

IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE CELULASE A PARTIR DE SOLO DE ÁREAS CULTIVADAS E SUA UTILIZAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS VEGETAIS

Jhennifer R. do Amaral¹ (IC)*, Nayane N. dos Santos¹ (IC), Saulo J. L. de Siqueira¹ (PQ)

¹ Universidade Estadual de Goiás, Campus Palmeiras de Goiás. Palmeiras de Goiás-GO, Brasil.

E-mail: jhenniferamaral@hotmail.com

Resumo: Resíduos de biomassa vegetal são gerados em grandes quantidades todos os anos no Brasil devido sua alta capacidade de produção agrícola. Aliado a isso, a biodiversidade do país, especialmente do Cerrado, gera um potencial para produção de enzimas fúngicas para aplicação biotecnológica. O objetivo deste trabalho foi identificar fungos celulolíticos isolados de áreas cultivadas e sua aplicação na degradação de resíduos vegetais para produção de celulases. Foram identificados fungos celulolíticos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, sendo que um dos isolados apresentou 0,07U/mL de atividade enzimática após crescimento em palha de milho.

Palavras-chave: Enzimas. Fermentação semi-sólida Biomassa. Biotecnologia. *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp.

Introdução

Devido ao aumento sucessivo da produção agrícola, há uma alta geração de resíduos vegetais nas safras brasileiras. Estes resíduos são de grande potencial econômico apesar de ainda serem pouco explorados e haver pouca informação referente aos processos de aproveitamento destes produtos e ao uso potencial da biomassa produzida (EPE, 2014)

Os resíduos lignocelulósicos de biomassa de fontes agrícolas são basicamente compostos por hastes de plantas, palhas, folhas e cascas. Estima-se que a quantidade de resíduo gerado seja o dobro da quantidade do produto colhido para uso comercial. No caso da soja, uma das culturas de maior comercialização, o total de resíduos transformados em biomassa equivale a aproximadamente 2,12 toneladas em base seca (EPE, 2014). Dentre outros resíduos, destacam-se também o bagaço de cana, a palha de milho e o farelo de trigo como resíduos de biomassa (SANCHES, 2009 apud DELABONA, 2011).

Os fungos são responsáveis pela degradação de matéria orgânicas, entre estes estão os compostos celulósicos encontrados no solo e tecidos vegetais. A

degradação desse composto é de grande importância, pois garante uma rica fonte de energia, já que a celulose é o biopolímero mais abundante do planeta. Com importante função de reciclagem de nutrientes, suas atividades dependem da matéria orgânica encontrada no solo, esta também determina a ocorrência e distribuição desses organismos (PELCZAR JR; CHAN; KRIENG, 1997; RUEGGER; TAU-K-TORNISIELO, 2004)

Enzimas são moléculas capazes de acelerar as reações químicas e estão presentes em todas as células. Celulases são enzimas responsáveis pela degradação da celulose, principal composto presente na parede dos vegetais. As celulases são enzimas que possuem capacidade de romper as ligações glicosídicas de microfibrilas da celulose, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose e se encontram na natureza como um complexo multienzimático. A microbiota do solo é importante devido a sua influência na qualidade do solo e, consequentemente, na produtividade agrícola, atuando na degradação dos resíduos lignocelulolíticos produzidos pelos cultivares (CASTRO, PEREIRA, 2010). A análise e a Identificação de fungos celulolíticos isolados de áreas cultivadas são importantes para que sejam utilizados na degradação de rejeitos agrícolas produzidos nessas áreas e outros tipos de resíduos que tenham alto teor de celulose (CARVALHO; 2008; MONTEIRO, 2012; SILVA et al., 2012). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi identificar parcialmente fungos celulolíticos isolados de solo de áreas de cultivo no Cerrado e testar sua produção de enzimas em resíduos de biomassa agrícola.

Material e Métodos

Área de estudo e cultivo dos fungos – Os fungos analisados pertencem ao grupo de Estudo de Fungos da UEG Campus Palmeiras e foram previamente isolados de amostras de solo em área experimental utilizadas para cultivo no Campus da Universidade Estadual de Goiás no Município de Palmeiras de Goiás (Latitude: 16, 823704 Longitude: 49,923148) em trabalhos anteriores (FERREIRA, 2014; MOURA, 2014).

Os fungos foram cultivados em placas de Petri, em temperatura ambiente variando entre 20 a 30 °C, em meio PPS (Czapeck modificado – Agar 1,5%, Peptona 0,5%, Na₂HPO₄ + H₂O 0,1%, KCL 0,05%, MgSO₄ 0,05%) ou YPD (Agar 1,5%, Peptona 2%, Extrato de Levedura 1%, Glicose 0,5%) contendo agente

antibacteriano, o crescimento foi observando em placa entre 4 a 7 dias. A seleção dos isolados produtores de celulasas foi feita através do método de coloração Vermelho Congo (THEATER; WOOD, 1982) em meio PPS contendo Carboximetilcelulose (CMC 0,5%).

Microcultivo – Um cubo do meio PPS novo foi colocado sobre uma lamina esterilizada, contida em uma placa de Petri estéril. Os fungos foram inoculados na parte superior do cubo de meio de cultura, e após recoberto com lamínula esterilizada. As placas foram mantidas à temperatura ambiente (20 a 30°C) e o desenvolvimento das hifas foi observado em microscópio (LEVY, 2004). Em algumas situações o micélio foi corado usando solução de Vermelho Congo 0,1% para melhorar a visualização das estruturas. As imagens obtidas foram feitas através de câmera fotográfica com a visualização no microscópio. A identificação foi baseada nas características morfológicas dos isolados. Para a identificação das espécies, foram utilizadas literaturas contendo chaves e fotos para identificação (NAVY et al., 1999; WATANABE, 2010).

Degradação de Resíduos por Fermentação semi-sólida – Para o cultivo dos fungos foram utilizadas a palha de milho e o farelo de trigo como resíduo de biomassa vegetal. A fermentação foi feita conforme Gama (2016), com adaptações. Para a fermentação semi-sólida foram utilizados dois frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL, cada frasco contendo 5g da fonte de carbono com 15mL de solução de sais (Na_2HPO_4 0,1%, KCL 0,05%, MgSO_4 0,05%) autoclavado. A esse meio foram adicionados 10 discos de 5mm de diâmetro de placas contendo os fungos crescidos. Os frascos foram mantidos em temperatura ambiente por um período de 7 dias. Para a extração das celulasas foram acrescentados aos frascos 50mL de água contendo 0,1% de Tween-80. Os frascos foram deixados em repouso por 1 hora com agitação manual periódica. A suspensão da solução foi filtrada em gaze e o material sólido mais fino separado do sobrenadante por centrifugação por 10 minutos a 3000rpm.

Análise da produção de Celulasas – Os ensaios enzimáticos foram feitos usando-se o método de ácido dinitrosalicílico (ADNS) (MILLER, 1959, com modificações). Foram misturados 400 µl de carboximetilcelulose 0,5% em Tampão Acetato de Sódio a 0,1 M a pH 5,0 a 600 µl de solução obtida da fermentação semi-sólida contendo celulasas. Os tubos foram incubados em banho-maria com temperatura de 50 °C por 50 minutos. Ao final da reação foi adicionado 1 mL de ADNS aos tubos e colocados em água em processo de ebulição por 5 minutos para

reação de detecção de açúcares redutores. Após a retirada dos tubos as soluções foram lidas no comprimento de onda de 540nm no espectrofotômetro. Uma unidade de celulasas foi definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1 μ mol de equivalentes de glicose por minuto de reação.

Resultados e Discussão

Para a identificação de fungos produtores de celulasas, foram analisados fungos de solo de diferentes áreas utilizadas para cultivo do campus da UEG Palmeiras de Goiás, isolados em trabalhos anteriores (FERREIRA, 2014; MOURA, 2014). Foram analisados 5 fungos de área sem cultivo (SCU), 3 fungos de área de cultivo de soja (SJU) e 3 de área de cultivo de sorgo (SRU), totalizando 11 isolados. Destes, apenas 2 não apresentaram produção de celulasas. A Tabela 1 mostra os dados da análise de produção de celulasas dos isolados selecionados.

Tabela 1 - Atividades da celulase de fungos isolados de solos de cultivo.

Código dos Isolados	Raio da Colônia (cm)	Raio de Atividade Enzimática (cm)	Índice Enzimático (IE)	Produção de Celulase
SCU MA 2:1	1,70	3,40	2,00	Sim
SJU-2.1	3,30	4,00	1,74	Sim
SJU-5.1	2,60	3,70	1,42	Sim
SJU- I	1,50	2,10	1,40	Sim
SCU-8.3	2,80	3,70	1,32	Sim
SRU-5	2,85	3,65	1,28	Sim
SCU MA 1:1	1,50	1,90	1,26	Sim
SCU-12.3	2,50	3,00	1,20	Sim
SRU- 4	3,00	3,50	1,17	Sim
SRU-2.2	3,50	0,00	0,00	Não
SCU-2	2,00	0,00	0,00	Não

Dos isolados analisados, 6 foram identificados parcialmente usando as imagens do microcultivo nas análises, chegando-se aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. A Figura 1 mostra as imagens obtidas e a classificação parcial de cada um dos isolados analisados.

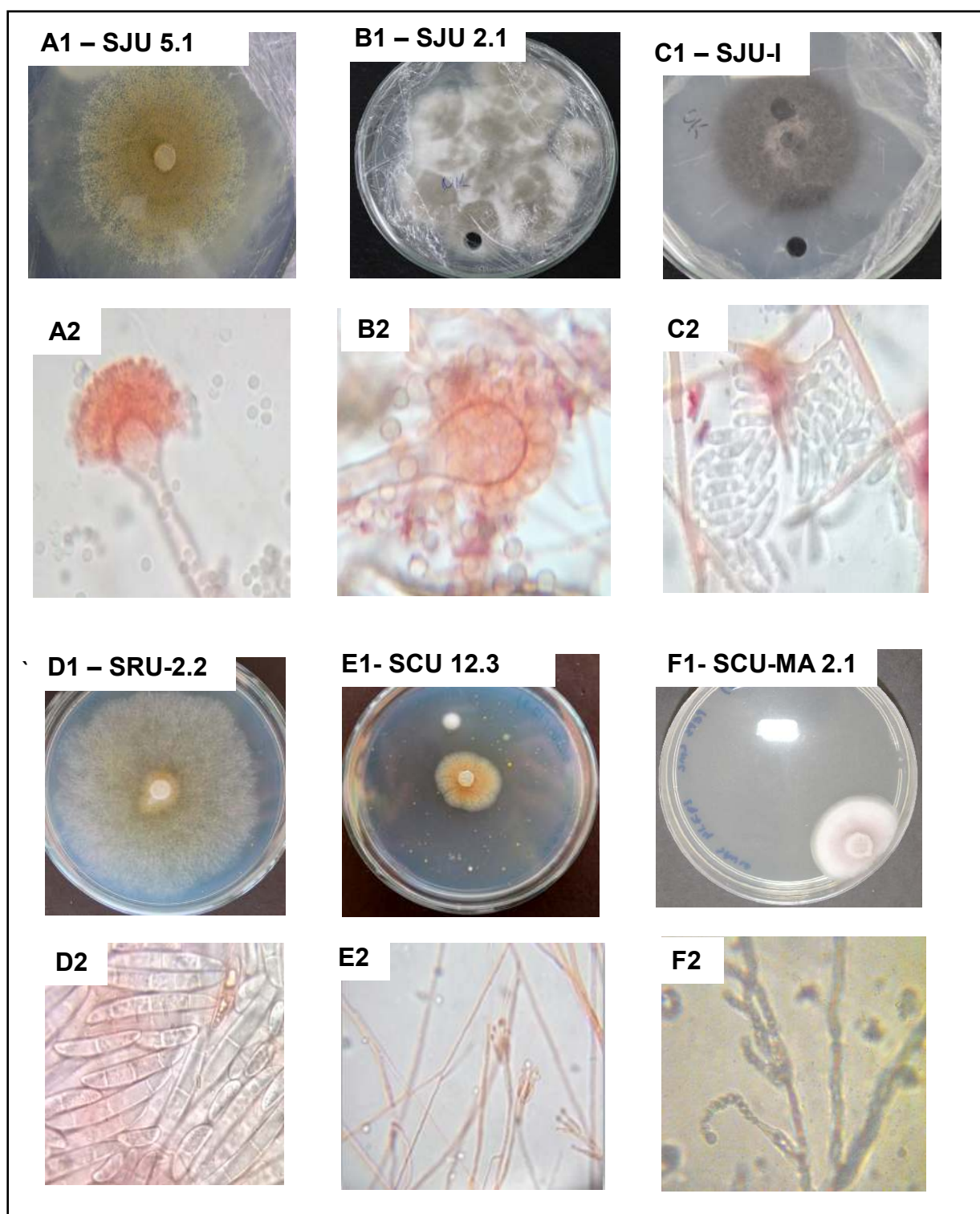


Figura 1. Morfologias em placa com meio PPS (1) e micrografias (2) obtidas dos isolados com identificação parcial. A – SJU-5.1; B – SJU-2.1; C – SJU-I; D – SRU-2.2; E – SRU-5 e F – SCU-MA 2.1. A e B – *Aspergillus* sp.; C e D – *Fusarium* sp.; E e F – *Penicillium* sp.

Para analisar a atividade fúngica de degradação de biomassa foi realizado experimento de fermentação semi-sólida usando biomassa vegetal e ensaio enzimático para análise de celulasas. Foram escolhidos 3 isolados, sendo um de maior índice enzimático, um intermediário e um de baixo índice enzimático (SCU MA 2.1/16 IE=2,0, SJU 5.1 IE=1,42 e SCU 12.3 IE=1,20). O isolado SJU-5.1 foi identificado como sendo do gênero *Aspergillus sp*, e os isolados SCU-12.3 e SCU-MA 2.1 como sendo *Penicillium sp*.

A Tabela 2 mostra o resultado da atividade de celulasas produzida por cada fungo após 7 dias de crescimento em farelo de trigo e em palha de milho, respectivamente, por fermentação semi-sólida. Os dados mostram que maior atividade de celulasas para o farelo de trigo foi do isolado SCU-12.3 (*Penicillium sp*.) e para a palha de milho foi do isolado SJU-5.1 (*Aspergillus sp*.).

Tabela 2. Atividade enzimática dos isolados em Farelo de Trigo utilizado no crescimento por fermentação semi-sólida.

Fonte De Carbono	Código do Isolado (Gênero)	Média da Atividade (U/mL)	Desvio Padrão
FARELO DE TRIGO	SCU-MA2.1 (<i>Penicillium sp.</i>)	0,0102	± 1,87%
	SCU-12.3 (<i>Penicillium sp.</i>)	0,0193	± 0,66%
	SJU-5.1 (<i>Aspergillus sp.</i>)	0,0110	± 2,34%
PALHA DE MILHO	SCU-MA2.1 (<i>Penicillium sp.</i>)	0,0135	± 4,96%
	SCU-12.3 (<i>Penicillium sp.</i>)	0,0247	± 15,2%
	SJU-5.1 (<i>Aspergillus sp.</i>)	0,0742	± 2,85%

Não houve correlação entre os resultados do ensaio de detecção de celulase em placa para os resultados da fermentação semi-sólida, pois o fungo com maior índice enzimático (SCU-MA 2.1) foi o que apresentou menor produção de celulasas nas duas fontes de carbono. Para os isolados analisados, a palha de milho se mostrou melhor indutor de celulasas que o farelo de trigo. O isolado SJU-5.1 apresentou produção de celulasas cerca de 7 vezes maior em palha de milho que em farelo de trigo.

Vários trabalhos tem tido como foco o uso de rejeitos de biomassa lignocelulósica como fonte para produção de enzimas por fungos. Usando metodologia semelhante à utilizada neste trabalho, Almeida (2013) obteve em

fermentação em estado sólido com um isolado de *Aspergillus fumigatus* atividade enzimática de 0,38 U/mL com palha de milho e 0,07U/mL em farelo de trigo. Delabona (2011), isolando fungos celulolíticos da Amazônia, obteve maior produção de celulasas em fermentação em estado sólido usando farelo de trigo com isolados do gênero *Aspergillus*. Foram isolados ainda fungos do gênero *Trichoderma* e *Mucor* com atividade celulolítica. A autora menciona ainda o gênero *Penicillium* como sendo um dos principais gêneros utilizados como fontes de celulasas para aplicações industriais. Almeida (2013) analisou um isolado do gênero *Penicillium* em farelo de trigo em fermentação em estado sólido como bom produtor de celulasas.

Estes dados corroboram o potencial de produção de celulasas pelos isolados de fungos analisados neste trabalho. Novos ensaios com variação no método de fermentação e otimização da extração podem permitir que melhores resultados sejam obtidos de modo a explorar melhor a capacidade enzimática dos isolados do Cerrado.

Considerações Finais

O Brasil tem um grande potencial para produção de enzimas, especialmente celulasas devido à grande de produção de biomassa lignocelulósica gerada pela agricultura, que muitas vezes é rejeitada, e também devido ao potencial genético de seus micro-organismos nos diferentes biomas, especialmente o Cerrado conhecido por sua rica biodiversidade.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que com sua bondade me fortalece todos os dias.

Agradeço ao meu orientador o Dr. Saulo José Linhares de Siqueira que com imenso profissionalismo e companheirismo me auxiliou e tornou possível esta pesquisa. Sou grata a minha querida colega e colaboradora Nayane pelo auxílio no desenvolvimento do projeto e ao meu querido colega Carlos Alexandre que disponibilizou parte do material necessário para que fosse possível a realização do experimento.

Agradeço a minha família pelo incentivo e confiança. Ao meu esposo e filho pela paciência e compreensão e por todo apoio a mim prestado.

Agradeço ao Campus da UEG de Palmeiras de Goiás pela estrutura disponibilizada a mim e a toda a equipe de técnicos de laboratório pelo auxílio e disponibilidade em minhas atividades.

Referências

ALMEIDA, M. **Seleção de fungos filamentosos produtores de xilanases e celulasas utilizando resíduos agroindustriais**. Dissertação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2013.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. **Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais**. Química Nova, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

DELABONA, P.S. **Bioprospecção de fungos produtores de celulasas da região amazônica para a produção de etanol celulósico**. Dissertação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

FERREIRA, J. M. R. **Isolamento de fungos celulolíticos do solo de áreas cultivadas em palmeiras de goiás**. Trabalho de Conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da UEG – Campus de Palmeiras de Goiás. Palmeiras de Goiás, 2014.

LEVY, C. E. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. ANVISA. Módulo VII. 2004. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/microbiologia/mod_7_2004.pdf. Acesso em 13 de março de 2016.

MILLER, G.L., **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. Anal. Chem., 31, 426, 1959.

MONTEIRO, M.C.P. **Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado**. Dissertação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MOURA, G.S. **Isolamento de fungos celulolíticos do solo de áreas de Cerrado de Palmeiras de Goiás.** Trabalho de Conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da UEG – Campus de Palmeiras de Goiás. Palmeiras De Goiás, 2014.

NAVY, S.S., BANDYOPADHYAY, R., HALL, A.J., AND BRAMEL-COX, P.J. **A pictorial guide for the identification of mold fungi on sorghum grain.** Information Bulletin no. 59 (In En. Summaries in En, Fr). Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 1999.

PELCZAR JR; CHAN; KRIENG. **Microbiologia: conceitos e aplicações.** 2 ed. V. 2. p. 306-309, cap. 28, microbiologia do solo e do ar. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 1997. Biblioteca

Rio de janeiro. EPE. Nota técnica DEA 15/14 de outubro de 2014. **Inventario Energético de resíduos rurais.** Disponível em: http://www.epe.gov.br/mercado/documents/série_estudos_de_energia/dea_15_-_14_-_inventário_energético_de_resíduos_rurais.pdf. Acesso em: 19 jul. 2017.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-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, p.205-211, Rio Claro-SP, abr.-jun. 2004.

SANTOS, F. R. S. **Produção e caracterização de celulases e hemicelulases por linhagens fúngicas mesófilas isoladas do cerrado sul-mato-grossense.** Dissertação em Ciência e tecnologia ambiental, Universidade de federal da Grande Dourados, Dourados, 2014.

SILVA, N.S.; SILVA, A.P.; BATISTA, S.B.; HARDOIM, E.L. **Análise qualitativa de bactérias com atividades enzimáticas celulolíticas e proteolíticas isoladas de solo adicionado de vinhaça.** Revista de Biologia e Ciências da Terra. Vol. 12. nº 1. 2012.

WATANABE, T. **Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi**: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton. 2010.