

Otimização das condições de cultivo do fungo filamentososo *Fusarium* sp. EA 1.3.7 para a produção de xilanases

Eloísa Alves Nogueira ¹
Tarcisio Michael Ferreira Soares de Oliveira ¹
Ingrid Cristina Santos Amorim ¹
Tássio Brito de Oliveira ²
David Lee Nelson ³
Vivian Machado Benassi ^{1*}

¹ Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri *campus* JK, MG 367, Km 583, 5.000, Alto da Jacuba, CEP 39.100-000, Diamantina – MG, Brasil

² Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, CEP 14.040-901, Ribeirão Preto – SP, Brasil

³ Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri *campus* JK, MG 367, Km 583, 5.000, Alto da Jacuba, CEP 39.100-000, Diamantina – MG, Brasil

* Autor para correspondência
vivian.benassi@ict.ufvjm.edu.br

Submetido em 29/09/2020

Aceito para publicação em 18/01/2021

Resumo

As xilanases são enzimas muito utilizadas em processos industriais, como no branqueamento de papel, indústria de panificação, clarificação de sucos e cerveja, maltagem e na produção de biocombustíveis, devido aos inúmeros benefícios e vantagens que o catalisador biológico apresenta. Nesse contexto, objetivou-se bioprospectar fungos filamentosos, selecionar um fungo potencial produtor de xilanases, otimizar a produção enzimática e realizar a caracterização bioquímica da enzima. Das onze morfoespécies de fungos filamentosos isolados a partir de três amostras de materiais orgânicos coletadas no solo da cidade de Diamantina, Minas Gerais, Brasil, selecionou-se o *Fusarium* sp. EA 1.3.7 como fungo potencial xilanolítico. As condições de cultivo do microrganismo foram padronizadas em meio submerso CP, durante seis dias, a 30°C, utilizando como fonte de nitrogênio a peptona, e o farelo de trigo como fonte de carbono; as xilanases produzidas apresentaram maiores atividades a 52°C e pH 5,3.

Palavras-chave: Bioprospecção; Condições de cultivo; Enzimas; Microrganismo

Abstract

Optimization of the culture conditions of the filamentous fungus *Fusarium* sp. EA 1.3.7 for the production of xylanases. Xylanases are enzymes widely used in industrial processes, such as paper bleaching, the bakery industry, juice and beer clarification, malting, and the production of biofuels, due to the benefits and advantages of the biological catalyst. In this context, we aimed to bioprospecting filamentous fungi, select a potential xylanase-producing fungus, optimize the enzymatic production, and perform the biochemical



characterization of the enzyme. Eleven filamentous fungi with distinct morphology were isolated from three samples of organic materials collected in the soil of the city of Diamantina, Minas Gerais, Brazil, and *Fusarium* sp. EA 1.3.7 was selected as a potential xylanase-producer. The best growth conditions for the production of xylanase were standardized in a submerged CP medium, for six days, at 30°C, using peptone as a nitrogen source, and wheat bran as a carbon source; the xylanases produced showed greater activities at 52°C and pH 5.3.

Key words: Bioprospecting; Cultivation conditions; Enzymes; Microorganism

Introdução

A celulose e a hemicelulose são os polissacarídeos mais abundantes na natureza, respectivamente, sendo observada uma média de 5% da constituição da parede primária e 20% da parede secundária dos vegetais composta por xilana, um dos polissacarídeos constituintes da hemicelulose (POLIZELI, 2009).

As xilanas são formadas por resíduos de D-xilose unidos por ligações *O*-glicosídicas do tipo β -(1→4), possuindo um grau de polimerização na faixa de 70 a 200 resíduos (PEDERSEN et al., 2007). Devido a sua alta complexidade, a sua clivagem requer a ação de um complexo enzimático, chamado de complexo xilanolítico, composto por diversas xilanases.

Essas enzimas possuem uma ampla aplicação industrial, podendo ser utilizadas na indústria de alimentos, bebidas, de papel e celulose, na formação de produtos químicos, ração animal, tratamento de tecidos, entre outras. Vale citar que, o uso de enzimas como catalisadores biológicos em processos industriais, ao invés de catalisadores químicos, é mais vantajoso devido a formação de produtos mais puros, além de ser biodegradáveis, reutilizáveis, sintetizadas em grande escala e em processos mais rápidos, além de exigir condições menos severas nas operações (SILVA, 2016). Com isso, a busca contínua por microrganismos produtores de xilanases é de grande interesse do ponto de vista biotecnológico para a obtenção de novas enzimas mais adaptadas a esses processos.

Nas últimas décadas, a utilização de fungos filamentosos em bioprocessos ganhou importância devido à sua produção de enzimas com características físico-químicas variadas e com potencial para a aplicação industrial (TROIANO et al., 2020). A capacidade de síntese em grande escala, bem como a

facilidade com que são secretadas para o meio externo, o fácil manuseio, as condições de cultivo facilmente controladas (SUGIHARTO, 2019), a menor demanda por espaço e o rápido crescimento onde há fonte de carbono associada ao calor e à umidade, constituem algumas dessas características marcantes (TREVISAN, 2004). Além disso, por serem decompositores naturais no meio ambiente, possuem uma alta diversidade metabólica, e podem ser cultivados em meio relativamente simples, como, por exemplo, em resíduos agroindustriais.

Esses resíduos, ricos em materiais lignocelulósicos, são amplamente produzidos pela atividade agrícola e industrial tais como cascas, bagaço de cana-de-açúcar, palha e farelo de arroz, palha e farelo de trigo, palha de bananeira, resíduo de algodão, papéis e papelão. A maioria desses materiais é aproveitada parcialmente ou descartada, sendo transformados em poluentes ao meio ambiente. No entanto, são materiais que podem agregar valor tecnológico sendo utilizados como substratos para a produção de enzimas por fermentação microbiana (BENASSI et al., 2012; MICHELIN et al., 2012).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar a prospecção de fungos filamentosos produtores de enzimas do complexo xilanolítico. Além disso, foram avaliadas as melhores condições de cultivo do microrganismo selecionado *Fusarium* sp. EA 1.3.7 para otimizar o processo de obtenção das xilanases, seguindo a caracterização bioquímica da enzima.

Material e Métodos

Os microrganismos isolados foram cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), número A64AD93.

Coleta de amostras, isolamento e caracterização morfológica macroscópica dos isolados

Coletaram-se três diferentes amostras de materiais orgânicos no solo da região de Diamantina, Minas Gerais, Brasil, para o isolamento de fungos filamentosos, sendo essas: (1) amostra EA 1, folha em decomposição; (2) amostra EA 2, folha e (3) amostra EA 3, semente. O material foi coletado utilizando-se pinças e luvas previamente, posteriormente foram armazenados em frascos de vidro vedados por algodão hidrofóbico. Todos os materiais utilizados foram previamente autoclavados a 120°C, 1,5 atm, durante 30 minutos.

Os materiais foram transportados de forma estéril para o laboratório de pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) *campus* JK, onde cada amostra coletada foi posta diretamente sobre uma placa de Petri contendo, de 15 a 20 mL de meio de cultivo sólido composto por Farinha de Aveia Quaker® 4% (m/v) e Ágar Bacteriológico 2% (m/v), proposto por Emerson (1941).

Os meios foram incubados a 30°C, durante quatro dias, sendo analisado o crescimento de fungos filamentosos, a cada 24 h. Vale citar que, o isolamento foi realizado de acordo com a observação das características morfológicas como as cores das colônias, aspecto, borda, textura e pigmentação (DOMSCH et al., 2007). À medida que os espécimes cresciam, os mesmos foram repicados, pontualmente ao centro de outra Placa de Petri, contendo o meio de cultivo sólido proposto por Emerson (1941), a 30°C, para a obtenção de culturas puras.

As cepas foram mantidas em meio sólido (EMERSON, 1941) inclinados em tubos de ensaio. Os repiques foram realizados periodicamente, sendo mantidos a 30°C em estufa bacteriológica durante sete dias e, posteriormente, armazenados a 4°C.

Análise do efeito da temperatura no crescimento dos fungos filamentosos isolados e na produção enzimática

Os microrganismos foram repicados em meio de cultivo sólido composto por xilana beechwood Sigma® na concentração de 1% (m/v) e Ágar Bacteriológico 2% (m/v), sendo mantidos em estufa bacteriológica a diferentes temperaturas, 30°C; 35°C e 40°C, por 51 h, com posterior medição do halo de crescimento fúngico e análise da taxa de crescimento em centímetro por hora (cm.h⁻¹) (BENASSI et al., 2014).

Triagem dos fungos filamentosos produtores de xilanases

Para identificar o melhor produtor de xilanases, os fungos filamentosos selecionados para o cultivo em meio submerso foram os identificados como EA 1.2.1; EA 1.2.2; EA 1.3.1; EA 1.3.3; EA 1.3.7 e EA 1.4.1, os quais obtiveram maior crescimento em meio de cultura sólido composto por xilana beechwood 1% (m/v).

Os fungos foram inoculados em meio submerso CP (PEIXOTO et al., 2003) utilizando-se farelo de trigo como fonte de carbono, sendo incubados a 30°C, durante quatro dias, em estufa bacteriológica de forma estacionária. Posteriormente, os meios foram filtrados utilizando-se bomba à vácuo, e o extrato enzimático bruto obtido foi utilizado para quantificar a atividade xilanolítica.

Identificação molecular do fungo filamentosso selecionado para a produção de xilanases

Para a identificação molecular, o DNA genômico dos isolados foi extraído realizando lise física do micélio utilizando um protocolo desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da Universidade de São Paulo. O micélio foi macerado em tampão de lise TES (Tris 100 mM; EDTA 10 mM; SDS 2%) com o uso de pistilo, e em seguida incubado a 65°C, durante 15 min. Após esse período, foi adicionado 140 µL de NaCl 5 M e incubado em gelo durante 30 min. Posteriormente, foi adicionado 600 µL de clorofórmio:

álcool isoamílico (24:1) e os tubos foram centrifugados a 10.000 G, durante 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e foram adicionados 300 µL de isopropanol e 50 µL de acetato de sódio 3M (pH 5,2). O material foi centrifugado nas condições citadas anteriormente e, após descartar o sobrenadante, foi feita uma nova lavagem com 600 µL de etanol 70%, seguida de uma nova etapa de centrifugação. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o pellet diluído em 50 µL de TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM) com 5 µL de RNase (10 mg.mL⁻¹).

Após extração do DNA, a região ITS foi amplificada com os *primers* ITS4 e ITS5. As reações de amplificação foram realizadas utilizando o kit PCR Master Mix Promega® seguindo as instruções do fabricante. O produto da reação foi visualizado após eletroforese em gel de agarose 1%, os quais foram corados com Nancy Sigma-Aldrich® e visualizados em transiluminador UV.

A purificação da reação de amplificação foi realizada com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Cleanup System* Promega® e quantificado em NanoDrop® Thermo Scientific®. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit *BigDye® Terminator Cycle Sequencing* Life Technologies®, segundo o protocolo do fabricante, e aplicados em sequenciador ABI 3500XL Life Technologies®. As sequências *forward* e *reverse* geradas foram checadas quanto à qualidade e reunidas em uma sequência consensus utilizando BioEdit v. 7.0.5.3. Os *contigs* foram comparados com sequências homólogas presentes em bancos de dados públicos como o NCBI-GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) através da ferramenta BLASTn.

Inóculo do fungo selecionado em meios de cultura submersos

O processo de inóculo consistiu na raspagem dos tubos de manutenção do fungo e diluição dos esporos em cerca de 5 mL de água destilada, previamente autoclavada, com posterior transferência de 1 mL do volume total da suspensão dos isolados (1,27 x 10⁶ esporos.mL⁻¹) para Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL do meio submerso estéril.

Obtenção da massa micelial e do extrato bruto enzimático

A massa micelial foi obtida através da filtração à vácuo com o auxílio de um funil de Büchner e papel de filtro Unifil®, 12,5 cm de diâmetro (SOUZA et al., 2020). Após a secagem, a massa micelial foi pesada em balança analítica. Os filtrados contendo as enzimas extracelulares foram submetidos à medição do pH, volume e dosagem enzimática para a determinação da atividade xilanolítica.

Determinação da atividade enzimática utilizando-se o método sacarificante

A determinação da atividade xilanolítica foi realizada utilizando como substrato a xilana beechwood Sigma® na concentração de 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5. A determinação ocorreu pela formação dos açúcares redutores durante a incubação da enzima com a xilana, utilizando-se o ácido 3',5'-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

A reação enzimática constituiu-se da incubação de 1500 µL do substrato xilana com 1500 µL do extrato bruto extracelular, em banho-maria a 55°C, durante 5 minutos. Decorrido o tempo, alíquotas de 500 µL da reação enzimática foram retiradas e adicionadas em tubos contendo 500 µL de DNS. Posteriormente, os tubos foram fervidos por 5 minutos e, após o resfriamento, adicionou-se 5 mL de água destilada. O branco consistiu de uma alíquota de 500 µL da mistura de reação adicionada imediatamente à 500 µL de DNS, denominada de tempo zero da reação.

As leituras foram realizadas a 540 nm em espectrofotômetro RayLigh UV – 2601®. O método foi previamente padronizado por uma curva padrão de xilose (0,1 a 1,0 mg.mL⁻¹), sendo a unidade de atividade (U.mL⁻¹) definida como a quantidade de enzima que hidrolisou um µmol de substrato por minuto por mL, nas condições de ensaio.

Efeito do meio de cultura submerso na produção xilanolítica e do tempo de crescimento do fungo para a produção enzimática

Diferentes meios de cultura submersos foram analisados para a produção xilanolítica pelo fungo *Fusarium* sp. EA 1.3.7, contendo farelo de trigo como fonte de carbono. Inoculou-se 1 mL da solução de esporos do microrganismo em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL dos meios de cultura: Meio CP (PEIXOTO et al., 2003), Meio Khanna (KHANNA et al., 1995), Meio SR (RIZZATTI et al., 2001) e Meio Adams (ADAMS, 1990), mantidos em estufa bacteriológica, a 30°C, por sete dias, sendo que a cada 24 h, triplicatas dos meios foram retirados, filtrados e determinou-se a atividade xilanolítica.

Análise de diferentes fontes de nitrogênio do meio de cultura submerso para o crescimento do fungo e produção xilanolítica

Cultivou-se o fungo *Fusarium* sp. EA 1.3.7 em 25 mL de meio submerso CP contendo farelo de trigo como fonte de carbono, sendo analisadas sete diferentes fontes de nitrogênio e um meio controle sem fonte de nitrogênio (Tabela 1) (SOUZA et al., 2020).

Realizou-se o inóculo de 1 mL da solução de esporos, sendo os meios mantidos em estufa bacteriológica, a 30°C, por seis dias, de forma estacionária. Decorrido

o tempo de incubação, os meios foram filtrados e determinou-se a atividade xilanolítica.

Efeito da solução de sais do meio de cultura na produção enzimática

O teste do efeito de diferentes soluções de sais do meio de cultura submerso CP, contendo farelo de trigo como fonte de carbono, foi realizado utilizando-se as soluções: (1) sais do próprio meio CP (KH_2PO_4 0,03% (m/v) e MgSO_4 0,05% (m/v)); (2) sais do meio SR (KH_2PO_4 0,015% (m/v), MgSO_4 0,012% (m/v) e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,05% (m/v)); (3) sais Wesson Cinética® 0,05% (m/v), (4) sais do meio CP + sais do meio SR, (5) sais Wesson Cinética® + sais CP, (6) sais SR + sais Wesson Cinética®, (7) sais CP + sais SR + sais Wesson Cinética® e (8) controle sem solução de sais (SOUZA et al., 2020).

Realizou-se o inóculo de 1 mL de solução de esporos em 25 mL de cada meio estéril, os meios foram mantidos em estufa bacteriológica, a 30°C, por seis dias, de forma estacionária. Decorrido o tempo de incubação, os meios foram filtrados e determinou-se a atividade xilanolítica.

Efeito da fonte de carbono do meio de cultura para uma maior produção enzimática

Realizou-se o inóculo de 1 mL de solução de esporos do fungo *Fusarium* sp. EA 1.3.7 em 25 mL do meio submerso CP contendo sais do meio SR, 0,8%

TABELA 1: Determinação da fonte de nitrogênio do meio de cultivo submerso CP para o crescimento do fungo *Fusarium* sp. EA 1.3.7 e produção xilanolítica.

Meios	Fonte de Nitrogênio
1	0,8% (m/v) extrato de levedura
2	0,8% (m/v) peptona
3	0,8% (m/v) ureia
4	0,4% (m/v) extrato de levedura e 0,4% (m/v) peptona
5	0,4% (m/v) extrato de levedura e 0,4% (m/v) ureia
6	0,4% (m/v) peptona e 0,4% (m/v) ureia
7	0,27% (m/v) extrato de levedura, 0,27% (m/v) peptona e 0,27% (m/v) ureia
8	sem fonte de nitrogênio (controle)

(m/v) de peptona como fonte de nitrogênio, variando-se as fontes de carbono, sendo elas: farelo de trigo, casca de laranja, casca de mandioca, casca de abóbora, casca de abacate e casca de batata. Os meios foram mantidos em estufa bacteriológica, a 30°C, por seis dias, de forma estacionária. Decorrido o tempo de incubação, os meios foram filtrados e determinou-se a atividade xilanolítica.

Determinação do efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática

O fungo filamentososo foi cultivado em meio submerso CP, a 30°C, utilizando peptona como fonte de nitrogênio, farelo de trigo como fonte de carbono, durante seis dias, de forma estacionária. Decorrido o tempo de incubação, os meios foram filtrados para a determinação das características bioquímicas da xilanase.

Para determinar o efeito das variáveis temperatura (X1) e pH (X2) sobre a reação enzimática utilizou-se o método de Planejamento Experimental de dois níveis, composto por três repetições de pontos centrais (0) e dois pontos externos (+/- α), em um total de 11 experimentos. O valor calculado para os pontos externos foi 1,41 (Tabela 2). O planejamento do experimento foi analisado utilizando-se o *software* Protimiza Experimental Design. Vale citar que foram utilizados os tampões acetato de sódio 100 mM para os pH 3,0; 3,6 e 5,0; e fosfato de sódio 100 mM para os pH 6,4 e 7,0.

TABELA 2: Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a determinação do efeito da temperatura e do pH na atividade xilanolítica.

Experimento	pH	Temperatura (°C)
1	-1 (3,6)	-1 (36)
2	1 (6,4)	-1 (36)
3	-1 (3,6)	1 (64)
4	1 (6,4)	1 (64)
5	-1,41 (3,0)	0 (50)
6	1,41 (7,0)	0 (50)
7	0 (5,0)	-1,41 (30)
8	0 (5,0)	1,41 (70)
9	0 (5,0)	0 (50)
10	0 (5,0)	0 (50)
11	0 (5,0)	0 (50)

Reprodutibilidade dos resultados

Todos os experimentos foram realizados de forma independente e em triplicata, os resultados apresentados são a média dos valores obtidos e o desvio padrão das análises.

Resultados

Isolamento e caracterização dos fungos filamentosos

Um total de onze fungos filamentosos foi isolado a partir das amostras coletadas, sendo nove microrganismos da amostra EA 1, folha em decomposição, sendo esses fungos identificados como EA 1.2.1; EA 1.2.2; EA 1.2.3; EA 1.3.1; EA 1.3.3; EA 1.3.5; EA 1.3.7; EA 1.3.8 e EA 1.4.1; um isolado de folha, amostra EA 2, identificado como EA 2.3.2; e um da semente, amostra EA 3, organismo identificado como EA 3.3.2 (Figura 1).

Mediante a caracterização morfológica dos isolados foi observado que apenas quatro fungos filamentosos isolados identificados como EA 1.2.1; EA 1.3.1; EA 1.3.7 e EA 2.3.2 apresentaram pigmentação nos tons das suas colorações, e quanto ao aspecto dos fungos, a maioria deles possuiu um aspecto seco, exceto os fungos EA 1.3.1 e EA 1.3.7, que possuíram bordas bastante úmidas e o centro com hifas de aspecto seco (Tabela 3).

O isolado EA 1.2.1 apresentou hifas brancas, base rosada e uma textura de camurça, por sua vez o isolado EA 1.2.2 possuiu apenas hifas amarelas e uma textura pulverulenta, o fungo EA 1.2.3 apresentou uma textura algodosa com bordas brancas e centro esverdeado, e o microrganismo EA 1.3.1 possuiu hifas brancas e uma base rosa escuro com textura algodosa, semelhante ao isolado EA 1.3.7, que também apresentou uma textura algodosa, hifas brancas e base roxa (Tabela 3).

FIGURA 1: Fungos filamentosos isolados em meio de cultivo sólido composto por Farinha de Aveia Quaker® e Ágar Bacteriológico, a 30°C.

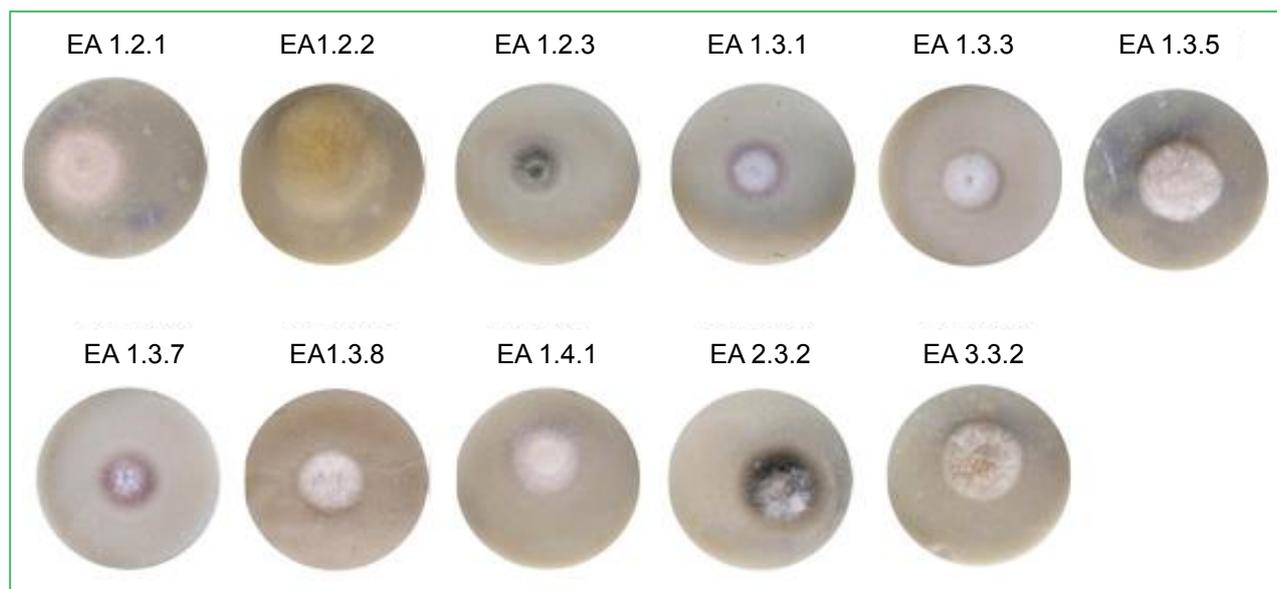


TABELA 3: Características morfológicas macroscópicas dos fungos filamentosos isolados em meio de cultura sólido, a 30°C, durante 51 h de cultivo.

Características Morfológicas Macroscópicas					
Fungo	Cor	Aspecto	Borda	Textura	Pigmento
EA 1.2.1	Rosa e Branca	S	R	Camurça	Presente
EA 1.2.2	Amarela	S	R	Pulverulenta	Ausente
EA 1.2.3	Esverdeada com bordas Brancas	S	R	Algodonosa	Ausente
EA 1.3.1	Hifas brancas e base rosa escuro	S/U	R	Algodonosa	Presente
EA 1.3.3	Branca	S	R	Camurça	Ausente
EA 1.3.5	Branca	S	R	Algodonosa	Ausente
EA 1.3.7	Branca e Roxa	S/U	R	Algodonosa	Presente
EA 1.3.8	Branca	S	R	Algodonosa	Ausente
EA 1.4.1	Branca com bordas lilás	S	R	Camurça	Ausente
EA 2.3.2	Branças e base Preta	S	R	Algodonosa	Presente
EA 3.3.2	Salmão e Branca	S	R	Algodonosa	Ausente

Os isolados EA 1.3.3; EA 1.3.5; e EA 1.3.8 possuíram coloração branca, porém o EA 1.3.3 possuiu textura de camurça, enquanto que os fungos EA 1.3.5 e EA 1.3.8 apresentaram textura algodonosa (Tabela 3). Por sua vez, o microrganismo identificado como EA 1.4.1 apresentou coloração branca com bordas

lilás e textura de camurça, e os isolados EA 2.3.2 e EA 3.3.2 possuíram textura algodonosa, contudo o EA 2.3.2 apresentou hifas brancas e uma base na cor preta, enquanto que o EA 3.3.2 apresentou uma base salmão e hifas brancas (Tabela 3).

Análise do efeito da temperatura no crescimento dos fungos isolados e na produção xilanolítica

Todos os isolados apresentaram uma melhor taxa de crescimento a 30°C, com baixo ou nenhum crescimento a 35°C, sendo que nenhum isolado foi capaz de se desenvolver a 40°C (Figura 2). No entanto, seis microrganismos se destacaram, pois obtiveram um crescimento maior no meio sólido contendo xilana, a 30°C, sendo esses identificados como EA 1.2.1; EA 1.2.2; EA 1.3.1; EA 1.3.7; EA 1.4.1 e EA 3.3.2 (Figura 2).

Triagem dos fungos filamentosos isolados e potenciais produtores de xilanases

Para identificar o melhor produtor de xilanases, os fungos filamentosos EA 1.2.1; EA 1.2.2; EA 1.3.1; EA 1.3.3; EA 1.3.7 e EA 1.4.1, identificados qualitativamente como os microrganismos de maiores

crescimentos em meio de cultura sólido contendo xilana, foram submetidos à fermentação submersa em meio CP, a 30°C. A partir dos resultados, foi observado que o isolado EA 1.3.7 apresentou maior atividade xilanolítica, 0,719 U.mL⁻¹, seguido dos fungos EA 1.3.1, EA 1.4.1 e EA 1.3.3 com atividades de 0,675 U.mL⁻¹; 0,525 U.mL⁻¹ e 0,250 U.mL⁻¹, respectivamente. Por outro lado, os fungos EA 1.2.1 e EA 1.2.2 apresentaram atividade muito inferiores, sendo o fungo EA 1.2.2 o que apresentou menor atividade enzimática (Figura 3).

A partir dos resultados da avaliação da atividade xilanolítica, o fungo filamentoso EA 1.3.7 foi selecionado como o melhor produtor de xilanases e empregado nos experimentos posteriores.

A partir do sequenciamento da região ITS e comparação com sequências homólogas nos bancos de dados, foi verificada uma maior identidade com as espécies *Fusarium foetens* CBS 110286 (99,40%) e *Fusarium circinatum* CBS 405.97 (98,60%). No entanto, esse marcador molecular não é eficiente para

FIGURA 2: Taxa de crescimento (cm.h⁻¹) dos fungos filamentosos isolados em meio de cultura sólido contendo xilana beechwood a diferentes temperaturas.

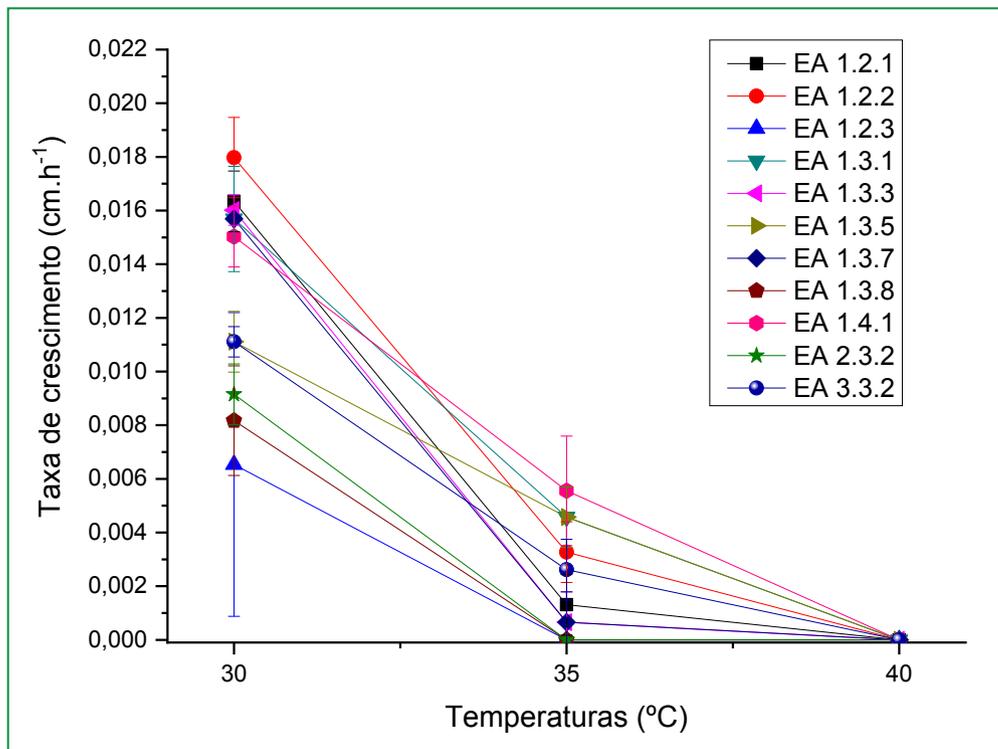
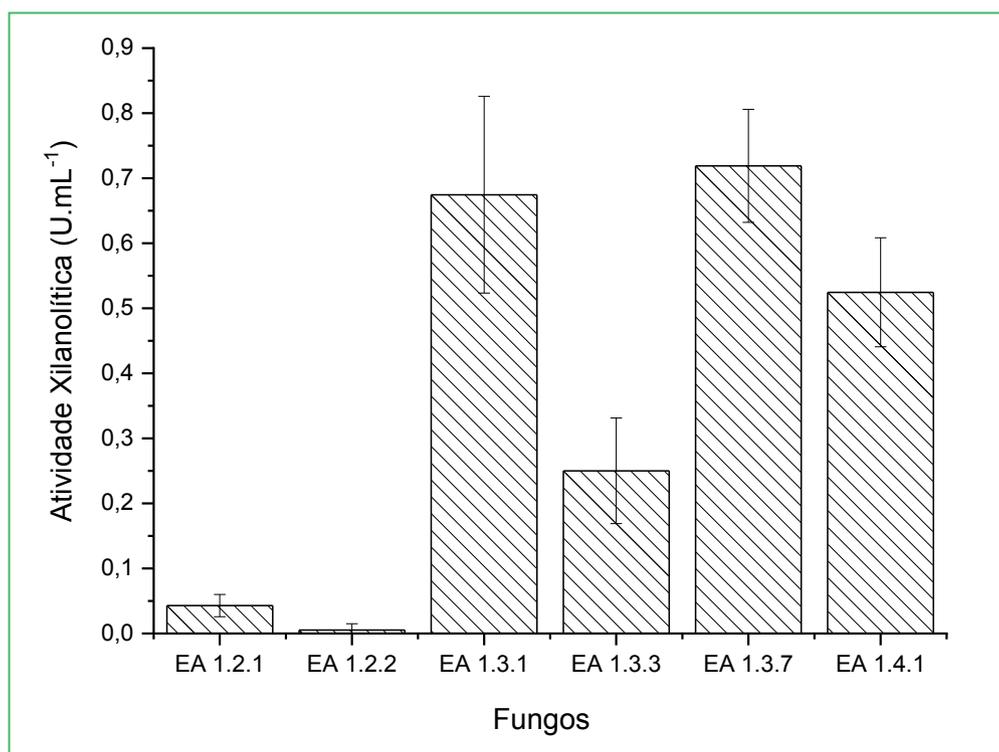


FIGURA 3: Determinação da atividade xilanolítica produzida pelos fungos filamentosos em meio de cultura submerso CP, a 30°C, durante quatro dias de cultivo.



a delimitação de espécies no gênero *Fusarium*, sendo necessário o uso de marcadores moleculares adicionais, e, portanto, o resultado da identificação do isolado EA 1.3.7 foi inconclusivo, sendo identificado como *Fusarium* sp.

Determinação do meio de cultura submerso e do tempo de crescimento do fungo para uma maior produção enzimática

O meio de cultivo onde observou-se uma maior atividade xilanolítica foi o CP no sexto dia de cultivo, 0,788 U.mL⁻¹. Analisando todo o desenvolvimento do fungo em meio CP, notou-se que a atividade enzimática aumentou constantemente com o passar dos dias, até que do sexto para o sétimo dia o aumento foi mínimo, 0,1%, considerando, então, que a atividade xilanolítica passou a ser constante e que um período de seis dias foi o melhor tempo de cultivo para o fungo *Fusarium* sp. EA 1.3.7 (Figura 4).

A partir das variações obtidas nos resultados, foi possível concluir que o tempo de cultivo de *Fusarium* sp. EA 1.3.7 para a produção enzimática é variável de acordo com as condições de crescimento em que é submetido, pois os valores e os comportamentos obtidos foram completamente diferentes quando variou-se a composição do meio de cultura submerso.

Análise de diferentes fontes de nitrogênio na produção enzimática pelo fungo isolado

Dentre as fontes de nitrogênio analisadas, a peptona (Pep.) destacou-se como indutora na produção de xilanases, obtendo uma atividade de 0,903 U.mL⁻¹, sendo 1,0% maior que a segunda fonte nitrogenada de maior atividade, o extrato de levedura (EL) associado à peptona e à ureia; e 1,4% maior que as fontes peptona acrescida de ureia. Vale citar que o meio que não conteve fonte de nitrogênio apresentou a menor atividade xilanolítica, 0,485 U.mL⁻¹, demonstrando a importância desse nutriente para a produção enzimática (Figura 5).

FIGURA 4: Determinação do meio de cultura submerso, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono, e do tempo de crescimento do *Fusarium* sp. EA 1.3.7, a 30°C.

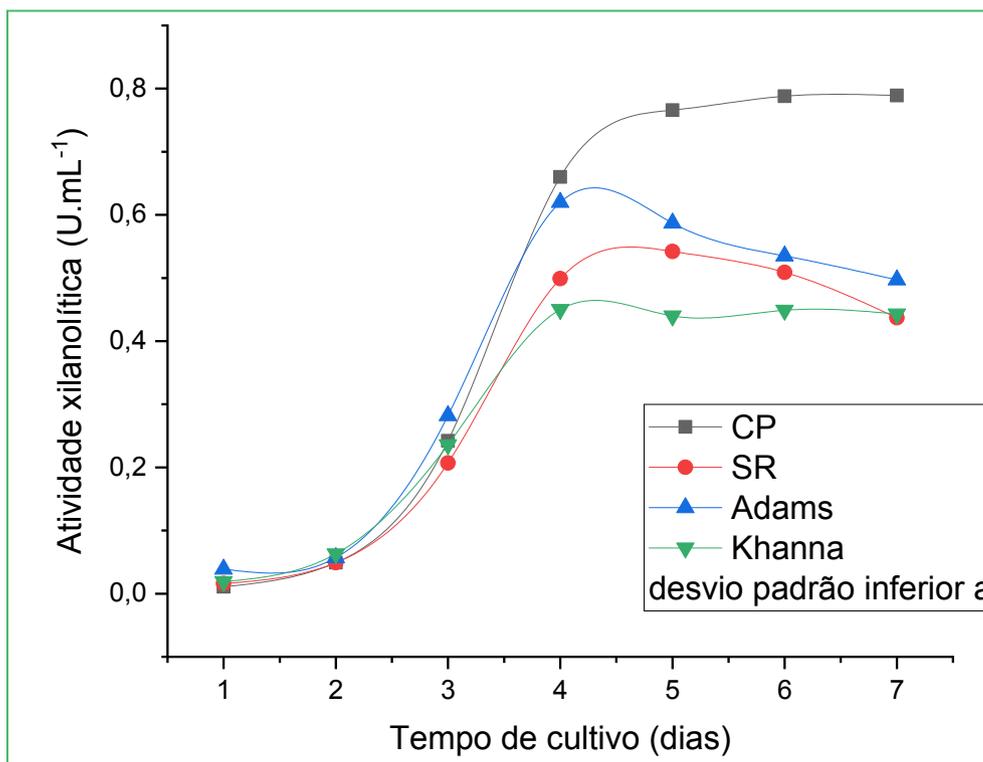
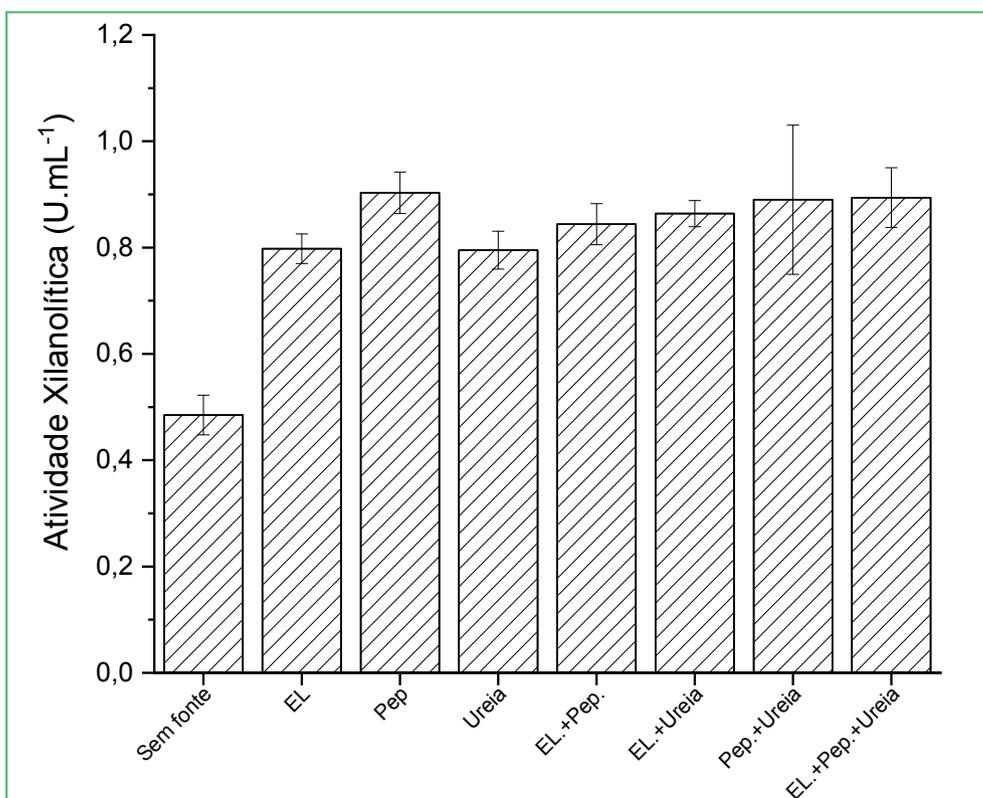


FIGURA 5: Determinação da fonte de nitrogênio no cultivo do *Fusarium* sp. EA 1.3.7, a 30°C, durante seis dias em meio submerso CP, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono para a produção de xilanas.



Efeito da solução de sais no meio de cultura para produção enzimática

O meio contendo a solução de sais SR apresentou a maior atividade xilanólica, de $0,939 \text{ U.mL}^{-1}$, seguido do meio contendo a solução de sais Wesson com $0,867 \text{ U.mL}^{-1}$. Foi possível observar, também, que a solução de sais CP associada a solução de sais SR e Wesson induziram uma menor atividade enzimática, assim como a ausência destes nutrientes, apresentando uma atividade de $0,552 \text{ U.mL}^{-1}$ e $0,598 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 6).

Análise da produção xilanólica pelo *Fusarium* sp. EA 1.3.7 utilizando-se resíduos agro-industriais como fonte de carbono

Pode-se observar que os resíduos utilizados como fonte de carbono no cultivo do fungo isolado *Fusarium* sp. EA 1.3.7 mostraram-se pouco indutores

da produção xilanólica nas condições de cultivo analisadas. Entretanto, tornam-se promissoras uma vez que induziram uma certa quantidade de xilanases, sendo os valores observados de atividade para a casca de laranja de $0,173 \text{ U.mL}^{-1}$, e $0,148 \text{ U.mL}^{-1}$ para a casca de abóbora (Figura 7).

Determinação do efeito do pH e da temperatura na atividade xilanólica

O fungo filamentosso foi cultivado em meio submerso CP, a 30°C , durante seis dias, utilizando peptona como fonte de nitrogênio e farelo de trigo como fonte de carbono. Os resultados obtidos indicam que a melhor atividade xilanólica ocorreu em temperaturas próximas a 52°C e pH na faixa de 5,3 (Figura 8).

A Equação 1 representa o modelo matemático obtido pela curva, modelo este que apresentou um bom coeficiente de determinação, com R^2 igual a 94,86%, demonstrando proximidade entre os resultados

FIGURA 6: Determinação da solução de sais do meio de cultura CP, contendo farelo de trigo como fonte de carbono e peptona como fonte nitrogenada, para uma maior produção de xilanases por *Fusarium* sp. EA 1.3.7, a 30°C , durante seis dias de cultivo.

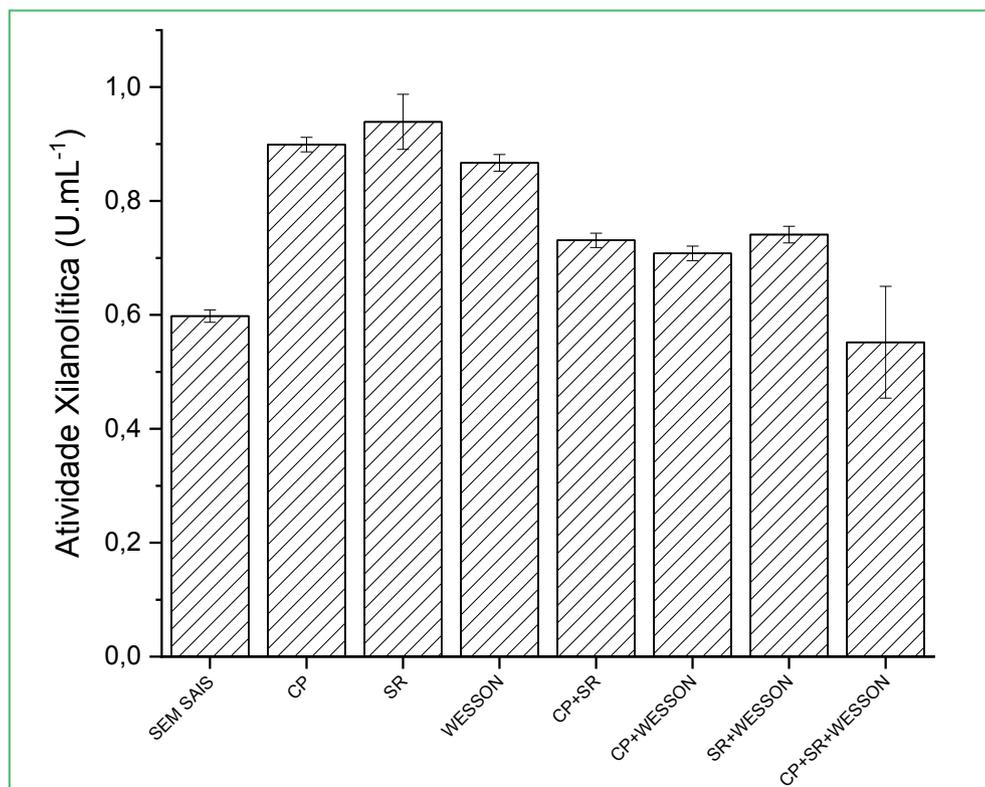


FIGURA 7: Produção xilanolítica por *Fusarium* sp. EA 1.3.7 utilizando-se resíduos agro-industriais como fonte de carbono em meio de cultura submerso CP, a 30°C.

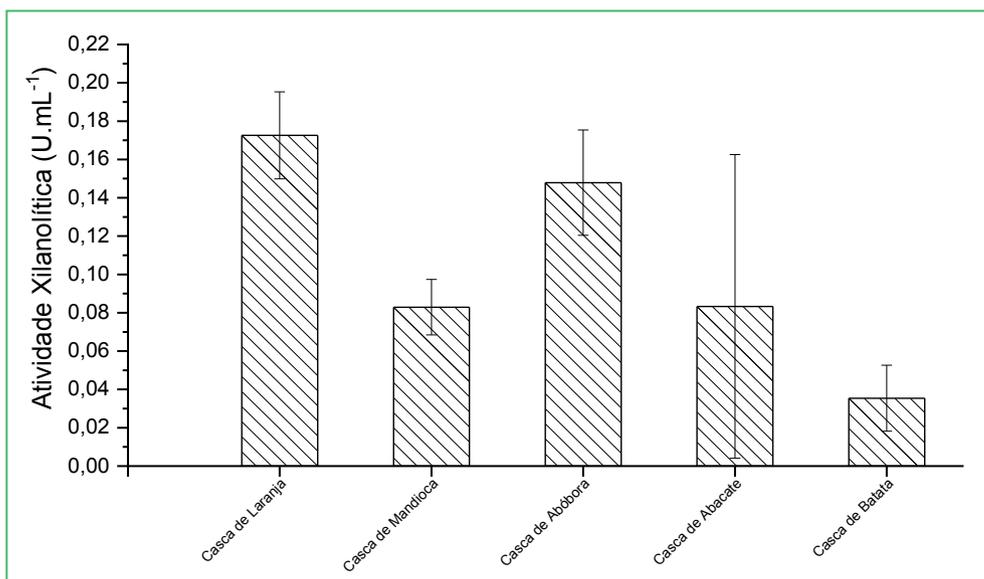
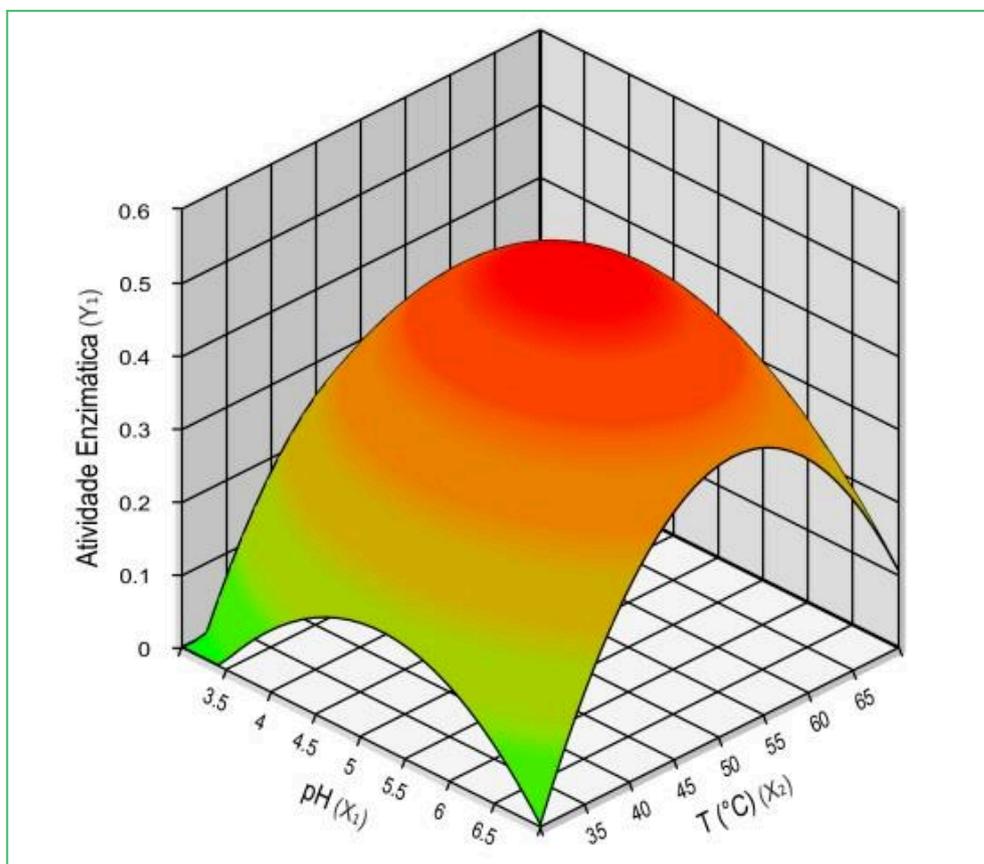


FIGURA 8: Gráficos gerados no Protimiza Experimental Design indicando a superfície de resposta do planejamento para a determinação da temperatura e do pH da reação enzimática.



experimentais e os teóricos. Além disso, o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo de acordo com o teste F, pois apresentou 95% de confiança.

$$\text{Equação 1: } Y_1 = 0,53 + 0,03 x_1 - 0,10 x_1^2 + 0,04 x_2 - 0,16 x_2^2$$

Discussão

Fungos filamentosos são seres cosmopolitas e, portanto, encontrados em diversos ambientes. A quantidade de espécies obtidas, utilizando técnicas dependentes de cultivo podem variar para cada ambiente ou tipo de amostra. Cardoso (2011) isolou dezesseis fungos filamentosos, que apresentaram características morfológicas variadas, a partir de materiais em decomposição, matérias vegetais e solo, enquanto Vici (2010) obteve trinta e seis morfoespécies a partir de duas amostras de solo e duas amostras de serragem.

Por outro lado, Pasin et al. (2014) isolaram vinte microrganismos a partir de doze amostras coletadas, enquanto Sobral et al. (2017) isolaram quatorze espécies de fungos filamentosos, sendo a maioria do gênero *Aspergillus* (50%), seguido por *Penicillium* (21%) e *Talaromyces* (14%), sendo esses valores bem próximos ao quantitativo de fungos filamentosos isolados em nosso estudo.

O efeito da temperatura no crescimento dos fungos é de extrema importância, pois possibilita caracterizar a temperatura ótima de crescimento dos microrganismos. Além disso, conhecer o quanto os fungos podem crescer frente à variação de temperatura permite diferenciar os estados de crescimento e de sobrevivência dos organismos, uma vez que a temperatura é um fator crucial no desenvolvimento dos mesmos (OLIVEIRA; RODRIGUES 2019).

Foi possível observar que a melhor temperatura de crescimento de todos os fungos isolados foi de 30°C, assim como, com exceção dos fungos EA 1.2.3; EA 1.3.8 e EA 2.3.2, que não se desenvolveram a 35°C, os que conseguiram, tiveram a taxa de crescimento reduzida a mais da metade. Além disso, a 40°C nenhum microrganismo cresceu. Desta forma, todos os fungos obtidos nesse trabalho foram classificados como

mesófilos e não toleram temperaturas elevadas, além de serem potenciais produtores de xilanases uma vez que cresceram em meio contendo exclusivamente xilana.

Nogueira (2017) observou que a melhor temperatura de crescimento dos microrganismos obtidos em seu estudo foi de 37°C a 45°C, e a partir de 45°C o crescimento permaneceu constante. Nos estudos de Pasin (2015), a maior parte dos fungos filamentosos, classificados como mesófilos, desenvolveram-se de 30°C a 35°C. Assim como Nwagu e Okolo (2011), que ao cultivarem o *Fusarium* sp. observaram uma maior taxa de crescimento a 30°C, valores esses semelhantes aos observados em nossos estudos para o isolado *Fusarium* sp. EA 1.3.7.

A fermentação submersa é a técnica mais utilizada nos países ocidentais para a produção de enzimas, pois os microrganismos crescem facilmente podendo controlar o pH e a temperatura de cultivo, e, principalmente, pela fácil obtenção das enzimas extracelulares (ORLANDELLI et al., 2012).

Todo os fungos filamentosos se desenvolveram em meio de cultivo sólido composto por Farinha de Aveia Quaker® 4% (m/v) e Ágar Bacteriológico 2% (m/v) e também apresentaram relevante atividade xilanólítica quando cultivados em fermentação submersa, entretanto, o fungo *Fusarium* sp. EA 1.3.7 se destacou com maior atividade, razão pela qual foi selecionado para dar continuidade aos experimentos.

O meio de cultura submerso empregado e o tempo de cultivo do microrganismo são fatores que influenciam na produção da enzima de interesse. De acordo com Sales et al. (2010), tanto a composição do meio, quanto o tempo de cultivo se apresentaram como variáveis significativas na produção de celulasas e xilanases.

Acerca da fonte de nitrogênio, Fernández-Espinar et al. (1992) verificaram que a produção de xilanases por *Aspergillus nidulans* foi máxima quando o microrganismo foi cultivado a 37°C, usando xilana como fonte de carbono e casaminoácidos de espelta de aveia como fonte de nitrogênio, embora a peptona também tenha se mostrado bastante efetiva na produção das enzimas de interesse, resultados discordantes aos observados em nossos estudos.

Para Simões e Tauk-Tornisielo (2005), a fonte de carbono é um componente crucial para o cultivo, desenvolvimento e atividade microbiana. Eles avaliaram o efeito de nove diferentes fontes de carbono no crescimento de duas linhagens de fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Rhizopus microsporus* cultivados a 35°C, em meio de cultura contendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio e constataram a influência significativa desses nutrientes, obtendo uma maior quantidade de biomassa de *Aspergillus niger* em meio de cultura contendo maltose e para o *Rhizopus microsporus* em meio contendo glicerol como única fonte de carbono.

No trabalho realizado por Simões et al. (2009), a atividade máxima de xilanases foi alcançada quando o fungo *Trichoderma viride* foi cultivado em meio de cultura contendo o farelo de trigo e sorbitol como fonte de carbono, a 25°C, resultados próximos aos nossos estudos, onde verificou-se uma alta produção xilanolítica em meio contendo farelo de trigo, mesmo sendo observado a indução da produção de xilanases utilizando-se resíduos agro-industriais. Embora esses resíduos possuam uma grande quantidade de xilana em sua composição, são materiais mais complexos, o que dificulta a ação das enzimas.

A faixa de pH e a temperatura ótima para a produção de xilanases é muito discutida na literatura e varia de acordo com o microrganismo em estudo. Resultados similares aos obtidos neste trabalho foram encontrados por Cysneiros et al. (2013), que obtiveram pH ótimo igual a 6,0 e temperatura ótima igual 50°C para as enzimas xilanases produzidas pelo fungo *Humicola grisea*. Para as xilanases produzidas pelo *Fusarium solani* F7 estudadas por Gupta et al. (2009), o pH e a temperatura ótimos aparente para a atividade da xilanase foram encontrados a 5,5 e 30°C.

Os resultados obtidos experimentalmente também corroboram com os resultados obtidos por Silva et al. (1999), que obteve a xilanase produzida por *Aspergillus fumigatus* otimamente ativa a pH 5,5 e 55°C, sendo esse valor de pH também obtido por *A. sydowii* MG49 e *A. niger*. Entretanto, discordam dos obtidos por Chutani e Sharma (2015), cuja xilanase produzida *Aspergillus oryzae* MDU-4 obtiveram atividades ótimas em temperatura e pH de 60°C e 6,0, respectivamente. Assim

como, Marques et al. (2018), verificaram que 6,0 e 75°C foram o pH e a temperatura de maiores atividades das xilanases produzidas por *P. stipata* SC 04.

A partir dos resultados apresentados foi possível observar a importância da busca por microrganismos, especialmente os fungos filamentosos, produtores de enzimas que estão sendo cada vez mais utilizadas em processos industriais em substituição à catalisadores químicos. As xilanases produzidas pelo *Fusarium* sp. EA 1.3.7 apresentaram boa atividade em diferentes condições de cultivo e se mostraram altamente eficientes a altas temperaturas, próximas a 52°C e em pH igual a 5,3. Além disso, foi possível produzi-las a partir de resíduos agroindustriais, material que representa um substrato alternativo, auxiliando na redução de custos de produção enzimática, além da resolução de problemas de poluição ambiental relacionados ao acúmulo ou má disposição desses resíduos, permitindo concluir que o microrganismo *Fusarium* sp. EA 1.3.7 é um potencial produtor de xilanases de grande interesse industrial.

Agradecimentos

Esse trabalho foi parte da iniciação científica da Eloísa Alves Nogueira. Agradecemos à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri *campus* JK. Bem como à toda equipe de docentes e discentes componentes do laboratório de pesquisa.

Referências

- ADAMS, P. R. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. **Mycopathology**, New York, v. 112, p. 35-37, 1990.
- BENASSI, V. M.; LUCAS, R. C.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Screening of thermotolerant and thermophilic fungi aiming -xylosidase and arabinanase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 4, 2014.
- BENASSI, V. M.; LUCAS, R. C.; MICHELIN, M.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Production and action of an *Aspergillus phoenicis* enzymatic pool using different carbon sources. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, p. 253-260, 2012.
- CARDOSO, A. L. G. **Prospecção de fungos filamentosos produtores de xilanases e/ou celulases para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 49 f. Trabalho de Conclusão

- de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental) – Centro Universitário UNISEB de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto. 2011.
- CHUTANI, P.; SHARMA, K. K. Biochemical evaluation of xylanases from various filamentous fungi and their application for the deinking of ozone treated newspaper pulp. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 127, p. 54-63, 2015.
- CYSNEIROS, C. S. S.; FERREIRA, R. N.; OLIVEIRA, M. A.; FAVORETTO, A. O.; ARNHOLD, E.; ULHOA, C. J. Produção, caracterização e avaliação de enzimas fibrolíticas na digestibilidade da forragem de milho. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 14, n. 4, p. 426-435, 2013.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. Number 2. Eching: IHW-Verlag, 2007.
- EMERSON, R. An experimental study of the life cycles and taxonomy of Allomyces. **Lloydia**, Annapolis. v. 4, p. 77-144, 1941.
- FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T, RAMÓN, D., PIÑAGA, F., VALLÉS, S. Produção de xilanase por *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology Letters**, Birmingham, v. 91, n. 2, 91-96, 1992.
- GUPTA, V. K.; GAUR, R.; GAUTAM, N.; KUMAR, P.; YADAV, I. J.; DARMWAL, N. S. Optimization of xylanase production from *Fusarium solani* F7. **American Journal of Food Technology**, Dubai, v. 4, n. 1, p. 20-29, 2009.
- KHANNA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 11, p. 242-243, 1995.
- MARQUES, N. P.; PEREIRA, J. C.; GOMES, E.; SILVA, R.; ARAÚJO, A. R.; FERREIRA, H.; RODRIGUES, A.; DUSSÁN, K. J.; BOCCHINI, D. A. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 122, p. 66-75, 2018.
- MICHELIN, M.; POLIZELI, M. L. T. M.; RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; RUIZ, H. A.; VICENTE, A. A.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; TEIXEIRA, J. A. Production of xylanase and β -xylosidase from autohydrolysis liquor of corncob using two fungal strains. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Garching, v. 35, p. 1185-1192, 2012.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, p. 426-428, 1959.
- NOGUEIRA, C. F. O. **Análise e caracterização do secretoma do fungo termofílico *Malbranchea pulchella* linhagem 6278**. 2017. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Lorena. 2017.
- NWAGU, T. N.; OKOLO, B. N. Extracellular amylase production of a thermotolerant *Fusarium* sp. isolated from Eastern Nigerian soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 4, p. 649-658, 2011.
- OLIVEIRA T. B.; RODRIGUES A. Ecology of thermophilic Fungi. In: TIQUIA-ARASHIRO, S.; GRUBE, M. (Ed.). **Fungi in extreme environments: ecological role and biotechnological significance**. Cham: Springer, 2019. p. 39-57.
- ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.
- PASIN, T. M. **Prospecção, purificação e propriedades funcionais de uma glucoamilase de *Aspergillus japonicus*: aplicação do extrato enzimático em reciclagem de papel**. 2015. 155 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2015.
- PASIN, T. M.; BENASSI, V. M.; MOREIRA, E. A.; JORGE, J. A. Prospecting Filamentous Fungi for Amylase Production: Standardization of *Aspergillus japonicus* culture conditions. **British Biotechnology Journal**, London, v. 4, p. 482-498, 2014.
- PEDERSEN, M.; LAURITZEN, H. K.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S. Identification of thermostable β -xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 29, p. 743-748, 2007.
- PEIXOTO, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **International Microbiology**, Berlin, v. 6, p. 269-273, 2003.
- POLIZELI, M. L. T. M. Properties and commercial applications of xylanases from fungi. In: RAI, M. (Ed). **Advances in fungal biotechnology**. Chapter 4. New Delhi: IK International Publisher, 2009. p. 82-108.
- RIZZATTI, A. C. S.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and properties of a thermostable extracellular α -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 26, p. 156-160, 2001.
- SALES, M. R.; MOURA, R. B.; PORTO, T. S.; MACEDO, G. R.; PORTO, A. L. F. Variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1290-1296, 2010.
- SILVA, C. H. C.; PULS, J.; SOUSA, M. V.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 114-119, 1999.
- SILVA, P. O. **Purificação e caracterização bioquímica da xilanase produzida por *Aspergillus japonicus* e imobilização enzimática em alginato**. 2016. 67 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 2016.
- SIMÕES, M. L. G.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Comparison of the traditional technique and automatized turbidimetric method in the cultivation in different carbon sources of filamentous fungi isolated of soil in caatinga area. **Holos Environment**, Rio Claro, v. 5, n. 2, p. 94, 2005.
- SIMÕES, M. L. G.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; TAPIA, D. M. Triagem das condições de cultivo para produção de xilanase por fungos filamentosos. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 22, 6317-6326, 2009.
- SOBRAL, L. V.; MELO, K. N.; SOUZA, C. M.; SILVA, S. F.; SILVA, G. L. R.; SILVA, A. L. F.; WANDERLEY, K. A. A.; OLIVEIRA, I. S.; CRUZ, R. Antimicrobial and enzymatic activity of anemophilous fungi of a public university in Brazil. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 2327-2340, 2017.

SOUZA, M. T. S.; MARINHO, B. M.; PASIN, T. M.; NELSON, D. L.; BENASSI, V. M. Prospection of filamentous fungi and the production of amylase by *Aspergillus* sp. M1.7.2. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, Viçosa, v. 6, n. 3, 2020.

SUGIHARTO, S. A review of filamentous fungi in broiler production. **Annals of Agricultural Sciences**, Cairo, v. 64, p. 1-8, 2019.

TREVISAN, H. C. Lipases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agente biotecnológico**. 1 ed. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 115-135.

TROIANO, D.; ORSAT, V.; DUMONT, M. J. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Belfast, v. 117, 109472, 2020.

VICI, A. C. **Produção, purificação e imobilização de lipases produzidas por *Beauveria brongniartii***. 2010. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2010.