

## Avaliação da Produção de Celulase por Cepas de *Fusarium*

Raíssa Mesquita Braga<sup>1</sup>, Genilton da Silva Faheina Junior<sup>2</sup>, Verônica Regina de Oliveira Lopes<sup>2</sup>, Suzana Claudia Martins<sup>1</sup>, Claudia Miranda Martins<sup>1</sup>, Gustavo Adolfo Saavedra Pinto<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Ceará – Depto. de Biologia. Caixa Postal 60455-760 Fortaleza – CE.  
E-mail: raissa\_@hotmail.com;

<sup>2</sup> EMBRAPA Agroindústria Tropical. Caixa Postal 60511-110 Fortaleza – CE.

### RESUMO

*A celulose possui um enorme potencial como fonte de energia renovável e a aplicação de celulasas na conversão de biomassas celulolíticas pode prover grandes benefícios econômicos, como produção de biocombustíveis. Além disso, as celulasas possuem uma ampla área de aplicação industrial. Uma grande variedade de microrganismos excreta celulasas, que as utilizam na natureza para decompor resíduos e causar doenças em plantas. Tendo em vista a importância biotecnológica das celulasas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de celulasas por cepas de *Fusarium*, em reposta a presença de celulose como única fonte de carbono. Todas as cepas estudadas apresentaram crescimento no meio analisado. Comparando-se estatisticamente os índices enzimáticos, observou-se que duas cepas isoladas na Bahia e no Ceará destacaram-se das demais. Os resultados obtidos são preliminares e justificam a continuação da seleção de cepas com potencial de produção de celulasas.*

**Palavras-chave:** fungo, enzima hidrolítica, potencial enzimático, celulose.

### INTRODUÇÃO

A celulose é o principal componente da parede celular das plantas. Metade do carbono orgânico na biosfera está contido na celulose, fazendo dela o mais abundante composto orgânico do mundo (Raven et al., 2001). A celulose constitui uma importante fonte renovável de carbono, o que estimula o uso de processos de fermentações celulolíticas e aumenta o interesse em aprimorar a digestibilidade de materiais ligno-celulósicos e em estudos acerca da hidrólise da celulose. Conseqüentemente, tem crescido o interesse no uso industrial de celulasas.

A aplicação de celulasas na conversão de biomassa celulolíticas em açúcares para a fermentação de etanol e outros produtos pode prover grandes benefícios ambientais e econômicos. O desafio chave é transformar essa conversão num processo mais rápido e menos custoso (Himmel et al., 1999).

Combustíveis alternativos aos derivados de petróleo são de grande interesse para reduzir a dependência mundial de recursos não renováveis. O combustível renovável mais comum é o etanol derivado do milho e da cana-de-açúcar. Biomassa lignocelulósica tem sido vista como uma alternativa futura para a produção de etanol. Para isso, devem ser desenvolvidas



tecnologias que permitam que essa conversão seja um processo economicamente vantajoso. Essas tecnologias incluem celulasas bastante efetivas (Gray et al., 2006).

As celulasas possuem uma grande área de aplicação, como na indústria de alimentos, cervejas e vinhos, alimentação de animais, têxtil, polpa e papel, assim como na agricultura e em pesquisas (Bhat, 2000).

Microrganismos que excretam celulasas desempenham um importante papel na natureza por sua capacidade de decompor resíduos lignocelulósicos estabelecendo um elo chave no ciclo do carbono. Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulasas. Apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural (Ruegger e Tauk-Tornisielo, 2004). Num ecossistema típico de decomposição de celulose, uma variedade de bactérias e fungos celulolíticos trabalham conjuntamente para converter substratos celulósicos insolúveis em açúcares solúveis, basicamente celobiose e glicose, que são assimilados pelas células. Para catalisar esse processo, os microrganismos celulolíticos produzem uma variedade de diferentes enzimas, conhecidas como celulasas (Bayer et al., 1998). O termo celulasas se refere a enzimas hidrolíticas e oxidativas que interativamente promovem a degradação da celulose. Existem três principais tipos de enzimas com atividade de celulasas: endo-1,4- $\beta$ -glucanase, celobiohidrolase e  $\beta$ -glucosidase (Goyal et al., 1991; Kvesitadze et al., 1999).

Enzimas celulolíticas ocorrem em diversas classes de fungos, que além de as utilizarem para decomposição de partes duras da planta, utilizam para extensão da parede celular e associações micorrízicas e patogênicas com plantas (Goyal et al., 1991).

Fungos do gênero *Fusarium* sp. são amplamente distribuídos ao redor do mundo e são encontrados no solo ou associados a espécies vegetais. Decompõem matéria orgânica do solo e podem causar inúmeras doenças em diferentes espécies vegetais (Martins, 2005). O presente trabalho teve como objetivo avaliar isolados de fungos filamentosos, do gênero *Fusarium*, quanto à produção de celulasas, em resposta à presença de celulose como única fonte de carbono.

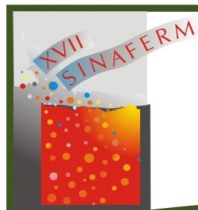
## MATERIAL E MÉTODOS

### Microrganismos

As 25 linhagens de fungos do gênero *Fusarium* provenientes da Coleção de Cultura da Embrapa Semi-Árido (CNPTSA). Os fungos foram conservados em ágar Sabouraud a 4°C, no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Biologia da UFC.

### Atividade Enzimática

A determinação da atividade enzimática foi baseada na metodologia descrita por Teather e Wood (1982). A capacidade de degradação de celulose foi verificada no meio Ágar celulose, de acordo com a composição:  $MgSO_4$  (0,5g.L<sup>-1</sup>); KCl (0,5g.L<sup>-1</sup>);  $NaNO_3$  (3,0g.L<sup>-1</sup>);  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,01g.L<sup>-1</sup>);  $K_2HPO_4$  (1,0g.L<sup>-1</sup>); Ágar-ágar (15g.L<sup>-1</sup>); Celulose microcristalina (5,0g.L<sup>-1</sup>). Os microrganismos foram inoculados com uma alça no centro da placa de Petri contendo o meio de cultura específico. As placas em triplicata foram incubadas por 4 dias a 30°C. Depois desse período, foi vertido sobre as placas 10 mL de solução corante de vermelho congo (1g.L<sup>-1</sup>), após 15 minutos em repouso a solução foi descartada. Em seguida



as culturas foram lavadas com solução de NaCl 2M e deixadas em repouso com esta solução por um período de 15 minutos. A presença de zonas claras ao redor das culturas é indicadora da atividade de celulase, além da magnitude desta. Os diâmetros das colônias e dos halos de hidrólise produzidos foram medidos com régua milimetrada durante os quatro dias, no mesmo horário. O índice enzimático foi calculado dividindo-se os valores desses halos, tendo o halo de crescimento do fungo como denominador.

### **Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA e comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade usando o programa estatístico Sisvar.

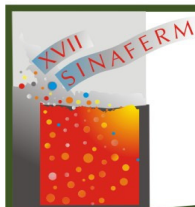
## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

O halo indicador da atividade de celulase foi observado em 23 cepas, ou seja, 92% das cepas analisadas (Figura 1). A análise estatística mostrou que houve diferença entre os índices enzimáticos das linhagens de *Fusarium* analisadas. Duas cepas destacaram-se das demais em relação ao índice enzimático: LCB 25 e LCB 33 apresentaram i.e. de 1,31 e 1,32, respectivamente. No outro extremo, 14 cepas não diferiram estatisticamente entre si, apresentando i.e. menor que 1,06 (Tabela 1). Comparando-se na literatura esses resultados com os de outros gêneros, os i.e. obtidos foram baixos. Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004), avaliando cepas estudadas de fungos isolados da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP, obtiveram i.e. de até 6,00 (*Trichoderma* e *Penicillium*) e Faheina et al. (2007), avaliando cepas de *Lasiodiplodia theobromae* isoladas de cajú, de 1,89. Braga et al (2007), avaliando cepas de *Fusarium*, obtiveram i.e. de até 1,10.

Comparando-se as cepas LCB 25 e 33 com as demais, observou-se que apesar de apresentarem maior índice enzimático, elas apresentaram os menores diâmetros de colônia entre as cepas analisadas: 36,33mm e 26,00mm, corroborando com os dados obtidos por Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004). Esses resultados mostram que mesmo apresentando menor crescimento e, conseqüentemente, menor produção de biomassa, algumas cepas podem possuir um grande potencial de produção e excreção enzimática de celulase. Esse fato revela a importância da análise do índice enzimático obtido através do teste do vermelho congo.

A cepa LCB 25 foi isolada de cultura de uva no município Casa Nova na Bahia e a cepa LCB 33 foi isolada de maracujá na Caatinga no Ceará, revelando um grande potencial da microbiota do Nordeste semi-árido.

Diversos estudos têm sido realizados sobre produção de celulases por fungos, revelando o potencial de vários gêneros, principalmente *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Gao et al., 1999; Kang et al., 2004; Ruegger e Tauk-Tornisielo, 2004; Picart et al., 2007; Ahamed e Vermette, 2008). Outros trabalhos têm revelado o potencial de gêneros menos destacados, como *Lasiodiplodia* e *Fusarium* (Braga et al., 2007; Faheina et al., 2007).

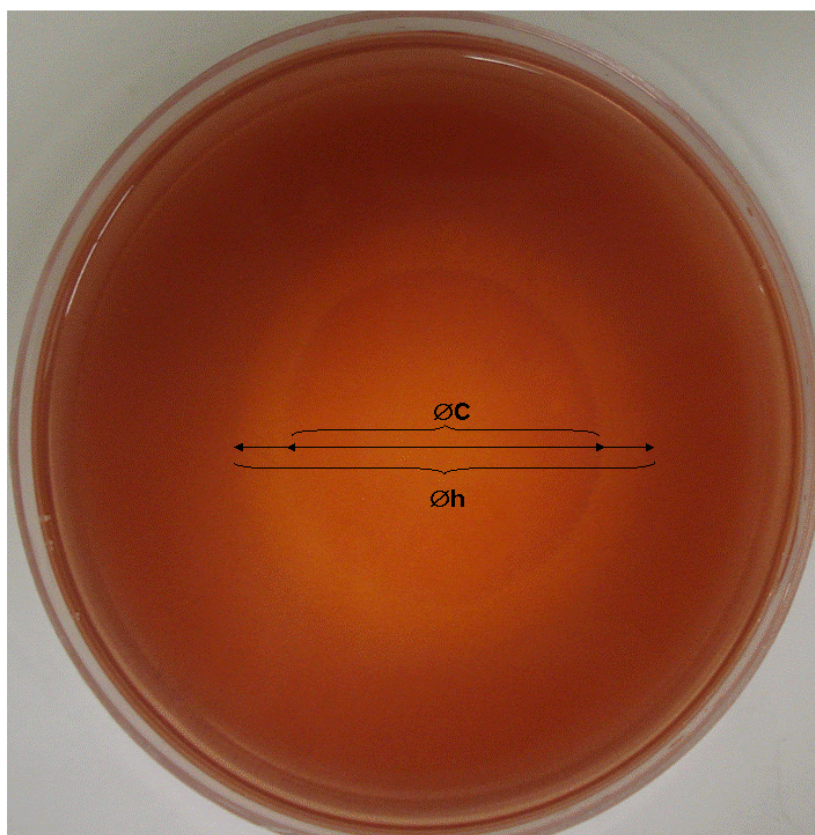


**Tabela 1:** Atividade da celulase de cepas do gênero *Fusarium*, cultivadas em meio ágar celulose por 4 dias a 30 °C.

Cepa	Cultura	øc	øh	IE
LCB 37	Maracujá	50,33±2,9	50,33±2,9	1,00 <sup>a</sup>
LCB 29	Tomate	62,00±2,0	62,00±2,0	1,00 <sup>a</sup>
LCB 34	Melão	48,33±1,5	49,67±2,1	1,03 <sup>ab</sup>
LCB 35	Melão	53,33±4,5	55,33±4,0	1,04 <sup>abc</sup>
LCB 36	Melão	58,33±0,6	60,67±1,2	1,04 <sup>abc</sup>
LCB 41	Feijão	56,33±1,5	58,67±2,1	1,04 <sup>abc</sup>
LCB 39	Feijão	63,67±1,5	66,33±1,2	1,04 <sup>abc</sup>
LCB 40	Feijão	67,00±7,0	70,00±7,0	1,05 <sup>abcd</sup>
LCB 27	Helicônia	50,33±2,1	52,67±1,5	1,05 <sup>abcd</sup>
LCB 16	Uva	53,00±2,6	55,67±2,1	1,05 <sup>abcd</sup>
LCB 19	Banana	56,67±2,1	59,67±3,1	1,05 <sup>abcd</sup>
LCB 31	Uva festival	58,00±0,0	61,33±0,6	1,06 <sup>abcd</sup>
LCB 30	Maracujá	61,33±4,2	65,00±3,0	1,06 <sup>abcd</sup>
LCB 23	Côco	58,67±1,2	62,33±2,3	1,06 <sup>abcd</sup>
LCB 15	Maracujá	59,67±1,5	64,00±1,0	1,07 <sup>bcde</sup>
LCB 32	Banana	52,33±2,1	56,67±2,1	1,08 <sup>bcde</sup>
LCB 22	Banana	47,33±0,6	51,33±1,5	1,08 <sup>bcde</sup>
LCB 43	Melão	54,67±3,5	60,00±3,0	1,10 <sup>cde</sup>
LCB 20	Feijão	53,67±4,0	59,00±3,6	1,10 <sup>cde</sup>
LCB 18	Feijão	50,00±2,6	55,00±1,7	1,10 <sup>cde</sup>
LCB 17	Algodão	51,33±0,6	56,67±0,6	1,10 <sup>cde</sup>
LCB 42	Melão	53,00±1,0	59,00±1,0	1,11 <sup>de</sup>
LCB 21	Manga	44,33±4,6	50,33±4,7	1,14 <sup>e</sup>
LCB 25	Uva	36,33±0,6	47,67±1,5	1,31 <sup>f</sup>
LCB 33	Maracujá	26,00±1,7	34,33±1,2	1,32 <sup>f</sup>

øc = diâmetro da colônia (mm); øh = diâmetro do halo (mm); Ie = índice enzimático; (-) = não produziu halo. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.





**Figura 1:** Placa de Petri com fungo após experimento, evidenciando o halo de hidrólise.  $\phi c$  = diâmetro da colônia (mm);  $\phi h$  = diâmetro do halo (mm).

## CONCLUSÕES

Todos os isolados avaliados cresceram em meio contendo celulose como única fonte de carbono, indicando sua capacidade de síntese de enzimas celulolíticas. Contudo, a cepa LCB 33 destacou-se, pois suas colônias apresentaram Índice Enzimático de 1,32.

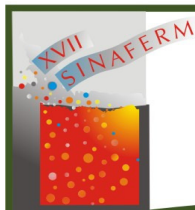
## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahamed, A. e Vermette, P. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. v. 42, p. 41–46.

Bayer, E. A.; Chanzyt, H.; Lamed, R. e Shoham, Y. (1998), Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 8, p. 548-557.

Bhat, M. K. (2000), Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. v. 18, p. 355-383.

Braga, R. M.; Faheina Jr.; G. S.; Martins, S. C. S.; Martins, C. C. e Pinto, G. A. S. Seleção de cepas de *Fusarium* produtoras de celulase. *Anais da XIII Semana universitária da UECE*, Fortaleza, 2008.



Faheina Jr., G. S.; Martins, C. M. e Pinto, G. A. P. Atividade da celulase por cepas de *Lasiodiplodia theobromae* isoladas de caju. *Anais do V Congresso Brasileiro de Micologia*, Recife, 2007.

Gao, J.; Weng, H.; Zhu, D.; Yuan, M.; Guan, F. e Xi, Y. (2008), Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology*. v. 99, p. 7623–7629.

Goyal, A.; Ghosh, B. e Eveleigh, D. (1991), Characteristics of Fungal Cellulases. *Bioresource Technology*, v. 36, p. 37-50.

Gray, K. A.; Zhao, L. e Emptage, M. (2006), Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*. v. 10, p. 141-146.

Himmel, M. E.; Ruth, M. F. e Wymans, S. E. (1999), Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 10, p. 358-364.

Kang, S. W.; Park, Y. S.; Lee, J. S.; Hong, S. I. e Kim, W. (2004), Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. v. 91, p. 153–156.

Kvesitadze, E.; Adeishvili, E.; Gomarteli, M.; Kvachadze, L. e Kvesitadze, G. (1999), Cellulase and xylanase activity of fungi in a collection isolated from the southern Caucasus. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 43, p. 189-196.

Martins, M. K. (2005), Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira. *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.

Picart, P.; Diaz, P. e Pastor, F. I. J. (2007), Cellulases from two *Penicillium* sp. strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization. *Letters in Applied Microbiology*. v. 45, p. 108–113.

Raven, P. H.; Evert, R. F. e Eichhorn, S. E. (2001), *Biologia Vegetal*, 6a. ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro - Brasil.

Ruegger, M. J. S. e Tauk-Tornisielo, S. M. (2004), 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.

Teather, R. M. e Wood, P. J. (1982), 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.