

Isolamento de fungos filamentosos produtores de celulases a partir de tocos de *Pinus sp*

Isolation of cellulase-producing filamentous fungi from *Pinus sp*

RESUMO

Pedro Afonso Fatori Maldonado
maldonado.pe@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

João Eduardo Levandoski
levandoski.eg@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Marcio Silva
marcios@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Bioprospecção é uma alternativa para a descoberta de organismos com potencial biotecnológico a partir da natureza. Neste trabalho a bioprospecção de fungos, produtores de celulases, foi conduzida a partir de tocos de *Pinus sp*, em uma silvicultura localizada na mesorregião centro oriental do Paraná. Foram coletados fungos com potencial de produção de enzimas lignocelulolíticas, sendo possível posteriormente isolá-los em placas de Petri com meio Manachini, tendo como base a seleção das cepas que melhor degradam matéria orgânica com celulose como única fonte de Carbono. Para essa seleção foi utilizado o corante Vermelho do Congo, o qual revela o diâmetro do halo de hidrólise, assim é possível calcular o índice enzimático pelo comparativo entre o tamanho do halo da colônia em relação ao tamanho do halo degradado por ela. Três fungos advindos de tocos com maior tempo de corte atingiram índices superiores a 1,5: F11, F12 e L13, sendo possível inserir o fungo L13 em meios alternativos com variações de pH, fontes de Nitrogênio e fontes de Carbono o isolamento. Após a fermentação, testes com Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foram feitos para a determinação de açúcares redutores totais, obtendo resultados inconclusivos devido à baixa absorbância das amostras em espectrofotômetro.

PALAVRAS-CHAVE: Fungo. Enzima. *Pinus sp*.

ABSTRACT

Bioprospecting is an alternative for detecting organisms with biotechnological potential from nature. This work in a bioprospection of cellulase-producing fungi was conducted from *Pinus sp* stumps in a forestry located in the mesoregion of central eastern Paraná. Fungi with potential for the production of lignocellulolytic enzymes were introduced, the latter being isolated in Petri dishes with the name Manachini, based on the selection of strains that improve cellulose organic degradation as the sole carbon source. This does not the halogen of the colored halogen of the colored the halo of cologne in the sized of halogen degraded by her. Three fungi from stumps with longer duration reached the means 1.5: F11, F12 and L13, being possible to insert L13 in the alternative media with pH variations, nitrogen sources and carbon sources in the isolation. After fermentation, tests with 3,5-dinitrosilylic acid (DNS) were added to determine total sugars, obtaining inconclusive results due to the low absorption of spectrophotometer samples.

KEYWORDS: Fungus. Enzyme. *Pinus sp*.

INTRODUÇÃO Página | 2

Celulases são enzimas hidrolíticas que participam da degradação da biomassa da natureza (SINGHANIA et al, 2010). Três enzimas fazem parte do grupo das celulases: endoglucanase, exoglucanase e beta-glicosidase. As primeiras agem na parte interna das fibras de celulose, formando os oligossacarídeos. As exoglucanases atuam nas pontas das fibras celulósicas, tendo como produto final unidades de glicose ou celobiose, formados por duas unidades de glicose. Por último, as beta-glicosidases atuam na quebra da celobiose, liberando unidades de glicose livres (ZANCHETTA, 2013).

“Naturalmente, todos os fungos produzem um grande número de enzimas para decompor os materiais complexos”, (GOPINATH et al., 2005). Eles secretam variadas enzimas no ambiente para auxiliar na nutrição, sendo responsáveis pela degradação de matéria natural, refinada ou processada (FASANELLA, 2008). Um exemplo é o material lignocelulósico que é composto de interações entre celulose, hemicelulose e lignina, digerido por meio da liberação de celulases fúngicas para obterem carbono como produto reacional, permitindo seu crescimento (SALOMÃO, 2017).

Assim, um método de se conseguir enzimas é por meio da bioprospecção de fungos produtores das moléculas. A bioprospecção deve levar em conta os substratos aos quais as enzimas de interesse participam do processo (STROBEL et al., 2004). Desse modo, o presente estudo consistiu em, por meio da bioprospecção em tocos da madeira *Pinus sp* cedidos por uma indústria madeireira no município de Ponta Grossa-PR, encontrar e isolar fungos filamentosos produtores de celulase de acordo com a taxa de produção da enzima.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta

De acordo com (LEVANDOSKI, 2019, no prelo), a coleta baseou-se no tempo decorrido após o corte dos tocos enumerando de (0) a (7) anos, considerando (0) para tocos recém cortados. Coletou-se amostras de três tocos diferentes para cada período, perfurando cada um dos tocos com profundidades de 0 a 2cm e 10 a 12cm, obtendo-se 48 amostras dispostas em tubos Falcon distintos com o auxílio de espátulas esterilizadas.

Isolamento

Para o isolamento das cepas, (LEVANDOSKI, 2019, no prelo) seguiu o método que consistiu em selecionar os fungos que degradam celulose. Para tanto, 100g de cada amostra de *Pinus sp* coletados em uma madeireira localizada no município de Ponta Grossa foram inoculadas em placas Petri com meio seletivo Manachini (Ágar 18,0g; KH₂PO₄ 2,0g; (NH₄)₂SO₄ 1,0g; MgSO₄.7H₂O 0,1g; Na₂HPO₄.2H₂O 0,9g; Extrato de Levedura 1,0g, 1L de água e 0,5% (p/v) de substrato indutor - Carboximetilcelulose)(MANACHINI et al., 1987), em seguida foram reveladas com Vermelho do Congo (KASANA et al, 2008).

Revelação Vermelho do Congo

Para a revelação das placas, foi preparada solução aquosa Vermelho do Congo 0,1% (p/v) e outra solução NaCl 1M, em seguida, adicionou-se o Vermelho do Congo nas placas até cobrir toda superfície do meio. Após 20 minutos, a solução das placas foi descartada, adicionando-se desta vez a solução de NaCl 1M. Após 20 minutos, a solução foi retirada e conseguiu-se notar a formação do halo translúcido o qual demonstra a ação enzimática.

Índice enzimático

Para o índice enzimático dado pela equação (1) (LIMA, 2006), (LEVANDOSKI, 2019, no prelo) seguiu o roteiro de (FLORÊNCIO, 2011) com algumas adaptações. Com o auxílio de uma alça de Platina, em fluxo laminar, fez-se o repique das estirpes por ponto central, no qual foi pego uma pequena alíquota dos fungos reativados da micoteca e repassados para placas distintas, contendo 20mL meio de Manachini com CMC (Carboximetilcelulose) como única fonte de Carbono. Após 96h, foi feita a revelação com Vermelho Congo e 3 fungos mostraram índices enzimáticos promissores, sendo que um deles apresentou aspecto morfológico de levedura (L13).

$$I = \frac{\text{diâmetro do halo (mm)}}{\text{diâmetro do poço (mm)}} \quad (1)$$

Análise Levedura L13

A levedura utilizada no trabalho (L13), dentre os fungos selecionados, teve segundo melhor desempenho considerando o cálculo do índice enzimático que é dado pela equação (1) (LIMA, 2006). O valor foi calculado após crescimento em placa de Petri durante 96h, sendo o diâmetro do halo de hidrólise de 33,7mm e o diâmetro do poço de 20,8mm. Para o procedimento, considerou-se o meio de Manachini com variações no Ph (4,5 e 5,5), fontes de nitrogênio (Extrato de levedura e borra de café) e fontes de carbono (Carboximetilcelulose e pó de pinus). Os experimentos foram feitos em duplicata sendo nomeados de A e B, C e D e assim por diante até a duplicata O e P.

A cepa foi retirada da micoteca da universidade e repicada em placa de Petri em meio sabouraud. Foi preparado um pré inóculo no qual, com uma alça de platina fez-se raspagem do fungo distribuído no meio da placa de Petri, repassando-o para um tubo Falcon preenchido com 20 mL de meio Manachini. Após 7 dias, mantido na estufa a temperatura constante de 31°C, retirou-se uma alíquota de 50µL para contagem de esporos em câmara de Neubauer (NEVES, 2003), contando no sentido horário dos quadrantes. Como resultado obteve-se $6,95 \times 10^6$ células em 1L.

Quantificação de açúcares redutores pelo método Ácido 3,5-dinitrosalicílico DNS

Após o período, testes para quantificar a atividade celulolítica total foram feitos. Para isso, preparou-se tampão citrato-fosfato pH 4,8 e 0,05M, DNS (SANTOS, 2010) foram realizados com intuito de se quantificar as celulasas produzidas na incubação. Os tubos Falcon foram dispostos em centrífuga com rotação de 5000rpm a 15 minutos. Na sequência, com micropipeta, na câmara de fluxo, retirou-se 2,0mL do sobrenadante dos tubos, colocando-os em tubos Eppendorf devidamente identificados. Os tubos Eppendorf foram centrifugados em centrífuga de bancada a 15000rpm durante 15 minutos para obter um caldo enzimático ainda mais clarificado, livre de materiais sólidos. Papéis filtro

qualitativos foram picados em quadrados de 1cm x 3cm e colocados em tubos de ensaio de 10mL juntamente a 1,0mL de tampão citrato-fosfato e 0,5mL de cada tubo Eppendorf já centrifugados. Para o branco da amostra, 1,5mL de tampão citrato-fosfato e a tira de papel filtro. Na sequência, a estante com os tubos já preparados foi colocada em banho-maria a 50°C por 30 minutos, em paralelo, 0,5mL de DNS foi adicionado a tubos de 25mL. Passado o tempo no banho-maria, 0,5mL dos tubos de 10mL foi repassado para os tubos de 25mL e postos em uma bandeja com água fervente por 15 minutos. Por fim, adicionou-se 4mL de água destilada em cada tubo para diminuir a temperatura. O conteúdo final dos tubos foi medido em espectrofotômetro na faixa de 540nm com as absorbâncias representadas na Tabela 1, sendo o processo feito mais duas vezes (triplicata).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento

Segundo (LEVANDOSKI, 2019, no prelo), não houve crescimento de outros microrganismos no meio de cultura Manachini suplementado com CMC. Foi preciso fazer um reajuste do pH do meio para 5 com acréscimo de ácido sulfúrico 0,1M pois no preparo, o meio estava mais alcalino. Foi possível isolar três fungos com potencial de produzir celulasas denominados F11, F12 e L13.

Índice enzimático

Os valores para seleção de fungos por índice enzimático variam de acordo com a literatura, para (SOARES et al., 2010), um valor considerado bom para microorganismos produtores de enzimas extracelulares é maior ou igual a 2. Porém, para o trabalho, (LEVANDOSKI, 2019, no prelo) considerou o valor de 1,5. Assim, 3 fungos mostraram ser potenciais produtores de enzimas celulolíticas: F11, F12 e L13. Nota: L13 é o fungo que aparenta morfologicamente ser uma levedura e não fungo filamentosos.

Análise Levedura L13

A análise da levedura L13 não permitiu resultados suficientes uma vez que os dados coletados no espectrofotômetro foram baixos se comparados à literatura. Como visualizado na Tabela 1, y_1 , y_2 , y_3 remetem aos dados coletados em triplicata de cada amostra e \bar{y} é a média entre eles. O (\bar{y} – branco) apresentou valor baixo se comparado com a literatura, evidenciando possíveis erros de aplicação da metodologia seguida.

Tabela 1 – Absorbâncias das amostras

	y_1	y_2	y_3	\bar{y}	σ	\bar{y} - branco	pH	FN	FC
A	0,063	0,047	0,047	0,0523	0,00924	0,0103	4,5	BC	PP
B	0,059	0,047	0,049	0,0517	0,00643	0,0097	4,5	BC	PP
C	0,046	0,046	0,049	0,0470	0,00173	0,0050	5,5	BC	PP
D	0,047	0,046	0,046	0,0463	0,00058	0,0043	5,5	BC	PP
E	0,046	0,049	0,044	0,0463	0,00252	0,0043	4,5	EX	PP
F	0,045	0,046	0,045	0,0453	0,00058	0,0033	4,5	EX	PP
G	0,044	0,044	0,045	0,0443	0,00058	0,0023	5,5	EX	PP
H	0,047	0,044	0,047	0,0460	0,00173	0,0040	5,5	EX	PP
I	0,042	0,045	0,046	0,0443	0,00208	0,0023	4,5	BC	CMC

J	0,044	0,045	0,046	0,0450	0,00100	0,0030	4,5	BC	CMC
K	0,043	0,046	0,048	0,0457	0,00252	0,0037	5,5	BC	CMC
L	0,047	0,046	0,043	0,0453	0,00208	0,0033	5,5	BC	CMC
M	0,044	0,043	0,047	0,0447	0,00208	0,0027	4,5	EX	CMC
N	0,046	0,06	0,041	0,0490	0,00985	0,0070	4,5	EX	CMC
O	0,049	0,047	0,047	0,0477	0,00115	0,0057	5,5	EX	CMC
P	0,042	0,045	0,045	0,0440	0,00173	0,0020	5,5	EX	CMC

Fonte: Autoria própria (2019)

CONCLUSÃO

Os fungos com maior potencial de produção de celulase se localizavam em tocos com idade de cortes mais avançados. O meio de Manachini suplementado com CMC funcionou quanto a indução de produção de celulase e o meio também foi seletivo quanto a proliferação apenas de fungos. Três fungos apresentaram índice enzimático maiores que 1,5, sendo um deles morfológicamente semelhante a uma levedura. O ensaio com ácido 3,5-dinitrosalicílico foi inconclusivo, podendo ter ocorrido por falhas no seguimento da metodologia.

REFERÊNCIAS

FASANELLA, Cristiane Cipola. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillusniger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente.** 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FLORENCIO, Camila. **Microrganismos Produtores de Celulases: Seleção de Isolados de *Trichoderma spp.*** 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

GOPINATH, Subash CB; HILDA, Azariah; ANBU, Periasamy. **Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments.** *My coscience*, v. 46, n. 2, p. 119-126, 2005.

KASANA, Ramesh Chand et al. **A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine.** *Current microbiology*, v. 57, n. 5, p. 503-507, 2008.

LEVANDOSKI, João Eduardo. **Isolamento de fungos filamentosos produtores de celulases a partir de tocos de *Pinus sp.*** Ponta Grossa, 2019. No prelo

LIMA, A. R. S. **Produção de pectinases por *Aspergillus* e classificação de suco de camu-camu com poligalacturonases e pectinesterases.** 2006. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Amazonas-UFAM.

MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARINI, C. **Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopusstolonifer*.** *Biotechnology letters*, v. 9, n. 3, p. 219-224, 1987.

NEVES, Luiz Carlos Martins das. **Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando Saccharomyces cerevisiae**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SALOMÃO, Gabriella Soares Borges. **Análise da produção de celulases por fungos utilizando bagaço de cana como substrato**. 2017. 82 f. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2017.

SANTOS, FH da R. et al. **Isolamento de bactérias com habilidade hidrolítica da biomassa em sistema de compostagem**. Embrapa Agrobiologia-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E), 2010.

SINGHANIA, Reeta Rani et al. **Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases**. Enzyme and Microbial Technology, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SOARES, Izabel Aparecida et al. **Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso Aspergillus nidulans**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.

STROBEL G.A.; DAISY B.H.; CASTILLO U.; HARPER J. **Natural products from endophytic microorganisms**. Journal of Natural Products, v. 67, p. 257-268. 2004.

ZANCHETTA, Ariane. **Celulases e suas aplicações**. 2013. 3 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia, Unesp, São José do Rio Preto, 2013.