

Seleção de Macrofungos Produtores de Lipases e Proteases

Marcelo Müller dos Santos^{1,3}, Maria Angela Lopes de Almeida Amazonas²,
David Alexander Mitchell¹ e Nadia Krieger³

1. Laboratório de Fermentação no Estado Sólido, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro Politécnico, UFPR, marcelomuller@hotmail.com 2. Centro Nacional de Pesquisa em Florestas, Embrapa Florestas, Colombo-PR. 3. Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise, Departamento de Química, Centro Politécnico, UFPR – Caixa Postal 19081, CEP 81531-990

RESUMO

Neste trabalho investigou-se a produção de lipases e proteases em isolados de macrofungos depositados na coleção de culturas da Embrapa Florestas, Colombo, Paraná. Técnicas rápidas de detecção qualitativa de atividade enzimática foram empregadas, permitindo a triagem de vários isolados em curto espaço de tempo. Para tanto, os macrofungos foram cultivados a 25 °C em placas de Petri contendo ágar bacteriológico 1,5 %, 1 % óleo de oliva e Rodamina B, para a detecção de lipases; para proteases, utilizou-se ágar nutriente adicionado de 4 % de gelatina. A detecção de atividade lipolítica baseou-se no halo fluorescente formado pela Rodamina B e pelo ácido graxo gerado na reação enzimática. A atividade proteolítica foi investigada pela formação de halos transparentes gerados pela degradação da gelatina. Foram avaliadas 45 linhagens de macrofungos, das quais 16 mostraram atividade lipolítica e 39 atividade proteolítica, sendo que as 16 linhagens que apresentaram atividade lipolítica também apresentaram atividade proteolítica.

INTRODUÇÃO

Macrofungos são fungos filamentosos que possuem a capacidade de produzir corpos de frutificação (Chang, 1993). A grande maioria dos macrofungos fazem parte do grupo dos basidiomicetos, mas alguns ascomicetos também podem produzir corpos de frutificação e também são classificados como macrofungos. Estes fungos têm sido utilizados a séculos pela medicina oriental (Cui & Chisti, 2003), principalmente devido às suas atividades antivirais (Collins & Tzi, 1997), anti-câncer (White *et al.*, 2002) e imunoestimulantes (Zhang *et al.*, 2002), que têm sido comprovadas em estudos recentes.

No Ocidente, os macrofungos são mais conhecidos por uma outra capacidade específica que possuem, a degradação da madeira. A adaptação destes microrganismos a ambientes florestais pela sua capacidade de obter nutrientes da madeira, deve-se a um complexo enzimático conhecido como complexo lignolítico. As enzimas que fazem parte deste complexo, a lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e lacase têm sido extensivamente estudadas. Apesar do grande avanço nos estudos das enzimas do complexo lignolítico de macrofungos, pouco foi feito até então, no estudo de enzimas hidrolíticas, entre elas lipases e proteases produzidas por estes fungos.

As lipases são definidas como carboxilesterases que catalisam a hidrólise e síntese de acilgliceróis de cadeia longa, sendo a trioleína o substrato padrão (Jaeger & Eggert, 2002). Podem ser aplicadas desde indústrias de detergentes (Kirk *et al.*, 2002) até a síntese de compostos de alto valor agregado (Rasor & Voss, 2001; Liese & Filho, 1999; Panke & Wubbolts, 2002; Jaeger & Eggert, 2002). As proteases, além de serem utilizadas em processos industriais como a fabricação de detergentes, na cervejaria e panificação, também, em condições apropriadas, podem catalisar a síntese de peptídeos de alto valor comercial (Beynon & Bond, 1989). Além dos exemplos já mencionados, a utilização tanto de lipases (Yoshida *et*

Tabela 1. Resultados do *screening* para a seleção de macrofungos produtores de lipases e proteases.

Macrofungo	Procedência	Lipase	Protease
<i>Agaricus cf^b. arvensis</i>	Tibagi-PR	-	+
<i>Agaricus fuscofibrillosus mediofuscus</i>	Curitiba-PR	-	-
<i>Agaricus brasiliensis</i> 72	CNPF ^a	-	+
<i>Agaricus brasiliensis</i> 97/11	UNESP-Botucatu	-	+
<i>Agaricus brasiliensis</i> 99/25	UNESP-Botucatu	-	+
<i>Agaricus brasiliensis</i> 99/26	UNESP-Botucatu	-	+
<i>Agaricus brasiliensis</i> 99/28	UNESP-Botucatu	-	+
<i>Agaricus brasiliensis</i> 99/29	UNESP-Botucatu	-	+
<i>Agaricus brasiliensis</i> 99/30	UNESP-Botucatu	-	+
<i>Agaricus brasiliensis</i> 00/30	UNESP-Botucatu	-	+
<i>Aurantioporus pulcherrimus</i> (micélio branco)	CNPF	+	+
<i>Aurantioporus pulcherrimus</i> (micélio rosa)	CNPF	-	+
<i>Aurantioporus pulcherrimus</i>	CNPF	-	+
<i>Chlorophyllum molybdites</i>	CNPF	-	-
<i>Flaviporus venustus</i>	CNPF	+	+
<i>Fomitopsis nivosa</i>	Guaraqueçaba-PR	+	+
<i>Ganoderma australe</i>	CNPF	+	+
<i>Ganoderma do complexo^b lucidum</i> †	Chapada dos Veadeiros - GO	+	+
<i>Ganoderma lucidum</i>	Curitiba - PR	+	+
<i>Ganoderma lucidum</i>	Hong Kong - China	-	+
<i>Ganoderma orbiformum</i>	Paranaguá - PR	+	+
<i>Gymnopilus sapineus</i>	CNPF	-	+
<i>Hydnopolyporus fimbriatus</i>	CNPF	+	+
<i>Henningsia brasiliensis</i>	Curitiba - PR	+	+
<i>Hypholoma subviride</i>	CNPF	+	+
<i>Lentinula boryana</i>	Quatro Barras - PR	-	-
<i>Lentinula edodes</i> 697	Tottori - Japão	-	+
<i>Lentinula edodes</i> LE1	Londrina - PR	+	+
<i>Lentinus crinitus</i>	CNPF	+	+
<i>Lentinus strigellus</i>	CNPF	-	+
<i>Lentinus strigosus</i>	CNPF	-	+
<i>Lentinus velutinus</i>	Balsa Nova - PR	+	+
<i>Oudemansiella canarii</i>	Curitiba - PR	-	+
<i>Paecilomyces farinosum</i>	São José dos Pinhais - PR	+	+
<i>Perenniporia martiusii</i>	São José dos Pinhais - PR	-	+

- Choi, H.S. e Sa, Y.S. (2000) Fibrinolytic and antithrombotic protease from *Ganoderma lucidum*. *Mycologia*. v. 92, p. 545-552.
- Choi, H.S. e Shin, P.H. (1998) Purification and partial characterization of a fibrinolytic protease in *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia*. v. 90, p. 674-679.
- Collins, R. A. e Tzi, B. N. (1997) Polysaccharopeptide from *coriolus versicolor* has potential for use against human immunodeficiency virus type 1 infection. *Life Sciences*. v. 60, n. 25, p. 383-387.
- Cui, J. e Chisti, Y. (2003) Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances*. v. 21, n. 2, p. 109-122.
- Hankin, L. e Anagnostakis, S.L. (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*. v. 67, p. 597-607.
- Jaeger, K. e Eggert, T. (2002) Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 13, p. 390-397.
- Kirk, O.; Borchert, T.V. e Fuglsang, C.C. (2002) Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 13, p. 345-351.
- Liese, A.; Filho, M.F. (1999) Production of fine chemicals using biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 10, p. 595-603.
- López-Serrano, P.; Wegman M.A.; van Rantwijk, F. e Sheldon, R.A. (2001) Enantioselective enzyme catalysed ammoniolysis of amino acid derivatives. Effect of temperature. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 12, p. 235-240.
- Panke, S. e Wubbolts, M.G. (2002) Enzyme technology and bioprocess engineering. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 13, p. 111-116.
- Rapp, P. e Backhaus, S. (1992) Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 14, p. 938-943.
- Rasor, J.P. e Voss, E. (2001) Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. *Applied Catalysis A: General*. v. 221, p. 145-158.
- Shelley, A. W.; Deeth, H. C. e Macrae, I. C. (1987) Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. *Journal of Microbiology Methods*, v. 6, p. 123-137.
- Wang, H.X. e Ng, T.B. (2001) Pleureryn, a novel protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 289, p. 750-755.
- White, R. W.; De Vere, H.R.M.; Soares, S. E.; Beckett, L.A. e Sun, B. (2002) Effects of a mushroom mycelium extract on the treatment of prostate cancer. *Urology*, v. 60, p. 640-644.
- Yoshida, N.; Aono, M.; Tsubuki, T.; Awano, K. e Kobayashi, T. (2003) Enantioselective synthesis of a chiral pyridazinone derivative by lipase-catalyzed hydrolysis. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 14, p. 529-535.
- Zhang, J.; Tang, Q.; Zimmerman-Kordmann, M.; Reutter, W. e Fan, H. (2002) Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*. *Life Sciences*, v. 71, p. 623-638.