

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE UMA COLEÇÃO DE *Aspergillus* spp. E *Penicillium* spp. PRODUTORES DE AMILASE EM MEIO SÓLIDO E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DESTA ENZIMA EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Luiza Fernanda Kozaen Souza (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ione Parra Barbosa-Tessmann (Orientador), 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: Amilase, DNA *barcoding*, Fungos contaminantes.

Resumo:

Previamente a este trabalho, foram recuperados 34 isolados (9 *Aspergillus* spp., 10 *Penicillium* spp., 11 *Fusarium* spp. e 4 de outros gêneros) de fungos contaminantes, cujos esporos e/ou hifas haviam sido liofilizados na década de 1990. Um teste de produção de amilase em meio sólido mostrou que todos os isolados de *Aspergillus* sp. e de *Penicillium* sp. eram produtores de amilase. Portanto, os objetivos deste trabalho foram identificar ao nível de espécie os isolados de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. por meio de DNA *barcoding* e avaliar produção de amilase em meio líquido. Como resultados, todos os isolados foram identificados e alguns novos produtores da enzima foram encontrados.

Introdução

As amilases degradam o amido e há vários tipos de amilases. As duas amilases mais aplicadas na degradação industrial do amido são as α -amilases (endoamilases) e as glicoamilases (exoamilases). O mercado global de enzimas será de 8,7 bilhões de dólares em 2026 e as α -amilases representam 30% deste mercado (MESBAH, 2022).

As amilases possuem diversas aplicações industriais, como nas indústrias de detergentes, alimentos, farmacêutica, têxtil, papel e produção de bioetanol (PAUL et al., 2021). Por causa do seu uso industrial extensivo e diversidade de aplicações, a pesquisa por novas fontes produtoras e novas enzimas é significativa.

A maioria das enzimas comercializadas são de origem microbiana. Tanto fungos como bactérias produzem α -amilases e glicoamilases, mas as α -amilases comerciais são principalmente de origem bacteriana e as glicoamilases comerciais são de origem fúngica (PAUL et al., 2021).

As enzimas microbianas são mais estáveis que enzimas extraídas de plantas e animais e apresentam produção e purificação mais fáceis, além de serem sazonalmente independentes (PAUL et al., 2021). A produção de amilases é geralmente influenciada pela cepa, composição do meio e condições de cultivo.

Materiais e Métodos

Microorganismos

Os isolados utilizados são os constantes na Tabela 1. Estes fungos estão sendo mantidos em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) inclinado e no mesmo meio sob óleo mineral.

Condições de cultura para a produção da enzima

O cultivo de cada fungo foi feito em três Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do seguinte meio líquido: extrato de levedura 3 g/L, peptona 5 g/L, NaH_2PO_4 21 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 29 mM, pH 7,0, e 2 g/L de amido solúvel. O inóculo consistiu de um mL de uma suspensão de esporos feita pela agitação de 1 cm^3 da cultura em BDA inclinado em 20 mL de água destilada estéril. Os frascos foram incubados por 72 h, a 25 °C, com agitação orbital (100 rpm). As culturas obtidas foram filtradas em papel de filtro e a atividade enzimática foi avaliada no filtrado. O micélio foi seco a 50 °C por 24 h e o peso do micélio seco avaliou o crescimento do microrganismo.

Ensaio enzimático de amilase

O método utilizado foi o de descoloramento do complexo amido-iodo (PALANIVELU, 2001). Uma alíquota de 500 µL do filtrado puro ou diluído foi adicionada a 1,0 mL de tampão de fosfato 0,1 M, pH 7,0, e 500 µL de amido solúvel a 0,1% (w/v), preparado no mesmo tampão. A reação foi incubada por 10 min a 50 °C. Em seguida, foram adicionados 500 µL de HCl 0,1 M e 500 µL da solução de iodo [KI 2,0 g/% (w/v); I_2 0,2 g/% (w/v)]. A absorbância foi lida a 690 nm. O branco foi preparado com 2,0 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. A concentração inicial do amido foi avaliada em uma reação com 500 µL da solução de amido 0,1% e 1,5 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. O amido residual nas culturas foi avaliado em reações com 500 µL do filtrado e 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. O branco e as reações controle foram adicionados de 500 µL de HCl 0,1 M e 500 µL do reagente de iodo antes da leitura da absorbância. A absorbância da amostra foi diminuída da absorbância do controle do amido residual no filtrado e o resultado obtido foi diminuído da absorbância do controle de amido inicial. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que causa uma redução de absorbância de 20% por minuto nas condições do ensaio.

Extração de DNA e identificação molecular dos isolados

Um mL da suspensão de esporos obtida como descrito acima foi utilizada para inocular Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio batata dextrose líquido. O cultivo estacionário foi feito por 2-3 dias a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas. O micélio foi coletado por filtração da cultura em nylon estéril e macerado com nitrogênio líquido em gral de porcelana para a extração do DNA genômico com o kit

PureLink™ Genomic Plant DNA Purification (Thermo Fisher Scientific, EUA). A concentração de DNA foi estimada por fluorimetria com o kit Qubit™ dsDNA HS Assay e o fluorímetro Qubit™ (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Reações de amplificação da região ITS-5.8S-rDNA foram realizadas em tubos de PCR contendo 25 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, 25 pmol dos iniciadores ITS4/5 (WHITE et al., 1990) e 2-5 ng do DNA genômico. A reação de PCR consistiu de 30 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 minutos a 94 °C e, após os ciclos, por 10 minutos a 72 °C. Após avaliar a amplificação em gel de agarose, o DNA amplificado foi purificado com o kit PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Thermo Scientific, EUA) e enviado para sequenciamento (Sanger) no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, São Paulo, SP, ou na empresa GoGenetic de Curitiba, PR. As sequências obtidas foram trimadas, depositadas no GenBank e utilizadas para pesquisa BLAST. A classificação dos isolados foi feita pela identidade de pelo menos 99% com sequências de espécies catalogadas em bancos de dados.

Resultados e Discussão

Todos os isolados foram identificados por DNA *barcoding* (Tabela 1) com alta identidade entre as sequências obtidas e as depositadas em bancos de dados.

Os isolados do gênero *Aspergillus* foram os maiores produtores da enzima (Figura 1). A espécie *A. clavatus* foi a maior produtora, seguida de espécie *A. niger*. A produção de amilase por *A. niger* é bem descrita (PAUL et al., 2021). No entanto, não há dados na literatura da purificação e caracterização de amilases de *A. clavatus*.

Dentre os isolados de *Penicillium* spp., o melhor produtor foi o isolado *P. citrinum* UEM 50 (Figura 1). A produção de amilase é reportada para poucas espécies do gênero *Penicillium* e a enzima produzida geralmente é a α-amilase. Não há relatos na literatura da purificação e caracterização de amilases de *P. crustosum* e *P. funiculosum* e estas enzimas poderiam ser estudadas.

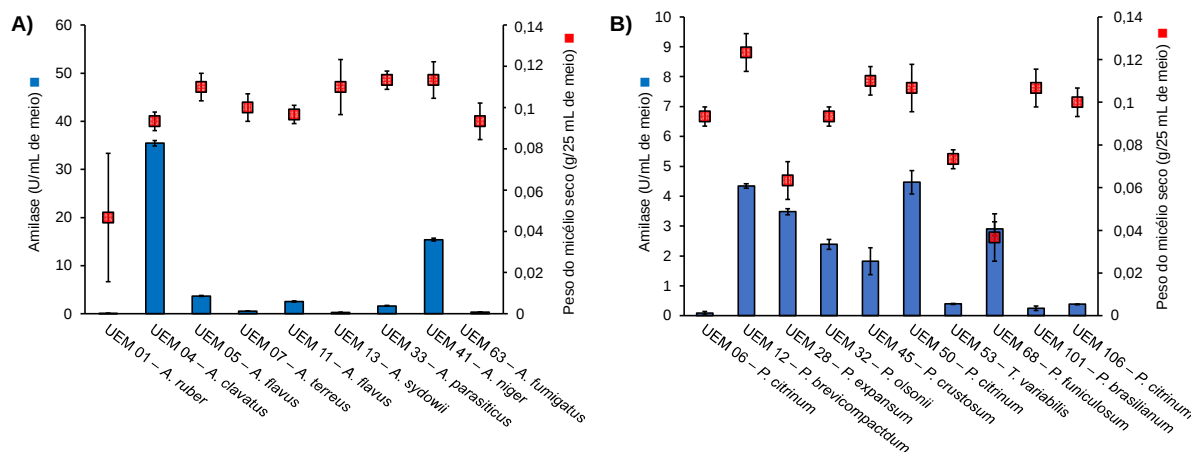


Figura1 – Produção de amilase em meio líquido. Produção pelos isolados de *Aspergillus* spp. (A) e *Penicillium* spp (B). Os dados são a média e o desvio padrão de triplicatas.

Tabela 1. Isolados identificados.

Isolado	Gênero e espécie	GenBank	GenBank de sequências similares (porcentagem de identidade)
UEM 01	<i>Aspergillus ruber</i>	OP329178	MH858702.1 (100%), MH854663.1 (100%)
UEM 04	<i>Aspergillus clavatus</i>	OP329179	HQ026749.1 (100%), NR_121482.1 (100%)
UEM 05	<i>Aspergillus flavus</i>	OP329180	OL711682.1 (100%), MZ158654.1 (100%)
UEM 07	<i>Aspergillus terreus</i>	OP329181	MT530046.1 (100%), KF624770.1 (100%)
UEM 11	<i>Aspergillus flavus</i>	OP329182	OL711682.1 (100%), MZ158654.1 (100%)
UEM 13	<i>Aspergillus sydowii</i>	OP329183	MH854859.1 (99.8%), MT312735.1 (99.8%)
UEM 33	<i>Aspergillus parasiticus</i>	OP329184	AY373859.1 (100%), KY937934.1 (100%)
UEM 41	<i>Aspergillus niger</i>	OP329185	MN267569.1 (100%), KP131604.1 (100%)
UEM 63	<i>Aspergillus fumigatus</i>	OP329186	MG991618.1 (100%), KU296267.1 (100%)
UEM 06	<i>Penicillium citrinum</i>	OP329187	MT597828.1 (100%), LC514694.1 (100%)
UEM 12	<i>Penicillium brevicompactum</i>	OP329188	MH863910.1 (100%), MN636211.1 (100%)
UEM 28	<i>Penicillium expansum</i>	OP329189	NR_077154.1 (100%), FJ463031.1 (100%)
UEM 32	<i>Penicillium olsonii</i>	OP329190	MH860601.1 (100%), AY373925.1 (100%)
UEM 45	<i>Penicillium crustosum</i>	OP329191	MH862985.1 (100%), MN511336.1 (100%)
UEM 50	<i>Penicillium citrinum</i>	OP329192	MG554246.1 (100%), KY921947.1 (100%)
UEM 53	<i>Talaromyces variabilis</i>	OP329193	MG957181.1 (100%), KU216713.1 (100%)
UEM 68	<i>Penicillium funiculosum</i>	OP329194	MH860684.1 (100%), GU183120.1 (100%)
UEM 101	<i>Penicillium brasilianum</i>	OP329195	MH865219.1 (100%), MH911419.1 (100%)
UEM 106	<i>Penicillium citrinum</i>	OP329196	MH858380.1 (99.6%), NR_121224.1 (99.6%)

Conclusões

Espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* contaminantes foram identificadas. A produção de amilase por estas espécies foi estudada em meio líquido e produtores de enzimas ainda não estudadas foram encontrados.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pela bolsa PIBIC.

Referências

MESBAH, N. M. Industrial biotechnology based on enzymes from extreme environments. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 10, 2022.

PALANIVELU P. **Analytical biochemistry and separation techniques**. Madurai, India: Kalamani Printers, 2001.

PAUL, J. S., GUPTA, N., BELIYA, E., TIWARI, S., & JADHAV, S. K. Aspects and recent trends in microbial α -amylase: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 193(8), 2649–2698, 2021.

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**

31º Encontro Anual de Iniciação Científica
11º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



10 e 11 de novembro de
2022

Methods and Applications. INNIS, M.A.; GELFAND, H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. Eds. San Diego: Academic Press Inc, pp. 315-322, 1990.