

ECOLOGIA DOS FUNGOS

Editores

Isabel M. Santos
Armando Venâncio
Nelson Lima



mum

Micoteca da Universidade do Minho



Esta publicação reúne as conferências e as comunicações apresentadas no encontro *Um dia sobre... A Ecologia dos Fungos* realizado a 13 de Dezembro de 2002 na Universidade do Minho, Braga, Portugal.

O texto integral que aqui se apresenta é da responsabilidade dos respectivos autores e não reflecte necessariamente a posição ou opinião da Micoteca da Universidade do Minho.

A Micoteca da Universidade do Minho agradece o apoio dado à edição desta obra à seguinte entidade:

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E DO ENSINO SUPERIOR

Portugal

Apoio do programa Operacional Ciência, Tecnologia,
Inovação do Quadro Comunitário de Apoio III

Ficha Técnica

Ecologia dos Fungos

Editores: Isabel M. Santos
Armando Venâncio
Nelson Lima

Edição: Micoteca da Universidade do Minho

Capa: Zapruder, Composição Gráfica e Design, Lda. - Porto

Execução Gráfica: Barbosa & Xavier, Lda., Artes Gráficas - Braga

Tiragem: 300 exemplares
Braga, Dezembro 2002

Depósito Legal: 188789/02

ISBN: 972-97916-1-9

Distribuição: Livraria Minho – Ferreira & Salgado, Lda
Largo da Senhora-a-Branca, 66
4710-443 Braga

Implementação de técnicas para avaliação do potencial degradativo de compostos naturais por fungos

Luís Valente, Isabel M. Santos, Nelson Lima

Micoteca da Universidade do Minho, Centro de Engenharia Biológica, Campus de Gualtar,
4710-057 Braga, Portugal.

e-mail: nelson@iec.uminho.pt

Introdução

A matéria orgânica que continuamente se forma na Terra não se acumula de forma progressiva, mas mantém-se mais ou menos constante através de um processo de equilíbrio entre acumulação e degradação. Sendo as formas mais comuns de carbono orgânico presente nos seres vivos as proteínas, os lípidos, os ácidos nucleicos (RNA e DNA), o amido, a celulose, as pectinas, a quitina e a lenhina, são estes os compostos mais importantes passíveis de serem degradados e/ou transformados pelos fungos filamentosos. Assim, o carbono ou é libertado para a atmosfera pelo catabolismo ou é incorporado nos seres vivos através do anabolismo. Os fungos, reconhecidos como biodegradadores, possuem um papel fundamental no desenrolar do ciclo do carbono. Por outras palavras, uma melhor compreensão dos mecanismos de degradação enzimática dos fungos, bem como da sua ecologia, pode permitir a possibilidade do seu uso em diferentes áreas da biotecnologia ambiental.

São conhecidas inúmeras técnicas que pretendem avaliar actividades enzimáticas. No entanto, devido a vários factores, nem todas essas técnicas descritas se adaptam às características das estirpes ou aos objectivos dos estudos de caracterização enzimática.

O presente trabalho tem como objectivo a implementação de técnicas para rastreio enzimático para diferentes estirpes de fungos pertencentes à Micoteca da Universidade do Minho (MUM). Para o efeito foram utilizados métodos que se baseiam fundamentalmente em alterações de cor ou transparência, de acordo com os substratos usados nos meios de cultura.

As estirpes

As estirpes utilizadas para este estudo foram fornecidas pela Micoteca da Universidade do Minho (MUM).

<i>Aspergillus niger</i> Tiegh. nom. cons	MUM 02.48
<i>Geotrichum candidum</i> Link: Fr.	MUM 94.02
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	MUM 97.32
<i>Penicillium crustosum</i> Thom	MUM 02.30
<i>Penicillium expansum</i> Link	MUM 02.03
<i>Penicillium roqueforti</i> Thom	MUM 99.25
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> Burdsall	MUM 95.01
<i>Trichoderma viride</i> Pers.: Fr.	MUM 97.54

Rejuvenescimento e crescimento de fungos

As estirpes utilizadas foram rejuvenescidas e crescidas em meio agarizado Czapek Dox – CD (OXOID), excepto *Mucor hiemalis* e *Phanerochaete chrysosporium* que foram rejuvenescidas, respectivamente, em meio de malte a meia concentração – MEA (extracto de malte 10 g/l, peptona 1 g/l, glucose 20 g/l, agar 20 g/l) e em meio de agar com água da torneira – TWA (20 g/l agar). Para garantir que a idade dos inóculos fosse idêntica nos diferentes testes, utilizaram-se os fungos com 5 a 7 dias de crescimento.

Ensaio enzimáticos

Em todos os meios utilizados no decorrer dos ensaios que se descrevem de seguida, foram inoculadas as oito estirpes. Os meios não inoculados serviram como branco.

Proteases

As proteínas, moléculas essenciais a todos os organismos vivos, desempenham inúmeras funções, sendo elas enzimáticas, de transporte, de armazenamento, estruturais, de defesa, etc. A sua unidade básica é o aminoácido, e estes encontram-se ligados entre si por ligações peptídicas.

As proteases são um grupo extenso de enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas libertando das proteínas péptidos ou aminoácidos. Podem ser consideradas como exopeptidases ou endopeptidases consoante actuam, respectivamente, apenas na extremidade da cadeia de aminoácidos ou aleatoriamente no interior

desta (Fig. 1), e é de ter em conta a sua elevada especificidade, quer em relação ao pH, quer em relação aos locais de ataque.

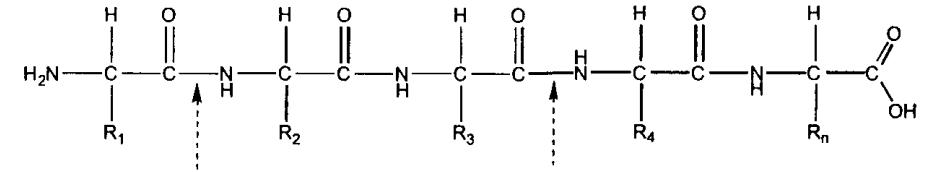


Figura 1. Esquema representativo da acção de endopeptidases (seta da direita) e exopeptidases (seta da esquerda) em proteínas.

Para detectar a degradação enzimática de proteases foi usado um meio que possui leite desnatado (*skim milk*) na sua constituição. Assim, foi adicionado 0,25 g de KH₂PO₄, 0,125 g de KCl, 0,05 g de MgSO₄·7H₂O, 0,025 g de CaCl₂, 6,25 ml de leite desnatado a 22,5%, 2,5 g de glucose e 250 ml de água destilada. O pH foi acertado a 5,4, adicionaram-se 3 g de agar para o meio, depois de cozido, ser esterilizado a 110 °C durante 20 min. O meio foi plaqueado em caixas de Petri que foram posteriormente inoculadas com os fungos e colocadas na estufa a 30 °C durante 6 dias. Quando um fungo degrada as proteínas altera a opacidade do meio tornando-o transparente.

Após incubação, observou-se em *Penicillium expansum* e *Trichoderma viride* a formação de halos concêntricos em redor das colónias, mais transparentes que o resto do meio, halos que indicam a actuação de proteases extracelulares. Nas restantes placas a cor do meio manteve-se homogénea e semelhante à placa de ensaio em branco.

Lipases

Os lípidos são um grupo que compreende uma grande diversidade de compostos químicos e caracterizam-se por possuírem uma elevada solubilidade em solventes orgânicos, por serem uma das principais formas de reserva de energia dos organismos, e por desempenharem um papel essencial na organização das membranas celulares.

Os triacilgliceróis são os lípidos mais simples (Fig. 2), são também denominados por gorduras neutras, e são constituídos por três ácidos gordos, cada um ligado através duma ligação éster a um glicerol.

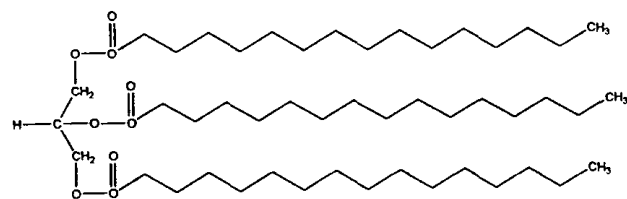


Figura 2. Esquema representativo da estrutura química de um triacilglicerol.

As lipases encontram-se distribuídas por todos os grupos de organismos vivos e podem ser definidas como glicerol éster hidrolases, catalisando a hidrólise de ligações éster em mono, di e triacilgliceróis, e pertencem ao grupo, mais abrangente, das esterases.

Actualmente, para serem definidos como lípidos, os compostos têm que possuir ácidos gordos com cadeias de dez ou mais carbonos. No entanto, em muitos ensaios que visam testar a actividade lipolítica usam-se compostos com cadeias de ácidos gordos muito mais curtas, como é o caso da tributirina.

A análise da actividade das lipases foi realizada de acordo com Lima *et al.* (1991) usando meio mineral base de Czapek (Smith & Onions, 1983) com tributirina a 0,1% (p/v). O meio de cultura foi emulsionado usando um homogeneizador mantendo a temperatura nos 60 °C. Foram transferidos 7 ml de meio para cada tubo e arrefeceu-se rapidamente em gelo, na posição vertical. Os tubos foram inoculados e colocados na estufa a 30 °C, durante 5 dias.

O princípio deste teste baseia-se no facto da tributirina ser insolúvel tornando o meio opaco. Quando é hidrolisada torna-se solúvel produzindo-se assim um clareamento no meio. A observação de um clareamento progressivo ao longo do tempo significa que a estirpe inoculada possui lipases extracelulares. Existe alguma controvérsia acerca da utilidade deste teste, uma vez que se pode considerar que as enzimas que actuam na tributirina são esterases, e não lipases. No entanto, este método foi usado devido à facilidade em estudar a actividade lipolítica quando comparado com substratos de cadeias mais longas. Dada a subjectividade que a definição de lipases encerra, consideram-se assim válidos os resultados obtidos neste teste principalmente se os considerarmos como presuntivos.

Após os 5 dias de incubação dos fungos, foi possível observar em quase todos os tubos um clareamento do meio. Observou-se que os tubos onde se havia dado maior clareamento foram, por ordem crescente, os que continham as estirpes:

Geotrichum candidum, *Penicillium roqueforti*, *Mucor hiemalis*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* e *Penicillium crustosum*. No tubo branco não se verificou qualquer clareamento do meio, em relação às condições iniciais, o que também ocorreu no tubo com a estirpe de *Phanerochaete chrysosporium*. Paralelamente aos ensaios com fungos foram realizados ensaios em que se inoculou 100 µl de lipase tipo VII de *Candida rugosa* (Sigma) com 10, 20, 50 e 100 µg. Mediu-se a profundidade de clareamento em mm de 24 em 24 horas até aos 5 dias de ensaio. Estes resultados foram correlacionados com as actividades determinadas quer por um método colorimétrico utilizando *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB) como substrato lipolítico, quer através do método clássico de titulação dos ácidos gordos libertados durante a hidrólise da tributirina a um pH constante de 7,2. Os valores de correlação obtidos foram respectivamente, 0,9621 e 0,9335. Estes resultados demonstram que este método se correlaciona com métodos quantitativos de determinação da actividade lipolítica tornando-o robusto. Por outro lado, poder-se-á converter profundidades de clareamento (mm) em unidades (U) de actividade enzimática (µmol/h). Por exemplo, no caso da estirpe de *Penicillium crustosum*, ao fim de 5 dias, a uma profundidade de 43 mm deverá corresponder uma actividade de 583 U. Esta estirpe destacou-se em termos degradativos, podendo por isso funcionar em estudos futuros como estirpe de referência ao servir de controlo positivo na análise lipolítica, ou avaliando a importância que poderá ter na biotecnologia ambiental.

RNases

O RNA (ácido ribonucleico), pelas funções que desempenha, nomeadamente na transcrição e tradução do código genético inscrito no DNA (ácido desoxirribonucleico) em proteínas, é uma molécula essencial aos seres vivos. Os monómeros são os nucleotídeos, sendo constituídos por um açúcar (ribose), bases azotadas e ácido fosfórico. Ao contrário do DNA, as moléculas de RNA são de cadeia simples e possuem a base azotada uracilo em vez da timina. Os monómeros ligam-se uns aos outros por ligações fosfodiéster. As RNases (ribonucleases) actuam ao nível das ligações fosfodiéster, hidrolisando-as, podendo ser exorribonucleases ou endorribonucleases, conforme actuam apenas na extremidade da cadeia, libertando monómeros, ou indiferentemente no interior da cadeia, fraccionando-a.

Para análise da degradação das enzimas degradadoras de RNA foi feito o seguinte meio: adicionaram-se 0,25 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,05 g de KCl, 0,05 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 de $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de RNA, 3 g de agar e 250 ml de água destilada. O meio foi cozido no microondas e autoclavado a 121 °C durante 15 min. Depois de inoculadas as placas foram colocadas a 30 °C na estufa durante 12 dias. Passado

esse tempo, as placas foram reveladas sendo inundadas com HCl 1M, e deixando-as à temperatura ambiente durante 1 hora.

O ácido adicionado, quando actua durante relativamente pouco tempo (uma hora) vai reduzir a opacidade da zona do meio em que ocorreu degradação. No entanto, caso o ácido actue durante tempo demais todo o meio poder-se-á tornar mais transparente devido à hidrólise ácida. Assim, as estirpes com RNases extracelulares vão-se caracterizar por, após a adição de HCl durante uma hora, terem um halo transparente no local de hidrólise.

Após a revelação foi observado que, em algumas das placas, o meio ficou mais transparente. Isto surgiu nas zonas onde o fungo cresceu ou também em redor dele, mas ocorreram casos em que todo o meio teve alteração na transparência. Outros houve ainda em que não se deu qualquer alteração. Assim, verificou-se que em *Trichoderma viride* houve ligeiro aumento de transparência na zona onde o fungo se desenvolveu e também numa área circundante a esta, o que demonstra a actuação de enzimas extracelulares. Quanto a *Mucor hiemalis* verificou-se que apenas na zona onde este constituiu a sua colónia se evidenciou uma elevada transparência. Já em *Penicillium crustosum* e *Penicillium expansum* foi observada uma aparente alteração em todo o meio. Estes resultados constituem um problema de interpretação, uma vez que a transparência além de homogênea é também reduzida. Nestes casos, para confirmação, será desejável realizar novos ensaios usando diferentes tempos de incubação. Nas restantes placas não se verificou alteração na opacidade.

DNases

Nos seres vivos o DNA é a molécula que contém a informação genética. Tal como o RNA, é um ácido nucléico, sendo cada nucleotídeo constituído por um açúcar (desoxirribose), uma base azotada e um ácido fosfórico. Os monómeros ligam-se uns aos outros por ligações fosfodiéster. Ao contrário do RNA, o DNA é constituído por uma cadeia dupla e possui, além de guanina, adenina e citosina presente no RNA, a base timina. As DNases (desoxirribonucleases) actuam ao nível das ligações fosfodiéster, hidrolisando-as, podendo ser endonucleases de restrição, endonucleases ou exonucleases conforme, respectivamente, actuam num local específico no interior da cadeia, indiferentemente no interior da cadeia, ou apenas na extremidade.

Em relação à análise a estas enzimas procedeu-se do mesmo modo que para as RNases, apenas substituindo na composição do meio o RNA por DNA. Sendo baseado nos mesmos princípios que o usado no teste das RNases, a composição e revelação do meio podem por isso ser explicados da mesma forma.

Neste caso obtiveram-se dois tipos de resultados: o mais comum consistiu na manutenção da opacidade. No entanto, na placa com *Mucor hiemalis*, o meio ficou muito mais transparente na zona onde o fungo se desenvolveu. Logo, apenas *Mucor hiemalis* demonstrou capacidade de hidrolisar o DNA.

Amilases

O amido é um polissacarídeo, constituído por cadeias ramificadas de glucose, sendo uma das substâncias de reserva mais comuns na Natureza e a principal quando se fala no reino das plantas.

O amido é então constituído por amilose (17 a 25% do total da molécula de amido) e amilopectina. A amilose é um polímero linear com ligações $\alpha_{1,4}$ e a amilopectina possui um corpo com ligações $\alpha_{1,4}$ mas também oligossacarídeos ramificados com ligações $\alpha_{1,6}$ (Fig. 3). O amido cora de azul quando em contacto com o iodo.

As amilases podem classificar-se em: α -amilases, β -amilases, pululanases, glucoamilases e α -glucosidases, baseando-se esta classificação nas suas actividades específicas. As α -amilases são endoglucosidases e actuam indiscriminadamente no interior das cadeias. As β -amilases são exoglucosidases e actuam na extremidade da molécula, libertando resíduos de maltose (Rawn, 1983). As glucoamilases, sendo também exoglucosidases, actuam na extremidade das cadeias, mas libertam resíduos de glucose e não de maltose (Schellart *et al.*, 1976). Por sua vez, as α -glucosidases ou maltases hidrolisam a maltose. Finalmente, as pululanases actuam ao nível das ligações $\alpha_{1,6}$ da amilopectina (Takizawa & Murooka, 1985).

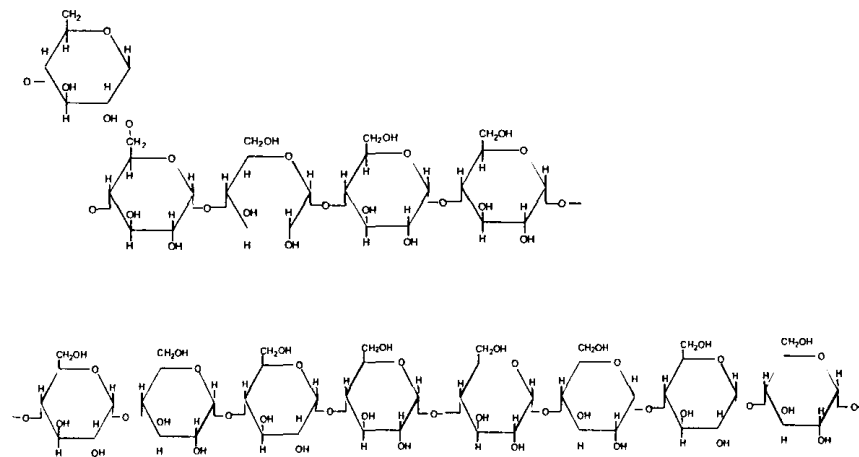


Figura 3. Estrutura química da amilopectina (em cima) e amilose (em baixo).

No caso das amilases, a análise de actividade foi realizada usando um meio cuja constituição se descreve em seguida: adicionou-se 1,25 g de amido solúvel, 0,5 g de extracto de levedura, 0,25 g de K_2HPO_4 , 0,125 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 25 μg de tiamina-HCl e 0,25 ml da solução de micronutrientes, água até perfazer 250 ml e acertou-se o pH a $7,3 \pm 0,2$. Por fim, juntou-se 4,25 g de agar. A solução de micronutrientes tinha a seguinte constituição: juntou-se 0,127 g de $FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, 0,178 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,074 g de $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,008 g de $CuSO_4$, 0,01 g de $CoSO_4$, 0,01 g de H_3BO e 100 ml de água. De seguida, cozeu-se o agar e autoclavou-se a $121^\circ C$ durante 15 min. As placas com este meio foram inoculadas e incubadas a $30^\circ C$ durante 8 dias. De seguida, as placas foram reveladas, tendo sido inundadas com uma solução aquosa de iodo (1% I_2 e 2% KI). A solução de iodo foi usada como revelador uma vez que esta solução confere cor azul-arroxeadada quando se associa a moléculas de amido, e não reage com os produtos que resultam da hidrólise deste.

Após a revelação verificou-se que a placa do ensaio em branco ficou azul-arroxeadada, tal como nas placas de *Geotrichum candidum*, *Mucor hiemalis* e *Penicillium roqueforti*. Nas outras placas foi observado que a alguma distância do limite das colónias a cor predominante era azul-arroxeadada, enquanto onde os fungos se encontravam, como em *Phanerochaete chrysosporium*, ou nas proximidades das suas colónias formando halos de cor concêntricos, como em *Penicillium crustosum*, *Penicillium expansum* (ver Fig. 4) e *Trichoderma viride*, o que dominava era a transparência. Observou-se também, nos bordos dos halos referidos nas placas com *Penicillium expansum* e *Trichoderma viride* uma fina camada concêntrica de cor avermelhada. A formação de halo em volta da colónia indica existência de amilases extracelulares, sendo possível relacionar uma elevada actividade amilolítica com um maior raio do halo. As estirpes de *Penicillium expansum* e *Aspergillus niger* possuem o maior poder amilolítico.

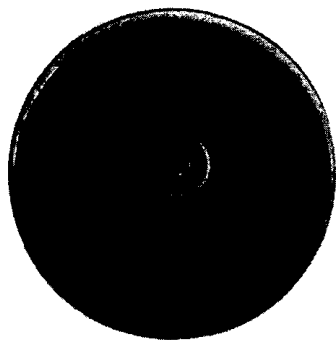


Figura 4. Resultado obtido após o ensaio da amilase para *P. expansum*.

O halo avermelhado que se formou nos ensaios existe devido à formação de dextrinas que constituem uma etapa intermédia da degradação do amido e que formam um complexo com essa cor quando em contacto com a solução de iodo.

Celulases

As moléculas de celulose são cadeias não ramificadas de glucose ligadas entre si por ligações $\beta_{1,4}$. Estas cadeias possuem um número variável de resíduos, com um comprimento médio por molécula de cerca de 8000 resíduos. Às unidades que, ao longo de uma molécula, se repetem dá-se o nome de resíduos de celobiose (Fig. 5). Por sua vez, as moléculas de celulose organizam-se em unidades chamadas microfibrilas. O centro de cada microfibrila é constituído por moléculas de celulose dispostas numa perfeita disposição tridimensional, formando uma região cristalina sendo esta a de mais difícil biodegradação. A rodear o centro cristalino encontra-se uma região que, embora também constituída por moléculas de celulose paralelas às do centro, não têm a já referida conformação tridimensional perfeita, sendo esta região periférica chamada por isso paracristalina (Goodwin & Mercer, 1983).

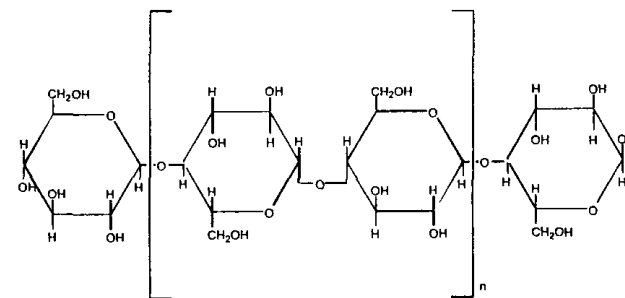


Figura 5. Estrutura química da celulose, constituída por n resíduos de celobiose.

A degradação microbiológica da celulose é de natureza complexa, especialmente no que diz respeito às zonas cristalinas, sabendo-se, actualmente, que é necessária uma interacção de uma variedade de diferentes enzimas para que ocorra a sua degradação. Na degradação da celulose por fungos é comum falar-se na actuação de três tipos de enzimas: as exoglucanases (normalmente designadas por celobiohidrolases - CBH), endoglucanases (EG) e β -glucosidases. De um modo geral, pensa-se que as enzimas fúngicas funcionam do seguinte modo: as endoglucanases actuam a nível interno nas cadeias de celulose, de modo aleatório, libertando cadeias mais peque-

nas. Já as celobiohidrolases actuarão nas extremidades das cadeias, libertando resíduos de celobiose. Por seu lado as β -glucosidases hidrolisam as ligações entre os dois resíduos de glucose presentes em cada molécula de celobiose. Este modo é, no entanto, um modo simplista de visualizar as reacções enzimáticas já que se sabe que elas actuam sinergicamente e, em determinadas condições, podem actuar de forma diferente (ex: exoglucanases actuarem como endoglucanases).

A análise da actividade celulolítica foi feita usando o teste baseado nas características da celulose-azure.

Assim, procedeu-se do seguinte modo:

PREPARAÇÃO DE MEIO A: adicionou-se 0,1 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 20 mg de KCl, 20 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 ml de água destilada, acertou-se o pH para $4,5 \pm 0,2$ e, por fim, adicionou-se 1,2 g de agar. O meio foi cozido e dividido por tubos tendo cada um 6 ml de meio. Estes foram autoclavados a 121°C , 15 min, e deixados à temperatura ambiente até solidificarem.

PREPARAÇÃO DE MEIO B: adicionou-se 0,05 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 10 mg de KCl, 10 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 33 ml de água destilada, acertou-se o pH a $4,5 \pm 0,2$ e por fim adicionou-se 0,6 g de agar. Cozeu-se e autoclavou-se o meio, sendo depois este mantido em banho-maria a 60°C .

PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO DE CELULOSE-AZURE: suspendeu-se 0,5 g de celulose-azure (Sigma) em água destilada e esta foi deixada durante a noite em agitação. No dia seguinte, de modo a lavar a celulose-azure e retirar o corante não associado à celulose, foram efectuadas centrifugações até que o sobrenadante se tornasse transparente. Adicionou-se ao precipitado final 17 ml de água destilada e a quente, adicionou-se o meio B à solução de celulose-azure, constituindo esta mistura o meio C. Em condições de assépsia, a cada um dos tubos com meio A preparados, adicionou-se 1,5 ml do meio C. Os tubos foram inoculados e mantidos a 30°C na estufa durante 17 dias.

Sendo a celulose-azure um corante associado a cadeias de celulose quando as celulasas actuam esta associação desfaz-se e o corante liberta-se difundindo-se. Assim, o grau relativo de celulólise detecta-se pela maior ou menor quantidade de cor azul que se difunde da camada superior para o meio basal A.

Observaram-se, após a incubação, diferenças na intensidade e na profundidade da cor azul nos meios. Assim, foram obtidos resultados nos quais o meio se manteve com duas camadas distintas, como em *Geotrichum candidum* e *Penicillium roqueforti*, noutros deu-se uma ligeira difusão de cor como em *Mucor hiemalis*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium expansum*, e outros houve ainda em que se verificou uma grande difusão de cor como em *Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Trichoderma viride*.

Pectinases

As substâncias pécticas são heteropolissacarídeos com ácido galacturónico e metanol como principais componentes (Fig. 6) e alguns açúcares neutros a eles ligados. As ligações que formam estas moléculas são $\alpha_{1,4}$ glicosídicas e surgem entre os anéis de piranose das unidades de ácido D-galacturónico. As pectinas possuem larga distribuição no reino das plantas.

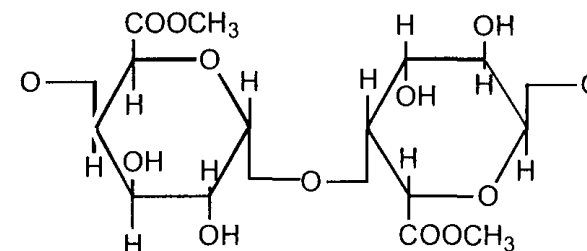


Figura 6. Estrutura química da molécula de pectina.

As pectinases são as enzimas responsáveis pela degradação das pectinas. Estas enzimas, para além de serem encontradas nas plantas, são também produzidas por muitos microrganismos entre os quais os fungos filamentosos. Elas formam um grupo de enzimas que inclui as enzimas de desesterificação (pectina metil-esterase – PME), as enzimas de despolimerização (poligalacturonases – PG e as pectato/pectina liases). A PME catalisa a hidrólise dos grupos metil dos resíduos dos ácidos D-galacturónicos da pectina, libertando metanol, as PG actuam hidroliticamente nas ligações glicosídicas $\alpha_{1,4}$ dos substratos de natureza péctica e as pectato/pectina liases catalisam a quebra das ligações $\alpha_{1,4}$ glicosídicas de D-galacturonanos, removendo um átomo de hidrogénio da posição C_5 com a formação de uma dupla ligação para estabilização da nova molécula. Recentemente, estas enzimas entre outros usos, têm sido utilizadas no tratamento de águas residuais com pectina (Kashyap *et al.*, 2001).

A detecção destas enzimas foi feita usando o meio preparado do seguinte modo: adicionaram-se 0,25 g de extracto de levedura, 3,5 g de agar, 125 ml de água corrente e 125 ml de solução de micronutrientes. A solução de micronutrientes foi preparada do seguinte modo: adicionou-se 0,25 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g de KH_2PO_4 , 0,75 g de Na_2HPO_4 , 0,025 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,13 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 125 ml de água destilada. De seguida foram adicionadas 2,94 g de citrato de sódio e 1,25 g de pectina. O meio foi cozido no microondas e agitado regularmente de modo a dissolver não só o agar mas também a pectina. O pH foi acertado a 4,5 com ácido

cítrico. O meio foi depois autoclavado a 105 °C durante 20 min, inoculado e incubado a 30 °C durante 3 a 4 dias. Após a incubação as placas foram inundadas com solução de revelação 1% CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamónia) e deixadas, várias horas, à temperatura ambiente. A revelação com o produto CTAB leva à formação de um precipitado onde ocorreu degradação pectinolítica. Algumas horas após a revelação verificaram-se duas situações: em *Aspergillus niger* e *Penicillium crustosum*, foi notória a formação de precipitados nas zonas onde o fungo se desenvolveu e num halo em redor destas, o que demonstra a degradação pectinolítica exógena. Nas placas com as outras estirpes e na placa em branco não foi detectada qualquer alteração de relevo no meio. A estirpe *Aspergillus niger* foi quem demonstrou a maior capacidade degradativa.

Quitinases

A quitina é um homopolímero de *N*-acetil-D-glucosamina com ligações $\beta_{1,4}$ (Fig. 7), é produzida em enormes quantidades na Natureza e é utilizada como componente estrutural por alguns organismos vivos. Existe, no entanto, mais que um tipo de quitina, e esta pode ser modificada por desacetilação formando quitosano (D-glucosamina com ligações $\beta_{1,4}$). Assim, e devido a esta complexidade de formas químicas, é normal que exista uma grande variedade de enzimas líticas que atacam estes compostos. De um modo simplificado podemos considerar quitinases como as enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas de quitina. Assim, temos as endoquitinases, que quebram ligações aleatoriamente ao longo da cadeia, as exoquitinases, que libertam unidades de diacetilquitobiose da extremidade da cadeia e, finalmente, β -*N*-acetilglucosaminidases, que podem actuar como exoquitinases fracas, libertando unidades de monossacarídeos da extremidade da cadeia. Os três tipos de enzimas constituem o sistema quitinolítico. Uma forma alternativa de degradação da quitina surge via desacetilação, dando origem a quitosano, que após várias hidrólises sucessivas por enzimas diferentes dá origem a glucosamina.

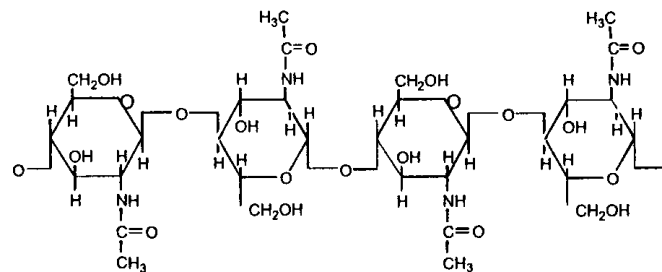


Figura 7. Estrutura química da molécula de quitina.

A análise da actividade das quitinases foi realizada pelo seguinte método:

PREPARAÇÃO DE MEIO A: adicionou-se 0,1 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 20 mg de KCl, 20 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 ml de água destilada, acertou-se o pH para $4,5 \pm 0,2$ e, por fim, adicionou-se 1,2 g de agar. O meio foi cozido e dividido por tubos, tendo cada um 6 ml de meio. Estes foram então autoclavados a 121 °C, 15 min e deixados à temperatura ambiente até solidificarem.

PREPARAÇÃO DE MEIO B: adicionou-se 0,05 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 10 mg de KCl, 10 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 34 ml de água destilada, acertou-se o pH $4,5 \pm 0,2$ e, adicionou-se 0,6 g de agar. Autoclavou-se o meio e este foi mantido em banho-maria a 60 °C.

PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO DE QUITINA-AZURE: dissolveu-se 0,3 g de quitina-azure (Sigma) em 8 ml de água destilada. A quente adicionaram-se 17 ml de meio B à solução de quitina-azure e agitou-se, constituindo esta mistura o meio C. Em condições de assépsia, a cada um dos tubos com meio A adicionou-se 1,5 ml do meio C.

Os tubos foram posteriormente inoculados com os fungos e mantidos a 30 °C na estufa, durante 20 dias.

As quitinases foram estudadas através de um método idêntico ao usado para estudo das celulases baseado na celulose-azure, substituindo-se celulose-azure por quitina-azure, e avaliando a degradação através de uma maior ou menor difusão de cor. Constataram-se, após o período de incubação, diferenças entre os tubos com as diferentes estirpes (Fig. 8). Enquanto na maioria dos tubos não se verificou difusão de cor, já em *Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Mucor hiemalis* (por ordem crescente da intensidade) ocorreu uma difusão de cor da camada superior para a camada inferior do meio.

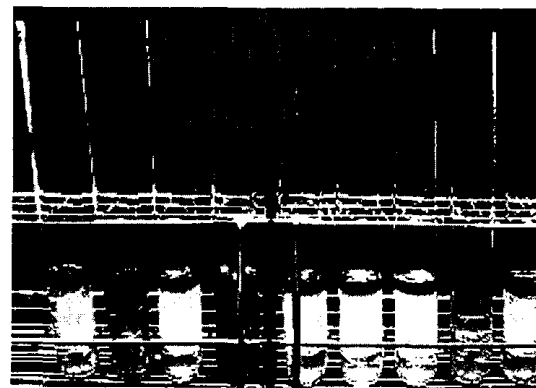


Figura 8. Resultados obtidos após o ensaio da quitina-azure.

Da direita para a esquerda: *Trichoderma viride*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Geotrichum candidum*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium expansum*, *Penicillium crustosum*, *Aspergillus niger* e Tubo controlo.

Lenhinases

A lenhina é um polímero aromático tridimensional sendo muito abundante na Natureza. Encontra-se nas paredes de todas as plantas vasculares e é constituído por três principais compostos: álcool *p*-comarílico, álcool coniferílico e álcool sinápico. Diferentes tipos de lenho possuem diferentes proporções destas unidades. Devido à sua constituição química, a lenhina é de muito difícil degradação, sendo apenas biodegradada por fungos ligados à podridão branca da madeira. As principais enzimas que actuam ao nível da degradação da lenhina são as famílias da lenhina peroxidases (LiP), da manganês peroxidases (MnP), e as lacases.

Para a detecção das lenhinases recorreu-se a quatro tipos de meios, os quais foram preparados da forma que se descreve a seguir e após terem sido inoculados foram incubados a 30 °C.

MEIO DE POLY-R478: Adicionaram-se 0,5 g de glucose, 0,025 g de peptona micológica, 0,0025 g de extracto de levedura, 0,05 g de poly-R478, 3,75 g de agar e 250 ml de água destilada. Depois de cozido no microondas o meio foi autoclavado e plaqueado. As placas inoculadas permaneceram na estufa durante 12 dias. Usando este método, obtiveram-se dois tipos de resultados: com desaparecimento parcial da cor vermelha rosada inicial como em *Phanerochaete chrysosporium*, ou sem alteração da cor inicial como nas restantes estirpes.

MEIO DE AZUL DEXTRANO: Este meio foi preparado de modo semelhante ao anterior mas substituindo o poly-R478 por 0,125 g de azul dextrano. As placas com meio de azul dextrano permaneceram na estufa durante 25 dias. No final obtiveram-se dois tipos de placas: com desaparecimento total da cor azul inicial como em *Phanerochaete chrysosporium*, ou sem alteração da cor inicial como nas restantes estirpes.

MEIO DE AZUL DE COOMASSIE: igual ao primeiro mas contendo 0,0125 g de azul de Coomassie em vez de poly-R478. As placas permaneceram na estufa durante 25 dias. Obtiveram-se dois tipos de placas: com desaparecimento total da cor azul inicial como em *Phanerochaete chrysosporium*, ou sem alteração da cor inicial, nas restantes estirpes analisadas.

MEIO DE AZUL DE METILENO: de preparação idêntica ao primeiro meio mas usando 0,00125 g de azul de metileno em substituição do poly-R478. As placas permaneceram na estufa durante 25 dias. Obtiveram-se três tipos de placas: com desaparecimento total da cor azul inicial como em *Phanerochaete chrysosporium*, com modificação parcial da cor do meio de azul para verde como por exemplo em *Penicillium expansum*, ou sem alteração da cor inicial.

A constituição dos diferentes meios é semelhante mas estes possuem substratos diferentes na sua composição. Todos estes substratos têm como objectivo mimeti-

zar a lenhina, uma vez que possuem uma constituição química simplificada e que se assemelha em vários aspectos a esta, podendo por isso ser atacados por enzimas lenhinolíticas, o que, ao acontecer, leva à quebra das ligações químicas ou dos anéis aromáticos que provoca uma perda de cor. Assim, uma diminuição da cor característica do meio significa que o fungo inoculado é potencialmente degradador da lenhina. O uso de diferentes substratos dá maior validade aos resultados em caso de concordância.

É de salientar que a estirpe *Phanerochaete chrysosporium*, em todas as placas em que esteve presente, levou à degradação dos substratos, sendo por isso considerada degradadora de lenhina. A alteração de cor azul para verde nas placas com azul de metileno explica-se por alterações do pH produzido pelo metabolismo dos fungos não sendo indicadora de degradação.

Síntese dos resultados das actividades enzimáticas

Compilando o que até agora foi dito, a Tabela I resume as capacidades degradativas de cada estirpe face aos substratos estudados nas técnicas de rastreio utilizadas.

Tabela I. Actividades enzimáticas das estirpes face aos diferentes substratos

	<i>A. niger</i>	<i>G. candidum</i>	<i>M. hiemalis</i>	<i>P. crustosum</i>	<i>P. expansum</i>	<i>P. roqueforti</i>	<i>P. chrysosporium</i>	<i>T. viride</i>
Protases	0	0	0	0	++	0	0	+++
Lipases	++	+	+	+++	++	+	0	++
RNases	0	0	+++	?	?	0	0	++
DNases	0	0	+++	0	0	0	0	0
Amilases	+++	0	0	++	+++	0	+++	+
Celulases	+++	0	+	+	+	0	+++	++
Pectinases	+++	0	0	+	0	0	0	0
Quitinases	++	0	+++	0	0	0	++	0
Lenhinases	0	0	0	0	0	0	+++	0

0 = sem actividade detectada;

+ a +++ = actividade relativa crescente;

? = resultado inconclusivo.

Conclusão

Este trabalho visava a optimização de técnicas de rastreio enzimático para o estudo do potencial degradativo de fungos. Os resultados obtidos validam uma bateria de testes rápidos de detecção das principais actividades enzimáticas em fungos, habilitando a Micoteca da Universidade do Minho com um instrumento analítico importante para a caracterização das estirpes que conserva. Por outro lado, os resultados obtidos permitem indicar desde já estirpes da colecção que poderão ser usadas como controlos positivos ou negativos em futuros ensaios enzimáticos. Finalmente, a continuação destes estudos poderá permitir encontrar isolamentos fúngicos com elevado poder degradativo, os quais poderão ser estudados de forma mais aprofundada através de outros ensaios bioquímicos ou moleculares.

Bibliografia

- Goodwin T.W. & Mercer E.I. (1983) *Introduction to plant biochemistry*. Pergamon Press, 2nd edition, England.
- Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra, S. & Tewari, R. (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology* 77, 215-227.
- Lima N., Teixeira J.A. & Mota M. (1991) Deep-agar diffusion test for preliminary screening of lipolytic activity of fungi. *Journal of Microbiological Methods* 14, 193-200.
- Rawn J.D. (1983) *Biochemistry*. Harper & Row, Publishers, New York.
- Schellart J.A., Visser F.M.W., Zandstra T. & Middelhoven W.J. (1976) Starch degradation by the mould *Trichoderma viride*. I. The mechanism of starch degradation. *Antonie van Leeuwenhoek* 42, 229-238.
- Smith D. & Onions A.H.S. (1983) A comparison of some preservation techniques for fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 81, 535-540.
- Takizawa N. & Murooka Y. (1985) Cloning of the pullulanase gene and overproduction of pullulanase in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*. *Applied Environmental Microbiology* 49, 294-298.