

Bioprospecção de fungos endofíticos de *Paullinia cupana* e *Rhizophora mangle* produtores de enzimas lignocelulolíticas

Jéssica de Sá Guimarães Peixoto¹, Paula Marcela Duque Jaramillo², Valquíria Martins Pereira³, Fabrício Machado Silva⁴, Léia Cecília de Lima Fávaro⁵

Resumo

Um dos desafios para a bioconversão de biomassa lignocelulósica é o aumento da eficiência de hidrólise enzimática dos polissacarídeos da parede celular vegetal. Para isso, a prospecção de fungos endofíticos pode ser uma ferramenta promissora para seleção de linhagens com habilidades lignocelulolíticas. Por serem simbiotes das plantas, esses fungos são capazes de produzir enzimas e desconstruir lignocelulose e não têm sido totalmente explorados para produção de enzimas industriais. O objetivo deste trabalho foi avaliar uma coleção de fungos endofíticos de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) e de plantas de manguezal (*Rhizophora mangle*) quanto à produção de enzimas lignocelulolíticas e selecionar potenciais linhagens que possam produzir enzimas para composição de coquetéis catalíticos na etapa de conversão de biomassa lignocelulósica em monômeros de carboidratos. Desse modo, foram avaliadas 304 linhagens de fungos endofíticos quanto à capacidade de degradar polissacarídeos em meio de cultura sólido (Avicel, cmc, xilana, pectina e amido), por meio da determinação do índice enzimático, que é dado pela razão entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia. A identificação dos fungos foi por biologia molecular por meio de análise da sequência da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico. A partir disso, foram selecionadas 30 linhagens promissoras, pertencentes a espécies que não têm sido tradicionalmente utilizadas na bioindústria e que possuem índice enzimático significativo. Essas linhagens poderão ser potenciais candidatos para a produção de extratos enzimáticos capazes de atuar na hidrólise de biomassa lignocelulósica.

Palavras-chave: biomassa lignocelulósica. hidrólise enzimática. fungos filamentosos.

Introdução

A produção de energia e de químicos renováveis a partir da bioconversão de biomassa lignocelulósica é uma alternativa para minimizar a utilização de combustíveis

¹ Bióloga, doutoranda em Tecnologias Químicas e Biológicas, Universidade de Brasília, jessica.peixoto@colaborador.embrapa.br

² Bacteriologista (Biomédica), doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, jaramillo526@gmail.com

³ Graduada Ciências Agrárias, doutora em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, valquiria.pereira@colaborador.embrapa.br

⁴ Engenheiro Químico, doutor em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, professor-adjunto do Instituto de Química da Universidade de Brasília, fmachado@unb.br

⁵ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

fósseis e para agregar valor a diferentes cadeias produtivas. Diante do exposto, o foco das pesquisas atuais direciona-se para a busca por soluções que mantenham integradas todas as etapas do processo, independentemente das diferentes rotas tecnológicas utilizadas, como meio de otimizar a produção do etanol de biomassa.

Dentre os desafios encontrados, pode-se citar o aumento da eficiência da hidrólise enzimática. Uma das barreiras encontradas pelas enzimas hidrolíticas é a recalcitrância da parede celular vegetal e mais especificamente da estrutura de celulose, que permecem na porção interior das microfibrilas emaranhada com a hemicelulose e lignina. A clivagem dos polissacarídeos da parede celular vegetal geralmente é realizada pela ação de enzimas de fungos, como observado na ecologia microbiana de solos de florestas, por exemplo.

O interior das plantas é reconhecido como um nicho prolífico para a descoberta de fungos com novas atividades biológicas (FÁVARO et al., 2012). Nesse contexto, fungos endofíticos, definidos como os que habitam, pelo menos por um período de seu ciclo de vida, o interior da planta sem induzir sintomas de doenças ou produzir estruturas externas (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007) teriam potencial para a produção de enzimas de interesse industrial pouco exploradas até momento (CORREA et al., 2014). O fato de que os endófitos são simbioses das plantas sugere que eles são capazes de produzir enzimas, fazendo-os capazes de desconstruir lignocelulose e convertê-la a açúcares fermentescíveis. Para testar essa hipótese, este estudo realizou a caracterização molecular e enzimática de fungos endofíticos de *Paullinia cupana* e *Rhizophora mangle* visando selecionar novas linhagens produtoras de enzimas degradadoras de parede celular vegetal.

Materiais e Métodos

Linhagens

Neste estudo, foram avaliados 266 fungos endofíticos de guaranazeiro (*Paullinia cupana*) e 38 fungos de uma planta típica de região de mangue (*Rhizophora mangle*). As 304 linhagens encontram-se preservadas na “Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias” da Embrapa Agroenergia. Os fungos foram reativados e cultivados em meio ágar batata-dextrose (BDA) a 25 °C por 7 dias.

Análise de sequência do DNA ribossômico (ITS1-5.8S-ITS2) e classificação taxonômica dos fungos

Os DNAs genômicos das 304 linhagens foram extraídos e utilizados como molde para amplificação por PCR da região ITS do rDNA com os primers ITS1 e ITS4 e sequência parcial do gene da beta-tubulina. Após o sequenciamento, a sequência consenso foi obtida com auxílio do software Geneious v. 9.0. Para classificação taxonômica, as sequências foram avaliadas nas bases de dados: NCBI, CBS, MycoBank, RDP, TrichOKEY e Fusarium-ID.

Índice enzimático: capacidade de produção de enzimas para degradação de polissacarídeos

A produção de enzimas foi avaliada em meio sólido (PONTECORVO et al., 1953) com 1,0% de carboximetilcelulose (cmc), de xilana ou de amido, para detecção de endoglicanase, xilanase e amilase, respectivamente. A degradação de pectina foi analisada em meio contendo 0,5% de pectina, em pH 5,0 e 7,0, para detecção de poligalacturonase e pectina liase, respectivamente (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). A produção de celulases totais foi avaliada em meio mínimo de sais (PONTECORVO et al., 1953) contendo Avicel PH-101 (celulose microcristalina). As linhagens foram incubadas a 25 °C por 6 dias. Os halos de degradação foram revelados com os corantes lugol e vermelho congo. O índice enzimático (IE) foi calculado por meio da razão entre a média do diâmetro do halo e a média do diâmetro da colônia. A produção de celulases totais foi inferida pelo diâmetro das colônias crescidas em meio contendo celulose microcristalina. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram analisados com auxílio do software Genes (CRUZ, 2006) e submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de *Scott-Knott*, ao nível de 5% de significância.

Seleção de linhagens fúngicas promissoras de atividades holocelulolíticas

Os critérios para a seleção de linhagens promissoras quanto à produção de enzimas foram: classificação taxômica, perfil de degradação de polissacarídeos, valores elevados de índice enzimático e análise da literatura. Para a escolha por meio da classificação taxômica, foi adotado o critério de busca por espécies pouco ou não contempladas na literatura, favorecendo as linhagens que não possuem genoma sequenciado, selecionando fungos inéditos quanto ao potencial biotecnológico. Com relação à determinação do perfil de degradação de polissacarídeos (CMC, xilana, pectina e amido), foram considerados os valores de índice enzimático estatisticamente superiores a 1 e a capacidade de cada linhagem de degradar os substratos (degradação exclusiva e /ou simultânea de vários substratos).

Resultados e Discussão

Identificação molecular dos fungos endofíticos presentes em *P. cupana* e *R. mangle*

As 304 linhagens foram cultivadas e submetidas à extração de DNA genômico. Produtos de amplificação únicos da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico foram obtidas para 158 linhagens. A Figura 1 representa algumas linhagens amplificadas utilizando os *primers* ITS1-F e ITS4. Os fungos foram classificados utilizando análise de seqüências contra diferentes bases de dados. As 158 linhagens foram classificadas em 19 gêneros diferentes, conforme mostrado na Figura 2.

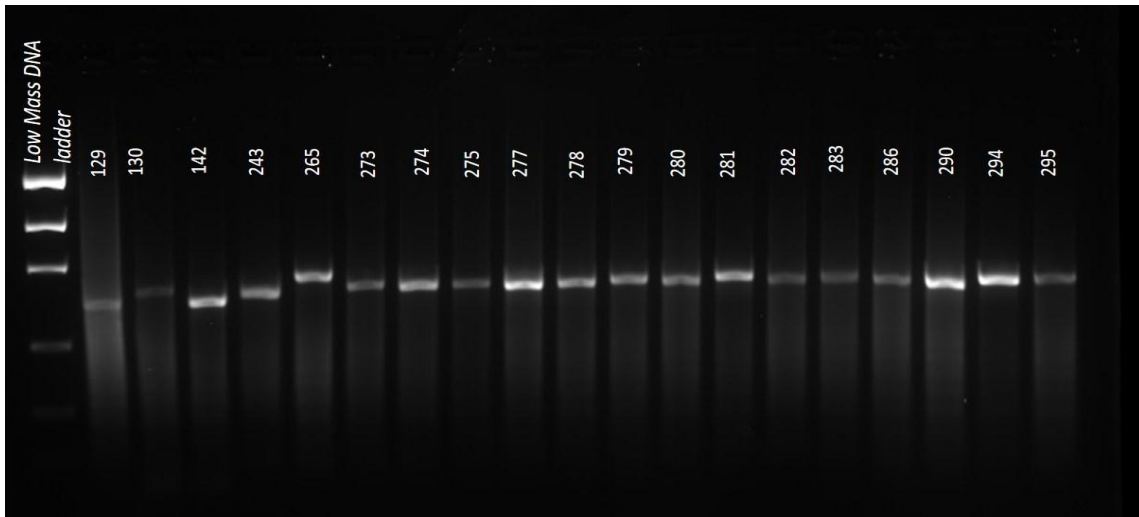


Figura 1. Produtos purificados de amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangue*.

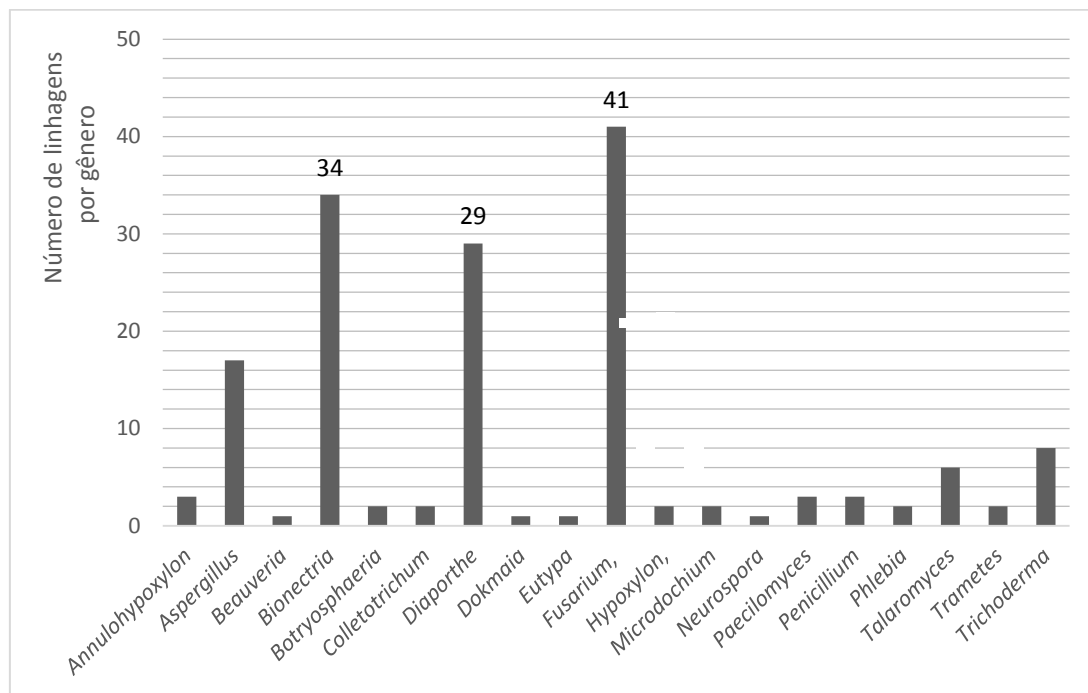


Figura 2. Distribuição de gêneros diferentes entre as 158 linhagens de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangue* que apresentaram sequências de qualidade (região ITS do rDNA ou gene betatubulina).

Das 158 linhagens avaliadas quanto à taxonomia, 5 pertencem ao filo Basidiomycota e 153 pertencem ao filo Ascomycota. Entre os ascomicetos, 123 pertencem à classe Sordariomycetes, 26 pertencem à classe Eurotiomycetes e 4 pertencem à classe Dothideomycetes.

Caracterização enzimática de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle*

A Figura 3 resume os resultados dos testes enzimáticos. Os maiores valores de índice enzimático observados foram: 4,18 ($\pm 0,44$) em cmc (*Diaporthe* sp. CED428); 5,26 ($\pm 1,34$) em xilana (*Bionectria* sp. CE100/161); 6,36 ($\pm 0,07$) em pectina pH 7,0 (*Bionectria* sp. CE100/161); 4,03 ($\pm 0,98$) em pectina pH 5,0 (*Fusarium* sp. CED334); 4,14 ($\pm 0,04$) em amido (*Fusarium* sp. CED334). O crescimento em Avicel foi observado para 301 linhagens, mas somente 40 apresentaram crescimento máximo (≥ 75.0 mm) nesse substrato.

Com a análise de correlação realizada pelo teste de *Scott-Knott* foi possível observar diferenças significativas ($p < 0,01$) quanto à capacidade de produção de enzimas e agrupar as 304 linhagens em 27 perfis distintos (classes fenotípicas), de acordo com o padrão de degradação (simultânea ou exclusiva) dos polissacarídeos avaliados.

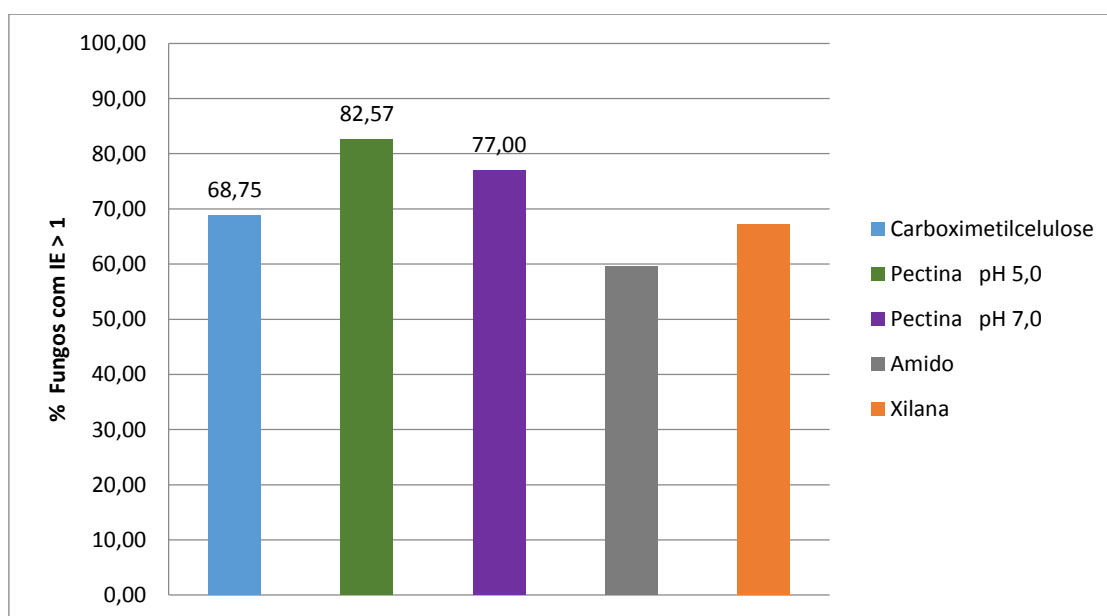


Figura 3. Porcentagem de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* que apresentaram índice enzimático (IE) > 1 em diferentes substratos. A pectina, em pH 5,0, foi utilizada para detecção de poligalacturonase e, em pH 7,0, para pectina liase. Para as demais fontes, utilizou-se o pH 6,0.

Seleção de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* promissores para estudos de hidrólise enzimática

Diante dos critérios adotados para seleção de candidatos para estudos posteriores, como taxonomia, maiores índices enzimáticos e análise de literatura foram selecionadas 30 linhagens promissoras, conforme mostrado na Tabela 1.

As linhagens selecionadas pertencem a espécies e gêneros que não têm sido utilizados para produção de enzimas lignocelulolíticas em nível industrial.

Tabela 1. Linhagens de fungos endofíticos selecionadas com base nos critérios múltiplos: taxonomia, índice enzimático e perfil de degradação de polissacarídeos.

Identificação taxonômica ^(*)	Linhagem	Origem
<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	CED426	<i>P. cupana</i>
<i>Aspergillus</i> sp. (<i>aculeatus</i>)	EP593	<i>P. cupana</i>
<i>Bionectria</i> sp.	CE101/161	<i>P. cupana</i>
<i>Bionectria</i> sp.	CED326	<i>P. cupana</i>
<i>Botryosphaeria</i> sp. (<i>ribis</i>)	EP555	<i>P. cupana</i>
<i>Colletotrichum</i> sp.	CED449B	<i>P. cupana</i>
<i>Criptovalsa</i> sp.	RZ511	<i>P. cupana</i>
<i>Diaporthe</i> sp.	12G	<i>R. mangle</i>
<i>Didymosphaeria</i> sp. (<i>variabile</i>)	EP654	<i>P. cupana</i>
<i>Eutypa</i> sp.	CED428	<i>P. cupana</i>
<i>Fusarium solani</i>	BDA79 (11A)	<i>R. mangle</i>
<i>Fusarium</i> sp.	CED382	<i>P. cupana</i>
<i>Fusarium</i> sp.	BDA6A (2A)	<i>R. mangle</i>
<i>Fusarium</i> sp.	2G	<i>R. mangle</i>
<i>Hypoxyylon investiens</i>	EP647	<i>P. cupana</i>
N.I.	CED413	<i>P. cupana</i>
N.I.	CE101	<i>P. cupana</i>
N.I.	CED412	<i>P. cupana</i>
N.I.	EP551/1	<i>P. cupana</i>
N.I.	CED409	<i>P. cupana</i>
N.I.	CP230	<i>P. cupana</i>
N.I.	BDA64 (9A)	<i>R. mangle</i>
N.I.	CED371	<i>P. cupana</i>
<i>Neofusicoccum</i> sp.	RZ482	<i>P. cupana</i>
<i>Phlebia</i> sp.	CE103	<i>P. cupana</i>
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CED440	<i>P. cupana</i>
<i>Sarocladium</i> sp. (<i>strictum</i>)	CED448	<i>P. cupana</i>
<i>Trametes versicolor</i>	BDA85 (12A)	<i>R. mangle</i>
<i>Trichoderma</i> sp. (<i>lixii</i>)	EP550	<i>P. cupana</i>
<i>Trichoderma spirale</i>	RZ476	<i>P. cupana</i>

^(*) A provável espécie é mostrada entre parênteses. NI (não identificado).

Considerações finais

Os melhores fungos identificados como bons produtores de enzimas pertencem a grupos taxonômicos que não têm sido explorados para bioconversão em nível industrial, tais como *Bionectria*, *Diaporthe* e *Fusarium*. A combinação dos diferentes critérios para seleção de linhagens pode ser uma estratégia promissora para uso em estudos de bioprospecção. Os extratos enzimáticos das linhagens selecionadas serão avaliados na hidrólise de biomassa lignocelulósica de modo a selecionar linhagens que possam ser aplicadas em bioprocessos.

Agradecimentos

À Universidade de Brasília, Capes e Embrapa Agroenergia, pelo apoio concedido na realização deste trabalho.

Referências

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 189-207.

CORRÊA, R. C. G.; RHODEN, S. A.; MOTA, T. R.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A.; MARQUES, S. M. C. C.; POLIZELI, M. L. T. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 2014.

CRUZ, C. D. **Programa genes: estatística experimental e matrizes**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 285 p.

FÁVARO, L. C. L.; SEBASTIANES, F. L. S.; ARAÚJO, W. L. *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, artigo e36826, 2012.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for the detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MCDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics Incorporating Molecular Genetic Medicine**, v. 5, p. 141-238, 1953.