

13º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2022

BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTO BIOATIVO

BIANCA A. J. A. BARROS¹, VANIA B. WIENDL², SUELENE F. S. B. SANTOS³

¹ Graduanda em Licenciatura em Química, Bolsista PIBIFSP, IFSP, Câmpus São José dos Campos, alice.b@aluno.ifsp.edu.br

² Engenheira de Alimentos - Professora Dra, IFSP, Câmpus São José dos Campos, vbattestin@ifsp.edu.br.

³ Técnica em Química, IFSP - Campus São José dos Campos, suelene@ufrj.br.

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.08.02.00-5 Bioquímica dos Microorganismos

RESUMO: A produção de compostos bioativos através de processos fermentativos, em rotas sustentáveis, ganhou destaque no cenário mundial da última década. Para tal, é de grande interesse o isolamento e a classificação de microrganismos capazes de produzir biomoléculas de interesse. Estes, por sua vez, podem ser facilmente encontrados em ambientes comuns, como o solo. O uso de microrganismos, através de isolamento e seleção de linhagens, é uma ferramenta cada vez mais utilizada para a produção de metabólitos importantes, nos quais pode-se incluir compostos bioativos importantíssimos como as enzimas, dentre as quais destaca-se a enzima tanase. Essa é uma enzima com amplo espectro de uso comercial, sendo aplicável em indústrias de alimentos, bebidas, farmacêutica, de alimentação animal e na produção de antioxidantes. O trabalho teve como objetivo isolar e selecionar linhagens fúngicas de diferentes fontes de solo e verificar o potencial de cada linhagem na produção da enzima tanase, criando um banco de culturas de microrganismos de interesse para o meio acadêmico local. Como resultados, obtiveram-se com sucesso o crescimento e isolamento de quatro espécies fúngicas.

PALAVRAS-CHAVE: isolamento; enzimas; tanase; fermentação; fungos.

BIOPROSPECTING OF MICROORGANISMS FOR PRODUCTION OF BIOACTIVE COMPOUND

ABSTRACT: The production of bioactive compounds through fermentative processes, in sustainable routes, gained prominence in the global scenario of the last decade. For such, it is of great interest the isolation and classification of microorganisms capable of producing interesting biomolecules. Such microorganisms can be easily found in common environments, such as soil. The use of microorganisms, through isolation and selection of lineages, is a tool increasingly used in the production of important metabolites, in which are included bioactive compounds of great importance, such as enzymes, among which stands out the enzyme named tannase. It is an enzyme with great specter of commercial use, being useful in food and drink industry, pharmaceutical industry, animal nutrition and in the production of antioxidants. This project's main goal is to isolate and select fungi lineages of different types of soil and verify the potential of each lineage for producing the enzyme tanase, creating a microorganism culture bank of interest to the local academic environment. As a result, the successful growth and isolation of four fungi species was achieved.

KEYWORDS: isolation; enzymes; tanase; fermentation; fungi.

INTRODUÇÃO

Compreende-se por fungos o grupo de microrganismos que apresenta parede celular, mas sofrem com a ausência do pigmento fotossintético clorofila, precisando, portanto, absorver seus nutrientes. Podem ser multicelulares ou unicelulares, e são um grupo dividido em dois tipos gerais: as leveduras e os bolores. Alguns podem ainda ser macroscópicos, como no caso dos cogumelos (PELCZAR Jr., CHAN, KRIEG, 1997). Embora sejam vistos majoritariamente como malfeitores, os fungos desempenham papel essencial na produção de diversas substâncias essenciais na garantia do bem estar da sociedade. Desta forma, a bioprospecção destes microrganismos, isto é, o cultivo seletivo em laboratório de fungos que realizem funções de interesse, é uma prática cada vez mais desejável, tendo em vista que a utilização dos microrganismos como fonte de biomoléculas e outros bioprodutos vêm se tornando cada vez mais comum nas últimas décadas (PELCZAR Jr., CHAN, KRIEG, 1997).

Através do processo de fermentação sólida, realizado por espécies fúngicas, é possível extrair as partes economicamente interessantes da biomassa e convertê-los em produtos que facilitam diversos processos industriais de grande relevância; um exemplo desses produtos são as enzimas, que representam, na maioria dos casos, a melhor alternativa nos processos de catálise, tendo em vista que sua atividade é superior à dos catalizadores não-biológicos. Estas, por sua vez, podem ser obtidas através da mencionada fermentação sólida e purificadas através de variados processos de purificação de proteínas. Diante disso, o projeto de pesquisa apresentado visa a bioprospecção de novas espécies fúngicas para a produção da enzima tanase através de fermentação em estado sólido.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e meios de cultura:

Ácido Tânico, SDS-trietanolamina, solução de sais (CaCl, KH₂PO₄, MnSO₄, (NH₄)SO₄, MgSO₄, KCl, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂), tampão acetato, PDA (Ágar de batata dextrosado), farelo de trigo, BSA (albumina de soro bovino).

Equipamentos:

Espectrofotômetro (Metash-Tecnal); banhos termostáticos (Tecnal); centrífuga (Kasvi k14-4000); estufa de cultura (Tecnal TE-392-1); incubador Shaker (K-330-Pro); balança analítica (Mettler Toledo Me 104); pHmetro (Metler Toledo).

Visando a cultura de diferentes espécies de fungos, coletaram-se amostras de aproximadamente 8 g do solo de proximidade das raízes de cinco tipos de árvores frutíferas: um pé de limão, um pé de jabuticaba, um pé de amora, um pé de goiaba e um pé de seriguela. As amostras foram coletadas utilizando-se de espátula, e armazenadas em plástico filme PVC.

Para inoculação dos microrganismos utilizou-se de meio de ágar de batata dextrosado, preparado na proporção de 8g de meio para 100 mL de água destilada. Para o preparo, após adicionar o meio em pó à água, levou-se a mistura à chapa de aquecimento a 100°C, sob agitação magnética branda, até que a solução levantasse fervura.

Uma vez fervente, a solução do meio foi distribuída em tubos de ensaio; estes, por sua vez, foram devidamente tampados com tampão de algodão e papel alumínio, e levados à autoclave para esterilização sob temperatura de 121°C e pressão equivalente a 120 atm. Os tubos esterilizados foram inclinados sobre suporte e resfriados por aproximadamente 24 horas. Após esse período, os meios prontos foram armazenados em resfriamento até o momento da inoculação.

Para inoculação dos microrganismos potencialmente presentes nas amostras de solo coletadas, pesou-se em béqueres 8g de cada amostra, adicionando-se a cada um 20 mL de água destilada. As soluções foram submetidas a agitação magnética branda, visando a completa dissolução da parte sólida, pelo período de dez minutos.

Após, retirou-se da geladeira os tubos de ensaio contendo o meio de crescimento preparado com antecedência. Utilizando-se de alça de inoculação de platina, devidamente esterilizada em bico de bunsen, realizou-se o esfregaço da parte aquosa do solo dissolvido nos meios de crescimento. Tal processo foi repetido para cada uma das 4 amostras, identificando corretamente em qual tubo cada amostra foi utilizada. Em seguida, os tubos de ensaio foram levados à estufa, à temperatura de 32°C, e

mantidos sob tal aquecimento durante 48 horas, visando fornecer condições ideais para o crescimento dos microrganismos.

Visando a separação de cada espécie de microrganismo obtida através da inoculação descrita, os microrganismos foram repicados múltiplas vezes, visando crescimento sem a presença de outras espécies. O repique foi realizado utilizando-se de alça de inoculação de platina, esterilizada em bico de Bunsen, e empregada na realização da transferência dos esporos dos fungos obtidos na etapa anterior para um novo meio de cultura. O repique foi repetido até obter-se um grau de isolamento satisfatório.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O preparo do meio de inoculação composto por ágar de batata dextrosado e a diluição das amostras de solo ocorreram conforme o processo descrito em materiais e métodos. Foram realizadas tentativas de obtenção de microrganismos a partir do solo da raiz de cinco árvores frutíferas; cada amostra de solo apresentou diferentes resultados, sendo três deles promissores diante do objetivo de isolar uma espécie fúngica capaz de produzir a enzima tanase.

As amostras de solo coletadas dos pés de seriguela, limão e jabuticaba apresentaram nas inoculações iniciais a predominância de fungos filamentosos semelhantes a bolores, de aparência esbranquiçada e aveludada. Houveram aparições pontuais de fungos de coloração escura. É importante ainda ressaltar que, no caso do pé de limão, houve crescimento de fungos em somente um dos tubos; o conteúdo do tubo não promissor foi devidamente descartado. Quanto as amostras de solo do pé de amora, ocorreu em maior incidência o crescimento de fungos filamentosos de coloração escura. A amostra do pé de goiaba contou com a presença de fungos de aparência aveludada e branca, bem como fungos semelhantes a líquens.

Para isolar as espécies fúngicas obtidas através da inoculação dos esporos gerais presentes nas amostras de solo coletadas, foi realizada a repicagem dos fungos que cresceram após a inoculação. Embora tenham crescido em quantidade satisfatória na etapa de inoculação, os fungos derivados do solo retirado da raiz do pé de seriguela não cresceram significativamente após o repique; esta amostra e seus repiques foram, portanto, descartados. Quanto as demais amostras, os resultados foram promissores e satisfatórios. Os fungos filamentosos derivados da amostra de solo do pé de jabuticaba cresceram em boa quantidade após a repicagem, mostrando-se ainda mais volumosos do que na inoculação inicial, conforme ilustra a Figura 1, na qual observa-se a progressão do crescimento: os dois primeiros tubos correspondem à inoculação inicial, e os dois últimos ao crescimento derivado do repique.



FIGURA 1. Progressão de crescimento de fungos derivados de amostra de solo de pé de jabuticaba.

Ocorreu novamente o crescimento predominante de fungos de aspecto aveludado e esbranquiçado. Refez-se o repique desta amostra a partir de tal crescimento, e a existência dos dois tipos de fungos fez-se novamente presente, conforme elucidada a Figura 2.



FIGURA 2. Crescimento de fungos a partir da repicagem.

Observa-se que um dos tubos de repique anterior ao representado pela figura 2 apresentou maior pureza da espécie branca de fungos do que seu sucessor.

No que diz respeito a amostra do solo do pé de limão, através do tubo único obtido na inoculação, obteve-se através do repique o crescimento de dois tipos de fungos: em um dos tubos repicados o foco foi para a espécie de aparência esbranquiçada e aveludada, ao passo de que no outro houve a tentativa de isolar os esporos da espécie mais escura que apareceram pontualmente no tubo inicial. O crescimento de ambas as espécies foi satisfatório; a espécie branca encontra-se quase pura à olho nu, enquanto a espécie escura ainda possui contaminação da espécie branca. Tais resultados são elucidados na Figura 3, onde o primeiro tubo corresponde à matriz decorrente da inoculação, o segundo tubo ao repique focado na espécie esbranquiçada e o terceiro tubo ao repique focado na espécie escura.



FIGURA 3. Progressão de crescimento de fungos derivados de amostra de solo de pé de limão.

Ambos os repiques seguiram para novo processo de repicagem, através do qual foi possível obter um tubo de fungos brancos ainda mais puros. O tubo focado no crescimento da espécie escura não teve crescimento significativo de fungos, e foi, portanto, descartado.

Quanto à amostra inoculada derivada do pé de amora, os resultados são ainda mais promissores, com crescimento volumoso de fungos. Na primeira repicagem, focou-se a inoculação de um tubo com os esporos da espécie escura, predominante nas matrizes. O repique foi realizado em duplicata; em um dos tubos, houve predominância da espécie esbranquiçada que aparecia pontualmente nos tubos

decorrentes da primeira inoculação, e este tubo foi descartado. Já no outro, a predominância da espécie escura manteve-se, apesar de a contaminação pela espécie branca ainda estar presente.

Foi realizada ainda uma segunda repicagem, focada na purificação da espécie mais escura. Infelizmente, ainda houve a presença da espécie branca após o crescimento. Houve ainda uma tentativa de isolar a espécie esbranquiçada contaminante, e nesta obteve-se mais sucesso, com o crescimento quase puro a olho nu. A Figura 4 ilustra a progressão do crescimento dos fungos em questão, sendo os dois primeiros tubos as matrizes decorrentes da primeira inoculação, o terceiro tubo o resultado do primeiro repique, o quarto tubo a repicagem focada no isolamento da espécie branca e o quinto a repicagem focada em purificar a espécie escura.



FIGURA 4. Progressão de crescimento de fungos derivados de amostra de solo de pé de amora.

CONCLUSÕES

O isolamento e a purificação de linhagens fúngicas é um trabalho relativamente simples, porém deve ser realizado de maneira minuciosa e cuidadosa; é perceptível que um trabalho atento às possibilidades de contaminação e aos cuidados necessários para o isolamento de uma linhagem fúngica obtém resultados mais rápidos com relação à obtenção de uma linhagem pura. Neste trabalho, obtiveram-se quatro espécies fúngicas, que serão futuramente induzidas à produção da enzima tanase, e seus potenciais de produção da enzima serão analisados.

AGRADECIMENTOS

Ao IFSP, pela concessão da bolsa PIBIFSP.

REFERÊNCIAS

PELCZAR Jr. M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N. R. **MICROBIOLOGIA: Conceitos e Aplicações**. Vol. 1, 2ª Ed. São Paulo: Editora Pearson Makron Books – 1997.