

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *Pleurotus ostreatoroseus* PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

Fernanda Prete Sanchez (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Anna Beatriz Zuliani Beinke (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Cristina Giatti Marques de Souza (Orientador). E-mail: cgmsouza@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Ciências Biológicas, Bioquímica / Bioquímica de Microrganismos

Palavras-chave: fermentação em estado sólido; ligninolítico; macromicetos.

RESUMO

As espécies do gênero *Pleurotus* são capazes de produzir enzimas degradadoras dos polímeros da parede celular dos vegetais porque são hábeis em produzir enzimas que atuam sobre a celulose e a lignina. Seu uso em pré-tratamento biológico de biomassas vegetais é uma alternativa promissora e de menor custo. Todavia, espécies desse gênero são pouco exploradas em relação à produção dessas enzimas. Geralmente o aproveitamento de resíduos agrícolas são para a produção dos corpos frutificação destes macromicetos, no entanto muitas enzimas podem ser produzidas sob condições em estado sólido. O gênero *Pleurotus* é muito conhecido na culinária e por suas propriedades nutraceuticas. *P. ostreatoroseus* é uma das espécies cultivadas desse gênero e o objetivo desse estudo foi o de avaliar meios de cultivo que possam proporcionar melhor crescimento e maior produção de enzimas de interesse biotecnológico. O fungo foi crescido em diferentes meios de cultura em placas de Petri e o melhor meio foi usado para avaliar a sensibilidade à temperatura durante o crescimento. Posteriormente os componentes desse meio foram usados, na melhor temperatura, para a avaliação da produção de enzimas em fermentação em estado sólido, por um período de 4 a 18 dias. Celulase, lacase e manganês peroxidase foram determinadas por métodos espectrofotométricos e os resultados mostraram que a celulase foi produzida em pequenas quantidades. Já a lacase foi a principal enzima secretada com $484,94 \pm 10,38$ U/L no quarto dia de cultivo. A manganês peroxidase também foi secretada no mesmo tempo ($10,25 \pm 4,43$ U/L).

INTRODUÇÃO

O Reino Fungi é representado por cogumelos, trufas, leveduras, mofos e ferrugens, sendo assim, é um grupo bastante heterogêneo. Grande parte dos basidiomicetos coloniza a madeira, degradando a celulose, a hemicelulose e a lignina, por isso são também chamados de lignocelulolíticos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Os fungos da podridão branca recebem este nome devido à degradação da lignina, promovida pela ação de suas enzimas sobre a madeira em decomposição, fazendo

com que esta adquira um aspecto esbranquiçado; celulose e hemiceluloses também são decompostas e são considerados os únicos capazes de mineralizar totalmente a lignina (JANUSZ *et al.*, 2017). O gênero *Pleurotus* faz parte dos organismos lignolíticos e é o segundo principal grupo de cogumelos comestíveis cultivados no mundo, compreendendo mais de 40 espécies (CHIRINANG; INTARAPICHET, 2009), *Pleurotus* spp são capazes de produzir enzimas degradadoras dos polímeros da parede celular dos vegetais e o pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos com as espécies, visando a produção de cogumelos para comercialização, é um tipo de fermentação em estado sólido praticada há muitos anos. Considerando que fungos lignolíticos são hábeis em produzir enzimas que atuam sobre a lignina e a celulose, seu uso em pré-tratamento biológico de biomassas vegetais é uma alternativa promissora e de menor custo. Recentemente em nosso laboratório foi realizada uma triagem de isolados de espécies de *Pleurotus* quanto a produção de hidrolases e oxidases. Entre os seis fungos testados, o *Pleurotus ostreatoroseus* teve índice enzimático positivo para oxidases, porém este fungo é o que teve menor desenvolvimento micelial quando comparado aos demais. Desta forma o objetivo deste projeto foi avaliar meios de cultivo que possam proporcionar melhor crescimento e maior produção de enzimas por *P. ostreatoroseus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Macromiceto e Manutenção: *P. ostreatoroseus* foi mantido em meio de farelo de trigo 12% agarizado e em placas de Petri através de repiques sucessivos. Para inóculo um pedaço de micélio obtido de uma placa de manutenção foi repicado em placa de Petri contendo o mesmo meio. Após 7-10 dias discos de micélio foram usados como inóculo.

Efeito do meio de cultivo no crescimento: o fungo foi inoculado em placas de Petri contendo meio extrato de malte, farelo de trigo e ágar, ágar dextrose e batata, ágar extrato de malte e peptona, ágar extrato de malte, ágar e triptona de soja, Sabouraud dextrose e ágar, farelo de trigo e por fim meio ágar Mueller Hinton. As placas permaneceram em estufa a 28 ± 2 °C e o crescimento radial foi medido no terceiro e no quinto dia após o inóculo.

Efeito da temperatura no crescimento: após a escolha do melhor meio sólido, o efeito da temperatura (25, 30 e 35 °C) no crescimento, foi avaliado. As medidas foram realizadas da mesma forma como descrito no item anterior.

Fermentação em estado sólido (FES): pesou-se 3,6 g de farelo de trigo em frascos de 125 mL e o meio foi umedecido com solução mineral acrescido de extrato de malte para dar umidade final de 85%. Depois de autoclavados, 3 discos de micélio ($\varnothing = 1,0$ cm) foram inoculados em cada frasco e interrompidos nos dias 4, 7, 10, 13, 16 e 18.

Métodos espectrofotométricos: as enzimas celulase, lacase e manganês peroxidase foram avaliadas usando seus respectivos substratos (carboximetilcelulose, ABTS e DMP). Lacase foi avaliada em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5) a 40 °C (PELÁEZ *et al.*, 1995). A oxidação do ABTS foi determinada pelo aumento na absorvância 420 nm ($\epsilon = 36.000$ M⁻¹cm⁻¹). A atividade de Manganês peroxidase (MnP) foi medida pela oxidação de MnSO₄ (1 mM) em tampão malonato de sódio

0,05 M (pH 4,5) na presença de H_2O_2 10^{-4} M e a 40 °C usando o DMP. Os açúcares redutores foram medidos pelo DNS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

P. ostreatoroseus cresceu nos diferentes tipos de meio de cultura. O melhor meio foi o de farelo de trigo e extrato de malte, no entanto quase não houve diferença entre esse e o meio de batata dextrose e o de extrato de malte com peptona (Figura 1). Na Figura 2, é possível observar a atividade das enzimas Lacase e Manganês Peroxidase no decorrer dos dias. O fungo cresceu bem em FES e produziu enzimas oxidativas. As duas enzimas foram encontradas em maior quantidade no início do cultivo, quarto dia. Celulase foi produzida em baixas quantidades ao longo de todo cultivo.

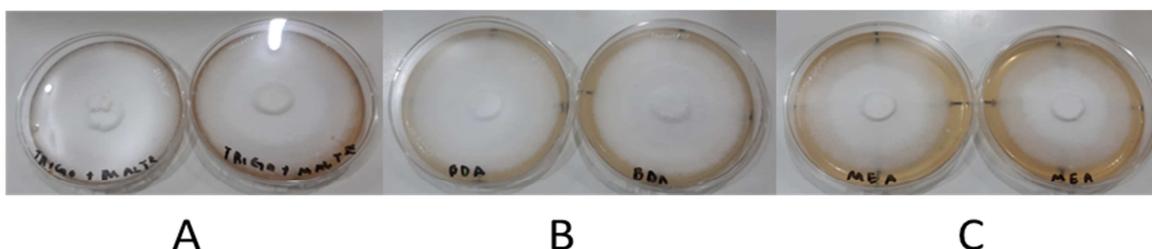


Figura 1: Crescimento do *P. ostreatoroseus* em meio contendo A: ágar, farelo de trigo e extrato de malte. B: ágar, dextrose e batata; C: ágar e extrato de malte.

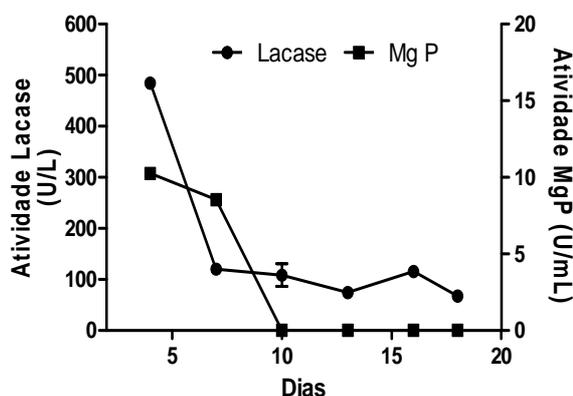


Figura 2: Curva da produção de enzimas de *P. ostreatoroseus* em FES

CONCLUSÕES

Nas condições de cultivo utilizadas, *P. ostreatoroseus* foi capaz de produzir lacase e manganês Peroxidase, enzimas essas que uma vez atuantes na decomposição da lignina facilitam a exposição da celulose e da hemicelulose da parede vegetal às enzimas que degradam esses dois polímeros. Desta forma, o fungo parece ser um candidato ao uso no pré-tratamento de resíduos. Porém outras condições de cultivo

precisam ser estudadas para melhorar a produção dessas enzimas em meio que estimule também o crescimento.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, PPG/UEM e Departamento de Bioquímica nossos agradecimentos.

REFERÊNCIAS

CHIRINANG, P., INTARAPICHET, K. O. Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. **ScienceAsia**, v. 35, p. 326-331, 2009. Disponível em: <https://www.thaiscience.info/journals/Article/SCAS/10558638.pdf>. Acesso em: 31 ago. 2023.

JANUS, G. *et al.* Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 6, p. 941–962, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/41/6/941/4569254?login=false>. Acesso em: 31 ago. 2023

PELÁEZ, F., MARTÍNEZ, M. J., MARTINEZ, A. T. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. **Mycological research**, v. 99, n. 1, p. 37-42, 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0953756209803134>. Acesso em: 31 ago. 2023.

TRABULSI, Luiz Rachid. ALTERTHUM, Flavio. **Microbiologia**. São Paulo, Atheneu, 5 ed; 2008. 760p. 2008.