



Produção de enzimas extracelulares por fungos associados à decomposição de materiais vegetais em riachos

Jéssica Barros Aguiar SILVA^[1], Suélen Caroline FRANTZ^[2], Anelise Kappes MARQUES^[1], Cristiane Martins COELHO^[1], Paula Benevides de MORAIS^[3]

^[1] Universidade Federal do Tocantins, Campus Palmas. Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia. Avenida NS 15, 109 Norte - Plano Diretor Norte, 77001-090. Palmas-TO, Brasil. Email: aneliseuft@hotmail.com; criscoelho@uft.edu.br

^[2] Universidade Federal do Tocantins, Campus Palmas. Laboratório de Microbiologia Aplicada. Avenida NS 15, 109 Norte - Plano Diretor Norte, 77001-090. Palmas-TO, Brasil. Email: suelencf@uft.edu.br

^[3] Professora do programa de Pós-Graduação Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (BIONORTE). Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia. Avenida NS 15, 109 Norte - Plano Diretor Norte, 77001-090. Palmas-TO, Brasil. E-mail: moraispb@uft.edu.br

INFORMAÇÕES

Recebido em: 07/09/2015

Aceito em: 28/11/2015

Publicado em: 23/12/2015

Document Object Identifier
10.18067/jbfs.v2i4.75

Termos de indexação:

Celulase

Xilanase

Fungos filamentosos

*Autor para correspondência
jessicabarros@hotmail.com

RESUMO

As celulasas e xilanasas fúngicas, derivadas de sua habilidade degradativa e excretadas, em geral, para o meio, despertam interesse biotecnológico por terem um largo espectro de aplicação. Objetivou-se verificar a produção das enzimas celulase e xilanase por fungos filamentosos isolados de detritos foliares alóctone em um córrego no Cerrado. Os testes foram realizados com 100 cepas utilizando meio de cultura sintético contendo, como única fonte de carbono, carboximetilcelulose e xilana para celulase e xilanase, respectivamente. Foram realizados inóculos no centro das placas e armazenadas por 4 dias em BOD a 28°C e submetido a choque térmico em estufa a 50°C por 16 horas. Para melhor visualização do halo de hidrólise as placas foram coradas com solução de vermelho congo e lavadas com solução de NaCl. Dos fungos testados 69% apresentaram resultado positivo para celulase dos quais 23% foram considerados com potencial para aplicação em biotecnologia. Não houve resultados positivos para a produção da enzima xilanase. Os fungos testados, associados ao processo de decomposição de matéria orgânica vegetal, apresentaram produção da enzima celulase, mas não da enzima xilanase.

Production of extracellular enzymes by fungi associated to the decomposition of plant materials in streams

ABSTRACT- Fungal cellulases and xylanases derived from the huge degradative capabilities of these microorganisms and excreted to medium, raise a biotechnological interest due to large application potential. The objective of this paper is to identify the production of the enzymes cellulase and xylanase by filamentous fungi isolated from allochthonous leaf litter in a stream in Cerrado ecosystem. The tests were carried out using 100 strains grown in synthetic culture medium containing carboxymethyl cellulose or beechwood xylan as sole carbon source for cellulase and xylanase production detection respectively. Inocula were performed in the center of plates and stored for 4 days at 28 ° C and subjected afterwards to thermal shock at 50 ° C for 16 hours. Plates were stained with Congo red solution and washed with a NaCl solution for better detection of the hydrolysis halo. Sixty nine percent of the fungal strains tested were positive for cellulase of which 23% were considered with potential for application in biotechnology. None of the fungal strains was able to degrade xylan.

Index terms: Pequizeiro; Insect-plant interaction; Tocantins



Copyright: © 2015 JBFS all rights. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Financiamento: Os autores reportam que houve suporte e auxílio financeiro pela Coordenação de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Nº do processo: 550912/2010-0) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior - CAPES/PROCAD (Nº do processo: 069/2009)

Conflito de interesse: Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Como referir esse documento (ABNT):

SILVA, J. B. A.; FRANTZ, S. C.; MARQUES, A. K.; COELHO, C. M.; MORAIS, P. B. Produção de enzimas extracelulares por fungos associados à decomposição de materiais vegetais em riachos. **Journal of Bioenergy and Food Science**, Macapá, v.2, n.4, p.208-212, out./dez., 2015. <http://dx.doi.org/10.18067/jbfs.v2i4.75>

INTRODUÇÃO

Os fungos que decompõem substâncias hemicelulósicas ocorrem geralmente no solo colonizando vegetais, suas raízes e resíduos com importante função de reciclagem de nutrientes [1]. No entanto, estudos sobre a decomposição de matéria orgânica alóctone em córregos de pequena ordem têm responsabilizado os fungos, principalmente os filamentosos, por decompor os componentes complexos do vegetal, tais como a celulose e xilana, mostrando-se, muitas vezes, mais relevantes que as bactérias nos processos iniciais de transformação da matéria particulada grossa que entra no corpo hídrico em matéria particulada fina. Isso se deve ao fato de que estes micro-organismos possuem um aparato enzimático capaz de quebrar essas moléculas de cadeias extensas em açúcares menores e mais assimiláveis [2, 3].

A celulose é um biopolímero formador da parede celular vegetal, a xilana é o maior polímero da hemicelulose que, por sua vez, é a segunda estrutura orgânica mais abundante na parede vegetal. A hidrólise desses componentes é de grande interesse biotecnológico e possui utilização industrial. Essas enzimas são aplicadas em etapas de processos de produção industrial e biotecnológicos em diversas áreas, incluindo biocombustíveis, produtos químicos, alimentos, bebidas, rações para animais, gêneros têxteis, papel e agricultura [4, 5].

A exploração dos micro-organismos pela indústria gera bilhões de dólares a cada ano [6] e as vantagens de realizar ensaios com fungos filamentosos se devem a fatores como fácil cultivo e manipulação, produção de altos níveis de enzimas extracelulares, maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade de reação [7-9].

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi verificar a produção de enzimas celolulíticas e xilanólíticas por fungos filamentosos associados ao processo de decomposição de matéria orgânica vegetal em riachos.

MATERIAL E MÉTODOS

As linhagens fúngicas pertencem à Coleção de Culturas Microbianas Carlos Rosa e foram originalmente isoladas de folhas senescentes da vegetação ripária de um córrego no Cerrado da região central do Estado do Tocantins após 30 dias imersas na água do próprio córrego. As linhagens foram repicadas previamente em BDA por 7 dias para os testes. Os testes para verificação da

produção de celulase foram realizados da forma descrita por Ruegger e Tauk-Tornisielo [1]. As placas foram incubadas por 4 dias a 28°C e em seguida submetidas a choque térmico de 50 °C em estufa por 16 horas. Após esse período, 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5g.L⁻¹) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0 foram adicionados às placas por meio de uma proveta de 10mL de modo que a superfície do ágar fosse completamente coberta e após 30 minutos a solução foi descartada [10]. Para uma melhor visualização do halo de degradação, as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M no mesmo tampão por 15 minutos e descartadas [11]. As placas para verificação de atividade xilanólítica, após incubação, passaram diretamente para o procedimento de coloração, adicionando-se 10 mL de solução corante de vermelho congo (1g.L⁻¹) e mantendo-se em repouso por 15 minutos. Posteriormente, as placas foram lavadas com solução de NaCl 1M, de forma semelhante ao procedimento descrito por Faheina et al. [12] conforme **Figura 1**:

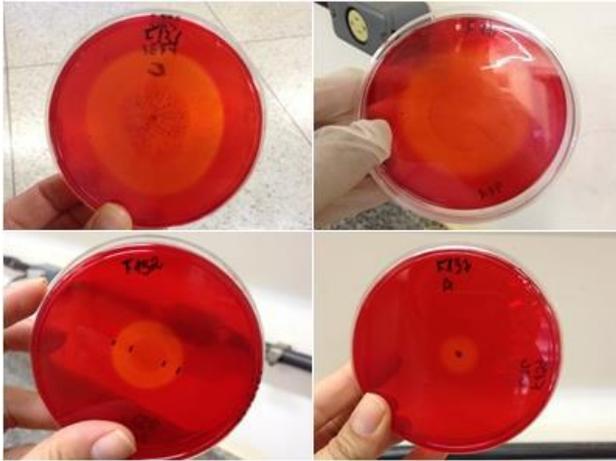
Figura 1. Realização do método de screening enzimático em meio sólido. A) Colônia isolada com crescimento de 7 dias; B) Retirada de fragmento da colônia com agulha de platina; C) Inóculo em meio seletivo com perfuração do ágar para crescimento fúngico.



Os diâmetros das colônias e dos halos produzidos foram medidos com paquímetro e calculados os índices enzimáticos (IE) por meio da razão entre o segundo e o primeiro resultado de cada repetição para posterior cálculo da média dos resultados de cada amostra [10]. Foram consideradas como positivas para a presença da enzima celulase, neste teste, todas as linhagens fúngicas que apresentaram halo de hidrólise. E as que alcançaram IE acima de 2 como de potenciais

para aplicação biotecnológica. Os halos de hidrólise de algumas linhagens podem ser visualizados na **Figura 2**:

Figura 2. Halo de hidrólise da enzima celulase em diferentes linhagens visualizado após placas coradas com solução de vermelho congo.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testadas 100 linhagens de fungos filamentosos oriundos de folhas em processo de decomposição quanto à produção das enzimas extracelulares, xilanase e celulase.

Não foram obtidos resultados positivos para a produção de xilanase. Segundo HRMOVA et al. [13], no processo de degradação de meios contendo xilana, a enzima é inicialmente induzida a produção de uma pequena quantidade que é excretada no meio e degrada a xilana em xilo-oligossacarídeos e xilobiose que após serem absorvidos pela célula, induzem os genes a produzirem xilanase extracelular. As xilanases induzidas degradam, então, o xilano em xilo-oligossacarídeos e xilobiose. O acúmulo destes monômeros provenientes da ação da enzima, entretanto, faz com que atuem como repressores na produção da mesma. Os derivados dos substratos e produtos enzimáticos finais podem desempenhar, portanto, um papel positivo chave na indução da enzima, mas também podem agir como inibidores dos produtos finais, possivelmente em concentrações mais elevadas [13, 14].

Para os testes na busca por produtores de celulase, 69% das linhagens apresentaram atividade celulolítica, detectadas através da visualização do halo de hidrólise em meio sólido contendo celulose como única fonte de carbono sendo 23% consideradas potenciais para aplicação em biotecnologia, uma vez que alcançaram índice enzimático acima de 2. A **Tabela 1** apresenta os números de linhagens testadas e seus respectivos resultados com os valores mínimos e máximos dos índices enzimáticos:

Tabela 1. Número de indivíduos positivos e negativos em teste de screening enzimático e valores mínimos e máximos dos índices enzimáticos.

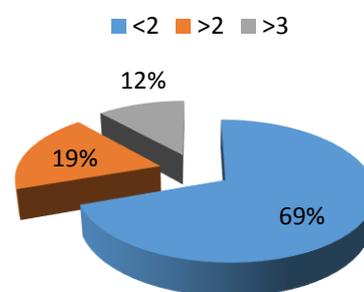
Teste	Celulase	Índice enzimático (máx. e mín.)
Negativos	31	-
Positivos	48	0,46 – 1,93
Positivos com potencial biotecnológico	21	2,00 – 8,57
Total	100	-

Ruegger e& Tauk-Tornisielo [1] obtiveram 45% de fungos produtores de celulase entre as linhagens isoladas do solo de uma estação ecológica em São Paulo. Abdel-Raheem e Shearer [15] testaram fungos ascomicéticos isolados de substratos vegetais e obtiveram 100% de celulolíticos, assim como Silva et al. [16] também encontraram, em solos de sistemas agroflorestais, 100% de fungos com produção da enzima celulase.

Dos fungos positivos para atividade celulolítica, 21 foram considerados potencialmente biotecnológicos para aplicações industriais segundo média do IE >2 proposto por Nogueira e Cavalcanti [10]. Neste estudo 4 linhagens apresentaram IE >3, 2 >4, 1 >5 e 1 >8, mostrando valores semelhantes aos expressos por gêneros frequentemente utilizados no mercado industrial, tais como *Penicillium* e *Trichoderma* [1, 17, 18]. Os demais valores estão expressos na **Figura 3**:

Figura 3. Gráfico de porcentagem dos índices enzimáticos (diâmetro da colônia (mm)/diâmetro do halo (mm)) de fungos positivos para atividade enzimática de celulase em meio sólido de fungos oriundos de vegetação alóctone do córrego Buritizal, Palmas-TO.

Índices enzimáticos



Não houve diferença estatisticamente significativa entre os IE dos indivíduos que apresentaram atividade celulolítica, tampouco os que apresentaram potencial biotecnológico para

aplicação industrial. Foi observado que as menores colônias produtoras de celulase foram as que obtiveram maiores halos de hidrólise e, conseqüentemente, os maiores índices enzimáticos. Ruegger & Tauk-Tornisielo [1] e Nogueira e Cavalcanti [10] também observaram este fato, concluindo que o teste qualitativo é mais indicado para teste com mesmas linhagens ou para verificação de mutações. Em contrapartida, Neirotti e Azevedo [19] em seus testes para melhoramento da técnica semi-quantitativa de screening em meio sólido afirmam uma correlação positiva entre o halo de degradação e a atividade enzimática validando este método para medir a atividade celulolítica em fungos.

CONCLUSÃO

Fungos associados a detritos vegetais em decomposição apresentam atividade celulolítica, a qual deve ter papel importante no processo de degradação da matéria orgânica vegetal nos ecossistemas aquáticos;

A ausência de linhagens xilanolíticas deve ser investigada, já que é possível um papel inibidor de

xilanas nas concentrações testadas em meio de cultura.

Linhagens produtoras de celulases com potencial biotecnológico estão associadas a processos de decomposição de matéria orgânica alóctone em riachos.

AGRADECIMENTOS

À CAPES e CNPq pelo financiamento deste trabalho.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

1. Condução e avaliação do experimento:

Jéssica Barros Aguiar Silva

Suélen Caroline Frantz

Cristiane Martins Coelho

Dr^a. Anelise Kappes Marques

2. Planejamento, orientação e revisão final do artigo

Dr^a. Paula Benevides de Morais

REFERÊNCIAS

- [1]. RUEGGER, M. J. S.; TAUK-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.2, p.205-211, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042004000200001>
- [2]. BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecologia: de indivíduos a ecossistemas**. Artmed: Porto Alegre. 2007. 752p.
- [3]. GONÇALVES JR, J. F.; GRAÇA, M. A. S.; CALLISTO, M. Litter decomposition in a Cerrado savannah stream is retarded by leaf toughness, low dissolved nutrients and a low density of shredders. **Freshwater Biology**, v.52, n.8, p.1440-1451, 2007. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01769.x>
- [4]. PETZOLD, K.; SCHWIKAL, K.; HEINZE, T. Carboxymethyl xylan – Synthesis and detailed structure characterization. **Carbohydrate Polymers**, v.64, p.292–298, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carpol.2005.11.037>
- [5]. FARINAS, C. S.; LEMO, V.; RODRÍGUEZ-ZUÑIGA, U. F.; BERTUCCI, N. V.; COURI, S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida. **Boletim Nacional de Desenvolvimento**. Embrapa: São Carlos. 2008. 15 p.
- [6]. KURTBÖKE, D.I., SWINGS, J. & STORMS, V. **Microbial genetic resources and Biodiscovery**. In Ipek Kurtböke & Jean Swings (eds.), *Microbial Genetic Resources and Biodiscovery* WFCC Publications, UK.
- [7]. POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIN, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, n.5, p.577-591, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>
- [8]. COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; SANTOS, T. M. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, n.8, p.881-885, 2006. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-005-9118-9>
- [9]. KAR, S.; MANDAL, A.; MOHAPATRA, P. K.; MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Production of cellulase-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 462-464, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000400011>
- [10]. NOGUEIRA, E. B. S.; CAVALCANTI, M. A. Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v.27, n.1, p.7-9, 1996.
- [11]. TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**. v.43, n.4, p.777-780, 1982.
- [12]. FAHEINA Jr., G.; BRAGA, R. M.; LOPES, V. R.; MARTINS, C.; PINTO, G. Atividade xilanolítica em cepas de *Fusarium*. In: XVII SIMPÓSIO

- NACIONAL DE BIOPROCESSOS. 2009. Natal – RN.
- [13]. HRMOVA, M.; BEILY, P.; VRSANKA, M. Cellulose and xylan degrading enzymes by *Aspergillus terreus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.11, n.9 p.610-616, 1989. [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90090-2](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(89)90090-2)
- [14]. POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIN, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, n.5, p.577-591, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>
- [15]. POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIN, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, n.5, p.577-591, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>
- [16]. ABDEL-RAHEEM, A.; SHEARER, C. A. Extracellular enzyme production by freshwater ascomycetes. **Fungal Diversity**, v. 11, p. 1-19, 2002. <http://dx.doi.org/10.1007/13225.1878-9129>
- [17]. KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, v.57, n.5, p.503-507, 2008. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>
- [18]. DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v.5, n.6, p.578-595, 2009. <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.5.578>
- [19]. NEIROTTI, E.; AZEVEDO, J. L. Técnica semiquantitativa de avaliação da produção de celulases em *Humicola* sp. **Revista de Microbiologia**; v. 19, p.78-81. 1988.