



ANIELLI SOUZA PEREIRA

**DIVERSIDADE E POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE
ENZIMAS DE *Penicillium*, *Aspergillus*, *Talaromyces* e
Paecilomyces ISOLADOS DE SOLO DE MATA ATLÂNTICA
DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO**

**LAVRAS - MG
2019**

ANIELLI SOUZA PEREIRA

**DIVERSIDADE E POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE *Penicillium*,
Aspergillus, *Talaromyces* e *Paecilomyces* ISOLADOS DE SOLO DE MATA
ATLÂNTICA DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza
Orientadora

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Coorientador

**LAVRAS - MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pereira, Anielli Souza.

Diversidade e potencial para a produção de enzimas de
Penicillium, *Aspergillus*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* isolados de
solo de Mata Atlântica do Quadrilátero Ferrífero / Anielli Souza
Pereira. - 2019.

101 p. : il.

Orientador(a): Sara Maria Chalfoun de Souza.

Coorientador(a): Luís Roberto Batista.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Biodiversidade. 2. Potencial biotecnológico. 3. Pectinase. I.
de Souza, Sara Maria Chalfoun. II. Batista, Luís Roberto. III.
Título.

ANIELLI SOUZA PEREIRA

**DIVERSIDADE E POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE *Penicillium*,
Aspergillus, *Talaromyces* e *Paecilomyces* ISOLADOS DE SOLO DE MATA
ATLÂNTICA DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 03 de junho de 2019.

Prof. Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Dr. José da Cruz Machado	UFLA
Dra. Caroline Lima Angélico	EPAMIG
Dra. Fátima Maria de Souza Moreira	UFLA

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza
Orientadora

**LAVRAS - MG
2019**

À minha família, fonte inesgotável de amor e apoio, dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pelo amor incondicional, pelo direcionamento, pelo cuidado, por ter sido força e alento nessa caminhada, por me guiar e permitir conquistar mais essa vitória.

À minha família, minha base, meu alicerce, que estão sempre na plateia me aplaudindo ou enxugando minhas lágrimas. Sem vocês eu nada seria. Meu muito obrigada. Amo vocês.

À minha eterna orientadora Dra. Ana Flávia Santos Coelho (UFPB) que há tantos anos, através do PIBIC-UFT, plantou em mim a sementinha da microbiologia que hoje me rende um fruto muito especial.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, professores e coordenadores pela oportunidade, ensinamentos e disponibilidade. À excepcional secretária Rose, por seu atendimento tão gentil e por nunca nos deixar perder os prazos.

À minha orientadora Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza, por tamanha sabedoria e paciência, por estar sempre disposta a ouvir e ajudar.

Ao meu co-orientador Dr. Luís Roberto Batista, por abrir as portas, pela oportunidade de participação no projeto e pela oportunidade de conhecer e me encantar pelo mundo dos fungos.

Aos colegas de turma, de disciplinas, das horas de desespero, principalmente à melhor equipe de estudos de Genética de Microrganismos: Joyce, Micha, Rafa e Su. Vocês foram demais.

Às amigas, confidentes, companheiras de laboratórios, de trabalho, de café, de noites e finais de semana no laboratório, de frustrações, mas, principalmente, de alegrias Loris, Michele, Nathasha, Sirlei, Fabi, Suzana, Thalissa. A jornada foi bem mais feliz com vocês.

Aos queridos Luiz Gustavo e Wesley pela companhia e toda ajuda com os experimentos e incansáveis traduções.

A todos que passaram pelo Laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciências de Alimentos – UFLA durante essa jornada e contribuíram de alguma forma para a conquista deste trabalho.

E teve festa também, momentos de amizade, descontração, apoio. E em todos eles a companhia de vocês fez toda a diferença. Su e Kaka, sempre e sempre. A vocês toda minha amizade, gratidão e amor. Sabrina, Ju, Camis, Paula, Reps Desapego, Tindóida, Pinga Pura, tem um pedacinho de cada um em meu coração.

À minha psicóloga Rafaela Borges por me ajudar a enxergar o mundo de uma maneira mais leve e conseguir concluir essa etapa. “Não somos bons o tempo todo e está tudo bem”.

Ao meu namorado Evandro, pela companhia, paciência e amor, por estar perto quando tudo parecia que ia desabar. Mesmo chegando no final foi apoio e aconchego em uma das etapas mais difíceis. Obrigada amor.

A todos que passaram pela minha vida ao longo desses anos e que de alguma forma, direta ou indiretamente, me ajudaram a chegar até aqui.

Muito obrigada!

Este trabalho faz parte do sub projeto intitulado “Biodiversidade e bioprospecção de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. em solos de áreas de mineração” que compõe o projeto “Diversidade de plantas e de organismos dos solos com potencial biotecnológico e indicadores de impacto ambiental, no estado de Minas Gerais” (CRA-RDP-00136-10, FAPEMIG/FAPESP/FAPESPA/VALE S.A).

RESUMO

O Brasil é um país rico em biodiversidade com inúmeras espécies de plantas, animais e microrganismos, distribuídos em diferentes biomas, apresentando como importante fonte de produtos biológicos de interesse para as indústrias farmacêuticas, agrárias e alimentícias. O conhecimento sobre esses organismos e os compostos por eles produzidos ainda é pouco explorado no Brasil, tornando importante a realização do levantamento dessa diversidade e possibilitando a utilização desses compostos de maneira eficaz. O objetivo do presente trabalho foi realizar um levantamento da diversidade de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* em solo de Mata Atlântica da região do Quadrilátero Ferrífero e avaliar seu potencial para produção de enzimas. Os isolados foram avaliados e caracterizados morfológicamente de acordo com aspectos macro e microscópicos. Para auxiliar na identificação dos isolados, foi avaliada a produção de toxinas (citrinina, aflatoxinas e ocratoxina A) através do método de cromatografia em camada delgada e também foi avaliado o perfil proteico de alguns isolados por MALDI-TOF MS. Por meio de teste de produção de enzima *in vitro* foi realizado *screening* dos isolados para as enzimas lipase, celulase e pectinase, sendo calculado o índice enzimático para cada fungo. A partir do *screening* foi selecionado um morfotipo e uma enzima para testes em fermentação submersa. Foram obtidos 2035 isolados de fungos, sendo 37 do gênero *Aspergillus*, 34 do gênero *Paecilomyces*, 6 do gênero *Talaromyces* e 1958 isolados do gênero *Penicillium*. Com a caracterização morfológica foi possível identificar 34 isolados de *Aspergillus*, 50 de *Penicillium* e 6 de *Talaromyces*, agrupados em 3, 15 e 3 espécies, respectivamente. Os demais foram agrupados por suas semelhanças morfológicas, caracterizados e armazenados para posterior análise genética. O teste de aflatoxinas foi eficiente para auxiliar na identificação de *A. flavus* e *A. parasiticus*, indicando 19 isolados na primeira espécie e 2 da segunda. A utilização de MALDI-TOF se mostrou eficiente no auxílio à identificação de fungos filamentosos, resultando em um bom agrupamento e diminuição do número de morfotipos a serem levados para análises posteriores. Na avaliação da produção de enzimas a enzima pectinase foi a que apresentou maior número de isolados produtores e o morfotipo P51 o maior índice enzimático, sendo selecionados para o teste em fermentação submersa. O isolado se apresentou bom produtor da enzima exo-poligalacturonase e foram definidas faixas ótimas de tempo, temperatura e pH para sua produção. Os resultados mostraram uma diversidade de espécies no solo avaliado, podendo haver espécies novas ainda não descritas, além de um potencial biotecnológico não explorado que pode ser melhor estudado e utilizado em diversos processos de produção.

Palavras-chave: biodiversidade, potencial biotecnológico, índice enzimático, DCCR, pectinase

ABSTRACT

Brazil is a rich country in biodiversity, with numerous plants, animals and microorganisms species, distributed in different biomes, presented as an important source of biological products of interest to pharmaceutical, agricultural and food industries. The knowledge on these organisms and on the compounds produced by them still little explored, so it is important the development of biodiversity surveys, enabling the effective use of these compounds. The aim of the present study was to carry out a biodiversity survey on genera of filamentous fungi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces*, and *Paecilomyces* in Atlantic Forest soil located in the Quadrilátero Ferrífero, and evaluate their enzyme production potential. The isolates were morphologically characterized and evaluated according to macroscopic and microscopic aspects. The toxin production evaluation (citrinin, aflatoxins and ochratoxin A) was applied to aid in the identification of isolates by thin layer chromatography method, in addition, the protein profile of some isolates were evaluated by MALDI-TOF MS. In vitro enzyme production tests was performed screening the isolates for lipase, cellulase and pectinase enzymes, so the enzymatic index of each fungus was calculated. From the screening, one morphotype and one enzyme were selected and tested in submerged fermentation. In total, 2035 fungal isolates were obtained, among which 37 of the genus *Aspergillus*, 34 of *Paecilomyces*, 6 of *Talaromyces* and 1958 isolates of the genus *Penicillium*. Through morphological characterization was possible to identify 34 isolates of *Aspergillus*, 50 of *Penicillium* and 6 of *Talaromyces*, grouped into 3, 15 and 3 species, respectively. All further isolates were grouped by their morphological similarities, characterized and stored for later genetic analysis. The aflatoxin test was efficient to assist with the identification of *A. flavus* and *A. parasiticus*, thus it was able to indicate 19 isolates from the first specie and 2 from the second. The application of MALDI-TOF technique was efficient in the aid to identify the filamentous fungi, resulting in good clusters and decreasing the number of isolates to be subjected to further analysis. In the enzyme production tests, the pectinase enzyme showed the higher number of isolates producers, and the morphotype P51 showed the highest enzymatic index, so it was selected for the submerged fermentation. The isolated demonstrated to be a good exo-polygalacturonase producer and optimum time, temperature and pH ranges were defined for its production. The results showed wide diversity of species in the evaluated soil, with the possibility of new species that have not been described before, besides the untapped biotechnological potential that can be better studied and used in several production processes.

Keywords: biodiversity, biotechnological potential, enzymatic index, Central Composite Design, pectinase

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1- Estrutura microscópica de <i>Aspergillus</i>	24
Figura 1.2 – Estrutura microscópica de <i>Penicillium</i>	25
Figura 1.3 – Estrutura microscópica de <i>Paecilomyces</i>	26
Figura 1.4 – Estrutura microscópica de <i>Talaromyces</i>	28

CAPÍTULO 2

Figura 3.1 – Colônias obtidas a partir do plaqueamento em superfície em meios DG18 (A) e DRBC (B) da diluição (10^{-2}) do solo de uma das amostras analisadas.	44
Figura 3.2 – Macro e micromorfologia de <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>A. parasiticus</i> (B) e <i>A. niger</i> (C).....	48
Figura 3.3 – Macro e micromorfologia de <i>Penicillium aurantiogriseum</i> (A), <i>P. brevicompactum</i> (B), <i>P. solitum</i> (C) e <i>P. corylophilum</i> (D).	50
Figura 3.4 – Macro e micromorfologia de <i>Penicillium janthinellum</i> (A), <i>P. simplicissimum</i> (B), <i>P. waksmanii</i> (C) e <i>P. decumbens</i> (D).	50
Figura 3.5 – Macro e micromorfologia de <i>Penicillium spinulosum</i> (A), <i>P. glabrum</i> (B) e <i>P. sclerotiorum</i> (C).	51
Figura 3.6 – Macro e micromorfologia de <i>Talaromyces funiculosus</i> (A), <i>T. purpurogenus</i> (B) e <i>T. variabilis</i> (C).	52
Figura 3.7 – Macro e micromorfologia dos morfotipos A01 (A), A02 (B) e A03 (C).....	53
Figura 3.8 – Macro e micromorfologia dos morfotipos Pae01 (A), Pae02 (B), Pae03 (C) e Pae04 (D).....	53
Figura 3.9 – Macro e micromorfologia dos morfotipos P01 (A), P02 (B), P03 (C), P04 (D), P06 (E), P07 (F), P08 (G), P09 (H), P10 (I), P11 (J).....	54
Figura 3.10 – Macro e micromorfologia do morfotipo P12 (A), P16 (B), P17 (C), P18 (D), P20 (E), P21 (F), P22 (G), P23 (H), P24 (I) e P25 (J).....	55
Figura 3.11 – Macro e micromorfologia do morfotipo P26 (A), P27 (B), P28 (C), P29 (D), P30 (E), P31 (F), P32 (G), P33 (H), P34 (I) e P35 (J).....	56
Figura 3.12 – Macro e micromorfologia do morfotipo P36 (A), P37 (B), P38 (C), P39 (D), P40 (E), P41 (F), P42 (G), P43 (H), P44 (I) e P45 (J).....	57
Figura 3.13 – Macro e micromorfologia do morfotipo P46 (A), P47 (B), P48 (C), P49 (D), P50 (E), P51 (F), P52 (G), P53 (H), P54 (I) e P55 (J).....	58

Figura 3.14 – Macro e micromorfologia do morfotipo P61 (A), P62 (B), P63 (C), P64 (D), P65 (E), P66 (F), P67 (G), P68 (H), P69 (I) e P70 (J).....	59
Figura 3.15 – Macro e micromorfologia do morfotipo P71 (A), P72 (B), P73 (C), P74 (D), P75 (E), P76 (F), P79 (G), P82 (H), P84 (I) e P85 (J).....	60
Figura 3.16 – Macro e micromorfologia do morfotipo P86 (A), P87 (B), P89 (C), P90 (D), P91 (E), P92 (F), P93 (G), P94 (H), P95 (I) e P96 (J).....	61
Figura 3.17 – Macro e micromorfologia do morfotipo P97(A), P98 (B), P101 (C), P103 (D), P104 (E), P105 (F), P107 (G), P108 (H), P109 (I) e P114 (J).....	62
Figura 3.18 – Macro e micromorfologia do morfotipo P115 (A), P116 (B), P117 (C), P118 (D), P122 (E), P123 (F), P124 (G), P125 (H), P126 (I) e P127 (J).	63
Figura 3.19 – Macro e micromorfologia do morfotipo P129 (A), P130 (B), P131 (C), P132 (D), P137 (E), P139 (F), P142 (G), P143 (H), P144 (I) e P145 (J).	64
Figura 3.20 – Macro e micromorfologia do morfotipo P146 (A), P148 (B), P150 (C), P151 (D), P152 (E), P154 (F), P155 (G), P156 (H), P157 (I) e P158 (J).	65
Figura 3.21 – Macro e micromorfologia do morfotipo P160 (A), P161 (B) e P162 (C).....	66

CAPÍTULO 3

Figura 3.1 – Testes positivos para produção de lipase. A – P40, B – P54, C – P126, D – P130.	91
Figura 3.2 – Testes positivos para produção de celulase. A – P22, B – P48, C – P71.....	92
Figura 3.3 – Morfotipos que apresentaram maior índice enzimático no teste para produção de pectinases. A – <i>A. parasiticus</i> , B – <i>A. flavus</i> , C – P51, D – P66, E – A01.....	94
Figura 3.4 – Diagrama de Pareto com efeito do tempo (t), temperatura (T), pH e suas interações sobre a atividade enzimática de exo-PG.....	96
Figura 3.5 – Curvas de contorno em função da interação entre as variáveis tempo (h), temperatura (°C) e pH sobre a atividade da enzima exo-PG.....	97

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 3.1 – Estimativa da população total de fungos filamentosos em amostras de solo de região de Mata Atlântica do Quadrilátero Ferrífero em dois meios de cultivo.	45
Tabela 3.2 – Espécies dos gêneros <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Talaromyces</i> isoladas de solo de região de Mata Atlântica do Quadrilátero Ferrífero.	47

CAPÍTULO 3

Tabela 2.1 – Variáveis do delineamento experimental com valores reais e codificados.	87
Tabela 2.2 – Matriz do delineamento experimental.	88
Tabela 3.1 – Índice enzimático de isolados dos gêneros <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Talaromyces</i> e <i>Paecilomyces</i> avaliada para produção de lipase, celulase e pectinase. (continua)	90
Tabela 3.2 – Matriz do delineamento experimental e atividade enzimática para exopoligalacturonase.	95

LISTA DE APÊNDICES

CAPÍTULO 2

Apêndice A - Coordenadas geográficas dos pontos centrais das 9 amostras compostas de solo coletadas em região de Mata Atlântica no Quadrilátero Ferrífero.	71
Apêndice B - Principais características macro e micromorfológicas dos isolados de fungos dos gêneros <i>Aspergillus</i> , <i>Paecilomyces</i> e <i>Penicillium</i> não identificados em nível de espécie. (continua).....	72
Apêndice C - Placas de cromatografia de camada delgada para teste de micotoxinas.	82

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
CAPÍTULO 1	19
1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
1.1 Biodiversidade.....	19
1.2 Bioprospecção	20
1.3 Quadrilátero Ferrífero e o bioma Mata Atlântica como ambiente para bioprospecção 20	
1.4 Biodiversidade microbiana do solo	21
1.5 Fungos dos gêneros <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Talaromyces</i> e <i>Paecilomyces</i>	22
1.5.1 Gênero <i>Aspergillus</i>	23
1.5.2 Gênero <i>Penicillium</i>	25
1.5.3 Gênero <i>Paecilomyces</i>	26
1.5.4 Gênero <i>Talaromyces</i>	27
1.6 Utilização de fungos para produção de enzimas	28
1.6.1 Pectinases.....	30
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
CAPÍTULO 2	39
DIVERSIDADE DE FUNGOS DOS GÊNEROS <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Talaromyces</i> E <i>Paecilomyces</i> ISOLADOS DE SOLO DE MATA ATLÂNTICA DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO.....	39
1 INTRODUÇÃO.....	40
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1 Área de estudo	41
2.2 Coleta de amostras.....	41
2.3 Isolamento, contagem e identificação dos fungos.....	42
2.3.1 Caracterização e identificação morfológica das espécies	43
2.3.2 Agrupamento de isolados pela técnica de MALDI-TOF MS	44
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1 Estimativa da população total de fungos filamentosos nas amostras.....	44
3.2 Quantificação de isolados dos gêneros <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Talaromyces</i> e <i>Paecilomyces</i>	46

3.3	Isolados do gênero <i>Aspergillus</i> identificados em nível de espécie	48
3.4	Isolados dos gêneros <i>Penicillium</i> identificados em nível de espécie	48
3.5	Isolados dos gêneros <i>Talaromyces</i> identificados em nível de espécie.....	51
3.6	Isolados dos gêneros <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Paecilomyces</i> não identificados em nível de espécie.....	52
3.7	Avaliação da produção de ocratoxina A, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e citrinina .	66
3.8	Agrupamento de isolados pela técnica de MALDI-TOF MS.....	67
4	CONCLUSÃO.....	67
5	REFERÊNCIAS	68
6	MATERIAL SUPLEMENTAR	71
CAPÍTULO 3		83
AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FUNGOS DOS GÊNEROS <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Talaromyces</i> E <i>Paecilomyces</i> ISOLADOS DE SOLO DE MATA ATLÂNTICA DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO.....		83
1	INTRODUÇÃO.....	84
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1	Obtenção dos isolados	85
2.2	Screening dos isolados para produção de lipase, celulase e pectinase	85
2.2.1	Screening para produção de lipase (SIERRA, 1975).....	86
2.2.2	Screening para produção de celulase (KASANA et al., 2008)	86
2.2.3	Screening para produção de pectinase (MARCHI et al., 2009).....	86
2.2.4	Determinação do índice enzimático (IE).....	87
2.3	Otimização da produção de pectinase	87
2.3.1	Condições de cultivo e obtenção do extrato enzimático	88
2.3.2	Determinação da atividade enzimática de pectinase	89
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
3.1	Screening dos isolados para produção de lipase, celulase e pectinase	89
3.2	Otimização para produção de pectinase	94
4	CONCLUSÃO.....	99
5	REFERÊNCIAS	99