

Avaliação das emzimas CMCase e xilanase de três fungos endofíticos da Amazônia, em três resíduos agrícolas em duas diferentes condições de cultivo

Silva, S.R.S.¹; Silva, A.S.²; Santiago, P.A.L.¹; Souza, A.D.L.²; Polikarpov I.³, Martinez J.L.⁴, Souza, A.Q.L.²

¹Universidade do Estado do Amazonas (UEA) – PPGMBT, ²Universidade Federal do Amazonas (UFAM) – PPGQ, ³Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – LCPBE, ⁴Facultad de Farmacia de La Universidad de Granada (UGR)

E-mail: jmtnez@ugr.es, srhrael@hotmail.com, ipolikarpov@ifsc.usp.br, santiago_fro@hotmail.com, couceiro@ufam.edu.br

Resumo

Diversos resíduos são gerados a partir de atividades humanas e esses resíduos, ao longo dos anos, tem sido alvo para utilizá-los na produção de moléculas de interesse de diversos setores industriais como por exemplo, as enzimas. Para a produção enzimática de CMCCase e Xilanase, três fungos (*Aspergillus niger*, *Penicillium adametzii* e Basidiomiceto) foram submetidos a cultivo submerso em duas soluções de cultivo diferentes (Manachini e GLBN 40) com três resíduos Amazônicos como indutores (casca de maracujá, cupuaçu e macaxeira) durante 5 e 10 dias. Todos tiveram produção enzimática, no entanto, *A.niger* mostrou-se o melhor produtor de CMCCase e xilanase em 5 dias com 7,2 UI/mL e 13,5 UI/mL, respectivamente, em solução de Manachini com casca de maracujá como indutor. Os valores obtidos com *P. adametzii*. e o Basidiomiceto variaram de acordo com as soluções de cultivo e com os indutores. As condições de cultivo podem ser otimizadas para melhoramento da produção enzimática.

Palavras-chave: Enzimas, Resíduos Agrícolas, Fungos Amazônicos, CMCCase, xilanase.

Introdução

As variadas atividades humanas geram inúmeros tipos de resíduos que, por sua vez, são acumulados no meio ambiente. Diante do acúmulo de resíduos agroindustriais, ao longo dos anos, têm-se buscado sua reutilização para redução da sua quantidade no meio ambiente.

Na região Norte do Brasil, o estado do Pará destaca-se como o maior produtor de macaxeira do país com produção acima de 4 milhões de toneladas, é responsável pela maior safra de cupuaçu do Brasil com mais de 74 mil toneladas em 13 mil hectares de área e também, é o maior produtor de maracujá da região com mais de 26 mil toneladas (IBGE

2014; CEPLAC,2013). Toda esta produção gera resíduos e vários bioprocessos têm sido utilizados para a conversão de resíduos em moléculas de interesse como aminoácidos, etanol, enzimas e outras.

A biomassa vegetal é composta por celulose, hemicelulose e lignina. Diversos microrganismos produzem enzimas que atuam em sinergia (complexo enzimático) e assim, conseguem degradar a biomassa vegetal. Fungos de ocorrência disseminada na natureza como Basidiomicetos e fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*, possuem capacidade de produzir essas enzimas (Bom *et al.*, 2008). Dentre outras enzimas desse complexo enzimático, destacam-se as endoglucanases e as xilanases. Estas enzimas são utilizadas em diversas indústrias como, por exemplo, indústrias de papel, roupa, têxtil, farmacêutica, entre outras, que têm o interesse no melhoramento da produção dos seus produtos.

O mercado brasileiro de enzimas, apesar de pequeno, quando comparado ao mercado mundial, mostra-se promissor devido a grande disponibilidade de resíduos agroindustriais e do dinamismo dos setores industriais (Mussatto *et al.*, 2007).

O objetivo deste trabalho foi comparar a produção enzimática de três fungos (Basidiomiceto, *Penicillium adametzii* e *Aspergillus niger*), três substratos e duas soluções de cultivo.

Material e métodos

Para induzir a produção de CMCase (Carboximetilcelulase) e xilanase, utilizou-se casca de cupuaçu, maracujá e macaxeira in natura, em duas soluções de sais minerais: Manachini (Manachini *et al.*, 1987) e GLBN 40.

Os fungos utilizados foram um Basidiomicetos (Mas 3M 1.1.1), um *Aspergillus niger* (EjFLOR 3cont BDA) e um *Penicillium adametzii*(Stsp C2-3/1-2C) reativados da coleção do Laboratório GEMMA (Grupo de Espectrometria de Massas e Microrganismos da Amazônia), na Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em meio BDA durante 8 dias a 28 °C.

Após a esterilização dos resíduos juntamente com as soluções, foram feitos os inóculos adicionando-se dois fragmentos de aproximadamente 1cm² de Basidiomiceto e 20 µL de solução de suspensão de esporos de *A. niger* e *P. adametzii* Os experimentos foram

cultivados em incubadora Shaker, em quintuplicata, durante 5 e 10 dias, a temperatura de 28 °C a 120 rpm. Para a extração das enzimas, todas as réplicas foram filtradas em sistema de filtração a vácuo estéril contendo filtro Millipore 0,22 µm. Para os testes quantitativos, foi separada uma alíquota de 1,5 mL.

Utilizou-se o método DNS (Miller, 1959), que quantifica açúcares redutores, para quantificar as enzimas CMCase e Xilanase a partir da metodologia descrita por Ghose, (1987). Os ensaios ocorreram em tubos de ensaio de 6 ml, em triplicata, adicionando-se 450 µL do substrato CMC (quando quantificada CMCase) e Xilano (quando quantificado Xilanase) a 1% em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 50 µL de extrato enzimático. Essa mistura foi aquecida por 10 minutos a 50°C em banho-maria. Após o tempo reacional, adicionou-se 500 µL do reagente ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS), levando as amostras ao banho fervente por 5 minutos e sequencialmente, as amostras sofreram resfriamento em banho gelado por mais 5 minutos. Por fim, adicionou-se 4 mL de água destilada. Para o controle das amostras, adicionou-se 450 µL de CMC, 500 µL de DNS e 50 µL do extrato enzimático. Para o Branco adicionou-se 500 µL de água destilada, 500 µL de DNS e 4 ml de água destilada. As amostras foram lidas a 540 nm em espectrofotômetro de UV.

Resultados e discussão

Com relação à CMCásica, as dosagens enzimáticas revelaram que dentre as soluções de sais minerais utilizadas no cultivo submerso, a solução de Manachini mostrou-se a melhor solução de cultivo para atividade e xilanásica, conforme mostra as figuras 1 e 2.

Em relação ao tempo de cultivo, o melhor tempo de produção mostrou-se em 5 dias havendo declínio desta produção com 10 dias para ambas as enzimas. Dentre os substratos agrícolas utilizados, a casca de maracujá mostrou-se melhor indutor na solução de Manachini tanto para CMCase quanto para Xilanase. A casca de cupuaçu mostrou-se o segundo melhor indutor e a casca de macaxeira foi o indutor menos eficiente. Dentre os fungos utilizados nesta pesquisa, o *A.niger* mostrou-se o melhor produtor de CMCase com 7,2 UI/mL em 5 dias, seguido do *P. adametzii* com 3,1 UI/mL em 10 dias e o pior desempenho foi o do Basidiomiceto com 3,0 UI/mL em 5 dias, todos em solução de Manachini. Muitas espécies de *Aspergillus* produzem várias enzimas extracelulares sendo elas 19 diferentes enzimas de importância biotecnológica (Pandey et al. 1999). Dentre estas

estão celulase, xilanase, poligalacturonase, α -galactosidase, α -amilase, glucoamilase, β -glucosidade e protease ácida.

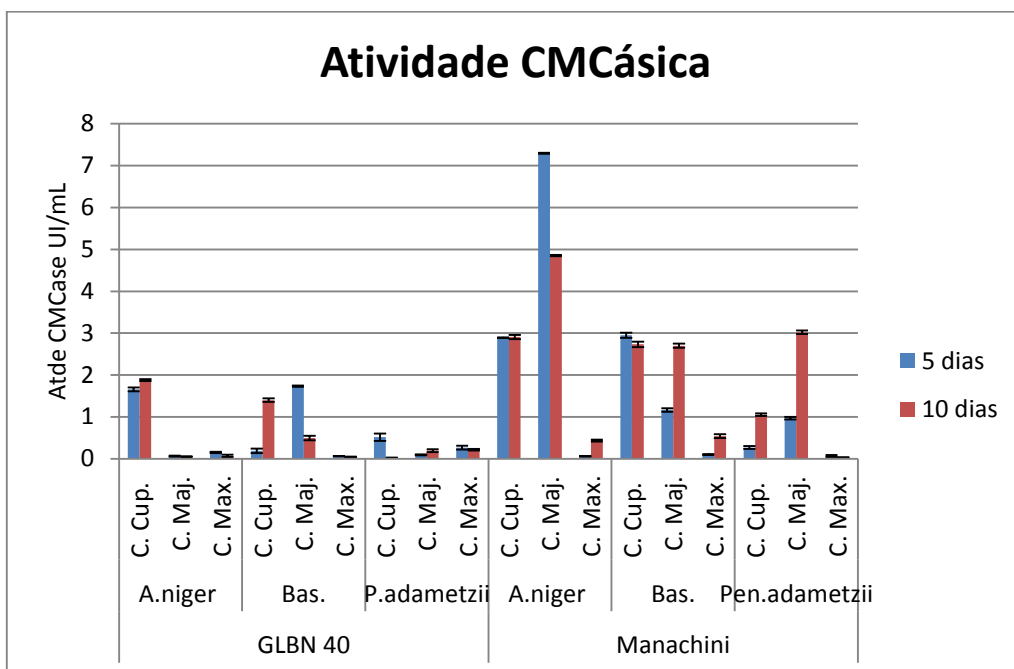


Figura 1. Comparação de atividade CMCásica entre solução de Manachini e solução GLBN 40 onde C.Cup.= casca de cupuaçu, C. Maj.=Casca de maracujá e C. Max.=casca de macaxeira.

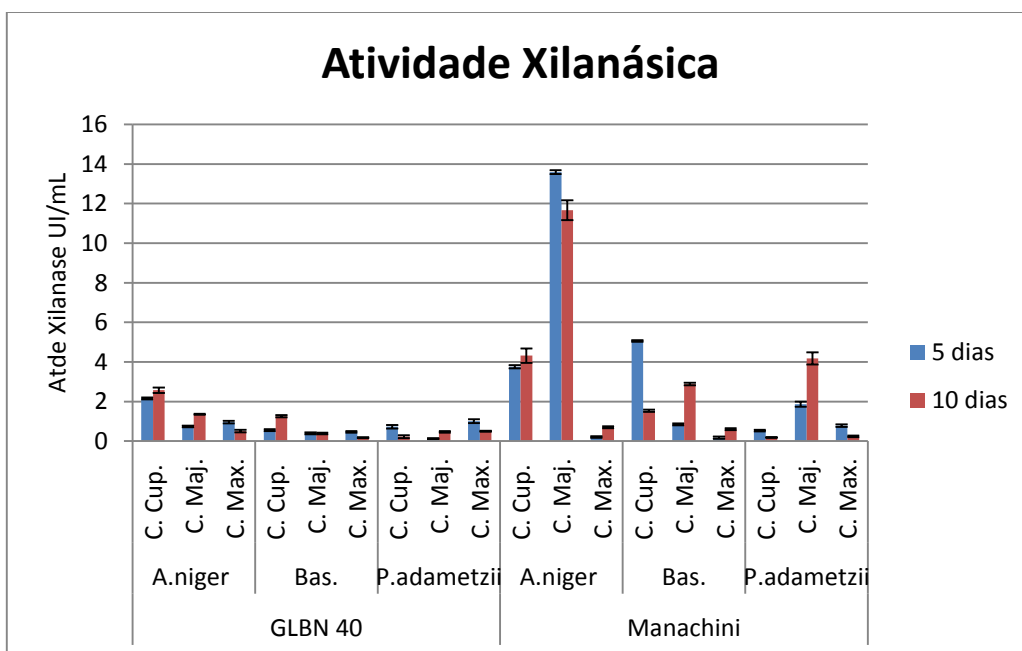


Figura 2. Comparação de atividade Xilanásica entre solução de Manachini e solução GLBN 40 onde C.Cup.= casca de cupuaçu, C. Maj.=Casca de maracujá e C. Max.=casca de macaxeira.

Em atividade xilanásica, o melhor desempenho foi do *A. niger* com 13,5 UI/mL, seguido do Basidiomiceto com 5,1 UI/mL, ambos em 5 dias, e o pior desempenho foi do *P. adametzii* com 4,7 UI/mL em 10 dias, todos em solução de Manachini. Stroparo *et al.* (2012) avaliaram a produção de hidrolases e dentre estas, observaram que o *A. niger* apresentou maior nível de Xilanase com 8,73 UI/mL, sendo os valores deste trabalho superiores utilizando a casca de maracujá como indutor, em 5 dias de cultivo.

Silva (2013) avaliou a produção de CMCase e Xilanase também utilizando casca de maracujá como substrato e uma espécie de *Penicillium*, reativado do Laboratório GEMMA e, obteve um valor de 13,444 UI/mL e 0,510 UI/mL no 10º dia de cultivo, utilizando 20 µL de solução de suspensão de esporos. Neste trabalho, encontrou-se os valores de 3.116 UI/mL e 4,793 UI/mL, de CMCase e Xilanase respectivamente, ambos em 10 dias, inoculados 10 µL de solução de suspensão de esporos. Silva (2013) também avaliou a produção de CMCase e Xilanase de Basidiomicetos e obteve 1,004 UI/mL e 0.371 UI/mL, respectivamente. Neste trabalho, as atividades CMCásica e xilanásica foram 3.012 UI/mL e 5.166 UI/mL, respectivamente. De acordo com Pandey *et al.* (1999), a enzima que será produzida depende do tipo de substrato utilizado no processo de cultivo. Isso justifica as diferenças de produção de xilanase e CMCase observadas dentre os substratos e soluções utilizadas, visto que cada solução (Manachini e GLBN 40) possui componentes diferenciados que podem interferir no crescimento fúngico e conseqüentemente, na produção enzimática.

Conclusões

A melhor solução de cultivo para a produção de CMCase e Xilanase foi a de Manachini tendo 5 dias de cultivo como melhor tempo de produção enzimática.

Entre os três fungos utilizados, a cepa de *A. niger* (EjFlor 3 cont BDA) foi o melhor produtor de ambas as enzimas e o melhor substrato, foi a casca de maracujá.

Agradecimentos

Ao apoio financeiro da FAPEAM, do CNPq e da CAPES que viabilizaram a realização desse trabalho e pela concessão de bolsa da CAPES.

Referências

Bom, EPS, Ferrara MA, Corvo ML, Vermelho AB, Paiva CLA, Alencastro RB, Coelho, R R R (2008) Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. *Interciência*. Rio de Janeiro.

Fraife Filho, G.A. (2013) Cultivo do cupuaçuzeiro para o estado da Bahia. CEPLAC/Centro de pesquisas do cacau – Cepec. <http://www.ceplac.gov.br/radar/cupua%C3%A7uzeiro.htm>

Ghose, T.K. (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* 59:257-268.

IBGE (2014). Lavoura Permanente. Acessado em: http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=df&te_ma=lavourapermanente2012. Acessado em 16 de fevereiro de 2014.

Manachini PL, Fortina MG, Parini C (1987) Purification and properties of endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters* 9:21-224.

Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31:426-428.

Mussato SI, Fernandes M, Milagres AMF (2007) Enzimas – Poderosa Ferramenta na Indústria. *Ciência Hoje* 41:28-33.

Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT (1999) The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 29:119–13,

Silva AS (2013) Avaliação da produção de celulasas e xilanase pela degradação de resíduos agrícolas regionais por fungos da Amazônia. Manaus, Brasil, 104p. (Dissertação) de Mestrado em biotecnologia. UFAM

Stroparo EC, Beite, SM, Resende JTV, Knob A (2012) Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Semina: Ciências Agrárias* 33:2267-2278.