



Atividade de Xilanase em Cepas de *Colletotrichum* e *Trichoderma*

Verônica Regina Lopes^{1,2}, Genilton Faheina Junior^{1,3}, Raissa Braga², Maria Aparecida de Jesus⁴, Claudia Martins⁵, Gustavo Pinto¹

1 Embrapa Agroindústria Tropical, Laboratório de Bioprocessos,
Rua Dra Sara Mesquita, 2270, Pici, Fortaleza - CE, e-mail: gustavo@cnpat.embrapa.br

2 Universidade Federal do Ceará, Departamento de Biologia,
Av. Humberto Monte, 2977, Pici, Fortaleza - CE, e-mail: raissa_@hotmail.com, vevelopes@gmail.com.

3 Universidade Federal do Ceará, Departamento de Tecnologia de Alimentos,
Av. Humberto Monte, 2977, Pici, Fortaleza - CE, e-mail: genilton@gmail.com

4 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Patologia das Madeiras,
Av. André Araújo, 2936, Petrópolis. Manaus - AM, e-mail: ranna@inpa.gov.br.

5 Universidade Federal do Ceará, Departamento de Biologia,
Av. Humberto Monte, 2977, Pici, Fortaleza - CE, e-mail: claudiamartins@ufc.br.

RESUMO

As enzimas são elementos catalisadores e, como tal, são o foco de intensa investigação em nível mundial na comunidade biológica. Dentre os microrganismos, os fungos vêm despertando crescente interesse, devido à grande diversidade de enzimas que secretam no ambiente, como as xilanases. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de produção de xilanases por cepas de Colletotrichum e Trichoderma. A capacidade de degradação foi verificada em meio com xilana oat-spelts como única fonte de carbono e constatado pelo método de coloração com Vermelho Congo, obtendo um índice enzimático (i.e.). A cepa Colletotrichum isolada de feijão-caupi obteve maior i.e., igual a 1,12. Por outro lado, com i.e. igual 1,04, a cepa de Trichoderma apresentou o menor i.e.. Todas as cepas de Trichoderma apresentaram maior variação de crescimento colonial, em 96 horas. A seleção de microrganismos com características singulares e habilidade enzimática atende uma necessidade cada vez mais crescente.

Palavras-chave: produção de enzimas, seleção de fungos, xilanase.

INTRODUÇÃO

As enzimas são os elementos catalisadores do metabolismo e, como tal, são o foco de intensa investigação em nível mundial na comunidade biológica. A segunda metade do século XX presenciou expansão de conhecimento sem precedentes sobre a utilização de microrganismos e os seus produtos metabólicos, as enzimas, em diversas áreas da pesquisa (Beg et al., 2001).



Dentre os microrganismos com potencial para aplicações biotecnológicas são os fungos que vêm despertando interesse, 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). Sob o ponto de vista industrial, a importância dos fungos para a produção e comercialização de enzimas está na facilidade das mesmas, uma vez produzidas, de serem extraídas, sem a necessidade de haver ruptura celular (Haltrich et al., 1996).

Atualmente, devido à diversidade tanto de microrganismos quanto de enzimas, muitas são as áreas da pesquisa que envolvem a produção de enzimas hidrolíticas em larga escala para fins industriais. Dentro deste contexto estão as xilanases, enzimas que podem ser produzidas por uma variedade de microrganismos, mas, no entanto, são os fungos filamentosos que se destacam como principais produtores. A produção de xilanases em escala industrial é, atualmente, dominada por espécies de *Aspergillus* e *Trichoderma* (Haltrich et al., 1996; Phan et al., 1998).

As possibilidades de aplicação da hidrólise da xilana são as mais diversas; envolvem desde o uso da enzima na digestibilidade de material lignocelulósico para ração animal, ao seu uso na indústria de papel e celulose (Kulkarni et al., 1999; Lima, 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).

Com intuito de obter maiores conhecimentos, o presente trabalho avalia a capacidade e o potencial de produção de xilanases por cepas de *Colletotrichum* e *Trichoderma* em resposta à presença da xilana como única fonte de carbono.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies de fungos

Foram utilizadas 6 cepas de *Colletotrichum* da coleção de cultura da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT) isoladas de banana, sapoti, feijão-caupi, ata e *Vinca rosea L.* (Boa-noite). Foram também analisadas duas cepas de *Trichoderma* do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Determinação qualitativa da atividade xilanolítica

A atividade de xilanase foi realizada através do método de coloração com Vermelho Congo (Theater e Wood, 1982) em meio contendo xilana *oat-spelts* (SIGMA) como única fonte de carbono. 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. Estas foram incubadas 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 por um período de 15 minutos, 10 mL da mesma solução permaneceu em cada placa.

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 índice enzimático 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

A análise dos resultados indicou que não houve evidências para diferenciar estatisticamente o i.e. das linhagens de *Colletotrichum* e *Trichoderma* testadas (Tabela 1). O i.e. é um parâmetro útil como um auxiliar para selecionar cepas com potencial produção de enzimas por microrganismos, mesmo estes pertencentes a uma mesma espécie, podendo ser utilizado como uma medida simples e rápida para a seleção de linhagens específicas (Ten et al., 2004).

Dentre as cepas de *Colletotrichum* a que apresentou maior i.e., igual a 1,12 foi o isolado de feijão-caupi. O isolado *Colletotrichum* I, obtido de *Vinca rosea* L. apresentou menor i.e., igual a 1,08. Braga et al. (2008), em estudos com os mesmos isolados de *Colletotrichum* analisadas em meio com celulose monocristalina como única fonte de carbono, constataram que o isolado de *Vinca rosea* apresentou i.e. muito próximo, com valor 1,09.

Tabela 1 – Atividade xilanolítica em cepas de *Colletotrichum* e *Trichoderma*

Identificação	Øc	Øh	i.e.*
<i>Trichoderma</i> I (T666)	9,4	9,9	1,04 ^a
<i>Trichoderma</i> II (T300)	11,9	12,4	1,06 ^a
<i>Colletotrichum</i> I (CNPAT023)	3,8	4,1	1,08 ^a
<i>Colletotrichum</i> II (CNPAT022)	3,2	3,5	1,09 ^a
<i>Colletotrichum</i> III (CNPAT028)	3,4	3,7	1,09 ^a
<i>Colletotrichum</i> IV (CNPAT027)	3,2	3,5	1,10 ^a
<i>Colletotrichum</i> V(CNPAT021)	3,6	3,9	1,10 ^a
<i>Colletotrichum</i> VI (CNPAT029)	2,8	3,1	1,12 ^a

*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.

Apesar do fato da produção comercial de xilanases se concentrar principalmente em cepas de *Trichoderma* e *Aspergillus* (Kulkarni et al., 1999), dentre as cepas de *Trichoderma* analisadas no presente estudo, nenhuma se destacou das demais, apresentando i.e. iguais a 1,04 e 1,06, valores abaixo dos apresentados pelas cepas de *Colletotrichum*.

Por outro lado, as cepas de *Trichoderma* apresentaram maior crescimento da colônia em um período de 96 horas (Tabela 1). O crescimento da colônia das cepas de *Trichoderma* nos intervalos de 24 horas variou, em média, de 3 cm a cada medição.

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 endofítico habita, precipitação anual, etc. (Carrol, 1998; Pereira et al., 2006).

Ruegger e Tauk-Tornisielo (2003), por exemplo, em análise do potencial celulolítico de fungos isolados do solo de uma estação ecológica, obtiveram resultados díspares em relação a cepas de *Trichoderma harzianum*. De seis cepas do citado fungo analisadas, apenas dois apresentaram i.e. para celulase, com valores iguais a 1,1 e 4,0. Segundo os autores, o valor do i.e. não foi um parâmetro adequado para comparar a atividade enzimática entre diferentes linhagens, porém serviu como uma medida útil para a seleção de cepas de uma mesma espécie.

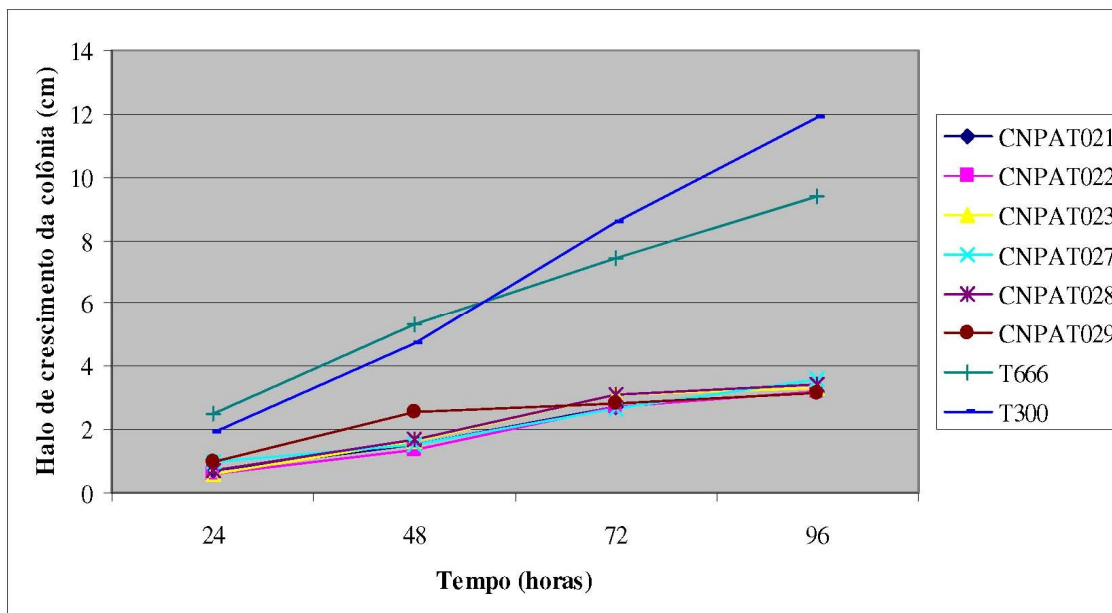


Gráfico 1 – Variação de crescimento da colônia durante o período de 96 horas

A triagem 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. 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).

O enriquecimento dos processos biotecnológicos, com a descoberta de novas linhagens de microrganismos potenciais produtores de enzimas e seu uso em vários processos e produtos irão criar novas soluções industriais para os biocatalisadores e contribuir com novas perspectivas para os problemas ambientais

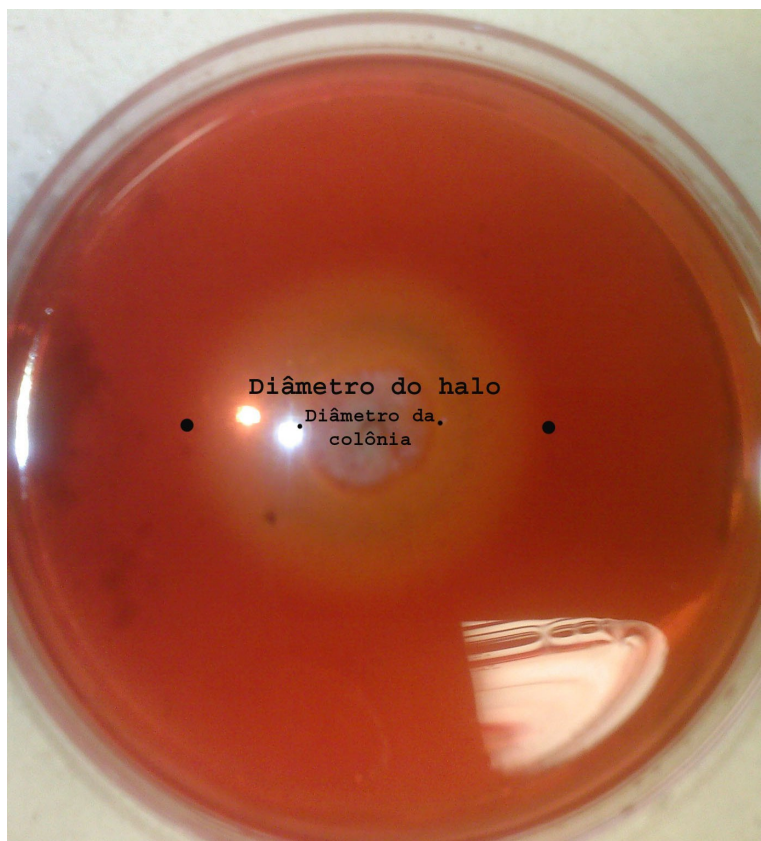


Figura 1: Exemplo de placa de Petri com fungo após experimento, evidenciando os diâmetros da colônia e do halo de hidrólise.

CONCLUSÕES

A partir dos estudos realizados, pôde-se verificar que todos os isolados cresceram em meio contendo xilana como única fonte de carbono, com destaque para as cepas de *Colletotrichum* que apresentaram os maiores i.e., indicando capacidade para síntese de xilanases. Os resultados obtidos evidenciam os benefícios que o conhecimento de novas linhagens de fungos promissores,



sob o ponto de vista biotecnológico, pode 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.
- Beg, Q. K.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Microbiol Biotechnol.**, v. 56, p. 326 – 338, 2001.
- Bennet, J.W. Mycothecnology: the role of fungi in biotechnology. **J. Biotechnol.**, v.66, p. 101-107, 1998.
- Braga, R.M.; Faheina Junior, G.S.; Martins, S.C.S.; Martins, C.M.; Pinto, G.A.S. Atividade de celulase de diferentes fungos filamentosos. In: Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 6., 2008, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UFC. CD-ROM.
- Carroll, G.C. 1988. Fungal endophytes in stem and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v.69, p.2-9, 1988.
- Colen, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases.** 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 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. **Biotechnologia 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.