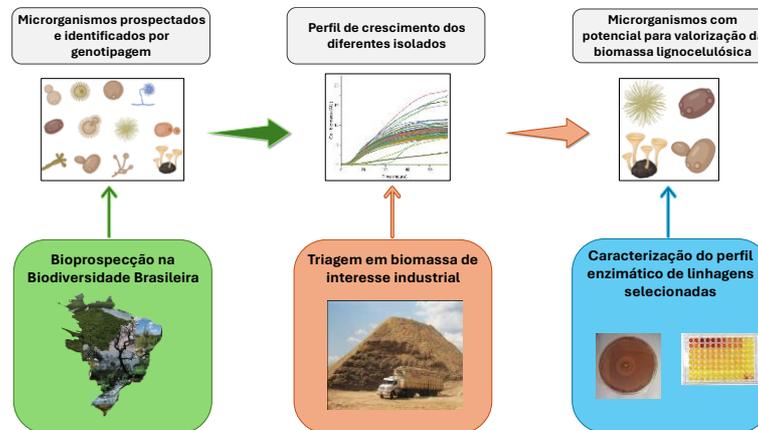


## Explorando a biodiversidade microbiana brasileira para uma bioeconomia circular: bioprospecção de novos fungos para a valorização da biomassa lignocelulósica



**Pesquisador responsável:** Dr. João Heitor Colombelli Manfrão Netto

**Unidade do CNPEM:** Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR)

### 1. Introdução

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade do mundo e, geralmente, é referido como fonte valiosa de recursos e de produtos naturais. Em termos de recursos microbiológicos, a biodiversidade brasileira ainda é pouco explorada, com a maioria das pesquisas focadas em grupos taxonômicos complexos, como vertebrados e plantas. Contudo, microrganismos possuem um grande potencial para o desenvolvimento de rotas alternativas e mais sustentáveis para a produção de combustíveis e químicos de interesse. Isso ocorre devida a capacidade de algumas espécies em utilizar recursos renováveis, como a biomassa lignocelulósica por exemplo, como substrato para sintetizar moléculas de interesse<sup>1</sup>. A produção de tais bioprodutos por rotas microbiológicas é, inclusive, alinhada com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). Incluindo, mas não restrito à ODS2 (Fome Zero), ODS7 (Energia Acessível e Limpa), ODS11 (Cidades e Comunidades Sustentáveis) e ODS13 (Combate às Alterações Climáticas). Portanto, é necessário investir em novas iniciativas focadas em mapear a diversidade microbiana dos biomas brasileiros, principalmente aqueles em alto grau de desmatamento, como a Mata Atlântica.

### 2. Estado-da-arte

Fungos são grupos taxonômicos interessantes devido ao seu metabolismo versátil, grande diversidade taxonômica e capacidade de sintetizar diferentes bioprodutos de interesse, incluindo enzimas e químicos. Por exemplo, espécies de fungos, como o *Trichoderma reesei*, são utilizadas para produção em escala industrial de coquetéis enzimáticos para o tratamento de biomassa lignocelulósica<sup>2</sup>. Além disso, algumas espécies de macrofungos são comestíveis e representam uma fonte alternativa de proteínas<sup>3</sup>. Portanto, mapear as espécies fúngicas dos biomas brasileiros é crucial para o estudo do impacto que tais comunidades microbianas

exercem em cada ecossistema, bem como para incentivar políticas públicas para a conservação e a proteção da biodiversidade destas regiões.

### 3. Objetivos

O objetivo geral deste projeto é realizar a prospecção e caracterização de fungo isolados partir de uma região conservada de Mata Atlântica (Legado das Águas, Reserva Votorantim). Os objetivos específicos do projeto são:

- I. Isolar e identificar diferentes linhagens de fungos coletados em região conservada de Mata Atlântica.
- II. Caracterizar o perfil de crescimento em biomassa industrialmente relevante (bagaço de cana-de-açúcar) das diferentes linhagens isoladas.
- III. Avaliar atividades enzimáticas de endo- $\beta$ -1,4-glucoamilase, endo- $\beta$ -1,4-xilanase e FPase de linhagens de fungos selecionadas.

### 4. Metodologia

#### 4.1. Coleta, Armazenamento e Isolamento dos fungos

A bioprospecção de linhagens fúngicas será realizada com dois tipos de amostras: (1) ambientais de solo e de madeira em decomposição e (2) de corpos de frutificação de macrofungos. Ao todo foram coletadas 23 amostras ambientais (18 de madeira em decomposição e 5 de solo) e 115 corpos de frutificação na reserva privada do Legado das Águas (Miracatu, São Paulo) que se encontra dentro do bioma da Mata Atlântica. Para macrofungos, durante a prospecção, o corpo de frutificação e/ou pequenos fragmentos dos substratos contendo fungos aderidos foram removidos, com ajuda de espátulas e/ou pinças, esterilizados previamente, e armazenados temporariamente em tubos de centrifuga de 50 mL estéreis até serem manipulados para extração de material genético ou isolamento de culturas puras. O isolamento ocorrerá em meio sólido PDA (*Potato Dextrose Agar*) até a observação de crescimento de um único tipo de fungo que será repicado em meio sólido, suplementado com os devidos antibióticos. Os esporos ou micélio serão armazenados em glicerol 15-25 % a -80 °C.

Para amostras ambientais, 10 a 20 gramas foram coletados com ajuda de colheres, esterilizadas previamente, e armazenadas temporariamente em tubos de centrifuga de 50 mL estéreis. Uma vez no laboratório, as amostras foram armazenadas a -20 °C até serem manipulados para isolamento de culturas puras. Para isolamento de culturas, 1 a 2 g da amostra ambiental foram inicialmente diluídas em solução tampão fosfato (PBS) e mantidas sob agitação por, pelo menos, 1 h para a extração dos microrganismos. Uma alíquota foi retirada e inoculada em meio contendo PDA suplementado com antibióticos com o intuito de eliminar eventuais bactérias presentes.

#### 4.2. Extração de DNA e identificação das espécies

Para a identificação molecular das linhagens isoladas, utilizaremos o DNA genômico e a amplificação da região ITS. Para isso, o DNA genômico será extraído com auxílio do kit *NZY Plant/Fungi gDNA Isolation* e utilizado como molde para uma reação de PCR utilizando os primers ITS1 e ITS4. Os amplicons serão purificados e sequenciados na plataforma de Sequenciamento de Alto Desempenho do LNBR. Os resultados serão analisados utilizando

bancos de dados disponíveis, como o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ou Mycobank.

#### 4.3. Triagem em biomassa de interesse industrial

De forma breve, para a fermentação em pequena escala, os esporos ou micélio, de culturas isoladas, serão coletados de uma placa PDA utilizando uma solução PBS e inoculados em frascos de agitação contendo 100 mL de meio mínimo (a composição poderá variar conforme a espécie, mas as alterações serão registradas) e 1 g ou 2 g da biomassa de interesse ou a quantidade corresponde em glicose (controle). Os frascos serão cultivados até 7 dias a 28 °C com rotação orbital de 200 rpm. Durante este período, o sobrenadante será coletado, em intervalos regulares. Os sobrenadantes serão centrifugados (para remoção da biomassa), armazenados devidamente e então utilizados para a etapa dos perfis enzimáticos.

#### 4.4. Ensaio enzimáticos

Os ensaios enzimáticos serão otimizados ao longo do projeto, mas utilizaremos protocolos já estabelecidos em nosso laboratório. Para todos os ensaios enzimáticos, a quantidade de proteína utilizada será medida por Bradford e o método do DNS (ácido Dinitrosalicílico) será utilizado para determinar a quantidade de açúcares redutores liberados durante a reação.

Para a determinação da atividade de celulasas totais (FPase), será utilizado uma tira de papel (Whatman Nº 1) de 1 x 6 cm com cerca de 50 mg. Em seguida, a reação será incubada com o papel a 50 °C por 1 hora. O protocolo da medição de atividade de Endoglucanase e de Xilanase também serão adaptados de Fonseca et al. (2020). De forma geral, a ação de Endoglucanase será avaliada na presença de Carboxi Metil Celulose (CMC) enquanto *beechwood xylan* será o substrato para a Xilanase. Ambas as reações ocorrerão com o tampão Citrato 50 mM, pH 5 a 50 °C por 5-30 min (Xilanase) e 10-30 min (Endoglucanase). A reação será parada com adição de DNS e, após fervura, lida no Tecan a 540 nm.

#### 5. Cronograma de Execução

Atividades	Trimestres			
	1°	2°	3°	4°
Isolamento das amostras de linhagens				
Extração e sequenciamento do material genético				
Triagem de fungos em diferentes biomassas e caracterização enzimática				
Redação de Relatório				

#### 6. Referências

1. Velvizhi, G. et al. Emerging trends and advances in valorization of lignocellulosic biomass to biofuels. *Journal of Environmental Management* vol. 345 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118527> (2023).
2. Santos, C. A. et al. A metagenomic 'dark matter' enzyme catalyses oxidative cellulose conversion. *Nature* (2025) doi:10.1038/s41586-024-08553-z.
3. Maini Rekdal, V. et al. *Neurospora intermedia* from a traditional fermented food enables waste-to-food conversion. *Nat Microbiol* (2024) doi:10.1038/s41564-024-01799-3.