



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2019

TÍTULO DO RESUMO

Pollyana Lopes Valle¹; Hélio Mitoshi Kamida²; Raquel Guimarães Benevides³

1. Bolsista PIBIC/Fapesb, Graduada em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

lopes.valle@gmail.com

2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

hmkamida72@gmail.com

3. Participante do projeto Produção recombinante de enzimas celulolíticas e ligninolíticas de fungos e sua aplicação no processamento de resíduos agroindustriais, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: raquelgb@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: descoloração; bagaço de cana; bagaço de licuri.

INTRODUÇÃO

Segundo Falade *et al.* (2017), a degradação efetiva da lignina é de importância primordial para a utilização de compostos lignocelulósicos no setor industrial para a efetiva utilização dos seus produtos de valores agregados. A utilização de fungos e suas enzimas no tratamento de resíduos lignocelulolíticos é uma alternativa promissora, pois, trata-se de uma alternativa limpa, segura e capaz de gerar produtos de valor agregado para posterior aplicação (Lu-Chau, *et al.* 2019).

Fungos de podridão branca utilizam os principais componentes da madeira (celulose, hemicelulose e lignina) para o metabolismo (Mohapatra *et al.*, 2018). Diversos fungos de podridão branca tem sido descritos, mas, apenas uma parte podem ser utilizados para degradar compostos lignocelulósicos, como é o caso dos fungos do gênero *Ganoderma*, os quais podem secretar uma variedade de enzimas modificadoras de lignina, tais como a Lignina Peroxidase (LiP) (EC1.11.1.14), a Manganês Peroxidase (MnP) (EC1.11.1.13), Lacases (Lac) (1.10.3.20) (D'Souza *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2012; Mohapatra *et al.*, 2018) capazes de hidrolizar a lignina.

O conhecimento dos indivíduos do gênero *Ganoderma* produtores de enzimas ligninolíticas fornecem informações a respeito do potencial biotecnológico desses metabólitos, contribuindo assim para o desenvolvimento de possíveis ferramentas mais eficazes nos processos de deslignificação de resíduos agroindustriais.

O trabalho realizado visou descrever as linhagens provenientes da CCMB UEFS das estirpes depositadas do gênero *Ganoderma*, cultivando-os em meio indutor e realizando testes através de corantes para a detecção de enzimas lignocelulósicas, assim como a identificação molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

As estirpes obtidas foram reativados em meio extrato de malte extrato de levedura ágar– 20 g de extrato de malte; 2 g de extrato de levedura; 16 g de ágar; 1000 mL de água destilada – por meio de plugs com aproximadamente 5 mm de diâmetro e incubados a 27°C por sete dias no escuro. Todos os testes executados no presente trabalho foram realizados em triplicata, com pseudotríplicas.

Para a extração do DNA genômico das estirpes, seguiu-se o protocolo utilizado por Ferreira-D'Silva (2014).

A amplificação dos segmentos ITS 6 e 8, foi obtida por meio do kit Taq DNA Polymerase, recombinant, da invitrogen™ seguindo as recomendações do fabricante.

As amostras amplificadas seguiram para a limpeza do produto da PCR através do kit PureLink® PCR Purification Kit, da invitrogen™, seguindo as recomendações do fabricante e então, preparadas para o sequenciamento, segundo a recomendação da empresa Myleus Biotecnologia a qual realizou o procedimento das amostras pelo método de Sanger.

Placas contendo meio indutor ABSA – 8 g de bagaço; 8 g de ágar-ágar; 2 g de sulfato de amônia; 400 mL de água destilada – com bagaço de cana e bagaço da bráctea do licuri, coletados no município de Amélia Rodrigues-BA e no *campus* da Universidade Estadual de Feira de Santana, respectivamente, foram inoculadas com plugs de aproximadamente 5 mm de diâmetro sendo incubados a 27°C, seguido de observação após 7 e 14 dias.

Como controle externo, foi utilizado estirpe de *Moniliophthora perniciosa* para os testes do RBBR e o teste da gota.

Para observar a produção de enzimas ligninolíticas foi realizado o teste de descoloração do RBBR - 5 g de Extrato de Malte; 20 g de ágar; 2 g RBBR (Azul Brilhante de Remazol); 1000 mL de água destilada - em meio sólido. Foi realizado através das estirpes crescidas e isoladas com sete dias de crescimento, sendo observados a descoloração do corante 7 e 14 dias posteriores à inoculação.

Para o teste em placa da atividade enzimática, foi realizado segundo Okino *et al.* (2000) com adaptações, com as estirpes que apresentaram resultado positivo no teste do RBBR. Para tal, elaborou-se o meio CGA a 0,1% – 0,1 mL de guaiacol; 2 g de bagaço de cana; 16 g de ágar; 1000 mL de água destilada, onde foram inoculados os fungos no meio e observado o resultado após sete dias de crescimento com incubação a 27°C, no escuro. Em seguida foi feito o teste da gota com solução de α -naftol (0,1M em 96% de etanol) para a detecção da atividade enzimática da lacase (Okino *et al.*, 2000).

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Ao todo, foram obtidos três fungos provenientes da CCMB-UEFS e três cedido pelo Dr. Diogo Rezende (UEFS), cultivados em meio extrato de malte, com identificações prévias: 452; 456; 601; 359D; 379D; MB194. O quadro 1 demonstra o panorama dos resultados obtidos nos testes realizados.

Estirpe	ABSA (cana)	ABSA (licuri)	RBBR	CGA	α -naftol
359D	+	+	+	+	+
379D	+	+	+	+	+
452	+	+	+	+	+
456	+	+	+	+	+
MB194	+	+	+	+	+
601	+	+	+	+	+
<i>M. perniciosa</i>	x	x	-	+	+

Quadro 1. Testes realizados com as estirpes trabalhadas. + resultado positivo; - resultado negativo; x teste não realizado.

Como demonstrado, todas as estirpes testadas conseguiram crescer nos meios indutores com os resíduos testados, com as estirpes 601, 379D e MB194 com crescimentos mais vigorosos no meio indutor com bagaço de cana de açúcar, resultados que corroboram com o de Santos (2017) e Stroparo *et al.* (2012) os quais obtiveram

crescimento fúngico em residuo de bagaço de bráctea de licuri e no bagaço de cana, respectivamente, e produção de enzimas.

O resultado quanto a descoloração do RBBR corrobora com o demonstrado por Silva *et al.* (2005) onde todas as estirpes de *Ganoderma* submetidas ao teste com RBBR também apresentaram resultado positivo. Assim como no trabalho de Okino *et al.* (2000), onde com exceção de uma estirpe de *Ganoderma* não descoloriu o RBBR, onde os autores explicam que o fato pode ter ocorrido devido a ausência da expressão do sistema lignocelulolítico por completo.

M. pernicioso também demonstrou resultado positivo no teste do guaiacol, o que vem sendo demonstrado pelos trabalhos de Liu *et al.* (2015) e Mondego *et al.* (2008) que esse fungo demonstra lacases em sua expressão. Todavia, quanto ao RBBR, o *M. pernicioso* demonstrou resultado negativo. Kumar *et al.* 2017, demonstrou em seu trabalho que diferentes isoenzimas apresentam distintas afinidades com os substratos. Assim, as enzimas secretadas por *M. pernicioso* no presente trabalho podem não possuir afinidade ao RBBR.

Com base nos resultados positivos obtidos por meio do teste em placas com guaiacol, assim como também pode ser observado nos trabalhos de Okino *et al.* (2000) e Zhou *et al.* (2018), supõe-se que os indivíduos trabalhados possuem um sistema ligninolítico e demonstraram eficiência na quebra do reagente. Visto que o guaiacol serve de substrato tanto para lacase (Ferdeş, *et al.*, 2018) quanto para a lignina peroxidase (Falade *et al.*, 2017)

Alfa-naftol é um metabólito tóxico hidroxilado de um hidrocarboneto policíclico aromático (PAH) naftaleno, que é catalizado por lacase (Aktaş *et al.*, 2001) justificando assim os resultados encontrados com a mudança da coloração do substrato onde houve o contato da gota da solução alcoólica de α -naftol. Os resultados obtidos no presente trabalho, são corroborados pelos de Okino e colaboradores (2001), onde todos os *Ganoderma* testados apresentaram também resultado positivo.

A região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) é altamente conservada interespecificamente mas variável entre as diferentes espécies (Gomes *et al.*, 2002) e, devido a sua variabilidade, são utilizados na identificação sistemática de espécies dentro de um gênero (Xuanwei *et al.*, 2008). As estirpes utilizadas apresentadas demonstraram amplificação da região ITS utilizando os primers 6 e 8, embora a obtenção da identificação a nível de espécie não foi possível por meio do sequenciamento, provavelmente, devido a baixa concentração do produto da pcr utilizado na reação. No entanto, apesar da não obtenção do sequenciamento a nível de espécie, os resultados obtidos confirmam com o gênero *Ganoderma* das estirpes depositadas na CCMB-UEFS utilizadas no presente trabalho.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos testes de degradação de corantes realizados com os fungos, é possível concluir que os mesmos possuem enzimas capazes de degradar esses reagentes. Através do teste do α -naftol é presumível afirmar que todos os *Ganoderma* testados, assim como *M. pernicioso*, secretam lacase, resultados esses que são corroborados com base em testes prévios disponíveis na literatura para o gênero.

Notou-se também que as linhagens de *Ganoderma* testadas foram capazes de utilizar os resíduos de cana e de licuri, tornando-os atrativos para estudos posteriores afim de aumentar o arcabouço a respeito de seu sistema ligninolítico e então, otimizá-los como ferramentas biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

AKTAŞ, N. *et al.* Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphthol. *Bioresource Technology*, v. 80, n. 1, p. 29-36, 2001.

D'SOUZA, Trevor M.; MERRITT, Carlos S.; REDDY, C. Adinarayana. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. Appl. Environ. Microbiol., v. 65, n. 12, p. 5307-5313, 1999.

FALADE, A. O. *et al.* Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. MicrobiologyOpen, v. 6, n. 1, p. e00394, 2017.

FERDEŞ, M. *et al.* Laccase enzyme production and biomass growth in liquid cultures of wood-degrading fungal strains. In: 46th International Conference "Actual Tasks on Agricultural Engineering. 2018. p. 341-388.

FERREIRA-D'SILVA A, (2014) Diversidade e Bioprospecção de Fungos Endofíticos Associados a Cactos Presentes em Ecossistemas do Brasil e Estados Unidos. Belo Horizonte, Brasil, 207 p. Tese.

GOMES, E. A. *et al.* Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. Genetics and Molecular Biology, v. 25, n. 4, p. 477-483, 2002.

KUMAR, A. *et al.* Gel-Based Purification and Biochemical Study of Laccase Isozymes from *Ganoderma sp.* and Its Role in Enhanced Cotton Callogenesis. Frontiers in microbiology, v. 8, p. 674, 2017.

LIU, H. *et al.* Expression and characterization of LacMP, a novel fungal laccase of *Moniliophthora perniciosa* FA553. Biotechnology letters, v. 37, n. 9, p. 1829-1835, 2015.

LU-CHAU, T. A. *et al.* Application of Fungal Pretreatment in the Production of Ethanol From Crop Residues. In: Bioethanol Production from Food Crops. Academic Press, 2019. p. 267-292.

MOHAPATRA, D., RATH, S. K., MOHAPATRA, P. K.; Bioremediation of Insecticides by White-Rot Fungi and Its Environmental Relevance. In: Mycoremediation and Environmental Sustainability. Springer, Cham, 2018. p. 181-212.

MONDEGO, J. M.C. *et al.* A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. BMC genomics, v. 9, n. 1, p. 548, 2008.

OKINO, L. K. *et al.* Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 16, n. 8-9, p. 889-893, 2000.

SANTOS, J. S. Otimização da produção das enzimas lacase e manganês peroxidase por *Pleurotus sajor-caju* em resíduo de *Syagrus coronata*. Anais Seminário de Iniciação Científica, n. 21, 2017.

SILVA, C. M M. S.; MELO, I. S.; OLIVEIRA, P. R. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma spp.* Enzyme and Microbial Technology, v. 37, n. 3, p. 324-329, 2005.

STROPARO, E. C. *et al.* Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. Semina: Ciências Agrárias, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 2012.

XUANWEI, Z. *et al.* Identification of medicinal *Ganoderma* species based on PCR with specific primers and PCR-RFLP. Planta medica, v. 74, n. 02, p. 197-200, 2008.

ZHOU, S. *et al.* Investigation of lignocellulolytic enzymes during different growth phases of *Ganoderma lucidum* strain G0119 using genomic, transcriptomic and secretomic analyses. PloS one, v. 13, n. 5, p. e0198404, 2018.

ZHOU, X.W. *et al.* Ligninolytic enzymes from *Ganoderma spp.*: current status and potential applications. Critical reviews in microbiology, v. 39, n. 4, p. 416-426, 2013.