



Isolamento de fungos celulolíticos de solo do ambiente amazônico e sua aplicação na produção de celulases

Taiana Sousa Bezerra (Bolsista/Apresentador)¹ – Unifesspa
taianasousa@unifesspa.edu.br

Darlisson de Alexandria Santos (Coordenador (a) do Projeto)² - Unifesspa
darlisson@unifesspa.edu.br

Agência Financiadora: CNPq

Eixo Temático/Área de Conhecimento: Química Orgânica

1. INTRODUÇÃO

A busca por novas linhagens fúngicas produtoras de enzimas celulolíticas é uma grande demanda mundial devido a necessidade de encontrar alternativas aos combustíveis fósseis, os quais são responsáveis por grande parte da poluição atmosférica. Esta busca torna-se ainda mais plausível quando as alternativas encontradas podem solucionar o maior empecilho do uso de combustíveis de fontes renováveis: a competição com a produção de alimentos. Esta competição existe devido ao fato de que o etanol produzido atualmente usa, na maioria dos casos, matéria-prima que também é usada como alimento. Nos EUA usa-se o milho como matéria-prima e no Brasil usa-se cana-de-açúcar, que é também usada para a produção de sacarose (MOHAMMADI et al., 2011).

Dentre as espécies fúngicas capazes de produzir celulases, reportadas em estudos recentes, existem aquelas isoladas do ambiente amazônico, o qual é uma enorme reserva de biodiversidade no mundo e possui muitos micro-ecossistemas e condições climáticas ideais para o crescimento fúngico (SOUZA et al., 2018). Uma das espécies fúngicas de ambiente amazônico relatadas como produtoras de celulase é o *Trichoderma harzianum*, com duas linhagens desta espécie sendo reportadas em trabalhos diferentes atestando tal capacidade. O primeiro trabalho, reportado por Delabona et al. (2012), mostrou que as celulases produzidas pela linhagem *T. harzianum* P49P11 possuem uma grande atividade frente ao bagaço de cana-de-açúcar tratado com explosão a vapor (DELABONA et al., 2012).

O outro trabalho foi realizado por Souza et al. (2018), no qual usou a linhagem *T. harzianum* 422 obtendo-se também uma boa atividade das celulases frente ao bagaço de cana-de-açúcar, este tratado com moinho de bolas e tratamento hidrotérmico (SOUZA et al., 2018). Espécies fúngicas do gênero *Aspergillus* também já foram relatadas como isoladas do ambiente amazônico e com capacidade de produzir celulases com boas atividades enzimáticas. São elas *A. niger* P47C3 e *A. fumigatus* P40M2, que produziram celulases usando diferentes substratos para cultivo. A potencialidade dos microrganismos de ambiente amazônico na produção de celulases é enorme, embora seja pouco estudada. Um exemplo é o trabalho descrito por Toyama et al. (2018) que descreve a descoberta de uma D-glicosidase, uma das enzimas do complexo celulásico, através de uma análise metagenômica da água do lago Poraquê (TOYAMA et al., 2018). A descoberta do gene de uma celulase presente em microrganismos de ambiente aquático mostra que ainda há muito a se conhecer acerca da microbiota amazônica e seu potencial biotecnológico.

¹Graduanda em Licenciatura em Química - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

²Doutor em Química - Professor Titular da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (FACED/ICH/Unifesspa).

2. MATERIAS E MÉTODOS

Os reagentes usados para o desenvolvimento deste trabalho foram obtidos de diversos fabricantes (Synth, Sigma, Chemco, Neon, Kasvi, Spectrum, Acumedia e Mercado Local).

2.1 Coleta das amostras de solo e isolamento dos microrganismos

As coletas de solo foram realizadas em diferentes pontos da UNIFESSPA campus II, a amostra I foi coletada em área em decomposição, já a amostra II foi coletada em solo com um pouco de folhas em decomposição formando uma camada muito fina sobre o solo. As amostras foram armazenadas em frascos estéreis até o uso posterior no isolamento das colônias. O isolamento e quantificação dos fungos foram realizados através do método de diluição seriada.

2.2 Cultivo dos fungos

2.2.1 Meio de cultura contendo extrato de malte

Para o crescimento e obtenção das colônias puras dos fungos foi utilizado o meio de cultura extrato de malte 2% e o pH do meio foi ajustado para 4. A solução foi esterilizada em autoclave em pressão de 120 atm durante 20 min. Logo após a retirada da autoclave os meios foram vertidos na capela de fluxo laminar. Em seguida os fungos foram inoculados nos meios de cultura de extrato de malte e as placas foram vedadas com parafilme e incubados na estufa a temperatura de 29 °C. Para as etapas posteriores foi preparada uma solução de esporos de cada linhagem fúngica isolada, a fim de padronizar o inóculo.

2.3 Fermentação em estado sólido

Os fungos foram cultivados sob fermentação em estado sólido em frascos Erlenmeyer (125 mL) que continham farelo de trigo (5,0 g) através de solução de esporos, na concentração de $5 \cdot 10^5$ esporos/grama de substrato e incubados em estufa por 3 dias a 32 °C. Após o período de crescimento foi realizada a extração das enzimas totais.

2.4 Extração do caldo enzimático contendo as celulases

A solução da enzima bruta foi obtida adicionando 50 mL de tampão acetato de sódio (0,5 M, pH 4,5). Em seguida o meio foi macerado e triturado, a solução é agitada vigorosamente durante 60 min. A mistura foi filtrada a vácuo para a retirada do material sólido. A solução resultante foi usada posteriormente para avaliação da atividade celulolítica do extrato enzimático.

2.4.1 Determinação da atividade de enzimas celulolíticas

A concentração de açúcares foi determinada usando o método DNS (MILLER, 1959). A fórmula geral (Equação 1) utilizada para o cálculo da atividade *FPase* foi adaptada de Ghose (1987).

Equação 1. Determinação das atividades celulolíticas.

$$\text{Atividade} = ART \times \frac{V_t}{0,18 \cdot V_e \cdot t} \quad (\text{Eq.1})$$

ART: açúcares redutores totais;

V_t: volume total do ensaio;

V_e: volume de extrato enzimático usado;

0,18: massa referente a 1 μmol de glicose;

t: tempo de reação (min).

2.4.2 Determinação da atividade de celulases totais (FPase)

A tira de papel foi cortada em formato espiral e colocada dentro do tubo de ensaio, ao mesmo foi adicionado 0,33 ml de caldo enzimático, 0,33 ml de água destilada e 1 ml de solução de DNS ao qual os mesmos foram submetidos ao banho maria na temperatura constante de 50 °C durante 5 min. Após isso os tubos foram resfriados e utilizados para análises futuras.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

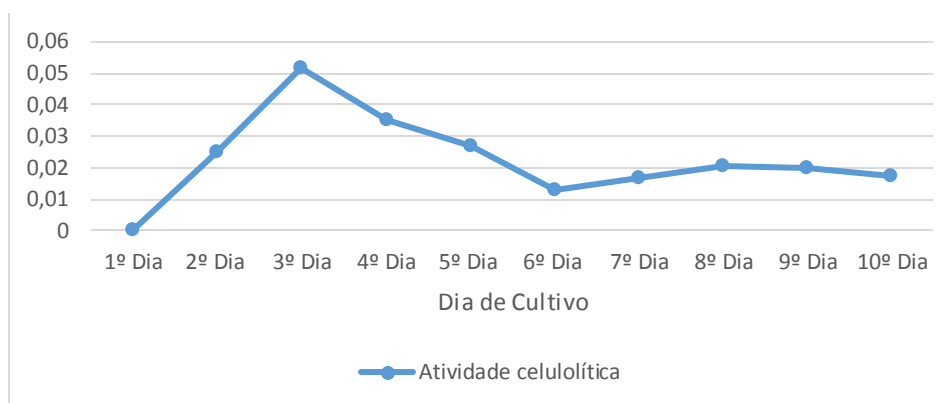
3.1 Escolha da linhagem de trabalho

Em trabalhos anteriores foi possível realizar o isolamento de oito fungos do solo da região arborizada do Campus II da Unifesspa (Figura 1). Dentre as 08 linhagens, três se destacaram pela maior atividade celulolítica – A1C2-03, A1C2-05 e A1C2-06. As duas últimas foram selecionadas para serem motivo de investigação de um projeto de mestrado, enquanto que a primeira, A1C2-03, foi selecionada para a realização dos estudos propostos neste projeto.

3.2 Estudo do melhor período de cultivo do fungo A1C2-03 frente à sua atividade

Para continuação da pesquisa foi analisada a atividade celulolítica da linhagem fúngica A1C2-03, a qual passou por um estudo de variação no período de cultivo em meio de cultura sólido rico em farelo de trigo. O período de crescimento estudado foi de 10 dias visando a obtenção de uma maior atividade, sendo que foi analisado seu potencial a cada dia, contando a partir do dia posterior ao inóculo. O gráfico abaixo mostra a relação entre o dia de crescimento e a atividade celulolítica.

Gráfico 1: Atividade enzimática celulolítica (U/mL de extrato enzimático) determinada de acordo com o período de cultivo para a linhagem A1C2-03 isolada do solo do Campus II da Unifesspa.



De acordo com o observado no gráfico, o melhor período de cultivo desta linhagem é de apenas 3 dias após seu inóculo, apresentando uma atividade enzimática celulolítica de $0,05 \text{ U.mL}^{-1}$. Se considerada a atividade produzida por grama de substrato utilizado no cultivo, a atividade obtida é de $0,5 \text{ U.g}^{-1}$.

3.3 Determinação das condições reacionais ótimas das celulasas produzidas

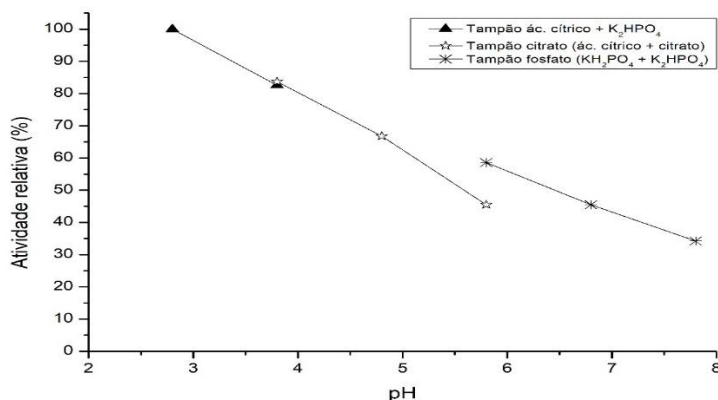
Uma vez determinado o melhor período de cultivo da linhagem fúngica A1C2-03 para a produção de celulasas, foram iniciados estudos da atividade destas enzimas frente às variações de pH e temperatura.

O gráfico 2 apresenta as atividades obtidas para cada um dos valores de pH testados, bem como a influência da solução tampão utilizada durante a hidrólise da celulose de papel de filtro. As atividades estão descritas em forma de atividade relativa onde à maior atividade obtida durante o experimento é atribuído o valor de 100% e as demais atividades obtidas são calculadas como normalização deste valor (regra de três).

Foi possível observar que o valor de pH mais ácido testado foi o mais favorável à atividade das celulasas e com o aumento do pH a atividade foi diminuindo, sendo que em um valor de pH levemente básico (pH 7,8) a atividade remanescente foi de pouco mais de 30%. Além disso, notou-se que não há diferença significativa na atividade quando são usados como solução tampão as soluções ác. cítrico + K_2HPO_4 e ác. cítrico + citrato de sódio. Estas duas soluções tampão foram utilizadas para obter-se o pH 3,8. Para o pH 5,8 também foram utilizadas duas soluções tampão, ác. cítrico + citrato de sódio e $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$, mas foi

possível observar uma maior atividade quando utilizou-se o tampão $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$, indicando que em algumas situações a solução tampão escolhida pode influenciar a atividade das celulasas.

Gráfico 2: pH ótimo para a realização da hidrólise enzimática da celulose usando celulasas da linhagem A1C2-03.



Os experimentos para determinar a temperatura ótima não foram realizados para este relatório devido à chegada da pandemia do COVID-19, tornando-se necessária a interrupção das atividades laboratoriais. Estes experimentos serão realizados tão logo tenhamos condições seguras de volta ao laboratório.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o desenvolvimento deste trabalho, foi possível determinar o melhor período de cultivo (3 dias) da linhagem fúngica A1C2-03 a fim de obter-se uma maior produção de celulasas usando fermentação em estado sólido tendo farelo de trigo como substrato. Esse curto período de cultivo favorece a aplicação desta linhagem para a produção de celulasas.

Na determinação do pH reacional ótimo, foi possível verificar um melhor ajuste das celulasas produzidas a valores de pH mais ácidos (pH 2,8) e o aumento do pH significou numa redução significativa da atividade. Desta forma, as celulasas produzidas pela linhagem fúngica A1C2-03 são mais indicadas para uso em processos industriais que ocorram em pH ácido, sendo esta uma excelente característica, pois celulasas que resistam a valores de pH abaixo de 3 são pouco relatadas.

REFERÊNCIAS (Conforme ABNT)

DELABONA, P.S.; PIROTA, R.D.P.B.; CODIMA, C.A.; TREMACOLDI, C.R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C.S. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 236- 242, 2013.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOHAMMADI, M.; NAJAFPOUR, G.D.; YOUNESI, H.; LAHIJANI, P.; UZIR, M.H.; MOHAMED, A.R. Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 4255-4273, 2011.

SANTOS, D.A. Produção de celulasas por fungos de ambiente marinho e terrestre para uso na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar e produção de 2,3- butanodiol pela bactéria *Serratia marcescens* a partir de glicose e glicerol.



VI Seminário de Iniciação Científica
Pesquisa na Amazônia: Novos cenários

📅 27, 29 e 30 de Outubro de 2020
📍 On-line pela plataforma Google Meet

UNIFESSPA | PROPIT

The banner features a light green background with several circular icons: a lightbulb, a magnifying glass, a smartphone, a Wi-Fi symbol, a laptop, and a search icon. The text is centered and includes the event title, subtitle, dates, and platform information.

2017. 222f. Tese (Doutorado em Ciências) – Pós-Graduação do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.