. M. *Fungi in bioremediation*. United Kingdom: Cambridge University Press, 2001, p. 136-187.
- GOMES, E.; AGUIAR, A. P.; CARVALHO, C. C.; BONFÁ, M. R. B.; SILVA, R.; BOSCOLO, M. Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. *Brazilian Journal of microbiology*, v. 40, p. 31-39, 2009.
- GOMES, E. B.; SILVA, R.; ROSADO, A. S.; PEREIRA JR., N. Biotreatment of diesel waste by sequencing batch bioreactor operation mode (SBR). *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 64, n. 5, p. 1-5, 2010.
- KLUCZEK-TURPEINEM, B.; MAIJALA, P.; HOFRICHTER, M.; HATAKKA A. Degradation and enzymatic activities of three *Paecilomyces inflatus* strains grown on diverse lignocellulosic substrates. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 59, p. 283-291, 2007.
- KLUCZEK-TURPEINEN, B.; TUOMELA, M.; HATAKKA. A.; HOFRICHTER, M.; Lignin degradation in a compost environment by the deuteromycete *Paecilomyces inflatus*. *Applied Microbiological Biotechnology*, v. 61, p. 374-379, 2003.
- LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.
- NARKHEDE, K. P.; VIDHALE, N. N. Biopulping studies using an effluent isolate *Curvularia lunata* LW6. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 5, p. 385-388, 2005.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, v. 25, p. 772-776, 2002.
- QUARANTINO, D.; CIAFFI, M.; FEDERICI, E.; D'ANNIBALE, A.; Response surface methodology study of laccase production in *Panus tigrinus* liquid culture. *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, p. 236-245, 2008.
- RAHMAN, K. S.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Enhanced bioremediation of n-alcane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*, v. 90, p. 159-168, 2003.
- SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE; J. S., Screening of basidiomycetes from Amazonia for the production of biotechnological interest enzymes. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v. 28 (Supl.), p. 116-124, 2008.
- TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; FERNÁNDEZ, F. J.; MONTIEL-GONZÁLES, A. M.; SÁNCHEZ, C.; DÍAZ-GODINEZ, G. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 81, p. 675-679, 2008.
- VALIEV, A.; OGEL, Z. B.; KLEPZIG, K. D. Analysis of cellulase and polyphenol oxidase production by southern pine beetle associated fungi. *Symbiosis*, v. 49, n. 1, p. 37-42, 2009.
- VAN DEN BRINK, H. J. M.; VAN GORCOM, R. F. M.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; PUNT, P. J. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v. 23, p. 1-17, 1998.

Recebido em 13 jun. 2010 / aprovado em 5 nov. 2010

**Para referenciar este texto**

MACIEL, C. do C. S. et al. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. *Exacta*, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 299-305, 2010.

