

Screening de Macrofungos Potencialmente Produtores de Enzimas Fenoloxidativas, Xilanolíticas e Celulolíticas

Vanessa Bachmann¹, Mariana Alexandre Zaboenco²; Hayssa Nunes²; Edson Alves de Lima³; Cristiane Vieira Helm³; Washington Luiz Esteves Magalhães³; Patrícia Raquel Silva³; Lorena Benathar Ballod Tavares²

¹Universidade Regional de Blumenau – Programa de Mestrado em Engenharia Ambiental
Caixa Postal 1507 – 89030-000 Blumenau – SC - E-mail: vanessabachmann@hotmail.com

²Universidade Regional de Blumenau – Depto. de Engenharia Química
Caixa Postal 1507 – 89030-000 Blumenau – SC

³Embrapa Florestas. Estrada da Ribeira, km 111
Caixa Postal 319 - 83411-000 Colombo-PR

RESUMO

*Basidiomicetos são fungos capazes de degradar os materiais lignocelulósicos por meio de enzimas hidrolíticas e oxidativas. Como forma de seleção qualitativa de fungos eficientes, emprega-se a técnica de difusão em placa de Petri - “cup-plate”. Neste estudo foram avaliados trinta e três isolados para seleção de linhagens produtoras de enzimas fenoloxidativas, xilanolíticas e celulolíticas. Avaliou-se a capacidade fenoloxidativa em meio com ácido gálico, xilanolítica em meio com xilana a 4% e celulolítica pelo teste com o indicador Vermelho do Congo. Das espécies testadas 51,5% produziram fenoloxidases, destacando-se o fungo *Lentinula boryana*. Onze isolados (33,3%) produziram xilanase, destacando-se os fungos *Fomitella supina* e *Lentinula boryana* vinte isolados (60,6%) se mostraram produtores de celulasas, destacando-se os fungos *A. vilipes* e *I. splitgerber* e *P. sajour-caju*. Os resultados indicaram que os testes qualitativos são bons indicadores para seleção de linhagens, mas não substituem os testes quantitativos de atividade enzimática.*

Palavras-chave: cup-plate, oxidativas, hidrolíticas, seleção, fungos.

INTRODUÇÃO

Materiais lignocelulósicos, por representarem uma abundante fonte de energia, apresentam grande potencial de uso como matéria prima em processos industriais para produção de bens de consumo diversos como combustíveis, insumos químicos, alimentos dentre outros (TAYLOR, 2008; CUREVO; FOLCH; QUIROZ, 2009). A biomassa lignocelulósica é constituída de celulose, hemicelulose, lignina, pequenas quantidades de extrativos e sais minerais (FERREIRA, 2009) Estes materiais apresentam-se como um compósito que deve ser estudado considerando-se suas propriedades químicas e morfológicas. Destes compostos, a celulose é o componente mais abundante seguindo das polioses (ou hemiceluloses) que são compostas essencialmente por glicose, manose e galactose (hexoses) e xilose e arabinose (pentoses). A lignina é composta basicamente de unidades de fenilpropano formando uma macromolécula tridimensional e amorfa, representando de 20 a 30% do total dos lignocelulósicos. Todos estes constituintes estão intimamente associados e/ou ligados quimicamente, construindo uma estrutura celular vegetal muito complexa (FERREIRA, 2009).

O processo de hidrólise enzimática desses compostos é conduzido por enzimas altamente específicas, liberando açúcares redutores incluindo a glicose. As enzimas basicamente, são encontradas em dois grupos responsáveis pela degradação da lignocelulose, as enzimas oxidativas e as hidrolíticas. As oxidativas, como lacase, manganês-peroxidase (MnP) e lignina-peroxidase (LiP), atuam na degradação da lignina e detoxificam o meio de crescimento dos metabólitos gerados durante a degradação. A degradação e/ou biotransformação da lignina permite que as enzimas hidrolíticas como as xilanases e celulases atuem nas fontes de carbono (AGUIAR FILHO, 2008; ALEXANDRINO et al., 2007; GOMES, 2007) liberando glicose e xilose, basicamente. Portanto, considerando-se o programa nacional de agroenergia que visa também o etanol de segunda geração, o conhecimento de fungos produtores de enzimas lignocelulolíticas torna-se relevante. Portanto, esse trabalho teve por objetivo realizar um *screening* de 33 isolados de macrofungos buscando encontrar linhagens para utilização em processo de produção de etanol em biomassa florestal pré-tratada.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições de cultivo para obtenção de inóculos

Os fungos foram conservados conforme o método Castellani (1967), e mantidos sob refrigeração até início das atividades. Para produção do inóculo, as cepas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio Potato Dextrose Ágar (PDA) por alguns dias em estufa BOD a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ até o preenchimento da placa pela colônia.

Determinação qualitativa das atividades enzimáticas

Fenoloxidasas: Realizaram-se ensaios em placas contendo meio ágar-malte com ácido gálico (AMAG) descrito por Mancilha (2006) que adaptou a metodologia de Davidson (1938). Cada placa contendo o meio AMAG foi inoculada na região central com um disco de micélio de aproximadamente 7 mm de diâmetro, sendo realizadas três repetições para cada fungo. As placas foram incubadas em estufa BOD a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ no escuro. Em intervalos regulares de aproximadamente 4 horas realizou-se a leitura do diâmetro do halo de oxidação para determinar a velocidade de reação ao longo de 90 horas. O teste foi considerado positivo para os fungos que formaram ao seu redor um halo marrom escuro - Reação de Bavendamm (DAVIDSON, 1938).

Xilanases: Realizaram-se ensaios em placas contendo o meio para atividade xilanolítica descrito por Pointing (1999). Para o preparo deste meio, acrescentou-se 4% de Xilana ao meio PDA. Em seguida, cada placa foi inoculada na região central com um disco de micélio de aproximadamente sete mm de diâmetro da matriz secundária, realizaram-se três repetições para cada fungo. As placas foram incubadas em estufa BOD sob temperatura controlada de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ no escuro. Quando o diâmetro da colônia atingiu aproximadamente 30 mm, retiraram-se as placas da estufa e seguiu-se o teste segundo TAVARES et al., (2002). A positividade é indicada pelo aparecimento do halo amarelo opaco em volta das colônias (POINTING, 1999) e o raio do halo foi medido com paquímetro.

Celulases: Para este teste, os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo o meio Socrean, um meio sintético com carboximetilcelulose (CMC) e Avicel como únicas fontes de carbono (NaNO_3 : $3,0\text{ g.L}^{-1}$; K_2HPO_4 : $1,0\text{ g.L}^{-1}$; MgSO_4 : $0,5\text{ g.L}^{-1}$; KCl : $0,5\text{ g.L}^{-1}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: $10,0\text{ mg.L}^{-1}$; CMC : $7,0\text{ g.L}^{-1}$ pH: 5,0; ágar: $30,0\text{ g.L}^{-1}$; Avicel: $7,0\text{ g.L}^{-1}$ pH: 5,0). Após preparo dos meios, foi realizada a inoculação de um disco de 7 mm de diâmetro de micélio a partir da matriz secundária de cada fungo. Os isolados então eram mantidos em estufa BOD a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ no escuro, até obterem um crescimento mínimo de 50

mm de diâmetro da colônia. Em seguida, era realizado o teste com o Vermelho do Congo. Após o crescimento, foram adicionados 5 ml de solução do indicador vermelho congo 0,2% em cada uma das placas. Após 15 minutos de reação, adicionou-se 5 ml de NaCl 0,1 M.

Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com nível de significância de 5% para comparação entre médias.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A "Reação de Bavendamm" pode ser citada como exemplo da utilização das técnicas de formação de halo (DAVIDSON et al., 1938). A Figura 1 representa a formação do halo de oxidação para algumas espécies ao longo do tempo.

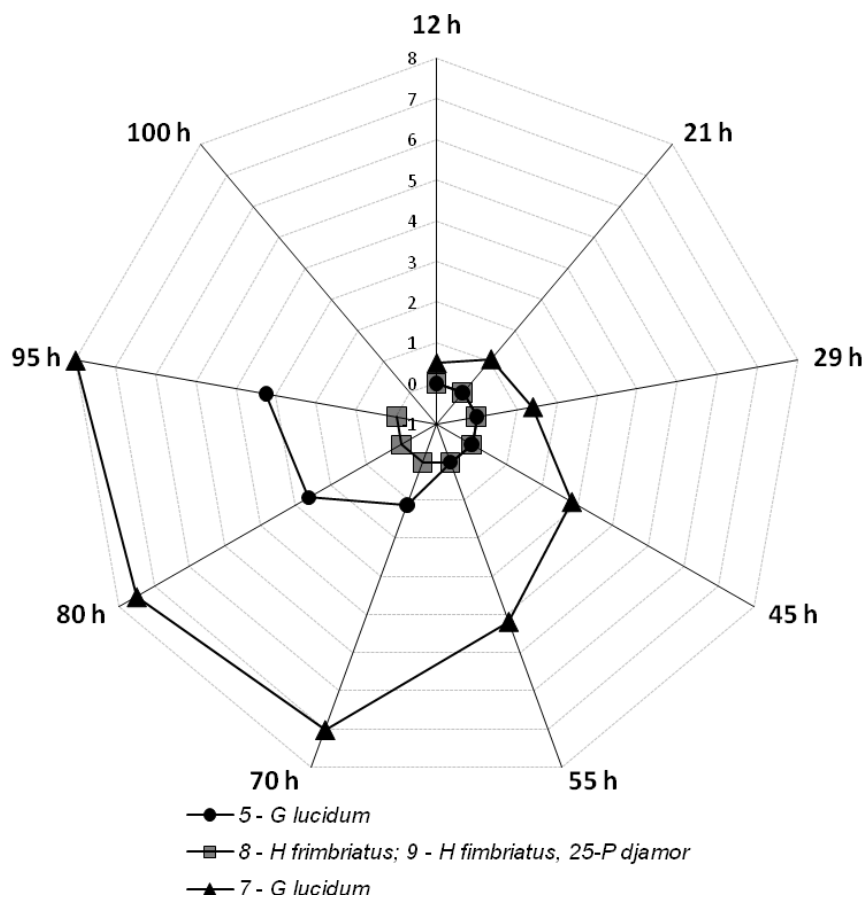


Figura 1 – Curva do halo de oxidação do ácido gálico por macrofungos (mm) em função do tempo.

Dos 33 fungos estudados, o 5 *G. lucidum* apresentou a maior velocidade de formação de halo de oxidação tanto em 48h de incubação como em 95 horas com valores da ordem de 0,22 mm/dia. Os dados de reação para obtenção dos halos de fenoloxidasas, xilanase e celulases são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultado dos testes para os 33 isolados de fungos nos meios com ácido gálico (Fenoloxidasas), com xilana (Xilanase) e com CMC e Avicel (Celulases). (FEN) Fenoloxidasas, (XIL) Xilanase, (CEL) Celulase, (+) resultado positivo para enzimas, (-) resultado negativo para enzimas, (-----) Não houve crescimento.

Nº	Espécie	FEN	Halo (mm)	Velocidade média (mm/h)	XIL	Halo (mm)	CEL	Halo (mm)
1	<i>Amylosporus campbellii</i>	-	0,00 ± 0,00 E	0	-	0,00 ± 0,00 D	-	0,00 ± 0,00 D
2	<i>Auriscalpium vilipes</i>	-	0,00 ± 0,00 E	0	-----	-----	+	26,66 ± 2,08 A
3	<i>Flaviporus venustus</i>	+	0,17 ± 0,02 E	0,004	-	0,00 ± 0,00 D	-	0,00 ± 0,00 D
4	<i>Fomitella supina</i>	-	0,00 ± 0,00 E	0	+	12,00 ± 0,20 A	-	0,00 ± 0,00 D
5	<i>Ganoderma lucidum</i>	+	4,83 ± 0,29 B	0,101	+	5,00 ± 0,50 C	+	10,00 ± 0,00 C
6	<i>Ganoderma lucidum</i>	+	3,67 ± 0,58 B	0,076	-	0,00 ± 0,00 D	+	3,00 ± 0,50 D
7	<i>Ganoderma lucidum</i>	+	5,5 ± 0,87 B	0,115	-	0,00 ± 0,00 D	+	5,33 ± 0,28 CD
8	<i>Hydnopolyporus fimbriatus</i>	-	0,00 ± 0,00 E	0	-	0,00 ± 0,00 D	-	0,00 ± 0,00 D
9	<i>Hydnopolyporus fimbriatus</i>	-	0,00 ± 0,00 E	0	-----	-----	+	1,66 ± 1,52 D
10	<i>Inonotus splitgerber</i>	+	0,92 ± 0,17 DE	0,019	+	5,17 ± 1,75 C	+	24,33 ± 4,50 A
11	<i>Lentinula boryana</i>	+	1,17 ± 0,14 DE	0,024	+	11,00 ± 2,00 AB	+	11,8 ± 0,72 BC
12	<i>Lentinula boryana</i>	+	10,00 ± 1,00 A	0,208	-	0,00 ± 0,00 D	+	12,33 ± 1,52 BC
13	<i>Lentinula edodes</i>	-	0,00 ± 0,00 E	0	+	10,00 ± 0,52 AB	-	0,00 ± 0,00 D
14	<i>Lentinula edodes</i>	-	0,00 ± 0,00 E	0	+	5,00 ± 0,86 C	+	4,16 ± 1,75 CD
15	<i>Lentinula edodes</i>	-	0,00 ± 0,00 E	0	+	9,00 ± 0,20 B	+	4,00 ± 2,50 CD
16	<i>Lentinula edodes</i>	-	0,00 ± 0,00 E	0	+	10,00 ± 0,20 AB	-	0,00 ± 0,00 D
17	<i>Lentinus strigellus</i>	+	4,17 ± 0,29 B	0,087	-	0,00 ± 0,00 D	+	3,33 ± 0,57 D
18	<i>Lentinus strigellus</i>	+	1,42 ± 0,94 DE	0,03	+	5,00 ± 0,43 C	-	0,00 ± 0,00 D
19	<i>Lentinus crinitus</i>	+	1,50 ± 0,00 DE	0,031	-----	-----	-	0,00 ± 0,00 D
20	<i>Perenniporia</i> sp.	-	0,00 ± 0,00 E	0	-	0,00 ± 0,00 D	-----	-----
21	<i>Perenniporia</i> sp.	-	0,00 ± 0,00 E	0	-	0,00 ± 0,00 D	+	10,66 ± 1,15 BC
22	<i>Perenniporia</i> sp.	-	0,00 ± 0,00 E	0	-	0,00 ± 0,00 D	+	11,33 ± 2,08 BC
23	<i>Phellinus linteus</i>	+	0,83 ± 0,29 DE	0,017	-	0,00 ± 0,00 D	-	0,00 ± 0,00 D
24	<i>Pleurotus albidus</i>	+	2,00 ± 0,43 CD	0,042	-----	-----	-	0,00 ± 0,00 D
25	<i>Pleurotus djamor</i>	-	0,00 ± 0,00 E	0	-	0,00 ± 0,00 D	+	2,00 ± 0,00 D
26	<i>Pleurotus pulmonaris</i>	-	0,00 ± 0,00 E	0	+	0,33 ± 0,57 D	+	5,00 ± 0,00 CD
27	<i>Pleurotus pulmonaris</i>	-	0,00 ± 0,00 E	0	-	0,00 ± 0,00 D	+	1,33 ± 0,57 D
28	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	+	1,67 ± 1,15 DE	0,035	-	0,00 ± 0,00 D	+	21,66 ± 3,78 AB
29	<i>Oudemansiella canarii</i>	+	3,33 ± 0,65 BC	0,069	-----	-----	-	0,00 ± 0,00 D
30	<i>Oudemansiella canarii</i>	+	0,50 ± 0,00 DE	0,01	-----	-----	-----	-----
31	<i>Tyromyces pulcherrimus</i>	-	0,00 ± 0,00 E	0	-----	-----	+	3,93 ± 4,82 CD
32	<i>Xylaria globosa</i>	+	0,83 ± 0,76 DE	0,017	+	9,00 ± 1,00 B	+	17,00 ± 1,00 B
33	<i>Xylaria</i> cf. <i>cubensis</i>	+	1,50 ± 0,00 DE	0,031	-	0,00 ± 0,00 D	+	11,00 ± 1,00 BC

Médias ± desvio padrão acompanhadas de letras maiúsculas iguais na coluna não diferem pelo Teste de Médias de Tukey ($p \leq 0,05$)

Em relação às fenoloxidasas, dos 33 fungos, 16 (48,5%) não apresentaram nenhuma reação de oxidação. O fungo *Lentinula edodes* estudado por Anguiano (2009), e Regina et al. (2009) apresentou enzimas fenoloxidativas pela análise quantitativa, mas no estudo qualitativo o resultado é negativo.

As outras 17 (51,5%) espécies testadas apresentaram reação positiva, indicando a oxidação do ácido gálico. Pode-se observar que o fungo 12 *Lentinula boryana* apresentou o maior halo (10mm) e foi significativamente diferente dos demais. Em contraste, outra linhagem da mesma espécie, 11 *L. boryana*, apresentou uma grande diferença no tamanho do halo (1,17mm) em relação ao anterior.

No teste com xilana, constatou-se que os fungos tiveram tempos diferentes para a colônia atingir 30mm de diâmetro e, também, algumas espécies não se adaptaram neste meio de 4% de xilana, ao ponto de não desenvolverem nenhuma hifa. Das 33 espécies testadas,

onze (33,3%) apresentaram reação positiva através do aparecimento de um halo amarelo opaco, indicando a degradação da xilana, quinze (45,5%) não produziram esta enzima e sete (21,2%) não se desenvolveram neste meio.

Dos produtores, destacou-se o fungo *Fomitella supina*, de halo com 12mm de raio. O fungo *Lentinula edodes* que é o segundo melhor produtor de xilanase neste estudo, foi estudado por Forganés (2004) e seus resultados também são positivos.

No teste com o Vermelho do Congo constatou-se que vinte isolados (60,6%) se mostraram produtores de celulasas, destacando-se os fungos *A. vilipes*, *I. splitgerber* e *P. sajor-caju*, onze isolados (33,3%) não se mostraram produtores e dois isolados (6,1%) não se desenvolveram neste meio.

Selecionou-se então dez isolados, que pela análise estatística mostraram ser os melhores produtores dentro destas condições de seleção. Em ordem de preferência então, *I. splitgerber* foi o melhor produtor de celulasas, produzindo xilanases também. Em seguida, estão os fungos *A. vilipes* e *P. sajor-caju*, que embora produzam apenas celulasas, se mostraram excelentes produtores, equiparando-se a *I. splitgerber*, mas ficando abaixo na classificação por não produzirem xilanase. Os próximos são 5 *G. lucidum*, 11 *L. boryana* e *X. globosa*. Estes fungos produzem os três tipos enzimáticos, porém em quantidades inferiores aos demais. Por último, foram selecionados 12 *L. boryana*, 21 *Perenniporia* sp., 22 *Perenniporia* sp. e *X. cubensis*, que possuem ainda, bons níveis de produção de celulasas, mesmo sem produção de xilanase.

É importante destacar que embora não tenha sido detectada atividade enzimática de alguns fungos, não se pode descartar completamente a sua ausência, pois são vários os fatores que contribuem para a ativação do sistema lignocelulolítico como condições nutricionais e culturais, substrato metabolizável, altos níveis de oxigênio, limite de nitrogênio e várias outras condições de cultivo (REGINA et al, 2009). Percebeu-se que muitos trabalhos obtiveram resultados com grande diferença quando o mesmo fungo foi cultivado em meio líquido e sólido (HERMANN, 2011). Além disso, os tipos e quantidades de enzimas são também definidos pelo genótipo específico do fungo associado à adaptação a um determinado substrato de crescimento (SHEARER, 1995).

CONCLUSÕES

Este estudo contribuiu para o conhecimento de espécies pouco estudadas dentro do contexto de produção enzimática por macrofungos. Os dados indicaram que *Innonotus splitgerber*, *Auriscalpium vilipes* e *Pleurotus sajor-caju* mostraram indicativo de possuir potencial biotecnológico para uso em hidrólise de biomassa florestal pré-tratada, comparativamente aos demais fungos testados.

Com este trabalho, também se pode constatar que os testes qualitativos em cup-plate com meios contendo ácido gálico, xilana, CMC e avicel são bons indicadores para seleção de linhagens.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as bolsas concedidas pela Fapesc, pela Secretaria de Educação e Ciência do Estado de Santa Catarina via Artigo 170 e pela Embrapa Florestas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar Filho, J.M.M. (2008), Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar. *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- Alexandrino, A.M. et al. (2007), Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack: Fr). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 27, n. 2, p. 364-368.
- Anguiano, A.C.R. (2009), Estudio de las propiedades bioactivas de hongos comestibles para el diseño de productos cárnicos funcionales. *Tese de Doutorado*, Universidade Autónoma de Madri, Madri, Espanha.
- Castellani, A. (1967), Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.*, v. 70, p. 181-184.
- Curevo, L.; Folch, J.L.; Quiroz, R (2009) Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Biotecnología*, v. 13, n. 3, p.11-25.
- Davidson, R.W.; Campbell, W.A.; Blaisdell, D.J. (1938) Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. *J. of Agric. Res.*, v. 57, n. 9, p. 683-685.
- Ferreira, L.F.R. (2009), Biodegradação de vinhaça proveniente de processo industrial de cana-de-açúcar por fungos. *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- Forganes, S. et al. (2004) Estudo das atividades de enzimas hidrolíticas e do crescimento micelial de *Lentinula edodes* cultivado em resíduo de eucalipto. *Anais do VIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica*, Paraíba.
- Gomes, D.N.F. (2007), Biodiversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jabotão dos Guararapes, Pernambuco. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.
- Hermann, K.L.; Costa, A.; Helm, C.V.; Lima, E.A ; Tavares, L.B.B. (2011) Effect of water activity on the radial growth rates and manganese peroxidase produced by species of *Lentinula*. *Process Biochemistry*. Submitted.
- Mancilha, E.S.deL. (2006), Seleção de basidiomycetes coletados e isolados em área de Mata Atlântica-PE, com atividade fenoxidase e sua aplicação na descoloração de corantes sintéticos. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
- Pointing, S.B. (1999), Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity*, v. 2, p. 17-33.
- Regina, M. et al. (2009), Atividade de enzimas oxidativas do *Lentinula edodes* em substratos agroindustriais. *Ciências Agrárias*, v. 30, n. 4, p.881-888.
- Shearer, C.A. (1995), Fungal competition. *Canadian Journal of Botany*, v. 73, p. 1259-1264.
- Tavares, L.B.B.; Schmidell Netto, W.; Facciotti, M.C.R . Proposta de modelo para cálculo de velocidades específicas em sistema com células imobilizadas em gel. *Vetor*, v. 22.
- Taylor, G. (2008), Biofuels and the biorefinery concept. *Energy Policy*, v. 36, n. 12, p. 4406-4409.