

AVALIAÇÃO DE BASIDIOMICETOS DO GÊNERO *GANODERMA* QUANTO AO POTENCIAL DE SÍNTESE DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

¹Cristiane Vieira Helm; ¹Edson Alves de Lima; ²Adriana Paula Orellana Boza; ³Fernanda de Souza Pinto; ⁴Selma da Costa Terzi; ⁴Sônia Couri

¹ Embrapa Florestas, Caixa Postal 319, 83411-000, Colombo, PR

² Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

³ Faculdades Integradas “Espírita”, Curitiba, PR

⁴ Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ

e-mail: cristiane@cnpf.embrapa.br

EVALUATION OF BASIDIOMYCETES OF *GANODERMA* GENUS REGARDING LIGNOCELLULOLYTIC ENZIMES SYNTHETIC POTENTIAL

Resumo

Este trabalho teve por objetivo avaliar a degradação de *Eucalyptus benthamii* por basidiomicetos do gênero *Ganoderma* da coleção de macrofungos da *Embrapa Florestas*, uma vez que estes fungos são potenciais produtores de enzimas oxidantes e hidrolíticas envolvidas na degradação de lignina e celulose. Foi utilizada a técnica de coloração com vermelho congo e determinada a atividade da celulase em carboximetilcelulose (CMCase). Para a produção das enzimas foi realizada primeiramente a produção de inóculo (micélio) em meio submerso, em seguida a fermentação semi-sólida (FSS) em meio de farelo de trigo, e finalmente a avaliação das enzimas lignocelulolíticas em madeira moída de *Eucalyptus benthamii*, suplementado com fonte de nitrogênio e sais minerais. Todos os isolados mostraram crescimento micelial nos diferentes substratos testados. As enzimas carboximetilcelulase e celulase cristalina apresentaram atividade, com exceção do isolado 0039, enquanto que a atividade beta-glicosidase só foi detectada no isolado 0020. O isolado *Ganoderma orbiformum* (0096) foi o que apresentou maior atividade para as enzimas beta-glicosidase e celulase cristalina. Todos os isolados do *Ganoderma lucidum* apresentaram a formação do halo, indicando a presença da CMCase.

Abstract

The objective of this study was to evaluate *Eucalyptus benthamii* decay by basidiomycetes of *Ganoderma* genus from *Embrapa Florestas*' macrofungi collection, since those fungi are potential producers of oxidase and hidrolitic enzymes involved at Lignin and Cellulose decay. The red congo collouring technique was used and celulase activity in carboximetilcellulose (CMCase) determined. For enzymes production, firstly inoculates (mycelium) production was realized within submerse culture, after it a semi-solid fermentation (FSS – *Fermentação Semi-Sólida*) within wheat bran and, finally *Eucalyptus benthamii*, wood loaf complemented with minerals and nitrogen sources Lignincellulotic enzymes was evaluated. All isolates portrayed mycelia growing at different tested cultures. Carboximeticelulase and crystal celulase showed activity, with exception of isolate 0039, while beta-glicosidase portrayed activity only for isolate 0020. The isolate *Ganoderma orbiformum* (0096) was the one which portrayed stronger activity of beta-glicosidase and crystal celulase enzymes. All *Ganoderma lucidum* isolates presented ring formation, CMCase presence indicator.

Introdução

O gênero *Ganoderma* pertence a classe dos basidiomicetos e são fungos conhecidos por sua capacidade específica de degradar a madeira pela ação de suas enzimas oxidativas (peroxidases e lacases) e hidrolíticas (beta-glicosidases e celulases) (Fernandes et al., 2005). Este gênero se desenvolve em temperatura média de 30 °C produzindo uma série de enzimas ligno-celulases, que permitem degradar facilmente a lignina e a celulose da madeira, assim como outros substratos vegetais utilizados para o seu cultivo.

Para o cultivo de cogumelos são aproveitados resíduos agroindustriais como substratos à base de cana-de-açúcar, palha de trigo, palha de arroz, gramíneas, serragens, polpa e casca de frutas, folhas de bananeira entre outros. Uma vez que diversos tipos de resíduos lignocelulósicos são gerados por processos industriais, exploração agrícola e pela população das áreas urbanas. A biomassa, no geral, tem sido utilizada geralmente como combustível sólido em sistemas de reciclagem e produção de biocombustíveis (Baysal et al., 2003).

A biomassa lignocelulósica compõe mais de 60 % de todo o material vegetal produzido em terra. Este recurso vasto é a fonte potencial de biocombustível, biofertilizantes, indústria de papel, rações animais e substratos para produção de alimentos e a utilização racional de todo esse potencial através de processos químicos ou biológicos é o grande salto na inovação tecnológica.

Inserida dentro do Projeto Florestas Energéticas que busca soluções inovadoras para o uso racional dos resíduos florestais, o objetivo deste trabalho foi avaliar, através de uma triagem, os basidiomicetos da coleção de culturas da *Embrapa Florestas*, quanto ao potencial de síntese de enzimas celulolíticas tendo em vista a hidrólise de substratos de madeira na conversão a etanol de segunda geração.

Material e Métodos

Foram selecionados cinco isolados do gênero *Ganoderma* (tabela 1) da coleção de macrofungos da *Embrapa Florestas*, inicialmente mantidos em placas de Petri com meio PDA a 25±1 °C.

TABELA 1 – Relação dos basidiomicetos avaliados da Coleção de Culturas da *Embrapa Florestas*.

Isolados	Fungos	Origem
0020	<i>Ganoderma lucidum</i>	Hong Kong, China
0096	<i>Ganoderma orbiformum</i>	Paranaguá, PR
0049	<i>Ganoderma australi (tornatum)</i>	Embrapa Florestas, Colombo, PR
0039	<i>Ganoderma lucidum</i>	Reserva Biológica Cambuí, Curitiba, PR
0033	<i>Ganoderma lucidum</i>	Chapada dos Veadeiros, GO

Primeiramente foi avaliada a atividade da celulase, onde os isolados foram cultivados em meio sintético com carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono (NaNO_3 : 3,0 gL⁻¹; K_2HPO_4 : 1,0 gL⁻¹; MgSO_4 : 0,5 gL⁻¹; KCl : 0,5 gL⁻¹; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 10,0 mgL⁻¹; CMC: 10,0 gL⁻¹; ágar: 20,0 gL⁻¹). Os inóculos foram obtidos discos no centro de placas de Petri. Estas foram incubadas por 4 dias a 28 °C e em seguida submetidas a choque térmico por 16 h a 50 °C. Após esse período, foram adicionados 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5 gL⁻¹) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0. Após 30 min a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão. Os diâmetros das colônias e os halos produzidos foram medidos com paquímetro (Nogueira & Cavalcanti,

1996)

Após, foram realizadas três etapas, a primeira foi realizada uma fermentação submersa para produção de micélio, seguida de uma fermentação semi-sólida, utilizando farelo de trigo como substrato para a síntese enzimática e a última etapa utilizando madeira de *Eucalyptus benthamii* triturado para a hidrólise do substrato pelo complexo enzimático.

Na fermentação submersa a composição do meio de cultura foi: glicose ($C_6H_{12}O_6$, $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), extrato de levedura ($4,8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4 , $0,87\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), cloreto de cálcio ($CaCl_2\cdot 2H_2O$, $0,37\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), cloreto férrico ($FeCl_3\cdot 6H_2O$, $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), cloreto de manganês ($MnCl_2\cdot 4H_2O$, $7,2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e sulfato de cobre ($CuSO_4$, $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Foram adicionados aos frascos de Erlenmeyer de 250 mL, 125 mL deste meio, que depois de autoclavados foram inoculados com 5 discos dos isolados crescidos em placas de Petri com meio BDA. Os frascos foram incubados a $25\text{ }^\circ\text{C}$, por 11 dias, em triplicata.

A fermentação no estado semi-sólido utilizando farelo de trigo como substrato foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL com meio contendo 25 g de farelo de trigo e uma solução de sulfato de amônia ($(NH_4)_2SO_4$, 0,91 %) em ácido clorídrico (HCl, 0,1 M). Este meio foi esterilizado em autoclave por 15 min a $121\text{ }^\circ\text{C}$. Após foi inoculado com 25 mL do meio fermentado produzido na fermentação submersa e incubado a $25 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$. por 17 dias.

O meio fermentado foi extraído com 30 mL com solução tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8, filtrado e armazenado em freezer a $-10 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$, até o momento de ser analisado e testado quanto a sua eficiência na hidrólise do material lignocelulósico. O extrato enzimático obtido na fermentação com farelo de trigo foi encaminhado ao Laboratório de Processos Fermentativos do CTAA – Embrapa Agroindústria de Alimentos para a determinação das atividades das enzimas. beta-glicosidase, celulase cristalina (C1) e carboximetilcelulose (CMCase) segundo Wood & Garcia-Campayo (1990).

Para a hidrólise da madeira 15 g de *Eucalyptus benthamii* triturado (granulometria de 0,5 mm) foi adicionado em 60 mL de solução de extrato de levedura ($4,8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4 , $0,87\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), cloreto de cálcio ($CaCl_2\cdot 2H_2O$, $0,37\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), cloreto férrico ($FeCl_3\cdot 6H_2O$, $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), cloreto de manganês ($MnCl_2\cdot 4H_2O$, $7,2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e sulfato de cobre ($CuSO_4$, $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Este meio foi esterilizado em autoclave por 1 hora a $121\text{ }^\circ\text{C}$. como pré-tratamento para deslignificação da amostra e adicionado o inóculo da fermentação e incubados por 7 dias.

Resultados e Discussão

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos após o cultivo dos fungos em meio sintético contendo CMC como única fonte de carbono. Houve a formação de um halo na zona de degradação da celulose ao redor das colônias, correspondente ao halo indicador da degradação da CMC, observada em 3 isolados de *Ganoderma lucidum*. Para comparar esses isolados, foi estabelecido um índice enzimático e por meio deste observou-se que algumas colônias com pouco crescimento apresentaram os índices maiores, como o isolado (0039) diâmetro da colônia = 12,87 mm, índice = 2,93. A visualização do halo depende de vários fatores, como a composição do meio de cultura e é um indicativo da síntese da enzima carboximetilcelulase (CMCase) pelos fungos avaliados.

TABELA 2 – Atividade da celulase de isolados do gênero *Ganoderma* da coleção de macrofungos da Embrapa Florestas-Colombo,PR, cultivados em meio sintético com carboximetilcelulose por 4 dias a $28\text{ }^\circ\text{C}$. Øc = diâmetro da colônia (mm); Øh = diâmetro do halo (mm); le = índice enzimático; nc = não cresceu.

Isolados		Øc	Øh	le
0020	<i>Ganoderma lucidum</i>	58,68	68,62	1,17
0096	<i>Ganoderma orbiformum</i>	nc		
0049	<i>Ganoderma australi (tornatum)</i>	nc		
0039	<i>Ganoderma lucidum</i>	12,87	37,76	2,93
0033	<i>Ganoderma lucidum</i>	53,23	63,92	1,20

A produção de micélio em forma de pellets na fermentação submersa facilitou a adaptação dos fungos no farelo de trigo para a produção das enzimas extracelulares .

A tabela 3 apresenta os resultados obtidos do extrato enzimático obtido na fermentação com farelo de trigo após a determinação das atividades das enzimas beta-glicosidase, celulase cristalina e carboximetilcelulase. Os resultados demonstraram que os isolados do gênero *Ganoderma* apresentaram maior atividade para a enzima beta-glicosidase e apenas um isolado da espécie *G. lucidum* apresentou atividade para a enzima CMC.

TABELA 3 – Atividade das enzimas beta-glicosidase, celulase cristalina (C1) e carboximetilcelulase

(CMCase) nas amostras obtidas dos basidiomicetos por fermentação semi-sólida em farelo de trigo, após 17 dias de fermentação.

Isolados		Atividade Enzimática UI (microM/min)		
		Beta-glicosidase	Celulase cristalina C1	Carboximetil celulase CMC
0020	<i>Ganoderma lucidum</i>	0,036	0,014	0,089
0096	<i>Ganoderma orbiformum</i>	0,281	0,008	0,000
0049	<i>Ganoderma australi (tornatum)</i>	0,159	0,013	0,000
0039	<i>Ganoderma lucidum</i>	0,000	0,000	0,000
0033	<i>Ganoderma lucidum</i>	0,172	0,013	0,000

As análises dos meios fermentados demonstraram que os isolados do gênero *Ganoderma* testados ainda não foram capazes de converter os substratos lignocelulósicos em açúcares redutores.

Até o presente momento não se conseguiu os resultados esperados, possivelmente, devido ao fato da fermentação em estado semi-sólido exigir mais tempo para a atividade das celulasas dos basidiomicetos degradar a fonte de carbono. Os experimentos estão no início e para as próximas etapas visamos adotar um pré-tratamento visando facilitar o acesso das enzimas lignocelulolíticas.

Referências

ABREU, L.D.; MARINO, R.H.; MESQUITA, J.B.; RIBEIRO, G.T. Degradação da madeira de *Eucalyptus* sp. por basidiomicetos de podridão branca. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.74, n.4, p.321-328, 2007.

BAYSAL, E; PEKER, H.; YALINKILIÇ, M.K.; TEMIZ, A . Cultivation of oyster mushroom on waste paper with some added supplementary materials. *Bioresource Technology*, v.89, n.1, p. 95-97, 2003.

FERNANDES, L.; LEITE, C.L.; ESPOSITO, E.; REIS, M.M. *In vitro* wood decay of *Eucalyptus grandis* by the basidiomycete fungus *Phellinus flavomarginatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.55, p.187-193, 2005.

NOGUEIRA, E.B.S.; CAVALCANTI, M.A.Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. *Revista de Microbiologia*, v.27, p.7-9, 1996.

NOVO INDUSTRI S.A. (Dinamarca). Celulose determination: Division Enzymes, N.AF149/5, GB, 1978.

WOOD, T.M.; GARCIA-CAMPAYO, V. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation*, v.1, p. 147-161, 1990.