

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### **Bioprospecção de Fungos Filamentosos Produtores de Enzimas Polissacaridasas Úteis Para Obtenção do Etanol Celulósico**

**Leonardo Corrêa Bertonha, Miguel Leal Neto, Jaqueline da Silva Coelho-Moreira,  
Adelar Bracht e Rosane Marina Peralta**

Universidade Estadual de Maringá– Departamento de Bioquímica  
Av. Colombo, 5.790 CEP 87020-900, Maringá - Pr  
Telefones: (44) 3011-4715; 30111372  
E-mail: jaquecoelho@hotmail.com

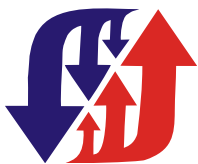
#### **RESUMO**

*Fungos filamentosos isolados de culturas de cana de açúcar foram avaliados quanto ao potencial de produção de enzimas hidrolíticas visando o aproveitamento do material lignocelulósico do resíduo bagaço de cana. Os fungos foram cultivados por 7 e 14 dias a 28° C utilizando-se uma mistura de bagaço de cana de açúcar:farelo de trigo na proporção de 4:1 com uma umidade inicial de 80%. Os extratos enzimáticos obtidos foram avaliados quanto a produção de enzimas amilase, endoglucanase, pectinase e xilanase utilizando-se técnicas de cup plate. Após avaliação dos halos de hidrólise os seguintes dez isolados mereceram destaque como bons produtores das enzimas polissacaridasas: *Bipolaris sp AR156*, *Penicillium sp AR155*, *Aspergillus sp AR136 A*, *Aspergillus 125*, *Fusarium sp AR 101*, *Fusarium 132*, *Fusarium AR126*, *Fusarium AR167*, *Fusarium AR176* e *Fusarium 206*.*

Palavras-chave: Fungos filamentosos, Bagaço de cana de açúcar, Fermentação em estado sólido, Endoglucanase, Xilanase, Pectinase.

#### **INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos esforços consideráveis tem sido realizados para a obtenção de energias renováveis e não poluidoras. Dentro deste contexto, o etanol celulósico ou etanol de segunda geração obtido a partir de resíduos lignocelulósicos provenientes da atividade agrícola merece destaque. A obtenção do etanol celulósico passa por 3 etapas igualmente importantes: (1) o pré-tratamento, onde se busca através de métodos físicos, químicos ou biológicos tornar os polissacarídeos mais acessíveis à hidrólise enzimática pela remoção da lignina; (2) a hidrólise enzimática, onde enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas serão utilizadas para a formação dos açúcares fermentáveis, principalmente glicose e xilose a partir da hidrólise da celulose e hemiceluloses; e (3) a fermentação, que continua utilizando leveduras para a produção de etanol, da mesma forma que no processo de obtenção de etanol de primeira geração. As polissacaridasas são, portanto, de fundamental importância para o processo de formação de açúcares fermentescíveis. Diversas enzimas conseguem sacarificar os carboidratos que seguem presentes no bagaço da cana de açúcar, tais como celulasas, xilanasas e pectinasas (Maciel, 2010). O número de fungos filamentosos conhecidos que eficientemente hidrolisam os polissacarídeos das fibras lignocelulósicas ainda é pequeno, e estudos de bioprospecção que indiquem novas fontes de enzimas úteis devem ser encorajados. O presente trabalho teve como objetivo avaliar fungos filamentosos isolados de culturas de cana de açúcar como potenciais produtores de enzimas polissacaridasas.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

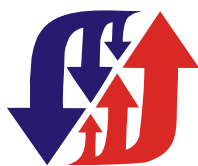
### MATERIAL E MÉTODOS

Os fungos *Fusarium* sp identificados como AR167, AR101, AR132, AR 176, AR126 e AR 206, *Aspergillus* sp identificados como AR136-A e AR125, *Penicillium* sp. AR155, *Beauveria* sp. 154, *Mariannaea* sp. AR22, *Curvularia* sp. 149 e *Bipolaris* sp. 156 foram gentilmente cedidos pela Prof. Dra. Maria Quecine, da Universidade de São Paulo. Estes isolados foram isolados de culturas de cana de açúcar e identificados pela região IPS 1-5.8S-IPS2 do DNA ribossômico. Os isolados são mantidos em laboratório em meio agar-batata-dextrose. Para produção das enzimas, foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 4 g de bagaço de cana, 1 g de farelo de trigo, 0,020 g de extrato de levedura e 20 mL de meio mineral para obtenção de umidade inicial de 80%. Após esterilização por autoclavagem, uma suspensão de esporos ( $1 \times 10^8$ ) foi adicionada e as culturas foram mantidas a 28° C por 7 ou 14 dias. Para fins de comparação da produção das enzimas, o mesmo procedimento foi realizado com os fungos *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* 25 e *Trichoderma reesei* 9414. Ao final dos cultivos, 50 mL de água estéril foram adicionados às culturas e as misturas foram mantidas sob agitação por 30 min, sendo então filtradas com auxílio de uma gaze e finalmente centrifugadas por 10 min a 2.000 rpm em centrífuga refrigerada. Os extratos enzimáticos foram mantidos a -20°C até análise das atividades enzimáticas.

Os ensaios de cup plate foram realizados em placas de Petri descartáveis. Os meios reacionais foram preparados utilizando-se ágar como agente solidificante e os substratos específicos para cada enzima. Após solidificação do ágar, poços foram formados com objeto cortante, e um volume de 100 µL de cada extrato enzimático foi adicionado às placas, que foram mantidas por 24 h à 30° C. Após este período, a atividade de cada enzima foi avaliada. Para amilase utilizou-se ágar-amido (ágar, 18 g. L<sup>-1</sup>; amido, 10 g. L<sup>-1</sup>, tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0), e a revelação foi realizada pela adição de solução de iodo 0,1%, observando-se halos translúcidos sobre um fundo azul. Para endocelulase (CMCase), utilizou-se ágar-CMC (ágar, 18 g.L<sup>-1</sup>, carboximetilcelulose, 10 g.L<sup>-1</sup>, tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0), e a revelação foi realizada pela adição de vermelho do congo 0,1% e solução de NaCl 0,1M, observando-se a formação de halos descoloridos sobre fundo vermelho. Para xilanase utilizou-se a mesma metodologia de CMC ase, substituindo CMC por xilano, observando-se os halos de descoloração. Para pectinase, o meio continha 10 g L<sup>-1</sup> de pectina; 20g.L<sup>-1</sup>, ágar; tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0. A revelação foi realizada pela observação dos halos translúcidos.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos das avaliações das atividades das enzimas amilase, pectinase, xilanase e endoglucanase (CMCase) dos fungos isolados das culturas de cana de açúcar e dos fungos controles. Muitos isolados não apresentaram atividade pectinase. Tal fato pode ser devido à baixa concentração de pectina no meio de cultivo, considerando que o substrato mais abundante foi o bagaço de cana de açúcar.



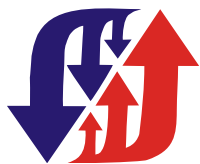
## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Tabela 1. Avaliação das atividades de polissacaridases pela técnica de *cup plate*

Avaliação da atividade de polissacaridases (halos em cm obtidos após 7 e 14 dias de cultivo)				
	Amilase	Pectinase	Xilanase	CMCase
<i>Fusarium AR167</i>	1,9/1,5	-/1,5	2,6/2,7	2,5/2,7
<i>Mariannaea AR22</i>	2,1/2,0	1,3/-	1,7/3,0	1,8/1,9
<i>Beauveria AR154</i>	1,3/1,6	-/-	1,3/2,4	1,2/1,2
<i>Fusarium AR101</i>	1,6/2,2	-/0,9	2,1/3,1	2,4/2,9
<i>Penicillium AR155</i>	2,0/1,6	2,1/-	3,0/3,0	2,6/2,7
<i>Aspergillus AR136 A</i>	2,6/1,5	-/-	3,4/3,4	3,2/3,1
<i>A. awamori</i> **	4,2/3,1	-/2,0	3,5/3,3	3,1/3,1
<i>T. reesei 9414</i> **	2,1/2,1	-/-	2,9/2,5	3,7/2,4
<i>A. niger 25</i> **	2,3/2,3	1,9/-	3,2/3,0	3,0/3,2
<i>Aspergillus 125</i>	2,2/2,2	-/-	2,5/2,6	2,6/3,1
<i>Fusarium 132</i>	2,1/2,1	-/2,0	2,4/2,5	2,5/2,7
<i>Curvularia 149</i>	3,0/3,0	1,2/-	2,5/2,4	1,6/2,1
<i>Bipolaris 156</i>	3,3/3,3	-/-	2,8/2,3	2,0/2,4
<i>Fusarium AR 176</i>	1,6/1,6	-/1,6	2,6/2,8	2,2/2,4
<i>Fusarium AR 126</i>	2,6/2,6	-/-	3,0/2,6	2,3/2,3
<i>Fusarium 206</i>	2,0/2,0	-/-	3,1/3,2	2,4/2,8

\*\* Culturas controle

De maneira geral, todos os isolados cresceram no meio oferecido (mistura de bagaço de canafarelo de trigo). Consideramos que dez isolados (assinalados em negrito na Tabela 1) demonstraram maiores possibilidades de serem bons produtores de alguma polissacaridase de interesse pelos resultados obtidos: *Fusarium AR167*, *Fusarium AR101*, *Fusarium 206*, *Penicillium AR155*, *Aspergillus AR136A*, *Aspergillus 125* e *Bipolaris 156*. Espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* tem sido muito exploradas como boas produtoras de amilases e xilanases. Muitas destas espécies são exploradas comercialmente (Correa et al. 2014). O gênero *Fusarium* é bastante conhecido por ser um fitopatógeno e mais de 120 espécies são conhecidas. Recentes estudos mostram que *Fusarium oxysporum* é capaz de produzir várias enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal e graças a isto é considerado um fungo relevante para a produção de etanol celulósico (Anasontzis & Chistakopoulos 2014).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### CONCLUSÕES

Os resultados apresentados são preliminares, mas apontam para a potencialidade de alguns isolados serem fontes de enzimas úteis para a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa vegetal. Estudos futuros serão realizados buscando otimizar a produção das enzimas por estes isolados em cultivos em estado sólido.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anasontzis, GE, Chistakopoulos P. 2014. Challenges in ethanol production with *Fusarium oxysporum* through consolidated bioprocessing. *Bioengineered* 5:393-395.

Correa, RC, Rhoden SA, Mota TR, Azevedo JL; Pamphile JL, de Souza CG, Polizeli ML, Bracht A, Peralta RM. 2014. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. *J Microbiol Biotechnol* 41:1467-1478.

Maciel, VFA, Pacheco TF, Gonçalves SB. 2010. Padronização do uso do corante rodamina B para avaliação de atividade lipolítica em estirpes fúngicas. *Comunicado Técnico Embrapa*. 1:1- 3.

Silva Neves KC, Porto ALF, Teixeira MFS. 2006. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular *Acta Amazônica*. 36:299 – 306