

Bioprospecção de Fungos Basidiomicetos Produtores de Enzimas Oxidativas Coletados no Município de Alvarães - Amazonas.

Rafael Pereira Lasmar^{1*}

Andrey Azedo Damasceno²

¹ Graduando no Curso de Licenciatura em Biologia - Universidade do Estado do Amazonas (UEA).

² Orientador, Msc em Biotecnologia e Recursos Naturais - Universidade do Estado do Amazonas (UEA).

* Autor para correspondência: rafaellasmar@hotmail.com

Resumo

Atualmente os processos biotecnológicos têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. As enzimas são biocatalisadores utilizados em diferentes indústrias além de poder ser empregadas em estudos da biologia molecular, aplicações biomédicas, no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos tecnológicos e no tratamento de resíduos. Estes catalisadores biológicos em geral são bastante atraentes para a aplicação industrial, principalmente pela sua ação eficiente e seletiva e há um reconhecimento crescente de que as enzimas podem ser usadas em muitos processos de remediação, como o tratamento de poluentes, Podendo ser considerado a produção dessas enzimas como, um dos maiores setores da indústria biotecnológica. Neste sentido os fungos vêm sendo amplamente utilizados na produção de substâncias de interesse econômico, como: enzimas, antibióticos, vitaminas e esteroides. Dessa forma, é fundamental conhecer quais cepas Amazônica acenam a possibilidade de serem possíveis produtores de enzimas lignolíticas: grupo do fenol-oxidase como as lignina-peroxidase e lacases, Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar a produção de fenol-oxidases através do teste de Benvendamm que utiliza o ácido tânico como indutor de enzimas por fungos Basidiomicetos. De modo geral das 4 cepas avaliadas, em 3 espécies evidenciou-se possíveis produtores das enzimas de interesse. Cabe ainda ressaltar que o melhor resultados foi obtido com cepa *Trametes lactinea*, com halos de 4,9 cm. Os resultados oriundos do presente projeto de grande importância para o estado incipiente da biotecnologia no Estado do Amazonas, uma vez que se volta a aplicação industrial e principalmente com uso destas enzimas na área da Biorremediação.

Palavras-Chave: Fungos. Enzimas. Biorremediação.

Abstract

Currently the biotechnological processes have gained a prominent place in the global technological development, exhibiting characteristics that confer economic and operating advantages over conventional chemical processes. Enzymes are biocatalysts used in different industries and can be used in studies of molecular biology, biomedical applications, the development of analytical methods, in manufacturing technology and in waste. These biological catalysts are generally very attractive for industrial application, mainly because of its efficient and selective action and there is a growing recognition that the enzymes can be used in many remediation processes, such as the treatment of pollutants, It can be considered the production of these enzymes as one of the biggest sectors of the biotechnology industry. In this sense the fungi have been widely used in the production of substances of economic interest, such as enzymes, antibiotics, vitamins and steroids. Thus, it is essential to understand which strains Amazon waving the possibility of possible enzyme producers lignolíticas: group of phenol oxidase-like lignin peroxidase and laccase, Therefore, this study aims to evaluate the production of phenoloxidases by testing Bavendamm using the tannic acid as an inducer of fungal enzymes Basidiomycetos. Generally the four strains tested in three species revealed a potential producers of the enzymes of interest. It is also worth mentioning that the best results were obtained with strain *Trametes lactinea* with halos of 4.9 cm. The results from this project of great importance for the incipient state of biotechnology in the state of Amazonas, since it turns industrie applications and especially with the use of these enzymes in the field of bioremediation.

Key-words: Fungi. Enzymes. Bioremediation.

Introdução

Há um reconhecimento crescente de que as enzimas podem ser usadas em muitos processos de biorremediação, como o tratamento de poluentes. O potencial de aplicação de enzimas ligninolíticas tem sido alvo de grande interesse acadêmico e industrial, devido à sua capacidade de biodegradar uma série de poluentes tóxicos e recalcitrantes. As potenciais vantagens do tratamento enzimático, em comparação com os tratamentos convencionais incluem: aplicação dos materiais recalcitrantes; a operação em altas e baixas concentrações de contaminantes ao longo de uma ampla faixa de pH, de temperatura e salinidade; as necessidades de aclimação da biomassa e do processo de controle mais fácil (DURAN & ESPOSITO, 2000).

Industrialmente uma das principais fontes produtoras de enzimas são os microorganismos. Estes são considerados fontes atrativas e de baixo custo na produção destes metabólitos, podendo ser cultivados em grandes quantidades e em tempo relativamente curto. Acrescenta-se ainda a vantagem da produção não estar condicionada às questões sazonais e geográficas e pela possibilidade de uso de matérias prima pouco dispendiosa. (ZIMMER, *et al.*, 2009).

A procura por enzimas vem sendo realizada utilizando vários tipos de produtos, a partir de origem animal e vegetal, ou pelo aproveitamento da expressão enzimática decorrente do crescimento microbiano sobre determinados substratos (COLEN, 2006). Dessa forma, os fungos são considerados maiores produtores das enzimas, as fenol-oxidase como as lacases, manganês-peroxidases, lignolíticas, destacando-se *Phanerochaete chrysosporium*, *Penicillium* spp., *Paecilomyces* spp., *Cunninghamella elegans*, *Candida* spp., *Torulopsis* sp., *Rhodotorula* sp., *Aspergillus sclerotium* e *Mucor racemosus* (BOONCHAN *et al.*, 2000; BONUGLI SANTOS *et al.*, 2010).

A literatura destaca as maiores famílias de enzimas produzidas por fungos lignolíticos: manganês peroxidase (MnP) (E.C:1.11.1), lacases (Lac) (E.C:1.10.3.2) e lignina peroxidase (LiP) (E.C:1.11.1.14), sendo essas duas as mais importantes nos processos de degradação de lignina com uma larga aplicação nas indústrias (D'SOUZA *et al.*, 2006).

A lacase é uma enzima que contém cobre em seu sítio ativo, no entanto lignina peroxidase (LiP) contém ferro como grupo prostético. A lignina peroxidase é uma proteína *heme* com um elevado potencial de oxidação e pode oxidar substratos fenólicos e não fenólicos. A lacase é uma oxidase que catalisa a redução do O₂ a H₂O e oxida aminas aromáticas (D'SOUZA *et al.*, 2006). Por tanto dada relevância e a busca por

alternativas para a produção e caracterização das enzimas é que o presente projeto vislumbra utilizar cepas Amazônicas de fungos basidiomicetos, com o objetivo de avaliarmos preliminarmente potencial biotecnológicos para produção enzimas de interesse Industrial, evidenciando assim o conhecimento da biodiversidade Amazônica.

Material e Métodos

Coleta dos Fungos

A presente pesquisa foi desenvolvida na Universidade do Estado do Amazonas (UEA), no Município de Tefé-AM, no Centro de Estudos Superiores de Tefé (CEST), laboratório de Biologia. As coletas dos basidiocarpos foram realizadas durante o período de verão entre os meses julho e agosto, no perímetro Rural do Município de Alvarães-AM, na Comunidade de Nogueira, cuja geografia apresenta uma latitude de 3°30`S, longitude 64°80`W e altura de 75m (Figura 1).



FIGURA 1: Localização geográfica da área de coleta dos fungos basidiomicetos, Alvarães-AM (seta branca).

Preparo do Meio de cultura

Os fungos coletados são os *Lentinus crinitus*, *Pycnoporus Sanguineos*, *Trametes lactinea* e *Trametes elegans*. Para o preparo do meio de cultura utilizou-se o meio sintético BDA (Batata, Dextrose e Agar) Sintético, sendo 19g para 450 ml de água

destilada e auxílio de um bastão de vidro foi dissolvido em Erlenmeyer, de 1.000 mL. Posteriormente foi vedado e levado para autoclave a 121 °C por 20 min a 1 atm para esterilização final. Autoclavou-se separadamente 50 mL de água em erlenmeyer de 125 mL. Quando a água do erlenmeyer 125mL ficou morna 30±35C⁰, foi acrescido 2,5 g de ácido tânico (C₇₆ H₅₂ O₄₆) em condições assépticas, agitou-se a mistura para que o ácido tânico se dissolva e forme uma mistura homogênea. Após o resfriamento do meio de cultura, o conteúdo do erlenmeyer 125 mL foi associado ao de erlenmeyer 500 mL e agitado para que o ácido se distribua uniformemente. O meio, então, foi vertido em placas de Petri 90x15mm, antes de ser resfriado, pois não se pode fundi-lo novamente, sob pena de oxidar o ácido e inutilizar o meio.

Dos basidiocarpos coletados foi retirada a amostra de fungo (30 mm), utilizada para inoculação, a qual passou por um procedimento de assepsia, que consta das seguintes etapas: mergulhar a amostra por 2 minutos em álcool 70%, em seguida em hipoclorito de sódio a 3%, logo após deixou-se o inóculo imerso por 2 minutos em água destilada. Esses procedimentos foram executados em ambiente estéril (interior da câmara de fluxo laminar adaptado) (Bononi e Trufem, 1985), (Cornelis, 1987).

Isolamento dos Fungos

Após estes procedimentos as amostras inoculadas, seguindo a metodologia proposta por Castro e Silva (1996), foram colocadas em placas de Petri 90x15mm e em tubos de ensaios inclinados com meio com BDA (batata dextrose e ágar), acrescido de 2 comprimidos de ampicilina (200g), para evitar possíveis contaminações. Posteriormente lacradas com fita plástica do tipo Parafilm e devidamente identificadas.

As placas de Petri 90x15mm, foram repicadas e incubadas em BOD (Baixa Demanda de Oxigênio) a 30° C (± 2°C) por um período de 72 horas para, avaliar o potencial das cepas quanto a produção de halos indicadores de enzimas oxidativas. Durante o período de 72h, as culturas foram monitoradas diariamente para a quantificação do crescimento dos possíveis halos de inibição.

Resultados e Discussão

De modo geral, os resultados oriundos da presente pesquisa indicaram possíveis microrganismos produtores de enzimas oxidativas, (Tabela 2) e (Tabela3). A cepa *Pycnoporus sanguineus*, obteve uma discreta atividade para o grupo das enzimas

oxidativas (Tabela 1). A maioria dos processos biotecnológicos que utilizam fungos basidiomicetos baseia-se nos seus metabólicos, como enzimas e polissacarídeos. Dentre os metabólitos produzidos por esses fungos devemos destacar cinabarina, um derivado fenoxazínico com atividade antibacteriana e antiviral, encontrado em *Pycnoporus sanguineus* (SMÂNIA; SMÂNIA JR.; LOGUEIRO-LEITE, 1998; SMÂNIA et al., 1997).

Para o fungo CEST 001 (*Lentinus crinitus*), este não evidenciou atividade entre os metabolitos produzidos pelo fungo e o ácido tânico, resultado semelhante foi mostrado por NEPOMUCENA (2010). Para o grupo controle, este não foi observado reações entre os metabólitos produzidos pelas cepas avaliadas.

Tabela 1: Crescimento do Halo em cm da Cepa CEST 002, pH 5.0.

Pycnoporus sanguineus

Data	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média parcial/3
08/09	1/1=1	Não cresceu	Não cresceu	0,333
09/09	3/2=2,5	2,5/2=2,25	2,5/1,5=2	2,25
10/09	3,5/3=3,25	4/2,5=3,25	2,7/3,5=3,1	3,33

Tabela 2: Crescimento do Halo em cm da Cepa CEST003, pH 5.0

Trametes lactinea

Data	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média parcial/3
08/09	1,5/2=1,75	2/2=2	2,5/1,7=2,1	1,95
09/09	6/5,5=5,75	6/7=6,5	6,2/5,5=5,85	6,03
10/09	8/8=8	8/8=8	7,75/7,6=7,675	7,9

Tabela 03: Crescimento do Halo em cm da Cepa CEST 004, pH 5.0.

Trametes elegans

Data	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média parcial/3
08/09	0,9/1,=1,1	1,1/1=1,05	0,7/1,2=0,95	1,03
09/09	3/4= 3,5	5/6=5,5	6/7=6,5	5,16
10/09	8/6=7	9/9=9	9/9=9	8,33

Por outro lado para os testes com os fungos do basidioma *Trametes*, estes mostraram-se possíveis produtores de enzimas. Os fungos têm tendência a colonizar os ambientes ácidos e para suas atividades metabólicas freqüentemente acidificam ainda mais o meio. O crescimento ótimo dos basidiomicetos se faz em geral em pH entre 4 a 6.5 e muitas espécies toleram grandes variações de pH. Os fungos podem se adaptar em meios bem ácidos. (CASTRO E SILVA 2002).

Os dados deste trabalho estão de acordo com a literatura que relatam a faixa de pH ótima sendo entre 5 e 6 sob agitação, é um fator fundamental na produção de lacases fúngicas (Dekker & Barbosa, 2001; Papagianni, et al., 2001; Pointing, 2000). Porém, alguns trabalhos relatam uma maior atividade da lacase em meios de cultivos estáticos (Martinez, et.al., 2009). Outro fator analisado é que o efeito negativo do processo de agitação tem sido documentado como inibidor da produção de lacases em fungos, algo que não foi o aliado em nossos experimentos.

As Lacases fúngicas têm sido encontradas em diferentes gêneros de ascomicetos, *Aspergillus*, *Neurospora* e *Podospora*, alguns deuteromicetos, *Botrytis* e principalmente basidiomicetos, *Collybia*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Trametes* particularmente aqueles associados com madeira deteriorada ou em estágio terminal de decomposição (D'Souza et al. 2006). Os melhores produtores de lacase são basidiomicetos pertencentes ao grupo dos fungos de decomposição branca, eficientes degradadores de madeira (Mayer & Staples 2002; Thurston, 1994). Quase todos esses fungos produzem MnP e lacase, mas somente alguns produzem LiP (Hatakka, 1994). No bioensaio para a cepa *Trametes elegans* obteve crescimento micelial de aproximadamente 3.5 cm, evidenciando assim um possível produtor de enzimas de interesse industrial. Ressalta-se ainda que o melhor crescimento ocorreu para a cepa de *Trametes lactinea*, com fonte micelial de aproximadamente 4,9 cm evidenciado na (Figura 02).

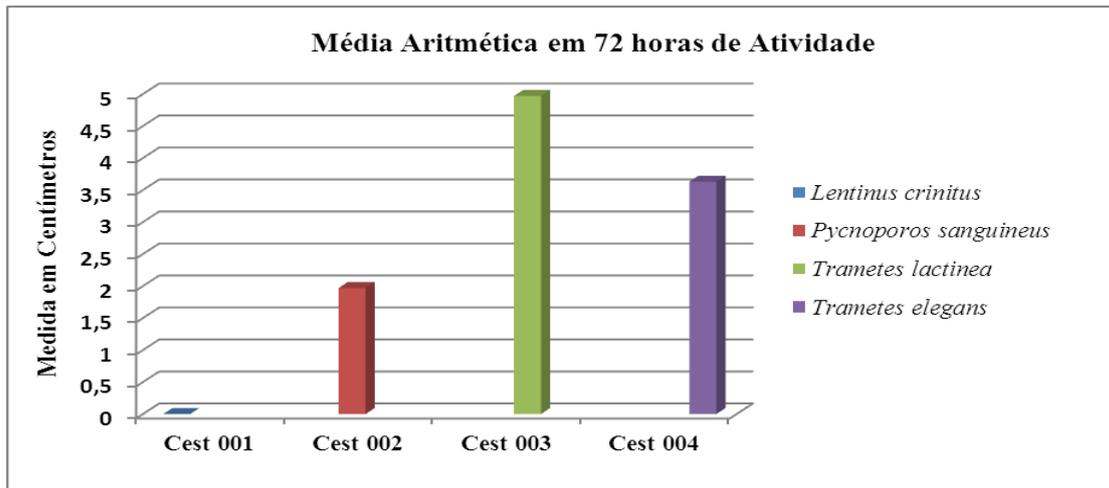


Figura 2: Média Final em 72 horas de atividade dos halos de reação entre os metabólitos produzidos pelas cepas *Lentinus crinitus*; *Pycnoporus sanguineus*; *Trametes lactinea* e *Trametes elegans* através do teste de Benvendamm.

Conclusão

- Das quatro cepas testadas, em três foi possível identificar halos indicativos para enzimas oxidativas, evidenciando assim um possível produtor destas enzimas de interesse industrial como na indústria farmacêutica e indústria de fermentação de bebidas e alimentos.
- Cabe ressaltar que os maiores halos foram obtidos com o Gênero *Trametes*, com halos de indicativos para classe de Enzimas Oxiredutases. Entretanto a maior atividade, foi para a cepa *Trametes lactinea*, com halos de 4,9 cm.
- Apesar do resultado favorável é imprescindível otimizar estes processos, como por exemplo diferentes fontes de carbono; faixa de pH e temperatura.

Referências

BOONCHAN, S.; BRITZ, M. L.; STANLEY, G.A. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal bacterium cocultures. *Applied Environmental Microbiology*, v. 66, p. 1007-1019, 2000.

BONONI, V. L. R.; TRUFEM, S. F. B. Cogumelos comestíveis, São Paulo: Ícone, 1985. Brasil. Resolução no. 357. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, 17 mar. 2005.

BONUGLI SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SILVA, M.; SETTE, L. D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 46, n. 1, p. 32-37, 2010.

CASTRO E SILVA, A. 1996. Micromorfologia da Degradação de Madeira da espécie Amazônica *Hura creptans* L. por fungos ligninolíticos pertencentes a classe Hymenomycetes (Tese de Doutorado). Manaus: INPA/FUA.

CASTRO E SILVA, et al. O inexplorado potencial enzimático da biodiversidade amazônica. 2002.

COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. 206 p. Dissertação (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia da UFMG, Minas Gerais, 2006.

CORNELIS, P. Microbial amylases. *Microbiological Sciences*, v. 4, n. 11, p. 342-343, 1987.

D'SOUZA, D. T.; TIWARI, R.; SAH, A. K.; RAGHUKUMARA, C. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme Microb Technol* v.38,p.504–511, 2006.

DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M.; GIESE, E.C.; GODOY, S.D.S.; COVIZZI, L.G. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, vol 28, p. 81 – 88, 2001.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal. B: Environm.*, v.28, p.83-99, 2000.

HATAKKA, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected White-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol Rev.* 13 125-135

MARTÍNEZ, H. *O Fascinante Mundo das Enzimas*. Disponível em: http://www.freedom.inf.br/artigos_tecnicos/03072006-1/mundo_enzimas.asp. Acessado em: 05 de Agosto de 2012.

MAYER, A.M. e STAPLES, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. vol. 60, no. 6, p. 551-565, 2002.

NEPOMUCENA, R.M.P. Avaliação do potencial microbiano de crescimento e secreção de lacase do fungo Amazônico *Lentinus crinitus*. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (MBT), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), 2010, 140p.

PAPAGIANNI, M.; NOKES, E.; FILER, K. Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: Effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculums performance. *Food Technology and Biotechnology*, Zagreb, vol. 39, n.4, p 319 – 326, 2001.

POINTING, S.B.; JONES, E.B.G.; VRIJMOED, L.L.P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture, *Mycologia*, vol 92, n.1, p.139 – 144, 2000.

SMÂNIA, E. F. A. Optimal Parameters For Cinnabarin Synthesis By *Pycnoporus Sanguineus*. *J. Chem. Biotechnol*, v.70, p.57-59. 1997.

SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA, A.J; LOGUEIRO-LEITE, C. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. *Rev. Microbiol. São Paulo*, v.29, n.4, p.317-320. 1998.

ZIMMER, K,ET AL. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista Liberato*, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 123-137, jul./dez. 2009.