

## **Enzimas extracelulares de *Aspergillus* e *Penicillium* conservados na Coleção de Fungos da Amazônia-CFAM**

Lima A.K.S.<sup>1</sup>, Torres D.R.<sup>1</sup>, Fernandes O.C.C.<sup>1</sup>, Silva J.C.<sup>1</sup>, Mendes L.<sup>2</sup>, Araújo C.P.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>-Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ. <sup>2</sup>- Universidade – Faculdade Estácio do Amazonas. E-mail: ofernandes@amazonia.fiocruz.br

Os microrganismos, como fontes de recursos renováveis atreladas às vantajosas características microbianas, tem sido alvo de constantes investigações em função do seu potencial biotecnológico, como produção de enzimas extracelulares, catalisadoras naturais e não tóxicas ao meio ambiente. Este estudo avaliou enzimas extracelulares de 30 culturas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* conservados na Coleção de Fungos da Amazônia. As culturas foram reativadas em meio seletivo e incubadas a 28 °C por sete dias. Na indução enzimática foi utilizado meio líquido solução de Manachini suplementado com os respectivos substratos indutores e após o processo de fermentação, os extratos foram filtrados a vácuo e submetidos a avaliação qualitativa em meio sólido específico: ágar celulose, ágar lipase, ágar amido e ágar leite acrescentado 5% de gelatina e incubadas a 28 °C por 24 horas para avaliação da capacidade de produção das enzimas. A detecção da atividade enzimática baseou-se na observação de um halo formado ao redor das colônias. Das 30 amostras selecionadas para o estudo, 80% (24) mostraram-se viáveis após o processo de reativação e destas, 91,6% (22) apresentaram halo de degradação nos ensaios enzimáticos para pelo menos uma das enzimas estudadas, sendo que 27,2% (06) das culturas apresentaram halo de degradação para todas as enzimas. Com este estudo observa-se que as culturas mostraram-se promissoras para a produção de enzimas extracelulares de interesse industrial.

**Palavras-chaves:** Fungos Filamentosos, Água, Enzimas, Amazônia.

### **Introdução**

A tecnologia enzimática é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado. Processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e menor consumo energético, já que as enzimas são biodegradáveis e, sendo altamente específicas, minimizam os efeitos indesejáveis. São importantes insumos intermediários nas indústrias químicas, alimentares, têxteis entre outras. Apresentam maior interesse, aquelas obtidas a partir de

micro-organismos, devido em grande parte à diversidade dos mesmos e um maior rendimento em relação aos processos extrativos de tecidos animais e vegetais (Orlandelli *et al.*, 2012; Rocha, 2010; Chandra *et al.*, 2010).

Dentre os fungos produtores de enzimas extracelulares, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, mesmo apresentando uma especificidade de degradação de alimentos, biodeterioração e patogenicidade ao homem e animais, estão sendo muito utilizados nas aplicações biotecnológicas devido às suas propriedades metabólicas, sendo fontes de produção de diversas enzimas de interesses orgânicos, antibióticos e micotoxicológicos (Tavares *et al.*, 2012).

Dentre as enzimas produzidas por estes gêneros estão as lipases, que apresentam múltiplas aplicações nas indústrias de detergentes, medicamentos, alimentos, biodiesel e também no tratamento de efluentes; as celulases, utilizadas na indústria têxtil e de papel/celulose e na produção de bioetanol de segunda geração; as amilases, aplicadas nas indústrias de panificação, têxtil, farmacêutica, laticínios e sucroalcooleira e as proteases, que apresentam larga aplicação em produtos industriais e domésticos, além de possuírem grande aplicação farmacêutica devido ao potencial fibrinolítico destas enzimas, sendo usadas no tratamento da trombose (Singh *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013; Doolotkeldieva e Bobusheva, 2011).

Diante a importância industrial das enzimas, este trabalho avaliou o potencial de produção de enzimas extracelulares de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* conservados na Coleção de Fungos da Amazônia-CFAM.

## **Material e métodos**

Foram selecionadas 30 amostras fúngicas dos gêneros *Aspergillus* (CFAM 0158, 0555, 0161, 0540, 0701, 0115, 0034, 0143, 0052, 0148, 0131, 0006, 0004 e 0160) e *Penicillium* (CFAM 0180, 0059, 0061, 0250, 0271, 0991, 0021, 0134, 0065, 0510, 0105, 0047, 0190, 0290, 0155 e 0289) conservadas em blocos de gelose na Coleção de Fungos da Amazônia – CFAM, da FIOCRUZ Amazônia - ILMD.

### *Reativação das culturas preservadas*

As amostras testadas foram reativadas em placas de Petri contendo Ágar Extrato de Malte – MEA e mantidas em estufa de crescimento, do tipo BOD, a 28 °C por sete dias.

Para a indução enzimática foi utilizado meio líquido solução de Manachini suplementado com o substrato indutor para cada enzima. Em Erlemayer de 25mL contendo 10mL da solução de Manachini e seus respectivos substratos indutores, foram inoculados 1mL da suspensão de esporos na concentração de  $5 \times 10^6$ . A fermentação líquida ocorreu nas seguintes condições: 120 rpm por 96 horas a 28 °C.

Após o período de fermentação, os cultivos foram filtrados a vácuo e o extrato enzimático foi avaliado qualitativamente em meio sólido específico para cada enzima, ágar celulose, ágar lipase, ágar amido e ágar leite acrescentado de 5% de gelatina. (Teixeira *et al.*, 2011), onde a produção enzimática foi avaliada pela formação de halos determinados em mm e incubadas a 28 °C, em BOD, por cinco dias. Para a visualização do halo de degradação da atividade enzimática do amido foi utilizado vapor de iodo. Para visualização do halo de degradação para celulase foi utilizada a solução de vermelho do congo 0,1% (p/v) e NaCl 1M. Para a lipase foi observada a formação de cristais em torno das colônias (Teixeira *et al.*, 2011) e para a protease, foi observada a formação de halo translúcido. Foram consideradas potenciais produtoras de enzimas, as culturas que apresentaram as características descritas para cada avaliação enzimática.

## Resultados e discussão

Das 30 amostras selecionadas para o estudo, 80% (24) mostraram-se viáveis após o processo de reativação e destas, 91,6% (22) apresentaram halo de degradação para pelo menos uma das enzimas estudadas, sendo que 27,2% (06) das culturas apresentaram halo de degradação para todas as enzimas estudadas, sendo elas: *Penicillium fellutanum* CFAM 0061, *Aspergillus niger* CFAM 0161, *Penicillium* sp. CFAM 0290, CFAM 0289 e CFAM 0180 e *P. fellutanum* CFAM 0059, com halos variando de 1 a 2mm para proteases, 1 a 3mm para amilases, 2 a 5mm para celulases e 1 a 3mm para lipases (Figura 1).

Nos testes de lipases observou-se que 81,8% (18) das culturas apresentaram resultado positivo, sendo quatorze (14) pertencentes ao gênero *Penicillium*.

Nos ensaios de proteases, 68,1% (15) das culturas apresentaram resultado positivo com formação de halo de degradação, variando de 1mm (*Penicillium* sp. CFAM 0179, CFAM 0155 e CFAM 0289) a 5mm (*A. niger* CFAM 0158).

Nos testes de amilases, 54,5% (12) das culturas apresentaram halo de degradação variando de 2mm (*Penicillium* sp. CFAM 0290 e CFAM 0289; *P. fellutanum* CFAM 0061) a 16mm (*A. sydowii* CFAM 0115).

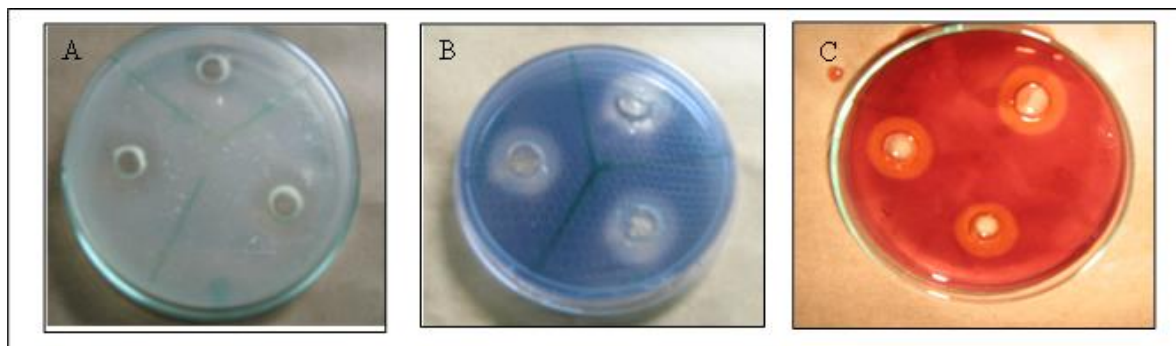


Figura 1. (A) *Penicillium* sp. produtor de proteases; (B) *Aspergillus sydowii*; produtor de amilases e (C) *Penicillium* sp. produtor de celulases.

E nos ensaios de celulases, 54,5% (12) das culturas apresentaram halo de degradação entre 1,5mm (*P. citrionigrum* CFAM-0105, *A. niger* CFAM-0158, *P. rugulosum* CFAM-0250) a 5mm (*Penicillium* sp. CFAM-0289) para doze (Figura 2).

Pereira (2012) avaliou o potencial de produção de celulases para fungos de vários gêneros isolados do solo, dentre estes, representantes dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Foi observado por estes autores, a variação de produção entre os gêneros e também entre espécies do mesmo gênero, conforme também foi observado neste estudo. Esses autores encontraram, usando *A. niger* e *Penicillium* sp., halos com tamanhos maiores dos encontrados neste estudo. Com isolados de *P. rugulosum* e *P. fellutanum*, Ruegger e Tornisielo (2004) não encontraram produção de enzimas celulolíticas.

De acordo com Messias *et al.* (2011), as lipases podem ser produzidas por diferentes micro-organismos, tais como *A. niger*, *A. oryzae* e *P. citrinum*, corroborando com os resultados obtidos neste estudo, com exceção de *Aspergillus oryzae* que não apresentou produção da enzima.

Silva *et al.* (2013) destacam o gênero *Aspergillus* spp como produtores de proteases, assim como o gênero *Penicillium* sp. Desta forma, os resultados encontrados no presente estudo são corroborados com os dados da literatura, visto que as diferentes espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* utilizadas foram produtoras de proteases.

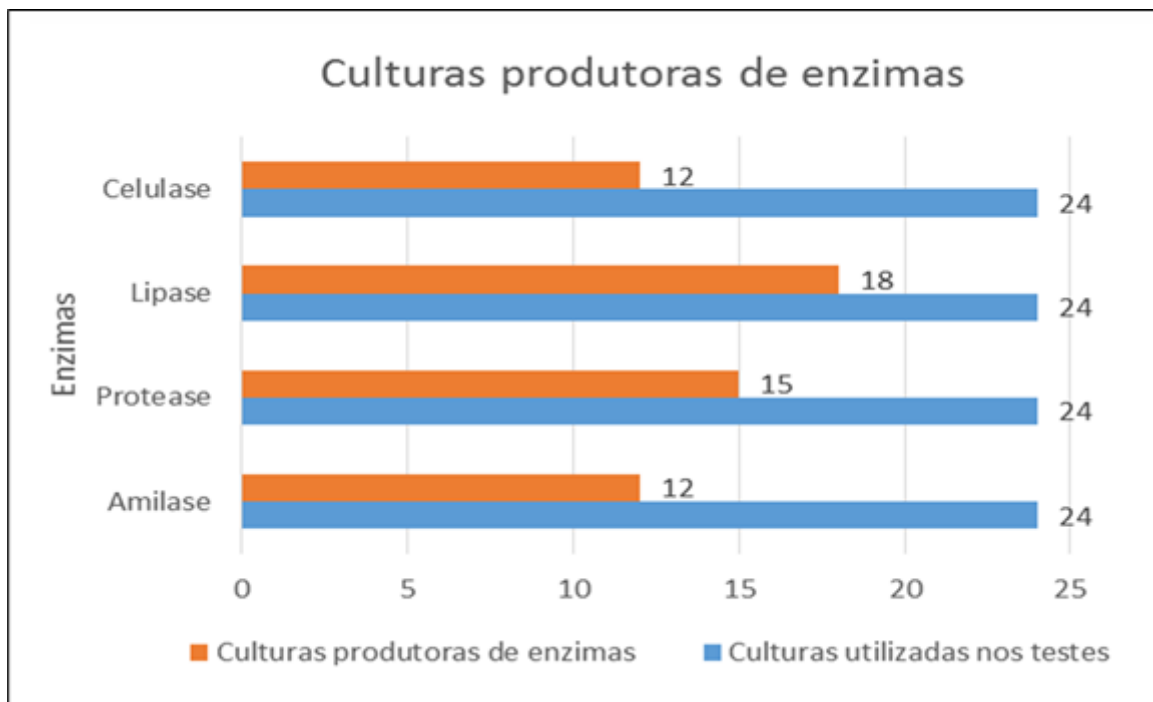


Figura 2. Total de culturas produtoras de enzimas.

Segundo a literatura e dados apresentado por Souza et al. (2010), o gênero *Aspergillus* apresenta-se promissor na produção de amilases e os resultados obtidos confirmam esses resultados, já que das oito amostras, seis apresentaram positividade nos testes e o *Aspergillus sydowii* CFAM 115 apresentou o maior halo de degradação.

### Conclusões

Cepas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* apresentam-se promissoras para a produção de enzimas extracelulares de interesse industrial, com destaque para a produção de lipases e celulasas. São recomendados ensaios mais específicos, a fim de quantificar a atividade enzimática e otimizar a produção enzimática, podendo ser estudados substratos alternativos, de baixo custo, a fim de reduzir os custos com a produção das enzimas.

### Referências

Castro MA, Pereira Jr N (2010) Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova* 33: 181-188.

Chandra M, Kalra A, Sharma PK, Kumar H, Sangwan RS (2010) Optimization of cellulases production by *Trichoderma citrinoviride* on marc of *Artemisia annua* and its application for bioconversion process. *Biomass and Bioenergy* 34:805-811.

Doolotkeldieva TD, Bobusheva ST (2011) Screening of Wild-Type Fungal Isolates for cellulolytic Activity. *Microbiology Insights* 4: 1–10.

Li Q, Yi L, Marek P, Iverson BL (2013) Commercial proteases: Present and future. *FEBS Letters* 587:1155–116.

Messias JM, Costa BZ, Lima VMG, Giese EC, Dekker RFH, Barbosa AM (2011) Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina 213-234.

Orlandelli RC, Specian V, Felber AC, Pamphile JA (2012) Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *Sabios Revista de Saúde e Biologia*.

Pereira VM (2012) avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulases por *Aspergillus sulphureus* (Fresen). Universidade Federal de Lavras /UFLA.

Rocha CP (2010) Otimização da Produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Ruegger MSJ, Tauk-tornisielo MS (2004) Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, 27: 205-211.

Singh S, Singh S, Bali V, Sharma L, Mangla J (2014) Production of Fungal Amylases Using Cheap, Readily Available Agriresidues, for Potential Application in Textile Industry. Department of Biotechnology and Biosciences, Lovely Professional University, Punjab, India.

Souza PM, Magalhães PO (2010) Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry: A review. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 850-861.

Tavares ACD, Fonseca JS, Fonseca TRB, Barroncas JF, Souza RAT, Silva TA, Teixeira MFS (2012) Enzimas Extracelulares de Fungos Anamórficos Isolados de *Morinda citrifolia* L. Universidade Federal do Amazonas – Faculdade de Biotecnologia. Manaus-AM. BBR - *Biochemistry and Biotechnology Reports* 5433: 2316-5200.

Teixeira MFS, Silva TA, Palheta RA, Carneiro ALB, Atayde HM (2011) Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações biotecnológicas). Manaus-AM: Edua 255: 142-143.