

# Utilização de protoplastos do fungo *Pleurotus sajor-caju* para a obtenção de variantes secretoras de lacases

Aline Ganzer Mezzomo, Aldo José Pinheiro Dillon

Universidade de Caxias do Sul - Laboratório de Enzimas e Biomassas - Instituto de Biotecnologia - UCS

## Introdução

Devido às propriedades saprofítica e lignolítica do basidiomiceto *Pleurotus sajor-caju*, este produz, durante o seu crescimento, um grupo enzimático conhecido como fenol-oxidases. Nesse grupo destacam-se as lacases, as quais se caracterizam por não serem específicas quanto ao substrato e apresentarem capacidade de atuar sobre uma variedade de substratos semelhantes à lignina. Dessa forma, as lacases constituem uma alternativa para processos biotecnológicos de remediação de danos ambientais, tais como detoxificação de efluentes e descoloração de corantes têxteis. Existe ainda possibilidades de aumentar a produtividade dessas enzimas para redução de custos em escala industrial. Uma possível estratégia para melhorar a produção destas enzimas produzidas pelos basidiomicetos é a obtenção de variantes genéticas a partir de protoplastos tratados com substâncias mutagênicas. Em vista disso, o objetivo deste trabalho é obter variantes genéticas para a produção de lacases pelo tratamento de protoplastos de *Pleurotus sajor-caju* com radiação ultra-violeta.

## Materiais e Métodos

Linhagens: **Parental:** *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.

**Variantes:** Am01/2009 e Ed01/2009, selecionados como melhores produtores de lacases em placas com corante após mutagênese induzida com radiação (luz UV) de protoplastos do parental.

**Meio Sólido com Corante:** Constituído de 0,01% do corante Reactive Blue 220, 2% de ágar, 2% de glicose, 30% de água de lavagem de farelo de trigo, obtido após fervura de 50 g de farelo de trigo em 1L de água destilada, 1% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e 65% de água destilada.

**Meio para Cultivo Sólido:** 5g de meio sólido seco, das quais 4,70g são de serragem de *Pinus sp.*, 0,25g de farelo de trigo e 0,05g de  $\text{CaCO}_3$ . A umidade sobre o peso sólido é de 66%. Sais adicionados: 0,065%(m/m)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,075%(m/m)  $\text{MnSO}_4$  e 0,075%(m/m)  $\text{CuSO}_4$ .

**Fermentação Sólida:** Um disco (1,5cm de diâmetro cada) da placa colonizada foi cultivado em um frasco de 100mL com Meio para Cultivo Sólido para cada linhagem foi feita triplicatas. Foram incubados em uma estufa de crescimento úmido (95% de umidade) a 28°C por 12dias. Foram coletadas amostras na cada dois dias de cultivo. A extração enzimática foi feita com adição de 25mL de água destilada e submetida à agitação de 160rpm e temperatura de 0°C por 30min.

**Meio para Fermentação Submersa:** 100mL contendo 0,5g de glicose, 0,15g de caseína hidrolizada, 10mL de solução de sais (Mandels & Reese, 1957) e 90mL de água destilada.

**Fermentação Submersa:** Cada linhagem foi cultivada em frascos Erlenmeyer 500mL alongados contendo 100mL de Meio de Cultivo Submerso e estes submetidos à agitação de 180rpm à temperatura de 28°C por sete dias. Após 5 mL desse inóculo de cada linhagem foi vertido em triplicata em frascos contendo o mesmo meio e mantidos nas mesmas condições por 14 dias. As amostras foram coletadas no 5°, 9° 11° e 14° dia de cultivo para mensuração enzimática.

A atividade de lacases foi determinada por UV-VIS (420nm) utilizando mistura reacional com ABTS como substrato redutor (Wolfenden & Wilson, 1982). A atividade de Manganês Peroxidase foi determinada por UV-VIS (610nm) utilizando mistura reacional com vermelho de fenol como substrato redutor (Kawahara et al., 1984).

## Resultados e Discussão

Foram obtidos variantes de *Pleurotus sajor-caju* em clones provenientes de protoplastos irradiados com luz UV, onde verifica-se distintas morfologias no crescimento em placa e formação de halo de descoloração do corante (Fig. 1). Ao observar o crescimento em placas com Meio de Manutenção, os variantes demonstram distintas morfologias de colônias e diferentes velocidades de crescimento. (Fig. 2)

Os variantes Am01/2009 e Ed01/2009 foram testados quanto a sua produção de lacases (Fig. 3) em cultivo sólido. No período de tempo analisado, o pico enzimático para secreção de lacases foi alcançado no 6° dia de cultivo.

Am01/2009 apresentou uma atividade enzimática de lacases de 1,99 vezes maior em relação ao parental e Ed01/2009 2,09 vezes maior, no 6° dia de cultivo.

O pico enzimático para secreção de manganês peroxidases (Fig. 4) foi alcançado no 9° dia de cultivo sólido (PS 2001 e Am01/2009) e 11° dia de cultivo (Ed01/2009). A atividade enzimática de Mn-Peroxidase foi 2,05 vezes maior em relação ao parental e de Ed01/2009 foi 2,26 vezes maior nos seus picos enzimáticos.

Em cultivo submerso, Am01/2009 e Ed01/2009 foram testados quanto a sua produção de lacases (Fig. 5), onde não se observa uma maior produção enzimática de lacases como ocorreu na fermentação sólida.

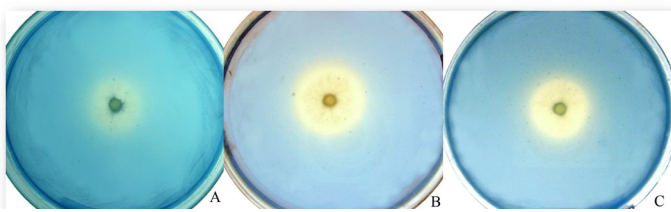


Fig. 1- Placas colonizadas demonstrando a descoloração do corante (4º dia). A) PS 2001. B) Am01/2009. C) Ed01/2009.



Fig. 2- Placas com colônias de *Pleurotus sajor-caju* de 4 dias. A) PS 2001. B) Am01/2009. C) Ed01/2009.

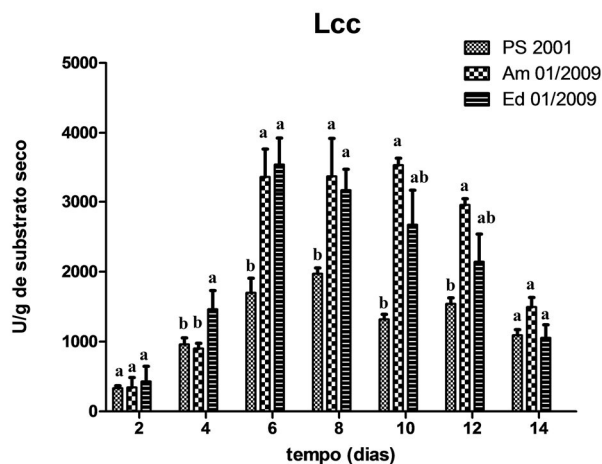


Fig. 3 - Perfil de secreção de lacases (expressa em unidade de enzima por grama de substrato seco) durante o cultivo sólido de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e de suas variantes Am01/2009 e Ed01/2009, obtidos pelo processo de obtenção de protoplasto, mutagênese e seleção.

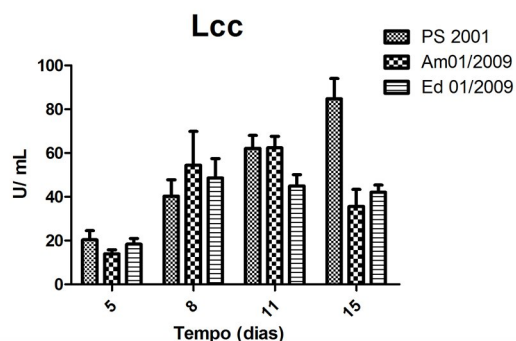


Fig. 5 - Perfil de secreção de lacases (expressa em unidade de enzima por mL de substrato) durante o cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e de suas variantes Am01/2009 e Ed01/2009.

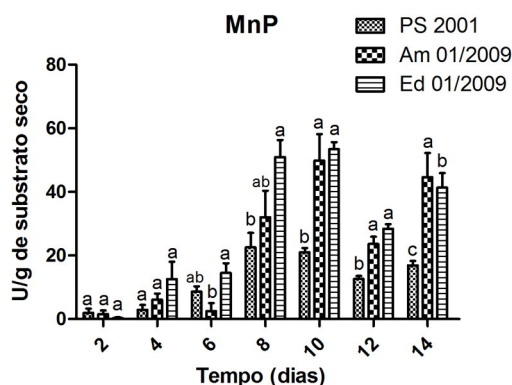


Fig. 4 - Perfil de secreção de manganês peroxidases (expressa em unidade de enzima por grama de substrato seco) durante o cultivo sólido de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e de suas variantes Am01/2009 e Ed01/2009.

## Referências Bibliográficas

Mandels, M.; Reese, E. T. (1957). J. Bacteriol.  
Wolfenden, R.S.; Wilson, R. L. (1982). J. Chem. Soc. Perkin Trans.

Miller, G.L. (1959). Anal. Chem.  
Kawahara, M.; Glenn, J. K.; Morgan, M.; Gold, M. H. (1984). FEBS Lett.  
Reissig J.L.; Strominger, J.L.; Leloir, L.F. (1955). J. Biol. Chem.  
Bradford, M. M. (1976). Anal. Biochem.