

REVITALIZAÇÃO DE ESPOROS LIOFILIZADOS DE FUNGOS CONTAMINANTES, AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PRODUTORA DE AMILASE E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA ESPÉCIE DOS PRINCIPAIS ISOLADOS PRODUTORES

Luiza Fernanda Kozaen Souza (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ione Parra Barbosa-Tessmann (Orientadora), e-mail: ipbtessmann@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / Departamento de Bioquímica - Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento (CNPq): 2.08.00.00-2 - Bioquímica

Palavras-chave: Esporos liofilizados, Amilase, DNA *barcoding*.

Resumo

Neste trabalho foram utilizadas 57 ampolas de vidro lacradas na década de 1990 e que continham esporos liofilizados de fungos filamentosos isolados do meio ambiente. As principais amilases utilizadas no processamento industrial do amido são as microbianas. Os objetivos deste trabalho foram: ativar os fungos liofilizados, avaliar produção de amilases em meio sólido e identificar a espécie dos principais isolados produtores. Trinta e três isolados de fungos foram recuperados, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Todos os isolados dos gêneros de *Aspergillus* e *Penicillium* e um isolado de *Fusarium* produziram amilase em meio sólido. Na identificação molecular foram encontradas, entre outras, as espécies *Aspergillus clavatus* e *Fusarium lateritium*. Este é o primeiro relato da produção de amilase por *A. clavatus* e *F. lateritium* e a futura caracterização das enzimas produzidas trará avanços no uso biotecnológico de amilases.

Introdução

A liofilização é a técnica primária usada na maioria das coleções de cultura para a preservação de fungos e é eficaz para quase todos os fungos conidiais, como ascomicetos e basidiomicetos (SMITH & ONIONS, 1994). Ela possui as seguintes vantagens: proteção da amostra contra infestações por ácaros e estabilidade das culturas (SMITH & ONIONS, 1994).

O mercado global de enzimas industriais deve atingir quase US \$ 6,3 bilhões em 2020 (SINGH et al., 2016). As amilases, que representam aproximadamente 25-30% de todo o mercado de enzimas, são de grande importância na indústria do amido, que foi avaliada em US \$ 77,4 bilhões em 2018 (SINGH et al., 2016). A maioria das amilases utilizadas industrialmente possuem origem microbiana e novos produtores são sempre procurados.

As principais amilases são as endoamilases (ex. α -amilases), que clivam ligações α -1,4 na parte interna das cadeias do amido e as exoamilases (ex.

β -amilases e glicoamilases), que clivam ligações glicosídicas em extremidades não redutoras das moléculas do amido. As α -amilases podem ser derivadas de bactérias e leveduras e as glicoamilases são produzidas principalmente por fungos filamentosos.

Este trabalho teve como objetivos revitalizar culturas liofilizadas de fungos contaminantes ambientais, avaliar a capacidade produtora de amilase e identificar molecularmente a espécie dos principais isolados produtores.

Materiais e métodos

Isolados liofilizados

Foram utilizadas 57 ampolas de vidro lacradas na década de 1990 (de 1992 a 1997), que continham esporos liofilizados de fungos filamentosos obtidos do ar pela exposição de placas contendo meio BDA (caldo de 200 g/L de batatas descascadas e cozidas, glicose 15 g/L, ágar 20 g/L) no Bloco I89 da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

Reativação e manutenção das culturas

Após desinfecção superficial com etanol 70%, as ampolas tiveram sua parte superior quebrada (Figura 1A) e 1,0 mL de água destilada estéril foi adicionado a cada ampola. Após uma curta hidratação (5 min), a suspensão obtida foi aplicada em uma placa de Petri ($\varnothing = 9$ cm) contendo meio BDA suplementado com 350.000 UI/L de penicilina e 145 UI/L de estreptomicina. As placas foram incubadas a 25 °C, com um fotoperíodo de 12 h, por cinco dias. Os fungos revitalizados foram transferidos para tubos contendo BDA inclinado e cultivados da mesma maneira. Alguns fungos foram submetidos ao isolamento monospórico para obtenção de culturas puras. As culturas em BDA inclinado foram estocadas a TA.

Produção de amilase em meio sólido

Os isolados foram inoculados e cultivados em placas de Petri ($\varnothing = 9$ cm) contendo meio ágar nutriente [extrato de levedura 3,0 g/L, peptona 5,0 g/L, pH 8,0, ágar 15 g/L] contendo 2 g/L de amido solúvel por 3 – 5 dias a 25 °C com um fotoperíodo de 12 h. O inóculo foi feito com um toque no centro da placa com a ponta cunhada de um palito de madeira estéril e coberto com esporos de uma cultura em meio BDA. Isolados não esporulantes foram inoculados com um pequeno pedaço (2 mm³) da cultura em BDA inclinado. Após cultivo, as placas foram reveladas com 5 mL do reagente de iodo [2 g/% KI; 0,2 g/% I₂] para a detecção do substrato remanescente.

DNA barcoding

Inicialmente, 1 cm³ de uma cultura em BDA inclinado foi transferido, picotado e agitado em um frasco contendo 20 mL de água destilada estéril. Um mL da

suspensão de esporos obtida foi inoculada em 25 mL de meio BD líquido em Erlenmeyer de 125 mL. Os frascos foram incubados de forma estacionária por 3 a 5 dias a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas. O micélio obtido foi coletado por filtração em gaze estéril, macerado com nitrogênio líquido em gral de porcelana e o DNA foi extraído deste com o kit PureLink™ Genomic Plant DNA Purification (Thermo Fisher Scientific, EUA). A concentração do DNA foi estimada por fluorimetria.

A reação de PCR foi realizada com 50 µL da seguinte mistura de reação: tampão da enzima 1X, MgCl₂ 1,5 mM, 1,5 U de Platinum Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, EUA), 0,2 mM de cada dNTP, 50 pmol de cada iniciador, ITS4 e ITS5 (WHITE et al., 1999), e de 10 a 20 ng do DNA genômico. A reação de PCR consistiu de 25 ciclos de 1 min e 30 seg a 94 °C, 1 min e 30 seg a 50 °C e 2 min a 72 °C. Antes dos ciclos as amostras foram aquecidas por 5 min a 94 °C e após os ciclos as amostras foram incubadas por 10 min a 72 °C. O produto amplificado foi avaliado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, sob luz UV, e purificado com o kit PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA).

O sequenciamento dos fragmentos amplificados foi feito pelo método de Sanger com o iniciador ITS4 no Centro de Estudos do Genoma Humano e Células Tronco da Universidade de São Paulo. As sequências obtidas foram utilizadas em uma pesquisa BLAST. A classificação dos isolados foi feita pela identidade de 99% ou mais com sequências de espécies catalogadas em bancos de dados.

Resultados e Discussão

Após reativação das culturas liofilizadas por quase 30 anos, foram obtidos 10 isolados de *Aspergillus* spp., 10 de *Penicillium* sp., 11 de *Fusarium* sp., dois de *Trichoderma* spp. e um de *Cladosporium* sp. (Tabela 1). Destes, todos os isolados de *Aspergillus* e de *Penicillium* e um de *Fusarium* produziram halo de hidrólise em meio sólido contendo amido (Tabela 1, exemplos na Figura 1B, C e D).

Sete isolados foram identificados por DNA *barcoding* (Tabela 1). Este é o primeiro relato da produção de amilase por *Aspergillus clavatus* e *Fusarium lateritium*.

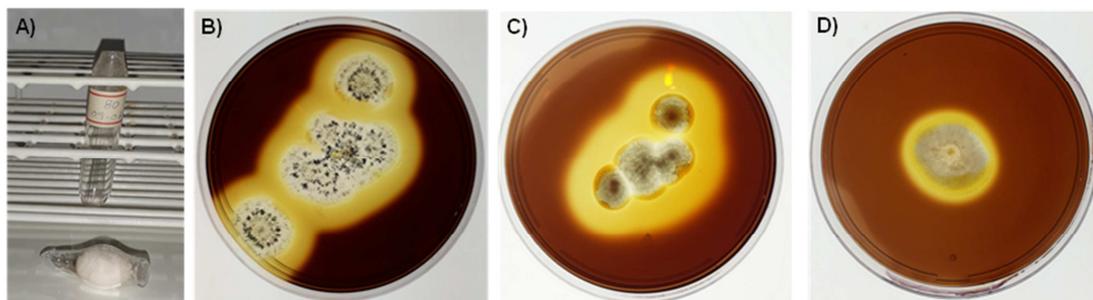


Figura 1 – A) Ampola quebrada para revitalização dos esporos liofilizados. Produção de amilase em meio sólido por *Aspergillus clavatus* UEM 04 (B), *Penicillium citrinum* UEM 50

(C) e *Fusarium lateritium* UEM 59 (D). O halo claro ao redor das colônias indica a produção de amilase.

Tabela 2. Isolados estudados, produção de amilase em meio sólido e identificação molecular dos principais isolados produtores.

| Isolados do gênero <i>Aspergillus</i> | Halo de hidrólise (mm) | Espécie (identificação molecular) | Isolados do gênero <i>Fusarium</i> | Halo de hidrólise (mm) | Espécie (identificação molecular) | |
|---------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| UEM 01 | 2 | <i>A. pseudoglaucus</i> | UEM 09 | 0 | <i>F. lateritium</i> | |
| UEM 04 | 7 | <i>A. clavatus</i> | UEM 19 | 0 | | |
| UEM 05 | 3 | <i>A. terreus</i> | UEM 21-a | 0 | | |
| UEM 07 | 3 | | UEM 29 | 0 | | |
| UEM 11 | 2 | | UEM 59 | 2 | | |
| UEM 13 | 8 | <i>A. sydowii</i> | UEM 60 | 0 | | |
| UEM 33 | 3 | | UEM 65 | 0 | | |
| UEM 41 | 6 | <i>A. niger</i> | UEM 67 | 0 | | |
| UEM 63 | 2 | | UEM 76 | 0 | | |
| UEM 68 | 3 | | UEM 102 | 0 | | |
| | | | UEM 103 | 0 | | |
| Isolados do gênero <i>Penicillium</i> | Halo de hidrólise (mm) | Espécie (identificação molecular) | Isolados de gêneros diversos | Gênero | | Halo de hidrólise (mm) |
| UEM 06 | 3 | <i>Penicillium citrinum</i> | UEM 16 | <i>Cladosporium</i> | | 0 |
| UEM 12 | 4 | | UEM 52 | <i>Trichoderma</i> | | 0 |
| UEM 28 | 4 | | UEM 70 | <i>Trichoderma</i> | 0 | |
| UEM 32 | 5 | | | | | |
| UEM 44 | 3 | | | | | |
| UEM 45 | 5 | | | | | |
| UEM 50 | 8 | | | | | |
| UEM 53 | 5 | | | | | |
| UEM 101 | 2 | | | | | |
| UEM 106 | 4 | | | | | |

Conclusões

Os fungos revitalizados pertencem principalmente aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. As enzimas das duas novas espécies produtoras de amilase, *A. clavatus* e *F. lateritium*, podem representar um avanço para a degradação industrial do amido.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação Araucária pela bolsa PIBIC.

Referências

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P.K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech.**, v. 6, pp.174, 2016.

SMITH, D.; ONIONS, A..HS. **The preservation and maintenance of living fungi**. IMI Technical Handbooks, nº. 2, 2nd ed. Wallingford, UK: International Mycological Institute, CAB International, 1994.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications**. INNIS, M.A.; GELFAND,

30º Encontro Anual de Iniciação Científica
10º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



11 e 12 de novembro de
2021

H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. Eds. San Diego: Academic Press Inc, pp. 315-322, 1990.