



## SCREENING TEST PARA AVALIAÇÃO DE BASIDIOMICETOS QUANTO À SÍNTESE DE CELULASES

\*Gustavo Lozano Côrtes, \*Fernanda de Souza Pinto, \*Crísfiâne Vieira Helm, \*Edson Alves de Uma, \*\*\*Washington Luiz Esteves Magalhães

\*Graduando do Curso de Engenharia Industrial Madeireira da Universidade Federal do Paraná, Curitiba - Paraná, estagiário da Embrapa Florestas, Colombo - Paraná,

\*Graduanda do Curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná, Curitiba - Paraná, estagiária da Embrapa Florestas, Colombo - Paraná,

\*\* Pesquisador da Embrapa Florestas, Caixa Postal 319, 83411-000, Colombo, PR

[Email:gustavo.cla.pioneiro@gmail.com](mailto:gustavo.cla.pioneiro@gmail.com)

### Resumo

Este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade da celulase de isolados de basidiomicetos. Dezenove isolados da coleção de macrofungos da *Embrapa Florestas* foram analisados para avaliar seus potenciais quanto à produção de celulases em resposta à presença de celulose como única fonte de carbono, em meio de cultura. Para a síntese enzimática foi realizada primeiramente a produção de micélio em placas de Petri, com meio PDA e posteriormente transferidas para o meio Socarean contendo Avicel e CMC como fontes de carbono. Foi utilizado o método qualitativo de coloração do indicador vermelho congo para a determinação do índice enzimático. Foram medidos os diâmetros dos halos de crescimento e de hidrólise após cinco dias de cultivo. Todos os isolados mostraram crescimento micelial nos diferentes substratos testados. Os que apresentaram o melhor índice enzimático foram *Xylaria globosa* (1,3431), *Perenniporia* sp (1,3069) e *Flaviporus venustus* (1,3027). Contudo, sugere-se que estudos mais detalhados com os isolados, sejam realizados para avaliar se estes são potencialmente bons produtores de celulases, sob condições adequadas de cultivo.

### SCREENING TEST FOR THE EVALUATION OF BASIDIOMYCETES ACCORDING CELLULASE POTENTIAL SYNTHESIS

### Abstract

This work objective was to evaluate the cellulase activity from nineteen basidiomycetes isolates belonging to the Embrapa Florestas collection macrofungi. Were analyzed their potentials towards cellulase production in a culture medium with just cellulose as a carbon source. Firstly were produced mycelia on Petri dishes for enzymatic synthesis in a PDA medium and then transferred for a Socarean medium with cellulose Avicel and CMC as the carbon sources. The enzymatic index was qualitatively evaluated through colorimetric congo red method. After five cultivating days were measured the growth and hydrolysis haloes. All isolates showed mycelia growth on the distinct tested substrates. The best enzymatic indices were achieved by the isolates *Xylaria globosa* (1.3431), *Perenniporia* sp (1.3069), and *Flaviporus venustus* (1.3027). However, more detailed studies are suggested for cellulase quantification using optimal cultivation conditions.

### Introdução

Alguns gêneros da classe dos fungos basidiomicetos são 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). Estes gêneros se desenvolvem 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.

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. Com a crescente preocupação na obtenção de energia limpa e renovável, muitos trabalhos em bioenergia tem sido desenvolvidos com a finalidade de obter-se ganhos substanciais para o meio ambiente.

Devido ao grande impacto ambiental que o uso contínuo de combustíveis fósseis apresenta, a produção de etanol de 2ª geração, a partir de material lignocelulósico, tem sido muito explorada, mostrando um potencial ambiental, econômico e social.

A biomassa lignocelulósica, constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, pode ser submetida a pré-tratamentos com a finalidade de facilitar a hidrólise enzimática que por sua vez pode converter açúcares redutores em etanol. Entretanto, faz-se necessário o ajuste de melhores condições para obtenção de um pré-tratamento adequado, bem como a obtenção de enzimas hidrolíticas com atividade alta e custo baixo, para que todo o processo seja viável economicamente.

Os fungos filamentosos da classe dos basidiomicetos, tem propriedades fisiológicas, enzimáticas e bioquímicas que os permitem se destacar entre os organismos que podem crescer em substratos lignocelulósicos. Os gêneros avaliados nesse estudo pertencem a classe dos basidiomicetos, compreendendo uma classe de organismos com uma capacidade de degradar a madeira pela ação de suas enzimas oxidativas (peroxidases e lacases) e hidrolíticas (beta-glicosidases e celulases) (Fernandes et al., 2005).

## Material e Métodos

A *Embrapa Florestas* mantém uma coleção de trabalho de isolados de macrofungos em método Castellani. O método baseia-se na conservação dos isolados em frascos de vidro contendo água destilada, autoclavados a  $121 \pm 1$  °C, a 1 atm por 15 min.

Neste estudo foram selecionados 19 destes isolados para avaliar a produção de enzimas celulolíticas (Tabela 1).

Para a realização do Screening Test e determinação do Índice Enzimático, primeiramente os isolados foram transferidos asépticamente em capela de fluxo laminar, para Placas de Petri contendo meio PDA (Batata desidratada 4g; dextrose 20g; Agar 15g; pH:  $5.6 \pm 0.2$  a 25°C). Plugs foram colocados no centro das placas e incubadas em estufa à  $25 \pm 1$ °C, por 7 dias. O experimento foi realizado com 5 repetições.

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

| No. de registro CNPF | Isolados                    | Local de Origem                           | Data de Coleta |
|----------------------|-----------------------------|---|----------------|
| 39                   | <i>Ganoderma lucidum</i>    | Reserva Biológica Cambuí                  | 15/01/00       |
| 33                   | <i>Ganoderma lucidum</i>    | Goiás, Chapada dos Veadeiros              | 28/11/99       |
| 66                   | <i>Pleurotus djamor</i>     | Paraná, Pinhais                           | 16/10/00       |
| 20                   | <i>Ganoderma lucidum</i>    | China, Hong Kong, CUHK                    | 06/08/99       |
| 19                   | <i>Pleurotus albidus</i>    | Paraná, Araucária                         | 07/06/99       |
| 71                   | <i>Xylaria globosa</i>      | Paraná, Colombo, Embrapa Florestas        | 15/01/01       |
| 28                   | <i>Lentinula edodes</i>     | Distrito Federal, Brasília, Cenargen CC57 | 17/09/99       |
| 24                   | <i>Lentinula boryana</i>    | Paraná, Morro Anhangava                   | 15/08/99       |
| 43b                  | <i>Perenniporia (tipo2)</i> | Paraná, Colombo, Embrapa Florestas        | 04/04/00       |
| 7                    | <i>Oudemansiella canari</i> | Paraná, Potinga, Guaraqueçaba             | 26/07/98       |

|     |                              |                                    |          |
|-----|------------------------------|------------------------------------|----------|
| 43a | <i>Perenniporia (tipo 1)</i> | Paraná, Colombo, Embrapa Florestas | 04/04/00 |
| 35  | <i>Polyporus udus</i>        | Paraná, Colombo, Embrapa Florestas | 10/12/99 |
| 26  | <i>Pleurotus sajor-caju</i>  | China, Cenargen, CC14              | 17/09/99 |
| 11  | <i>Fomitopsis nivosa</i>     | Parque Nacional do Superagui       | 03/01/99 |
| 44  | <i>Phylacia turbinata</i>    | Paraná, Colombo, Embrapa Florestas | 04/04/00 |
| 57  | <i>Xylaria globosa</i>       | Paraná, Colombo, Embrapa Florestas | 17/04/00 |
| 45  | <i>Xylaria cubensis</i>      | Paraná, Colombo, Embrapa Florestas | 04/04/00 |
| 53  | <i>Flaviporus venustus</i>   | Paraná, Colombo, Embrapa Florestas | 17/04/00 |
| 18  | <i>Phellinus linteus</i>     | Paraná, Colombo, Embrapa Florestas | 28/05/99 |

Após o crescimento e desenvolvimento micelial até atingir todo o diâmetro das placas de Petri, os fungos foram transferidos para placas de Petri contendo meio Socrean (meio sintético com carboximetilcelulose (CMC) e Avicel como únicas fontes de carbono (NaNG-i: 3,0 gr<sup>1</sup> ; K<sub>2</sub>HP04: 1,0 gr<sup>1</sup> ; MgS04: 0,5 gL<sup>"</sup> ; KCl: 0,5 gL<sup>-1</sup> ; FeS04 .7H~: 10,0 mgL<sup>"</sup> ; CMC: 5.0 gr<sup>1</sup> pH: 5,0; ágar: 30,0 gr<sup>1</sup> ; Avicel: 5.0 gL<sup>-1</sup> pH: 5,0). O Avicel e o CMC induzem os fungos a produzirem enzimas que degradam a celulose. Os inóculos foram obtidos discos no centro de placas de Petri. Os isolados foram mantidos em estufa a 25±1 DC, até obterem um crescimento mínimo. A partir do momento em que obtiveram o crescimento adequado foram selecionadas três placas com melhor desenvolvimento para o teste do vermelho do congo.

Para o teste com vermelho do congo (C32H22N~a206S2) marcou-se em cada placa dois eixos aleatórios, esses eixos foram utilizados como referência para a medida do halo de crescimento e posteriormente para o halo de hidrólise. Foram registrados os valores referentes aos diâmetros correspondentes a cada eixo. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de solução do indicador vermelho congo 0,1% em cada uma das placas de Petri contendo os isolados. Após 15 minutos ter ocorrido a reação foi adicionado 3 mL de solução de NaCl 0,1 M. O halo fluorescente de coloração alaranjada foi observado em todas as placas. O diâmetro do halo foi medido utilizando como referência os mesmos eixos que foram marcados na placa anteriormente. Os diâmetros das colônias e os halos produzidos foram medidos com paquímetro digital e calculado o halo de hidrólise.

$$\text{Ind. Enz.} = \frac{\text{Øc}}{\text{Øh}}$$

## Resultados e Discussão

Os resultados obtidos após o cultivo dos fungos em meio sintético contendo CMC e AVICEL como únicas fontes de carbono e após a reação do teste qualitativo com o indicador vermelho do congo foi verificada a formação do halo de hidrólise na zona de degradação da celulose ao redor das colônias, correspondente ao halo indicador da degradação da CMC e do AVICEL, observada nos isolados de macrofungos selecionados. Para comparar esses isolados, foi estabelecido Um índice enzimático. A visualização do halo dependeu de vários fatores, como a composição do meio de cultura e foi um indicativo da síntese da enzima carboximetilcelulase (CMCase) pelos fungos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade da celulase de isolados de vários gêneros da coleção de macrofungos da Embrapa Florestas-Colombo,PR, cultivados em meio sintético com carboximetilcelulose e Avicel a 28 De. 0c = diâmetro da colônia (mm); 0h = diâmetro do halo (mm); Ind. Enz. = índice enzimático; N/A = não produziu enzima! enzima não detectada pdo teste.

| No. de registro CNPF | Isolado                  | Ø halo de crescimento | δ Øcresc. | Ø halo de hidrólise | δ Øhidról. | Ind. Enz. |
|----------------------|--------------------------|-----------------------|-----------|---------------------|------------|-----------|
| 39                   | <i>Ganoderma lucidum</i> | 54,5317               | 0,9108    | 56,8517             | 1,2682     | 1,0425    |

|     |                      |         |        |         |        |        |
|-----|----------------------|---------|--------|---------|--------|--------|
| 33  | Ganoderma lucidum    | 58,7783 | 0,9375 | 60,8600 | 0,7451 | 1,0354 |
| 66  | Pleurotus djamor     | 58,9700 | 3,0445 | 61,9367 | 0,4737 | 1,0503 |
| 20  | Ganoderma lucidum    | 60,6867 | 0,5244 | 55,8667 | 0,9339 | 0,9206 |
| 19  | Pleurotus albidus    | 65,4875 | 4,1118 | 68,6850 | 1,6688 | 1,0488 |
| 71  | Xylaria globosa      | 41,2025 | 9,9950 | 55,3375 | 2,0541 | 1,3431 |
| 28  | Lentinula edodes     | 52,2925 | 0,5268 | 63,7725 | 1,4319 | 1,2195 |
| 24  | Lentinula boryana    | 44,3025 | 0,6470 | 45,6400 | 0,4525 | 1,0302 |
| 43b | Perenniporia (tipo2) | 66,4225 | 4,2674 | 73,1850 | 2,2274 | 1,1018 |
| 7   | Oudemansiella canari | 50,5025 | 3,6663 | 53,8850 | 5,3457 | 1,0670 |
| 43a | Perenniporia (tipo1) | 52,2683 | 1,3120 | 68,3117 | 0,1782 | 1,3069 |
| 35  | Polyporus udus       | 41,8500 | 3,2964 | 34,7917 | 2,5611 | 0,8313 |
| 26  | Pleurotus sajor-caju | 64,1433 | 4,7845 | 51,6817 | 2,1165 | 0,8057 |
| 11  | Fomitopsis nivosa    | 54,0067 | 3,6758 | 54,2333 | 3,2583 | 1,0042 |
| 44  | Phylacia turbinata   | 55,6117 | 1,4949 | 59,0583 | 0,9035 | 1,0620 |
| 57  | Xylaria globosa      | N/A     |        | N/A     | N/A    |        |
| 45  | Xylaria cubensis     | N/A     |        | N/A     | N/A    |        |
| 53  | Flaviporus venustus  | 46,0983 | 5,9021 | 60,0500 | 3,9491 | 1,3027 |
| 18  | Phellinus linteus    | 32,0733 | 2,0698 | 35,8567 | 0,4316 | 1,1180 |

Os isolados selecionados evidenciaram potencial produção de enzimas celulases, os que apresentaram o melhor índice enzimático foram *Xylaria globosa* (1,3431), *Perenniporia sp* (1,3069) e *Flaviporus venustus* (1,3027). Contudo, sugere-se que estudos mais detalhados com os isolados, sejam realizados para avaliar se estes são potencialmente bons produtores de celulases, sob condições adequadas de cultivo.

#### Referências

- ABREU, L.D.; MARINO, R.H.; MESQUITA, J.B.; RIBEIRO, O.T. Degradação da madeira de *Eucalyptus sp*, por basidiomicetos de podridão branca. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.74, nA, p.32 1-328, 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, MM. *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.A.F 149/5, GB, 1978.
- WOOD, T.M.; GARCIA-CAMPAYO, V. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation*, v.1, p. 147-161, 1990.