

Simone Zaccaria *, Fernanda Bettin, Mauricio Moura da Silveira
 Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia – *E-mail: szaccaria@ucs.br

INTRODUÇÃO

Alguns cogumelos comestíveis possuem valor nutricional e gastronômico, propriedades medicinais e aplicações ambientais e biotecnológicas. Neste grupo, fungos do gênero *Pleurotus* vem sendo intensivamente estudados devido a sua capacidade de transformar vários resíduos lignocelulósicos e poluentes através do complexo enzimático das fenol-oxidases. Lacases são enzimas pertencentes a este grupo que oxidam compostos fenólicos e aromáticos reduzindo o oxigênio a água pela retirada de um elétron do substrato, possuindo amplas aplicações no tratamento de corantes têxteis e efluentes clorofenólicos produzidos por indústrias de papel e celulose. *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 produz diferentes níveis de lacases em processo submerso, de acordo com variações no meio de cultivo, na estrutura química e no tempo de adição de indutores enzimáticos e nas condições operacionais utilizadas, como temperatura, saturação em oxigênio dissolvido e pH, fatores que podem interferir fortemente na síntese dessas enzimas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do pH sobre a cinética de crescimento e a produção de lacases de *P. sajor-caju* PS-2001 em processo submerso em biorreator com agitação mecânica.

MATERIAL E MÉTODOS

❖ Microrganismo



Figura 1. *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.

Pleurotus sajor-caju PS-2001, da coleção de microrganismos do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

❖ Inóculos

Glicose (5 g/L)
 Caseína pura (1,5 g/L)
 Solução mineral (100 mL/L)



Figura 2. Frasco Erlenmeyer de 500 mL.

Micélio
 3 discos (1,5 cm Ø)

Crescimento sob agitação recíproca de 180 rpm durante 6 dias a 28±1°C

❖ Cultivos



Figura 3. Biorreator com agitação mecânica (Biostat B®).

Glicose (5 g/L), caseína pura (1,5 g/L), solução mineral (100 mL/L), ácido benzoico (1 mM) e CuSO₄ (0,4 mM - adicionado após 24 h).

- Volume operante: 4 L
- Temperatura: 28±1°C
- 200 rpm e 0,5 vvm (2 L/min) iniciais
- Oxigênio dissolvido (OD): mínimo de 30% da saturação
- pH : 6,0, 6,5, 7,0 e livre (não controlado)
- Coleta de amostras: tempo 0 (inóculo) a 90 h

❖ Análises

- Biomassa micelial - gravimetria
- Substrato - Glicose (Miller, 1959)
- Lacases (Wolfenden & Willson, 1982)
- Peroxidases totais (Heinzkill *et al.*, 1998)
- Mangânes peroxidases (Kuwahara *et al.*, 1984)
- Lignina peroxidases (Tien & Kirk, 1984)
- Oxidases do álcool veratrílico (Bourbonnais & Paice, 1988)

RESULTADOS

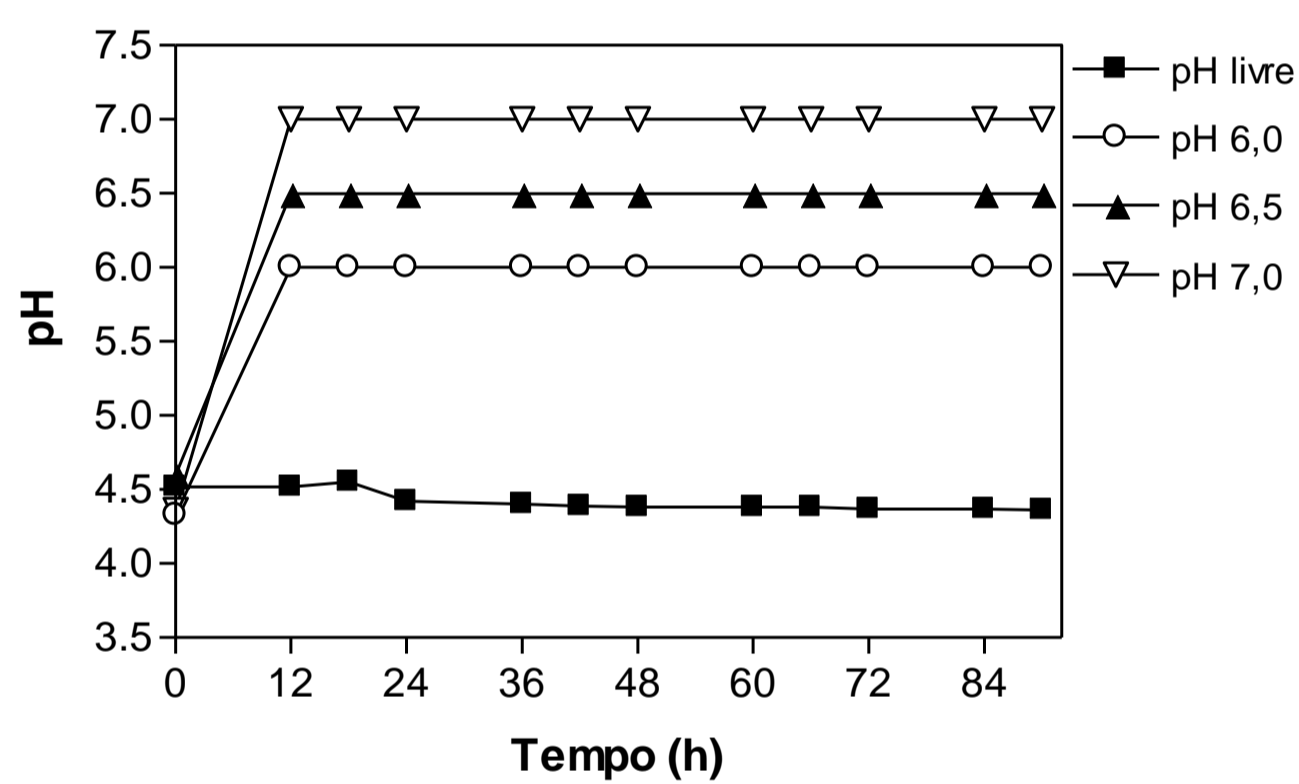


Figura 4. Variação do pH em função do tempo durante cultivos submersos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em biorreator com agitação mecânica a 28°C.

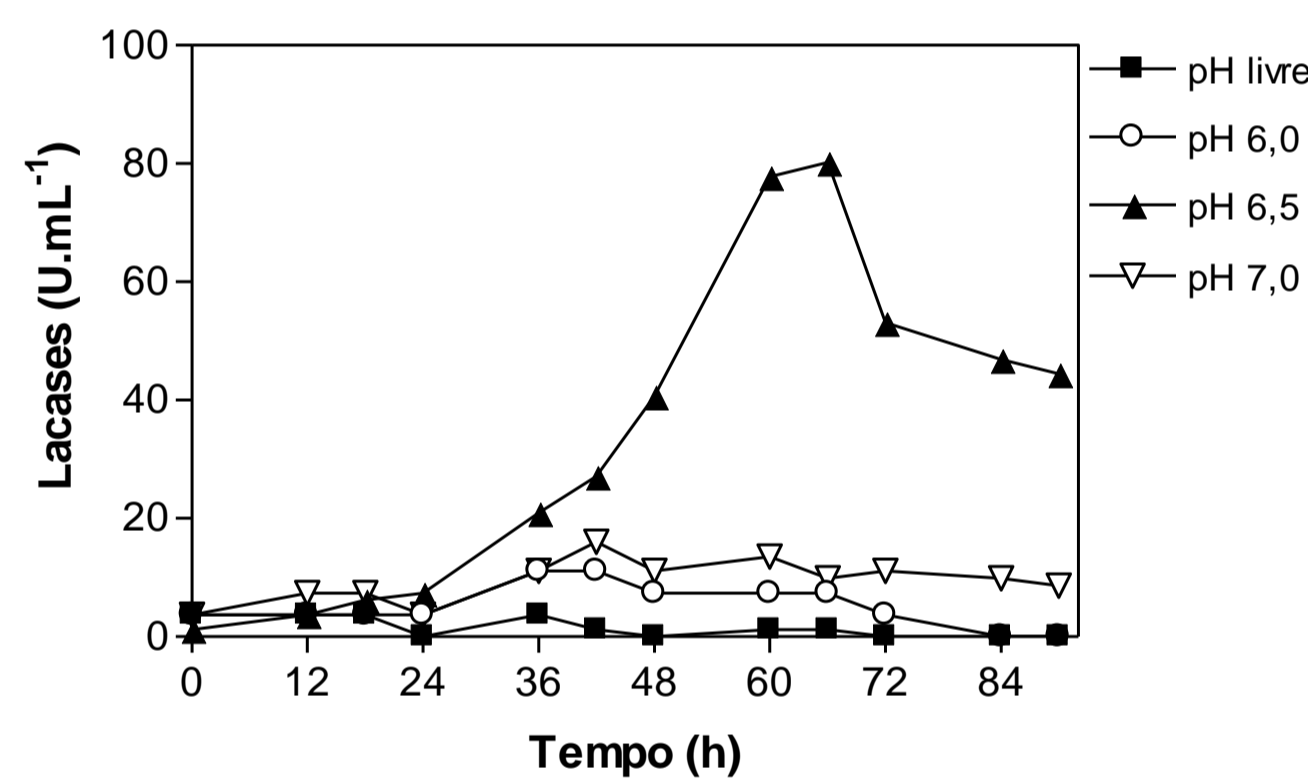


Figura 5. Atividade de lacases em função do tempo durante cultivos submersos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em biorreator com agitação mecânica sob diferentes condições de pH a 28°C.

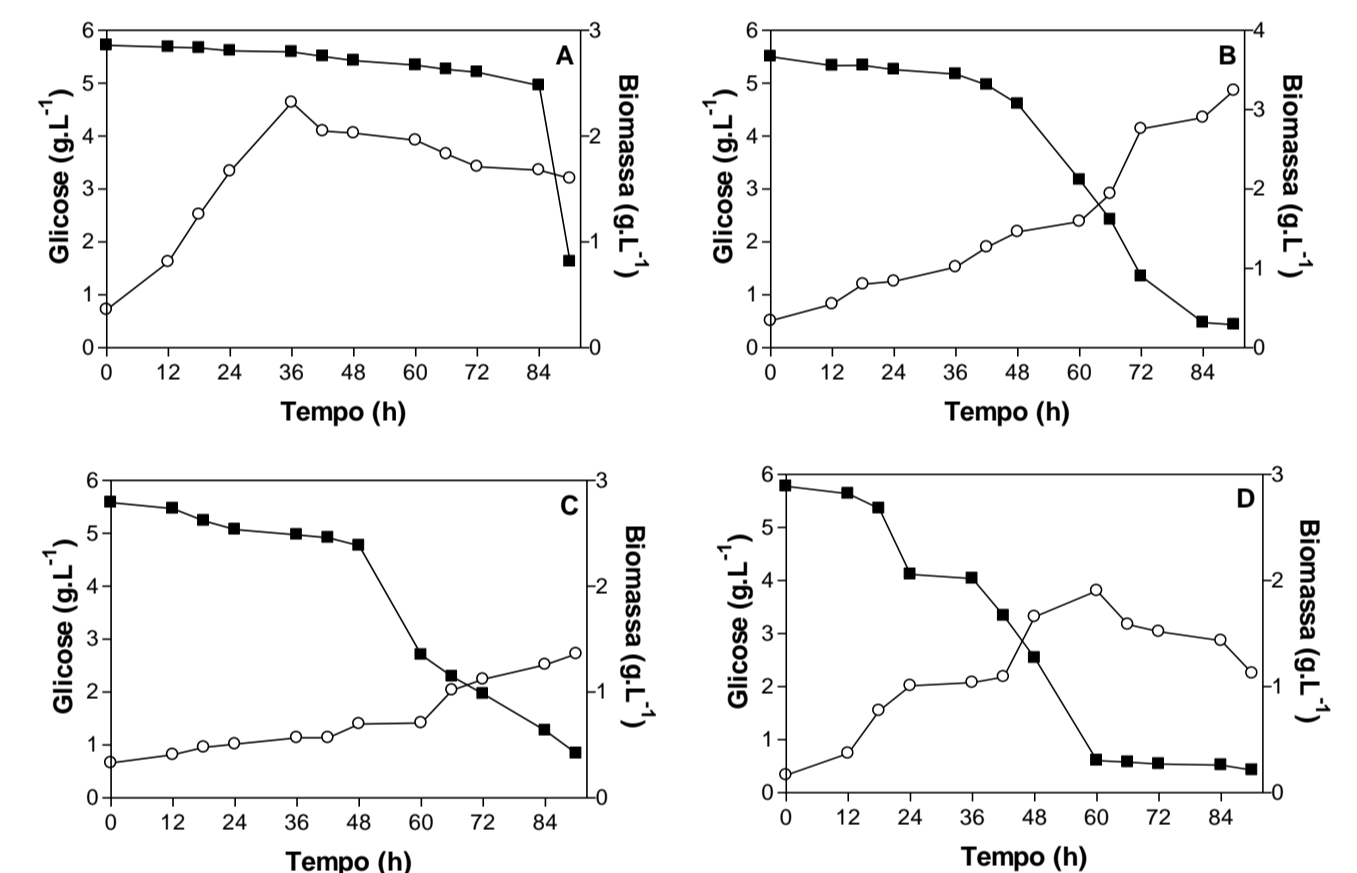


Figura 6. Consumo de substrato (■) e biomassa micelial (○) em função do tempo em cultivos submersos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em biorreator com agitação mecânica sob diferentes condições de pH a 28°C. (A) pH livre. (B) pH 6,0. (C) pH 6,5. (D) pH 7,0.

Tabela 1. Atividades enzimáticas obtidas durante cultivos submersos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 realizados em biorreator com agitação mecânica sob diferentes condições de pH a 28°C.

	pH			
	Livre	6,0	6,5	7,0
Lac (U/mL)	3,70	11,1	80,2	16,0
Tempo (h)	0	36	66	42
Per (U/mL)	2,47	2,47	19,7	6,17
Tempo (h)	24	36	72	60
MnP (U/mL)	1,22	6,98	0,09	3,66
Tempo (h)	36	72	48	66
LiP (U/mL)	ND	0,9	ND	ND
Tempo (h)	---	48	---	---
OAV (U/mL)	ND	0,50	ND	ND
Tempo (h)	---	12	---	---

Legenda: ND - Atividade enzimática não detectada.

Lac (atividade máxima de lacases), Per (atividade máxima de peroxidases totais), MnP (atividade máxima de mangânes peroxidases), LiP (atividade máxima de lignina peroxidases), OAV (atividade máxima de oxidases do álcool veratrílico).

Tabela 2. Resultados gerais obtidos durante cultivos submersos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 realizados em biorreator com agitação mecânica sob diferentes condições de pH a 28°C.

	pH			
	Livre	6,0	6,5	7,0
Lac _{máx} (U/mL)	3,70	11,1	80,2	16,0
Tempo (h)	0	36	66	42
P _E (U/mL/h)	0	0,206	1,197	0,294
X _{máx} (g/L)	2,32	3,24	1,36	3,81
Tempo (h)	36	90	90	60
P _X (g/L/h)	0,054	0,032	0,011	0,058

Legenda: Lac_{máx} (máxima atividade de lacases), P_E (produtividade volumétrica de lacases), X_{máx} (máxima concentração celular), P_X (produtividade volumétrica de biomassa).

CONCLUSÕES

- Atividades de lacases foram observadas em todas as condições testadas, com os melhores resultados em pH 6,5 (pico de 80 U/mL em 66 h e produtividade volumétrica de 1,197 U/mL/h).
- Também foram detectadas atividades de outras fenol-oxidases (peroxidases totais, MnP, LiP e OAV), porém, em níveis inferiores aos observados para lacases, que é a principal enzima produzida por *P. sajor-caju* PS-2001 em processo submerso.
- O pH 7,0 favorece a produção de biomassa micelial, que atingiu um pico de 3,81 g/L em 60 h de cultivo; no entanto, o mesmo efeito não foi observado sobre a produção de lacases.
- Os resultados obtidos mostram que a manutenção do pH em 6,5 resulta em relevante incremento na síntese de lacases e em elevada produtividade volumétrica, mesmo com baixa biomassa micelial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bourbonnais, R. & Paice, M.G. (1988). *Biochem. J.* 255: 445-450.
 Heinzkill, M. *et al.* (1998). *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1601-1606.
 Kuwahara, M. *et al.* (1984). *FEBS Lett.* 169: 247-250.
 Miller, G.L. (1959). *Anal. Chem.* 31: 426-428.
 Tien, M. & Kirk, T.K. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 2280-2284.
 Wolfenden, B.S. & Willson, R.L. (1982). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* 02: 805-812.

APOIO