



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOÃO PAULO SACCHETTO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE POR
Botryosphaeria rhodina MAMB-05 EM ÓLEO DE SOJA
COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO**

Londrina
2009

JOÃO PAULO SACCHETTO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE POR
Botryosphaeria rhodina MAMB-05 EM ÓLEO DE SOJA
COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Aneli de Melo
Barbosa

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Inês
Rezende

Londrina
2009

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S121o Sacchetto, João Paulo

Otimização da Produção de Lacase por *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em Óleo de Soja como Única Fonte de Carbono/ João Paulo Sacchetto. – 2009. 127 f.: il.

Orientadora Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa

Co-orientadora Profa. Dra. Maria Inês Rezende

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Londrina, PR, 2009.

1. *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 2. Lacase 3. Óleo de Soja 4. Metodologia de Superfície de Resposta 5. Lipase 6. Literatura alemã 7. Novela alemã I. Barbosa, Aneli de Melo II. Lisboa, Marijane III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título. V. Série.

CDU 663.1

JOÃO PAULO SACCHETTO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE POR *Botryosphaeria
rhodina* MAMB-05 EM ÓLEO DE SOJA COMO ÚNICA FONTE DE
CARBONO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Valéria Marta Gomes de Lima
UNESP – Campus de Assis - SP

Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio
UEL – Londrina - PR

Londrina, 26 de Fevereiro de 2009.

*Em meio às discussões gaúchas, com sorriso
de cantinho de boca, infiltrado em tantas
representações metafóricas, metonímicas e até
irônicas, me encontrei.
Dedico este trabalho a Paulo Salvetti Jr.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa por sua orientação, experiência e contribuições.

Às Profa Dra. Maria Inês Rezende, amiga e conselheira, Profa Dra. Ieda Spacino Scarminio pelas importantes contribuições no exame de qualificação.

À Profa Dra. Valéria Marta Gomes de Lima, por gentilmente aceitar o convite em participar de minha banca de defesa de dissertação.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub pelo generoso acolhimento em seu laboratório, BIOTECLAB, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

À minha família, Mariana Aymee Sacchetto, Elena Lehrbaum Sacchetto e Mario Silvio Sacchetto, por me aceitar e amar. Por toda compreensão, incentivo e conselhos sobre o viver.

Siliane Berté e Giovana Granzotto, colonas, paixões infalíveis e cafés matinais na cozinha do Depto., me ensinaram a olhar o mundo *multi-color*.

Paola Cunha Tarouco e Maira Carvalho, gaúchas, pelo amor incondicional às bactérias e fungos, respectivamente, e também por dividirem comigo experiências únicas e inesquecíveis de laboratório.

Paula Campos e Kerlly Pellizzaro que com todo amor e discrição, me acolheram em seus braços, cheios de vida, me devolvendo a certeza do novo amanhecer em um período bastante delicado.

Gisele Silva, Renan Salvetti e Eduardo Oliveira que como irmãos, foram suporte para o dia-a-dia, alegria que reabastecia e oração que movia.

Valquíria Aleixo de Barros e Márcia Abdalla Tomioshi, mãezinhas do coração, incentivadoras, protetoras, exemplos de amizade e força.

Paulo Roberto Salvetti Junior, que com toda sua força me devolveu a vida.

Deus, pela oportunidade de ter conhecido todas essas pessoas que são essenciais a minha existência.

CAPES pela possibilidade de dedicação exclusiva, através da Bolsa de mestrado.

A sorrir eu pretendo levar a vida.
Cartola

SACCHETTO, João Paulo. **Otimização da produção de lacase por *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em óleo de soja como única fonte de carbono**. 2008. 127 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

Lacases (EC 1.10.3.2) são oxidases multicúpricas que catalizam reações de oxidação de compostos fenólicos e não-fenólicos com a concomitante redução do oxigênio à água. Estas enzimas estão envolvidas na patogenicidade e morfogênese de diversos organismos incluindo-se fungos ligninolíticos. As lacases fúngicas tem sido estudadas e aplicadas em vários processos biotecnológicos tais como no tratamento de efluentes industriais, no processamento de sucos, vinhos e cerveja, e também no branqueamento de polpa e papel. O fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 foi isolado de cancro de eucalipto e selecionado previamente como ligninolítico e produtor constitutivo de lacases. No presente trabalho foi avaliada a influência da adição de fontes de nitrogênio inorgânicas (NH_4Cl , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3), orgânicas (extrato de levedura, uréia, peptona, milhocina), de fosfato inorgânico (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , K_2HPO_4) e de diferentes concentrações de íons cobre 0, 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, na produção de lacase pelo fungo, utilizando-se óleo de soja como única fonte de carbono. O NaNO_3 e KH_2PO_4 foram as fontes de nitrogênio e fosfato selecionadas, respectivamente. Um planejamento fatorial composto central 2^3 foi desenvolvido para determinar as concentrações destas respectivas fontes de nitrogênio e fosfato e de íons cobre para otimizar a produção da enzima. A análise por metodologia de superfície de resposta demonstrou que a máxima produção de lacase ($3,07 \pm 0,04 \text{ U mg}^{-1}$) foi obtida na presença de NaNO_3 (100 g L^{-1}), KH_2PO_4 (125 g L^{-1}) e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Nos experimentos de validação do método em laboratório a produção de lacase obtida por *B. rhodina* MAMB-05 foi $2,95 \pm 0,1 \text{ U mg}^{-1}$ nas condições otimizadas acima descritas. Cultivos nas condições otimizadas foram desenvolvidos em biorreatores de bancada, nos quais foram obtidos títulos mais elevados de lacase ($19 \pm 2,82 \text{ U mg}^{-1}$) em 24 horas de cultivo, e de lipase ($0,56 \pm 0,007 \text{ U mg}^{-1}$) em 72 horas.

Palavras-chave: *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Lacase. Óleo de soja. Metodologia de superfície de resposta. Lipase.

SACCHETTO, João Paulo. **Optimization of laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 on soybean oil as sole carbon source.** 2008. 127 f. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Laccases (EC 1.10.3.2) are polyphenol oxidases that catalyse oxidation reactions of reducing substrates like phenolic and non-phenolic compounds with the concomitant reduction of oxygen to water. These enzymes are thought to be involved in the pathogenicity of various microorganisms including ligninolytic fungi. Fungal laccases have been studied and applied in several biotechnological processes such as in the treatment of industrial wastewater; processing of fruit juices, wine and beer; and for biobleaching and pitch control in the pulp and paper industry. The ascomyceteous fungus *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, isolated from a stem canker on an eucalypt tree, is a ligninolytic fungus and a constitutive producer of laccase. In this work we examined the influence of inorganic (NH_4Cl , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3) and organic (yeast extract, urea, peptone, corn steep liquor) nitrogen sources, phosphate (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , K_2HPO_4) and different concentrations of copper (0, 12.5, 25, 50 and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) on the production of laccase by *B. rhodina* MAMB-05 using soybean oil as sole carbon source. NaNO_3 and KH_2PO_4 were the nitrogen and phosphate sources selected, respectively. A 2^3 -factorial central-composite experimental design was conducted to determine the best concentration of the nitrogen and phosphate sources, and copper concentration to optimize the laccase production. Analysis by response surface methodology showed that the maximum predicted laccase production ($3.07 \pm 0.04 \text{ U mg}^{-1}$) was in the presence of NaNO_3 , (100 g L^{-1}), KH_2PO_4 (125 g L^{-1}) and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. The laccase titre obtained with the validation experiments in laboratory was $2.95 \pm 0.1 \text{ U mg}^{-1}$. Cultures were developed in bioreactors using the optimized conditions, and presented much higher laccase titres; $19 \pm 2.82 \text{ U mg}^{-1}$ in 24 h. The higher lipase titres ($0,56 \pm 0,007 \text{ U mg}^{-1}$) in 72 hours.

Keywords: *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Laccase. Soybean oil. Response surface methodology. Lipase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Microrganismos citados como produtores de lacases.....	27
Tabela 2 – Meios de cultivo utilizados na produção de algumas lacases microbianas.....	31
Tabela 3 – Lacases comercializadas industrialmente.....	41
Tabela 4 – Composição do óleo de soja Liza®.....	46
Tabela 5 – Variáveis do meio de cultivo para a produção de lacase e respectivos níveis utilizados no Planejamento Composto Central 23 (PCC).....	56
Tabela 6 – Influência da fonte de nitrogênio na produção de lacase, pH final dos cultivos e biomassa produzida por <i>B. rhodina</i> MAMB-05.....	76
Tabela 7 – Influência da fonte de fosfato na produção de lacase por <i>B. rhodina</i> MAMB-05.....	77
Tabela 8 – Influência de diferentes concentrações de íons cobre na produção de lacase por <i>B. rhodina</i> MAMB-05.....	79
Tabela 9 – Parâmetros avaliados na produção da lacase.....	80
Tabela 10 – Respostas observadas no delineamento fatorial 2 ³ , para avaliar os efeitos das variáveis concentração de NaNO ₃ , KH ₂ PO ₄ e íons Cu ²⁺	82
Tabela 11 – Análise de variância da resposta Atv. Esp. Lacase (U mg ⁻¹); R ² = 0,72.....	83
Tabela 12 – Coeficientes estimados pelo modelo de regressão.....	84
Tabela 13 – Comparação das condições de cultivo para a produção de lacase em shaker e biorreator.....	89

Apêndice A

Table 1 – The process variables and their levels used in the Central Planning Compound 2 ³ (CPC).....	126
---	-----

Table 2 – Responses observed in 2³ factorial design to evaluate the effects of varying concentrations of NaNO₃, KH₂PO₄ and Cu²⁺ ions	127
--	------------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Exemplos de mediadores da lacase	22
Figura 2 –	Representação esquemática de ciclos redox catalisados pela lacase para a oxidação de substratos na ausência (a) e na presença (b e c) de mediadores biológicos e sintéticos, respectivamente.....	22
Figura 3 –	Modelo tridimensional da lacase de <i>Coprinus cinereus</i>	23
Figura 4 –	Representação de um modelo de centro trinuclear da lacase	24
Figura 5 –	Exemplos de aplicações sintéticas do sistema lacase - mediador. (a) Oxidação do índigo a isatina. (b) Conversão do adlerol à adlerona. (c) Oxidação do álcool benzílico ao seu correspondente aldeído. (d) Oxidação do alquil β -glucosídeo ao seu correspondente glucuronosídeo	42
Figura 6 –	Colônia do fungo ascomiceto <i>B. rhodina</i> MAMB-05.....	44
Figura 7 –	Frasco de Erlenmeyer com quatro inserções na parede modificado por um vidreiro	52
Figura 8 –	Biorreator utilizado na produção de lacase por <i>B. rhodina</i> MAMB-05	58
Figura 9 –	pH ótimo para a atividade da lacase em ABTS produzida por <i>B. rhodina</i> MAMB-05 utilizando óleo de soja como única fonte de carbono	67
Figura 10 –	Temperatura ótima para atividade da lacase de <i>B. rhodina</i> produzida em óleo de soja como única fonte de carbono tanto em ABTS como em DMP	68
Figura 11 –	Estabilidade da lacase produzida por <i>B. rhodina</i> MAMB-05 em óleo de soja como fonte única de carbono frente ao congelamento e descongelamento sequencial	69
Figura 12 –	Atividade específica da lacase e biomassa de <i>B. rhodina</i> MAMB-05 em diferentes fontes de carbono.....	71
Figura 13 –	Produção de lacase e biomassa por <i>B. rhodina</i> MAMB-05 em diferentes concentrações de óleo de soja.....	72

Figura 14 – Perfil da produção de lacase por <i>B. rhodina</i> MAMB-05 em meio de Vogel (1956) suplementado com 1% (v v-1) de óleo de soja	73
Figura 15 – Gráfico de Pareto indicando os efeitos significativos e não-significativos em 95% de confiança	83
Figura 16 – Valores observados versus valores previstos	84
Figura 17 – Linhas de contorno e superfícies de resposta da atividade da lacase de <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05 cultivado na presença de óleo de soja como fonte única de carbono	86
Figura 18 – Produção de lacase e lipase em biorreator de bancada utilizando óleo de soja como fonte de carbono. O inóculo utilizado foi composto por 20 esferas de micélio de 0,7 cm de diâmetro, e o pH não foi controlado	91
Figura 19 – Produção de lacase e lipase em biorreator de bancada utilizando óleo de soja como fonte de carbono. O inóculo utilizado foi composto por 20 esferas de micélio de 0,7 cm de diâmetro, e o pH foi controlado em 6	92
Figura 20 – Imagens dos cultivos de <i>B. rhodina</i> MAMB-05 em óleo de soja nos biorreatores (144 horas de cultivo).....	93
Figura 21 A – Produção de lacase e lipase em biorreator de bancada utilizando óleo de soja como fonte de carbono. O inóculo utilizado foi uma solução de 20 mL de hifas trituradas, e o pH foi controlado em 6.....	95
Figura 21 B – Perfil estimado da biomassa fúngica durante o terceiro cultivo (g L-1)	95
Figura 22 A – Produção de lacase e lipase em biorreator de bancada utilizando óleo de soja como fonte de carbono. O inóculo utilizado foi uma solução de 20 mL de hifas integras, e o pH não foi controlado.....	96
Figura 22 B – Perfil estimado da biomassa fúngica durante o quarto cultivo (g L-1)	97

Figura 23 – Comparação da produção de lacase por <i>B. rhodina</i> MAMB-05, utilizando óleo de soja como fonte de carbono, em shaker e biorreatores	99
--	----

Apêndice A

Figure 1 – Activity of laccase produced by <i>B. rhodina</i> MAMB-05 in soybean oil as sole carbon source and (A) different sources of nitrogen and (B) different sources of phosphate	124
Figure 2 – Contour surfaces of the laccase activity of <i>B. rhodina</i> MAMB-05 produced using soybean oil as sole carbon source.....	125
Figure 3 – Efeitos significativos e não significativos das variáveis na produção de lacase por <i>B. rhodina</i> MAMB-05 em óleo de soja como única fonte de carbono	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS – 2,21	azino-bis-ácido – (3 – etilbenzotiazolina – 6 – sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
AV	Álcool veratrílico
BDA	Batata - Dextrose - Ágar
<i>B. rhodina</i>	<i>Botryosphaeria rhodina</i>
DP	Desvio padrão
EPS	Exopolissacarídeo
G	Gramma
<i>GI</i>	Graus de liberdade
HBT	N-hidroxibenzotriazolina
kDa	Quilodalton
L	Litro
MBE	Meio basal estoque
mL	Mililitro
MSR	Metodologia de superfície de resposta
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
QM	Quadrado médio
q.s.p.	Quantidade suficiente para
R²	Coefficiente de determinação
Rpm	Rotação por minuto
SQ	Soma dos quadrados
ton	Tonelada
VGA	Vogel – Glucose – Ágar
VLA	Ácido violúrico
vvm	Volume de ar/ volume de meio/ minuto
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	LACASES: DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E MECANISMOS DE AÇÃO.....	21
3.2	PROPRIEDADES DAS LACASES	23
3.3	FONTE DAS LACASES	25
3.4	REQUERIMENTOS NUTRICIONAIS PARA A PRODUÇÃO DE LACASES	28
3.4.1	Nutrição e Metabolismo Fúngico	28
3.4.2	Importância da Composição dos Meios de Cultivos	32
3.5	OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE: PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXPERIMENTOS E ANÁLISE POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR).....	34
3.6	APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS LACASES.....	36
3.6.1	Lacases e a Indústria Alimentícia	37
3.6.2	Lacases e a Biodegradação	38
3.6.3	Lacases nas Indústrias Papeleira e Têxtil	39
3.6.4	Lacases Aplicadas na Medicina	41
3.6.5	Lacases na Produção de Etanol e Sínteses Orgânicas.....	42
3.7	BOTRYOSPHERA RHODINA MAMB-05	43
3.8	ASPECTOS GERAIS DOS ÓLEOS VEGETAIS: A UTILIZAÇÃO DE ÓLEO DE SOJA COMO FONTE DE CARBONO PARA A PRODUÇÃO DE LACASES E LIPASES	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1	REAGENTES.....	48
4.2	MICROORGANISMO	48
4.2.1	Manutenção do Microrganismo	48
4.3	MEIOS DE CULTIVO.....	49

4.3.1	Meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA).....	49
4.3.2	Meio Mínimo de Vogel (1956).....	49
4.3.3	Meio de Vogel (1956) – Glucose – Ágar (VGA).....	50
4.4	ESTUDOS PRELIMINARES PARA A PRODUÇÃO DE LACASE EM ÓLEO DE SOJA E GLICEROL.....	51
4.5	PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO DO B. RHODINA MAMB-05.....	51
4.5.1	O inóculo	52
4.5.2	Interrupção dos Cultivos	52
4.6	PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA LACASE PRODUZIDA POR B. RHODINA MAMB-05 EM ÓLEO DE SOJA.....	53
4.6.1	pH e Temperatura Ótimos	53
4.6.2	Determinação Especificidade do Substrato	54
4.6.3	Determinação da Estabilidade da Lacase Frente ao Congelamento e Descongelamento Sequencial	54
4.7	AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DAS FONTES DE NITROGÊNIO, FOSFATO E ÍONS CU ²⁺ NA PRODUÇÃO DE LACASE	54
4.7.1	Efeito da Fonte de Nitrogênio	55
4.7.2	Efeito da Fonte de Fosfato	55
4.7.3	Efeito da Concentração de Íons Cu ²⁺	55
4.8	PLANEJAMENTO FATORIAL: O ESTUDO DA PRODUÇÃO DA LACASE.....	56
4.9	INVESTIGAÇÃO DA PRODUÇÃO DA LACASE EM BIORREADORES	57
4.9.1	Cultivos em Biorreatores	59
4.9.2	Experimento 1.....	59
4.9.3	Experimento 2.....	60
4.9.4	Experimento 3.....	60
4.9.5	Experimento 4.....	61
4.10	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	61
4.10.1	Determinação de Proteínas Totais	61
4.10.2	Determinação dos Açúcares Redutores e Totais	62
4.10.3	Determinação da Biomassa Microbiana	62
4.10.4	Determinação de Atividade de Lacase sobre ABTS.....	63
4.10.5	Determinação de Atividade de Lacase sobre DMP	63
4.10.6	Determinação de Atividade da Lipase	64

4.11	METODOLOGIA ESTATÍSTICA.....	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.1	PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA LACASE PRODUZIDA POR B. RHODINA MAMB-05 NA PRESENÇA DE ÓLEO DE SOJA COMO FONTE DE CARBONO.....	66
5.1.1	Efeito do pH e Temperatura na Atividade da Lacase de B. rhodina MAMB-05 Produzida em Óleo de Soja como Única Fonte de Carbono.....	67
5.1.2	Determinação da Estabilidade da Lacase Frente ao Congelamento e Descongelo Sequencial.....	68
5.2	EFEITO DA ADIÇÃO DE ÓLEO DE SOJA E GLICEROL NA PRODUÇÃO DE LACASE PELO B. RHODINA MAMB-05.....	70
5.3	EFEITOS DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO, FOSFATO E CONCENTRAÇÕES DE ÍONS Cu^{2+} NA PRODUÇÃO DA LACASE EM ÓLEO DE SOJA COMO FONTE DE CARBONO POR B. RHODINA MAMB-05.....	74
5.3.1	Efeito de Diferentes Fontes de Nitrogênio Inorgânicas e Orgânicas na Produção de Lacase por B. rhodina MAMB-05 em Óleo de Soja como Única Fonte de Carbono.....	74
5.3.2	Efeito de Fontes de Fosfato na Produção de Lacase por B. rhodina MAMB-05 em Óleo de Soja como Única Fonte de Carbono.....	77
5.3.3	Efeito da Concentração de Íons Cu^{2+} na Produção de Lacase por B. rhodina MAMB-05 em Óleo de Soja como Única Fonte de Carbono.....	78
5.4	PLANEJAMENTO FATORIAL E METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA: O ESTUDO DA PRODUÇÃO DA LACASE.....	80
5.5	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA LACASE EM BIORREATORES.....	87
	CONCLUSÕES.....	100
	REFERÊNCIAS.....	101
	APÊNDICE.....	110
	APÊNDICE A.....	111

1 INTRODUÇÃO

O mercado industrial de enzimas tem movimentado cerca de dois bilhões de dólares/ano devido ao uso crescente destes catalisadores biológicos que não causam dano ambiental, visto que são biodegradáveis, o que favorece amplas aplicações em diferentes processos tecnológicos junto a indústrias alimentícias, farmacêuticas, têxteis, papeleiras, entre outras.

As enzimas são obtidas em diferentes fontes, como as vegetais, as animais e também as microbianas. As lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas classificadas como polifenóis oxidases, e também recebem a denominação de oxidases azuis, visto que possuem cobre em sua estrutura química (proteínas multicúpricas), além de apresentarem uma parte glicídica (glicoproteínas). As mais estudadas para uso industrial são as lacases microbianas extracelulares.

Neste trabalho foi otimizada a produção de lacase pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, isolado de cancro de eucalipto por Barbosa e colaboradores em 1996. Vários estudos foram desenvolvidos previamente sobre a bioquímica e fisiologia da produção de lacase por este microrganismo. Atualmente sabe-se que é um fungo endofítico, ligninolítico que produz lacase constitutivamente e também secreta celulase, xilanase, amilase, pectinase, beta-glucanase, dependendo da respectiva fonte indutora, além de um exopolissacarídeo do tipo beta-glucana, denominado botriosferana, em condições apropriadas de cultivo.

Sabe-se que o álcool veratrílico (AV) é um agente indutor de lacase para o *Botryosphaeria*. Também são indutores diferentes compostos relacionados com a estrutura química da lignina como o guaiacol, veratraldeído, 4-clorofenol, lignosulfonato. Entretanto, para a excreção de lacase, há necessidade da presença de uma fonte orgânica de carbono. A glucose não reprime a síntese de lacase, bem como outros polissacarídeos como amido, celulose, xilana, beta-glucana, pectina, ou resíduos industriais como torta de soja, milho, mamona ou bagaço de laranja. Porém, a adição de agentes indutores para a produção de lacase encarece o processo de produção.

Em 2007 Dekker e colaboradores observaram que o *B. rhodina* MAMB-05 cresceu em óleo de soja como única fonte de carbono e secretou lacase.

Até então, desconhecia-se a possibilidade deste microrganismo ser lipolítico. Em 2008, Sacchetto e colaboradores avaliaram nove isolados de *Botryosphaeria*, em busca de selecionar o melhor produtor de lacase, e oito óleos vegetais, além do glicerol, como fonte única de carbono, objetivando selecionar o que promovesse a maior produção de lacase. O *B. rhodina* MAMB-05 foi o fungo que produziu títulos mais altos de lacase em todos os óleos vegetais, tendo a maior produção ocorrida no óleo de soja.

Considerando-se que o óleo de soja é uma fonte barata de carbono, dada a abundância no Brasil, este trabalho de dissertação teve por objetivo principal selecionar algumas variáveis que influenciam a produção de lacase por *B. rhodina* utilizando-se o óleo de soja como única fonte de carbono, bem como otimizar a produção desta enzima em escala de frascos, utilizando-se planejamento fatorial e análise por metodologia de resposta. Uma vez obtidas as condições ótimas de produção da lacase, estas foram avaliadas em escala de fermentador de bancada visando aumentar a produção desta polifenol oxidase.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar a produção de lacase pelo fungo *B. rhodina* MAMB-05 através de planejamento fatorial, utilizando-se óleo de soja como fonte única de carbono.

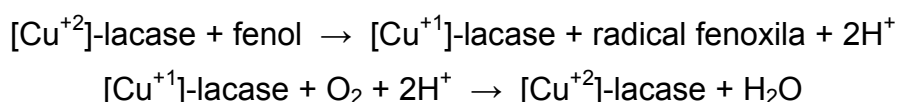
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da adição das fontes de carbono glicose, glicerol e óleo de soja na produção de lacase pelo fungo *B. rhodina* MAMB-05;
- Determinar propriedades bioquímicas da lacase: efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da enzima;
- Selecionar a melhor fonte de nitrogênio para a produção de lacase tais como: sais inorgânicos e fontes orgânicas complexas, na presença de óleo de soja;
- Avaliar o efeito da adição de fosfato inorgânico na síntese da lacase em óleo de soja como fonte de carbono;
- Determinar a melhor concentração de íons Cu^{2+} para a produção de lacase na presença do óleo de soja;
- Otimizar a produção de lacase por *B. rhodina* MAMB-05, através de planejamento fatorial e análise por metodologia de superfície de resposta, após terem sido selecionadas as variáveis mais significativas que influenciam a produção na presença de óleo de soja;
- Investigar a produção da lacase e lipase, nas condições otimizadas, em biorreatores de bancada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LACASES: DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E MECANISMOS DE AÇÃO

As lacases são definidas como *p*-difenol: dioxigênio oxidorreductase (EC 1.10.3.2), também conhecidas como polifenol oxidases, são glicoproteínas monoméricas, diméricas ou tetraméricas na sua forma ativa de holoenzima, e apresentam aproximadamente quinhentos aminoácidos em sua estrutura primária. São cuproproteínas que catalisam reações de oxido-redução, sendo capazes de oxidar mono, di e polifenóis, metoxifenóis promovendo concomitantemente a redução do oxigênio molecular à água (YAROPOLOV et al., 1994; THURSTON, 1994; LEONOWICZ et al., 2001; DEKKER; BARBOSA, 2001; DURÁN et al., 2002; TYCHANOWICZ et al., 2006; HAO et al., 2007; NILADEVI; PREMA, 2008). O mecanismo de reação inicia-se com a transferência de um elétron do substrato fenólico produzindo um radical fenoxila, como pode ser observado nas reações abaixo¹:



Além de oxidarem compostos fenólicos, as lacases podem também oxidar alguns compostos aromáticos não fenólicos, ácido ascórbico, aminas aromáticas e alguns íons inorgânicos, quando na presença de alguns mediadores (PERALTA; SOUZA; BÔER, 2004). Esses mediadores podem ser de origem: biológica, sendo secretados por alguns microrganismos, como os fungos ligninolíticos, participando das reações de deslignificação do complexo lignocelulósico (SILVA; GOMES, 2004); ou sintética, apresentados na Figura 1, como é o caso do ABTS [2,2¹- azino-bis – ácido (3-etilbenzotiazolina-6- sulfônico)].

¹ Reação da redução do oxigênio molecular até água segundo Pietro; Said, 2004.

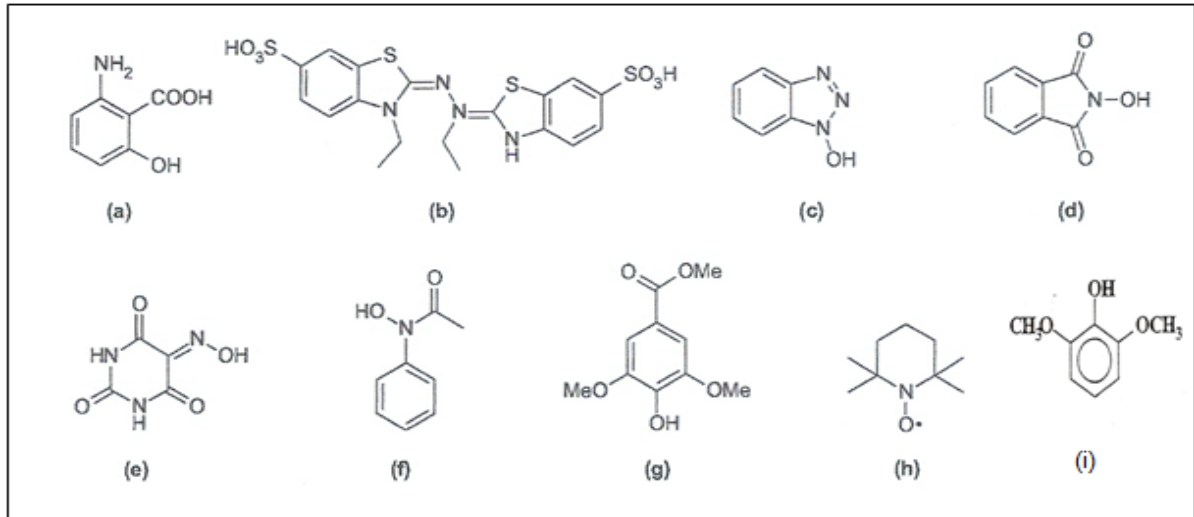


Figura 1 – Exemplos de mediadores da lacase. (a) Ácido 3- hidroxiantranílico (HAA); (b) 2,2¹- azino-bis- ácido -(3-etilbenzotiazolina-6- sulfônico) (ABTS); (c) N- hidroxibenzotriazolina (HBT); (d) N- hidroxiptaimida (HPI); (e) ácido violúrico (VLA); (f) N- hidroxiacetanilida (NHA); (g) Metil ester 4-hidróxi-3,5-dimetóxi-ácido benzóico (ácido siríngico); (h) 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-iloxi (TEMPO); (i) 2,6 – dimetoxifenol.

Fonte: Dekker et al. (2002); Riva (2006).

As reações catalisadas pelas lacases estão representadas na Figura 2, que ilustra também os mecanismos de ação dos mediadores biológicos e sintéticos propostos por Riva (2006).

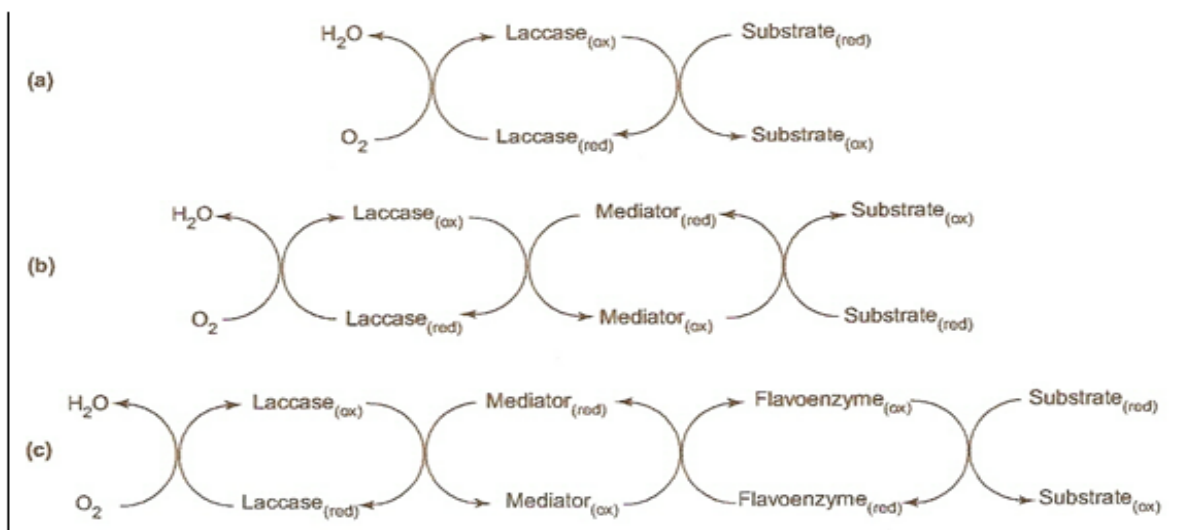


Figura 2 – Representação esquemática de ciclos redox catalisados pela lacase para a oxidação de substratos na ausência (a) e na presença (b e c) de mediadores biológicos e sintéticos, respectivamente.

Fonte: Riva (2006).

3.2 PROPRIEDADES DAS LACASES

As lacases estão caracterizadas como cupro-proteínas e integram um pequeno grupo de enzimas conhecidas como oxidases azuis (ALCÁNTARA et al., 2007; MESSERSCHIMIDT, 1997). Essa classificação deve-se ao fato de que estas enzimas necessitam de átomos de cobre que participam do sítio ativo e são fundamentais no mecanismo da catálise (PALMIERI et al., 1997; DURÁN et al., 2002; BROWN et al., 2002). A Figura 3 apresenta um modelo estrutural da lacase de *Coprinus cinereus* indicando três diferentes domínios, também conhecidos como sítios TI, TII e TIII, caracterizados por espectroscopia e cristalografia, os quais são importantes para a catálise (DAVIES; DUCROIS, 2001; DURÁN et al., 2002; PERALTA; SOUZA, 2004).

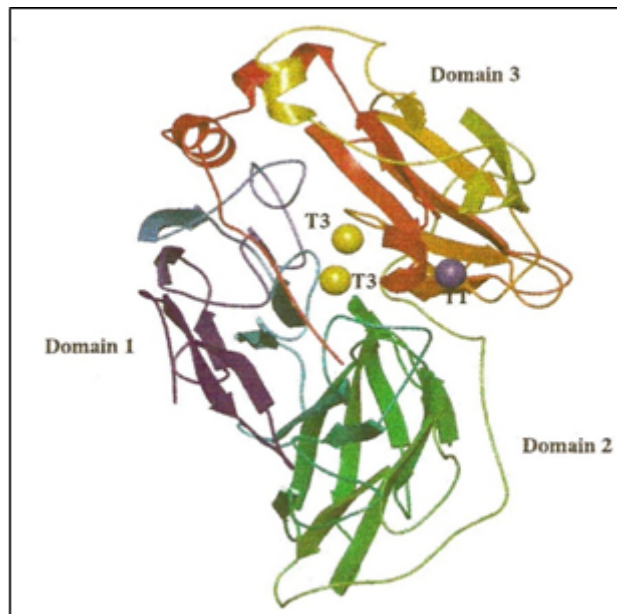


Figura 3 – Modelo tridimensional da lacase de *Coprinus cinereus*
Fonte: Davies; Ducrois (2001).

O primeiro sítio, T1, é o responsável pela intensa cor azul das enzimas, que as classificam como oxidases azuis, e apresenta um pico elevado no espectro visível, próximo de 610 nm, quando o cobre está no estado cúprico (Cu^{2+}). Tal fato deve-se à reação de oxidação do íon Cu^{2+} junto da concomitante redução

dos ligantes. No segundo domínio, sítio TII, os ligantes são constituídos por dois aminoácidos histidina e uma molécula de água e o cobre mostra baixa absorvância na região do visível, observado por espectroscopia de ressonância para-magnética (EPR). O terceiro domínio, sítio TIII, é binuclear, ou seja, possui dois átomos de cobre, antiferromagneticamente emparelhados, ligados entre si, e apresenta uma absorvância máxima em 330 nm. Esses dois últimos sítios formam um centro trinuclear TII/TIII, no qual ocorre a redução do oxigênio molecular, mostrado na Figura 4 (PALMIERI et al., 1997; DAVIES; DUCROIS, 2001; BROWN et al. 2002; DURÁN et al. 2002; PIETRO; SAID, 2004).

Os centros de cobre das lacases conduzem os elétrons de um substrato com redução do oxigênio molecular, sem liberação de peróxido. Durante o ciclo catalítico, ocorrem quatro oxidações monoelétrônicas do substrato catalisadas pelo cobre do sítio tipo I (TI). Os elétrons são transferidos ao agrupamento trinuclear, onde ocorre a redução do oxigênio molecular e liberação de água. O tipo de substrato oxidado pelas lacases pode ser ampliado por meio de um mecanismo de reação que inclui mediadores redox, os quais são facilmente oxidados no centro TI, produzindo, em alguns casos, radicais catiônicos reativos e muito instáveis, que podem oxidar substratos complexos antes de voltarem ao seu estado original. Assim, neste mecanismo constituído do sistema lacase-mediador, o mediador oxida substratos de massa molecular elevada. E, por fim, os elétrons recebidos pela lacase são transferidos, reduzindo o oxigênio para formação de água (TORRES et al. 2003).

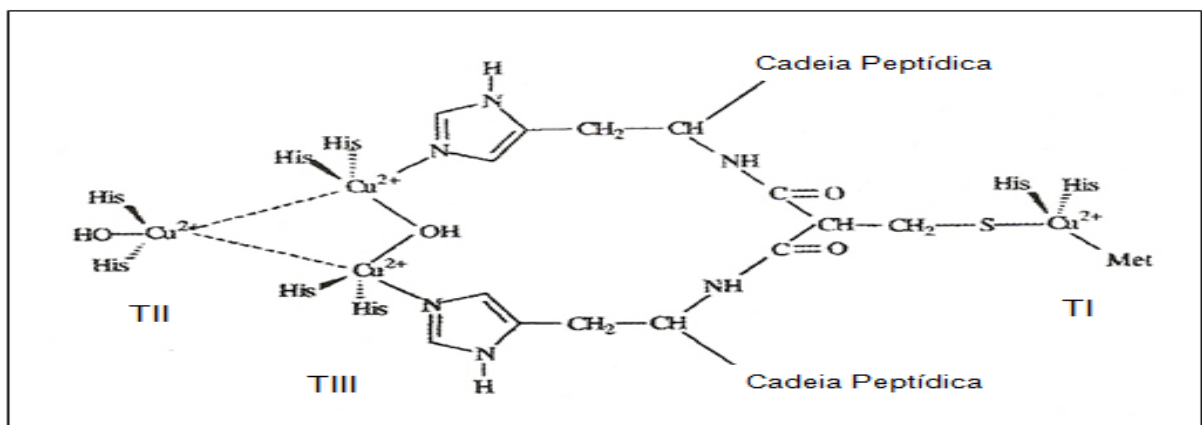


Figura 4 – Representação de um modelo de centro trinuclear da lacase.
Fonte: Durán et al.(2002)

Portanto, a reação catalítica mediada por lacase ocorre em três etapas distintas, sendo que na primeira há a redução do cobre do sítio TI pela oxidação do substrato, na segunda há a transferência interna do elétron do cobre do sítio TI para os sítios TII e TIII, formando o grupo trinuclear, e na terceira há redução do oxigênio para água pelo cobre do sítio TI e TII (GIANFREDA et al. 1999).

3.3 FONTES DE LACASES

O estudo das lacases parte do final do século XIX, quando, em 1883, Yoshida identificou em extrato da planta japonesa *Rhus vernicifera*, grande produtora de verniz, uma quantidade relevante dessa enzima (PIETRO; SAID, 2004). Anos mais tarde, Vandane e Derycke (1983) retomaram os estudos das lacases em plantas, e propuseram que tais enzimas apresentavam-se em diferentes isoformas.

A produção de lacases pode ser mais facilmente encontrada em grupos das plantas e dos fungos (MAYER; STAPLES, 2002; HAO et al., 2007). No entanto, lacases foram também identificadas em insetos como mosquitos do gênero *Anopheles* e estão relacionadas aos processos de esclerotização da cutícula.

Pesquisas recentes têm investigado a produção de lacases por bactérias (NILADEVI; PREMA, 2006), como é o caso de algumas espécies de *Streptomyces*, por exemplo, *S. cyaneus*, *S. lavendulae* e *S. coelicolor*. Givaudan e colaboradores, em 1993, detectaram a produção de lacases pela bactéria *Azospirillum lipoferum*. Mayer e Staples, em 2002, demonstraram que o microrganismo *Bacillus subtilis* produz lacase, a qual está diretamente relacionada à formação e pigmentação de esporos resistentes.

Algumas estudos de lacases produzidas em plantas mostraram que, nesses casos, tais enzimas possuem peso molecular caracterizado e definido entre 90-130 kDa (quilodaltons) e seu conteúdo de carboidratos estabelecido entre 22-45% do peso total da proteína (PIETRO; SAID, 2004).

No entanto, as lacases produzidas por fungos constituem o grupo mais estudado quanto à produção e aplicação. Dentre os diversos filos fúngicos, os ascomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos compõem os microrganismos com maior potencial, até hoje pesquisados (HAO et al., 2007). Esse potencial se deve ao

fato de essas oxidases azuis estarem envolvidas em muitos processos vitais desses microrganismos, como na formação do corpo de frutificação, e na pigmentação de esporos e parede celular. Além disso, por serem empregadas em importantes processos biotecnológicos, como na degradação da lignina e na detoxificação de compostos fenólicos (PIETRO; SAID, 2004).

As lacases fúngicas podem ser monoméricas ou diméricas e possuem um peso molecular bastante variável, 30-140 kDa (quilodaltons), de acordo com as diferenças entre as espécies fúngicas. O seu conteúdo em carboidratos também apresenta grandes variações estando limitada entre 15-41% do seu peso total (PERALTA; SOUZA; BÔER, 2004).

Na Tabela 1, estão relatados diversos microrganismos produtores de lacases, destacando-se, dentre eles, os fungos que constituem o grupo mais amplo na produção destas enzimas.

Tabela 1 – Microrganismos citados como produtores de lacases.

Microrgs	Gênero	Espécies	Referências
Bactérias	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Riva, (2006)
	<i>Azospirillum</i>	<i>A. Lipoferum</i>	Durán et al., (2002)
	<i>Alteromonas</i>	<i>Alteromonas sp.</i>	Durán et al., (2002)
Leveduras	<i>Filobassidiella</i>	<i>F. neoformans</i>	Pietro; Said, (2004)
Fungos ascomicetos	<i>Fusarium</i>	<i>F. proliferatum</i>	Kwon; Anderson, (2001)
	<i>Botryosphaeria</i>	<i>B. rhodina</i>	Barbosa et al., (1996)
	<i>Botrytis</i>	<i>B. cinerea</i>	Mayer; Staples, (2002)
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. nidulans</i>	Mayer; Staples, (2002)
	<i>Daldinia</i>	<i>D. concentrica</i>	Thurston, (1994)
	<i>Neurospora</i>	<i>N. crassa</i>	Oda et al., (1991)
	<i>Podospora</i>	<i>P. anserine</i>	Bollag; Leonowicz, (1984)
	<i>Pichia</i>	<i>P. pastoris</i>	Gelo- Pujic et al., (1999)
	<i>Gaeumannomyces</i>	<i>G. graminis</i>	Edens et al., (1999)
Fungos basidiomicetos	<i>Pycnoporus</i>	<i>P. cinabarinus</i>	Meza et al., (2005)
	<i>Trametes</i>	<i>T. hirsuta</i>	Couto et al., (2006)
		<i>T. versicolor</i>	Ceylan et al., (2008)
		<i>T. pubescens</i>	Couto; Toca-Herrera, (2007)
	<i>Coriolopsis</i>	<i>C. rígida</i>	Alcántara et al., (2007)
	<i>Ceriporiopsis</i>	<i>C. subvermispota</i>	Pietro, Said, (2004)
	<i>Lentinus</i>	<i>L. critinus</i>	Machado et al., (2006)
	<i>Pleurotus</i>	<i>P. ostreatus</i>	Rezende et al., (2005)
		<i>P. tigrinus</i>	Fenice et al., (2003)
	<i>Panus</i>	<i>P. eryngii</i>	Munoz et al., (1997)
	<i>Polyporus</i>	<i>P. pinsitus</i>	Brinch; Pedersen, (2002)
	<i>Phlebia</i>	<i>P. radiata</i>	Leonowicz et al., (2001)
	<i>Agaricus</i>	<i>A. bisporus</i>	Thurston, (1994)
Fungos Deuteromicetos	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>Pestalotiopsis sp.</i>	Hao et al., (2007)

3.4 REQUERIMENTOS NUTRICIONAIS PARA A PRODUÇÃO DE LACASES

3.4.1 Nutrição e Metabolismo Fúngico

Para o desenvolvimento de um microrganismo é necessária a presença de nutrientes elementares para o seu cultivo. O conjunto no qual estão presentes os elementos essenciais, sem os quais um microrganismo não poderia viver, é chamado de meio de cultivo. O meio de cultivo pode variar de acordo com a fisiologia do microrganismo, sendo possível o cultivo em meios naturais, sendo a composição quantitativa desconhecida, ou em meios sintéticos, os quais têm composição qualitativa e quantitativa conhecida. O desenvolvimento de meios sintéticos é fundamental para estudos de pesquisa que busquem avaliar a relação entre o crescimento do microrganismo e a ação de cada um dos elementos presentes no meio. Os meios sintéticos constituem-se no estado líquido e são necessários para o isolamento dos metabólitos microbianos, assim como para que se possa quantificar o crescimento por peso seco da biomassa e controlar com mais eficiência a aeração (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004).

Vários são os parâmetros de cultivo que afetam diretamente a produção e a atividade das lacases por fungos. A produção de isoformas de lacase, por diferentes fungos, pode ser aumentada sob condições de cultura apropriada (DEKKER et al. 2007). Dentre os parâmetros de cultivo estão incluídos: a disponibilidade de oxigênio, fontes de carbono, fosfato e nitrogênio, microelementos, pH e temperatura (VAN DER MERWE, 2002).

A produção de lacase por *Coriolus versicolor* e *Funalia trogii* foi avaliada por Kahraman e Gurdal (2002), que estudaram o efeito de meios de cultura sintéticos e naturais. Utilizaram como meio de cultura natural o melão de cana de açúcar e como meio sintético um meio basal estoque (MBE) contendo glucose, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , extrato de levedura e água destilada. Os dois diferentes meios foram avaliados na presença e ausência de caule de algodão. Os resultados mostraram que para esses dois microrganismos o meio de cultura natural na presença de caule de algodão houve maior produção de lacase quando

comparada aos outros meios de cultivo. A maior atividade de lacase ($4,9 \text{ U mL}^{-1}$) foi detectada nos cultivos com o *F. trogii*.

Os elementos essenciais dos meios de cultivo podem ser divididos em macronutrientes, micronutrientes e elementos-traços. Os macronutrientes são aqueles encontrados em maior concentração nos meios de cultivo, ou seja, são os que os microrganismos requerem em maior quantidade para sobreviverem. Ao passo que os micronutrientes são aqueles encontrados em menor concentração, isto é, na ordem de $\mu\text{g mL}^{-1}$. Já os elementos-traços são aqueles de concentração ínfima, porém de importância vital para o desenvolvimento do microrganismo (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004).

Os macronutrientes dos meios de cultivo constituem-se predominantemente pelas fontes de carbono, uma vez que os carboidratos são responsáveis pela geração de energia. Como exemplo de fontes de carbono recorrentes em cultivos, pode-se citar: glicose, frutose, amido, ácidos orgânicos e lipídeos, como o óleo de soja, entre outros.

Além dos carbonos, também estão presentes outros elementos fundamentais para a composição de uma célula fúngica, como o nitrogênio, principal átomo na composição de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos. Segundo Galvagno e Forchiassin (2004) o nitrogênio é encontrado em quatro formas potencialmente assimiláveis pelos microrganismos, são elas: N_2 , NO_3^- , $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ e N orgânico.

Ainda serão considerados macronutrientes o fósforo, que é um componente celular de alta energia das moléculas de ATP, encontrado principalmente na forma de PO_4^{2-} , e o enxofre, elemento também essencial na síntese de aminoácidos sulfurados, geralmente encontrado na forma de sulfatos.

Quanto aos micronutrientes e aos elementos-traços, são encontrados principalmente na forma de minerais, como potássio, magnésio, ferro, manganês, cromo, e cobre. Esses são responsáveis por três funções básicas vitais para o fungo: contribuir para o funcionamento das coenzimas; para as transferências de elétrons em reações de óxido-redução e atuar em reguladores osmóticos.

As variações nas concentrações dos elementos essenciais presentes nos meios de cultivo influenciam diretamente o desenvolvimento microbiano, assim como na obtenção de seus metabólitos. Visando entender o metabolismo dos microrganismos e otimizar processos de produção de importantes

metabólitos, alguns autores avaliaram diferentes fatores de crescimento, para investigar os componentes dos meios de cultivo na produção da lacases, como estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Meios de cultivo utilizados na produção de algumas lacases microbianas.

Microrganismos	Fontes de carbono	Fontes de nitrogênio	Fontes de fosfato	Macro/ Microelementos	Agit. (rpm)	pH	Temp. (°C)	Tempo	Referências
<i>Botryosphaeria</i> sp.	Glucose (10g L ⁻¹)	NH ₄ NO ₃ (100g L ⁻¹)	KH ₂ PO ₄ (250g L ⁻¹)	Meio mínimo de Vogel (1956)	200	6	28	Variável	Dekker; Barbosa, (2001)
<i>Lentinula edodes</i>	Glucose (20 g L ⁻¹)	Ext. de malte (5 g L ⁻¹) Peptona(10g L ⁻¹)	-	Meio líquido de Von Hunolstein et al., (1986)	240	5,4	28	4 dias	Minussi; Pastore; Durán, (2007)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Glucose (5 g L ⁻¹)	Ext. levedura (0,5g L ⁻¹)	K ₂ HPO ₄ (1g L ⁻¹)	KCl (0,5g L ⁻¹) MgSO ₄ .7H ₂ O (0,5 g L ⁻¹) FeSO ₄ (0,1 g L ⁻¹) Mn(CH ₃ COO) ₂ (0,008 g L ⁻¹) ZnNO ₃ (0,003g L ⁻¹) Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (0,006g L ⁻¹) CuSO ₄ .5H ₂ O (0,003 g L ⁻¹)	100	5.5	28	Até 18 dias	Ardon; Kerem; Hadar (1996)
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Maltose, glucose, celobiose, lactose, glicerol (10g L ⁻¹)	NH ₄ NO ₃ (10 g L ⁻¹)	KH ₂ PO ₃ (3g L ⁻¹)	MgSO ₄ (1,5 g L ⁻¹), VB ₁ (0,01 g L ⁻¹), solução mineral (1 mL L ⁻¹), CuSO ₄ .5H ₂ O (10µmol L ⁻¹)	150	5.6	28	7-9 dias	Hao et al., (2007)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Maltose (2.5 g L ⁻¹) Bagaço de cana (35% m/m)	Ext. lev (1g L ⁻¹) Tartarato de amônio (1,84 g L ⁻¹)	-	Tartarato de sódio (2,3 g L ⁻¹) CuSO ₄ .5H ₂ O (0,1 g L ⁻¹)	-	-	24	-	Meza et al., (2005)
<i>Trametes hirsuta</i>	Glucose (10 g L ⁻¹)	Ext. levedura (15g L ⁻¹) (NH ₄) ₂ SO ₄ (0,9 g L ⁻¹)	KH ₂ PO ₄ (2 g L ⁻¹)	MgSO ₄ .7H ₂ O (0,5 g L ⁻¹) CaCl ₂ .2H ₂ O (0,1 g L ⁻¹) KCl (0,5 g L ⁻¹) Tiamina (0,5 g L ⁻¹) em tampão citrato-fosfato pH 4,5	70		30	7 dias	Rodríguez Couto et al., (2006)

3.4.2 Importância da Composição dos Meios de Cultivos

Alguns fatores, tais como, a composição do meio de cultivo e também a aeração influenciam o crescimento microbiano e a produção de enzimas. A aeração do meio de cultivo pode também afetar a produção de lacase. Dekker e Barbosa (2001) examinaram o efeito da aeração na produção de lacase pelo *B. rhodina* MAMB-05, através da comparação de cultivos submersos realizados em frascos de *Erlenmeyer* (125 mL) normais e modificados (com quatro inserções nas paredes laterais) para aumentar a aeração. Verificaram que a máxima atividade enzimática ($1,6 \text{ U mL}^{-1}$) foi obtida entre 4-5 dias de cultivo, quando utilizaram frascos modificados.

A produção de lacase por *Trametes hirsuta* foi avaliada em biorreator *air-lift* e suplementação constante do meio de cultura com diferentes fontes de carbono, e dentre elas o glicerol, fonte que mais induziu esta enzima (20.000 U L^{-1}) no vigésimo sexto dia de cultivo (RODRIGUEZ-COUTO et al., 2006).

A influência de nutrientes na produção de lacase pelo fungo *B. rhodina* MAMB-05 foi avaliada na presença e ausência do indutor álcool veratrílico (AV). Também foram estudados parâmetros como tipo de inóculo, pH inicial, razão carbono/nitrogênio, fontes de nitrogênio, efeitos da adição de surfactantes como Tween 80 e Tween 60, além de óleo de soja e de cobre. A adição do AV induziu a produção de lacase. Dentre os tipos de inóculo comparados, o primeiro era constituído por três esferas retiradas das placas de Petri, contendo micélio, para cada 25 mL de meio, e o segundo, uma solução homogeneizada de micélio. Nos cultivos com o primeiro tipo de inóculo a produção da lacase foi aumentada para $4,83 \pm 0,38 \text{ U mL}^{-1}$ na presença de AV, quando comparada ao seu controle $0,53 \pm 0,001 \text{ U mL}^{-1}$. O pH ótimo inicial foi na faixa de 5,5 a 7,5 (DEKKER et al, 2007).

Dentre as fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas investigadas (asparagina, prolina, uréia, NH_4NO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl), para a produção de lacase pelo *B. rhodina*, os resultados mostraram que elas não influenciaram significativamente a produção de biomassa na ausência de AV. Entretanto, todas as fontes inorgânicas, com exceção de NH_4Cl , na presença de AV, influenciaram positivamente a produção da lacase pelo *B. rhodina*. Dentre as fontes orgânicas, a prolina ($0,0002 \pm 0,00003 \text{ U mL}^{-1}$) e uréia ($0,08 \pm 0,02 \text{ U mL}^{-1}$) exerceram um efeito repressor na síntese da

lacase. A adição do surfactante Tween 80 ao meio de cultivo promoveu um aumento da produção da lacase, de $0,77 \pm 0,02 \text{ U mL}^{-1}$ para $1,03 \pm 0,12 \text{ U mL}^{-1}$ na ausência do indutor AV, e de $6,01 \pm 0,099 \text{ U mL}^{-1}$ para $9,14 \pm 0,102 \text{ U mL}^{-1}$ na presença de AV (DEKKER et al., 2007).

Quando óleo de soja (1% v/v) foi adicionado ao meio de cultivo para o *B. rhodina* MAMB-05, a produção de lacase foi aumentada de $0,36 \pm 0,15 \text{ U mL}^{-1}$ (quando a fonte foi glucose) para $1,74 \pm 0,09 \text{ U mL}^{-1}$ na ausência de AV. A adição de cobre ao meio de cultivo também exerceu um efeito significativo na produção de lacase (DEKKER et al., 2007).

Ao isolar um novo fungo produtor de lacase, classificado como *Pestalotiopsis* sp., Hao e colaboradores (2007) realizaram diversos testes em relação ao meio de cultivo, alterando as fontes de carbono e nitrogênio e utilizando alguns possíveis indutores para investigar se a produção de lacase poderia ser aumentada. Demonstraram que com as fontes de carbono utilizadas (maltose, glucose, celobiose, lactose, glicerol), a produção de lacase foi favorecida quando maltose foi utilizada, atingindo níveis de $1,8 \text{ U mL}^{-1}$ de atividade enzimática, ao contrário, com o glicerol a atividade enzimática da lacase não passou de $0,4 \text{ U mL}^{-1}$.

Quanto às fontes de nitrogênio, foram testados: extrato de carne, tartarato de amônio, nitrato de amônio, extrato de levedura, oxalato de amônio, cloreto de amônio, sulfato de amônio, peptona e uréia. Baixos níveis de produção de lacase foram constatados na ausência de nitrogênio, fato que se alterou com o acréscimo do elemento, responsável, dessa forma, pelo aumento na produtividade da enzima. Quando se utilizou tartarato de amônio (10 g L^{-1}) um máximo de atividade da lacase foi atingido, chegando a 14 U mL^{-1} . Quanto aos indutores, foram avaliados guaiacol, xilidina, íons Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} e Mn^{2+} e verificou-se que o íon cobre foi o fator que mais influenciou a produção da lacase, atingindo níveis próximos de 33 U mL^{-1} (HAO et al. 2007).

A produção de lacase por fungos que causam podridão branca em madeira foi avaliada através da adição de álcool veratrílico (AV) e guaiacol como suplemento a três diferentes meios de cultivo: meio de sais minerais; caldo de extrato de malte; e uma mistura de meio de sais minerais e extrato de malte. Como resposta, o AV foi capaz de aumentar a produção de lacase por *Phlebia radiata* em duzentas vezes, de $0,045 \text{ U mL}^{-1}$ para $9,470 \text{ U mL}^{-1}$, quando cultivado somente meio

em sais minerais. Quando foi adicionado o guaiacol ao meio, a atividade de lacase foi de 0,045 U mL⁻¹ para 10,475 U mL⁻¹ (ARORA; GILL, 2001).

O efeito de alguns metais foi estudado para a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*. Houve aumento da produção quando diferentes concentrações de cobre e cádmio foram adicionadas ao meio de cultivo. O cobre na concentração de 1mM proporcionou níveis de lacase de aproximadamente 400 U mL⁻¹. Tal experimento levou à compreensão de que esse elemento afeta positivamente a síntese da enzima, visto que em sua ausência no meio de cultivo os níveis de atividade foram em torno de 50 U mL⁻¹ (BALDRIAN; GABRIEL, 2002).

A importância da adição de cobre na produção de lacase por *Pleurotus pulmonarius* foi também avaliada sob fermentação em estado sólido, levando à conclusão de que a síntese desta enzima foi aumentada quando se adicionou uma solução de íons Cu²⁺ na concentração de 15 mM ao meio de cultivo. A produção da enzima passou de aproximadamente 200 U mL⁻¹ para 700 U mL⁻¹ (TYCHANOWICZ et al., 2006).

Os trabalhos acima relatados demonstram que é de fundamental importância a avaliação dos componentes dos meios de cultivo para aumentar a produção de enzimas microbianas, incluindo-se as lacases, visto que existe variabilidade genética e fisiológica nas diferentes espécies de um mesmo gênero microbiano, assim como entre diferentes gêneros.

3.5 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE: PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXPERIMENTOS E ANÁLISE POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)

O planejamento fatorial constitui uma técnica estatística muito importante para processos de otimização. Através dela é possível avaliar diversos fatores de um experimento e as relações entre eles, buscando os melhores níveis para o desenvolvimento da pesquisa. A base de um planejamento fatorial está na definição dos níveis em que cada fator deve ser estudado. Tais níveis devem ter sido previamente analisados em ensaios experimentais, para que se obtenha um planejamento completo.

Assim, para a etapa de exploração inicial de uma investigação no laboratório, é necessário que se faça uma triagem de variáveis para que se construa o planejamento fatorial. O modelo estatístico de um experimento fatorial é formulado de acordo com os efeitos por unidade de variação dos fatores. A equação 1 representa um planejamento 2^2 , no qual y é a resposta, β são os coeficientes a serem determinados, x_1 e x_2 são respectivamente as variáveis que representarão o fator A e B, e ε é um termo de erro aleatório (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007):

$$y(x_1, x_2) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon(x_1, x_2) \quad (1)$$

De acordo com Montgomery (2005), os níveis das variáveis independentes são representados de maneira codificada, através de sinais algébricos, que podem ser identificados em níveis superiores ou inferiores, em -1 e +1, e ainda é possível adicionar pontos centrais, os quais permitem a estimativa do erro, sendo úteis quando não há repetição dos ensaios nos pontos fatoriais. A partir disso, um modelo linear é capaz de explicar a relação entre a resposta e os fatores.

Embora tenha sido explicado o modelo através da utilização de dois fatores, o planejamento fatorial também poderá utilizar mais fatores. Nesse caso, levando em conta que a técnica da metodologia é limitada, será necessária a utilização de blocagem, que consiste na divisão dos experimentos em blocos, partindo do princípio que a blocagem promove uma variação fixa. No entanto, quando ocorre a blocagem, cada um dos blocos torna-se um fator e, assim sendo, esse pode ou não ter uma resposta significativa (SILVA, 2007).

Quando se utiliza o planejamento fatorial, os resultados podem ser tratados por uma metodologia de superfície de resposta (MSR), que é uma técnica de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007). De acordo com os mesmos autores, a MSR é constituída de duas etapas bastante distintas: modelagem e deslocamento. Essas etapas são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com a intenção de atingir uma região ótima (máxima ou mínima) da superfície investigada. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais. O deslocamento dá-se sempre ao longo do

caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

No intuito de utilizar essas ferramentas estatísticas, Vasconcelos e colaboradores (2000), por exemplo, estudaram a influência de vários parâmetros fermentativos (tempo de cultivo, agitação, concentração de álcool veratrílico e extrato de levedura) na produção de lacase por *Botryosphaeria sp.* através de um planejamento fatorial 2^{4-1} e análise por MSR. Os resultados mostraram que somente os parâmetros concentração de álcool veratrílico (30,4 mM) e tempo de cultivo (4,5 dias) foram variáveis significativas para a produção ótima da lacase ($5,6 \pm 0,34 \text{ U mL}^{-1}$).

Tais recursos estatísticos são aplicáveis em experimentos de diversas áreas do conhecimento. Os resultados obtidos através dessas metodologias possibilitam uma pesquisa segura, ágil e econômica, inclusive para a produção de enzimas por microrganismos.

3.6 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS LACASES

Não há dúvidas de que as propriedades bioquímicas e físico-químicas das lacases, tais como atividade, estabilidade, pH e temperatura ótimos, forneçam muitas informações iniciais importantes para estudos básicos e também para a aplicação de lacases em biotecnologia (MOUGIN et al., 2003; SHLEEV et al., 2004). No campo das aplicações biotecnológicas e ambientais das lacases, extensas pesquisas têm sido desenvolvidas, procurando avaliar as possibilidades oferecidas por tais enzimas em contribuições científicas diversas.

As lacases estão em evidência devido a sua vasta aplicabilidade em segmentos variados. Seu amplo espectro de aplicação caminha pelas áreas da alimentação, biodegradação, indústria papeleira, têxtil, medicina, novas tecnologias, produção de etanol, sínteses orgânicas, entre outras (MAYER; STAPLES, 2002; WINDSTEN; KANDELBAUER, 2008).

De acordo com Xu (2005), o mercado industrial enzimático movimenta em torno de US\$ 2 bilhões de dólares por ano, com mais de 500 produtos no mercado para mais de 50 tipos de aplicações. A grande maioria das

enzimas comercializadas são hidrolases, incluindo-se as proteases, esterases e até mesmo as lipases, enquanto que as lacases ocupam um minúsculo espaço dentro do mercado das enzimas. Portanto, há necessidade de se investigar o uso dessas oxidoredutases, desde a redução nos custos de produção através do isolamento de microrganismos produtores, até a obtenção em substratos de baixo custo, purificação, caracterização e aplicações (DURÁN; ESPOSITO, 2000).

Uma alternativa para ampliar a aplicação de lacases e diminuir o seu custo poderia se dar através de imobilização em diferentes suportes. Durán et al. (2002) imobilizaram a lacase produzida por *Polyporus versicolor* em gelatina, poliuretano e sefarose 4B-Epi-IDA-Cu²⁺ (quelato-metal). O suporte constituído do quelato-metal apresentou ótima absorção, estabilidade e uma prática viável economicamente. A enzima imobilizada foi utilizada na clarificação do suco de maçã e proporcionou redução dos fenóis (48,6%) e de agentes cromóforos como os flavonóides (47%).

O custo da produção de lacase pode também diminuir através do melhoramento dos meios de cultivo, possibilitando um aumento da produção pelo microrganismo, utilizando-se suplementos baratos e acessíveis, tornando a produção em grande escala economicamente viável. Niladevi e Prema (2008) obtiveram títulos de lacase de 6 U mL⁻¹ depois de terem otimizado o meio de cultivo (extrato de levedura, MgSO₄, CuSO₄, (NH₄)₂SO₄, CaCO₃ e elementos traços) para a produção de lacase por *Streptomyces psammoticus*.

3.6.1 Lacases e a Indústria Alimentícia

As lacases podem ser aplicadas de diversos modos em Indústrias alimentícias. Isso porque, podem promover aumento na qualidade e segurança nutricional de determinados alimentos, assim como gerar novos produtos. Além disso, podem ser aplicadas em processos para aumentar ou modificar a cor de alguns alimentos e bebidas. O emprego de lacases no processamento do óleo de oliva através da polimerização de vários fenóis, por exemplo, resultou em uma cor mais escura do óleo (MINUSSI; PASTORE; DURÁN, 2002; XU, 2005;).

O mosto e o vinho são misturas complexas de diferentes sais, nos quais os compostos fenólicos e químicos são os responsáveis pelo aroma. A lacase imobilizada em um quelato-cobre foi utilizada na remoção de fenóis, alguns ácidos orgânicos, como o ácido ferúlico, ácido *o*-cumárico e o flavonóide (-)-epicatequina, do mosto do vinho branco, favorecendo uma melhora do aroma e também a clarificação deste vinho. Esse tratamento pode prevenir o fenômeno de madeirização ou escurecimento do vinho, que é provocado tanto por contaminações das uvas, quanto por problemas no processamento, estocagem e armazenamento das garrafas (MINUSSI; PASTORE; DURÁN, 2002; MAYER; STAPLES, 2002).

3.6.2 Lacases e a Biodegradação

As lacases também são capazes de oxidar e degradar alguns lipídeos, como trilinoleína e metil linoleato. Esses compostos graxos insaturados não são substratos típicos para a produção de lacases, pois seus produtos de reação incluem hidroperóxidos e epóxidos. Essas enzimas podem também degradar resíduos plásticos contendo unidades de olefinas, na presença de mediadores redox, que iniciam reações em cadeia, desintegrando o plástico (XU, 2005).

A biodegradação de dois hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's), o antraceno e 2-metilantraceno, foram avaliados por *Rigidoporus lignosus*, em um meio suplementado com mediadores específicos para lacase (ABTS, HBT, VLA). O antraceno foi parcialmente metabolizado, tendo restado, após 14 dias de cultivo, 10,7% de sua composição original. Entretanto o composto 2-metilantraceno foi completamente metabolizado no oitavo dia de cultivo, quando se utilizou ácido violúrico como mediador (CAMBRIA et al., 2008).

A lacase de *Trametes versicolor* foi determinada para avaliar a oxidação de alguns compostos fenólicos presentes em águas residuais de uma indústria de processamento de óleo de oliva. Onze compostos fenólicos foram avaliados e todos sofreram algum tipo de degradação (CANFORA et al., 2008).

As lacases fúngicas têm se mostrado eficientes na degradação de uma variedade de poluentes ambientais persistentes. De acordo com Mayer e Staples (2002), os isômeros 2,4,6-triclorofenol tiveram sua alta toxicidade amenizada

devido ao emprego dos fungos *Panus tigrinus* e *Coriolus versicolor*. Em ambos os casos, lacases foram detectadas no meio sendo responsabilizadas pelas transformações químicas dos compostos. Segundo estes pesquisadores, as lacases produzidas pelo *Trametes hirsuta* podem ser utilizadas para oxidar alcenos de difícil degradação no ambiente. Esse processo de oxidação utiliza um sistema enzima-mediador (BHT) que transforma o alceno à cetona ou aldeído.

Depois de purificadas, as lacases secretadas por *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* foram capazes de converter a dicetonitrila, uma substância química ativa em herbicidas e com ação acumulativa, a ácido, na presença de 2 mM de ABTS, que age como mediador redox em pH 3 (MOUGIN et al., 2000).

3.6.3 Lacases nas Indústrias Papeleira e Têxtil

A indústria de papel e celulose no Brasil constitui uma das maiores cadeias produtivas de emprego e movimenta bilhões de dólares, tendo produzido 7,4 milhões de toneladas de papel em 2001. Entretanto, esse é um dos setores que mais promovem a poluição ambiental, principalmente com efluentes lançados pelas indústrias que utilizam produtos químicos tais como bases, organoclorados, peróxidos e corantes (SILVA; GOMES, 2004). Porém o uso de tecnologias alternativas que reduzam ao máximo o impacto ambiental causado pelos efluentes já estão disponíveis, utilizando-se de enzimas na etapa de polpação e branqueamento, como tem sido descrito na literatura.

A produção do papel e a polpação são caracterizadas como etapas de remoção da lignina da madeira. Se utilizados microrganismos que secretam extracelularmente lacase, há o ataque da lignina conjuntamente com mediadores químicos, promovendo sua despolimerização (MOSAI et al. 1999). Alguns microrganismos como *Trametes versicolor*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Phlebia radiata* e *Phellinus pini*, são considerados reveladores nos estudos de biopolpação por secretarem grande quantidade de lacase (HATAKKA, 2001).

O branqueamento da polpa ocorre devido ao rompimento dos laços entre a lignina e os carboidratos, promovendo abertura da sua estrutura e tornando-a mais permeável às substâncias oxidantes, levando à remoção da lignina, o que aumenta a brancura da polpa (PIETRO; SAID, 2004).

Os microrganismos mais investigados no processo de branqueamento são o *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor*, sendo esse último o mais estudado quanto à produção de lacases. Outros microrganismos como o *Schizophyllum commune*, *Ganoderma lucidum*, *Polyporus versicolor*, *Lentinus edodes*, *Tinctoporia borbonica* também são eficientes na descoloração (GARG; MODI, 1999).

As lacases também estão diretamente ligadas ao tratamento de resíduos nas indústrias têxteis (HAO et al.,2007). Existem mais de 100.000 corantes comerciais disponíveis para essas indústrias com uma produção acima de 700 ton. por ano. Durante o processo de tingimento e descoloração de tecidos, consome-se grandes quantidades de água e substâncias químicas, produzindo efluentes contaminados com compostos sintéticos complexos e, muitas vezes, recalcitrantes. Os corantes são projetados para resistirem à luz, água e agentes oxidantes, o que gera a necessidade de biotratamentos para seus efluentes, como aqueles com microrganismos produtores de lacases para remover e degradar estes poluentes (PIETRO; SAID, 2004).

Em 2000, Raghukumar avaliou a capacidade do *Flavodon flavus* de descolorir corantes sintéticos como verde brilhante, vermelho do Congo, violeta cristal, e remazol azul brilhante, e verificou que esse microrganismo foi capaz de degradar quase que por completo todos os corantes citados. A adição de indutores de lacase como AV e etanol aumentou a produção e o rendimento da descoloração dos efluentes (MAYER; STAPLES, 2002).

A Tabela 3 apresenta as principais lacases comercializadas industrialmente com diferentes aplicabilidades.

Tabela 3 – Lacases comercializadas industrialmente.

	Nome do produto	Fabricante
Indústria alimentícia		
Lacase	Suberase	Novozymes
Indústria têxtil		
Lacase	DeniLite Novozym 51003*	Novozymes Novozymes
Aplicações em diagnósticos		
Lacase*		Sigma-Aldrich Amano Tienzyme Worthington Biochemical

* Produzida em escala piloto.

Fonte : Xu (2005).

3.6.4 Lacases Aplicadas na Medicina

A atuação das lacases na medicina também tem sido importante. São utilizadas, por exemplo, em processos de síntese orgânica, como no processo de síntese de cefalosporinas, vinblastinas e vindolinas. Também podem oxidar a toxina uruxiol, derivada do catecol, cuja contaminação causa dermatite (XU, 2005).

Um novo método de análise de morfina foi desenvolvido utilizando-se lacase para distinguir simultaneamente a morfina da codeína nas amostras. Foi construído um sensor baseado em lacase e glucose desidrogenase, imobilizadas em um eletrodo de oxigênio *Clark*. A morfina é oxidada pela lacase com consumo de oxigênio e regenerada pela glucose oxidase. Como a lacase não oxida a codeína, o sensor torna-se específico para a morfina, podendo detectá-la em concentrações entre 32 nM e 100 µM, num período de um minuto de reação (BAUER et al., 1999).

Ainda, lacases purificadas produzidas pelo fungo *Tricholoma giganteum* têm sido descritas na literatura como possíveis inibidores de atividade da transcriptase reversa do vírus HIV-1 (WANG; NG, 2004).

3.6.5 Lacases na Produção de Etanol e Sínteses Orgânicas

Para melhorar a produção de etanol através de materiais renováveis, lacases de *Trametes versicolor* foram expressas sob controle do gene promotor PGK1 em *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados mostraram que os materiais lignocelulósicos apresentaram vantagens na produção desse combustível, principalmente porque constituem fontes economicamente viáveis (MAYER; STAPLES, 2002).

Investigações sobre sistemas lacase-mediador em processos de designificação têm sido eficientes na oxidação de substituintes não-fenólicos, particularmente grupos de álcool benzílico. A lacase de *Trametes pubescens* foi utilizada na investigação de sistemas de oxidação de mono, di e oligossacarídeos. A Figura 5 mostra algumas reações catalisadas por esse sistema.

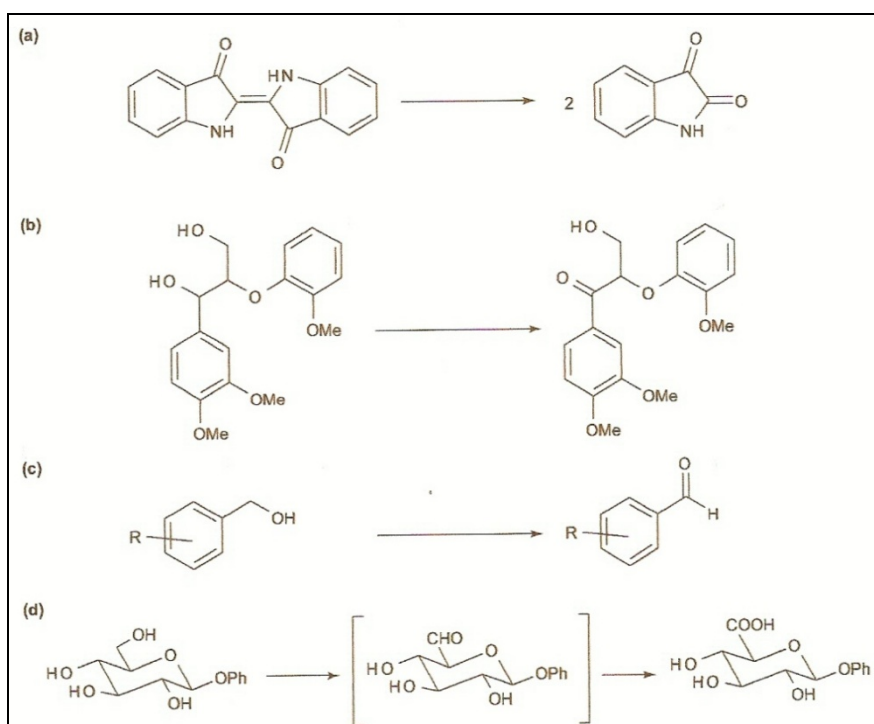


Figura 5 – Exemplos de aplicações sintéticas do sistema lacase - mediador. (a) Oxidação do índigo a isatina. (b) Conversão do adlerol à adlerona. (c) Oxidação do álcool benzílico ao seu correspondente aldeído. (d) Oxidação do alquil β-glucosídeo ao seu correspondente glucuronosídeo.

Fonte: Riva (2006).

3.7 *BOTRYOSPHAERIA RHODINA* MAMB-05

O fungo ascomiceto *Botryosphaeria* sp. foi isolado de cancro de eucalipto em 1995 por Barbosa e colaboradores. Esse microrganismo foi selecionado como ligninolítico por descolorir o corante poliaromático como Poly R-478. Em 1996 foi descrito como produtor constitutivo de lacase, quando também se constatou que a síntese da enzima não era reprimida por glucose. O álcool veratrílico induziu significativamente a produção dessa lacase, assim como esse microrganismo cresceu na presença de diferentes concentrações de vários compostos aromáticos, tais como catecol, 4-clorofenol, 2,6-dimetoxifenol, guaiacol, e alguns derivados do ácido benzóico (ácidos vanílico, siríngico, verátrico) em meio sólido e líquido de cultivo (BARBOSA et al., 1996, DEKKER; BARBOSA, 2001; DEKKER; BARBOSA; SARGENT, 2002).

A produção da lacase pelo *Botryosphaeria* sp foi otimizada, utilizando-se glucose como fonte de carbono, através de um planejamento fatorial e análise por MRS. As variáveis investigadas foram o tempo de cultivo, concentração de extrato de levedura, agitação e concentração de álcool veratrílico. O tempo de cultivo e a concentração de AV foram os fatores que mais influenciaram a produção da enzima. A condição ótima para a produção dessa lacase foi 4,5 dias de cultivo a 180 rpm e 30,4 mM de AV (VASCONCELOS et al, 2000).

O efeito da aeração também foi estudado, na produção de lacase por *Botryosphaeria* sp., e demonstrou que o aumento na aeração influenciou positivamente a produção de biomassa fúngica e da enzima. A atividade da lacase foi determinada utilizando-se de dois substratos sintéticos, o ABTS [2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)] e DMP (2,6-dimethoxyphenol) (DEKKER; BARBOSA, 2001).

Além de produtor constitutivo de lacase, o *Botryosphaeria* sp também foi caracterizado como ligninolítico, pectinolítico, glucanolítico, celulolítico, hemicelulolítico, amilolítico e inulinolítico na presença e na ausência de álcool veratrílico (CUNHA et al., 2003).

Em 2004, Garcia e colaboradores classificaram o *Botryosphaeria* em nível de espécie através de técnicas moleculares de PCR (reação em cadeia da polimerase), amplificação das regiões conservadas e seqüenciamento dos espaços

internos transcritos (ITS) 1 e 2 e o gene 5.8 S do DNA ribossômico. Por último, analisou-se as seqüências em banco de dados. Esse ascomiceto foi identificado como pertencente à espécie *rhodina*. A Figura 6 mostra o *B. rhodina* crescido em meio sólido de Vogel - glucose - ágar.

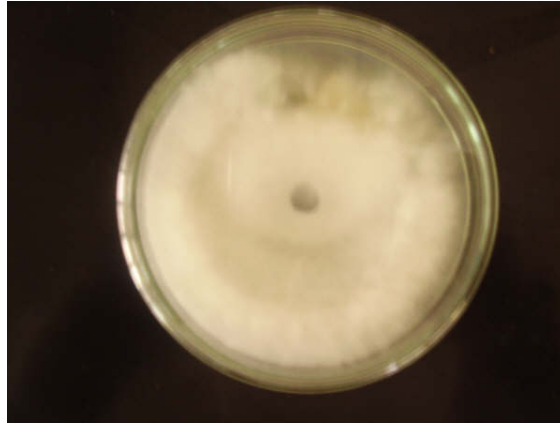


Figura 6 – Colônia do fungo ascomiceto *B. rhodina* MAMB-05.

A adição de Tween 80, 60, 40 e 20 nos cultivos do *Botryosphaeria* sp., contendo glucose 1% como fonte de carbono, na presença e ausência de AV, proporcionou um aumento na produção de lacase por *B. rhodina* MAMB-05 (GIESE et al., 2004). Isso pode ser explicado porque esse surfactante é não-iônico, pouco tóxico para as membranas biológicas e é constituído por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol, que estimula a secreção de proteínas em microrganismos além de alterar a morfologia e a superfície da parede celular de fungos (STUTZENBERGER, 1992; DOMINGUES et al., 2000).

Em 2003, Barbosa e colaboradores caracterizaram um exopolissacarídeo (EPS) secretado pelo *Botryosphaeria rhodina* como uma β -(1-3; 1-6)-glucana, denominado botriosferana. No intuito de aumentar a produção do EPS, alguns parâmetros de cultivo foram estudados, como a suplementação do meio de cultivo com diferentes fontes de carbono. Alguns resultados preliminares, otimizados por MSR, mostraram que a adição de óleo de soja e Tween 80 ao meio de cultivo aumentou a produção de EPS, indicando a possibilidade de o *B. rhodina* MAMB-05 ser lipolítico, embora elevadas concentrações de glucose tenham sido utilizadas como fonte de carbono para a produção da beta-glucana (SILVA et al., 2007).

Em 2007, Dekker e colaboradores utilizaram uma mistura de óleo de soja (1% v v⁻¹) e glucose 1% (m v⁻¹) como fonte de carbono no mínimo de Vogel (1956) e constataram a produção de lacases e biomassa do ascomiceto *B. rhodina* MAMB-05. Observaram um aumento significativo na produção de biomassa fúngica (21,88 ± 1,11 g L⁻¹) em relação aos cultivos com apenas glucose (6,25 ± 0,51 g L⁻¹). Houve um aumento da produção de lacase em óleo de soja (1,74 ± 0,09 U mL⁻¹) quando comparado ao controle com glucose (0,36 ± 0,15 U mL⁻¹). Esse trabalho sugeriu que a produção de lacase pelo *B. rhodina* MAMB-05 poderia ser otimizada utilizando-se o óleo de soja como fonte única de carbono.

3.8 ASPECTOS GERAIS DOS ÓLEOS VEGETAIS: A UTILIZAÇÃO DE ÓLEO DE SOJA COMO FONTE DE CARBONO PARA A PRODUÇÃO DE LACASES E LIPASES

Até o presente, nenhum artigo na literatura nacional e internacional descreveu a produção de lacases, e mesmo de lipase, por *B. rhodina* MAMB-05 utilizando-se óleo de soja como única fonte de carbono em uma condição otimizada.

Como foi descrito no item 3.4.1, os microrganismos armazenam energia para manutenção de suas células, e conseqüente crescimento e reprodução, através de diversas vias metabólicas. As fontes de energia são incorporadas por assimilação dos elementos do meio de cultivo, para serem utilizados nas distintas vias metabólicas (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004). Os óleos vegetais, que são compostos lipídicos conhecidos como triacilgliceróis, podem ser utilizados como tais fontes de energia. Para que o fungo possa obter energia através de lipídios é necessário que a ação metabólica do fungo possa degradar tais compostos. Para que isso ocorra é preciso que o fungo seja produtor de uma enzima hidrolase denominada lipase, responsável pela lise dos triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol que, depois da quebra, são degradados em suas respectivas vias metabólicas. A via metabólica para os ácidos graxos é conhecida como β-oxidação (SILVA, 2007).

Zhang e colaboradores (2002) investigaram e propuseram que as lacases estão envolvidas na degradação de alguns triglicerídeos como a trilinoleína

e metil linoleato. Os resultados apresentados mostraram que 20-35% dos triglicerídeos apresentaram degradação após três horas de reação

Um dos óleos vegetais mais conhecidos e utilizados, seja na indústria alimentícia ou nos diversos campos da ciência, é o óleo de soja. Isso se deve, em grande parte, à sua composição que determina o seu valor nutricional, sabor e propriedades físicas. Uma relação 4:1 entre ácidos graxos poliinsaturados e saturados é considerada ideal para um óleo de boa qualidade (CAMPOS, M. M., 1979).

Segundo Moretto e Alves (1986), a maior parte do óleo de soja é composta por gordura insaturada. Ácidos graxos poliinsaturados (ácido linolênico e linoléico), monoinsaturados (ácido oléico) e saturados (ácido palmítico e esteárico) correspondem, em média, a 60%, 25% e 15%, respectivamente. O ácido linolênico (componente da fração poliinsaturada do óleo), que corresponde, em média, a 7% da composição do óleo, é um ácido graxo ômega-3. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos alifáticos de cadeias longas, encontrados em gorduras e óleos naturais. Podem ou não apresentar ligações duplas entre as moléculas de carbono, sendo classificados como saturados (nenhuma ligação dupla) ou insaturados (com ligações duplas). Os ácidos graxos saturados podem ser monoinsaturados (apenas uma ligação dupla) ou poliinsaturados (mais de uma ligação dupla). A Tabela 4 apresenta a composição nominal do óleo de soja Liza[®].

Tabela 4 – Composição do óleo de soja Liza[®].

Informação Nutricional (porção 15 mL)		
Quantidade por porção		% VD*
Valor calórico	120 kcal	5
Carboidratos	0 g	0
Proteínas	0 g	0
Gordura total	14 g	17
Gorduras saturadas	2 g	8
Gorduras monoinsaturadas	4 g	-
Gorduras poliinsaturadas	8 g	-
Colesterol	0 mg	0
Sódio	0 mg	0
Vitamina E	2 mg	20% IDR**

(*) Valores diários com base em uma dieta de 2000 kcal

(**) Ingestão diária recomendada

Ingredientes – Óleo de soja refinado, conservante ácido cítrico

A utilização de óleo de soja como fonte de carbono para o crescimento fúngico e conseqüente produção de lacase e lipase é bastante restrita na literatura e sua aplicação contribuirá para pesquisas acerca da produção, propriedades e aplicações das respectivas enzimas produzidas por *B. rhodina* MAMB-05, assim como no desenvolvimento de novos processos biotecnológicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi realizada nos laboratórios de Pesquisa do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina e no laboratório BIOTECLAB do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.1 REAGENTES

O óleo vegetal utilizado foi o óleo de soja da marca Liza – Cargill do Brasil, embalado em frasco de polietileno, sem conservantes.

A milhocina®, utilizada como fonte orgânica de nitrogênio, foi doada gentilmente pela *Corn Products* Brasil (Mogi Guaçu – SP).

Os demais reagentes foram de grau analítico provenientes da *Aldrich, Fluka, Merck, Quimfar, Sigma* e *Synth*.

4.2 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, isolado de cancro de eucalipto por Barbosa e colaboradores (1995) e identificado por Garcia et al. (2004).

4.2.1 Manutenção do Microrganismo

O *B. rhodina* MAMB-05 foi mantido em tubos de ensaio inclinados, contendo meio sólido de Batata-Dextrose-Ágar (BDA), a uma temperatura de $4 \pm$

2°C e repicados periodicamente (DEKKER; BARBOSA, 2001). Para a manutenção permanente destas cepas foi utilizado o Método de Castellani (CASTELLANI, 1967).

4.3 MEIOS DE CULTIVO

Os meios de cultivo utilizados na prática cotidiana laboratorial estão descritos abaixo:

4.3.1 Meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

Batata	20g
Dextrose	2g
Ágar	1,5g
Água destilada q.s.p.	100 mL

4.3.2 Meio Mínimo de Vogel (VOGEL, 1956)

O meio mínimo de Vogel (1956) foi utilizado como meio basal para o desenvolvimento dos cultivos. Para o seu preparo foram dissolvidos em 750mL de água destilada, sucessivamente e com agitação constante à temperatura ambiente, os seguintes reagentes:

Citrato de Na.5H ₂ O	150 g
KH ₂ PO ₄ anidro	250 g
NH ₄ NO ₃ anidro	100 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	10 g

CaCl ₂ .2 H ₂ O	5 g
Elementos traços	5 mL
Solução de Biotina	2,5 mL

Solução de elementos traços foi constituída de:

Ácido cítrico.H ₂ O	5 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5 g
Fe (NH ₄) (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	1 g
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,25 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,25 g
H ₃ BO ₃ anidro	0,05 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,05 g

O volume final da solução de elementos traços foi ajustado para 100 mL. A solução de biotina foi preparada dissolvendo-se 5 mg de biotina (Merck) em 50 mL de água destilada. O volume final foi completado para 1L. Para o uso, este meio foi diluído 50 vezes em água destilada. Nessas condições, o pH final desse meio encontra-se na faixa entre 5,8 e 6,0.

4.3.3 Meio de Vogel (VOGEL, 1956) – Glucose – Ágar (VGA)

Para a produção dos inóculos foi utilizado o meio de VGA de acordo com Vasconcelos et al. (2001):

Meio mínimo de Vogel (1956) (concentrado)	2 mL
Glucose	1g
Ágar	2g
Água destilada	100 mL

4.4 ESTUDOS PRELIMINARES PARA A PRODUÇÃO DE LACASE EM ÓLEO DE SOJA E GLICEROL

Para investigar a ação indutora do óleo de soja e do glicerol na produção da lacase por *B. rhodina* MAMB-05 foi desenvolvido um experimento nas seguintes condições estabelecidas: temperatura $28 \pm 2^\circ\text{C}$; agitação 180 rpm*; pH inicial 6; tempo cultivo 120 horas.

Os cultivos foram desenvolvidos sob condição de fermentação submersa, em triplicata, em frascos de *Erlenmeyer* de 125 mL modificados (DEKKER; BARBOSA, 2001), contendo 25 mL de meio, mantendo-se a proporção ar:meio (5:1). Foi utilizado o meio basal de Vogel (1956). Em um primeiro experimento, foi avaliada uma mistura de glucose (10 g L^{-1}) e óleo de soja 0,5% (v v^{-1}) adicionados ao meio basal. Também foram paralelamente desenvolvidos dois cultivos-controle: o primeiro, com glucose adicionada ao meio de Vogel (1956), e o segundo, com somente óleo de soja, suplementando o meio de Vogel (1956). Em um segundo experimento, os cultivos continham glucose (10 g L^{-1}), glicerol 1% (v v^{-1}), e o meio basal de Vogel. Assim como no experimento anterior, cultivos somente na presença de glucose e de glicerol foram realizados.

4.5 PREPARO DOS MEIOS E CULTIVO DO *B. RHODINA* MAMB-05

Os cultivos para avaliar a produção de lacase, em escala de frascos, foram desenvolvidos em triplicata, em frascos de *Erlenmeyer* de 125 mL modificados, tendo quatro inserções em sua parede (DEKKER; BARBOSA, 2001), conforme mostra a Figura 7, guardando-se a proporção ar:meio (5:1). Foi utilizado o meio basal de Vogel (1956) suplementado com óleo de soja nas seguintes concentrações de óleo de soja (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; e 2% (v v^{-1})). Todos os frascos foram mantidos a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ em incubadora orbital a 180 rpm por cinco dias.

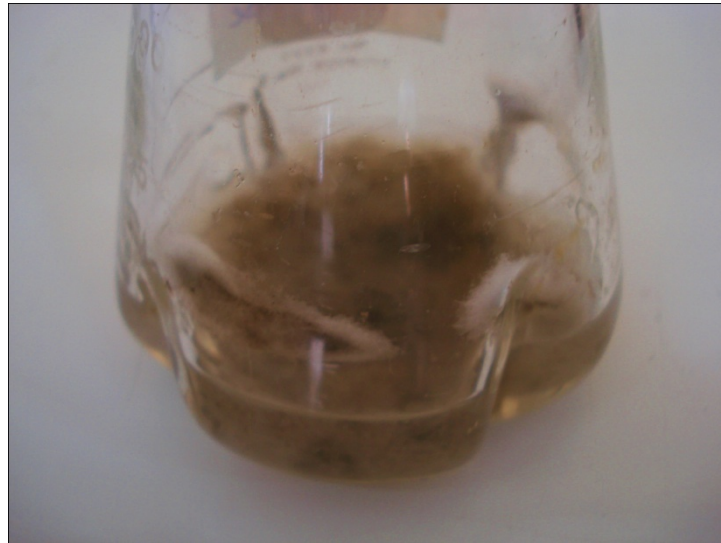


Figura 7 – Frasco de *Erlenmeyer* com quatro inserções na parede modificado por um vidreiro.

4.5.1 O Inóculo

Hifas do ascomiceto *B. rhodina* foram transferidas dos tubos de ensaio de manutenção para placas de Petri contendo meio de VGA, descrito no item 4.4.3. As placas foram incubadas durante cinco dias a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ conforme descrito por Dekker; Barbosa (2001). O inóculo constituiu-se de quatro esferas de 0,7 cm de diâmetro, retiradas de placas distintas contendo hifas homogeneamente distribuídas do respectivo microrganismo, as quais foram transferidas assepticamente para frascos contendo meio de cultivo líquido.

4.5.2 Interrupção dos cultivos

As culturas foram interrompidas através de centrifugação por 15 minutos a $2236 \times g$, a $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Os sobrenadantes foram filtrados em lã de vidro, e coletados em tubos tipo *Falcon* em banho de gelo, e posteriormente utilizados para as determinações analíticas e pH..

A biomassa micelial recuperada após a centrifugação foi lavada três vezes com água destilada, para remoção do óleo residual e, em seguida, determinada por gravimetria a 70°C até peso constante.

4.6 PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA LACASE PRODUZIDA POR *B. RHODINA* MAMB-05 EM ÓLEO DE SOJA

Após a escolha da melhor concentração de óleo de soja para a produção de lacase, um estudo para se estabelecer o pH ótimo, temperatura, especificidade do substrato e estabilidade da enzima em relação ao tempo foi realizado.

4.6.1 pH e Temperatura Ótimos

O extrato enzimático foi utilizado nos estudos de caracterização da enzima. O sobrenadante dos cultivos foi incubado nos diferentes tampões: KCl-HCl 50mM (pH 1,0-2,0), citrato-fosfato 50mM (pH 3,0-7,0), fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0-8,0), e glicina-NaOH 50mM (pH 8,0-11,0) a 30°C; e em várias temperaturas (30° - 65°C) no pH ótimo. Uma curva de pHs foi estabelecida analisando-se os seguintes valores 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0 e 9,0. A curva de temperatura foi construída determinando-se a atividade enzimática nas temperaturas de 30, 40, 45, 50, 55, 60 e 65°C. Até esta fase, todos os ensaios enzimáticos foram conduzidos utilizando-se a metodologia empregada por Dekker et al. (2007).

4.6.2 Determinação da Especificidade do Substrato

A atividade da lacase foi determinada utilizando-se dois substratos sintéticos: o 2,2¹-azino-bis ácido (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)(ABTS); e o 2,6-dimetoxifenol (DMP), em diferentes tampões e temperaturas (VASCONCELOS et al. (2000).

4.6.3 Determinação da Estabilidade da Lacase Frente ao Congelamento e Descongelamento Seqüencial

A estabilidade da lacase foi determinada nos extratos enzimáticos da seguinte forma: alíquotas de 5 mL foram armazenadas após a interrupção de um cultivo, essas amostras foram congeladas em frascos âmbar e a cada período de 24 horas uma das alíquotas era descongelada para que se determinasse a atividade enzimática, repetindo-se o procedimento até completar 144 horas.

4.7 AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DAS FONTES DE NITROGÊNIO, FOSFATO E ÍONS Cu^{2+} NA PRODUÇÃO DE LACASE

A fonte de nitrogênio do meio mínimo de Vogel (1956) foi substituída por fontes inorgânicas e orgânicas. Quando essas fontes foram orgânicas, realizaram-se determinações de açúcares totais e redutores.

Os cultivos líquidos foram realizados de acordo com o item 4.5, em triplicata, na presença da melhor concentração de óleo de soja como única fonte de carbono.

4.7.1 Efeito da Fonte de Nitrogênio

Os cultivos foram realizados, substituindo-se a fonte de nitrogênio do meio mínimo de Vogel (1956) por sais inorgânicos, tais como NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 na concentração original do meio basal e por fontes orgânicas como extrato de levedura, peptona, uréia e milhocina[®] também nas mesmas concentrações originais (100 g L^{-1}). A milhocina[®] foi utilizada na forma de suspensão baseado na metodologia de Messias (2008). Um experimento sem a presença de fonte de nitrogênio foi desenvolvido como controle.

4.7.2 Efeito da Fonte de Fosfato

O efeito da concentração de fosfato na produção de lacase pelo *B. rhodina* MAMB-05 foi avaliado tanto na presença da fonte original do meio mínimo de Vogel (1956) KH_2PO_4 , quanto a substituindo por K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , ou Na_2HPO_4 . Um cultivo na ausência de fonte de fosfato também foi realizado como controle.

4.7.3 Efeito da Concentração de Íons Cu^{2+}

Para avaliar o efeito da concentração de íons cobre na produção de lacase, foram analisadas diferentes concentrações (0; 12,5; 25; 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) de íons Cu^{2+} adicionadas ao meio de cultivo, utilizando como fonte de íons Cu^{2+} o composto $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

4.8 PLANEJAMENTO FATORIAL: O ESTUDO DA PRODUÇÃO DA LACASE

Selecionadas as variáveis que mais influenciaram a produção de lacase, ou seja, a fonte de nitrogênio, a fonte de fosfato e a concentração de íons Cu^{2+} , os parâmetros para aumentar a produção da lacase foram estudados através de um planejamento composto central (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

Um delineamento fatorial para três variáveis em dois níveis (2^3 pontos fatoriais) foi empregado para a obtenção das condições ótimas de produção da lacase em óleo de soja. As variáveis e os respectivos valores codificados e decodificados, para os vários níveis, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Variáveis do meio de cultivo para a produção de lacase e respectivos níveis utilizados no Planejamento Composto Central 2^3 (PCC).

EXPERIMENTOS	VARIÁVEIS EM NÍVEIS CODIFICADOS		
	A	B	C
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	+1,68	0	0
10	-1,68	0	0
11	0	-1(*)	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	+1,68
14	0	0	-1,68
15 (0)	0	0	0
16 (0)	0	0	0
17 (0)	0	0	0

Váriaveis	Variáveis em níveis decodificados				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
A ₁ [Cu ²⁺] (µg mL ⁻¹)	8	25	50	75	100
B ₁ [KH ₂ PO ₄] (g L ⁻¹)	0	0	125	250	335
C ₁ [NaNO ₃] (g L ⁻¹)	16	50	100	150	184

(*) - Não há concentração negativa por isso não se utilizou nenhuma concentração.

O planejamento, desenvolvido em duplicata, foi composto por 17 experimentos, sendo seis axiais (dois pontos axiais para cada variável) e três repetições no ponto central. Em cada caso a atividade da lacase foi determinada e os dados foram ajustados em um modelo polinomial de segunda ordem, conforme a equação (2) a seguir:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (2)$$

na qual Y é a variável de resposta desejada, β_0 a constante, β_i o coeficiente para o efeito linear, β_{ii} o coeficiente para o efeito quadrático, β_{ij} o coeficiente para o efeito de interação das variáveis, X_i e X_j representam os valores codificados das variáveis x_i e x_j . A equação quadrática descrita acima foi utilizada para a plotagem das superfícies de resposta para as variáveis.

Os diagramas de Pareto foram utilizados para facilitar a visualização dos efeitos principais e suas interações.

4.9 INVESTIGAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE EM BIORREADORES

A partir dos resultados da otimização da produção de lacase em frascos de Erlenmeyer quanto às concentrações de N, P e Cu, utilizou-se um biorreator de bancada de 2L Biostat[®] B. BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL.

O biorreator, apresentado na Figura 8, constitui-se de:

1. Camisa ou tanque com capacidade de 2L;
2. Sistema de agitação com duas pás associadas a um eixo central responsável pela frequência da agitação (rpm);
3. Sensores para controle do percentual de oxigênio dissolvido (a), temperatura (b) e pH (c);
4. Mangueira para retirada de amostra;

5. Entradas conectadas às mangueiras, acopladas a três bombas peristálticas para adição de ácidos, bases e anti-espumantes;
6. Entrada de ar ligada a uma mangueira, conectada a um filtro, para entrada de ar;
7. Controlador de fluxo de ar.

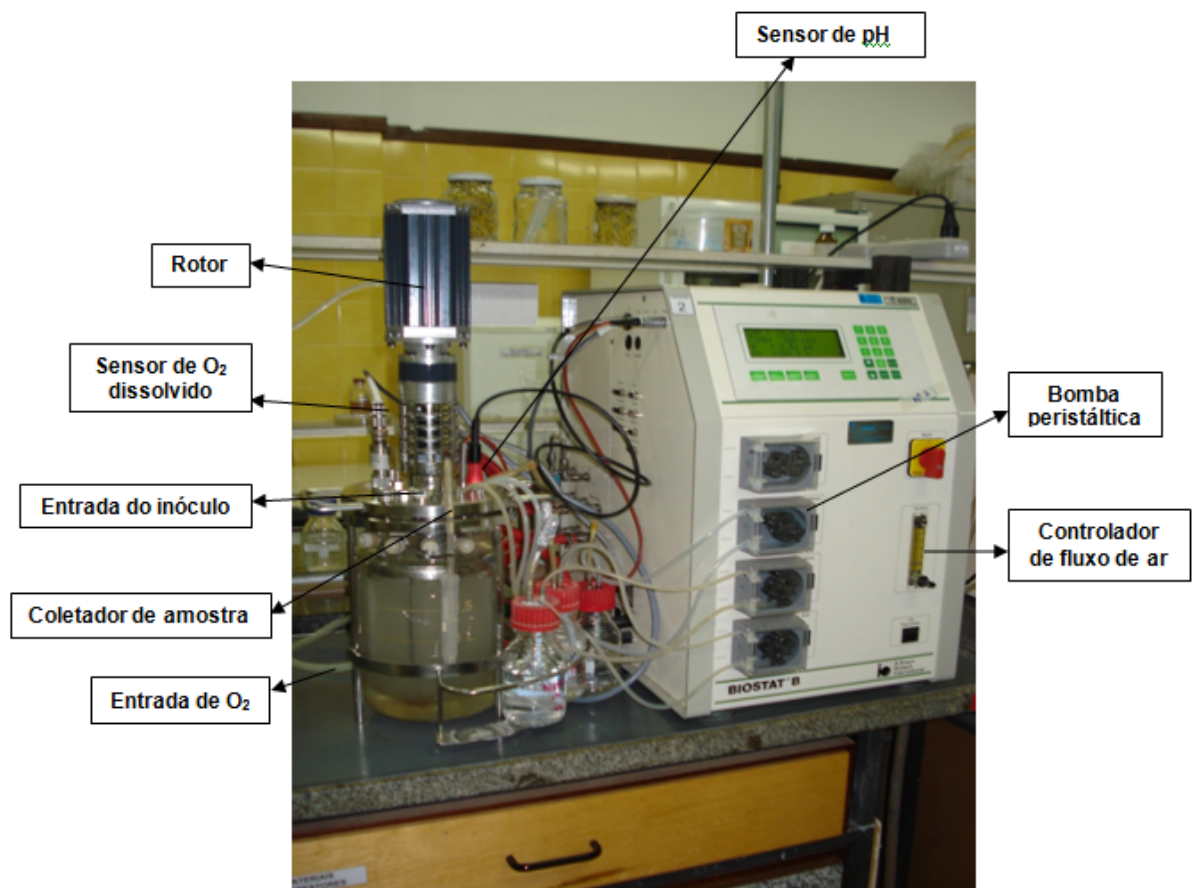


Figura 8 – Biorreator utilizado na produção de lacase por *B. rhodina* MAMB-05.

Não existiam registros na literatura de que o fungo ascomiceto *B. rhodina* MAMB-05 tenha sido cultivado em biorreatores. Portanto, alguns parâmetros para a produção de lacase por esse microrganismo foram investigados, na busca de se encontrar condições que favorecessem a produção desta polifenol oxidase.

4.9.1 Cultivos em Biorreatores

Quatro experimentos foram desenvolvidos para estabelecer condições que favoreceriam a produção da lacase por *B. rhodina* MAMB-05. Todos os cultivos foram realizados utilizando-se meio mínimo de Vogel (1956) modificado, como descrito no item 4.7, suplementado com óleo de soja como única fonte de carbono. As condições comuns para todos os quatro experimentos foram: a temperatura, mantida em 28 °C; a agitação, constante em 200 rpm; a aeração de 1 vvm; e tempo de cultivo de 168 horas. Previamente foi realizado um pré-inóculo, constituído de uma porção de hifas do *B. rhodina* MAMB-05, as quais foram transferidas do cultivo estoque para placas de Petri contendo o meio VGA. As placas foram incubadas por um período de 5 dias a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Após esse período, 20 esferas de 0,7 cm de diâmetro foram adicionadas a um frasco de *Erlenmeyer* de 1L contendo meio mínimo de Vogel (1957) modificado e glucose (10 g L^{-1}). O pré-inóculo foi mantido sob cultivo estático em estufa de crescimento por 5 dias a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.9.2 Experimento 1

Para o desenvolvimento deste cultivo os parâmetros pH e Inóculo foram as variáveis investigadas quanto às suas possíveis influências sobre a produção de lacase. Para o inóculo, o micélio do pré-inóculo foi retirado do frasco de *Erlenmeyer*, lavado assepticamente, com água destilada estéril. A partir desse micélio lavado, 20 esferas de 0,7 cm de diâmetro foram retiradas e adicionadas assepticamente ao biorreator. O pH não foi controlado.

Para as determinações analíticas e enzimáticas, alíquotas de 12 mL foram coletadas a cada intervalo de 24 horas, iniciando-se a contagem a partir do inóculo (coleta da primeira amostra). O experimento foi mantido ativo por um período de 168 horas.

4.9.3 Experimento 2

Um segundo cultivo foi desenvolvido para a avaliação da produção da lacase quando o pH do meio foi controlado em 6, durante as 168 horas de cultivo.

4.9.4 Experimento 3

O pH e Inóculo foram novamente as variáveis investigadas quanto às suas possíveis influências sobre a produção da lacase. Após o cultivo do pré-inóculo, todo o micélio fúngico foi homogeneizado em um liquidificador previamente esterilizado e uma alíquota deste homogeinato foi analisada no microscópio óptico para constatar a presença de células íntegras.

O homogeinato foi transferido para tubos de centrifuga estéreis, e centrifugados por um período de 15 minutos a 2236 x g a 4°C. O precipitado foi ressuscitado em uma solução fisiológica de NaCl 0,9% (m v⁻¹) estéril. A suspensão homogeneizada de micélio foi diluída adequadamente até se obter a densidade óptica entre 0,4 e 0,5 a 400 nm, conforme descrito por Barbosa et al. (2003). Esta solução diluída continha, aproximadamente, de 200 a 260 µg de micélio seco por mL de suspensão de micélio. O inóculo (20 mL) desta solução padronizada de hifas fúngicas foi adicionado ao meio de cultivo esterilizado, no biorreator de 2L. Portanto, o inóculo constituiu-se de 1% (v v⁻¹) de uma solução padronizada de hifas fúngicas. O pH do cultivo foi mantido constante em 6.

No último dia de cultivo todo o conteúdo do biorreator foi filtrado e lavado exaustivamente, para retirada do óleo residual, com água destilada para estimar a biomassa fúngica por peso seco. A estimativa da biomassa foi realizada juntamente com a retirada das alíquotas diárias do extrato enzimático.

4.9.5 Experimento 4

Um quarto experimento foi realizado também tendo o inóculo e o pH como variáveis. Após o pré-inóculo, 4 esferas de 0,7 cm de diâmetro foram transferidas para frascos de Erlenmeyer (125 mL), modificados, contendo meio mínimo de Vogel (1956) já otimizado. O inóculo foi mantido sob agitação constante em incubadora orbital durante 48 horas a $28\pm 2^\circ\text{C}$ e 180 rpm (BARBOSA et al., 2003). Após esse período de crescimento, as 4 esferas utilizadas foram retiradas e uma alíquota de 20 mL deste meio de cultivo, contendo hifas fúngicas, foi adicionado ao biorreator, junto do óleo de soja em 1% ($v v^{-1}$) como fonte de carbono.

4.10 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.10.1 Determinação de Proteínas Totais

As proteínas extracelulares foram determinadas pelo método de Hartree (1972), que é o método modificado de Lowry et al. (1961). O princípio do método baseia-se em duas etapas, na primeira a proteína reage com o reativo cupro-alcálico, formando um complexo. Na segunda etapa ocorre a redução dos sais de fosfomolibdato e fosfotungstato do reativo de Folin Ciocalteu pela tirosina presente nas moléculas protéicas. Para a quantificação das proteínas totais, construiu-se uma curva de calibração utilizando-se como padrão soro albumina bovina ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$). As leituras das amostras foram realizadas a 650 nm.

4.10.2 Determinação dos Açúcares Redutores e Totais

A determinação quantitativa de açúcares redutores foi realizada pelo método de Somogyi (1954) e Nelson (1944). O método baseia-se na reação que ocorre entre as extremidades redutoras dos açúcares presentes no filtrado, ou seja, as moléculas de glicose que reduzem o reativo cupro-alcálico de Somogyi, resultando em óxido cuproso. Este, em presença do reativo arsenomolibdídico de Nelson, forma um complexo de óxido de molibdênio de cor azul estável. A cor desenvolvida é proporcional à concentração de açúcares presentes e é estável por várias horas. O padrão utilizado para construção da curva de calibração foi glucose 1 g L^{-1} . As leituras das amostras foram feitas a 540 nm.

Os açúcares totais foram determinados pelo método do Fenol-Ácido Sulfúrico, conforme Dubois et al. (1956). O método é baseado na reação de desidratação, a qual ocorre com as pentoses e hexoses, convertendo-as em furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente, que reagem com o fenol, formando um complexo colorido alaranjado. Esse complexo, quando envolve pentoses, absorve na região espectral de 480 nm, já quando envolve hexoses, absorve em um comprimento de onda de 490 nm. O padrão utilizado nas dosagens dos açúcares foi glucose $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.10.3 Determinação da Biomassa Microbiana

A biomassa fúngica foi estimada por gravimetria, através de secagem em estufa a 70°C até peso constante. O método baseia-se na retenção da biomassa em papel de filtro, previamente dessecado e pesado. A biomassa retida no papel foi lavada com água destilada inúmeras vezes para a remoção do óleo residual. Após essa fase, o conjunto foi colocado em estufa de secagem até obtenção de peso constante. Para encontrar o peso seco do micélio calculou-se a diferença do peso do papel e do peso total dos sólidos com o filtro.

4.10.4 Determinação da Atividade de Lacase sobre ABTS

A atividade enzimática da lacase foi determinada espectrofotometricamente, utilizando-se o ABTS como substrato, conforme descrito por Barbosa; Dekker; Hardy (1996). O volume final do ensaio enzimático foi de 1 mL, e o sistema de incubação continha 50 μ L de ABTS (50 mM em água deionizada), 150 μ L de tampão McIlvaine (pH 3,0 - 120 mM), solução enzimática (0,1 a 0,8 mL) e água deionizada para completar o volume, se necessário. Este ensaio foi incubado durante 5 minutos em banho-Maria termostaticado a 50°C. As leituras foram desenvolvidas a 420 nm ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A unidade de atividade da lacase é definida como o número de μ mol de ABTS oxidado por minuto por mL de extrato enzimático, nas condições descritas.

4.10.5 Determinação da Atividade de Lacase sobre DMP

A atividade enzimática da lacase também foi determinada espectrofotometricamente, utilizando-se o DMP como substrato, conforme descrito por Barbosa; Dekker; Hardy (1996). O volume final do ensaio enzimático foi de 1 mL, e o sistema de incubação continha 150 μ L de DMP (10 mM em água deionizada), 150 μ L de tampão McIlvaine (pH 6,5 - 120 mM), solução enzimática (0,1 mL) e água deionizada para completar o volume. Este ensaio foi incubado durante 5 minutos em banho-Maria termostaticado a 45°C. O comprimento de onda utilizado foi 468 nm ($\epsilon = 10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A unidade de atividade da lacase é definida como o número de μ mol de DMP oxidado por minuto por mL da solução de enzima nas condições descritas.

4.10.6 Determinação da Atividade de Lipase

A atividade enzimática da lipase foi determinada através de espectrofotometria, baseado na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP), em pH 8, 55°C por 2 minutos. Este método foi descrito inicialmente por Winkler e Stukamm (1979), e modificado por Lima et al. (2004). O método consiste na hidrólise do *p*NPP pela lipase, em meio aquoso contendo o surfactante Triton X-100. A liberação do *p*-nitrofenol, de coloração amarela, foi observada em um comprimento de onda de 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a liberação de 1 μmol de *p*NP (*p*-nitrofenol) por minuto por mL da solução enzimática. Para relacionar a concentração do produto com a absorbância da leitura foi utilizado o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 1,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Procedimento experimental:

- Solução A: palmitato de *p*-nitrofenila em isopropanol, em uma concentração de 3,0 mg/mL.
- Solução B: 2 g de Triton X-100 dissolvidos em 450 mL de tampão Fosfato 0,05 mol/L, pH 8,0.

Foi adicionado, lentamente e sob agitação contínua, 1 mL da solução A em 10 mL da solução B. A mistura reativa foi realizada imediatamente antes da determinação da atividade, pois o substrato é instável quando em meio aquoso. Para o início da reação, 0,9 mL da mistura foi adicionada em um tubo de ensaio juntamente com 0,1 mL do extrato enzimático, em banho-Maria a 55°C por 2 min. Após o tempo da reação, a leitura da absorbância foi realizada em um comprimento de onda igual a 410 nm.

4.11 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram realizados pela análise de variância (ANOVA). As análises foram discurridas ao nível de significância de 95% ($p < 0,05$), com o auxílio do programa *GraphPad Prism* versão 4.0. As análises referentes à metodologia de superfície de resposta foram realizadas com o programa *Statistic* (Statsoft Inc.) versão 6.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA LACASE PRODUZIDA POR *B. RHODINA* MAMB-05 NA PRESENÇA DE ÓLEO DE SOJA COMO FONTE DE CARBONO

Vários substratos têm sido relatados para determinar a atividade de lacase, tais como guaiacol, seringaldazina, *o*-dianizidina, ABTS (2,2¹ – azino-bis-ácido – (3 – etilbenzotiazolina – 6 – sulfônico)), DMP (2,6 – dimetoxifenol), entre outros. Entretanto, os dois últimos citados têm sido os mais descritos nos artigos científicos, sendo também os utilizados neste trabalho.

A atividade da lacase pelo *B. rhodina* MAMB-05 produzida em óleo foi $0,44 \pm 0,02$ U mL⁻¹, quando determinada pelo substrato sintético ABTS, e $0,04 \pm 0,005$ U mL⁻¹, quando na presença do DMP. A análise de variância mostrou que existe diferença significativa ($p < 0,05$) entre os substratos analisados a 5% de probabilidade, portanto para os experimentos subseqüentes padronizou-se o substrato ABTS para a determinação da atividade da lacase.

Cunha e colaboradores (2003) avaliaram a atividade da lacase produzida em diferentes fontes de carbono por *Botryosphaeria* sp., tanto em ABTS, quanto em DMP. Em todas as fontes utilizadas a atividade da enzima sobre o ABTS foi maior do que a atividade sobre o substrato DMP. Rezende e colaboradores (2005) investigaram a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* na presença do herbicida Scepter[®] e utilizaram ambos os substratos sintéticos citados. Nesse caso, a atividade da lacase induzida pelo herbicida foi maior com o DMP (4,5 U mL⁻¹) do que com o ABTS (3 U mL⁻¹).

5.1.1 Efeito do pH e Temperatura na Atividade da Lacase de *B. rhodina* MAMB-05 Produzida em Óleo de Soja como Única Fonte de Carbono

Tanto Xu (1996) quanto Cunha e colaboradores (2003), apontam que as lacases possuem um amplo espectro de valores de pH para diferentes substratos. A Figura 9 apresenta o perfil de pH da lacase de *B. rhodina* MAMB-05 determinada com o substrato ABTS, indicando que o pH ótimo foi 3. Este resultado confirma os relatados de Dekker e Barbosa (2001), quanto ao valor de pH determinado para este substrato. O pH e temperatura ótimos da lacase de *B. rhodina* MAMB-05, produzida na presença de álcool veratrílico e glucose 1% ($m\ v^{-1}$) como fonte de carbono, foram determinadas previamente por Vasconcelos e colaboradores (2000). Para avaliar se o óleo de soja como fonte de carbono interfere nesses parâmetros, os mesmos foram determinados com a lacase produzida conforme descrito no item 4.6.2. Concluiu-se que fontes de carbono diferentes parecem não afetar a síntese da lacase, visto que o pH ótimo foi idêntico tanto para a lacase produzida em glucose e álcool veratrílico (Dekker e Barbosa, 2001) quanto a produzida em óleo de soja.

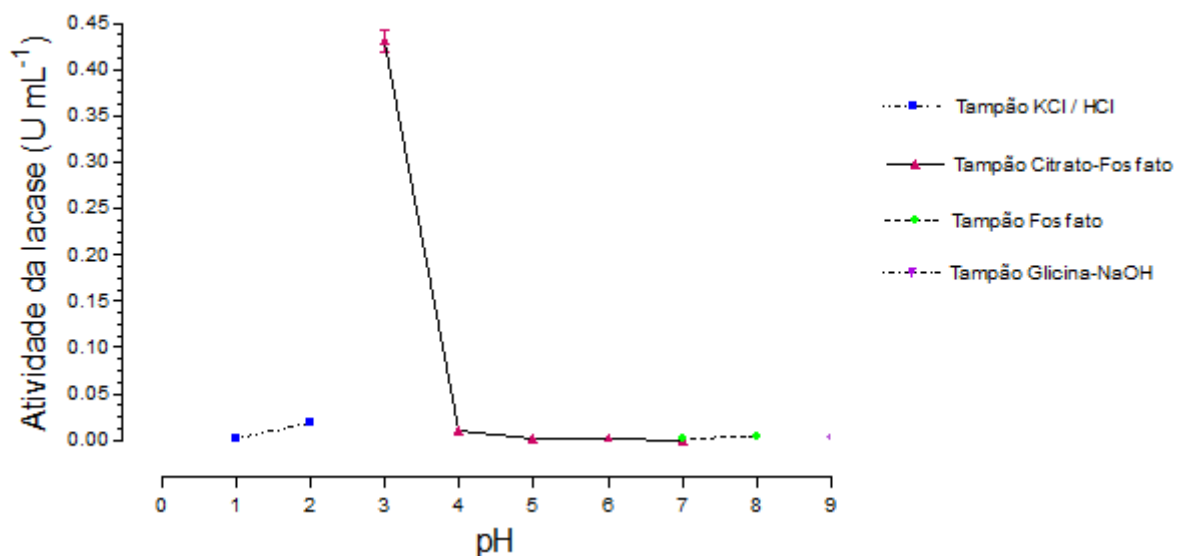


Figura 9 – pH ótimo para atividade da lacase em ABTS produzida por *B. rhodina* MAMB-05 utilizando óleo de soja como única fonte de carbono.

A Figura 10 compara o perfil de atividade da lacase de *B. rhodina* MAMB-05 em diferentes temperaturas, detectada com os substratos ABTS e DMP. Os valores de temperatura ideal foram 50°C e 45°C, respectivamente. Novamente, houve a confirmação dos resultados relatados por Dekker e Barbosa (2001), indicando a possibilidade de ser a mesma enzima produzida em diferentes fontes. A comprovação desta afirmação poderá ser obtida através de experimentos futuros de eletroforese e ou purificação desta polifenol oxidase obtida em diferentes fontes.

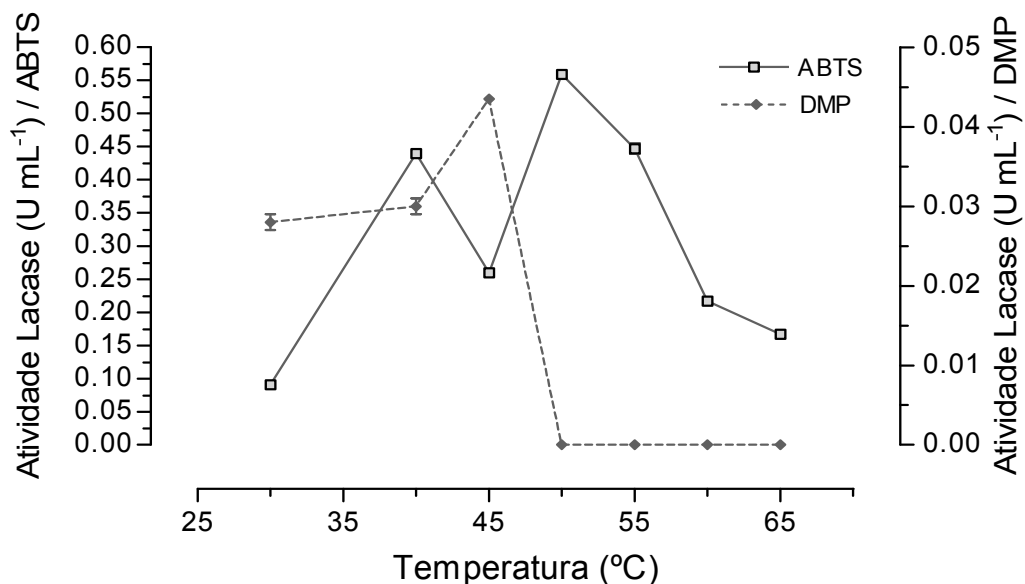


Figura 10 – Temperatura ótima para atividade da lacase de *B. rhodina* produzida em óleo de soja como única fonte de carbono tanto em ABTS como em DMP.

5.1.2 Determinação da Estabilidade da Lacase Frente ao Congelamento e Descongelamento Sequencial

As exoenzimas normalmente são mais estáveis do que as endoenzimas, visto que irão exercer atividade extracelularmente. Geralmente são glicoproteínas e a porção glicídica confere a elas maior estabilidade.

Várias exolacases fúngicas têm sido purificadas e apresentam diferentes concentrações de carboidratos participantes de sua estrutura química. As lacases do *B. rhodina* MAMB-05 ainda não foram purificadas até homogeneidade.

As determinações enzimáticas sempre foram desenvolvidas logo após a interrupção dos cultivos. As lacases de *B. rhodina* MAMB-05 produzidas em glucose como fonte única de carbono e álcool veratrílico também já foram congeladas e liofilizadas. Soluções preparadas com a enzima liofilizada sempre apresentaram atividade. Entretanto, ainda não era conhecido o grau de estabilidade da lacase de *B. rhodina* MAMB-05 produzida em óleo, depois de congelada e descongelada por várias vezes consecutivamente. A Figura 11 mostra o perfil dessa estabilidade durante sete dias consecutivos.

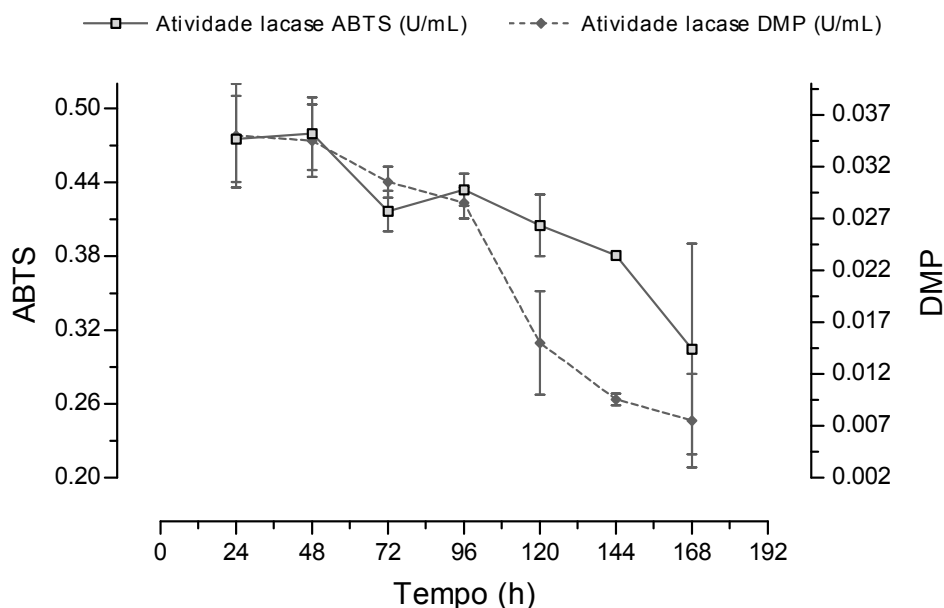


Figura 11 – Estabilidade da lacase produzida por *B. rhodina* MAMB-05 em óleo de soja como fonte única de carbono frente ao congelamento e descongelamento seqüencial.

As atividades de lacase foram determinadas tanto com ABTS quanto com DMP. Ao atingir 168 horas (7 dias) de congelamento e descongelamento, a atividade da lacase determinada com ABTS apresentou 64% de sua atividade mostrando maior estabilidade quando comparada com o substrato DMP que apresentou somente 21% de atividade.

Estes resultados sugerem a possibilidade de que a lacase detectada com ABTS seja diferente da detectada com DMP, sendo, possivelmente, isoenzimas. Entretanto, somente após a purificação até homogeneidade é que se poderá responder esta hipótese.

5.2 EFEITO DA ADIÇÃO DE ÓLEO DE SOJA E GLICEROL NA PRODUÇÃO DE LACASE PELO *B. RHODINA* MAMB-05

A utilização de óleo de soja como fonte de carbono no cultivo do *B. rhodina* MAMB-05, para a produção de lacase, deve-se ao fato de que esse óleo é produzido em grande escala no Brasil, sendo um substrato barato. Também tendo em vista o baixo custo, também foi testado o glicerol, que por ser um subproduto do processo de produção do biodiesel, seja por transesterificação, processo alcalino ou enzimático, vem sendo cada vez mais produzido desde que entrou em vigor no Brasil a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, que obriga que à matriz energética, ou seja, ao diesel comercial, sejam adicionados 5% de biodiesel (RANGANATHAN et al. 2008).

Com o objetivo de avaliar a produção de lacase pelo *B. rhodina* MAMB-05, cultivou-se o ascomiceto na presença de glucose 1% (m v⁻¹), óleo de soja 1% (v v⁻¹), glucose 1% (m v⁻¹) + óleo de soja 0,5% (v v⁻¹), glicerol 1% (v v⁻¹) e glucose 1% (m v⁻¹) + glicerol 1% (v v⁻¹), como suplemento ao meio mínimo de Vogel (1956).

Na Figura 12 estão apresentados os resultados referentes à produção de lacase pelo *B. rhodina* MAMB-05 nas diferentes fontes de carbono estudadas. Quando o microrganismo foi cultivado em glucose 1% (m v⁻¹), a atividade específica da lacase foi $1,22 \pm 0,03$ U mg⁻¹. Estes resultados confirmaram os relatos de Barbosa e colaboradores (1996) que classificaram a lacase como uma enzima constitutiva para este microrganismo. A produção de lacase na presença de óleo de soja 1% (v v⁻¹) ($2,91 \pm 0,03$ U mg⁻¹) e glicerol 1% (v v⁻¹) ($1,97 \pm 0,14$ U mg⁻¹) foi superior à atividade do cultivo contendo apenas glucose 1% (m v⁻¹) ($1,22 \pm 0,04$ U mg⁻¹), o que sugere a atuação positiva do óleo de soja e do glicerol no metabolismo

do *B. rhodina* MAMB-05, favorecendo a síntese da lacase. Rodríguez Couto e colaboradores (2006) estudaram a produção de lacase pelo fungo *Trametes hirsuta* e comprovaram que na presença de glicerol a atividade da lacase foi $19,4 \text{ U L}^{-1}$, enquanto que na presença de glucose diminuiu para $10,6 \text{ U L}^{-1}$. Esses autores concluíram que o glicerol como fonte de carbono também atuou positivamente na síntese da lacase.

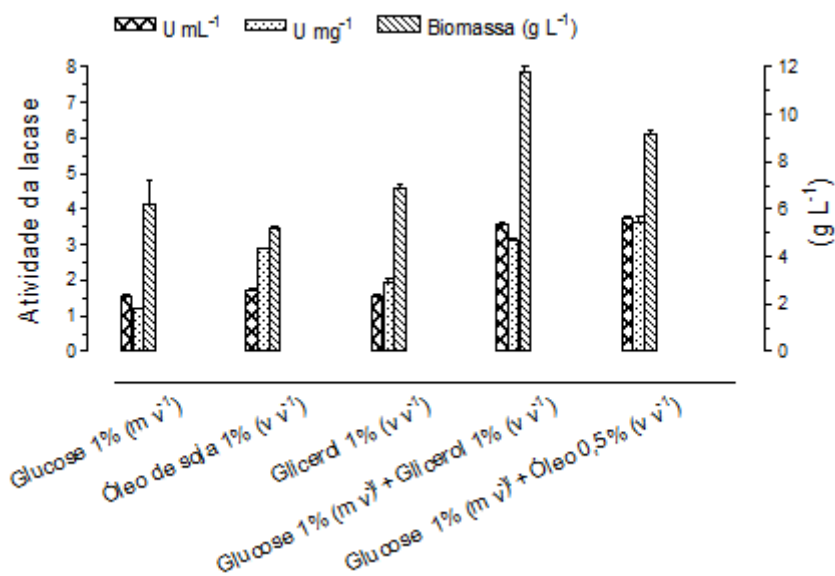


Figura 12 – Atividade específica da lacase e biomassa de *B. rhodina* MAMB-05 produzida em diferentes fontes de carbono.

A Figura 12 apresenta uma comparação da produção de biomassa nas diferentes fontes de carbono avaliadas. Não houve diferença entre os valores (aproximadamente 4 g L^{-1}) de biomassa nos cultivos que continham somente glucose ou glicerol, porém na presença da mistura glucose e glicerol houve um aumento de duas vezes o valor obtido apenas com glucose (8 g L^{-1}).

Os valores de pH final não sofreram nenhuma alteração em todos os cultivos, permanecendo em torno de 7 para todas as condições.

Comparando-se a produção de lacase por *B. rhodina* MAMB-05 tanto na presença de glicerol ($1,97 \pm 0,14 \text{ U mg}^{-1}$) quanto na de o óleo de soja ($2,91 \pm 0,03 \text{ U mg}^{-1}$), optou-se por dar continuidade nos experimentos subsequentes com

esta última fonte de carbono, por ter apresentado atividade mais significativa. Esse resultado confirma a afirmação de Dekker e colaboradores (2007), quando descreveram que o microrganismo *B. rhodina* MAMB-05 é capaz de crescer e produzir lacase em óleo de soja, como fonte de carbono, quando incorporado ao meio mínimo de Vogel (1956) contendo glucose 1% ($m v^{-1}$).

Considerando-se que o *B. rhodina* MAMB-05 produziu lacase quando cultivado em óleo de soja 1% ($v v^{-1}$) optou-se por avaliar diferentes concentrações desse óleo, em busca da melhor delas, conforme mostra a Figura 13.

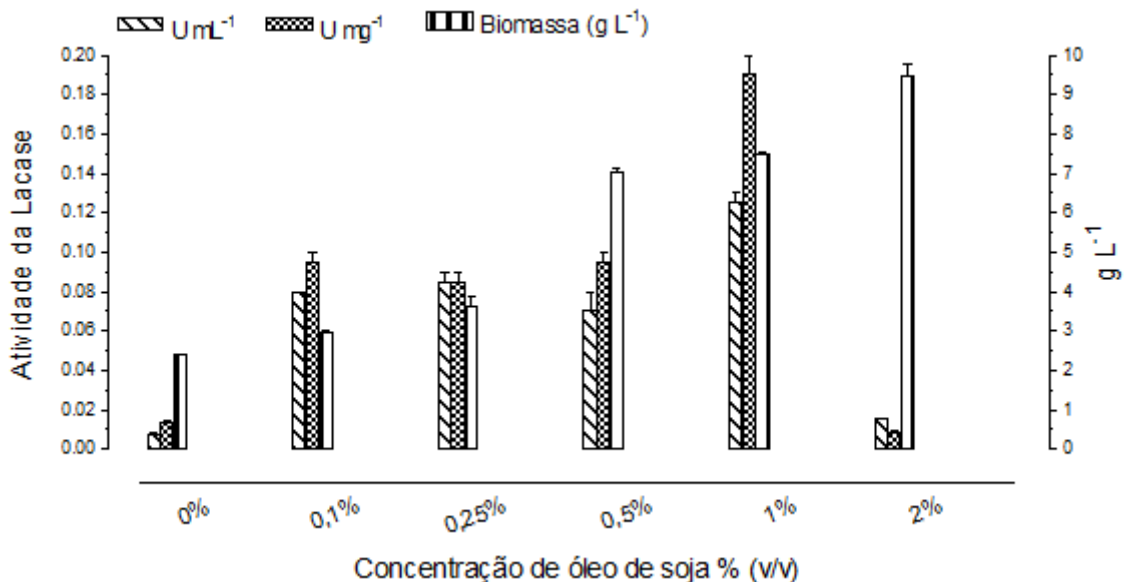


Figura 13 – Produção de lacase e biomassa por *B. rhodina* MAMB-05 em diferentes concentrações de óleo de soja.

A partir dos resultados apresentados na Figura 13, pode-se concluir que, dentre as concentrações investigadas, a melhor para a produção de lacase foi 1% ($v v^{-1}$) de óleo de soja ($0,19 \pm 0,01 U mg^{-1}$). Isso porque, em 2% ($v v^{-1}$) de óleo de soja a produção da lacase foi reprimida devido à elevada concentração de fonte de carbono, o que proporcionou um desvio metabólico para a produção de biomassa fúngica, maior ($9,56 \pm 0,63 g L^{-1}$) se comparada com as outras concentrações.

A Figura 14 mostra o perfil de produção de lacase por *B. rhodina* MAMB-05, em cultivos submersos, utilizando óleo de soja 1% ($v v^{-1}$) como única

fonte de carbono. A máxima produção foi obtida em 5 dias de cultivo (120 horas), detectada por ABTS ($0,48 \pm 0,004 \text{ U mL}^{-1}$) e por DMP ($0,04 \pm 0,007 \text{ U mL}^{-1}$).

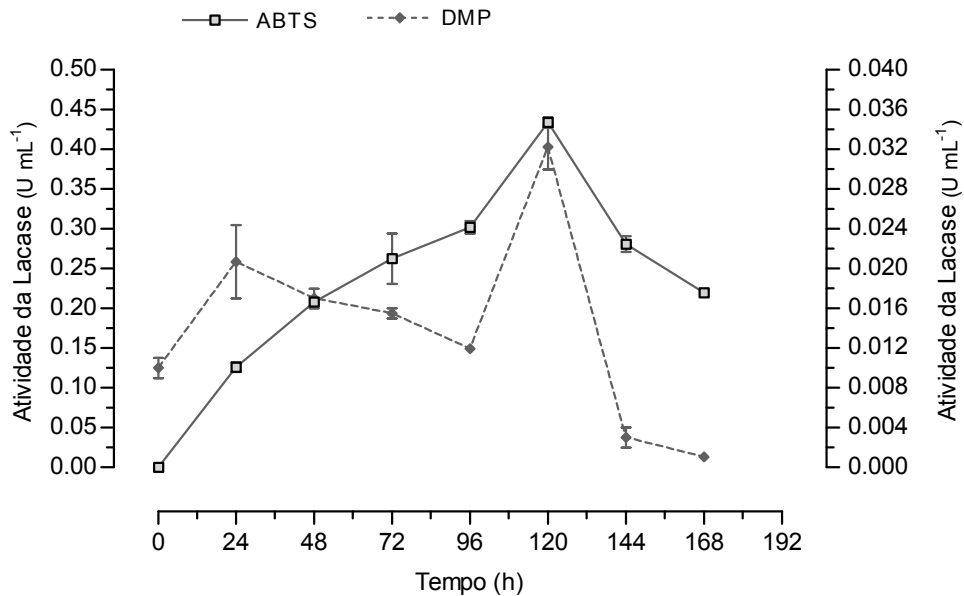


Figura 14 – Perfil da produção de lacase por *B. rhodina* MAMB-05 em meio de Vogel (1956) suplementado com 1% (v v^{-1}) de óleo de soja.

Estes resultados confirmaram os previamente obtidos por Vasconcelos e colaboradores (2000), embora tenham utilizado glucose como fonte de carbono e álcool veratrílico como indutor, cuja produção máxima de lacase ocorreu entre 96 e 120 horas.

5.3 EFEITOS DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO, FOSFATO E CONCENTRAÇÕES DE ÍONS Cu^{2+} NA PRODUÇÃO DA LACASE EM ÓLEO DE SOJA COMO FONTE DE CARBONO POR *B. RHODINA* MAMB-05

Fontes de nitrogênio, fosfato e concentração de cobre são parâmetros de cultivo que influenciam a síntese da lacase (Dekker et al., 2007). Entretanto, estes parâmetros parecem estar também vinculados à fonte de carbono utilizada. Objetivando-se avaliar os três parâmetros acima referidos, o *B. rhodina* MAMB-05 foi cultivado em óleo de soja variando-se as fontes de nitrogênio, fosfato e concentração de íons cobre.

5.3.1 Efeito de Diferentes Fontes de Nitrogênio Inorgânicas e Orgânicas na Produção de Lacase por *B. rhodina* MAMB-05 em Óleo de Soja como Única Fonte de Carbono

A Tabela 6 mostra os resultados da influência das diferentes fontes de nitrogênio avaliadas na produção de lacase por *B. rhodina* MAMB-05. As fontes estudadas foram, NH_4Cl , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 e, também, extrato de levedura, uréia, peptona e milhocina[®]. As fontes inorgânicas de nitrogênio exerceram uma influência maior na produção da lacase do que as fontes orgânicas. A maior atividade de lacase ($2,49 \text{ U mg}^{-1}$) foi detectada quando utilizou-se NaNO_3 como fonte de nitrogênio.

Resultados semelhantes foram obtidos por Dekker e colaboradores em 2007, mas utilizando glucose como fonte de carbono. Para o *B. rhodina* MAMB-05 cultivado em glucose com ou sem adição de álcool veratrílico, a melhor fonte de nitrogênio foi NH_4NO_3 , sugerindo que se variando a fonte de carbono, a fonte de nitrogênio também pode afetar a síntese da lacase positiva ou negativamente. Essa hipótese pode é endossada pelos estudos de Stajic e colaboradores (2006), que afirmaram que a assimilação de fontes de nitrogênio por microrganismos produtores de lacase varia para cada cepa e de acordo com a composição do meio de cultivo.

A produção da lacase por *B. rhodina* MAMB-05 em óleo de soja foi muito baixa em NH_4Cl como fonte de nitrogênio. De acordo com Dekker e colaboradores (2007), isso pode ter acontecido porque o íon cloreto exerce ação inibitória sobre a lacase, provavelmente através da interação do íon cloreto com o cobre que faz parte do sítio ativo da enzima.

Tabela 6 – Influência de fontes de nitrogênio na produção de lacase, pH final dos cultivos e biomassa produzida por *B. rhodina* MAMB-05.

Fontes de Nitrogênio	Atividade Volumétrica (U mL ⁻¹) ^a	Atividade Específica (U mg ⁻¹) ^a	pH Final ^b	Biomassa (g L ⁻¹) ^b	Açúcar total (mg mL ⁻¹) ^b	Açúcar Redutor (mg mL ⁻¹) ^b
Inorgânicas						
Sem nitrogênio	0,009 ± 0,001	0,25 ± 0,002	6,5	8,48	-	-
NH ₄ Cl	0,003 ± 0,000	0,02 ± 0,001	3,9	7,56	-	-
NaNO ₃	0,22 ± 0,007	2,49 ± 0,092	6,1	8,84	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,12 ± 0,010	1,46 ± 0,175	7,0	10,64	-	-
NH ₄ NO ₃	0,01 ± 0,000	0,05 ± 0,007	5,0	8,04	-	-
Orgânicas						
Extrato Levedura	0,323 ± 0,0110	0,993 ± 0,035	8,0	11,00	11,97	1,73
Uréia	0,0007 ± 0,0009	0,003 ± 0,001	8,4	8,96	8,54	1,40
Peptona	0,012 ± 0,0006	0,042 ± 0,002	7,3	8,68	13,26	1,93
Milhocina [®]	0,21 ± 0,02	1,73 ± 0,19	6,5	9,04	9,37	1,51

(a) – Média das triplicatas ± SD (b)- Média das triplicatas ***pH inicial de todos os cultivos = 6,0

5.3.2 Efeito de Fontes de Fosfato na Produção de Lacase por *B. rhodina* MAMB-05 em Óleo de Soja como Única Fonte de Carbono

Quatro fontes de fosfato foram avaliadas na produção de lacase por *B. rhodina* MAMB-05. Foram analisadas as fontes KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 e também a ausência de fosfato. Todas elas foram testadas na concentração da fonte original do meio mínimo de Vogel (1956). Os resultados desse experimento estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Influência de fontes de fosfato na produção de lacase por *B. rhodina* MAMB-05.

Fontes de Fosfato	Atividade Volumétrica (U mL ⁻¹) ^a	Atividade Específica (U mg ⁻¹) ^a	pH Final ^b	Biomassa (g L ⁻¹) ^b
S/ Fosfato	0,030 ± 0,005	0,21 ± 0,036	8,4	9,76
Na_2HPO_4	0,004 ± 0,000	0,02 ± 0,004	7,7	8,13
KH_2PO_4	0,250 ± 0,028	1,59 ± 0,070	6,6	6,12
NaH_2PO_4	0,006 ± 0,000	0,06 ± 0,004	6,5	4,43
K_2HPO_4	0,032 ± 0,003	0,20 ± 0,025	7,3	6,79

(a) – média de triplicatas ± SD

(b) – média de triplicatas

****pH inicial de todos os cultivos = 6,0

Os resultados indicaram que a fonte de fosfato original do meio mínimo de Vogel (1956), KH_2PO_4 , foi a melhor para a produção de lacase por *B. rhodina* MAMB-05 na presença de óleo de soja, quando comparada às outras fontes testadas ($p < 0,05$). A máxima atividade enzimática foi $0,25 \pm 0,028$ U mL⁻¹ e $1,59 \pm 0,07$ U mg⁻¹. Os dados apresentados na Tabela 7 mostraram que, na ausência da fonte de fosfato, a produção de biomassa foi afetada positivamente (9,76 g L⁻¹), quando comparada à fonte original do meio basal que contém como fonte de fosfato KH_2PO_4 (6,12 g L⁻¹), já na presença da fonte NaH_2PO_4 , a produção foi ligeiramente afetada repercutindo num decréscimo da quantidade de biomassa produzida (4,43 g L⁻¹).

De acordo com a literatura científica, não somente os resultados desta pesquisa mostram que a presença de KH_2PO_4 no meio de cultivo influencia positivamente a atividade da lacase. Cavallazzi, Oliveira e Kasuya (2004) estudaram a produção de lacases por *Lepista sordida* utilizando KH_2PO_4 como fonte de fosfato junto ao meio de cultivo. Seus resultados mostraram que, na presença dessa fonte, no sétimo dia de cultivo a atividade da lacase foi igual a 140 U L^{-1} , maior atividade enzimática encontrada quando comparada às outras fontes. Baseado nos resultados encontrados nesta pesquisa e nos resultados mostrados na literatura científica, a fonte escolhida para o estudo da produção de lacase através de um planejamento fatorial foi KH_2PO_4 .

5.3.3 Efeito da Concentração de Íons Cu^{2+} na Produção de Lacase por *B. rhodina* MAMB-05 em Óleo de Soja como Única Fonte de Carbono

Palmieri e colaboradores (2000) descreveram que íons cobre induzem a produção de lacase em *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus ostreatus*.

Com o objetivo de investigar a influência de diferentes concentrações de íons Cu^{2+} na produção de lacase por *B. rhodina* MAMB-05, um experimento foi desenvolvido utilizando as seguintes concentrações de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ no meio de cultivo 0; 12,5; 25; 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Na Tabela 8 estão presentes os valores das atividades de lacase volumétricas, específicas, pH final dos cultivos e biomassa.

Tabela 8 – Influência de diferentes concentrações de íons cobre na produção de lacase por *B. rhodina* MAMB-05.

Concentração de íons Cu ²⁺ (µg mL ⁻¹)	Atividade Volumétrica (U mL ⁻¹) ^a	Atividade Específica (U mg ⁻¹) ^a	pH ^b	Biomassa (g L ⁻¹) ^b
Sem cobre	0,26 ± 0,023	2,68 ± 0,301	6,2	6,02
12,5	1,33 ± 0,106	7,52 ± 0,177	6,3	6,23
25	2,76 ± 0,077	17,15 ± 3,02	6,1	6,01
50	2,74 ± 0,075	18,62 ± 0,36	6,2	5,35
100	1,85 ± 0,098	11,64 ± 0,048	6,1	4,87

(a)– Média de triplicatas ± SD (b) – Média de triplicatas

*** pH inicial de todos os cultivos = 6,0

A análise da Tabela 8 mostra que na ausência de cobre o ascomiceto *B. rhodina* MAMB-05 produz uma quantidade ínfima de lacase (0,26 ± 0,023 U mL⁻¹), o que confirma que essa enzima seja cobre-dependente. Nota-se também que a máxima atividade enzimática (18,62 ± 0,36 U mg⁻¹) foi alcançada quando se utilizou uma concentração de 50 µg mL⁻¹ de CuSO₄.5H₂O.

De acordo com Dekker et al. (2007), a quantidade de cobre requerida para a produção de lacase varia para cada fungo, estima-se que a concentração deste indutor ao meio de cultivo deva estar entre 0,003 e 40 µg mL⁻¹, muito embora haja relatos na literatura do uso de 320 µg mL⁻¹ de CuSO₄, como a melhor concentração para determinada produção enzimática.

Ainda segundo os mesmos autores, quando concentrações superiores a 41 µg mL⁻¹ de CuSO₄.5H₂O foram adicionadas ao meio de cultivo do *B. rhodina* MAMB-05 na presença de glucose 10 g L⁻¹, a produção de biomassa foi afetada negativamente, reduzindo em 16% a sua totalidade.

Essa tendência na diminuição da biomassa fúngica também pode ser verificada neste trabalho. Na Tabela 8 estão demonstrados os resultados que evidenciam que concentrações superiores a 50 µg mL⁻¹ de CuSO₄ reduzem a produção de biomassa do *B. rhodina* MAMB-05.

Baldrian e Gabriel (2002) demonstraram que a biomassa produzida por *Pleurotus ostreatus* reduz de 3,1 mg mL⁻¹ para 1,2 mg mL⁻¹ quando 5 mM Cu é

utilizado no cultivo. Para os autores a presença do cobre não só induz a lacase pela expressão do gene da lacase, mas também afeta positivamente a estabilidade da enzima.

Além dessas vantagens, Tychanowicz et al. (2006) e Hao et al. (2007) afirmaram que altas concentrações de cobre ou de compostos aromáticos aumentam a produção de lacase pelo ascomiceto *Podospora anserina* e que essa enzima atua num mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo provocado por radicais livres. O mecanismo de ação baseia-se na formação de um quelato entre os íons cobre durante o processo de síntese da lacase.

5.4 PLANEJAMENTO FATORIAL E METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA: O ESTUDO DA PRODUÇÃO DA LACASE

A partir da triagem das variáveis no item 5.5, um planejamento fatorial foi desenvolvido na busca de se estudar a influência de cada variável e também das interações entre elas sobre a produção de lacase por *B. rhodina* MAMB-05 em óleo de soja 1% (v v⁻¹). Os parâmetros de cultivo estudados foram: concentração de KH₂PO₄, NaNO₃ e íons cobre, e são apresentados na Tabela 09.

Tabela 9 – Parâmetros avaliados na produção da lacase.

Váriáveis	Variáveis em níveis decodificados				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
A. [Cu ²⁺] (µg mL ⁻¹)	8	25	50	75	100
B. [KH ₂ PO ₄] (g L ⁻¹)	0	0	125	250	335
C. [NaNO ₃] (g L ⁻¹)	16	50	100	150	184

Vasconcelos et al. (2000) otimizaram a produção de lacase por *Botryosphaeria* sp. na presença de álcool veratrílico e verificaram que a concentração de álcool veratrílico (±35mM) e o tempo de cultivo (4-5 dias) foram os efeitos significativos na produção desta polifenol oxidase.

Tavares et al. (2006) otimizaram a produção de lacase por *Trametes versicolor* através dos estudos da concentração de glucose, pH do meio e agitação, o modelo matemático obtido mostrou que somente a concentração de glucose (9 g L⁻¹), pH (5) e a interação de ambas variáveis foram significativas na síntese da enzima.

Nesta pesquisa, um delineamento fatorial composto central 2³ foi realizado, em duplicata, para investigar o efeito de três variáveis na produção da lacase por *B. rhodina* MAMB-05 em óleo de soja. As respostas observadas nesse delineamento estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 – Respostas observadas no delineamento fatorial 2³, para avaliar os efeitos das variáveis concentração de NaNO₃, KH₂PO₄ e íons Cu²⁺.

EXPERIMENTOS	VARIÁVEIS EM NÍVEIS CODIFICADOS			ATIVIDADE VOLUMÉTRICA (U mL ⁻¹)	ATIVIDADE ESPECÍFICA (U mg ⁻¹)	pH	BIOMASSA (g L ⁻¹)
	A	B	C				
1	-1	-1	-1	0,02	0,02	8,2	7,54
1	-1	-1	-1	0,02	0,02	8,2	7,32
2	+1	-1	-1	0,009	0,008	8,6	7,16
2	+1	-1	-1	0,007	0,006	8,6	7,09
3	-1	+1	-1	0,62	1,52	6,6	6,50
3	-1	+1	-1	0,68	1,55	6,6	6,6
4	+1	+1	-1	1,22	2,26	6,7	8,31
4	+1	+1	-1	1,14	2,15	6,7	8,23
5	-1	-1	+1	0,02	0,01	8,7	7,57
5	-1	-1	+1	0,014	0,009	8,7	7,59
6	+1	-1	+1	1,11	0,6	7,8	3,89
6	+1	-1	+1	1,05	0,55	7,7	4,09
7	-1	+1	+1	0,99	1,65	6,6	7,89
7	-1	+1	+1	1,17	1,99	6,6	7,88
8	+1	+1	+1	1,88	1,88	7,3	8,90
8	+1	+1	+1	2,14	2,16	7,4	8,8
9	+1,68	0	0	0,017	0,012	8,4	7,44
9	+1,68	0	0	0,018	0,012	8,4	7,33
10	-1,68	0	0	0,003	0,004	9,0	8,24
10	-1,68	0	0	0,004	0,004	9,0	8,19
11	0	-1(*)	0	0,004	0,001	9,3	2,24
11	0	-1(*)	0	0,005	0,001	9,3	3,12
12	0	+1,68	0	0,60	0,87	6,5	7,21
12	0	+1,68	0	0,68	0,93	6,5	7,24
13	0	0	+1,68	0,003	0,001	8,7	3,04
13	0	0	+1,68	0,003	0,001	8,6	3,14
14	0	0	-1,68	0,57	0,29	6,8	5,16
14	0	0	-1,68	0,61	0,29	6,8	5,12
15 (0)	0	0	0	1,61	3,07	6,9	7,14
15 (0)	0	0	0	1,66	3,01	6,8	7,32
16 (0)	0	0	0	1,68	3,11	7,1	8,46
16 (0)	0	0	0	1,65	3,08	7,0	8,43
17 (0)	0	0	0	1,66	3,10	6,9	6,29
17 (0)	0	0	0	1,64	3,03	6,9	6,77

A - [Cu²⁺] (µg mL⁻¹)
 B - [KH₂PO₄] (g L⁻¹)
 C - [NaNO₃] (g L⁻¹)

(*) - Não há concentração negativa por isso não se utilizou nenhuma concentração.
 (**) - Os experimentos foram realizados em duplicatas.

A Figura 15 apresenta o gráfico de pareto que demonstra a importância relativa dos efeitos assim como verifica a possibilidade da eliminação dos fatores que são menos importantes.

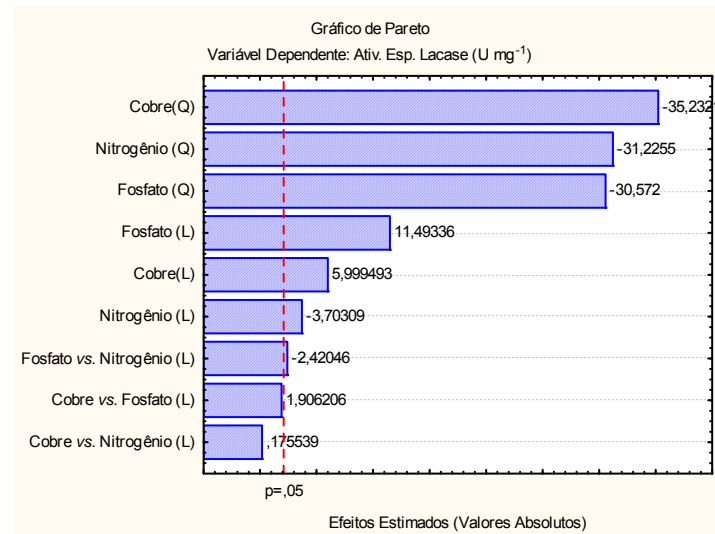


Figura 15 – Gráfico de Pareto indicando os efeitos significativos e não-significativos em 95% de confiança.

A Figura 15 evidencia que as interações entre cobre *versus* fosfato e cobre *versus* nitrogênio não são significativas ao nível de 95% de confiança, portanto, pode-se descartá-las.

A análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 11, é responsável por medir a dispersão dos valores em torno da média e determinar a significância do modelo gerado. Ela foi realizada com a resposta da atividade específica da Lacase (U mg⁻¹).

Tabela 11 – Análise de variância da resposta Atv. Esp. Lacase (U mg⁻¹); R²= 0,72.

Fatores	SQ	gl	QM	F	P
Cobre (L)	0,3343	1	0,3343	32,69	0,000016
Cobre (Q)	12,6918	1	12,6918	1241,29	0,000000
Fosfato (L)	1,3506	1	1,3506	132,09	0,000000
Fosfato (Q)	9,5564	1	9,5564	934,64	0,000000
Nitrogênio (L)	0,1402	1	0,1402	13,71	0,001509
Nitrogênio (Q)	9,9693	1	9,9693	975,02	0,000000
Fosfato vs. Nitrogênio (L)	0,0599	1	0,0599	5,85	0,025687
Falta de ajuste	13,2282	7	1,8897	184,82	0,000000
Erro experimental	0,1942	19	0,0102		
Total	47,8235	33			

SQ- soma dos quadrados
gl – graus de liberdade
QM- quadrado médio
F- teste F
P-probabilidade

A Tabela 12 apresenta a significância dos coeficientes estimados (teste *t-Student's* e valores de p (*p-value*)) pelo modelo de regressão mostrando os coeficientes que posteriormente serão apresentados na equação polinomial.

Tabela 12 – Coeficientes estimados pelo modelo de regressão.

Fatores	Coefficiente β	Erro padrão	<i>t-value</i>	<i>p-value</i>
Média	2,74	0,03	70,50	<0,0001
Cobre (L)*	0,11	0,01	5,72	<0,0001
Cobre (Q)*	-0,73	0,02	-35,23	<0,0001
Fosfato (L)*	0,81	0,02	37,10	<0,0001
Fosfato (Q)*	-0,80	0,02	-30,57	<0,0001
Nitrogênio (L)**	-0,06	0,02	-2,99	0,007
Nitrogênio (Q)*	-0,66	0,02	-31,22	<0,0001
Fosfato vs. Nitrogênio (L)**	-0,06	0,02	-2,42	0,02

* Estatisticamente significativo a 99% de confiança.

** Estatisticamente significativo a 95% de confiança.

A partir da análise das Tabelas 11 e 12 concluiu-se que o modelo foi significativo ($p < 0,0001$), apresentando um coeficiente de determinação $R^2 = 0,72$, ou seja 72% da variação total é explicada pelo modelo. Isso sugere que o modelo gerado apresenta uma boa correlação entre os valores experimentais e previstos, como pode ser verificado na Figura 16.

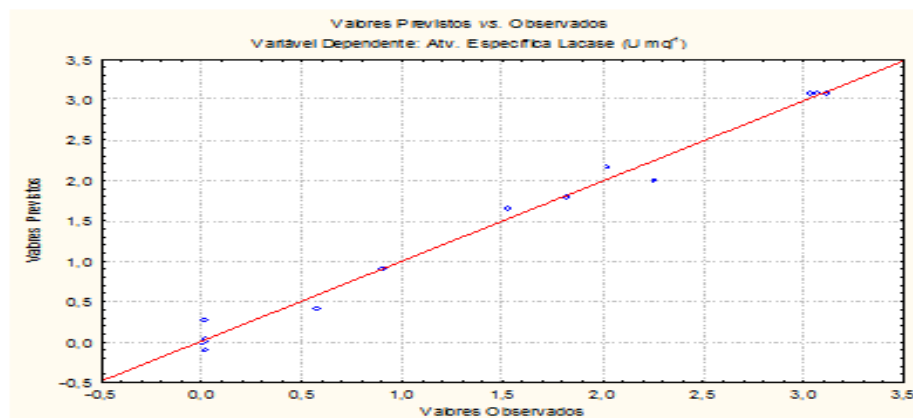


Figura 16 – Valores observados versus valores previstos.

Os valores previstos *versus* os valores observados na Figura 16 confirmam que o modelo proposto descreve bem os dados experimentais, visto que os pontos caem próximos à linha reta.

Todos os efeitos estudados foram estatisticamente significativos, ao nível de 99% de confiança, quanto à interação fosfato *versus* nitrogênio. Analisando-se os valores da atividade da lacase nos diferentes cultivos, apresentados na Tabela 10, conclui-se que as concentrações ideais de KH_2PO_4 , NaNO_3 e íons Cu^{2+} para a máxima produção da lacase ($3,07 \pm 0,04 \text{ U mg}^{-1}$) por *B. rhodina* MAMB-05 em óleo de soja como fonte de carbono, se dá exatamente no ponto central do planejamento fatorial, que foi constituído pelos seguintes valores decodificados, respectivamente; 125 g L^{-1} , 100 g L^{-1} e $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os coeficientes de regressão, obtidos pela análise de regressão múltipla, em termos de variáveis codificadas e seus respectivos valores de erro padrão estão apresentados na Equação 3. Todos os valores representados são significativos ($p < 0,05$), pois, quando possível, os modelos obtidos são simplificados pela eliminação dos termos que não são estatisticamente significativos, com isso, o modelo polinomial de segunda ordem foi apresentado na forma reduzida:

$$\hat{Y} = 2,747 + 0,110x - 0,730x^2 + 0,816y - 0,803y^2 - 0,061z - 0,664z^2 - 0,061yz \quad (3)$$

$(\pm 0,03)$ $(\pm 0,02)$ $(\pm 0,02)$ $(\pm 0,02)$ $(\pm 0,02)$ $(\pm 0,02)$ $(\pm 0,02)$ $(\pm 0,02)$

no qual \hat{Y} é a atividade específica da lacase prevista pelo modelo, e x , y e z são os valores codificados de cobre, KH_2PO_4 e NaNO_3 , respectivamente.

O sinal negativo do termo de interação yz , mostra uma relação antagônica entre as duas medidas y (concentração de KH_2PO_4) e z (concentração de NaNO_3), indica a existência de uma relação de proporcionalidade inversa entre esses dois efeitos. Segundo esse modelo, uma diminuição na concentração de NaNO_3 deve ser acompanhada de um ligeiro aumento na concentração de KH_2PO_4 , para se obter um aumento na produção da atividade da lacase.

A relação entre as variáveis e as respectivas respostas pode ser melhor entendida pela observação das superfícies de contorno e resposta

representadas na Figura 17, que foram geradas através do modelo predito mantendo constante a concentração de óleo de soja ($1\%v\ v^{-1}$).

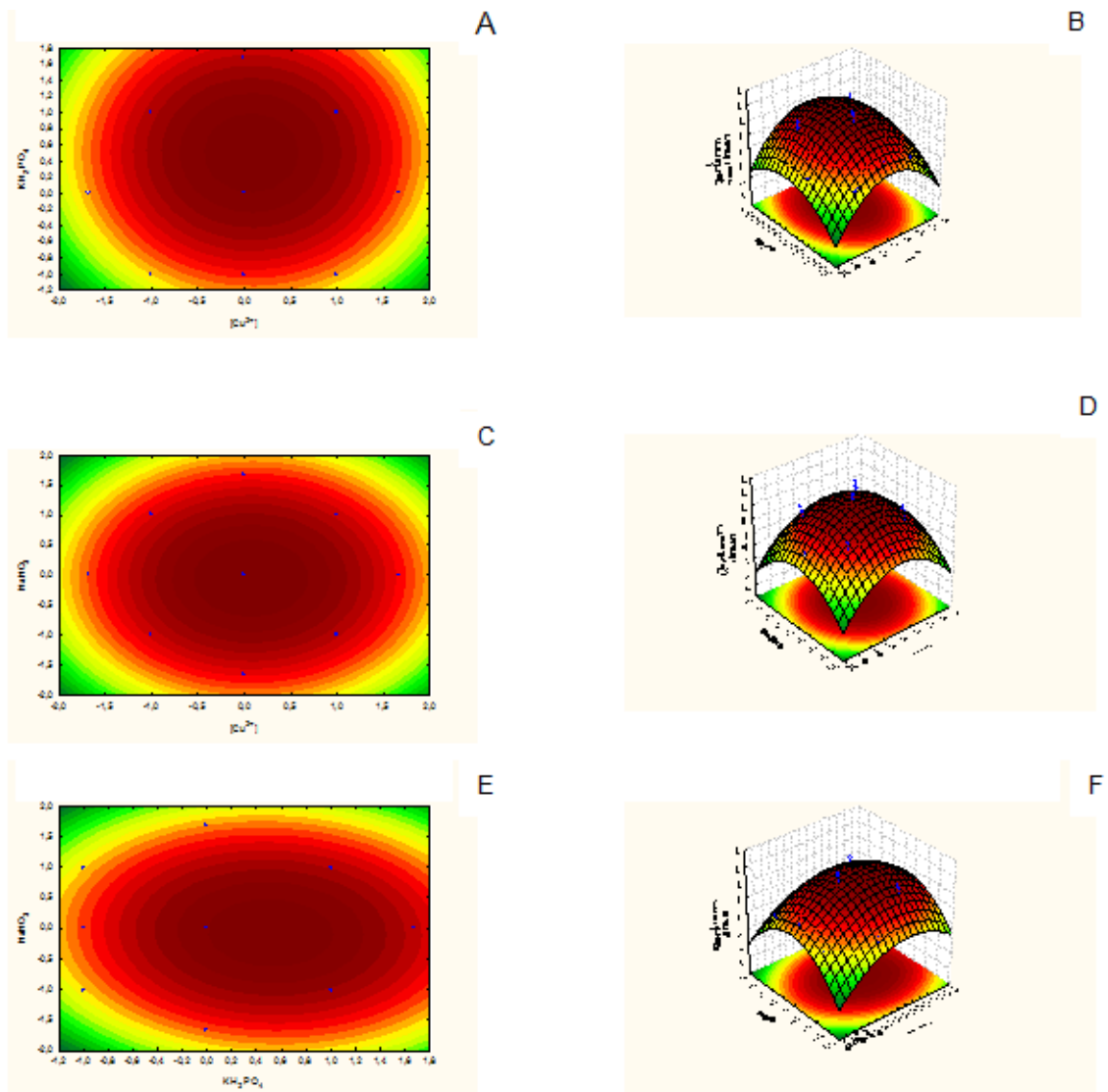


Figura 17 – Linhas de contorno e superfícies de resposta da atividade da lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 cultivado na presença de óleo de soja como fonte única de carbono.

Todas as três superfícies de resposta exibem um comportamento similar na atividade específica da lacase predita, alcançando a máxima atividade em $3,07 \pm 0,04\ U\ mg^{-1}$. A análise do planejamento fatorial composto central 2^3 demonstrou que o efeito mais significativo na produção da lacase, dentre os estudados, foi a concentração de Cu^{2+} , seguida pela concentração de $NaNO_3$ e

KH₂PO₄. Através das curvas de nível observou-se que, para atingir a máxima produção da lacase por *B. rhodina* MAMB-05 em óleo de soja, deve-se utilizar no meio de cultivo concentrações dos nutrientes entre 48 a 52 µg mL⁻¹ de Cu²⁺, de 99 a 101 g L⁻¹ de NaNO₃ e de 124 a 126 g L⁻¹ de KH₂PO₄.

Outras variáveis potencialmente importantes no processo de produção da lacase por *B. rhodina* MAMB-05 não foram contempladas neste planejamento fatorial, como por exemplo, o pH inicial do cultivo do microrganismo. Medeiros et al. (1999) otimizaram a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* estudando as variáveis pH inicial, concentração de extrato de levedura e ação de indutores, seus resultados mostraram que somente o pH inicial do cultivo (6,0-6,5) e a concentração do extrato de levedura (0-0,25%) foram estatisticamente significantes na síntese da enzima.

Para confirmar a possível aplicabilidade do modelo obtido, experimentos foram realizados nas condições ótimas apresentadas acima, e o resultado da atividade enzimática da lacase foi de 2,95 ± 0,1U mg⁻¹.

5.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA LACASE EM BIORREACTORES

A partir dos resultados obtidos dos experimentos de otimização do planejamento fatorial e análise por MSR, cultivos do *B. rhodina* MAMB-05 na presença de óleo de soja foram realizados em biorreatores de bancada com o objetivo de se investigar o comportamento da produção da lacase nessas condições.

Tal estudo avaliou o tipo de inóculo e sua possível influência quanto à produção de lacase. Além do tipo de inóculo, a variável pH também foi investigada. As análises foram feitas em comparação os dados obtidos nos cultivos em incubadora orbital.

A Tabela 13 apresenta algumas respostas e parâmetros que foram estabelecidos como condições de cultivo para a síntese da lacase quando cultivada em *shaker*, a partir das condições anteriormente estudadas anteriormente, e, também, quando cultivada em biorreatores de bancada. O meio de cultivo utilizado em todos os experimentos foi o meio mínimo de Vogel (1956) otimizado e suplementado com óleo de soja 1% (v v⁻¹). A agitação foi de 180 rpm para o cultivo

em *shaker* de acordo com Vasconcelos et al. (2000). Para o cultivo em biorreator a agitação foi mantida em 200 rpm. A aeração é uma variável a ser considerada nos experimentos em biorreatores, para tanto, foi estabelecido um fluxo de ar de um vvm (volume de ar por volume de meio de cultura). A temperatura foi mantida constante (28 ± 2 °C) em todos os experimentos.

Quanto aos tipos de inóculos, foram estudados em três variações, sendo: 20 esferas de 0,7 cm de diâmetro de micélio fúngico; 20 mL solução de hifas trituradas; solução de 20 mL de hifas fúngicas não trituradas. Em relação ao pH, duas variações foram analisadas, sendo: pH controlado em 6 e sem controle do pH.

Tabela 13 – Comparação das condições de cultivo para a produção de lacase em *shaker* e biorreator.

Condições de cultivo	Meio de cultivo ^a	pH ^{***}	Inóculo	Agitação (rpm) ^b	Aeração (vvm) ^c	Temperatura (°C)	Tempo (h) ^d
<i>Shaker</i>	MM.V.o + 1% óleo	7,0	4 esferas*	180	-	28 ± 2	120
Biorreator 1	MM.V.o + 1% óleo	6,4	20 esferas**	200	1	28 ± 2	72
Biorreator 2	MM.V.o + 1% óleo	6	20 esferas**	200	1	28 ± 2	72
Biorreator 3	MM.V.o + 1% óleo	6	20 mL solução de hifas trituradas	200	1	28 ± 2	96
Biorreator 4	MM.V.o + 1% óleo	6	20 mL solução de hifas íntegras	200	1	28 ± 2	24

(*) - Esferas com 0,7 cm de diâmetro, retiradas da placa de petri, na qual foi cultivado o *B. rhodina* como pré-inóculo.

(**) - Esferas de micélio com 0,7 cm de diâmetro.

(***) - Valores de pH determinados quando a atividade da lacase foi máxima nos respectivos tempos de cultivo.

(a) - O meio de cultivo utilizado nos experimentos foi o meio mínimo de Vogel (1956) otimizado (M.M.V.o) para a produção da lacase suplementado com 1% de óleo de soja.

(b)- A agitação em *shaker* consistiu em cento e oitenta (180) rotações por minuto (rpm) e em biorreator foi de duzentas (200) rotações por minuto.

(c)- A aeração não pode ser controlada em *shaker*. Em biorreatores a aeração foi mantida em um (1) volume de ar por volume de meio de cultivo (vvm).

(d)- Os tempos de cultivo apresentados na tabela demonstram quais foram os horários no qual a atividade específica da lacase foi maior.

Foi também investigado nestes experimentos a produção de lipase por *B.rhodina* MAMB-05, visto que, para acessar a fonte de carbono teoricamente o microrganismo precisa desta enzima e até o momento não há relatos na literatura científica acerca desta capacidade por este microrganismo.

As lipases são definidas como glicerol éster hidrolases (E.C.3.1.1.3) capazes de catalisar a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa, liberando monoglicerídeos, diglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol na interface óleo-água (KAMINI, MALA, PUVANAKRISHNAN, 1998; KAMINI et al., 2000; STEHR et al., 2003; GHANEM, 2007). Além de ser capaz de produzir lipase, Melzer et al. (2008) descreveram que o microrganismo *B. rhodina* também é capaz de produzir uma epóxido hidrolase.

Diante disso, com o objetivo identificar a produção de lipases pelo *B. rhodina* MAMB-5 foi determinada a atividade da lipase em conjunto com a atividade da lacase nos experimentos desenvolvidos em biorreatores

A Figura 18 apresenta os resultados obtidos quanto à produção de lacase e lipase durante o processamento do primeiro experimento em biorreator. Nesse cultivo foi utilizado como inóculo 20 esferas de micélio de 0,7 cm de diâmetro. Além do inóculo, também foi avaliado o não controle do pH. Através da análise da Figura 18, constatou-se que níveis enzimáticos de $7,83 \pm 0,13 \text{ U mg}^{-1}$ para lacase e $0,5 \pm 0,02 \text{ U mg}^{-1}$ para lipase foram encontrados com 72 horas de cultivo. Nesse experimento não foi possível estimar a biomassa fúngica em função do tipo de inóculo utilizado proporcionar a formação de *pellets* durante o cultivo. O pH do meio de cultivo do experimento três encontrava-se em 6,4 quando foi detectada a maior atividade da lacase. De acordo com Dekker et al. (2007) o pH ótimo para a produção de lacase por *B. rhodina* MAMB-05 encontra-se na faixa entre 5,5 – 6,5. Esse primeiro cultivo, realizado em biorreator, quando comparado aos experimentos realizados em *shaker* ($3,07 \pm 0,04 \text{ U mg}^{-1}$) exibiu valores significativos para a produção de lacase, levando a constatação de que a produção de enzimas pode ser afetada positivamente utilizando biorreatores de bancada como fermentadores.

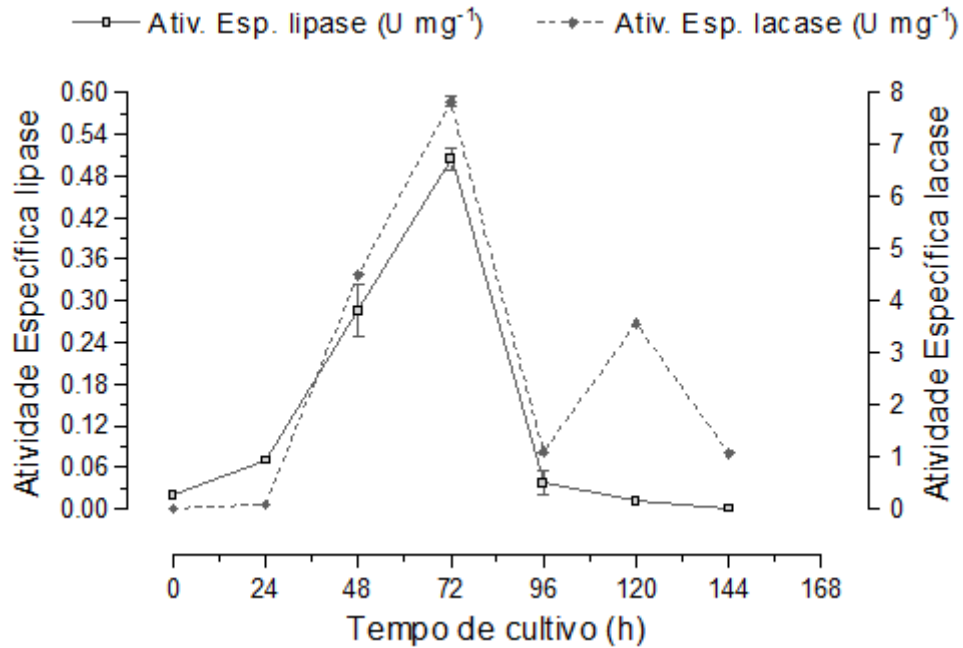


Figura 18 – Produção de lacase e lipase em biorreator de bancada utilizando óleo de soja como fonte de carbono. O inóculo utilizado foi composto por 20 esferas de micélio de 0,7 cm de diâmetro, e o pH não foi controlado.

Tavares et al. (2006) constataram que a atividade da lacase produzida por *Trametes versicolor* foi substancialmente afetada pela alteração do pH durante o cultivo. Os autores propuseram que as bruscas quedas nas atividades enzimáticas podem ocorrer devido a repressão do metabolismo de síntese da lacase durante a alteração dos valores de pH. Outra hipótese baseia-se na troca da estrutura tridimensional da enzima, afetando o sítio ativo, não permitindo assim a reação biocatalítica. Partindo-se dessas constatações, um segundo experimento foi desenvolvido utilizando-se o mesmo tipo de inóculo do experimento anterior apenas controlando-se o pH em seis, com o objetivo de investigar a influência da variável pH na produção de lacase e lipase por *B. rhodina* MAMB-05. A Figura 19 apresenta o perfil da produção de lacase e lipase nesse segundo experimento.

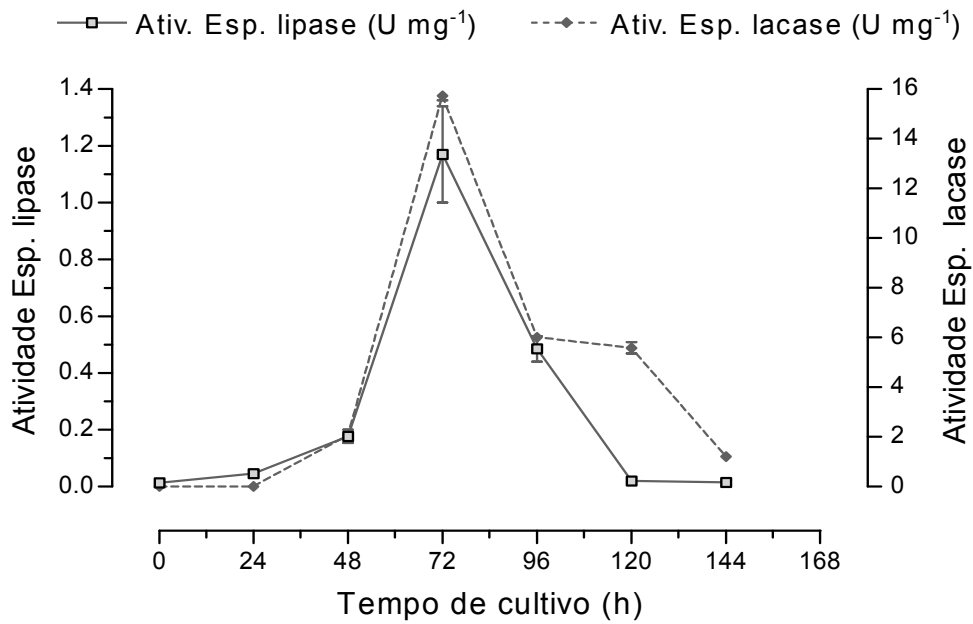


Figura 19 – Produção de lacase e lipase em biorreator de bancada utilizando óleo de soja como fonte de carbono. O inóculo utilizado foi composto por 20 esferas de micélio de 0,7 cm de diâmetro, e o pH foi controlado em 6.

A partir da análise comparativa das Figuras 18 e 19, verificou-se que a maior atividade para ambas as enzimas foi detectada em 72 horas de cultivo, porém, quando o pH do cultivo do ascomiceto foi controlado em seis a atividade enzimática tanto da lacase ($15,72 \pm 0,24 \text{ U mg}^{-1}$) quanto da lipase ($1,17 \pm 0,24 \text{ U mg}^{-1}$) foram superiores às atividades do cultivo que não teve seu pH controlado.

No entanto, o tipo de inóculo utilizado no processo fermentativo em biorreatores fez gerar no meio de cultivo *pellets*, responsáveis por causar limitação na transferência de oxigênio, aumento na viscosidade do meio e bloqueio na metabolização de nutrientes. De acordo com Agematu et al. (1993), isso ocorre porque as lacases são excretadas para o meio de cultivo através do micélio do fungo filamentoso. Para Couto e Toca-Herrera (2007) cultivos de fungos filamentosos realizados sob fermentação submersa em biorreator freqüentemente exibem resultados não controláveis de crescimento micelial. Esse fator acaba tornando-se limitante para a produção de lacases e até mesmo de lipases pelo *B. rhodina* MAMB-05.

A Figura 20 registra imagem do primeiro experimento e também do terceiro, já com o problema da formação de pellets solucionado.

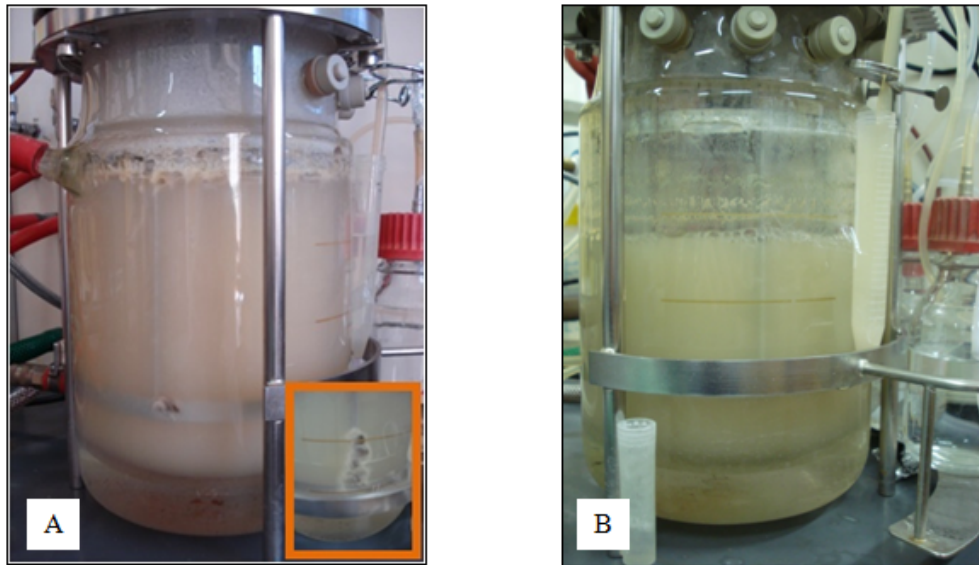


Figura 20 – Imagens dos cultivos de *B. rhodina* MAMB-05 em óleo de soja nos biorreatores (144 horas de cultivo).

- (A) Exibe, no detalhe, os pellets formados durante o primeiro cultivo.
 (B) Exibe o meio de cultivo homogêneo durante o terceiro cultivo.

Algumas estratégias podem ser tomadas para controlar o crescimento de fungos em biorreatores. Segundo Lema et al. (2001), um sistema de pulso é capaz de controlar a formação de *pellets* no meio de cultivo, isto tornaria possível uma operação mais prolongada e detalhada do estudo da produção de algumas enzimas extracelulares.

Outros autores tais como Thongehul e Yang (2003), propõem o uso da imobilização dos fungos filamentosos em diferentes suportes para minimizar este problema. Tal técnica, segundo os autores, é de fácil aplicação devido à grande inclinação que esses microrganismos possuem de aderir em superfícies. Esse sistema separaria as células livres do meio cultivo, influenciando na diminuição da viscosidade, e facilitando a transferência de oxigênio do meio de cultivo para as células fúngicas, assim como acarretaria numa diminuição da perturbação do pH. Schliephake et al. (2000) produziu lacase através da imobilização do fungo *Pycnoporus cinnabarius* em cubos de esponja de *nylon* em biorreatores.

A estratégia utilizada no terceiro experimento, para investigar a influência do tipo de inóculo na produção das enzimas, foi modificar o inóculo, de acordo com a descrição no item 4.9.4, almejando impedir a formação de *pellets*, conforme a Figura 20 (B). A Figura 21(A) representa a cinética de produção da lacase e da lipase durante 144 horas de cultivo mantendo-se o pH do meio constante igual a 6. As determinações enzimáticas mostraram que a máxima produção da lacase ($0,78 \pm 0,01 \text{ U mg}^{-1}$) ocorreu em 96 horas de cultivo. Já a produção máxima de lipase ($0,1 \pm 0,01 \text{ U mg}^{-1}$) foi evidenciada em 24 horas de cultivo. Estes resultados mostram que a lipase é sintetizada primeiramente para clivar o óleo vegetal em monoglicerídeos, diglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol (JAEGER; REETZ, 1998) facilitando o desenvolvimento do microrganismo.

A utilização desse novo tipo de inóculo possibilitou a análise da biomassa, uma vez que não houve formação de *pellets*. A Figura 21(B) mostra o perfil da biomassa do ascomiceto durante o período de análise de 144 horas. Observa-se que esse perfil mantém uma relação de proporcionalidade inversa com a produção da lacase, ou seja, quando a atividade da enzima manteve-se em $0,27 \pm 0,004 \text{ U mg}^{-1}$ em 144 horas de cultivo a produção de biomassa foi máxima, alcançando níveis em torno de 26 g L^{-1} . Esses resultados contrariam os dados apresentados por Couto et al. (2006) que afirmaram que o aumento na produção de lacase por *Trametes hirsuta* está intimamente ligada a um aumento na produção da biomassa deste fungo.

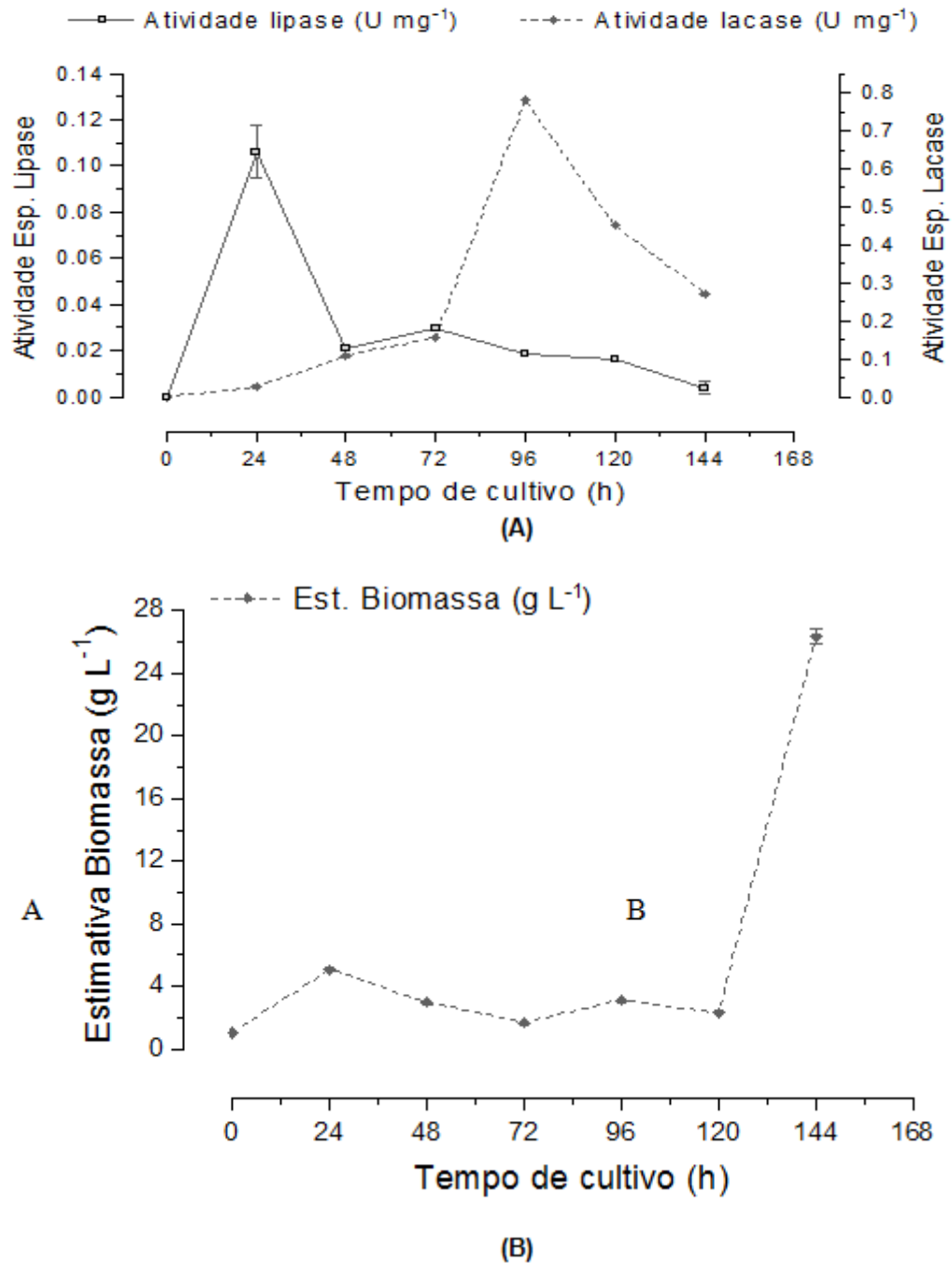


Figura 21 – (A) Produção de lacase e lipase em biorreator de bancada utilizando óleo de soja como fonte de carbono. O inóculo utilizado foi uma solução de 20 mL de hifas trituradas, e o pH foi controlado em 6. **(B)** Perfil estimado da biomassa fúngica durante o terceiro cultivo (g L⁻¹).

Embora no terceiro experimento não tenha havido formação de pellets, constatou-se que a síntese tanto da lacase quanto da lipase foram

drasticamente reduzidas em relação aos experimentos anteriores. Tal redução pode ter ocorrido em função de um estresse celular, ou seja, uma lesão nas hifas, durante o processo de trituração das mesmas. Para evitar a interferência desse estresse na produção das enzimas, foi desenvolvido um quarto experimento, no qual o inóculo constituiu-se de 20 mL de solução de hifas não trituradas de um cultivo com 48 horas de andamento.

A Figura 22 (A) apresenta a curva de produção da lacase e da lipase durante o percurso do quarto experimento realizado em biorreator. Nessa etapa, o pH do meio de cultivo não pôde ser controlado. A máxima produção de lacase, nesse experimento foi avaliada em 24 horas de cultivo ($19 \pm 2,82 \text{ U mg}^{-1}$), já a atividade lipolítica foi detectada em 72 horas de cultivo apresentando $0,56 \pm 0,007 \text{ U mg}^{-1}$. A Figura 22(B) apresenta o perfil da biomassa fúngica ao longo desse último experimento.

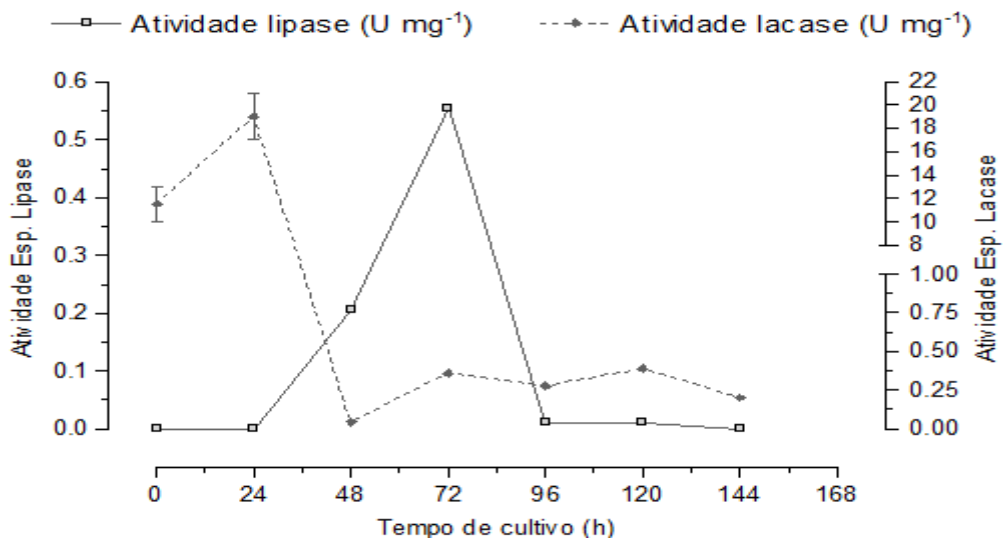


Figura 22 (A) – Produção de lacase e lipase por *B. rhodina* MAMB-05 em biorreator de bancada utilizando óleo de soja como fonte de carbono. O inóculo utilizado foi uma solução de 20 mL de hifas integras, e o pH não foi controlado.

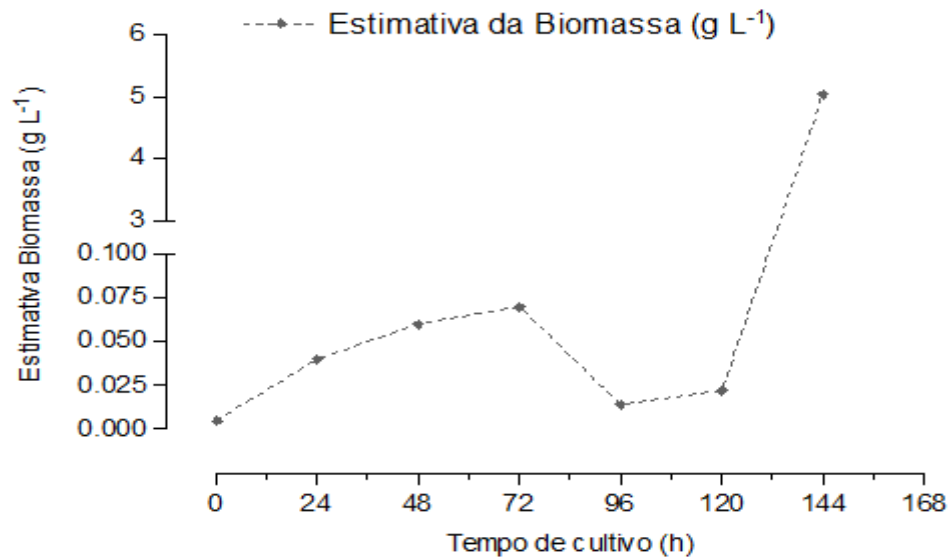


Figura 22 (B) – Perfil estimado da biomassa de *B. rhodina* MAMB-05 durante o quarto cultivo (g L⁻¹).

O pH do meio de cultura no momento em que a máxima atividade de lacase foi detectada encontrou-se em 6,0, o que também sugere, segundo Dekker et al. (2007), uma dependência do pH na faixa de 6-6,5 para a ótima produção da enzima. A Figura 22 (B) apresenta a estimativa da biomassa do quarto experimento, assim como na Figura 21 (B) é confirmada a proporcionalidade inversa da biomassa com a produção de lacase. Ou seja, não existe uma relação direta entre a atividade enzimática da lacase e produção de biomassa.

Através da análise comparativa entre os quatro diferentes cultivos, o quarto experimento foi o único a apresentar atividade de lacase antes da detecção de atividade lipolítica. E, ainda, sobrepondo o experimento dois, no qual foram utilizadas 20 esferas de micélio como inóculo, esse último experimento apresentou a maior atividade enzimática de todos os experimentos feitos em biorreatores. Uma possível explicação sobre esses resultados pode estar baseada justamente no tipo de inóculo, já que foi constituído de uma solução de hifas não trituradas vindas de um pré-inóculo com o mesmo meio de cultura ao qual iria ser adicionado, o que pode ter não provocado um estresse nas células fúngicas.

Zhang e colaboradores (2002) propuseram que as lacases são capazes de oxidar lipídeos, através da peroxidação de ácidos graxos insaturados. Tais autores investigaram a degradação da trilinoleína através de uma lacase purificada, e concluíram que essas lacases possuem o comportamento similar a

uma lipoxigenase. A partir de tal pesquisa, pode-se sugerir que a lacase produzida pelo *B. rhodina* MAMB-05 em óleo de soja possua um comportamento semelhante à enzima utilizada para degradar trilinoleína. Ou ainda, que o potencial de redução da lacase seja maior que o potencial de redução da lipase, o que poderia explicar a síntese da lacase ter ocorrido antes da lipase.

A produção de lipases em óleo de soja por *B. rhodina* MAMB-05 na presente pesquisa apresenta algumas características similares com outros trabalhos da literatura científica.

Carvalho et al. (2005) produziram lipase pelos microrganismos *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium solitum* utilizando óleo de oliva 1% (v v⁻¹). Demonstraram que a máxima atividade lipolítica foi detectada pelo *Aspergillus niger* (18,2 U mL⁻¹) em 72 horas de cultivo, resultado que é similar ao desta pesquisa. Pastore e colaboradores (2003) apresentaram que a atividade lipolítica de *Rhizopus* sp. reduz em 50% seu rendimento quando o microrganismo é cultivado em meios de cultura que exibem valores de pH diferentes de 6-6,5.

A Figura 23 apresenta todos os resultados obtidos relacionados à produção de lacase e lipase por *B. rhodina* MAMB-05 em óleo de soja. A partir da análise de tal gráfico pode-se sugerir que a produção de lacase utilizando biorreatores de bancada influenciou positivamente na atividade enzimática, quando comparado aos cultivos realizados em *shaker*. Esse resultado pode ser confirmado porque a atividade da lacase foi seis vezes superior em biorreatores.

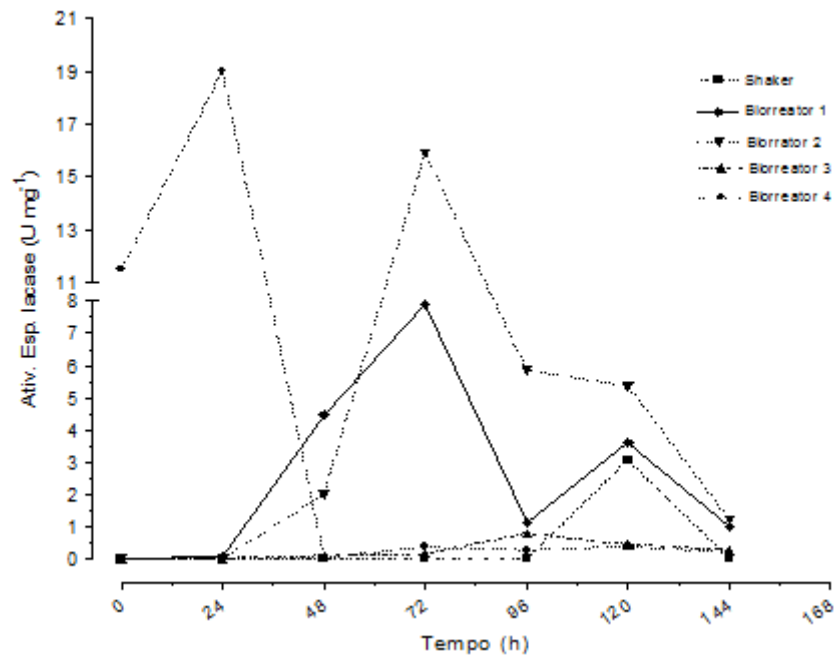


Figura 23 – Comparação da produção de lacase por *B. rhodina* MAMB-05, utilizando óleo de soja como fonte de carbono, em *shaker* e biorreatores.

Alcántara, Gómez e Pazos (2007) estudaram a produção de lacase por *Corioloopsis rigida* quando cultivada em *shaker* e biorreator de bancada. Segundo os autores, a primeira metodologia implica em algumas limitações tais como, a impossibilidade de se controlar o pH do cultivo, o controle e estudo da aeração do meio, e avaliar a produção da enzima em sucessivos cultivos.

Tais conclusões estão de comum acordo com os resultados encontrados no presente trabalho, mostrando que os resultados já otimizados em incubadora orbital serviram de suporte para os cultivos em biorreatores, os quais superaram os resultados obtidos anteriormente, principalmente, por se tratar de uma técnica mais desenvolvida tecnologicamente, na qual pode ser controlado o pH e a aeração durante o cultivo. Em uma perspectiva futura, algumas variáveis no processo de produção da lacase em biorreatores poderiam ser estudadas através planejamentos fatoriais no intuito de aumentar a produtividade do processo fermentativo.

CONCLUSÕES

- a) *B. rhodina* MAMB-05 quando cultivado na presença de óleo de soja 1% (v v⁻¹), apresentou atividade específica da lacase de 2,91±0,03 U mg⁻¹, superior quando comparada aos cultivos na presença de glucose 1% (m v⁻¹, 1,22 ± 0,03 U mg⁻¹, e glicerol 1% (v v⁻¹), 1,97 ± 0,14 U mg⁻¹.
- b) O substrato selecionado para a determinação da lacase foi o ABTS, apresentando atividade de 0,44 ± 0,02 U mL⁻¹.
- c) O pH ótimo para a determinação da lacase, na presença do substrato ABTS, foi igual a 3. As temperaturas ótimas de reação da lacase para o DMP e para o ABTS foram, respectivamente, 45 (0,04 ± 0,0007 U m^{L-1}) e 50°C (0,56 ± 0,005 U m^{L-1}).
- d) A produção máxima da lacase em incubadora orbital ocorreu em 120 horas de cultivo, na presença de ABTS, sendo de 0,48 ± 0,04 U mL⁻¹.
- e) O NaNO₃ foi a fonte de nitrogênio que mais favoreceu a atividade da lacase (2,49 ± 0,09 U mg⁻¹.)
- f) O KH₂PO₄ foi a fonte de fosfato que mais favoreceu a produção (1,59 ± 0,07 U mg⁻¹).
- g) Na ausência de cobre a produção de lacase foi de 0,26 ± 0,023 U mL⁻¹. A máxima atividade enzimática (18,62 ± 0,36 U mg⁻¹) foi alcançada quando se utilizou uma concentração de 50 µg mL⁻¹ de CuSO₄.5H₂O.
- h) A máxima atividade da lacase encontrada através do processo de otimização foi de 3,07 ± 0,04 U mg⁻¹. As concentrações dos nutrientes no meio de cultivo devem estar entre 48 a 52 µg mL⁻¹ de Cu²⁺, de 99 a 101 g L⁻¹ de NaNO₃ e de 124 a 126 g L⁻¹ de KH₂PO₄.
- i) Constatou-se que cultivos realizados em biorreatores de bancada, os quais, diferentemente das incubadoras orbitais, possibilitam o controle de variáveis como o pH e o oxigênio dissolvido, aumentam a atividade da lacase, chegando a um máximo de 19 ± 2,82 U mg⁻¹ em apenas 24 horas de cultivo, quando comparado aos cultivos realizados em incubadora orbital 3,07 ± 0,04 U mg⁻¹. A atividade lipolítica foi detectada em 72 horas de cultivo apresentando 0,56 ± 0,007 U mg⁻¹.

REFERÊNCIAS

AGEMATU, H.; TSUCHIDA, T.; KOMINATO, K.; SHIBAMOTO, N.; YOSHIOKA, T.; NISHIDA, H.; et al. Enzymatic dimerization of penicillin. *XJ Antibiot.* V. 46, p.141-148, 1993.

ALCANTARA, T.; GOMEZ, J.; PAZOS, M. Enhanced production of laccase in *Coriolopsis rigida* grown on barley bran flask or expanded-bed bioreactor. *World J. Microbiol. Biotechnol.* v.23, p.1189-1194, 2007.

ARDON, O.; KEREM, Z.; HADAR, Y. Enhancement of laccase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *Journal of Biotechnology.* v. 51, p. 201-207, 1996.

AROCKIASAMY, S.; KRISHNAN, I.P.G.; ANANDAKRISHNAN, N.; SEENIVASAN, S.; SAMBATH, A.; VENKATASUBRAMANI, J.P. Enhanced Production of Laccase from *Coriolus versicolor* NCIM 996 by Nutrient Optimization Using Response Surface Methodology. *Applied biochemistry and biotechnology.* DOI 10.1007/s12010-008-8205-4, 2008.

ARORA, D.S.; GILL, P.K. Effects of various media and supplements on laccase production by some White rot fungi. *Bioresource Technology.* v.77, p. 89-91, 2001.

BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters.* v. 206, p. 69-74, 2002.

BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; KURTBÖKE, I.; HARDY, G. E. S. In vivo decolorization of poly R-478 as a method for screening ligninolytic microorganisms for use in bioremediation. *Proceedings. 4th PACIFIC RIM Biotechnology Conference, Melbourne, Australia,* p.88-90, 1995.

BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; HARDY, G.E. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. *Letters in Applied microbiology.* v. 23, p. 93-96, 1996.

BARBOSA, A.M.; STELUTTI, R.M.; DEKKER, R.F.H.; CARDOSO, M.S.; SILVA, M.L.C. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1-3; 1-6)- β -D-glucan produced by the ascomycetous fungus, *Botryosphaeria* sp. *Carbohydrate Research.*, Amsterdam, v.338, p. 1691-1698, 2003.

BAUER, C.G.; KUEHN, A.; GAJOVIC, N.; SKOROBOGATKO, O.; HOLT, P.J.; BRUCE, N.C. MAKOWER, A.; LOWE, C.R.; SCHELLER, F.W. Few enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *J. Anal. Chem.* v. 120, p.266-269, 1999.

BERTRAND, G. Sur La presence simultanee de la laccase ET de la tyrosinase dans Le suc de quelques champignons. *C R Hebd Seances Acad Soi.* v.123, p. 463-465, 1896.

BOLLAG, J.M.; LEONOWICZ, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied and Environmental Microbiology.* v. 48, p. 849-854, 1984.

BRINCH, D.S.; PEDERSEN, P.B. Toxicological studies on *Polyporus pinsitus* laccase expressed by *Aspergillus oryzae* intended for use in food. *Food Additives and Contaminants*. v. 19, p. 323-334, 2002.

BROWN, M.A.; ZHAO, Z.; MAUK, A.G. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. *Inorg. Chim. Acta*. v. 331, p.232-238, 2002.

CAMBRIA M. T.; Minniti, Z.; LIBRANDO, V.; CAMBRIA, A. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Rigidoporus lignosus* and its Laccase in the Presence of Redox Mediators. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 149, p. 1-8, 2008.

CAMPBELL, M. K. *Bioquímica*. Trad. Henrique Bunselmeyer Ferreira...[et al.]. -3. ed – Porto Alegre: Artmed Editora, 2000.

CANFORA, L; IAMARINO, G; RAO, M., et al. Oxidative transformation of natural and synthetic phenolic mixtures by *trametes versicolor* laccase. *Journal of agricultural and food chemistry*. v. 56, p. 1398-1407, 2008.

CARVALHO, P.O.; CALAFATTI, S. Ap.; MARASSI, M.; SILVA, D.M.; CONTESINI, F.J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Química Nova*. v.28, N° 4, p.614-621, 2005.

CASTELLANI, A. maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in sterile distilled water; further research. *J. Trop. Med*. v.70, p.181-184, 1967.

CAVALLAZZI, J.R.; OLIVEIRA, M.G.A.; KASUYA, C.M. Laccase production by *Lepista sordida*. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.35, p. 261-263, 2004.

CAVALLAZZI, J.R.; KASUYA, C.M.; SOARES, M.A. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 36, p. 383-387, 2005.

CEYLAN, H.; KUBILAY, S.; AKTAS, N.; SAHINER, N.; An approach for prediction of optimum reaction conditions for laccase-catalyzed bio-transformation of 1-naphthol by response surface methodology (RSM). *Bioresource Technology*. v.99, p.2025-2031, 2008.

COUTO, S.R.; TOCA-HERRERA, J.L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*. v.25, p. 558-569, 2007.

CUNHA, M.A.; BARBOSA, A.M.; GIESE, E.C.; DEKKER, R.F.H. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* sp. *J. Basic Microbiol*. v.43, p. 376-383, 2003.

DAVIES, G. J.; DUCROS, V. Laccase. *Handbook of Metalloproteins*. UK. p. 1359-1368, 2001.

DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. The effect of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 28, p. 81-88, 2001.

DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M.; GIESE, E.C.; GODOY, S.D.S.; COVIZZI, L.G. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *International Microbiology*. v.10, 2007.

DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M.; SARGENT, K. The effect of lignin-related compounds on the growth and production of lacases by the ascomycete, *Botryosphaeria* sp. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 30, p. 374-380, 2002.

DEKKER, R.F.H.; LING, K.Y.; BARBOSA, A.M. A simple method for monitoring chromatography column eluates for laccase activity during enzyme purification. *Biotechnology Letters*. v. 22, p. 105-108, 2000.

DOMINGUES, F.C.; QUEIROZ, J.A.; CABRAL, J.M.S.; FONSECA, P. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microbiol. Technol.* v. 26, p. 394-401, 2000.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28, p.350-356, 1956.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potencial applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*. v. 28, p. 83-99, 2000.

DURÁN, N. et al. Applications os laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. In: *Enz. Microbiol. Technol.*, v.31, p. 907-31, 2002.

EDENS, W. A.; GOINS, T.O.; DOOLEY, D.; HENSON, J. Purification and Characterization of a secreted lacase of *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici*. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 65, p. 3071-3074, 1999.

FENICE, M.; SERMANNI, G.G.; FEDERICI, F.; D'ANNIBALE, A. Submerged and solid-state production of lacase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *Journal of Biotechnology*. v. 100, p. 77-85, 2003.

GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In: *FUNGOS uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul-RS, Ed. EDUCS, 2004.

GARCIA, J. E.; VILAS-BOAS, L. A; DEKKER, R. F. H.; FÚNGARO, M. H. P.; BARBOSA, A. M. Molecular identification of a species of *Botryosphaeria* sp.; *Botryosphaeria rhodina*. GenBank. Acession number: AY612337, 2004.

GARG, S.K.; MODI,D.R. Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi. *Critical Reviews Biotechnology*, v.19, p. 85-112, 1999.

GELO-PUJIC,M; KIM,H.H.; BUTLIN, N.G.; TAYHAS,G.; PALMORE,R. Electrochemical studies of a truncated lacase produced in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p.5515-5521, 1999.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*. v.63, p.1721-1754, 2007.

GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J.M. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. CRC Press LLC. 1999.

GIESE, E.C.; COVIZZI, L.G.; DEKKER, R.F.H.; BARBOS, A.M. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. *Acta Scientiarum Biological Sciences*. v. 26, p. 463-470, 2004.

GIVAUDAN, A.; EFFOSSE, A.; FAURE, D.; POTIER, P.; BOUILLANT, M.L.; BALLY, R. polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for lacase activity in nonnitile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Lett.* v. 190, p. 205-210, 1993.

HAO, J.; SONG, F.; HUANG, F. et al. Production of lacase by isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. *J. Microbiol. Biotechnol.* v. 34, p. 233-240, 2007.

HARTREE, D. *Analytical Biochemistry*. v. 48, p. 422-427, 1972.

HATAKKA, A. Biodegradation, of lignin. In: Hofrichter, M.; Steinbuchel, A. editors. *Lignin, humic substances and coal*. Weinheim, Germany: Wiley-VCHJ. p. 129-179, 2001.

JAEGER, K. E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v.16, p.396-403, 1998.

JAOUANI, A.; GUILLÉN, F.; PENNINGKX, M.J.; MARTÍNEZ, A.T.; MARTÍNEZ, M.J. Role of *Pycnoporus coccineus* lacase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 36, p. 478-486, 2005.

KAHRAMAN, S.S.; GURDAL, I.H. Effect of synthetic and natural culture media on lacase production by white rot fungi. *Bioresource Technology*. v.82, p. 215-217, 2002.

KAMINI, N.R.; FUJII, T.; KUROSU, T.; IEFUJI, H. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. *Process Biochemistry*, v.36, p.317-324, 2000.

KAMINI, N.R.; MALA, J. G. S., PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochemistry*, v.33, p.505-511, 1998.

KLONOWSKA, A.; LE PETIT, J.; TRON, T. Enhancement of minor lacases production in the basidiomycete *Marasmius quercophilus* C30. *FEMS Microbiology Letters*. v. 200, p. 25-30, 2001.

KWON, S.I.; ANDERSON, A.J. Laccase isozymes: production by an opportunistic pathogen, a *Fusarium proliferatum* isolate from wheat, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 59, p. 235-242, 2001.

LABORDE, J. Sur la casse des vins. C R Hebd Acad Soi. v. 123, p. 1074-1075, 1896.

LEMA, J.M.; ROCA, E.; SANROMÁN, A.; NÚÑEZ, M.J.; MOREIRA, M.T.; FEIJOO, G. Pulsing bioreactors. In: CABRAL, J.M.S.; MOTA, M.; TRAMPER, J. editors. Multiphase bioreactor design. London: Taylor & Fancis; 2001. p. 309-29.

LEONOWICZ, A.; CHO, N.S.; LUTEREK, J. WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A. HOFRICHTER, M. et al. Fungal laccase: properties and activity on lignin. J. Basic Microbiol. v. 41, p. 185-227, 2001.

LIMA, V. M. G. Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium* e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos. 2004. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LOGUERCIO-LEITE, C. Taxonomia dos fungos. In: FUNGOS uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul-RS, Ed. EDUCS, 2004.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUG, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, v.193, p.265-275, 1951.

MACHADO, K.M.G.; MATHEUS, D. R.; RODRIGUES, T.A.; BONONI, V.L.R. Enhancement of growth of *Lentinus crinitus* in soil using benomyl and vegetable oil. Brazilian Journal of Microbiology. v. 37, p. 425-427, 2006.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C.; Laccase; new functions for an old enzyme: a review. Phytochemistry. v. 60, p. 551-565, 2002.

MEDEIROS, M. B.; BENTO, A.V.; NUNES, A.L.L.; OLIVEIRA, S.C. Optimization of some variables that affect the synthesis of laccase by *Pleurotus ostreatus*. Bioprocess Engineering. V.21, p. 483-487, 1999.

MELZER, G.; JUNNE, S.; WOHLGEMUTH, R.; HEMPEL, D.C.; GOTZ, P. Production of epoxide hydrolases in batch fermentations of *Botryosphaeria rhodina*. Journal of industrial microbiology and biotechnology. v. 35, p.485-493, 2008.

MESSERSCHMIDT, A. Multi-copper oxidases. Germany. p.36, 1997.

MESSIAS, J. M. Produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em diferentes fontes de carbono. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina/Paraná.

MEZA, J.C.; LOMASCOLO, A.; CESALOT, L.; SIGOILLOT, J.C.; AURIA, R. Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-cane bagasse: influence of ethanol vapours as inducer. Process Biochemistry. v.40, p. 3365-3371, 2005.

MINUSSI, R.C.; PASTORE, G.M.; DURÁN, N. Potential applications of laccase in the food industry. A review. Food science & Technology. v. 13, p. 205-216, 2002.

MINUSSI, R.C.; PASTORE, G.M.; DURÁN, N. Laccase induction in fungi and laccase / N-OH mediator systems applied in paper Mill effluent. *Bioresource Technology*. v. 98, p. 158-164, 2007.

MONTGOMERY, D. C. Design and analysis of experiments. 6.ed. New York. John Wiley & Sons, 2005.

MOREIRA, F.G.; REIS, S.; COSTA, M.A.F.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Production of hidrolytic enzymes by the plant pathogenic fungus *Myrothecium verrucaria* in submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 36, p. 7-11, 2005.

MORETO, E.; ALVES, R.F. Óleos de gorduras vegetais, processamento e análises. Florianópolis-SC: Ed. UFSC, 1986.

MOUGIN, C.; KOLLMANN, A.; JOLIVALT, C. Enhanced production of lacase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. *Biotechnology Letters*. v.42, p. 139-142, 2003.

MUÑOZ, C.; GUILLÉN, F.; MATÍNEZ, A.T.; MARTÍNEZ, M.J. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 63, p. 2166-2174, 1997.

NELSON, N. A. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, v.153, p.376-380, 1944.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos. Campinas – SP: Ed. Unicamp, 2007.

NILADEVI, K.N.; PREMA, P. Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolourization. *Bioresource Technology*. v. 99, p. 4583-4589, 2008.

ODA, Y.; ADACHI, K.; AITA, I.; ITO, M.; ASO, Y.; IGARASHI, H. Purification and Properties of laccase excreted by *Pycnoporus coccineus*, *Agric. Biol. Chem.* v. 55, p. 1393-1395, 1991.

PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; SCALONI, A.; CAPASSO, A.; SANNIA, G. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The journal of Biological Chemistry*. v. 272, n. 50, p. 31301-31307, 1997.

PARK, C.; LIM, J.S.; LEE, Y.; LEE, B.; KIM, S.W.; LEE, J.; LEE, J.; KIM, S.; Optimization and morphology for decolorization of reactive black 5 *Funalia troglitii*. *Enzyme and Microbial Techonology*. v.40, p. 1758-1764, 2007.

PASTORE, G.M.; COSTA, V.S.R.; KOBLITZ, M.G.B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.* *Cienc. Tecnol. Alim.* v.23, p.135-140, 2003.

PERALTA, R.M.; SOUZA, C.G.M.; BÔER, C.G. As principais oxidorredutases de uso industrial. Ed. Legis Summa. Ribeirão Preto – SP. 2004.

PIETRO, R. C. L. R.; SAID, S.; Enzimas Como Agentes Biotecnológicos. Ed. Legis Summa. Ribeirão Preto – SP. 2004.

RAGHUKUMAR, C. Fungi from marine habitats: an application in bioremediation. Mycol. Res., v. 104, p. 1222-1226, 2000.

RANGANATHAN, S. V.; SRINIVASAN, L. N.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. Bioresource Technology, v.99, p.3975-3981, 2008.

REZENDE, M.I.; BARBOSA, A.M.; VASCONCELOS, A.F.; HADDAD, R.; DEKKER, R.F.H. growth and production of laccases by the ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, cultured on basal medium containing the herbicide Scepter (imazaquin). J. Basic microbial. v.45, p. 460-469, 2005.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. TRENDS in Biotechnonology, v. 24, p. 219-226, 2006.

RODRÍGUES COUTO, S.; RODRÍGUEZ, A.; PATERSON, R.R.M.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J.A. Laccase activity from the the fungus *Trametes hirsuta* using na air-lift bioreactor. Letters in Applied Microbiology. v. 42, p. 612-616, 2006.

SAHINER, B; CHAN, H.P.; HADJILSKI, L.M. Performance analysis of three-class classifiers: Properties of a 3-D ROC surface and the normalized volume under the surface for the ideal observer. IEEE TRANSACTIONS ON MEDICAL IMAGING. v. 27, p. 215-227, 2008.

SILVA, R.; GOMES, G. Ligninases. In: PIETRO, R. C. L. R.; SAID, S.; Enzimas Como Agentes Biotecnológicos. Ed. Legis Summa. Ribeirão Preto – SP. 2004.

SCHLIEPHAKE, K.; MAINWARING, D.E.; LONERGAN, G.T.; JONES, I.K. BAKER, W.L. Transformation and degradation of the disazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. Enzyme Microb. Technol. v.27, p. 100-107, 2000.

SHLEEV, S.V.; KHAN, I.G.; GAZARYAN, I.G.; MOROZOVA, O.V.; YAROLOPOV, A.I. Laccase-mediator systems and their applications: A review. Applied Biochemistry and biotechnology. v. 111, p. 167-183, 2004.

SILVA, C.C. Effects os soybean oil and Tween 80 on production of botryosphaeran by *Botryosphaeiria rhodina*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina-PR, 2007.

SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugars. Journal of Biological Chemistry, v.160, p.61-68, 1945.

STAJIC, M.; PERSKY, L.; FRIESEM, D. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 38, p.65-73, 2006.

STEHR, F.; KRETSCHMAR, M.; KRÖGER, C.; HUBE, B.; SCHÄFER, W. Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.22, p.347-355, 2003.

STUTZENBERGER, F.J. Interference of the detergent Tween 80 in protein assays. *Anal. Biochem.* v.207, p.249-254, 1992.

TAVARES, A.P.M.; COELHO, M.A.Z.; AGAPITO, M.S.M.; COUTINHO, J.A.P.; XAVIER, A.M.R.B. Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.134, p.233-248, 2006.

THONGEHUL, N.; YANG, S.T.; Controlling filamentous fungal morphology by immobilization on a rotating fibrous matrix to enhance oxygen transfer and l(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Ferment. Biotechnol. ACS SYM SER.* v. 862, p. 36-51, 2003.

THURSTON, C.F.. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, v. 140, p. 19-26, 1994.

TYCHANOWICZ, G. K.; SOUZA, D. F.; SOUZA, C. G. M.; KADOWAKI, M. K.; PERALTA, R. M. Copper improves the production of laccase by the White-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 49, n. 5, p. 699-704, 2006.

VANDANE, E.J., DERYCKE, D.G. Microbial inulinases: Fermentation process properties and applications. In: *Adv. Appl. Microbiol.* v.29, p. 139-176, 1983.

Van Der Merwe, J.J. Production of laccase by the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. *Dissertação de mestrado, University of the Free State, Bloemfontein, South África*, p.125, 2002.

VASCONCELOS, A.F.D.; BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; SCARMINIO, I.S. REZENDE, M.I. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. In the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Process Biochemistry*. v.35, p. 1131-1138, 2000.

VASCONCELOS, A.F.D.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M.; PACCOLA-MEIRELLES, L. Comparison of the laccases, molecular marker proteins, and induction of pycnidia by three species of botryosphaeriaceous fungi. *Mycoscience*. v. 42, p. 543-548, 2001.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Microbial Genetics Bulletin*, v.13, p.42-43, 1956.

WANG,H.X.; NG,T.B. A novel laccase with fair thermostability from the edible wild mushroom (*Albatrella dispansus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.315, p.450-454, 2004.

WALSH, C. Enabling the chemistry of life. *Nature.* v.409, p.226-231, 2001.

WARNER, J.C.; CANNON, A. S.; DYE, K.M. Green Chemistry. *Environmental Impact Assessment Review*, v.24, p.775-799, 2004.

WINDSTEN, P.; KANDELBAUER, A. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology.* v. 42, p.293-307, 2008.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens* *Journal of Bacteriology*, v.3, p.663-670, 1979.

XU,F. Laccase. In: Flickinger MC, Drew S.W. (eds) *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation.* v.3. John Wiley & Sons, New York, p. 1545-1554, 1996.

XU, F. Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Industrial Biotechnology.* v. 1, n. 1, p.38-49, 2005.

YAROLOV, A.I.; SKOROBOGATKO, O.V.; VARTANOV, S.S.; VARFOLOMEYEV, S.D. Properties, Catalytic Mechanism and Applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* v.49, p. 257-280, 1994.

YOSHIDA, H. Chemistry of lacquer (*Urushi*) part 1. *J. chem. Soc.* v.43, p. 472-486, 1883.

ZHANG,X.; EIGENDORF,G. STEBBING, D.W.; MANSFIELD, S.D. SADDLER, J.N. Degradation of trilinolein by lacase enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* v.405, p. 44-54, 2002.

APÊNDICE

APÊNDICE A
ARTIGO CIENTÍFICO

**“LACCASE PRODUCTION AND OPTIMIZATION BY *BOTRYOSPHERIA*
RHODINA MAMB-05 ON SOYBEAN OIL”**

**João Paulo Sacchetto, Maria Inês Rezende, Robert F. H. Dekker, Ieda S. Scarminio,
Marco A. Záchia Ayub, Aneli M. Barbosa***

**“LACCASE PRODUCTION AND OPTIMIZATION BY *BOTRYOSPHERIA*
RHODINA MAMB-05 ON SOYBEAN OIL”**

**João Paulo Sacchetto¹, Maria Inês Rezende¹, Robert F. H. Dekker², Ieda S. Scarminio³,
Marco A. Záchia Ayub⁴, Aneli M. Barbosa^{1*}**

Abstract

In the present work, it was evaluated the influence of inorganic (NH_4Cl , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and NH_4NO_3) and organic (yeast extract, urea, peptona, and milhocina®) nitrogen sources, inorganic phosphate sources (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , K_2HPO_4), and different concentrations of copper ions (0; 12.5; 25; 50 and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) in the production of laccase by the ascomycete *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, which was isolated from cankers of stems of eucalyptus (*Eucalyptus* spp.). Soybean oil was used as the only carbon source. A Central composite design (2^3) and the response surface methodology were used to optimize the enzyme production. The optimal conditions obtained were: NaNO_3 (100 g L^{-1}), KH_2PO_4 (125 g L^{-1}) and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. A validation experiment was done to confirm the optimization methodology of the production of laccase by *B. rhodina* MAMB-05, and the result obtained was $2.95 \pm 0.1 \text{ U mg}^{-1}$ of protein.

Keywords: *Botryosphaeria rhodina*. Laccase. Soybean oil. Surface methodology response.

Introduction

Laccases (bezenenediol: *p*- diphenol: dioxygen oxidoreductase (EC 1.10.3.2)), also known as polyphenol oxidase, are monomeric, dimeric, or tetrameric glycoproteins in the active form of holoenzymes, and have about five hundred amino acids in their primary structure [1,2,3]. The fungal laccase has been studied and applied in various biotechnological processes as the treatment of agro-industrial wastes, juices production, wines and beer clarifications, and biobleaching of paper pulp [4, 5, 6, 7]. Laccases are multi-copper

¹ Departamentos de Bioquímica e Biotecnologia e de Química, CCE, Universidade Estadual de Londrina, Cx.P. 6001, CEP 86051-990, Londrina-PR, Brasil. * Corroponding author: aneli@uel.br , Fax: +55-043-3371 4054. Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, CCE, Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, BRASIL.

² Biorefining Research Initiative, Lakehead University, Thunder Bay, Ontario, Canada P7B 5E1.

³ Departamentos de ¹Bioquímica e Biotecnologia e de ³Química, CCE, Universidade Estadual de Londrina, Cx.P. 6001, CEP 86051-990, Londrina-PR, Brasil

⁴ Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP 91540-000, Porto Alegre-RS, Brasil.

oxidases enzymes that reduce molecular oxygen to water, simultaneously performing an one-electron oxidation of various aromatic substrates such as diphenols, monophenols, and aromatic amines. These enzymes are involved in the pathogenicity and morphogenesis of a diversity of organisms, including ligninolytic fungi.

Barbosa et al. [8] have isolated from canker of eucalyptus a strain of *Botryosphaeria* sp., which was used for the production of ligninolytic enzymes and described as constitutive producer of laccase, which was not repressed by glucose when grown in the presence of polyaromatic dye Poly R-478. Vasconcelos et al. [9] optimized the production of laccase by *Botryosphaeria* sp. using glucose as carbon source, studying the influence of some variables such as time of cultivation, concentration of yeast extract and of veratryl alcohol. Garcia et al. [10] classified the organism as *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05.

The study of the conditions of cultivation is essential for optimization of processes of enzymes such as laccases, in order to produce large amounts of enzyme in media supplemented only with cheap and accessible substrates, making the large scale production economically viable. Response surface methodology (RSM) is an effective statistical technique for the investigation of complex processes. The main advantage of RSM is the reduced number of experimental runs needed to provide sufficient information for statistically acceptable results and it is a faster and less expensive method for gathering research data than the classical method [14].

In a previous work, Dekker et al. [11] used soybean oil in combination with Vogel's culture medium [12], and found that the *B. rhodina* MAMB-05 was able to produce laccase over this simple and inexpensive carbon source. However, best concentrations of soybean oil and other culture parameters were not optimized in that work. Therefore, the aims of this research was to optimize the production of laccase by *B. rhodina* MAMB-05 examining the compositions of culture medium by means of factorial design and RSM, and using soybean oil as the sole carbon source. Information concerning the use soybean oil as carbon source for fungal growth and enzyme production is lacking in the literature, and its implementation will contribute to research on the production, properties and applications of the enzymes produced by *B. rhodina* MAMB-05 and the development of new biotechnological processes.

Materials and Methods

Microorganism and culture conditions

The microorganism used was the ascomycete *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, which was isolated from canker of eucalyptus by Barbosa et al. [8] and identified by Garcia et al. [10]. Cell cultures were maintained on Potato–Dextrose agar at 4°C. *B. rhodina* MAMB-05 was grown under submerged cultivation in 125 mL baffled Erlenmeyer flasks, containing 25 mL of basal medium (pH 6) comprising at least half Vogel [12] and soybean oil (1% v v⁻¹) as sole carbon source. Each flask was inoculated with four spheres of 0.7 cm in diameter removed from the Petri dishes covered with fungal mycelium grown for 120 hours. Cultures were incubated at 28 ° C in an orbital incubator at 180 rpm.

Experimental Design

A previous screening of variables was performed to find parameters that could have any important influence on the production of laccase by *B. rhodina* MAMB-05 in soybean oil. The cultures were performed in duplicates, replacing the nitrogen sources in minimal medium of Vogel by inorganic salts such as NaNO₃, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃ concentration in the original basal medium and organic sources such as yeast extract, peptone, urea and milhocina[®]. The milhocina[®] was used as a suspension based on the methodology of Messias [15]. An experiment without the presence of nitrogen source was developed for performance assessment of the enzyme production.

The effect of phosphate concentration in the production of laccase by *B. rhodina* MAMB-05 was evaluated both in the presence of the original source of Vogel's minimal medium (1956) KH₂PO₄, as the replacement of the sources K₂HPO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄. Cultivation in the absence of a source of phosphate was also conducted to investigate its influence on the laccase production.

To evaluate the effect of the concentration of copper ions in the production of laccase, were tested different concentrations (0, 12.5, 25, 50 and 100 g mL⁻¹) of Cu²⁺ ions added to the medium of cultivation, as CuSO₄.5H₂O.

Based upon this preliminary test, the selected variables were the nitrogen and phosphate sources and concentrations of cation Cu²⁺. Selected the best sources and concentrations, a central composite factorial design 2³ was used to obtain the optimum conditions for production of laccase by *B. rhodina* MAMB-05 in soybean oil. The variables and their coded and decoded values to the various levels are presented in Table 1.

The design was composed of 17 experiments (in duplicates) and three replicates in the central point. Laccase activity was determined, and the data were adjusted in a second-order polynomial model as in equation (1):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

Where Y is the variable of response desired, the constant β_0 , β_i the coefficient for the linear effect, β_{ii} the coefficient for the quadratic effect β_{ij} the coefficient for the effect of interacting variables, X_i and X_j represent the coded values of variables x_i and x_j . A quadratic equation described above was used to plot the areas of responses to the variables. The analysis concerning the response surface methodology and ANOVA were performed with the STATISTICA, version 6.0

Enzyme assay

The cell-free extract (CFE) used as a source of laccase, was obtained after removal of mycelium by centrifugation at $2,236 \times g$, $4^\circ C$, for 15 minutes. The activity of laccase was determined using 2,21-azino-bis acid (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma) as substrate in pH 3.0 buffered with 120 mM citrate-phosphate [16]. The final volume of the ELC was 1.0 mL and this was incubated at $50^\circ C$ for 5 minutes, and the absorbance was measured at 420 nm ($\xi = 36,000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Laccase activity is expressed in units as the number of μmols of the oxidized product formed per minute in one milliliter of enzyme solution.

The extracellular proteins were determined by the method described by Hartree [17]. The biomass of fungal mycelium was determined by constant gravimetric dry weight at $70^\circ C$.

Results and Discussion

Preliminary screening of nitrogen, phosphate and copper sources for the production of laccase by B. rhodina

Different sources of nitrogen are described as being responsible for the increase of laccase activity of some microorganisms [11]. Figure 1 A shows the influence of the tested nitrogen sources on laccase production. The NaNO_3 was the best nitrogen source for production of laccase by *B. rhodina* MAMB-05 in soybean oil as carbon source, showing activities of $2.49 \pm 0.09 \text{ U mg}^{-1}$, significantly better when compared to NH_4NO_3 , originally used in Vogel's medium, in which the activity was $0.05 \pm 0.007 \text{ U mg}^{-1}$. Cavallazzi, et al. [18] investigated the effect of ammonium tartarate in the production of laccase by *Lentinula edodes*, and showed that the appropriate use of the nitrogen source greatly influences the production of the enzyme, since the use of this source increased the laccase activity from 50 U mL^{-1} to 250 U mL^{-1} , when compared to vanillin and the control. Dekker et al. [11] demonstrated the influence of different sources of nitrogen in the production of laccase by *B. rhodina* MAMB-05 when cultured in glucose and have found that in the presence of NH_4Cl the activity of the enzyme was reduced, even in the presence of veratryl alcohol ($0.13 \pm 0.02 \text{ U mL}^{-1}$), According to the authors, this may be explained by the potential inhibitory action chloride ion exerts on the activity of laccase.

Hao et al. [19] investigated the effect of different sources of nitrogen in the production of laccase by the fungus *Pestalotiopsis* sp. and found that ammonium tartarate was the best, when compared with urea, yeast extract, ammonium nitrate, ammonium oxalate, ammonium chloride, ammonium sulfate and acrylamide, producing activities of laccase of 14 U mL^{-1} . They also observed that concentrations below 15 g L^{-1} can reduce the activity of laccase. Stajic et al. [20] shows that the assimilation of different nitrogen sources is variable for each microorganism and strongly influenced by the characteristics of cultivations.

According to the literature, the presence of KH_2PO_4 in the medium positively influences the activity of laccase [28]. The results obtained in the preliminary screening of variables (Figure 1B), indicated that Vogel's minimal medium composition with KH_2PO_4 , was the best ($1.59 \pm 0.07 \text{ U mg}^{-1}$) for the production of laccase by *B. rhodina* MAMB-05 when using soybean oil as carbon source. In the absence of phosphate, the production of biomass was positively affected (9.76 g L^{-1}) when compared to Vogel's original formula containing KH_2PO_4 (6.12 g L^{-1}). or NaH_2PO_4 (4.43 g L^{-1}).

In a series of studies to determine the influence of phosphate on laccase activities, Cavallazzi et al. [18, 21] found that KH_2PO_4 was the best source for enzyme production in cultures of *Lepista sordida* (140 U L^{-1}), and *Lentinus edodes* (250 U mL^{-1}) when compared to other sources.

The production of laccase by different fungi is regulated by the presence of the ion copper, which is in the active site of the protein structure. Dekker et al. [11], tested different concentrations of Cu^{2+} (0-40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for the production of laccase by *B. rhodina* MAMB-05 growing on glucose and have found that in the absence of it *B. rhodina* MAMB-05 produces only a tiny amount of laccase, suggesting that this enzyme is copper-dependent. The ideal concentration was established in 10.24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ at which the highest enzyme activity was achieved.

Palmieri et al. [22] reported that copper ions induced the production of laccase in cultures of *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. The production of this enzyme by *Pleurotus ostreatus* also significantly increases with higher concentrations of Cu^{2+} ions added to cultivation. According to these authors, the presence in both the absence of copper ions did not alter the fungal biomass.

Although for Dekker et al. [11], the amount of copper required for the production of laccase by *B. rhodina* MAMB-05 in the presence of glucose 10 g L^{-1} , varies between 0.003 and 40 g mL^{-1} , this study found that in the presence of soybean oil as sole carbon source the appropriate concentration of copper was higher. The same authors also argue that when concentrations higher than 41 mg mL^{-1} of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ were added to the culture medium for biomass production was affected negatively by reducing by 16% the total. This trend can be found in this work, since the production of biomass was lower when the amount of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ was 50 g mL^{-1} than in lower concentrations. Baldrian and Gabriel [24] showed that the biomass produced by *Pleurotus ostreatus* is reduced in the presence of 5 mM Cu on growing. For the authors the presence of copper not only induces the expression of the laccase gene, but also positively affects the stability of the enzyme.

Besides these advantages, Tychanowicz et al. [25] and Hao et al. [19] stated that high concentrations of copper and aromatic compounds increase the production of laccase by ascomycete *Podospora anserina*, and that this enzyme acts in a defense mechanism against oxidative stress caused by free radicals. The mechanism of action is based on the formation of a chelate between copper ions during the synthesis of laccase.

Based on these results, NaNO_3 and KH_2PO_4 were chosen as a variable in the factorial design experiment.

Optimization of laccase production by CCD

From the screening of variables, a factorial design was proposed in order to study the influence of each variable and the interactions between them on the production of laccase by *B. rhodina* MAMB-05 in soybean oil. The responses observed in this design are shown in Table 2. All effects were statistically significant, at 95% confidence. Looking up the values of laccase activity in the different cultures it is concluded that the optimal concentrations of KH_2PO_4 , NaNO_3 and Cu^{2+} ions for maximum production of laccase ($3.07 \pm 0.04 \text{ U mg}^{-1}$) by *B. rhodina* MAMB-05 in soybean oil as carbon source, occurs exactly in the center of the factorial design, which was composed of the following values decoded, respectively, 125 g L^{-1} , 100 g L^{-1} and 50 g mL^{-1} .

Vasconcelos et al. [9] optimized the production of laccase by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol (VA) and found that the concentration of VA ($\pm 35 \text{ mM}$) and time of cultivation (4-5 days) were significant effects in the production of polyphenol oxidase. Tavares et al. [26] optimized the production of laccase by *Trametes versicolor* by the studies of the concentration of glucose, pH and agitation of the medium, the mathematical model obtained showed that only the concentration of glucose (9 g L^{-1}), pH (5) and the interaction of both variables were significant in the synthesis of the enzyme.

In this work, results presented on the Pareto chart (Figure 3) show the relative importance of the effects and verify the possibility of the elimination of factors that are less important. This results clearly shows that the effect of copper is the most significant factor in the production of laccase, followed by nitrogen, which also proved to be important. Shows also that the interactions between copper versus copper versus nitrogen and phosphate are not significant at the 95% confidence, so you can discard them.

From the analysis of variance (ANOVA), it was concluded that the model was significant ($p < 0.0001$), with a coefficient of determination $R^2 = 0.72$, 72% of the total variation is explained by the model. This suggests that the model generated provides a good correlation between experimental and expected values. The predicted values versus the values observed confirm that the proposed model describes well the experimental data, since the points fall near the straight line.

The regression coefficients, obtained by multiple regression analysis in terms of coded variables and their values for standard error are shown in Equation 2. All values represented are significant ($p < 0.05$), therefore, when possible, the obtained models are simplified by the elimination of terms that are not statistically significant, with this, the second-order polynomial model was presented in reduced form:

$$\hat{Y} = 2.747 + 0.11x - 0.73x^2 + 0.816y - 0.803y^2 - 0.061z - 0.664z^2 - 0.061yz \quad (2)$$

(± 0.03) (± 0.02) (± 0.02) (± 0.02) (± 0.02) (± 0.02) (± 0.02) (± 0.02)

where Y is the specific activity of laccase, and x, y, and z are the values encoded copper, KH_2PO_4 and NaNO_3 , respectively.

The negative sign of the coefficient of linear term yz, which is a consequence of the opposite signs of the coefficients of linear terms y (concentration of KH_2PO_4) and z (concentration of NaNO_3) indicates the existence of a relationship of inverse proportionality between these two effects. According to this model, a decrease in the concentration of NaNO_3 must be accompanied by a slight increase in the concentration of KH_2PO_4 to get an increase in production activity of laccase.

The result of the factorial design was represented by control surfaces, which were used to optimize the production of laccase. Thus, the relationship between variables and their responses can be understood, as Figure 2.

All three control surfaces exhibit a similar behavior in the specific activity of laccase predicted, reaching the maximum activity at $3.07 \pm 0.04 \text{ U mg}^{-1}$. Through these areas, it was observed that, to achieve the maximum production of laccase by *B. rhodina* MAMB-05 in soybean oil, must be used in the medium concentrations of nutrients between 48 to 52 $\text{g mL}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, 99 to 101 $\text{g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ and 124 to 126 g L^{-1} in KH_2PO_4 .

Other potentially important variables in the production of laccase by *B. rhodina* MAMB-05 were not included in this factorial design, such as initial pH of the culture of the microorganism. Medeiros et al. [27] optimized the production of laccase by *Pleurotus ostreatus* studying the initial pH, concentration of yeast extract and action of inducers, the results showed that only the initial pH of the culture (6.0-6.5) and the concentration of the extract of yeast (0-0.25%) were statistically significant in the synthesis of the enzyme.

To confirm the possible applicability of the model obtained, experiments were performed in optimum conditions given above, and the result of the enzymatic activity of laccase was $2.95 \pm 0.1 \text{ U mg}^{-1}$.

Conclusions

In this work, the optimization of the composition of the culture medium influenced the activity of laccase synthesized by *B. rhodina* MAMB-05 positively. The results presented concluded that among all sources of nitrogen and phosphate studied, only KH_2PO_4 and NaNO_3 were significant, as the concentration of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ copper ion. Thus, so as to realize the optimization of laccase production by 1% (v v⁻¹) of soybean oil by *B. rhodina* MAMB-05 is necessary that the composition of the medium presents 125 g L^{-1} KH_2PO_4 and 100 g L^{-1} NaNO_3 .

Acknowledgments

The authors wish to thank CNPq and CAPES for their financial support of this research. The authors express their gratitude to Dr. Simone H Flôres for valuable suggestions on CCD.

References

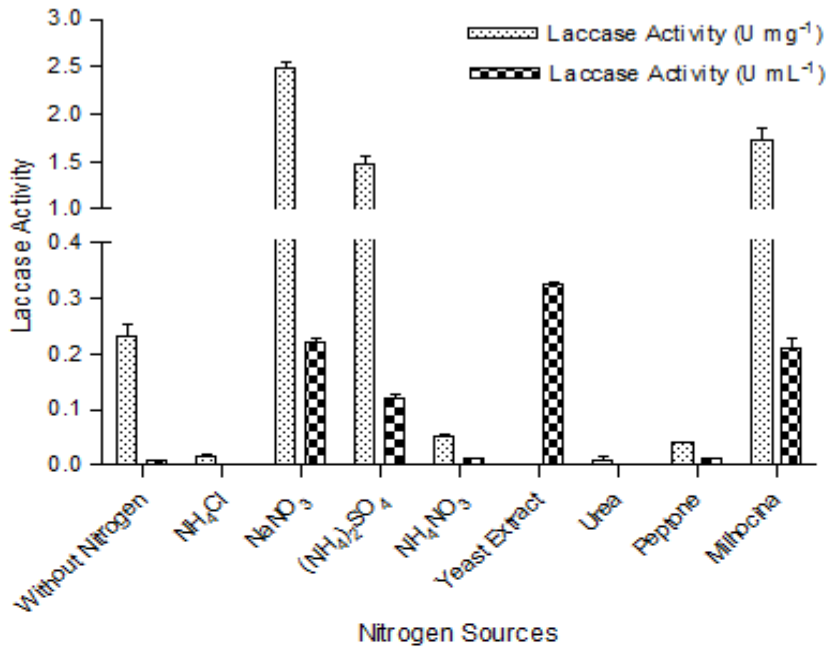
- [1] Xu F. Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Ind Biotechnol* 2005;1:38-49.
- [2] Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Microbiol* 1994;140:19-26.
- [3] Niladevi KN, Prema P. Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolorization. *Biores Technol* 2008;99:4583-4589.
- [4] Smith M, Thurston CF, Wood DA. Fungal laccases: role in delignification and possible industrial applications. In: *Multi-cooper oxidases*, World Scientific, Singapore, cap. 7, p. 201-204, 1997.
- [5] Durán N, Esposito E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl Catal Environm* 2000;28:83-99.
- [6] Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Adv* 2003;22:161-187.
- [7] Minussi RC, Pastore GM, Duran N. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci Technol* 2002;13:205-216.
- [8] Barbosa AM, Dekker RFH, Kurtböke I, Hardy GES. *In vivo* decolorization of poly R-478 as a method for screening ligninolytic microorganisms for use in bioremediation. *Proceedings. 4th PACIFIC RIM Biotechnology Conference*, Melbourne, Australia, p.88-90, 1995.
- [9] Vasconcelos AFD, Barbosa AM, Dekker RFH, Scarminio IS, Rezende MI. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Process Biochem* 2000;35:1131-1138.
- [10] Garcia JE, Vilas-Boas LA, Dekker RFH, Fúngaro MHP, Barbosa AM. Molecular identification of a species of *Botryosphaeria* sp.; *Botryosphaeria rhodina*. GenBank. Accession number: AY612337, 2004.
- [11] Dekker RFH, Barbosa AM, Giese EC, Godoy SDS, Covizzi LG. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *Int Microbiol* 2007;10:177-186.

- [12] Vogel HJ. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. Microbial Gen Bull 1956;13:42-43.
- [13] Silva CC, Dekker RFH, Silva RSSF, Corradi da Silva ML, Barbosa, AM. Effect of soybean oil and Tween 80 on the production of botryosphaeran by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Process Biochemistry 2007; 42: 1254-1258.
- [14] Neto BB, Scarminio IS, Bruns RE. Como fazer experimentos. Campinas – SP: Ed. Unicamp, 2007.
- [15] Messias JM, Costa BZ, Lima VMG, Dekker RFH, Rezende MI, Krieger N, Barbosa AM. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. Enzyme and Microbial Technology. In Press, Corrected Proof, available online 26 August 2009.
- [16] Barbosa AM, Dekker RFH, Hardy GE. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. Lett Appl Microbiol 1996;23:93-96.
- [17] Hartree D. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. Anal Biochem 1972;48:422-427.
- [18] Cavallazzi JR, Kasuya CM, Soares MA. Screening of inducers for lacase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. Braz J Microbiol 2005;36:383-387.
- [19] Hao J, Song F, Huang F. Production of lacase by isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. J Microbiol Biotechnol 2007;34:233-240.
- [20] Stajic M, Persky L, Friesem D. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. Enz Microbial Technol 2006;38:65-73.
- [21] Cavallazzi JR, Oliveira MGA, Kasuya CM. Laccase production by *Lepista sordida*. Braz J Microbiol 2004;35:261-263.
- [22] Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, Sannia G. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. J Biol Chem 1997;272:31301-31307.
- [23] Klonowska A, Le Petit J, Tron T. Enhancement of minor lacases production in the basidiomycete *Marasmius quercophilus* C30. FEMS Microbiol Lett 2001;200:25-30.
- [24] Baldrian P, Gabriel J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. FEMS Microbiol Lett 2002;206:69-74.
- [25] Tychanowicz GK, Souza DF, Souza CGM, Kadowaki MK, Peralta RM. Copper improves the production of laccase by the White-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. Braz Arch Biol Technol 2006;49:699-704.
- [26] Tavares APM, Coelho MAZ, Agapito MSM, Coutinho JAP, Xavier AMRB. Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. Appl Biochem Biotechnol 2006;134:233-248.

[27] Medeiros, MB, Bento AV, Nunes ALL, Oliveira, SC. Optimization of some variables that affect the synthesis of laccase by *Pleurotus ostreatus*. *Bioprocess Engineering* 1999;21:483-487.

[28] Rodriguez Couto, S, Toca-Herrera, JL. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances* 2007;25:558-569.

(A)



(B)

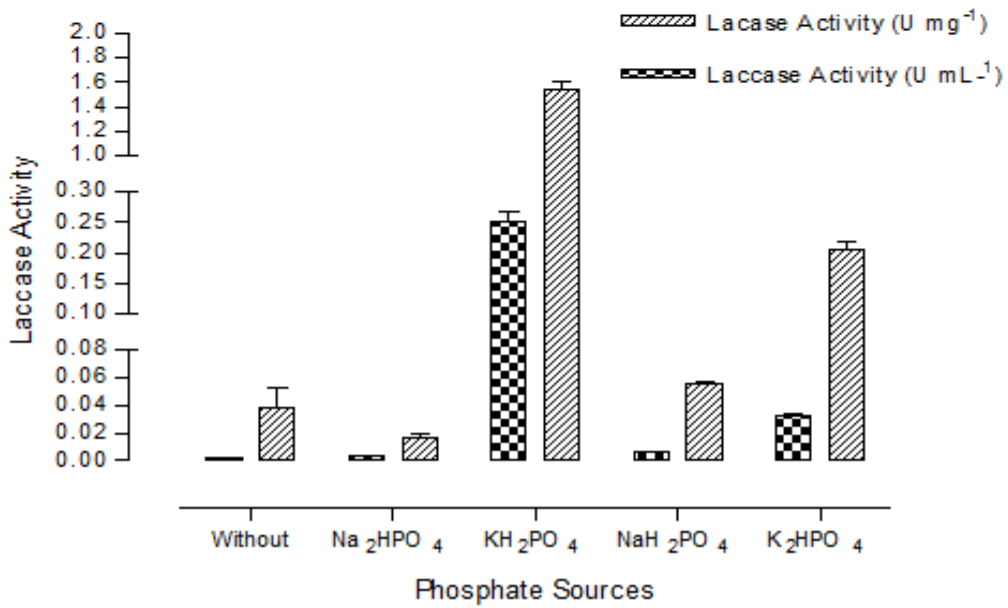


Figure 1 – Activity of laccase produced by *B. rhodina* MAMB-05 in soybean oil as sole carbon source and (A) different sources of nitrogen and (B) different sources of phosphate

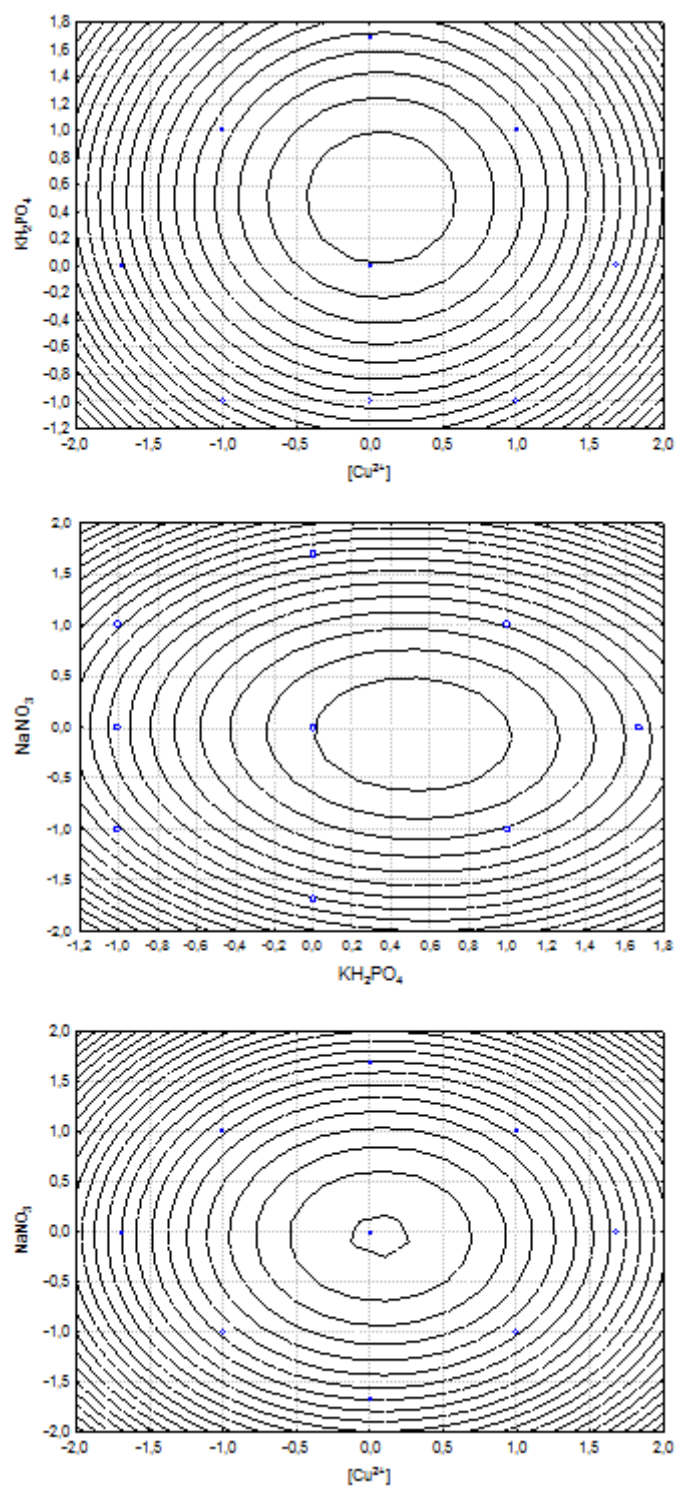


Figure 2 – Contour surfaces of the laccase activity of *B. rhodina* MAMB-05 produced using soybean oil as sole carbon source

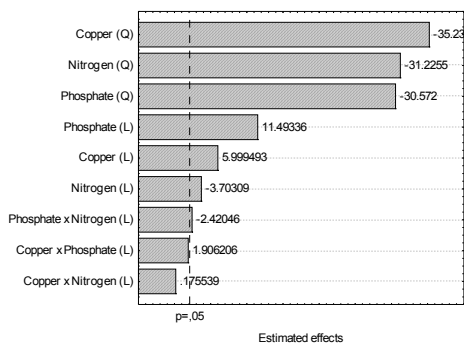


Figure 3 – Efeitos significativos e não significativos das variáveis na produção de lacase por *B. rhodina* MAMB-05 em óleo de soja como única fonte de carbono

Table 1 – The process variables and their levels used in the Central Planning Compound 2^3 (CPC)

RUN#	VARIABLES IN CODED LEVELS				
	A	B	C		
1	-1	-1	-1		
2	+1	-1	-1		
3	-1	+1	-1		
4	+1	+1	-1		
5	-1	-1	+1		
6	+1	-1	+1		
7	-1	+1	+1		
8	+1	+1	+1		
9	+1.68	0	0		
10	-1.68	0	0		
11	0	-1	0		
12	0	+1.68	0		
13	0	0	+1.68		
14	0	0	-1.68		
15 (0)*	0	0	0		
16 (0)	0	0	0		
17 (0)	0	0	0		
Factors	Real Values				
	-1.68	-1	0	+1	+1.68
A [Cu ²⁺] (µg ml ⁻¹)	8	25	50	75	100
B [KH ₂ PO ₄] (g l ⁻¹)	0	0	125	250	335
C [NaNO ₃] (g l ⁻¹)	16	50	100	150	184

(#) – All runs were done in duplicate.

(*) - Central runs

Table 2 – Responses observed in 2^3 factorial design to evaluate the effects of varying concentrations of NaNO_3 , KH_2PO_4 and Cu^{2+} ions

RUNS#	VARIABLES IN CODED LEVELS			RESPONSES			
	A	B	C	LACCASE ACTIVITY (U ml^{-1})	ESPECIFIC LACCASE ACTIVITY (U mg^{-1})	pH	BIOMASS (g l^{-1})
1	-1	-1	-1	0.02	0.02	8.2	7.54
2	+1	-1	-1	0.01	0.007	8.6	7.16
3	-1	+1	-1	0.62	1.52	6.6	6.50
4	+1	+1	-1	1.22	2.26	6.7	8.31
5	-1	-1	+1	0.02	0.01	8.7	7.57
6	+1	-1	+1	1.11	0.57	7.8	3.95
7	-1	+1	+1	0.99	1.82	6.6	7.89
8	+1	+1	+1	1.88	2.02	7.3	8.80
9	+1.68	0	0	0.02	0.01	8.4	7.37
10	-1.68	0	0	0.003	0.004	9.0	8.21
11	0	-1	0	0.004	0.001	9.3	2.64
12	0	+1.68	0	0.60	0.90	6.5	7.21
13	0	0	+1.68	0.003	0.001	8.7	3.06
14	0	0	-1.68	0.57	0.29	6.8	5.14
15 (0)	0	0	0	1.61	3.04	6.9	7.24
16 (0)	0	0	0	1.68	3.11	7.1	8.44
17 (0)	0	0	0	1.66	3.07	6.9	6.53

A - $[\text{Cu}^{2+}]$ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

B - $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ (g l^{-1})

C - $[\text{NaNO}_3]$ (g l^{-1})

(#) – All runs were done in duplicate.