

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Determinação do Perfil de Endoglucanases de Fungos Filamentosos Isolados do Parque Nacional de Itatiaia e seu Potencial Biotecnológico

Julia Ramos de Souza Baruque¹, Eutizio Luca D'Ottavio Longo² e Rodrigo Pires do Nascimento²

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Cidade Universitária, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Departamento de Engenharia Bioquímica, Cidade Universitária, 21941-909, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

E-mail: rodrigopires@eq.ufrj.br / jubabaruque@hotmail.com

RESUMO

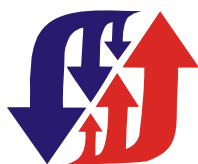
Os fungos filamentosos são microrganismos quimiorganotróficos, aeróbios que existem em diferentes habitats, como a Mata Atlântica. Apresentam uma grande versatilidade metabólica, tornando-os alvos de estudos de perfil enzimático para fins biotecnológicos. Assim, o presente trabalho objetivou bioprospectar fungos filamentosos com capacidade celulolítica a partir de amostras de solo coletadas no Parque Nacional de Itatiaia. Foram isolados 9 fungos em meio seletivo contendo celulose microcristalina como fonte de carbono. Os isolados de fungos foram crescidos em meio de saís contendo papel de filtro como principal fonte de carbono a 28°C / 200 rpm / 7 dias. Ao longo de 3, 5 e 7 dias, alíquotas foram coletadas, centrifugadas e a atividade de endoglucanase determinada pela quantificação de açúcares redutores (DNS). A maior atividade (1.633,48 U/l) foi detectada pelo isolado I14-13 ao fim de 7 dias. Esse estudo sugere o potencial de fungos filamentosos da Mata Atlântica na degradação de biomassa vegetal.

Palavras-chave: celulasas, fungos filamentosos, processos fermentativos.

INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos eucarióticos, saprófitas ou parasitas, pertencentes ao domínio Eukarya e classificados no reino Fungi. De acordo com Hibbett et al. (2007), a nova classificação do reino dos fungos é composta por 7 filos, 10 subfilos, 35 classes, 12 subclasses e 129 ordens. Os fungos podem ser encontrados abundantemente no solo, sendo de grande importância dentro dos ecossistemas terrestres, onde exercem importante papel na decomposição de material orgânico através da secreção de enzimas extracelulares que digerem matéria orgânica complexa (Heaton et al., 2012, Madigan et al., 2012), o que os tornam potenciais fontes de enzimas com aplicabilidade biotecnológica. Dentre as enzimas fúngicas de grande relevância industrial e ambiental, destacamos as holocelulasas, amilases, peroxidases, peptidases, entre outras (Lange et al., 2012).

A parede celular vegetal é o maior reservatório de fonte de carbono renovável em a natureza, e contém três importantes constituintes poliméricos: a celulose, as hemiceluloses e a lignina (Goyal et al., 2008). A estrutura da celulose pode ser quebrada por intermédio de um



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

complexo enzimático que reconhece as ligações β -1,4 entre as moléculas de glucose, denominadas celulases, que apresentam grande potencial biotecnológico. As celulases são divididas em 3 grupos: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e β -glucosidases (EC 3.2.1.21). Assim, o presente estudo objetivou isolar e selecionar fungos filamentosos celulolíticos de solo coletado na parte baixa do Parque Nacional de Itatiaia (PNI).

MATERIAL E MÉTODOS ISOLAMENTO DE FUNGOS CELULOLÍTICOS

Duas amostras de solo foram coletada na parte baixa do Parque Nacional de Itatiaia, a denominada I14 a uma altitude de 1.104m (22.431493°S / 44.621872°W) e a denominada I5 a uma altitude de 1.216m (22.256173°S / 44.370904° W). O isolamento de ambas as amostras foi processado de acordo com a metodologia da Diluição Seriada, com plaqueamento em meio de sais suplementado com celulose microcristalina. As placas foram incubadas a 30°C por 10 dias e os fungos crescidos foram transferidos para placas contendo meio de Agar Malte (pH 5.5). Os fungos crescidos de forma pura foram conservados em água estéril (Castellani, 1939).

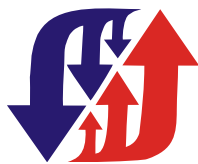
Os fungos foram identificados pela técnica do microcultivo, no qual estruturas de reprodução anamorfa foram visualizadas em microscópio óptico, no aumento de 100x e 400x.

DETECÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA

O meio fermentativo consistia de 1.0% (p/v) papel de filtro Whatman n°1 (1,0 cm²) e 0.1% (p/v) extrato de levedura em solução de sais (pH 5,5) contendo (g/l): 2.0 K₂PO₄; 1.4 (NH₄)₂SO₄; 0.3 MgSO₄.7H₂O; 0.3 CaCl₂; 0.005 FeSO₄.7H₂O; 0.00156 MnSO₄.7H₂O; 0.0014 ZnSO₄.7H₂O; 0.002 CoCl₂ (Mandels & Weber, 1969). Cada Erlenmeyer (250 mL) continha 60 mL de meio fermentativo, o qual foi inoculado com 2 slots (0,5 cm²) do crescimento micelial do fungo em meio Agar Malte (após 10 dias de incubação a 28°C, pH 5,5) a ser estudado e então o sistema foi incubado a 28°C / 200 rpm / 7 dias. Alíquotas foram retiradas ao fim de 3, 5 e 7 dias. Os sobrenadantes foram obtidos após filtração em filtro de vidro sinterizado (n°3) e congelados a -18°C para análises posteriores. O sistema de análise foi conduzido em duplicata. As linhagens I14-2, I14-12, I14-13, I14-16 e I14-17 da amostras I14 e I5-1, I5-3, I5-4 e I5-6 foram escolhidas inicialmente para a análise do perfil celulolítico.

ENSAIO ANALÍTICO

A determinação da atividade de endoglucanase (CMCase) foi conduzida através da quantificação dos açúcares redutores gerados na presença de 2.0% (p/v) carboximetilcelulose em tampão citrato de sódio, 50 mM, pH 4,8, pelo método DNS (Miller, 1959), como descrito por Ghose (1987). O sistema enzimático foi incubado a 50 °C por 20 min e a leitura foi realizada por espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) correspondeu a liberação de 1 μ mol de glucose equivalente por minuto nas condições do ensaio. Todos os ensaios analíticos foram realizados em triplicata.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os fungos das amostras I14 e I5 foram isolados de solo de área florestal (Mata Atlântica), a uma altitude de aproximadamente 1.100 m e 1.200 m, respectivamente. Utilizando meio seletivo contendo celulose microcristalina como única fonte de carbono, foi possível isolar ao todo 9 linhagens de fungo filamentososo da amostra I14 e 7 linhagens de fungo filamentososo da amostra I5. Esses fungos foram identificados como sendo dos gêneros *Penicillium* (isolado I14-2), *Trichoderma* (isolados I14-12, I14-13, I14-16 e I14-17). Os fungos isolados da amostra I5 não foram identificados. Os isolados I14-13 e I5-6 apresentaram maior atividade de endoglucanase (1.633,48 U/l e 1.357,38 U/l, respectivamente), ao fim de 7 dias (Figuras 1 e 2). O isolado I14-2 também apresentou uma boa atividade de endoglucanase (1.024,89 U/l) ao fim de 5 dias. Já os isolados I5-1, I5-3, I14-16 e I14-17 apresentaram atividade de endoglucanase inferior a 500 U/l, como observado nas Figuras 1 e 2.

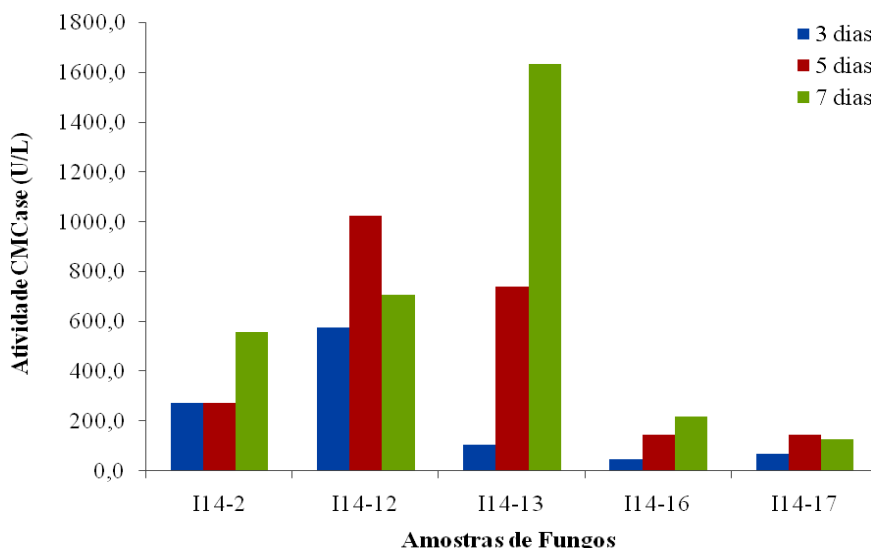


Figura 1 – Perfil de produção de endoglucanase pelos isolados de fungo da amostra I14 na presença de papel de filtro como substrato indutor, em condição submersa.

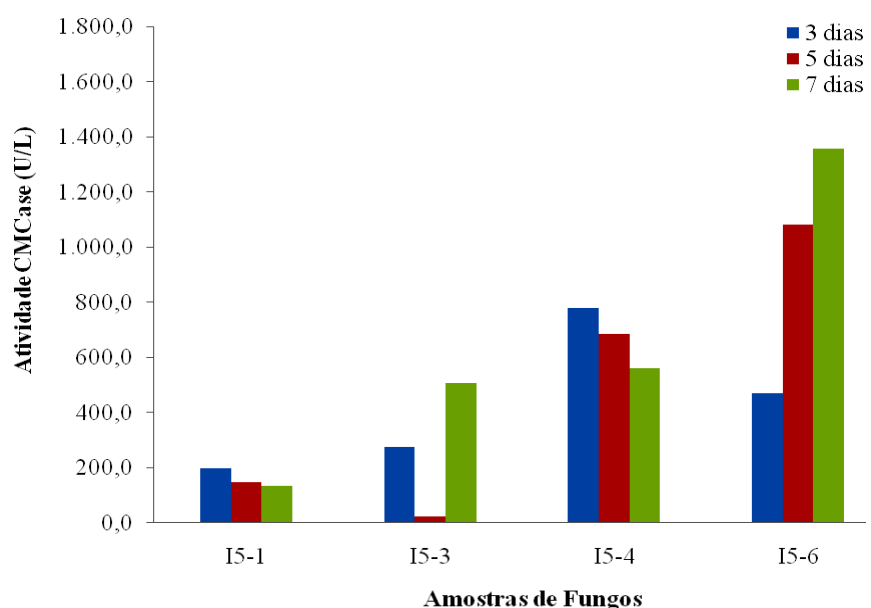
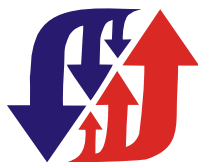


Figura 2 – Perfil de produção de endoglucanase pelos isolados de fungo da amostra I5 na presença de papel de filtro como substrato indutor, em condição submersa.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Dados na literatura sugerem que os valores obtidos no presente trabalho, em condições não otimizadas, são promissores. Grigorevski-Lima et al. (2013) observou a produção de celulases pela estirpe *Trichoderma atroviride* 676, isolada da floresta amazônica, obtendo valores de 1.900 U/l de endoglucanase (CMCase) na presença de 3,0% (p/v) bagaço de cana e 0,3% (p/v) milhocina. Castro et al. (2010) observou valores de endoglucanase para o fungo *Penicillium funiculosum* variando entre 446,0 e 3.588,0 U/l em diferentes substratos naturais e em condições otimizadas. Os resultados aqui obtidos indicam que os fungos de Itatiaia apresentam potencial celulolítico de grande relevância.

CONCLUSÕES

O Parque Nacional de Itatiaia pode ser considerado um importante “hot spot” na busca de novos fungos com potencial celulolítico. Em estudos anteriores (Longo et al., 2013), algumas linhagens isoladas apresentaram excelente potencial celulolítico. Os dados apresentados aqui fazem parte de um amplo projeto de bioprospecção e novos estudos deverão ser realizados em outras amostras de solo e serrapilheira do Parque Nacional de Itatiaia para determinar o perfil celulolítico dos fungos filamentosos deste bioma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Castellani A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. J. Trop. Med. Hygiene, vol 42, pp. 225-226.
- Castro AM, Carvalho MLA, Leite SGF, Pereira-Jr. N. 2010. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. vol. 37, pp. 151-158.
- Ghose TK. 1987. Measurement of cellulase activities. Pure Appl Chem., vol 59, pp. 257-268.
- Goyal M, Kalra KL, Sarren VK, Soni G. 2008. Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. Braz. J. Microbiol. vol 39, pp.535-541.
- Heaton L, Obara B, Grau V, Jones N, Nakagaki T, Boddy L, Fricker MD. 2012. Analysis of fungal networks. Fungal Biol. Rev. vol 26, pp. 12-29.
- Lange L, Bech L, Busk PK, Grell MN, Huang Y, Lange M, Linde T, Pilgaard B, Roth D, Tong X. 2012. The importance of fungi and of mycology for a global development of the bioeconomy. IMA Fungus vol 3, pp. 87-92.
- Longo ELD, Arruda GF, Oliveira MU, Menezes JPSQ, Oliveira MMQ, Coelho RRR, Nascimento RP. 2013. Avaliação da Produção de Celulases por Fungos Isolados da Mata Atlântica. XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos, Foz do Iguaçu, PR.
- Mandels, M., Weber, J. 1969. Production of cellulases. Adv. Chem. Ser. vol 95, pp. 391-414.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P. 2012. Brock Biology of Microorganisms. 13. ed. San Francisco: Benjamin Cummings.
- Miller, L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. vol. 31, pp. 426-428.

APOIO FINANCEIRO: CNPq, FAPERJ e FINEP.