ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS COM ATIVIDADE LIGNOLÍTICA E CELULOLÍTICA DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Albuquerque, E.D.[1]; Loss, R.[2]; Chiaradia, A.C.N.[3]; Fernandes, P.M.B.[3]

[1]Aluna do curso de Doutorado em Biotecnologia – RENORBIO/UFES; [2]Aluno do curso de Mestrado em Biotecnologia – UFES; [3]Professora Doutora do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – UFES.

INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos não causam danos à planta e podem ser isolados de tecidos vegetais desinfectados superficialmente. Possuem uma relação mutualística com as plantas hospedeiras, recebendo nutrientes e proteção, tornando a planta mais competitiva a ambientes de estresse. Porém, quando a planta se encontra em condições adversas, o endófito tornar-se patógeno ou saprófita.

Para colonizar os tecidos vegetais, estes são capazes de produzir enzimas, tais como lignases e celulases, que quebram a parede celular dos vegetais (SCHULZ *et al*, 2002). As celulases e lignases são muito utilizadas na indústria alimentícia e de bebidas, como também na produção de papel, em indústria têxtil e no processo de produção de biocombustível (WILSON *et al*, 2009). *Monotospora* sp, *Fusicoccum* sp e *Periconia* sp são alguns dos fungos endofíticos relatados por produzir celulases e lignases. O endófito *Periconia* sp, produz β – glucosidase com alta atividade, a enzima é termoestável e resistente a variações de pH (HARNPICHARNCHAI *et al*, 2009).

Estas enzimas possuem um alto custo de obtenção, e para diminuir estes custos vários resíduos agroindustriais estão sendo utilizados como substrato para produção de celulases por fungos (FARINAS *et al,* 2008). Visto que fungos endófitos são capazes de produzir enzimas com alta atividade, objetivou-se isolar os mesmos da casca do coco e do bagaço da cana-de-açúcar e testar suas atividades lignolíticas e celulolíticas para posterior produção de enzimas a partir de resíduos agroindustriais.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Isolamento: As amostras de bagaço de cana-de-açúcar e da casca de coco foram coletadas em condições estéreis e cortadas em pedaços de 1 cm^2, e lavados em água corrente, e posteriormente em água com detergente, em etanol 70% por 30 segundos e por último em hipoclorito 10% por 5 minutos. Após, foram lavadas em três águas destiladas estéreis dentro da câmara de fluxo laminar, e adicionadas em meio mínimo contendo: 20 g de xilose, 6.7 g de yeast nitrogen base e 100 mg de cloranfenicol por litro. Da última água de lavagem foi retirada uma alíquota e adicionada em meio YEPD para controle. Após um período de 7 dias, uma alíquota de 200 µl do crescimento dos fungos foi adicionada em meio YEPD e as placas incubadas a 28ºC. Após crescimento, as colônias dos fungos foram selecionadas e purificadas em YEPD com 100 mg de cloranfenicol por litro.

Seleção dos fungos celulolíticos e lignolíticos: Para identificar a atividade celulolítica, os isolados fúngicos foram crescidos em meio sintético com carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono ($NaNO_3$: 3,0 $g.L^{-1}$; K_2HPO_4: 1,0 $g.L^{-1}$; $MgSO_4$: 0,5 $g.L^{-1}$; KCl: 0,5 $g.L^{-1}$; $FeSO_4.7H_2O$: 10,0 $mg.L^{-1}$; CMC: 10,0 $g.L^{-1}$; ágar: 20,0 $g.L^{-1}$). Os inóculos dos fungos foram obtidos com palitos, e semeados em placa de petri com meio sintético CMC. Após 5 dias de crescimento a 28 ºC, as placas foram coradas com vermelho congo 0,2% durante 15 minutos e depois lavadas com água destilada e com NaCl 1M por 15 minutos. A presença da atividade celulolítica é observada ao redor da colônia pela formação de um halo amarelado contrastrando com o vermelho do corante na área não degradada . O tamanho das colônias e dos halos de inibição foram medidos com paquímetro (RUEGGER *et al*, 2003). A atividade lignolítica foi identificada pela reação de Bavendamm em meio sólido malte (extrato de malte: 20,0 $g.L^{-1}$, 20,0 $g.L^{-1}$de bacto ágar, 5 $g.L^{-1}$de ácido tânico, pH = 4,5).

As placas de petri contendo os inóculos dos fungos foram incubados a 28ºC no escuro. Após, foi observada diariamente a formação de halo amarronzado ao redor da colônias.

Análise da liberação de glicose em meio contendo resíduos como única fonte de carbono: Os fungos com atividade lignolítica e celulolítica foram crescidos em meio líquido contendo: 20 $g.L^{-1}$de pó da casca de coco pré-tratada em sonicador por 30 minutos, 5 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura e de peptona (pH:5,6) (JEYA *et al* , 2009). Os inóculos foram adicionados ao meio e colocados sobre agitação por 3 dias. Os níveis de glicose foram medidos utilizando-se um glicosímetro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados 28 fungos endofíticos, dos quais 7 apresentaram atividade celulolítica **(Tabela 1)** e apenas 2 apresentaram atividade lignolítica **(Figura 1)**. Dos 7 fungos com atividade celulolítica, o de maior atividade foi o isolado da casca de coco verde, CCYNB7, com índice enzimático de 2,6 **(Tabela 1)**. De acordo com Ruegger *et al* (2003), índices enzimáticos em torno de 2,6 são valores encontrados em fungos filamentosos do gênero *Penicillium* sp, e índices em torno de 1,6 em fungos do gênero *Aspergillus* sp .

Tabela 1 – Atividade celulolítica de fungos endofíticos isolados de resíduos agroindustriais em Vitória/ES, cultivados em meio sintético com carboximetilcelulose por 5 dias a 28 ºC.

Isolados	Amostra	Fungo	Øc	Øh	Ie
BGYNB4	Bagaço	Filamentoso	15	32	2,13
BGYNB8	Bagaço	Filamentoso	10	24	2,40
BGYNB12	Bagaço	Filamentoso	26	38	1,46
BGYNB13	Bagaço	Filamentoso	10	16	1,60
BGYNB16	Bagaço	Filamentoso	14	18	1,30
CCYNB7	Casca do coco	Filamentoso	10	26	2,60
BGYNB1	Bagaço	Levedura	3	4	1,30

Øc = diâmetro da colônia (mm); Øh = diâmetro do halo (mm); Ie = índice enzimático (mm).

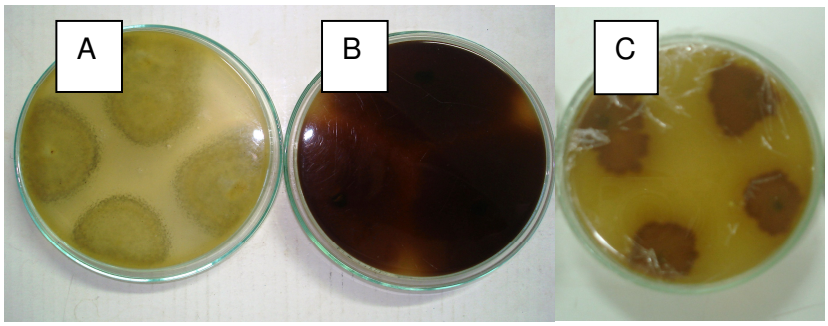


Figura 1 – Reação de Bavendamm para atividade lignolítica. (A) Controle, sem atividade. (B) BGYNB20, com intensa atividade. (C) CCYNB7, com baixa atividade.

Os fungos CCYNB7 e BGYNB20 foram crescidos em meio de cultura com o resíduo da casca de coco triturado, e somente CCYNB7 disponibilizou níveis de glicose **(Tabela 2)**, demonstrando a presença de celulase do tipo β - glicosidase. Esta enzima é capaz de clivar a celobiose em duas moléculas de glicose, na etapa final do processo lignocelulolítico. Para que ocorra a quebra de lignocelulose disponibilizando a glicose, são necessárias enzimas tais como: lignases, xilanases e celulases. Já que o fungo CCYNB7 disponibiliza a glicose, então ele possui enzimas capazes de degradar a lignina, hemicelulose e xilana, polímeros que envolvem a celulose e dificultam a atividade celulolítica (HARNPICHARNCHAI *et al*, 2009). Estes dados comprovam a atividade lignolítica e celulolítica do isolado CCYNB7.

Tabela 2 – Média dos níveis de glicose em meio de cultura líquido, contendo resíduo da casca de coco, submetidos à ação das enzimas dos fungos: CCYNB7 e BGYNB20.

Tratamentos	**Glicose ($mg.dL^{-1}$)**
CCYNB7	40
BGYNB20	0
Controle (sem inóculo)	0

CONCLUSÕES

Fungos endofíticos com atividade celulolítica e lignolítica podem ser isolados de resíduos agroindustriais. O fungo CCYNB7 foi capaz de produzir enzimas e disponibilizar a glicose a partir de resíduos agroinsdustriais, demonstrando que endófitos podem ter potencial biotecnológico para obtenção de enzimas lignocelulolíticas.

REFERÊNCIAS

HARNPICHARNCHAI, P.; CHAMPREDA, V.; SORNLAKE, W.; EURWILAICHITR, L.. **A thermotolerant β-glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars.** Protein Expression and Purification, v. 67 2009. p.61–69.

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 Brasil. Bot., V.27, n.2, 2004. p.205-211.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, Anne-Katrin; KROHN, K.. **Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites.** Mycol. Res.. v.**106** (9) : 2002. p.996-1004.

WILSON, D.B.. **Cellulases and biofuels**. Current opinion in Biotechnology. v.20. 2009. p. 295–299.

FARINAS, C. S.; LEMO, V.; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U.F.; NETO, V. B.; COURI, S.. **Avaliação de Diferentes Resíduos Agroindustriais como Substratos para a Produção de Celulases por Fermentação Semi-sólida.** Boletim de pesquisa e desenvolvimento 22 – EMBRAPA. 2008. p.17.

JEYA, M.; ZHANG, Y.M.;KIM, I.W.; LEE, J.K . **Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from Trametes hirsuta and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM**. Bioresource Technology 100, p.5155–5161. 2009.


CBRO
Congresso Brasileiro
de Resíduos Orgânicos