

AMILASES E PECTINASES EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR FUNGOS ANTÁRTICOS E SUAS APLICAÇÕES

Mayanne Karla da Silva ¹

Alysson Wagner Fernandes Duarte (orientador) ²

RESUMO

Fungos são encontrados em variados substratos como os líquens antárticos e tem demonstrado potencial na produção de enzimas extracelulares com aplicação biotecnológica, a exemplo de amilases e pectinases usadas em indústrias de alimentos e tecidos. Diante disso, objetivou-se avaliar o potencial de fungos isolados de líquens da Antártica em produzir amilases e pectinases extracelulares com aplicações químicas variadas. Os fungos recuperados dos líquens Antárticos foram testados para a produção de amilases e pectinases, sendo cultivados em meio YMA modificado com um substrato indutor: amido e pectina, respectivamente, sob temperatura de $8,0 \pm 2,0$ °C. Após o período de análise de 7 dias, para a confirmação da atividade de amilases, o lugol foi adicionado ao meio, observando a presença de halos brancos em torno das colônias e, para a confirmação de pectinases, ao meio foi adicionado solução de CTAB 1%. Por fim, determinou-se o índice enzimático (IE), a razão entre o diâmetro dos halos de hidrólise pelo da colônia dos isolados testados. Cerca de 130 fungos isolados de líquens antárticos foram testados para a produção enzimática, em que 25 isolados (19,2%) tiveram atividade positiva para amilases, seguido de 24 (18,4%) positivos para pectinases. A maioria dos isolados positivos para pectinases e amilases foi recuperada dos líquens *Lecania brialmontii*, *Xanthoria candelaria* e *Usnea aurantiacoater*. A confirmação da produção dessas enzimas extracelulares entre os fungos isolados de líquens da Antártica reflete a capacidade química e metabólica para produzi-las, o que é importante em industriais de interesse.

Palavras-chave: Microrganismos, Enzimas extracelulares, Líquens, Antártica, Biotecnologia.

INTRODUÇÃO

Ambientes extremamente frios apesar de sua natureza estressante, em termos de clima e geografia, abriga uma diversidade biológica amplamente interessante e pouco conhecida. Com temperaturas baixas, intensa radiação ultravioleta e rodeada por gelo e neve, a Antártica é um desses habitats em que há a presença de microrganismos adaptados às suas condições. Esses já foram relatados em variados substratos antárticos, em solos, água marinha, musgos e nas angiospermas lá presentes. Somado a eles tem-se os líquens, uma unidade formada pela associação simbiótica entre uma alga ou cianobactéria fotossintetizante e um fungo filamentosos. São ainda pouco estudados quanto à capacidade de interagir com outros microrganismos e serem potencialmente úteis em produzir moléculas viáveis (DUARTE *et al.*, 2013; SANTIAGO *et al.*, 2015).

Nesse sentido, a produção de enzimas extracelulares é uma das alternativas para o estudo do potencial microbiano dos fungos recuperados de líquens Antárticos. As amilases e pectinases são enzimas atuantes na catálise de ligações glicosídicas de carboidratos complexos como o amido e pectina, respectivamente. As primeiras são bastante usadas nas indústrias de panificação, tecidos e ração animal (CARRASCO *et al.*, 2016), enquanto que as segundas estão envolvidas na extração de óleos, clarificação de sucos e amadurecimento de

¹ Graduanda do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alagoas - UFAL, karlamayanne@gmail.com;

² Professor orientador: Doutorado em Biotecnologia, USP. UFAL, Campus Arapiraca alysson.duarte@arapiraca.ufal.br.

frutos (PASTORE & UENOJO, 2007). Diante disso, objetivou-se avaliar a aptidão de fungos isolados de amostras de líquens da Antártica em produzir amilases e pectinases aplicáveis na biotecnologia.

METODOLOGIA

Foi realizada a coleta de 28 amostras de líquens no arquipélago das *Shetlands* do Sul (Antártica marítima), durante expedições brasileiras realizadas nos verões de 2015/2016 e 2016/2017. As amostras foram homogeneizadas em solução salina (0,85%), diluídas e em seguida plaqueadas em dois meios de cultura: **1) Ágar Yeasts Malt** (YMA) (3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ de extrato de malte, 5,0 g.L⁻¹ de peptona, 10 g.L⁻¹ de glicose e 15 g.L⁻¹ de ágar) e **2) Sabouraud Dextrose Ágar** (SDB) diluído 10 vezes (2 g.L⁻¹ de batata e 15 g.L⁻¹ de ágar), ambos suplementados com amoxicilina (500 mg.L⁻¹) e clorafenicol (100 µg.mL⁻¹), respectivamente. As placas de Petri foram incubadas a 8,0 ± 2,0 °C, com o acompanhamento do crescimento das colônias durante 60 dias. Os isolados crescidos foram repicados para novos meio de cultura e preservados dos isolados em solução de glicerol 20% por ultracongelamento em ultrafreezer a -80 °C.

Os procedimentos metodológicos descritos por Martorell *et al.* (2017) foram usados para a triagem enzimática, com a avaliação da produção de 2 enzimas extracelulares: a amilase e pectinase pelos fungos obtidos na etapa anterior. Os isolados foram cultivados em meio de cultura sólidos YMA diluído 10 vezes, acrescidos de substratos indutores, conforme a especificidade da enzima, com incubação de 7 dias a 8,0 ± 2,0 °C. Para amilase, o amido foi adicionado ao meio de cultura e solução de iodo utilizada para revelação do halo de hidrólise, e para pectinase o meio foi suplementado com pectina e o halo de hidrólise revelado por solução de CTAB a 1 %. Por fim, avaliou-se o índice enzimático (IE) que corresponde à razão entre o diâmetro do halo de hidrólise pelo da colônia a fim de se confirmar os isolados com maior atividade enzimática extracelular.

DESENVOLVIMENTO

Microrganismos encontrados na Antártica foram testados quando a habilidade de produzir metabólitos secundários necessários ao funcionamento celular, como enzimas extracelulares. Há estudos confirmados de fungos na Antártica produtores de lipases, celulases, proteases, lacases, xilanases e amilases (DUARTE *et al.*, 2018) isolados de substratos terrestres e marinhos lá presentes.

Cerca de 25% dos fungos filamentosos isolados de solos da Ilha de Rei George, na Antártica, demonstraram atividade para a produção de amilases, principalmente do gêneros *Geomyces* e *Aureobasidium* sp., conforme KRISHNAN e colaboradores (2011). Já as espécies de leveduras *Dioszegia fristingensis*, *Mrakia lollopi*, *Holtermaniella watticus* e *Tetracladium* sp. apresentaram melhor atividade para amilases (CARRASCO *et al.*, 2016). Essas enzimas são aplicadas nas indústrias têxteis, alimentícia, fabricação de xaropes e até na biorremediação de efluentes contendo amido (MARTORELL *et al.*, 2019).

Enquanto que os trabalhos de LOPERENA *et al.* (2012), POVEDA *et al.* (2018) e VAZ *et al.* (2011) são um dos poucos relatos sobre a produção de pectinases por fungos antárticos em amostras de solos, água e esponjas marinhas. *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Leucosporidium* e *Mrakia* configuram gêneros de leveduras antárticas, já testados para a produção dessa enzima. As pectinases são amplamente utilizadas nas etapas de processamento de alimentos, tais como a extração e clarificação de sucos (IBIDEM *et al.* 2019).

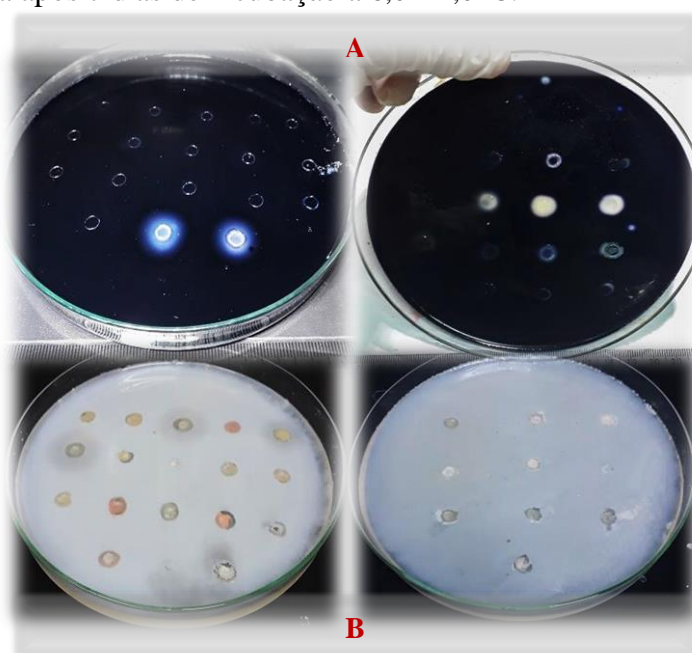
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi obtido um total de 380 fungos do processamento das 28 amostras de líquens coletadas na Antártica, cerca de 130 desses foram testados para a produção das enzimas, em que 25 isolados (19,2%) tiveram atividade positiva para a produção de amilases, seguido de 24 isolados (18,4%) positivos para pectinases extracelulares, (tabela 1, figura 1).

Tabela 1: Fungos isolados de líquens positivos na produção de amilases e pectinases extracelulares.

Fungos triados (n)	Enzima	Isolados positivos n (%)
130 isolados	Amilase	25 (19,2%)
	Pectinase	24 (18,4%)

Figura 1: Atividade enzimática positivas para (A) amilases e (B) pectinases produzidas por fungos da Antártica após 7 dias de incubação a $8,0 \pm 2,0$ °C.



Os líquens *Xanthoria candelaria* (L4), *Usnea capilacea* (L11), *Caloplaca regalis* (L15), *Lecania brialmontii* (L19), *Usnea aurantiacoate* (L31) apresentaram mais isolados produtores de pectinases. E o índice enzimático variou de 1,20 a 3,80, respectivamente para os isolados T. L19, 3. L31, 7. L31 (menores valores de atividade pectinolítica) e o isolado 2. L3 (maior IE observado, com o líquen *U. aurantiacoater* L3), tabela 2.

Já no *screening* de amilases, o *L. brialmontii* teve 10 isolados confirmados como produtores da enzima, seguido de *U. aurantiacoater* (L1) com 4 isolados. Em relação ao IE dos fungos positivos ao teste, teve uma variação de 1,10 com os isolados AD. L19 e 2. L31 até o valor de 2,83 para o 4. L10 (de *Sphaerophorus globosus*).

Tabela 2: Índice Enzimático de amilases e pectinases produzidas por fungos isolados de líquens coletados na Antártica. (IE = halo de hidrólise/diâmetro da colônia).

LIQUEN	ISOLADO	ÍNDICE ENZIMÁTICO (IE)	
		Amilase	Pectinase
<i>Usnea aurantiacoater</i>	B. L1	1,33	-
	D. L1	1,12	-
	E. L1	1,60	-
	I. L1	1,28	-
<i>Usnea aurantiacoater</i>	1. L2	-	2,40
<i>Usnea aurantiacoater</i>	2. L3	-	3,80
	3. L3	-	2,00
	7. L3	1,40	-
<i>Xanthoria candelaria</i>	4. L4	1,50	2,22
	6. L4	-	2,00
	7. L4	1,50	2,33
<i>Xanthoria candelaria</i>	9. L6	-	2,00
<i>Sphaerophorus globosus</i>	B. L6	-	1,50
	4. L10	2,83	1,50
	5. L10	-	1,75
<i>Usnea capilacea</i>	F. L11	-	1,42
	G. L11	-	1,28
	I. L11	-	1,28
<i>Xanthoria candelaria</i>	1. L12	x	-
	2. L12	x	-
	3. L12	-	3,33
	A. L12	-	1,50
<i>Mastodia tessellata</i>	B. L14	1,42	-
<i>Caloplaca regalis</i>	2. L15	1,57	x
	13. L15	-	x
	17. L15	1,38	x
<i>Lecania brialmontii</i>	1. L19	x	-
	2. L19	x	-
	4. L19	x	-
	5. L19	1,25	-
	G. L19	1,60	-
	J. L19	-	1,75
	I. L19	-	1,75
	O. L19	1,28	-
	P. L19	1,25	-
	T. L19	1,28	1,20
	AD. L19	1,10	-
	1. LF19	1,25	-
<i>Usnea aurantiacoater</i>	3. L25	1,16	-
<i>Usnea aurantiacoate</i>	2. L31	1,10	1,40
	3. L31	-	1,20
	7. L31	-	1,20

x: IE não mensurados

A prospecção significativa das 2 enzimas entre os fungos demonstra a habilidade desses microrganismos em produzir amilases e pectinases ativas no frio como já relatados na literatura (CARRASCO *et al.* 2016; LOPERENA *et al.* 2012; POVEDA *et al.*, 2018); o que do ponto de vista de aplicação industrial é bastante vantajoso, devido a faixa térmica da atividade dessas enzimas ser mais eficiente para o processo industrial (IBIDEM *et al.* 2019). Ademais, esse é um dos poucos relatos de fungos recuperados de líquens produtores dessas enzimas e aqueles isolados positivos com maiores IE enzimático puderam ser avaliadas quanto às características das enzimas produzidas a fim de aumentar a eficiência na atividade e então serem aplicadas industrialmente no processamento de alimentos, tratamentos de resíduos e produção de compostos que demandam tais enzimas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, verificou-se que os fungos recuperados de líquens da Antártica são produtores de amilases e pectinases extracelulares que podem ser aplicadas posteriormente em processos químicos biootecnológicos empregando baixas temperaturas. Esse trabalho reforça a importância de estudos referentes à produção de enzimas hidrolases extracelulares produzidas por fungos isolados da Antártica.

REFERÊNCIAS

CARRASCO, M.; *et al.* **Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts.** BMC Microbiology, 2016.

DUARTE, A. W. F.; *et al.* Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. **Extremophiles**, 2013. p. 1023–1035.

DUARTE, A. W. F.; *et al.* Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2018.

KRISHNAN, A. Extracellular hydrolase enzyme production by soil fungi from King George Island, Antarctica. **Polar Biol**, 2011.

LOPERENA, L.; *et al.* Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. **World J Microbiol Biotechnol**, 2012.

MARTORELL, M. M.; *et al.* Antarctic Yeasts as a Source of Enzymes for Biotechnological Applications. 2019. In: **Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications.** Springer, 2019. p. 285-304.

MARTORELL, M. M.; *et al.* Bioprospection of cold-adapted yeasts with biotechnological potential from Antarctica. **Journal of Basic Microbiology**, 2017.

PASTORE, G. M.; UENOJO, M. **Pectinases: aplicações industriais e perspectivas.** v. 30. nº 2. Química Nova, São Paulo, 2007.

POVEDA, G.; *et al.* Cold-active pectinolytic activity produced by filamentous fungi associated with Antarctic marine sponges. **Biological Research**, 2018.

SANTIAGO, I. F.; *et al.* Lichensphere: a protected natural microhabitat of the non-lichenised fungal communities living in extreme environments of Antarctica. **Extremophiles**, 2015. p. 1087-1097.

VAZ, A. B. M.; *et al.* The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2011.