



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014008502-5 A2



(22) Data do Depósito: 09/04/2014

(43) Data da Publicação: 01/12/2015

(RPI 2343)

(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DA ENZIMA LACASE POR FUNGO MARINHO, ENZIMA LACASE E USO DA MESMA

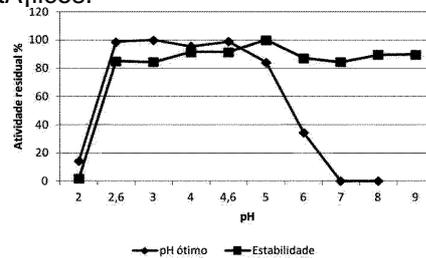
(51) Int. Cl.: C12N 9/04; C12N 1/16

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

(72) Inventor(es): LARA DURÃES SETTE, RAFAELLA COSTA BONUGLI SANTOS, CÁROL CABRAL TERRONE, ELEONORA CANO CARMONA

(74) Procurador(es): FABÍOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) Resumo: PROCESSO DE OBTENÇÃO DA ENZIMA LACASE POR FUNGO MARINHO, ENZIMA LACASE E USO DA MESMA. A presente invenção está relacionada com a otimização das condições de cultivo para produção de lacase por um fungo derivado de ambiente marinho. Tais condições permitiram a obtenção de quantidades significativas de lacase após a purificação (1.300 U/L) com atividade enzimática ótima em pH 3,0 e 60 °C e com peso molecular na faixa de 60 a 70 kDa. Nas condições de cultivo otimizadas a enzima apresentou eficiente estabilidade frente a diferentes valores de pH e temperatura, com manutenção de 100% da estabilidade térmica após 1 h mesmo em temperatura de 62 °C, e da estabilidade frente a diferentes pHs após 48 h, além da resistência a íons metálicos.



**"PROCESSO DE OBTENÇÃO DA ENZIMA LACASE POR FUNGO  
MARINHO, ENZIMA LACASE E USO DA MESMA"**

CAMPO DA INVENÇÃO

[1] A presente invenção se insere no campo de  
5 aplicação da Química, Farmácia, Microbiologia,  
Biotecnologia e, mais especificamente, nas áreas de  
degradação de poluentes; nas indústrias alimentícia, de  
polpa e papel e têxtil; e, aplicações farmacêuticas e  
cosméticas, uma vez que se refere a um processo de obtenção  
10 otimizado da enzima lacase, produzida pelo fungo marinho  
*Peniophora sp.* CBMAI 1063.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[2] Os fungos filamentosos produtores de enzimas  
ligninolíticas são fontes potenciais de recursos genéticos  
15 para aplicação em processos de biorremediação de diversos  
poluentes ambientais, incluindo os efluentes de indústrias  
têxteis. Esses efluentes além de alto teores de corantes  
contêm também valores extremos de pH e sais, os quais podem  
variar de 20 a 80%, representando um dos principais  
20 problemas durante sua degradação por microorganismos. Neste  
contexto, os fungos derivados de ambiente marinho podem ser  
considerados estratégicos por estarem adaptados às  
condições de salinidade.

[3] O oceano cobre mais de 70% da superfície  
25 terrestre e é considerado como um grande reservatório de  
recursos naturais. No entanto, a dimensão da biodiversidade  
marinha, em especial dos microrganismos, quase não é  
conhecida. Estima-se que a diversidade biológica dos  
ecossistemas marinhos é maior do que nas florestas  
30 tropicais.

[4] Invertebrados marinhos, principalmente esponjas, representam uma importante fonte de produtos naturais potencialmente ativos e biologicamente funcionais. Muitos desses compostos apresentam atividade citotóxica, antibacteriana, antifúngica, antiviral ou anti-inflamatória.

[5] Vários estudos têm relatado a descoberta de novos compostos bioativos de organismos marinhos, concentrando-se principalmente na química de metabolitos secundários, que incluem agora mais de 15.000 compostos bioativos estruturalmente diversos isolados durante os últimos 30 anos. O metabolismo secundário de microorganismos de origem marinha começou a ser investigado muito mais recentemente. No entanto, as associações ecológicas que ocorrem entre os microrganismos e os substratos marinhos têm sido amplamente negligenciadas.

O fungo *Peniophora* sp.

[6] O fungo basidiomiceto de ambiente marinho é capaz de produzir enzimas ligninolíticas em condições salinas, principalmente a enzima lacase, capaz de descolorir corante e efluente têxteis e de degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

[7] O basidiomiceto *Peniophora* sp. linhagem 205 foi isolado da esponja marinha *Amphimedon viridis* e taxonomicamente identificado na Divisão de Recursos de Microbianos (DRM) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas UNICAMP. Inicialmente, a identificação foi realizada por meio do sequenciamento da região D1/D2 do gene 28S (código 205), e, em seguida, a identificação do

fungo foi confirmada utilizando a região ITS e D1/D2.

[8] O isolado encontra-se depositado na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) do CPQBA/UNICAMP sob o acrônimo CBMAI 1063 e uma  
5 cópia do mesmo encontra-se preservada na coleção de culturas do Instituto de Biociências de Rio Claro, intitulada Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).

A enzima lacase

10 [9] Lacases são oxidases que catalisam a oxidação de uma variedade de hidrocarbonetos aromáticos doadores, com a concomitante redução de oxigênio a água. Em geral, essas enzimas são monoméricas ou, raramente, glicoproteínas homo e heterodiméricas ou homotetraméricas. Sua atividade  
15 depende de quatro íons cobre distribuídos por três sítios de ligação altamente conservados.

[10] Além disso, elas são capazes de degradar compostos não fenólicos na presença de compostos mediadores tais como 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)  
20 (ABTS) e 1-hidrobenzotriazol (HBT) ou metabólitos fúngicos presentes naturalmente em solos incluindo ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA). Assim, essas enzimas têm ampla especificidade de substrato e são capazes de oxidar uma gama de compostos xenobióticos.

25 [11] São umas das mais importantes enzimas lignina-degradantes e tem um grande potencial em aplicações no setor ambiental (degradação de poluentes) e no setor industrial incluindo as indústrias de produtos químicos, combustíveis, alimentos, agrícola, papel, têxtil e de  
30 cosméticos, como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1. Aplicações biotecnológicas das lacases

Indústria Alimentícia	Indústria de Polpa e Papel	Indústria de Têxtil	Bioremediação	Aplicações Farmacêuticas, Cosméticas e em Nanotecnologias
Remoção de Fenóis de Alimentos e Bebidas; Diminuição de Turbidez	Despolimezação da Lignina; Deslignificação da Polpa na Madeira; Bio-branqueamento da Polpa Kraft	Degradação de Corantes	Biodegradação de componentes xenobióticos	Produção de Polímeros; Agentes Farmacêuticos; Biosensores; Novos Produtos Sintéticos.

[12] Apesar de muitos estudos de atividade de lacase terem sido realizados, o seu papel biológico nos fungos ainda é incerto. Os relatórios indicam sua participação no crescimento celular, no controle de fatores de patogenicidade e pigmentação de esporos, esporulação, e a degradação da lignina, entre outras funções.

[13] Lacases fúngicas têm sido relatadas em diferentes grupos, principalmente no filo *Basidiomycota*, entre as quais se incluem o grupo ecológico de fungos xilófagos brancos (white-rot fungi - WRF). Estes WRF são capazes de degradar e mineralizar a lignina por via aeróbia. No entanto, há pouca informação disponível sobre a produção de lacase por fungos de origem marinha.

[14] Desde que fungos de ambientes marinhos se

adaptaram a salinidade, é razoável supor que os metabólitos secundários biologicamente ativos diferem das suas congêneres terrestres. Existem lacases produzidas por fungo do gênero *Peniophora* de origem terrestre. Entretanto o  
5 processo produtivo é diferente e essas enzimas não foram ainda caracterizadas quanto às propriedades físico-químicas. A enzima do fungo marinho *Peniophora sp.* CBMAI 1063 é produzida em quantidade significativa em condição salina.

10 [15] No entanto, este grupo de microorganismos apenas recentemente atraiu a atenção como uma fonte potencial de novas atividades enzimáticas e processos de biodegradação. Neste contexto, o estudo de enzimas extracelulares produzidas por microorganismos de origem marinha é de alto  
15 interesse em biotecnologia aplicada.

[16] Fatores como pH, período de incubação, temperatura, aeração, agitação, a adição de indutor e a taxa de carbono/nitrogênio podem influenciar na atividade da lacase. Estudos mostraram que a composição do meio de  
20 cultura e do método de incubação tem uma influência direta sobre a expressão gênica e resulta em diferentes isoformas do gene da lacase. Recentemente, o desenvolvimento de métodos moleculares tem permitido o estudo de funções da lacase fúngica e das isoformas do gene da lacase.

#### 25 ESTADO DA TÉCNICA

[17] O artigo "*The Production of Ligninolytic Enzymes by Marine-Derived Basidiomycetes and Their Biotechnological Potential in the Biodegradation of Recalcitrant Pollutants and the Treatment of Textile Effluents*" descreve a produção  
30 de enzimas ligninolíticas sob condições salina e não-salina

e descoloração de corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR) por três basidiomicetos recuperados a partir de esponjas marinhas, incluindo o fungo *Peniophora sp.* linhagem 205. Contudo neste trabalho a atividade da enzima lacase não foi estudada profundamente visto que o objetivo do estudo era a avaliação da degradação do corante RBBR e um efluente têxtil. A atividade de lacase foi apenas detectada durante o processo de descoloração do corante.

[18] O artigo "*Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes*" avalia genes de lacase de três basidiomicetos de origem marinha, entre eles do fungo *Peniophora sp.* Linhagem 205 e as suas respectivas atividades. Neste trabalho o potencial de produção da enzima lacase foi identificado usando condições de cultivo disponíveis na literatura. Não houve neste estudo nenhum desenvolvimento de uma condição de cultivo específica para a produção de lacase pelo fungo em questão. A avaliação da produção de lacase bem como a otimização do processo produtivo foi minuciosamente desenvolvido na presente invenção. Cabe ressaltar que o objetivo principal do trabalho acima citado foi conhecer o potencial de produção da enzima lacase por basidiomicetos de origem marinha sem nenhuma informação mais detalhada sobre a produção e sobre as características da enzima produzida.

#### 25 Objetivo e vantagens da invenção

[19] O objetivo da presente invenção é otimizar a produção da enzima lacase por fungo marinho (condições de cultivo).

[20] A otimização da produção da enzima lacase pelo fungo *Peniophora sp.* CBMAI 1063 por meio de desenho

experimental permitiu um aumento da atividade enzimática de aproximadamente 430 vezes (1.300 U/L). A lacase produzida, depois de purificada (18 U), foi capaz de descolorir 70 % do corante Preto Reativo 5 (200 mg/L) sem adição de mediadores após 5 h, confirmando o seu potencial para descoloração de corantes e efluentes têxteis.

[21] Enzimas produzidas por micro-organismos de ambiente marinho têm sido relatadas como mais eficientes do que as produzidas por micro-organismos terrestres, principalmente para degradação de corantes e efluentes têxteis em condições extremas de pH e temperatura. As lacases possuem um amplo espectro de aplicação, podendo ser utilizadas nas indústrias de alimentos (remoção de fenóis de alimentos e bebidas; diminuição de turbidez), de polpa e papel (da lignina; deslignificação da polpa na madeira; bio-branqueamento da polpa kraft), têxtil (degradação de corantes e efluentes), em processos de bioremediação (biodegradação de componentes xenobióticos), bem como nos setores farmacêuticos, de cosméticos e em nanotecnologias (produção de polímeros; agentes farmacêuticos; biosensores; novos produtos sintéticos).

#### BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[22] A presente invenção está relacionada com a otimização das condições de cultivo para produção de lacase por um fungo derivado de ambiente marinho. Tais condições permitiram a obtenção de quantidades significativas de lacase após a purificação (1.300 U/L) com atividade enzimática ótima em pH 3,0 e 60 °C e com peso molecular na faixa de 60 a 70 KDa. Nas condições de cultivo otimizadas a enzima apresentou eficiente estabilidade frente a

diferentes valores de pH e temperatura, com manutenção de 100% da estabilidade térmica após 1 h mesmo em temperatura de 62 °C, e da estabilidade frente a diferentes pHs após 48 h, além da resistência a íons metálicos.

#### 5        BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[23] A Figura 1 representa graficamente a estratégia do planejamento experimental que permitiu o aumento de 430 vezes da atividade da lacase produzida pelo fungo *Peniophora sp.* CBMAI 1063.

10        [24] A figura 2 representa graficamente a superfície de resposta para a atividade de lacase pelo fungo *Peniophora sp.* CBMAI 1063 em função da variável 1 Extrato de levedura e da variável 2 CuSO<sub>4</sub> de acordo com o DCCR.

[25] A figura 3 representa graficamente a cinética da  
15        atividade de lacase produzida pelo fungo *Peniophora sp.* CBMAI 1063 nas condições validadas de otimização.

[26] A figura 4 representa graficamente a influência  
do pH na atividade da lacase produzida pelo fungo  
*Peniophora sp.* CBMAI 1063 e estabilidade aos diferentes pHs  
20        após 48 h de incubação a 4 °C.

[27] A figura 5 representa graficamente a influência  
da temperatura na atividade da lacase produzida pelo fungo  
*Peniophora sp.* CBMAI 1063 e estabilidade térmica após 1 h.

[28] A figura 6 representa graficamente o efeito de  
25        íons metálicos na atividade da lacase produzida pelo fungo  
*Peniophora sp.* CBMAI 1063.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[29] Para alcançar a otimização do processo de  
produção, a influência de diferentes fatores no processo  
30        produtivo foi avaliada por meio da aplicação de 3

planejamentos experimentais, 2 do tipo Plackett e Burman (P&B) e 1 delineamento composto central rotacional (DCCR).

[30] Inicialmente na metodologia do planejamento experimental como se conhecia pouco do processo, utilizou-se da estratégia de triagem das condições de cultivo através da técnica conhecida como Plackett e Burman (P&B), que promoveu a seleção de variáveis com foco na redução do número de ensaio. As variáveis avaliadas no 1º P&B foram as concentrações de: inóculo do fungo, glicose, malte, extrato de levedura, farelo de trigo,  $\text{CuSO}_4$  e peptona; além da salinidade e do pH. No 2º P&B algumas das variáveis foram novamente estudadas, entretanto em uma nova faixa, juntamente com novas 3 variáveis: biotina, riboflavina e ácido glutâmico. Nesta triagem os efeitos principais de acordo com um modelo linear e as variáveis que influenciaram no processo foram avaliadas.

[31] Na segunda fase, a mais bem sucedida técnica usada para análise e otimização das variáveis de um processo, o delineamento composto central rotacional (DCCR), possibilitou a avaliação dos efeitos da concentração do extrato de levedura e do  $\text{CuSO}_4$  individualmente e de suas interações sobre a produção da enzima, uma vez que estas variáveis foram identificadas no P&B como altamente significativas para o processo. Ao final, a metodologia de superfície de resposta pode ser empregada para obtenção de um modelo teórico e dedução das condições otimizadas. Esta metodologia foi de grande importância para os resultados obtidos e permitiu um aumento de aproximadamente 430 vezes ou 1.300 U/L de lacase em quatro bateladas de estudo, incluindo a validação, que

totalizaram 52 ensaios (figura 1).

[32] O gráfico de contorno e superfície de resposta, gerado a partir do modelo matemático obtido após a condução do DCCR (figura 2), demonstra que as variáveis estão na região de otimização, uma vez que o raio de maior atividade está completamente dentro da superfície de resposta. De acordo com o gráfico as faixas de valores que resultam na melhor atividade enzimática são: 1,12 a 2,74 g/L de extrato de levedura e 2 a 4,92 mM de  $\text{CuSO}_4$ .

[33] A fim de verificar a adequação do modelo matemático obtido (DCCR), bem como validar a otimização, a atividade da lacase foi testada utilizando as condições otimizadas para o cultivo do fungo, as quais estão sendo propostas para o desenvolvimento da patente (tabela 2).

*Tabela 2. Condições finais do meio de cultivo otimizado para produção da enzima lacase pelo fungo derivado marinho Peniophora sp. CBMAI 1063 (para 50 mL).*

Componente	Concentração e/ou condição
Glicose	2,74 g/L
Peptona	2,74 g/L
Extrato de Malte	1,36 g/L
Água do mar artificial (ASW)	32,5 (mL)
Biotina	0,01 %
Riboflavina	0,01 %
Ácido glutâmico	0,20 %
Extrato de levedura	2 g/L
$\text{CuSO}_4$	2 mM
pH	8
Inóculo	6 cilindros*

<b>Temperatura</b>	28 °C
<b>Tempo de incubação</b>	7 dias

\*Cilindros de 5 mm de diâmetro da margem das colônias do fungo crescido em ágar mate 2% (MA2) por 7 dias

[34] A validação foi altamente significativa e no mesmo tempo de incubação se obtiveram mais de 1.000 U/L ou 5 10 U/ml de lacase, ou seja, um aumento em relação ao DCCR devido à significância e à otimização do modelo matemático. A condição de validação foi utilizada na avaliação da cinética enzimática, que resultou novamente em um aumento da atividade em relação ao melhor tempo de incubação 10 (figura 3).

Características da lacase produzida pelo fungo Peniophora sp. CBMAI 1063

[35] A lacase produzida pelo fungo marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi purificada e caracterizada no 15 Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP campus Rio Claro. Quantidades significativas (18 U/ml) foram obtidas após a purificação e a atividade enzimática mostrou pH e temperaturas ótimos de 3,0 e 60 °C. Em adição, a enzima possui peso molecular na faixa de 60 a 70 KDa e 20 apresentou eficiente estabilidade frente a diferentes valores de pH (figura 4) e temperatura, com manutenção de 100% da estabilidade térmica após 1 h mesmo em temperatura de 62 °C (figura 5), além da resistência a íons metálicos (figura 6).

25 Potencial biotecnológico da lacase produzida pelo fungo Peniophora sp. CBMAI 1063

[36] A enzima purificada (18 U) foi capaz de descolorir 70 % do corante Preto Reativo 5 (200 mg/L) sem

adição de mediadores após 5 h, confirmando o seu potencial biotecnológico, além da resistência a íons metálicos, que permite sua aplicação biotecnológica em diferentes tratamentos ambientais e industriais.

### Reivindicações

1. Processo de obtenção da enzima lacase por fungo marinho CARACTERIZADO pelo fato de que os componentes do meio de cultivo otimizado são:

- 5           - Glicose: 2,74 g/L;  
          - Peptona: 2,74 g/L;  
          - Extrato de malte: 1,36 g/L;  
          - Água do mar artificial (ASW): 32,5 (mL);  
          - Biotina: 0,01 %;
- 10          - Riboflavina: 0,01 %;  
          - Ácido glutâmico: 0,20 %;
- Extrato de levedura: 1,12 a 2,74 g/L,  
preferencialmente 2 g/L;
- CuSO<sub>4</sub>: 2 a 4,92 mM, preferencialmente 2 mM.

15          2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADO pelo fato de que o pH do meio é 8.

          3. Processo, de acordo com as reivindicações 1 ou 2, CARACTERIZADO pelo fato de que a temperatura do meio é 28 °C.

20          4. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, CARACTERIZADO pelo fato de que são utilizados 6 cilindros de inóculo de 5 mm de diâmetro da margem das colônias do fungo crescido em ágar malte 2% (MA2) por 7 dias.

25          5. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, CARACTERIZADO pelo fato de que o fungo marinho é o *Peniophora sp.* CBMAI 1063.

          6. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, CARACTERIZADO pelo fato de que o  
30 tempo de incubação é 7 dias.

7. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tais condições de cultivo são para 50 mL de meio de cultura.

8. Enzima lacase **CARACTERIZADA** pelo fato de que é obtida por meio do processo definido nas reivindicações 1 a 7.

9. Enzima, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a atividade enzimática mostrou pH e temperaturas ótimos de 3,0 e 60 °C.

10. Enzima, de acordo com as reivindicações 8 ou 9, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a mesma possui peso molecular na faixa de 60 a 70 KDa.

11. Enzima, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a mesma apresenta resistência a íons metálicos.

12. Uso da enzima lacase, como definida nas reivindicações 8 a 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para tratamentos de efluentes ambientais e industriais.

Figura 1

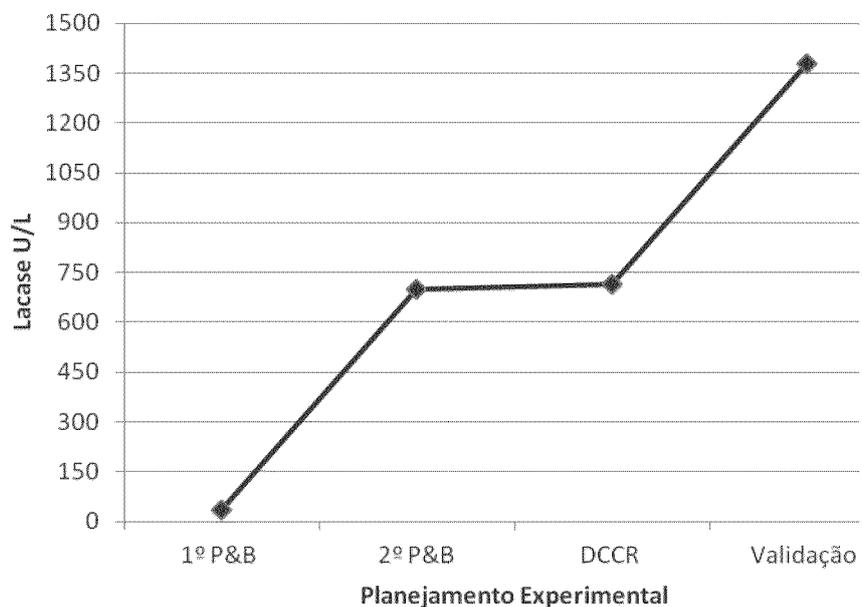


Figura 2

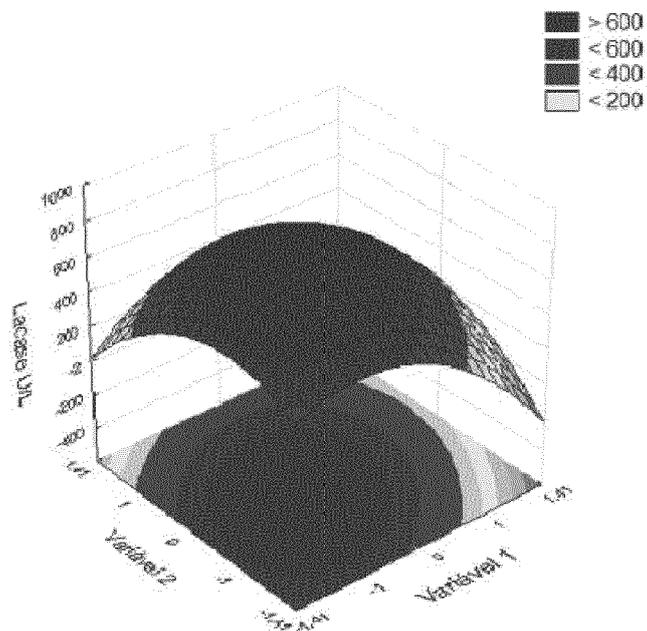


Figura 3

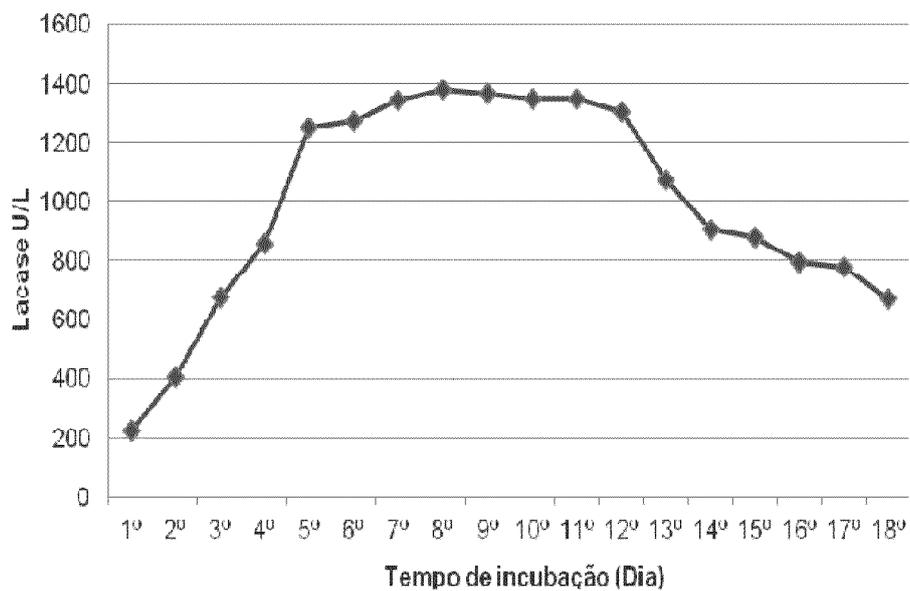


Figura 4

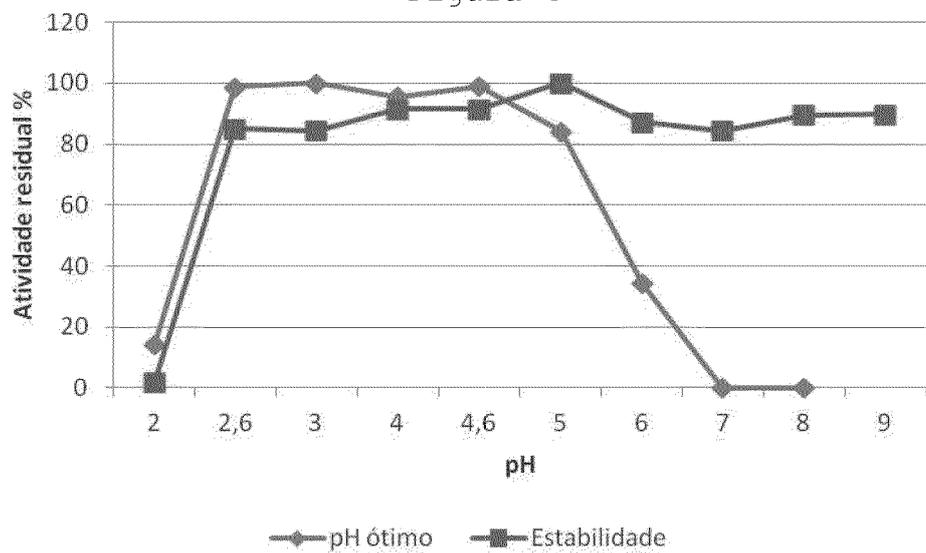


Figura 5

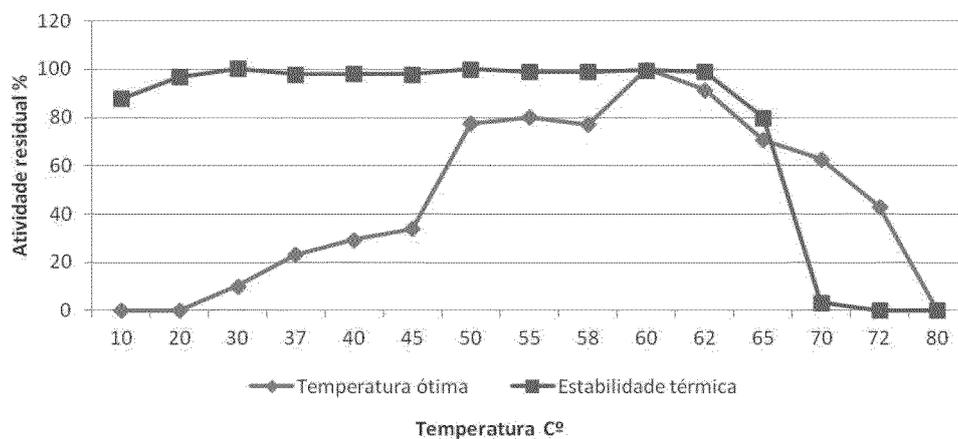
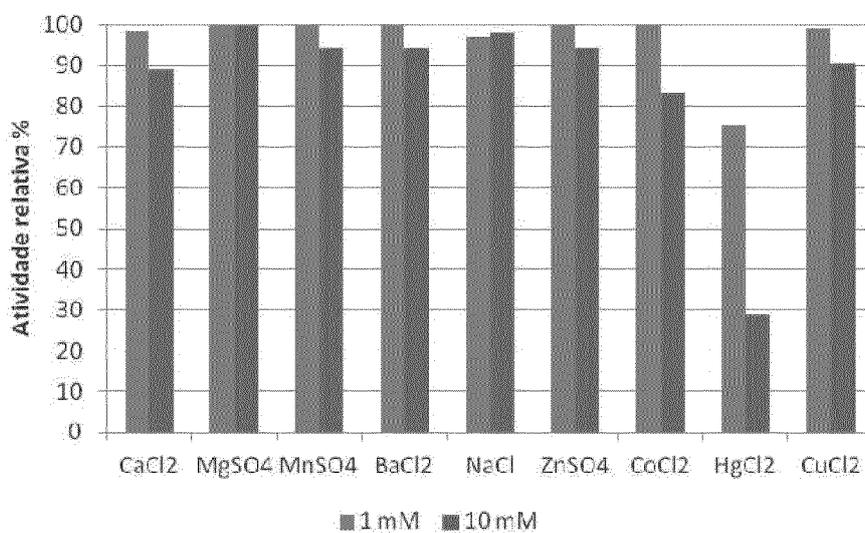


Figura 6



**"PROCESSO DE OBTENÇÃO DA ENZIMA LACASE POR FUNGO  
MARINHO, ENZIMA LACASE E USO DA MESMA"**

A presente invenção está relacionada com a otimização das condições de cultivo para produção de lacase por um  
5 fungo derivado de ambiente marinho. Tais condições permitiram a obtenção de quantidades significativas de lacase após a purificação (1.300 U/L) com atividade enzimática ótima em pH 3,0 e 60 °C e com peso molecular na faixa de 60 a 70 KDa. Nas condições de cultivo otimizadas a  
10 enzima apresentou eficiente estabilidade frente a diferentes valores de pH e temperatura, com manutenção de 100% da estabilidade térmica após 1 h mesmo em temperatura de 62 °C, e da estabilidade frente a diferentes pHs após 48 h, além da resistência a íons metálicos.