



Atividade Xilanolítica em Cepas de *Fusarium*

Genilton Faheina Junior^{1,2}, Raissa Braga³, Verônica Regina Lopes³, Claudia Martins⁴,
Gustavo Pinto¹

¹ Embrapa Agroindústria Tropical,

Rua Dr^a Sara Mesquita, 2270, Planalto Pici, Fortaleza - CE, e-mail: gustavo@cnpat.embrapa.br

² Universidade Federal do Ceará, Departamento de Tecnologia de Alimentos,

Av. Humberto Monte, 2977, Pici. Fortaleza - CE, e-mail: genilton@gmail.com

³ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Biologia,

Av. Humberto Monte, 2977, Pici. Fortaleza - CE, e-mail: raissa_@hotmail.com, vevelopes@gmail.com.

⁴ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Biologia,

Av. Humberto Monte, 2977, Pici, Fortaleza - CE, e-mail: claudiamartins@ufc.br.

RESUMO

*Devido à grande diversidade de enzimas que secretam no ambiente, os fungos vêm despertando crescente interesse em estudos relacionados à biotecnologia. Dentre as enzimas secretadas por fungos filamentosos estão as xilanases, cujo potencial nas aplicações biotecnológicas tem sido alvo de inúmeros estudos. O trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de produção de xilanases por cepas de *Fusarium*. A capacidade de degradação foi verificada em meio com xilana oalt-spelts ($2,0\text{g.L}^{-1}$) como única fonte de carbono e constatado pelo método de coloração com Vermelho Congo, através da presença de halo de hidrólise. O índice enzimático (i.e.) foi calculado dividindo-se os valores das medidas do halo de hidrólise com o halo de crescimento. Todas as 25 cepas testadas apresentaram halo de hidrólise, destacando-se a cepa LCB 33, isolada de maracujá, com i.e. igual a 1,3. Tais resultados tornam importantes os benefícios que o conhecimento de novas linhagens de fungos promissores pode oferecer.*

Palavras-chave: enzimas, potencial biotecnológico, seleção de fungos.

INTRODUÇÃO

Os fungos vêm despertando crescente interesse em estudos relacionados à biotecnologia devido à grande diversidade de enzimas que secretam no ambiente, sendo responsáveis pela deterioração de vários materiais naturais. Esses microrganismos desempenham um importante papel na natureza por sua capacidade de ciclagem de nutrientes, decompondo resíduos lignocelulósicos (Bennet, 1998). Lima et al. (2005) ressaltam que os fungos filamentosos são os microrganismos com maior importância na biotransformação devido à alta capacidade celular e à versatilidade bioquímica. Assim como Haltrich et al. (1996), que afirmam ser mais vantajosa a produção de enzimas por fungos, devido à facilidade da extração da enzima do ponto de vista comercial.



Dentre as enzimas secretadas por fungos filamentosos estão as xilanases, cujo potencial nas aplicações biotecnológicas tem sido alvo de inúmeros estudos. As enzimas xilanolíticas são produzidas por uma variedade de microrganismos, no entanto os fungos são os produtores principais, secretando xilanases acessórias que auxiliam no branqueamento das xilanas. Atualmente, a produção de xilanases em escala industrial é dominada por espécies de *Trichoderma* e de *Aspergillus* (Haltrich et al., 1996; Phan et al., 1998).

As possibilidades de aplicação da hidrólise da xilana envolvem desde o uso da enzima na digestibilidade de material lignocelulósico para ração animal, ao seu uso na indústria de papel e celulose (Lima et al., 2005). Na indústria de alimentos as xilanases podem ser utilizadas na clarificação de sucos, na fabricação de café solúvel, na produção de leite e derivados, etc. (Teunissen e Camp, 1993).

É de grande interesse estratégico a identificação de microrganismos potenciais produtores de enzimas, pois garante o suprimento destas aos variados processos industriais, desenvolvendo sistemas enzimáticos ímpares (Alves et al., 2002). Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de produção de xilanases por cepas de *Fusarium*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas

Foram utilizadas 25 cepas de *Fusarium* cedidas pela Embrapa Semi-árido (CPATSA) isoladas de: algodão, banana, côco, feijão, helicônia, manga, maracujá, melão, pimentão e uva. Os fungos foram mantidos em meio de cultura Ágar Batata Dextrose, a 4°C no Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT).

Determinação qualitativa da atividade xilanolítica

A atividade de xilanase foi realizada através do método de coloração com Vermelho Congo em meio contendo xilana *oalt-spelts* (SIGMA) como única fonte de carbono (Theater e Wood, 1982). A capacidade de degradação da xilana foi verificada no meio Ágar-xilana de acordo com a composição: MgSO_4 (0,5g.L⁻¹); KCl (0,5g.L⁻¹); NaNO_3 (3,0g.L⁻¹); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01g.L⁻¹); K_2HPO_4 (1,0g.L⁻¹); ágar (15g.L⁻¹); xilana *oat spelts* (2,0g.L⁻¹), em pH 6,0. As placas contendo o meio xilana-ágar foram inoculadas com um repique pontual utilizando-se fungos cultivados em Ágar Batata Dextrose, conservados a 30°C durante 72 horas. Em seguida, os inóculos foram incubados por 96 horas a 28°C.

A cada período de 24 horas, foram medidos os halos de crescimento do fungo tomando o devido cuidado de medir no mesmo horário da inoculação. Após o término do período de incubação, 96 horas, foi adicionado em cada placa 10 mL de solução corante Vermelho Congo (1g.L⁻¹), permanecendo em repouso durante 15 minutos. A solução foi descartada lavando-se em seguida com solução de NaCl 1M e permanecendo com 10 mL da mesma solução em cada placa, por um período de 15 minutos.

A atividade de xilanase foi observada através da presença de zonas claras, indicando halos de hidrólise, ao redor das culturas. O índice enzimático (i.e.) de cada microrganismo foi calculado dividindo-se os valores das medidas do halo de hidrólise com o diâmetro da colônia medido após quatro dias de crescimento.



As cepas que mostraram i.e. maior que 1,0 foram consideradas como produtoras de xilanase. Foram realizadas três séries de experimentos independentes. Para avaliação dos resultados, foram aplicadas análises estatísticas, utilizando-se o teste de Análise de Variância (ANOVA) e o teste *t*, considerando-se 95% de confiança.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 25 amostras do fungo analisadas, todas apresentaram halo de hidrólise, indicativo da atividade de xilanase. A análise dos resultados mostra que a cepa LCB 33 isolada de cultura de maracujá, se destacou das demais com i.e. igual a 1,3. Por outro lado, a cepa LCB 35, isolada de cultura de melão, apresentou o menor i.e. com valor igual a 1,07.

Tabela 1 – Atividade xilanolítica em cepas de *Fusarium* isoladas de diferentes culturas.

Identificação	Cultura	Øc	Øh	i.e.*
LCB 35	Melão	4,8	5,2	1,07 ^a
LCB 42	Melão	4,5	4,9	1,09 ^a
LCB 37	Maracujá	4,4	4,9	1,10 ^a
LCB 36	Pimentão	4,6	5,1	1,10 ^a
LCB 19	Banana	5,1	5,6	1,10 ^{ab}
LCB 41	Feijão	4,3	4,8	1,11 ^{abc}
LCB 40	Feijão	5,0	5,6	1,12 ^{abc}
LCB 15	Melão	4,6	5,1	1,12 ^{abc}
LCB 39	Feijão	5,0	5,6	1,13 ^{abcd}
LCB 43	Maracujá	5,7	6,4	1,13 ^{abcd}
LCB 16	Banana	4,5	5,1	1,14 ^{abcd}
LCB 32	Uva	4,7	5,3	1,14 ^{abcd}
LCB 31	Uva festival	4,8	5,5	1,14 ^{abcde}
LCB 18	Feijão	4,0	4,7	1,16 ^{abcde}
LCB 29	Côco	4,4	5,1	1,17 ^{abcde}
LCB 23	Tomate	4,6	5,4	1,17 ^{abcde}
LCB 30	Maracujá	4,2	5,0	1,17 ^{abcde}
LCB 34	Melão	3,9	4,6	1,18 ^{abcdef}
LCB 17	Algodão	4,4	5,3	1,21 ^{bcdefg}
LCB 20	Feijão	4,0	4,9	1,22 ^{cdefg}
LCB 27	Helicônia	3,2	3,9	1,23 ^{defg}
LCB 21	Manga	4,1	5,1	1,23 ^{defg}
LCB 22	Banana	3,5	4,3	1,25 ^{efg}
LCB 25	Uva	3,5	4,6	1,29 ^{fg}
LCB 33	Maracujá	2,1	2,8	1,30 ^g

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Øc = diâmetro da colônia (cm); Øh = diâmetro do halo (cm); i.e. = índice enzimático.



Os resultados do estudo evidenciaram que as cepas isoladas de maracujá diferiram estatisticamente, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). Deve-se salientar que a habilidade de um fungo em produzir enzimas varia entre espécies, como também entre isolados de uma mesma espécie e é bastante variável. O potencial de produção de enzima pode variar em função da distribuição geográfica do fungo, assim como a idade da planta na qual o microrganismo habita, precipitação anual, etc. (Carrol, 1988; Lima, 2005).

Esses fatores possivelmente influenciaram diretamente os resultados obtidos de uma mesma espécie, como nos apresentados por cepas de *Fusarium* isolados de maracujá. Enquanto a cepa LCB 33 foi isolada em um campo experimental na Caatinga em dezembro de 2004, a cepa LCB 15 foi isolada em junho de 2002, no Distrito Irrigado Senador Nilo Coelho.

Faheina et al. (2008), em estudo com outros isolados de *Fusarium*, também avaliando atividade xilanólítica, constataram que a cepa isolada de cultura de banana apresentou i.e. igual a 1,24. Valor próximo apresentado no presente estudo pela cepa LCB 22, também de de banana, com i.e. igual a 1,25.

De acordo com Ten et al., 2004, o diâmetro do halo de hidrólise é útil como um auxiliar para selecionar cepas com altos níveis de atividade de degradação de polissacarídeos. Além disso, o índice enzimático pode ser utilizado como uma medida simples e rápida para selecionar linhagens com potencial produção de enzimas dentro de uma mesma espécie (Figura 1). A seleção de microrganismos considerados produtores de enzimas inclui a correlação direta entre o diâmetro do halo de hidrólise e a habilidade de degradação da fonte de carbono (Theater e Wood, 1982; Lin et al., 1991).

Kulkarni (1999) enfatiza que, apesar da produção comercial das xilanases se concentrar principalmente nos fungos *Aspergillus sp.* e *Trichoderma sp.*, novas cepas estão sendo identificadas devido à demanda por cepas produtoras de xilanases com maior rendimento, alta estabilidade em condições extremas de temperatura e pH.

A seleção de organismos com características singulares de sobrevivência e habilidade enzimática atende uma necessidade biotecnológica cada vez mais crescente sob o ponto de vista industrial e ambiental. Os resultados obtidos evidenciam que grande parte do potencial de uso da microbiota brasileira permanece por ser levantado.



Figura 1 - Halo de hidrólise em cepa de *Fusarium* isolada de cultura de melão (LCB 34).



CONCLUSÕES

A cepa LCB 33, isolada de maracujá, se destacou das demais com i.e. igual a 1,3. O menor i.e. foi apresentado pela cepa LCB 35, isolada de melão, com valor igual a 1,07. Tais resultados indicam os benefícios que o conhecimento de novas linhagens de fungos promissores, sob o ponto de vista biotecnológico, podem oferecer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, M. H.; Campos-Tagaki, G. M.; Porto, A. L. F.; Milanez, A. I. Screening of *Mucor spp.* for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Braz. J. Microbiol.**, v. 33, n. 4, p. 225-230, 2002.

Bennet, J.W. Mycothecnology: the role of fungi in biotechnology. **J. Biotechnol.**, v.66, p. 101-107, 1998.

Carroll, G.C. Fungal endophytes in stem and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v.69, p.2-9, 1988.

Faheina Junior, G.S.; Braga, R.M.; Martins, S.C.S.; Martins, C.M.; Pinto, G.A.S. Capacidade de produção de xilanase por cepas de *Fusarium*. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, 27., 2008, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UFC, 2008. Disponível em: <http://www.encontrosuniversitarios2008.ufc.br/index.php?option=com_content&view=article&id=144:ciencia-e-tecnologia-de-alimentos&catid=63:trabalhos-aceitos-pesquisa&Itemid=68>. Acesso em: 03 mar. 2009.

Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K. D.; Steiner, W.; Zupancic, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technol.** v.58, p.137-161, 1996.

Kulkarni, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnology aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 411-456, 1999.

Lin, J. E.; Chang, D. C. N.; Shen, G. J. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. **Biotechnol. tech.**, v. 5, n. 5, p. 275-280, 1991.

Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. **Biociencia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. Ed. Edgard Blucher, v. 3, São Paulo, 2005. 535p.

Phan, P.L.; Taillandier, P.; Delmas, M. Strehaiano, P. 1998. Production of xylanases by *Bacillus polymyxa* using lignocellulosic wastes. **Industrial Crops and Products**, v.7: 195 – 203.

Teather, R.M.; Wood, P.J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. **Appl. Environ. Microbiol.** v.43, p.777-780, 1982.

Ten, L.N.; Ima, W-T.; KANGA, M-K.M.S., LEEA, S-T. Development of a plate technique for screening polysaccharide-degrading microorganisms by using of insoluble chromogenic substrates. **J. Microbiol. Methods** v.56, p.375-382, 2004.

Teunissen, M.J.; Camp, H.J.M.O. Anaerobic fungi and their cellulolytic enzymes. **Antonie Leeuwenhoek**, v.63, n.1, p. 63-76, 1993.