

# Utilização de protoplastos do fungo *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 para a obtenção de variantes secretoras de lacases

Aline Ganzer Mezzomo, Letícia Frizzo, Raquel Calloni, Aldo José Pinheiro Dillon



Universidade de Caxias do Sul - Laboratório de Enzimas e Biomassas - Instituto de Biotecnologia - Centro de Ciências Agrárias e Biológicas

## 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 de enzimas 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, porém o custo de produção destas enzimas é muito elevado. Uma possível estratégia de melhorar a produção destas enzimas em basidiomicetos é a obtenção de variantes genéticas a partir de protoplastos que foram tratados com substâncias mutagênicas. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi obter linhagens que produzam maior quantidade desta enzima a partir da linhagem de *P. sajor-caju* PS-2001, tratando protoplastos com radiação UV e utilizando um processo seletivo baseado na descoloração do corante Reactive Blue 220.

## Materiais e Métodos

**Linhagem:** *Pleurotus sajor-caju* PS-2001, pertencente à coleção de microrganismos do IB-UCS.

**Meio de Manutenção:** 2% de ágar, 2% de farelo de trigo moído, 2% de serragem de *Pinus* sp. moída e 0,2% de  $\text{CaCO}_3$ .

**Solução de Regeneração:** Os protoplastos serão regenerados em 10mL contendo 0,02g de peptona, 0,1g de glicose e 1mL de solução de sais (Mandels & Reese (1957)) e 2,088g de sacarose (0,6M de sacarose).

**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

**Obtenção de Protoplasto:** O micélio de uma placa de Petri, recentemente cultivado com *P. sajor-caju*, foi inoculado em um frasco Erlenmeyer 500 mL, com 100 mL de Meio de Cultivo Submerso, incubados à 28°C por 24h do qual foi obtido 0,1g de massa fúngica por filtragem. A esta massa foi acrescentado 5 mL da solução de Glucanex (100 mg de Glucanex<sup>®</sup> em 100mL de tampão citrato 0,05M e 0,6M de KCl) e condicionada à 34°C à uma agitação de 120rpm por 3h para hidrólise da quitina da parede fúngica e obtenção de protoplastos. Em seguida os protoplastos foram filtrados e lavados com KCl 0,6M e após centrifugados por 15min à 3000rpm.

**Mutagênese e Regeneração:** O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso com 1mL de solução de regeneração, a qual foi disposta em uma placa de Petri aberta e irradiada com luz UV por 150s, o que causou a morte de aproximadamente 90% dos protoplastos. Completou-se com Solução de Regeneração para 10mL em um frasco que foi incubado por 72h à 28°C na ausência de luz, para regeneração da parede celular.

**Seleção de Variantes:** A solução de Regeneração contendo os protoplastos foi plaqueada em Meio Sólido com Corante. Para seleção de variantes o halo de degradação do corante foi observado (Figura 1). Variantes que demonstraram halo precoce ou maior em relação ao halo produzido pelo parental foram selecionados e cultivados em placas de Meio de Manutenção

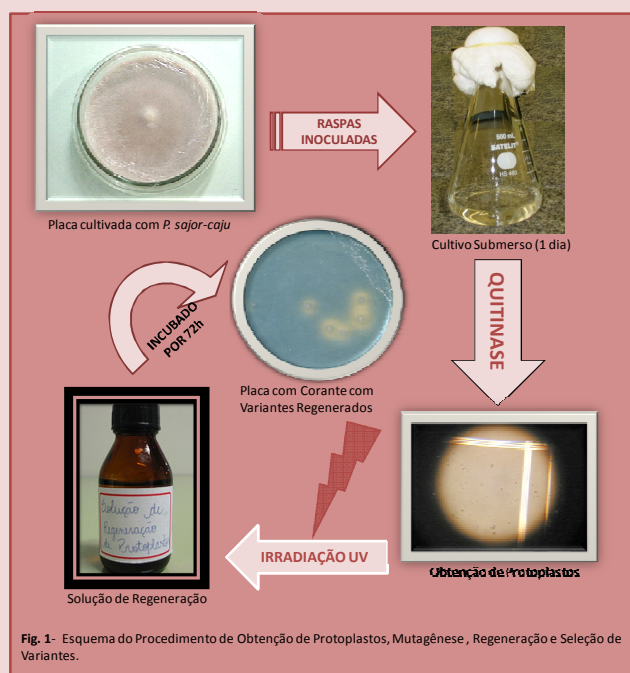


Fig. 1- Esquema do Procedimento de Obtenção de Protoplastos, Mutagênese, Regeneração e Seleção de Variantes.

**Ensaio de Screening:** Variantes selecionados foram cultivados em triplicatas em Placas de Petri contendo Meio de Seleção juntamente ao parental PS-2001. Devido à secreção de lacases pela colônia, o corante contido no meio foi descolorido. Para mensuração da produção dessas enzimas foi medido o diâmetro da colônia e seu respectivo halo de descoloração em cada dia de crescimento, durante sete dias. A partir desses valores é possível calcular a relação do halo sobre a colônia (Fig. 2).

**Ensaio de Crescimento Micelial:** Variantes selecionados e o parental OS-2001 foram cultivados em Placas de Petri contendo Meio de Manutenção. Durante sete dias, o diâmetro da colônia foi medido. A partir desses valores pode-se ter o perfil de crescimento da colônia.

## Resultados e Discussões

Inicialmente estudou-se um meio para selecionar clones que apresentassem potencial para secreção de enzimas, para tanto observamos que o meio em que adicionamos 1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tornou a atividade de descoloração mais tardia, sendo este escolhido para o processo de seleção, o qual se baseou na seleção de clones com mais rápida capacidade de descoloração.

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. 2). A relação halo/colônia revela que o variante Tai 01/2009 teve maior produção enzimática por quantidade de micélio desenvolvido (Fig. 4).

Ao observar o crescimento em placas com Meio de Manutenção, os variantes demonstram distintas morfologias de colônias (Fig. 3) e diferentes perfis de velocidade de crescimento (Fig. 5).

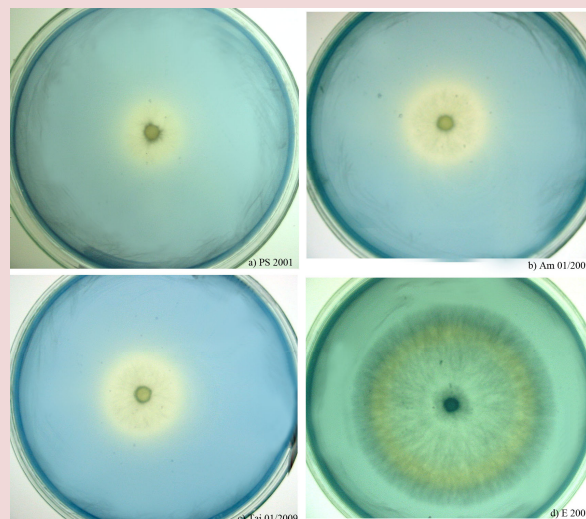


Fig. 2 – Placas colonizadas demonstrando a descoloração do corante e diferentes perfis de colonização (4º dia).

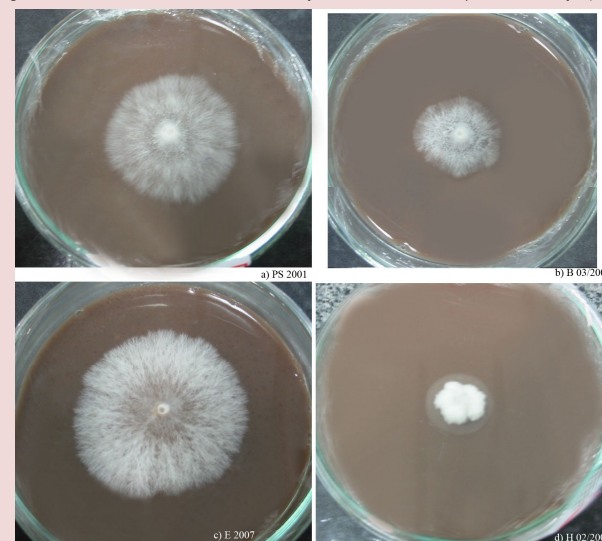


Fig. 3 – Placas colonizadas demonstrando o perfil de colonização (4º dia).

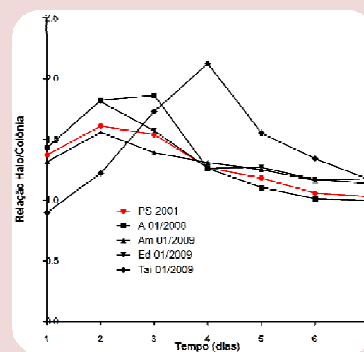


Fig. 4 – Gráfico Relação Halo/Colônia X Tempo – Comparação relação halo/colônia entre parental e alguns variantes.

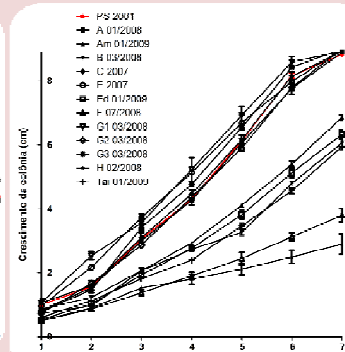


Fig. 5 – Gráfico Crescimento da Colônia X Tempo – Comparação o crescimento das colônias dos variantes e do parental.

## Referências Bibliográficas:

- Mandels, M.; Reese, E. T. (1957). J. Bacteriol. 73: 269-278.
- Wolfenden, R.S.; Wilson, R. L. (1982). J. Chem. Soc. Perkin Trans. 02:805-812.
- Kuwahara, M.; Glenn, J. K.; Morgan, M.#; Gold, M. H. (1984). FEBS Lett. 169: 247-250.
- Reissig J.L.; Strominger, J.L.; Leloir, L.F. (1955). J. Biol. Chem. 27:959-966
- Bradford, M. M. (1976). Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Miller, G.L. (1959). Anal. Chem. 31:426-428