

PRODUÇÃO DA ENZIMA MANGANÊS PEROXIDASE OBTIDA DO FUNGO DA PODRIDÃO BRANCA E POTENCIAL USO COMO ADITIVO DE FORRAGEM

Janaina M. Bragatto¹, Erica Machado³, Paula T. Matumoto-Pintro², Bruna C. Agostinho³, Lúcia M. Zeoula^{2*},

1. Estudante de IC pela Universidade Estadual de Maringá

2. Pesquisadora da Universidade Estadual de Maringá / * Orientadora

3. Aluna de pós graduação pelo departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá

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 a 20 dias) e sua estabilidade em pH e temperatura. A atividade Manganês peroxidase foi determinada através da oxidação de $MnSO_4$ em Malonato de sódio na presença de H_2O_2 . As variáveis foram analisadas pelo procedimento MIXED do Pacote Estatístico SAS. Os dados foram interpretados por uma análise de variância a 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 e a maior atividade da enzima se deu em pH 5,5 e a temperatura de 30 a 40° C.

Palavras-chave: cogumelo, enzima extracelular, pH

Apoio financeiro: CNPq

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UEM.

Introdução:

A produção de cogumelos ocorre em resíduos lignocelulósicos elaborados por materiais ou subprodutos da agricultura sendo considerado processo biotecnológico que recicla a matéria orgânica devido à habilidade desses fungos em produzir enzimas lignocelulósicas (Zhang et al., 2002). 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.

Após o crescimento e a colheita dos cogumelos, o substrato de crescimento, composto exaurido, pode ser utilizado para outros fins na agropecuária, como adubo ou

para alimentação animal (Sanchez, 2004).

Para o cultivo de cogumelo, teoricamente, qualquer material lignocelulósico é suscetível de utilização, e diversos têm sido testados experimentalmente, principalmente com matéria-prima local, objetivando sempre à diminuição dos custos e o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos.

Os fungos da podridão branca produzem uma variedade de enzimas extracelulares que atuam sinergicamente e eficientemente na degradação da parede celular, dentre elas, a manganês peroxidase, que é uma enzima ligninolítica e foi reportado como a principal enzima envolvida na despolimerização da lignina (Sahoa e Gupta, 2005).

Alterações na composição química da parede celular pode resultar em aumentos na digestibilidade das forragens quando tratadas com enzimas extracelulares e disponibilizar mais energia metabolizável para o ruminante. Desta forma, investigar a produção de enzimas 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.

Metodologia:

Os cultivos dos fungos foram realizados em frascos de erlenmeyer de 125mL contendo 50mL de meio KIRK 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 em pH 4,5, na presença de H_2O_2 . Para a análise de cada amostra utilizou-se 0,6 mL de solução

tampão malonato de sódio (50mM) pH 4,5 (temperatura ambiente) com 1,2 mL de amostra, 0,60 mL de MnSO₄ (4,5 mM) e 0,30 H₂O₂ (9mM). A absorbância pode ser medida após 5 minutos em 270nm. Para o preparo do “branco”, a amostra foi substituída por 1,2 mL de solução tampão.

A proteína total para determinação da atividade enzimática específica foi determinada pelo método de Bradford (1976): 50 µL de solução contendo a enzima e incubada em 2,5 mL de reagente de Bradford por 5 min em temperatura ambiente. As absorbâncias das amostras foram lidas em 595 nm em espectrofotômetro. Foi utilizada a albumina de soro bovino (5-200 µg/mL) como padrão.

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 amostras foram mantidas em banho-maria e incubadora de baixa temperatura.

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 $p < 0,05$. Foram feitas análises de variâncias para verificar os efeitos principais de tratamento, do tempo e da interação entre tratamento e tempo. Nos casos onde houve efeito significativo de tempo, o desdobramento foi feito através da análise de regressão.

Resultados e Discussão:

O feno proporcionou maior produção da enzima em relação ao bagaço de cana, provavelmente, devido ao teor de proteína bruta desses materiais (10,54% vs 3,93%).

Em relação aos tempos de incubação, nota-se que até o 10º dia, a produção enzimática foi linear positiva e posteriormente se estabilizou.

A maior atividade enzimática foi verificada em pH 5,5 (Figura1). A temperatura em que a enzima teve maior atividade foi entre 30 a 40°C (Figura 2).

A temperatura e o pH tem grande influência sobre a velocidade das reações enzimáticas e temperaturas muito elevadas provocam o rompimento de ligações químicas e conseqüentemente, a desnaturação de enzima (SKOOG ET al., 2007).

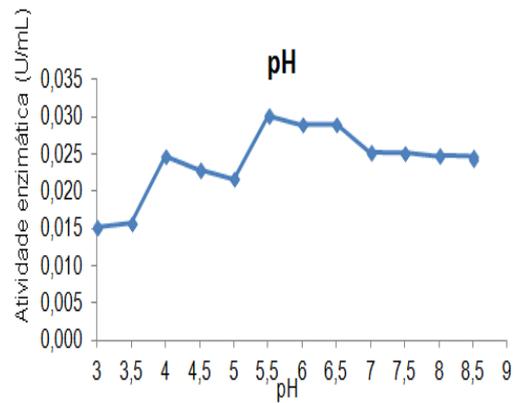


Figura 1. Atividade da enzima manganês peroxidase em diferentes faixas de pH (3 a 8,5).

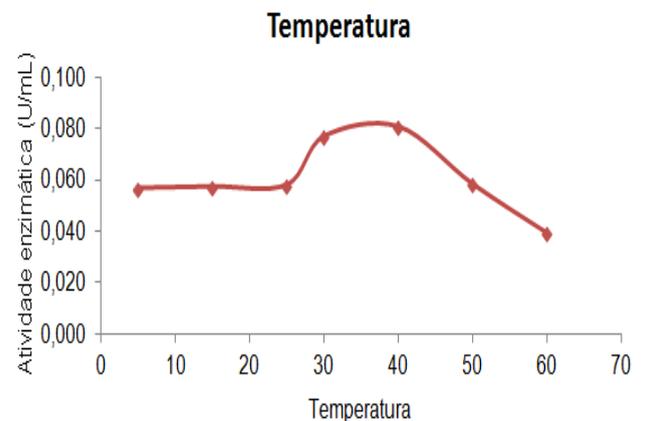


Figura 2. Atividade da enzima manganês peroxidase em diferentes faixas de temperatura (5 a 60°C).

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.

Referências bibliográficas:

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.

SAHOO, DK, GUPTA, R. (2005), Avaliação de microorganismos ligninolíticos para descoloramento eficiente de uma pequena fábrica de papel e celulose de efluentes. **Processo Biochem.**, 40, 1573-1578.

SANCHEZ, C. Modern aspects of mushroom culture technology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 756-762, 2004.

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.

ZHANG, R. H.; LI, X.; FADEL, J. G. Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 3, p. 277-284, 2002.