

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Bioprodutos de *Cladosporium cladosporioides*: hidrolases e captação de melanina

Andrade, R. C. S.¹, Reis Mansur M. C. P. P.², Cardoso, V. S.², Mazotto, A. M.², Sousa, E. P.², Macrae, A.², Vermelho, A. B.²

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro – Faculdade de Farmácia

²Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - BIOINOVAR –
Avenida Carlos Chagas Filho 373
CEP 21941902 Rio de Janeiro – RJ - E-mail: roberta.carvalho91@hotmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise qualitativa de hidrolases (amilases, peptidases, lipases, celulases) e enzimas degradadoras de melanina do fungo Cladosporium cladosporioides para produção de bioprodutos com potencial aplicação industrial. Em adição isolamos o pigmento de melanina do fungo Aspergillus niger como padrão.

Como resultado verificamos que o Cladosporium cladosporioides produziu celulases, lipases, amilases e uma pequena quantidade de queratinase e caseinase.

O fungo foi capaz de degradar a melanina incorporada no meio de cultura, por absorção da mesma em seu corpo celular, e ação de enzimas líticas que ainda estão sendo estudadas e caracterizadas.

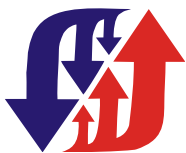
Palavras-chave: *Cladosporium cladosporioides*, Hidrolases, Melanina.

INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas responsáveis pela aceleração das reações químicas que mantêm e regulam os organismos vivos. Ocorrem na natureza e podem ser de origem vegetal, animal e microbiana. Devido à facilidade do cultivo e manipulação genética dos microrganismos, as enzimas microbianas são muito usadas. Em adição, os biocatalisadores microbianos apresentam grande variedade de atividade catalítica, produção independente de flutuações sazonais, rápido crescimento em meio de cultura (Rao *et al.*, 1998; Hasan *et al.*, 1996, Coelho & Nascimento, 2008). Os fungos filamentosos compõem o grupo de microrganismos com maior número de espécies e apresentam imensa variedade em relação à morfologia e propriedades fisiológicas e bioquímicas (Fernandes, 2009).

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo - Para esse estudo foi utilizada a estirpe do fungo *Cladosporium cladosporioides* que foi isolada dos manguezais de Jequiá, Duque de Caxias e Guapimirim no Estado do Rio de Janeiro, e a estirpe do fungo *Aspergillus niger* para a obtenção de melanina. Essas estirpes fazem parte da coleção de cultura do Laboratório de Biotecnologia Sustentável e Bioinformática Microbiana (LBSBM) isoladas e identificadas por Ghizelini (2013).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Pigmento Melanina – O pigmento melanina foi produzido pelo fungo *Aspergillus niger* e sua extração foi realizada de acordo com o método descrito por Sava *et al.* 2001, com modificações. Inicialmente foi realizada a precipitação do pigmento a partir do meio de cultura com ácido clorídrico 7 M. Esse precipitado foi centrifugado a 4000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com água destilada estéril e posteriormente liofilizado. A melanina sintética (Sigma) foi utilizada como referência.

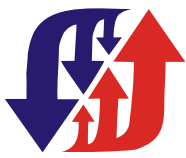
Manutenção das estirpes - Estes fungos foram mantidos em tubos contendo Meio Ágar Batata Dextrose inclinado (BDA g/l: 200 g de batata, 20 g de dextrose, 15 g de ágar), que após \pm 5 dias de incubação a 28°C foram conservados a 4°C (Ghizelini, 2013). Concomitantemente, a partir das placas de Petri contendo BDA foram retirados plugs de 5 mm de diâmetro com crescimento fúngico das culturas puras e transferidos para tubos contendo 4 mL de água destilada estéril, fechados e estocados à temperatura ambiente (Castellani, 1939).

Capacidade de descoloração da melanina pelos fungos - O potencial de descoloração da melanina pelo *Cladosporium cladosporioides* foi avaliado através do cultivo deste fungo em meio contendo melanina. Primeiramente, os fungos foram ativados em placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose por \pm 7 dias a 28°C. Após seu crescimento, os plugs de 5 mm de diâmetro foram retirados, assepticamente das bordas das colônias e, posteriormente, transferidos para erlenmeyers de 100 ml contendo 50 ml de extrato de malte 2% e melanina de *Aspergillus niger* na concentração final de 100 mg/l. Os erlenmeyers foram mantidos a 28°C a 140 rpm. Os meios não inoculados foram utilizados como controle abiótico da descoloração e mantidos nas mesmas condições dos meios inoculados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Hidrolases - A presença de hidrolases extracelulares foi avaliada a partir de métodos para detecção de atividade enzimática através de halo de hidrólise em placa de meio sólido com substratos específicos incorporados para detecção de cada tipo de enzima: gelatina 1%, caseína 1% e queratina de pena de frango 2% para peptidases, amido 0,2% para amilases, tributirina 1% para lipases e carboximetilcelulose 0,2% para celulasas (Vermelho *et al.* 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados preliminares relativos à absorção de melanina no meio pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* estão nas figuras 1 e 2. Na figura 2, vemos que no segundo dia a melanina desaparece do meio e se concentra no fungo, indicando que houve processo de clareamento durante a incubação.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

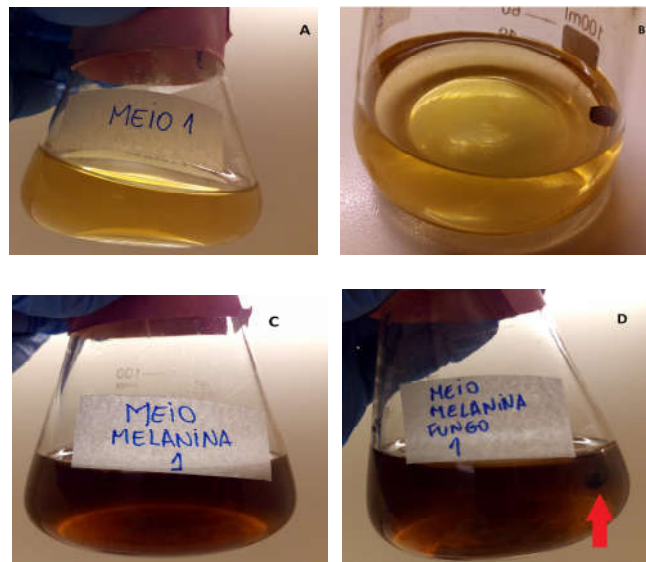
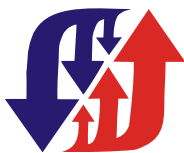


Figura 1. Teste de clareamento da melanina com 24 horas de cultivo. (A) Controle do meio de malte; (B) Meio de malte com plug contendo cultura de *Cladosporium cladosporioides*; (C) Controle do meio de malte com melanina; (D) Meio de malte com melanina contendo o plug.



Figura 2. Teste de absorção da melanina após 48 horas. (A) Controle do meio de malte; (B) Meio de malte com plug contendo cultura de *Cladosporium cladosporioides*; (C) Controle do meio de malte com melanina; (D) Meio de malte com melanina contendo o plug.

Na tabela 1 e na figura 3 encontram-se os resultados dos testes para as enzimas: amilase, celulase, gelatinase, caseinase, queratinase, lipase.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Tabela 1. Produção de enzimas em meio ágar com diferentes substratos incorporados. Os resultados foram expressos em (+) halos de hidrólise maior do que 1 cm, (-) halo de hidrólise menor do que 0,5 cm, (+/-) halos de hidrólise maior do que 0,5 e menor do que 1 cm.

ENZIMAS	RESULTADO
Lipase	(+/-)
Queratinase	(+/-)
Celulase	(-)
Amilase	(+)
Caseinase	(+)

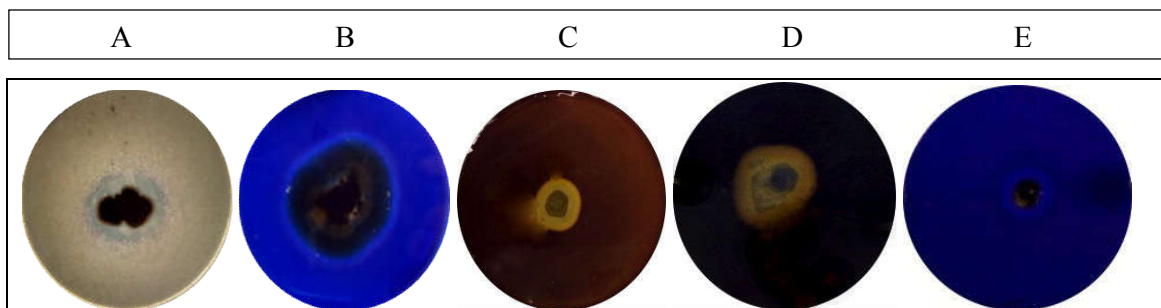


Figura 3. Halos inibitórios formados em meios com diferentes substratos incorporados. (A) Tributirina; (B) Queratinase; (C) Celulase; (D) Amilase; (E) Caseinase.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que as enzimas extracelulares como lipases, amilases e proteases foram produzidas pelo fungo *Cladosporium cladosporioides*. O fungo foi capaz de degradar a melanina do meio de cultura no segundo dia. Em virtude dos resultados preliminares obtidos estão sendo realizadas investigações qualitativas e quantitativas.

Suporte: MCT-CNPq, FAPERJ, CEPG, CAPES

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Castellani, A. **Viability of some pathogenic fungi in distilled water**. J. Trop. Med. Hyg., v. 42, p. 225-226, 1939.
- Fernandes, A.P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- Ghizelini, A.M. **Diversidade e Potencial Biotecnológico de Fungos Isolados de Sedimentos de Manguezais do Estado do Rio de Janeiro, Brasil**. 2013. 164 f. Tese de doutorado (Doutorado em Ciências – Biotecnologia Vegetal) – Programa de Pósgraduação em Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2013.
- Rao, M.B.; Tanksale, A.M.; Ghatge, M.S.; Deshpande, V.V. **Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases**. **Microbiology and molecular**. Biology Reviews, 98: 1092-2198, 1998.
- Vermelho, A.B.; Meirelles, M.N.; Lopes, A. *et al.* **Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.91, n.6, p.755-760, 1996.
- Sava, V.M.; Yang, S.; Hong, M.; Yang, P.; Huang, G G.S. **Isolation and characterization of melanic pigments derived from tea and tea polyphenols**. Food Chem 73: 177-184, 2001.