

Comparação da Produção Enzimática de Variantes do Fungo *Pleurotus sajor-caju* PS2001 em Relação ao Parental em Ensaio Sólido

Leticia Rosa Frizzo, Aline Ganzer Mezzomo, Aldo José Pinheiro Dillon.



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

Introdução

Dentre os resíduos orgânicos das indústrias têxteis e papelreira destacam-se os compostos fenólicos. Estes compostos compreendem geralmente moléculas grandes que apresentam alta toxicidade e não podem ser liberadas no ambiente sem tratamento.

Uma possível solução para remediação dos danos ambientais causados pelos efluentes das indústrias têxteis e papelreira é a detoxificação de efluentes e descoloração de corantes têxteis com utilização das lacases. As lacases fazem parte de um grupo enzimático conhecido como fenol-oxidases e destacam-se por não serem específicas quanto ao substrato. As fenol-oxidases são produzidas pelo basidiomiceto *Pleurotus sajor-caju* durante seu crescimento. No entanto a utilização destas enzimas para tratamento de efluentes possui custo elevado. Uma possível alternativa na redução do custo desse tratamento é a obtenção de variantes genéticas a partir de mutagenese de protoplastos. Neste trabalho são apresentados as primeiras avaliações do potencial de produção de lacases secretadas por variantes genéticas de *Pleurotus sajor-caju*, obtidos a partir de protoplastos tratados com radiação UV.

Materiais e Métodos

Linhagem: *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 pertencente à coleção de microrganismos IB-UCS. E variantes obtidos através de mutagenese de protoplastos do parental



Figura 1. Placas com meio de manutenção colonizadas: A (PS2001), B (Am01/2009), C (Ed01/2009)

Meio de Manutenção: 2% de ágar, 2% de farelo de trigo moído, 2% de serragem de *Pinus sp.* moída e 0,2% de CaCO_3 .

Meio de cultivo sólido: 5 g de meio sólido seco, das quais 94% são de serragem de *Pinus sp.*, 5% de farelo de trigo e 1% de CaCO_3 .

Inóculo: Para a preparação do inóculo foi feito o repique de uma placa de petri (contendo meio de manutenção) colonizada pela linhagem em uma placa contendo o mesmo meio. Os repiques foram incubados por 7 a 14 dias a 28°C.

Cultivo sólido: Um disco de 1,5 cm de diâmetro da placa do inóculo foi cultivado em um frasco de 100 ml contendo meio de cultivo sólido. A umidade sobre o peso sólido de 66%. Foram adicionados os seguintes sais para indução enzimática: 0,065% (m/m) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,075% (m/m) MnSO_4 e 0,075% (m/m) CuSO_4 . Cada linhagem foi cultivada em triplicatas. Os frascos inoculados foram incubados em estufa de crescimento úmido (95% de umidade) a 28°C por 14 dias. Foram feitas coletas no 2°, 4°, 6°, 8°, 10°, 12° e 14° dias. A extração enzimática foi feita com adição de 22mL de água destilada a 11g de amostra homogeneizada e submetida à agitação de 160rpm e temperatura de 0°C por 30min. Para mensurar a massa fungica foram utilizados 0,5 g do substrato seco pela dosagem de N-acetilglicosamina após o tratamento de hidrólise ácida.



Placa de cada linhagem



Frasco de 100ml Inoculado

Figura 2- Esquema do Cultivo.

Análises :

Atividade de Lacase: determinada por UV-VIS ($\lambda_{\text{máx}}=420\text{nm}$) utilizando mistura reacional com ABTS como substrato redutor (Wolfenden & Wilson, 1982).

Atividade de Manganês Peroxidase: determinada por UV-VIS ($\lambda_{\text{máx}}=610\text{nm}$) utilizando mistura reacional com vermelho de fenol como substrato redutor (Kuwahara *et al.*, 1984).

Resultados e discussão

Na figura 3, referente a dados de atividade de lacases até o oitavo dia de cultivo, verifica-se que os dois clones (Am01/2009 e Ed01/2009) avaliados mostram a atividade duplicada em relação a linhagem parental. O mesmo observa-se na figura 4 para a atividade de manganês peroxidases. Estes resultados indicam que pode ser obtida variabilidade genética quanto a secreção de lacases pela mutagenese em protoplastos

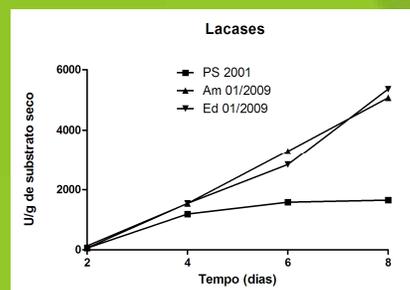


Figura 3. Perfil de atividade de lacases em clones de *Pleurotus sajor-caju*.

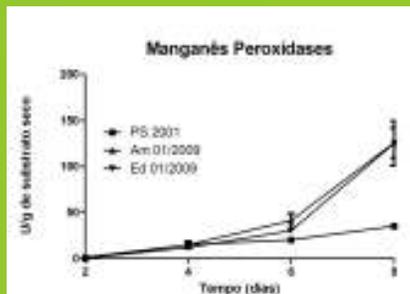


Figura 4. Perfil de atividade de manganês peroxidases em clones de *Pleurotus sajor-caju*.

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