

Seleção de fungos endofíticos isolados de *Goniorrhachis marginata* Taub. e *Cavanillesia arborea* K. Shum para a produção de enzimas com aplicação biotecnológica

Selection of endophytic fungi isolated from Goniorrhachis marginata Taub. and Cavanillesia arborea K. Shum for the production of enzymes with biotechnological application

Juliana Kátia Lopes Araújo Rodrigues¹, Thalita Emanuelle Sousa Lima², Milena Nascimento Santos³, Janete Maria da Silva Alves⁴, Thiago Rodrigues de Assis⁵, Henrique Maia Valério⁶

¹Doutoranda em Biotecnologia, Unimontes. ^{2,3}Bacharel em Ciências Biológicas, Unimontes. ⁴Doutora em Bioquímica e Imunologia, Departamento de Biologia Geral, Unimontes. ⁵Bacharel em Engenharia de Produção, Faculdade Santo Agostinho. ⁶Doutor em Microbiologia, Departamento de Biologia Geral, Unimontes.

Resumo

Introdução – Muitas enzimas produzidas por fungos têm relevantes aplicações em diferentes áreas industriais. Os fungos endofíticos, são uma fonte promissora para seleção de enzimas devido a sua capacidade de sobreviver em ambientes hostis e produzir metabólitos bioativos. **Objetivos** – Selecionar fungos endofíticos coletados do material foliar de *Goniorrhachis marginata* e *Cavanillesia arborea*, produtores de enzimas extracelulares, além de avaliar o potencial halotolerante e termotolerante desses microrganismos. **Metodologia** – Avaliou-se o crescimento fúngico em diferentes temperaturas e concentrações do cloreto de sódio e calculou-se o índice de crescimento micelial. Além disso, determinou-se a atividade enzimática dos endófitos para a produção de enzimas, cultivando-se os microrganismos em meios sólidos específicos para a indução da bioprodução de cada enzima analisada. **Resultados** – O melhor produtor de amilases foi o isolado de *Penicillium* sp., que apresentou índice enzimático 2,16. Para enzima protease, o melhor produtor foi o *Penicillium citrinum*, com o índice enzimático de 2,10. Já o *Fusarium* sp. se destacou na produção de tanase, com índice enzimático de 5,53. Além disso, o fungo mais halotolerante foi o *Aspergillus niger*, e o mais termotolerante o *Aspergillus fumigatus*. **Conclusão** – Concluiu-se que as diversas espécies de fungos endofíticos avaliados neste estudo podem ser utilizadas em novos estudos para viabilizar a produção em maior escala de enzimas comerciais.

Termos para indexação: Enzimas. Fungos. *Aspergillus*. *Penicillium*.

ABSTRACT

Introduction – Many enzymes fungi produce have relevant applications in different industrial areas. Endophytic fungi are a promising source for enzyme selection due to their ability to survive in hostile environments and produce bioactive metabolites. **Objectives** – To select endophytic fungi collected from the leaf material of *Goniorrhachis Marginata* and *Cavanillesia Arborea*, producers of extracellular enzymes, in addition to evaluating these microorganisms' halotolerant and thermotolerant potential. **Methodology** – Fungal growth was evaluated at different temperatures, and sodium chloride concentrations, and the mycelial growth index was calculated. In addition, the enzymatic activity of the endophytes for enzyme production was determined by cultivating the microorganisms in specific solid media to induce the bioproduction of each enzyme analysed. **Results** – The best producer of amylases was the isolate of *Penicillium* sp., which presented an enzymatic index of 2.16. For the protease enzyme, the best producer was *Penicillium Citrinum*, with an enzymatic index of 2.10. *Fusarium* sp. stood out in tannase production, with an enzymatic index of 5.53. In addition, the most halotolerant fungus was *Aspergillus Niger*, and the most thermotolerant was *Aspergillus Fumigatus*. **Conclusion** – It was concluded that the various species of endophytic fungi evaluated in this study can be used in new studies to enable the production of commercial enzymes on a larger scale.

Index terms: Enzymes; Fungi; *Aspergillus*; *Penicillium*

INTRODUÇÃO

Os microrganismos endofíticos são principalmente bactérias e fungos que colonizam o interior de organismos vivos sem causar sintoma aparente³. Esses

microrganismos podem habitar, de forma assintomática, em diferentes tecidos vegetais, incluindo caules, folhas, cascas, raízes, frutos, sementes ou flores^{3,24}.

Trata-se de uma associação simbiótica mutualística, em que ambos os organismos se beneficiam: a planta fornece abrigo e nutrientes essenciais para os microrganismos endofíticos, enquanto eles auxiliam no crescimento da planta hospedeira, protegem-na do ataque de herbívoros ou outros patógenos e aumentam sua resistência

Corresponding / Correspondence: Henrique Maia Valério – Endereço: Laboratório de Ecologia de Microrganismos e Microbiologia Ambiental, LEMMA, UNIMONTES, Campus Sede, Vila Mauriceia, Montes Claros, MG, Brasil. CEP: 39.401-089 – E-mail: henrique.valerio@unimontes.br

a fatores de estresse abiótico, como salinidade, estresse osmótico e toxicidade de metais pesados no solo^{32,3}.

Dentre as categorias de microrganismos endofíticos, existem os extremófilos, microrganismos que vivem em condições extremas^{8,23}. As principais razões para estudá-los incluem entender seus mecanismos envolvidos na adaptação ao estresse e identificar seus metabólitos produzidos em condições extremas que apresentam potencial aplicação biotecnológica^{8,23,9}.

Esses organismos desenvolveram, ao longo da evolução dessas interações com suas plantas hospedeiras, diferentes processos metabólicos voltados para adaptações físico-químicas ao meio extremo, em vários níveis^{16,12}. Esses processos os tornam modelos promissores para a compreensão aprofundada da evolução funcional da adaptação aos ambientes extremos, se tornando foco crescente de pesquisas, nos últimos anos, devido às descobertas inovadoras de seus mecanismos de tolerância ao estresse³⁴.

Fungos endofíticos adaptados ao habitat podem conferir tolerância significativa ao estresse abiótico às plantas que não são suas hospedeiras originais. Portanto, a identificação de tais microrganismos associados às plantas que crescem em ambientes extremos, bem como sua diversidade, composição da comunidade e os fatores ecológicos que os afetam são de grande valor biotecnológico, especialmente em regiões áridas e semi-áridas^{16,8}.

Os fungos endofíticos extremófilos possuem a capacidade de produzir abundante conjunto de enzimas extracelulares, o que pode ser explicado por sua ampla distribuição nos mais diversos substratos e por seus hábitos nutricionais. Portanto, não é surpreendente que cerca de 60% das enzimas industriais utilizadas atualmente sejam de origem fúngica¹⁰. Dentre as principais enzimas de interesse comercial, podem ser destacadas as amilases, proteases, tanases, pectinases e xilanases²⁶.

As enzimas fúngicas são utilizadas principalmente nas etapas de fermentação nas indústrias, uma vez que elas apresentam vantagens sobre os catalisadores químicos, por não formarem produtos secundários nas reações, em razão da sua alta especificidade. Essa característica permite controlar a obtenção do produto desejado, reduzir os problemas ambientais e os custos com tratamento de efluentes, dado que, as enzimas são biodegradáveis e apresentam rapidez de reação com baixa concentração do biocatalisador^{6, 22}.

O isolamento e a seleção de fungos endofíticos podem contribuir para a descoberta de novas enzimas com características desejáveis (estabilidade a altas temperaturas, variações de pH e alta especificidade). Além disso, podem abrir perspectivas promissoras científicas e comerciais^{6, 22}.

Inúmeras metodologias podem ser aplicadas para a seleção de endófitos através da determinação da presença de enzimas extracelulares. Dentre elas, está incluída a utilização de meio sólido com presença de substratos e corantes que possibilitam a melhor visualização do

halo de degradação do substrato pelo fungo. A avaliação do índice enzimático (IE) e da produção de enzimas por microrganismos é baseada na razão entre o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro da colônia¹⁸.

Com base no exposto e destacando os benefícios e as contribuições deste estudo – não apenas para a comunidade científica, mas por também ser promissor em aplicações industriais, fornecendo informações técnicas que podem ser aplicadas para toda a sociedade –, os objetivos deste trabalho foram: (a) selecionar fungos endofíticos produtores *in vitro* de enzimas proteases, celulasas, amilases, pectinases e xilanases, isolados de plantas das espécies *G. marginata* Taub. e *C. arborea* K. Shum; e (b) avaliar a capacidade termotolerante e halotolerante desses microrganismos isolados em condições de estresse físico-químico, em bioensaios de laboratório.

METODOLOGIA

Obtenção dos microrganismos

Os fungos que foram estudados neste projeto foram cedidos pelo Laboratório de Ecologia de Microrganismos e Microbiologia Ambiental (LEMMA) da Universidade Estadual de Montes Claros, representando quinze espécies previamente identificadas, isoladas de plantas das espécies *G. marginata* Taub e *C. arborea* K. Shum (Tabela 1).

Os microrganismos foram reativados no meio de cultura Agar Batata Dextrose (BDA), e, após a reativação, sucedeu-se a incubação por aproximadamente sete dias a 25°C.

Tabela 1 – Lista das plantas e suas respectivas espécies de fungos endofíticos isolados a partir de material foliar coletados no PEMS Mata Seca (IEF/MG) e o número de acesso ao GenBank.

Plantas	Espécies de fungos endofíticos	Códigos	Nº de acesso
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	G7	KP122777
	<i>Aspergillus niger</i>	M20	KP122786
	<i>Curvularia lunata</i>	G1	KP122784
	<i>Passalora ageratinae</i>	G20	KP122773
	<i>Penicillium sp</i>	G19	KP122801
	<i>Penicillium citrinum</i>	G18	KP122761
	<i>Penicillium griseofulvum</i>	G11	KP122762
	<i>Scopulariopsis gracilis</i>	G15	KP122796
Goniorrhachis marginata Taub.	<i>Fusarium subglutinans</i>	G25	KP122765
Cavanillesia arborea K. Shum	<i>Passalora loranthincola</i>	C1	KP122757
	<i>Fusarium sp</i>	M7	KP122781
	<i>Fusarium annulatum</i>	C6	KP122790
	<i>Mycosphaerella pini</i>	C4	KP122772

Fonte: autores, 2024.

Ensaio de termotolerância

O ensaio de termotolerância foi realizado em placas de petri com meio ágar batata dextrose (BDA) estéril. Foram retirados com auxílio de perfuradores de 9 mm, discos com micélio de cultivos com 7 dias de incubação. Cada placa de petri recebeu um disco de micélio do isolado de cada espécie, sendo que o experimento foi realizado em triplicata para cada fungo endofítico testado¹⁷.

As placas foram incubadas em estufa a 25°C por seis dias. Os diâmetros das colônias foram medidos em dois sentidos perpendiculares, com o auxílio de um paquímetro digital, após 2, 4 e 6 dias da inoculação, e os resultados foram expressos em milímetros. Os ensaios foram realizados nas seguintes temperaturas: 35, 45 e 55°C, e o controle a 25 ±3° C¹⁷.

Ensaio de halotolerância

Foram retirados discos de micélio de 9 mm das colônias cultivadas em placas de Petri, com 7 dias de incubação, a 25°C, com auxílio de perfuradores, como foi descrito anteriormente. Posteriormente, subcultivos de cada isolado foram transferidos para o centro das placas de Petri, que continham 15 mL do meio de cultura BDA, preparado com diferentes concentrações de NaCl (de 0% a 10% com um intervalo de 2,5%), previamente autoclavadas²³.

As placas foram incubadas em estufa a 25°C por seis dias, e os procedimentos foram realizados em triplicata. Os diâmetros das colônias foram medidos em milímetros, com um auxílio de um paquímetro digital após 2, 4, 6 e 8 dias da inoculação, em dois sentidos perpendiculares²³.

Análise multivariada de dados

Calculou-se o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), analisando as médias dos diâmetros das colônias de cada fungo nos ensaios de termotolerância e halotolerância (conforme a equação 1), em que: *D* é diâmetro médio atual de colônia; *Da* o diâmetro da colônia do dia anterior; e *N* o número de dias após a inoculação. A análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, foram calculados com o programa Past Statistic 4.03 (Øyvind Hammer, Oslo, EUA).

$$IVCM = \frac{\sum(D-DA)}{N}(1)$$

Seleção de microrganismos produtores de enzimas

Os microrganismos foram incubados em meio sólido específico para induzir a bioprodução de cada enzima e analisar a formação do halo, permitindo a seleção dos microrganismos produtores de amilases, proteases, xilanasas, tanases e pectinases. Os ensaios foram realizados em triplicatas, nos quais os isolados foram inoculados

em fragmentos de 8 mm no centro das placas¹.

Após o período de crescimento para cada ensaio, foram medidos os diâmetros do halo e das colônias com auxílio de um paquímetro. O índice enzimático (IE) foi determinado pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia. As médias dos halos foram avaliadas estatisticamente por meio de análise de desvio padrão e coeficiente de variação^{4,1}.

Produção de amilase

A habilidade de degradar amido foi utilizada como critério para determinação da produção de enzimas amilolíticas. Foi utilizado o meio ágar amido (extrato de levedura 10g/L, peptona de caseína 20g/L, amido solúvel 10g/L, ágar 20g/L, pH 6,5), autoclavado e em seguida, vertido em placas de petri. As placas foram inoculadas com cepas dos fungos endofíticos e incubadas a 30°C, por cinco dias. Posteriormente, as placas foram reveladas com solução de lugol a 0,5% por 5 minutos, e, em seguida, lavadas com água destilada para se determinar a atividade amilolítica pela formação de halo claro ao redor da colônia⁴.

Produção de protease

Para detectar a atividade proteolítica, foi utilizado o meio ágar-gelatina-leite estéril em placas de petri (18 g ágar, 10 g leite em pó desnatado; 10 g de gelatina em pó incolor sem sabor; 1000 mL de água destilada). As placas foram incubadas durante sete dias a 25°C. Após esse período, foi adicionada solução saturada de sulfato de amônio, cujo precipitado tornou o ágar mais opaco, e a produção de enzimas foi observada pela formação de halos enzimáticos incolores ao redor das colônias¹.

Produção de pectinase

Os fungos pectinolíticos foram selecionados em placa com meio estéril, constituído de 1,25% de solução de pectina cítrica pH 5,5 contendo: 50 mM de fosfato de potássio; 6,7 g.L⁻¹ de extrato de levedura; 0,2% de glicose; e 0,5% de ágar. Os microrganismos foram inoculados e incubados a 30°C por quatro dias. Após incubação, as placas foram reveladas com solução 1% de brometo hexadeciltrimetilamônio por 5 minutos e lavadas com água destilada. A formação de halo ao redor das colônias significou que o fungo foi capaz de degradar a pectina, ou seja, foi produtor de pectinase¹.

Produção de tanase

As linhagens fúngicas foram replicadas no Meio *Screening* Tanase (meio básico modificado) para classificar os possíveis produtores da enzima tanase. O meio continha ácido tânico, o que lhe confere fonte de glicose e ácido gálico. Os fungos foram inoculados em meio de cultura contendo (g/L): ácido tânico, 10; NaNO₃ 3,0; KH₂PO₄ 1,0; MgSO₄.7H₂O 0,5; KCl 0,5; FeSO₄.7H₂O 0,01;

e Agar 30,0; pH 5.8. A inoculação de cada linhagem de endófito testada foi realizada em triplicata a 30°C por 120 horas²⁶.

Produção de xilanase

A seleção de microrganismos produtores de xilanase foi realizada em meio de cultura sólido, com (g/L): extrato de levedura 0,6; KH₂PO₄ 7,00; MgSO₄ 0,1; K₂HPO₄ 2; (NH₄)₂SO₄ 1,00, Agar 18,00, Xilana 10,00. Os fungos foram incubados por cinco dias, e, após as colônias estarem visíveis nas placas, elas foram embebidas em lugol a 0,5% por 5 minutos e depois lavadas com água destilada, sendo avaliada a produção de xilanase pela formação de halo claro ao redor da colônia⁴.

RESULTADOS

Avaliação do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) para o teste de termotolerância

Os fungos utilizados nos ensaios de termotolerância foram previamente selecionados a partir da triagem realizada com parte da coleção de fungos endófitos isolados em Barriguda e Itapicuru. O IVCM dos fungos endófitos foi determinado através da regressão da variação do diâmetro em função do espaço de tempo (Tabela 2).

Tabela 2 – Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de fungos endófitos isolados da *Goniorrhachis marginata* Taub. e *Cavanillesia arborea* K. Shum em diferentes temperaturas

Índice de crescimento micelial (cm/dia)			
Espécies	25°C	35°C	45°C
<i>Curvularia lunata</i>	0,21±0,06a	0,23±0,09ab	-
<i>Passalora sequoiae</i>	0,61±0,29a	0,64±0,05ab	-
<i>Passalora fulva</i>	0,13±0,06a	0,26±0,07ab	-
<i>Penicillium citrinum</i>	0,39±0,22a	0,43±0,05ab	-
<i>Fusarium annulatum</i>	0,92±0,02a	0,5±0,03ab	-
<i>Passalora loranthincola</i>	0,28±0,05a	0,2±0,06ab	-
<i>Penicillium brevicompactum</i>	0,53±0,13a	0,47±0,14ab	-
<i>Phomopsis saccharata</i>	0,21±0,02a	0,16±0,03ab	-
<i>Scopulariopsis sp</i>	0,60±0,14a	0,47±0,07ab	-
<i>Scopulariopsis gracilis</i>	0,12±0,06a	0,29±0,25ab	-
<i>Phaeocytostroma ambiguum</i>	0,25±0,07a	0,30±0,04ab	-
<i>Mycosphaerella pini</i>	1,18±0,21a	1,14±0,19ab	0,23±0,09b
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,18±0,32a	0,82±0,08ab	1,31±0,05b
<i>Aspergillus niger</i>	1,06±0,23a	0,86±0,07ab	0,22±0,06b
<i>Passalora ageratinae</i>	1,10±0,27a	0,99±0,03ab	0,71±0,17b
<i>Aspergillus sp</i>	0,79±0,05a	0,86±0,08ab	1,10±0,16b

Resultados do IVCM ± desvio padrão.

Nota: médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem estatisticamente ao nível de 5%.

Fonte: autores, 2024.

Avaliação do índice de velocidade de crescimento micelial IVCM para o teste de halotolerância

Constatou-se que houve interação significativa entre a concentração de cloreto de sódio e a velocidade de crescimento dos isolados testados. O crescimento ótimo dos microrganismos foi entre 0% e 2,5% e se observou redução do IVCM à medida em que se aumentou a concentração do sal no meio (Tabela 3).

Tabela 3 – Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de fungos endófitos isolados da *Goniorrhachis marginata* Taub. e *Cavanillesia arborea* K. Shum em diferentes concentrações de cloreto de sódio

Índice de velocidade de crescimento micelial (cm/dia) em cada concentração de NaCl					
Espécies fúngicas	0%	2,5%	5%	7,5%	10%
<i>Aspergillus sp.</i>	0,60±0,02a	0,37±0,1a	0,11±0,04ab	0,02±0,01b	0,002±0,04b
<i>Scopulariopsis gracilis</i>	0,22±0,17a	0,19±0,12a	0,06±0,01ab	0,06±0,02b	0,01±0,00b
<i>Penicillium citrinum</i>	0,73±0,14a	0,83±0,10a	0,48±0,15ab	0,35±0,06b	0,19±0,09b
<i>Fusarium annulatum</i>	0,28±0,08a	0,33±0,10a	0,18±0,02ab	0,12±0,06b	0,02±0,03b
<i>Penicillium brevicompactum</i>	0,74±0,28a	0,73±0,27a	0,51±0,11ab	0,27±0,21b	0,26±0,22b
<i>Penicillium griseofulvum</i>	0,66±0,31a	0,69±0,13a	0,52±0,11ab	0,37±0,12b	0,24±0,07b
<i>Passalora loranthincola</i>	0,24±0,14a	0,22±0,13a	0,06±0,01ab	0,10±0,01b	0,02±0,00b
<i>Fusarium annulatum</i>	0,89±0,01a	0,88±0,07a	0,66±0,03ab	0,45±0,03b	0,18±0,03b
<i>Scopulariopsis sp</i>	0,25±0,24a	0,37±0,17a	0,34±0,05ab	0,22±0,17b	0,09±0,01b
<i>Phaeocytostroma ambiguum</i>	0,27±0,10a	0,39±0,11a	0,02±0,00ab	0,12±0,06b	0,01±0,01b
<i>Phomopsis saccharata</i>	0,38±0,14a	0,07±0,00 a	0,14±0,04ab	0,04±0,02b	0,02±0,00b
<i>Mycosphaerella pini</i>	1,00±0,02a	1,00±0,00a	0,80±0,09ab	0,3±0,10b	0,14±0,03b
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,05±0,06a	0,6±0,00a	0,30±0,19ab	0,19±0,01b	0,18±0,06b
<i>Aspergillus niger</i>	1,15±0,18a	1,05±0,08a	0,95±0,02ab	0,83±0,14b	0,33±0,03b
<i>Passalora ageratinae</i>	0,04±0,03a	0,06±0,02a	0,04±0,02ab	0,01±0,01b	0,01±0,01b
<i>Curvularia lunata</i>	0,19±0,10a	0,20±0,09a	0,16±0,04ab	0,04±0,03b	0,04±0,04b

Resultados do IVCM ± desvio padrão.

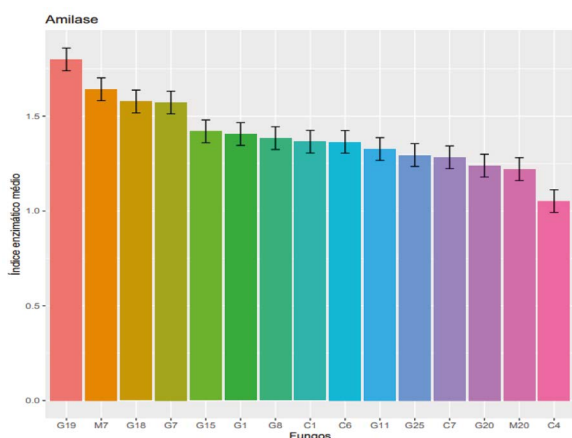
Nota: médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de 5%.

Fonte: autores, 2024.

Seleção de fungos produtores de amilase

Neste estudo, 100% dos fungos testados foram capazes de crescer e produzir enzimas amilases, com o índice enzimático (IE) entre 1,3 e 2,16 (Gráfico 1).

Figura 1 – Atividade amilolítica dos fungos endofíticos isolados da *Goniorrhachis marginata* Taub. e *Cavanillesia arborea* K. Shum determinada por índice enzimático (IE).



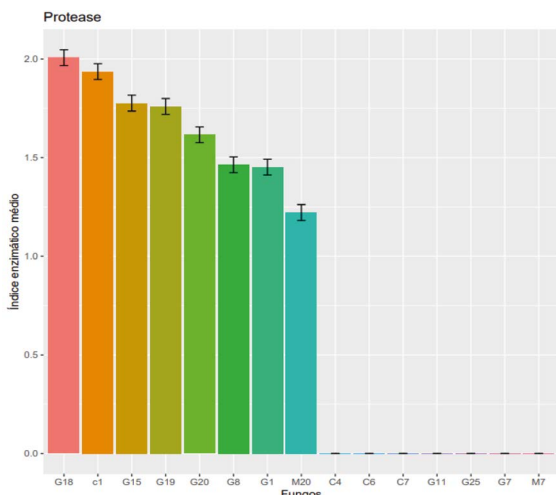
Fonte: autores, 2024.

Seleção de fungos produtores de proteases

Constatou-se, nessa pesquisa, que oito isolados de fungos cresceram e produziram halos de degradação de proteína, conforme é observado no Gráfico 2.

As espécies *Scopulariopsis* sp., *Mycosphaerella pini*, *Penicillium griseofulvum*, *Fusarium* sp., *Fusarium annulatum*, *Fusarium subglutinans*, *Aspergillus fumigatus* cresceram significativamente, porém não produziram enzimas capazes de degradar as proteínas-alvo presentes no meio (Figura 2).

Figura 2 – Atividade proteolítica dos fungos endofíticos isolados da *Goniorrhachis marginata* Taub. e *Cavanillesia arborea* K. Shum determinada por índice enzimático (IE)

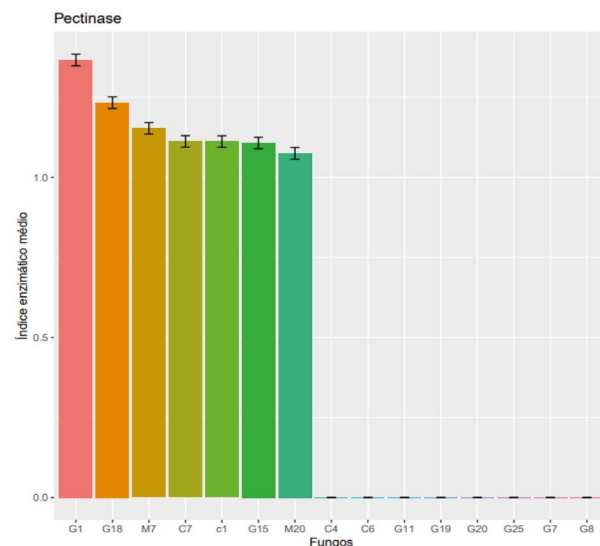


Fonte: autores, 2024.

Seleção de fungos produtores de pectinase

Constatou-se que apenas sete isolados apresentaram atividade de pectinase (Figura 3).

Figura 3 – Valores da atividade de pectinase dos fungos endofíticos isolados da *Goniorrhachis marginata* Taub. e *Cavanillesia arborea* K. Shum determinada por índice enzimático (IE).

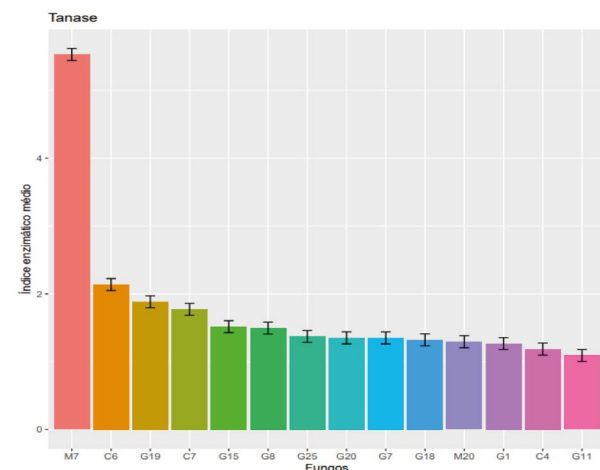


Fonte: autores, 2024.

Seleção de fungos produtores de tanase

Foi constatado que 93% das linhagens de fungos endofíticos testadas apresentaram índice enzimático maior que 1 (Figura 4).

Figura 4 – Valores da atividade de tanase dos fungos endofíticos isolados da *Goniorrhachis marginata* Taub. e *Cavanillesia arborea* K. Shum determinada por índice enzimático (IE).

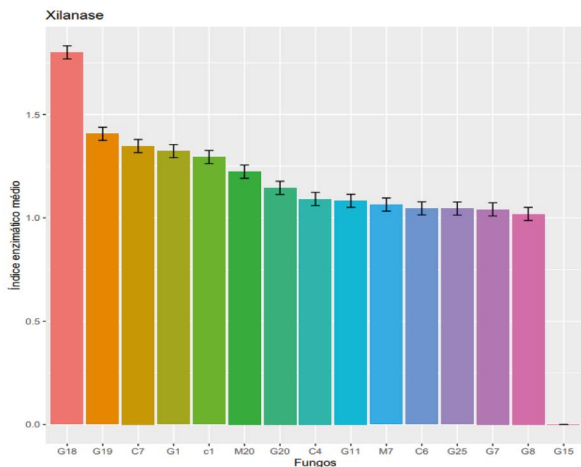


Fonte: autores, 2024.

Seleção de fungos produtores de xilanase

Constatou-se que a maioria dos fungos endófitos produziram xilanases, ou seja, 93% dos isolados (Figura 5).

Figura 5 – Valores da atividade de xilanase dos fungos endófitos isolados da *Goniorrhachis marginata* Taub. e *Cavanillesia arborea* K. Shum determinada por índice enzimático (IE).



Fonte: autores, 2024.

DISCUSSÃO

Neste estudo, constatou-se que houve interação significativa entre a temperatura de crescimento dos isolados em relação ao índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). A faixa de temperatura ótima para o maior índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos diferentes isolados variou entre 25°C e 35°C, sendo que o *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus* sp. e *Mycosphaerella pini* foram os microrganismos mais termotolerantes e apenas o *Aspergillus fumigatus* foi capaz de crescer a 55°C, apresentando o IVCM de $0,12 \pm 0,05$. O *Aspergillus fumigatus* foi também caracterizado no estudo de Oliveira *et al.* (2015)²¹ e foi classificado como termotolerante, por crescer em temperaturas acima de 50°C.

Os fungos são considerados halófilos obrigatórios quando necessitam de sal para o crescimento ótimo, podendo ser classificados como extremamente halófilos ou moderadamente halófilos. Os microrganismos halotolerantes podem sobreviver e continuar crescendo com alta concentração de sal em seu meio, embora o crescimento ótimo também ocorra na ausência de sal².

Neste estudo, foi possível observar que os fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium griseofulvum* foram os que apresentaram melhor crescimento, mesmo com o aumento da concentração de NaCl, apresentando IVCM de 0,33, 0,26 e 0,24, respectivamente, para a concentração de 10%, sendo considerados os mais halotolerantes dentre os testados.

Os isolados *Penicillium brevicompactum* e *Aspergillus niger*, identificados neste trabalho, já foram também

caracterizados por Musa e colaboradores (2018)¹⁹, sendo associados a ambientes salgados e classificados como halotolerantes. Resultados semelhantes foram obtidos por RAJAA *et al.* (2019)²³, que obtiveram crescimento ótimo em meio de cultura a 2,5% de NaCl para os fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium allii*, isolados em ambientes supersalinos.

Identificar microrganismos halotolerantes é uma ferramenta importante para a biorremediação, uma vez que efluentes industriais frequentemente contêm concentração de solutos que podem inibir enzimas e microrganismos sensíveis a baixa atividade em água. Além disso, solos cultivados, onde frequentemente são utilizados herbicidas, podem ter sua salinidade aumentada pela irrigação ou pelo uso de fertilizantes químicos².

Ao longo dos anos de evolução, os fungos halófilos adotaram mecanismos para sobreviver em ambientes salinos. Para ocorrer a adaptação da célula do microrganismo, primeiramente ela deve ser capaz de identificar o aumento da concentração de sal no meio. O principal mecanismo que possibilita essa detecção é a via do glicerol de alta osmolaridade. Esse caminho está envolvido também na resposta à salinidade e osmo Adaptação das células fúngicas²².

Perante o estresse salino, a maioria dos fungos acumula solutos, tais como aminoácidos livres e polióis, para aumentar sua osmolaridade interna e permitir que a água entre em suas células. Outras estratégias que são utilizadas pelos fungos são as mudanças no transporte de íons ou na fluidez da membrana plasmática, que desempenha um papel importante na adaptação à alta concentração de sal².

Os resultados dos ensaios realizados neste estudo foram compatíveis com os de Arakaki *et al.* (2013)², que reportaram fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* como halotolerantes, sobretudo quando se mediu os IVCM ao longo do aumento das concentrações de NaCl, assim como nas condições testadas neste experimento. Musa *et al.* (2018)¹⁹ descrevem que a halofilia é encontrada em vários grupos fúngicos, em ordens individuais, que não são filogeneticamente próximas. Os autores citam gêneros frequentemente encontrados em ambientes salinos, dentre os quais alguns fungos filamentosos não melaninizados, e, com maior frequência, os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*¹⁹.

O gênero *Penicillium* é dominante em ambientes salinos mais frios, enquanto as espécies de *Aspergillus* prevalecem em condições salinas com temperaturas mais altas. O gênero *Aspergillus* não tem uma população total e diversidade de espécies como as encontradas para o gênero *Penicillium*. Entretanto, *Aspergillus* sp. produz esporos mais resistentes a produtos químicos e cresce mais rapidamente que o gênero *Penicillium*¹⁹.

Já na análise da capacidade enzimática dos fungos deste trabalho, e segundo Lealem e Gashe (1994)¹⁴, para que um microrganismo seja considerado como um bom produtor de enzimas extracelulares em meio sólido,

é necessário que seu índice enzimático seja maior ou igual a 2,0.

As amilases representam 25% do mercado mundial de enzimas, e exercem, dessa maneira, um papel importante no cenário industrial, sendo utilizadas na produção de tecidos, papel, detergentes, em processos fermentativos, na área da saúde e em outros processos industriais^{27,31}.

Neste estudo, foi possível caracterizar os microrganismos *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. como bons produtores de amilase microbiana, apresentando um índice enzimático de 2,12 e 2,16, respectivamente. Importante é ressaltar que 100% dos fungos testados foram capazes de crescer e produzir enzimas amilases.

Os resultados obtidos vão ao encontro do estudo de Zang et al. e colaboradores³³(2020), que avaliaram o uso do gênero *Fusarium* para produção de diferentes enzimas extracelulares, e constataram o potencial desse gênero como produtor de enzimas com melhor estabilidade.

As proteases são utilizadas nas indústrias de detergentes, têxtil, alimentícia, cosméticos e farmacêutica, sendo reconhecidas como as enzimas hidrolíticas de maior interesse industrial, pois correspondem a 60% do mercado mundial de enzimas¹³.

As enzimas protease desenvolvem um papel ativo na patogênese de fungos e na fisiologia fúngica para digerir grandes peptídeos extracelulares, visto que trabalham para digerir as proteínas presentes em tecidos vivos, bem como auxiliam na quebra da glicoproteína presente na parede celular e auxiliam na penetração nos tecidos do hospedeiro³⁰. Sendo assim, as proteases são usadas em muitas aplicações médicas para feridas, saúde digestiva, coagulação sanguínea, diabetes e outras aplicações³⁰.

Os isolados dos fungos *Penicillium citrinum*, *Passalora loranthincola* e *Scopulariopsis gracilis* foram os melhores produtores de proteases, apresentando IE de 2,10, 2,05 e 2,01 respectivamente. As espécies do gênero *Penicillium* apresentam grande aplicabilidade industrial na produção da enzima protease, produzindo enzimas proteolíticas ácidas e alcalinas em diferentes meios²⁵.

Neste estudo, 53% dos isolados apresentaram halo de degradação em meio ágar-leite, sendo o resultado compatível com a literatura consultada. Nagarajan e colaboradores (2020)²⁰ avaliaram 30 espécies de fungos isolados do farelo de algodão, farelo de trigo e farinha de soja para produção de proteases, utilizando placas com esse meio de cultura (ágar-leite). Esses autores constataram que seis isolados apresentaram halo de degradação da enzima protease, representando 20% dos fungos testados.

As pectinases são utilizadas na indústria de bebidas, na clarificação de sucos de frutas e vinhos. Nesse sentido, a utilização industrial dessa classe de enzimas cresce continuamente¹³.

Nesta pesquisa, 46% dos isolados produziram a enzima pectinase, sendo que a melhor produção da enzima foi obtida pelo fungo *Curvularia lunata*, com o IE de 1,37 cm.

Entretanto, nenhum dos endófitos testados apresentou IE superior a 2, e, apesar de terem apresentado capacidade de produção da enzima, não podem ser considerados como bons produtores¹⁴, tendo em vista seus baixos valores de IE. Por isso, não são viáveis para a utilização industrial com base nas condições testadas.

No estudo de Sudeep e colaboradores (2020)²⁹, apenas 28,5% dos fungos filamentosos isolados de várias amostras de solo produziram a pectinase, e, entre as quatro cepas produtoras, o gênero *Aspergillus* sp. apresentou a maior produção da enzima. Nesse caso, a produção máxima de pectinase foi obtida sob condições ótimas de cultivo em fermentação submersa por 48 horas de período de incubação, concentração de substrato de 1% e temperatura de 30 °C. Já para produção comercial de pectinases atualmente, os gêneros *Aspergillus* spp., *Erwinia* spp., *Bacillus* spp. e *Penicillium* spp. vêm sendo amplamente utilizados²⁹.

As tanases são empregadas nas indústrias de alimentos, bebidas, de ração animal, no tratamento de efluentes etc. Contudo, a principal aplicação é na indústria farmacêutica e química por produzir ácido gálico⁵. Na produção de tanases, 93% das linhagens que foram testadas nesta pesquisa apresentaram índice enzimático maior que 1, sendo os melhores produtores da enzima tanase os isolados de *Fusarium annulatum* e *Fusarium* sp., que apresentaram um IE de 2,03 e 5,53, respectivamente. Apenas o isolado de *Passalora loranthincola* não produziu enzimas tanases capazes de degradar o ácido tânico, substrato presente no meio teste revelador.

As xilanases, atualmente, são utilizadas na produção de sucos e pães, no processo de branqueamento de papel, além de serem utilizadas como aditivo em ração animal, na produção de etanol e xilitol²⁸. Na produção de xilanase, o *Penicillium citrinum* apresentou IE de 1,80 sendo o maior halo produzido dentre as demais espécies dos endófitos avaliados. Apesar de esses isolados testados apresentarem produção de xilanases extracelulares, não são indicados para fins industriais, visto que, um bom produtor deve apresentar IE acima de 2,0¹⁴. O fungo *Scopulariopsis gracilis*, apesar de crescer num meio que contém xilana cristalina, como principal substrato de C, não apresentou halo de degradação visível. Neste estudo, 93% dos isolados apresentaram IE mensurável para produção de xilanases.

CONCLUSÕES

Neste estudo, foi possível verificar o potencial termotolerante e halotolerante de fungos isolados da *Goniorrhachis marginata* Taub e *Cavanillesia arborea* K. Shum, o que pode ser considerado promissor para estudos futuros na área da biotecnologia, sendo que o fungo mais halotolerante foi o *Aspergillus niger* e o mais termotolerante o *Aspergillus fumigatus*. Além disso, a microbiota fúngica endófitica cultivável, caracterizada neste estudo, apresentou diferentes espécies de fungos

filamentos com capacidade para produção de enzimas, como *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., identificados como bons produtores de amilase. Já o *Fusarium annulatum* e o *Fusarium* sp. mostraram-se bons produtores de tanase.

Por fim, os fungos *Penicillium citrinum*, *Passalora loranthincola* e *Scopulariopsis gracilis* foram identificados como bons produtores de proteases, o que confirma o potencial biotecnológico para estudos futuros, visando a utilização desses isolados de fungos e de seus bioprodutos via seleção direcional, para aplicação em indústrias de alimentos, bebidas e farmacêutica por meio de processos biotecnológicos específicos.

REFERÊNCIAS

- AKUJOBI, C.O. *et al.*, Production of protease by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolated from abattoir environment. **Journal of Research in Biology**. v. 2, p. 77-82, 2012.
- ARAKAKI, R. L. *et al.* Halotolerance, ligninase production and herbicide degradation ability of basidiomycetes strains. **Food Microbiology, Braz. Journal Microbiol.** v. 4, p. 44, 2013.
- AR H. H. *et al.*, Bioactive compounds and biomedical applications of endophytic fungi: a recent review, **Microbial Cell Factories** v. 22, p. 107, 2023. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02118-x>
- BARATTO, C. M. *et al.*, Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, v. 11 n. 2, p. 15-28, 2011.
- CAVALCANTI, R. M. F., GUIMARÃES L. H. S. Produção e Caracterização Parcial de Tanase Pelo Fungo Endofítico *Aspergillus niger* Ang18 em Fermentação em Estado Sólido. **Revista Saúde e Ciência online**, v. 7, n. 2, p.502, 2018.
- CHOUDHARY M, *et al.*, Endophytic Fungi-Mediated Biocatalysis and Biotransformations Paving the Way Toward Green Chemistry. **Front. Bioeng. Biotechnol.** 2021. doi: 10.3389/fbioe.2021.664705
- DAWOON C, HARYUN K., HYUN S., Fungi in salterns. **Journal of Microbiology**, v. 57, p. 717-724, 2019.
- DENEL. F *et al.*, Isolation, Identification and Enzymatic Activity of Halotolerant and Halophilic Fungi from the Great Sebkhah of Oran in Northwestern of Algeria. **Mycobiology**, v 47, p. 230-241, 2019.
- EDBEIB M. F., WAHAB R. A., Halophiles HF. Halophiles: biology, adaptation and their role in decontamination of hypersaline environments. **World J Microbiol Biotechnol.** v.32, p.1-23, 2016.
- FELBER, A.C. *et al.* Bioprospecting foliar endophytic fungi of *Vitisla brusca* Linnaeus, Bordô and Concord cv. **Annals of Microbiology**, v. 66, p.765-775, 2016.
- GENDI E. H. *et al.*, Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges. **J. Fungi** v.8, 23. 2023 <https://doi.org/10.3390/jof8010023>
- KHAN, M. F.; PATRA, S. Deciphering the rationale behind specific codon usage pattern in extremophiles. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15548, 2018.
- KUMAR, D. J. *et al.*, Pectinase Producing Bacteria Isolation from Halophilic Soil, Water Samples and Partial Purification of the Enzyme. **International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology**. v. 7, p. 600-607, 2020.
- LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 348-352, 1994.
- LIMA, J. M. Enzyme-producing fungi associated to aquatic macrophytes of the Negro river, Manaus. **Biota Amazônia**, v. 10, n. 3, p. 52-57, 2020.
- MAHDIEH, *et al.* Desert-adapted fungal endophytes induce salinity and drought stress resistance in model crops. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 10, p.225-238, 2021.
- MAIA, F.G. *et al.* Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose **Bioscience Journal**. v. 27, n. 2, p. 205-210, 2011.
- MENDONÇA, G. R. Q. *et al.* Atividade enzimática de fungos endofíticos das plantas medicinais amazônicas Mulateiro (*Calycophyllum spruceanum*) e Sucuuba (*Himatanthus sucuuba*). **ScientiaPlena**, v. 9, n. 19, 2023. doi: 10.14808/sci.plena.2023.
- MUSA, H. *et al.* Salt-adapted moulds and yeasts: Potentials in industrial and environmental biotechnology. **Process Biochemistry**, v. 69, p. 33-44, 2018.
- NAGARAJAN, *et al.*, Optimized production of extracellular alkaline protease from *Aspergillus tamarii* with natural by-products in a batch stirred tank bioreactor. **Preparative Biochemistry & Biotechnology** v. 50, p. 992-999, 2020.
- OLIVEIRA, T. B. *et al.*, A. Thermophilic fungi in the new age of fungal taxonomy. **Extremophiles**, v. 19, n. 1, p. 31-37, 2015.
- QIN, D., *et al.* Enhanced production of unusual triterpenoids from *Kadsura angustifolia* fermented by a symbiont endophytic fungus, *Penicillium* sp. SWUKD4. 1850. **Phytochemistry** v.158, p.56-66, 2019. doi: 10.1016/j.phytochem.2018.11.005
- RAJAA C. *et al.* Isolation, Identification and Enzymatic Activity of Halotolerant and Halophilic Fungi from the Great Sebkhah of Oran in Northwestern of Algeria. **Mycobiology**, v. 47, p. 230-241, 2019.
- RANA L. K. *et al.*, Endophytic fungi from medicinal plants: biodiversity and biotechnological applications, **Microbial Endophytes, Woodhead Publishing**, v.21, p. 273-305, 2020.
- SANTI, L. *et al.* *Penicillium oxalicum* secretomic analysis identify plant cell wall degrading enzymes important for fruit juice extraction. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, p. 1764-1775, 2021.
- SILVA, B, C, R *et al.*, Isolation and screening of microorganisms that produce enzymes of commercial interest. **Scientia Plena**, v. 14, p. 1-10, 2018.
- SIMAIR, A. A, *et al.* Production and Partial Characterization of α -Amylase Enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and Potential Applications. **BioMed Research International**, v. 12, p. 15-25, 2017.
- SINGH, J. *et al.* Enzymatic Processing of Juice From Fruits/Vegetables: An Emerging Trend and Cutting Edge Research in Food Biotechnology. **Enzymes in Food Biotechnology: Academic Press**, v. 24, p.419 -432, 2019.
- SUDEEP, C. S. *et al.*, Production, Characterization, and Industrial Application of Pectinase Enzyme Isolated from Fungal Strains. **Fermentation**, v. 6, n, 59, 2020. <https://doi.org/10.3390/fermentation6020059>
- SUMAIYA N. H. Extracellular Enzyme of Endophytic Fungi Isolated

from *Ziziphus spina* Leaves as Medicinal Plant. 2022.doi:<https://doi.org/10.1155/2022/2135927>

31. TALLAPRAGADA, P.; *et al.*, Partial purification and characterization of amylase enzyme under solid state fermentation from *Monascus sanguineus*. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. v. 15, n. 1, p. 95-101,2017.

32. WULANDARI, A.P. *et al.* Endophytic microbiome of *Boehmeria nivea*

and their antagonism against latent fungal pathogens in plants. **BMC Microbiol**, v.22, p.320-339, 2022.

33. ZANG, Y.Y. *et al.* Carrier-Free Immobilization of Rutin degrading enzyme extracted from *Fusarium* spp. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. 470, 2020.

34. ZHANG, X. *et al.* Novel Natural Products from Extremophilic Fungi. **Marine Drugs**, v. 16, n. 6, p. 194, 4 jun. 2018.

Submetido em 28/08/2024

Aceito em 23/10/2024