

Manutenção da coleção de macrofungos e triagem de potenciais produtores de biopigmentos

Kamilla Martins Borges¹, Thaís Demarchi Mendes², Guilherme Conceição da Silva³, Léia Cecília de Lima Fávaro⁴, Félix Gonçalves de Siqueira⁵

Resumo

Algumas espécies de macrofungos são amplamente exploradas como alimentos, em razão, além de seu sabor, das suas propriedades nutricionais e terapêuticas. Nos últimos anos, o interesse tem se voltado para a aplicação biotecnológica das propriedades desse grupo de fungos, como a produção de enzimas lignocelulósicas, de pigmentos e de compostos bioativos. A preservação desses microrganismos em coleções de cultura garante a conservação do germoplasma para investigações e aplicações futuras. A preservação de macrofungos por longos períodos ainda é um desafio, fazendo-se necessária a aplicação de diferentes métodos, como criopreservação, Castellani e repique contínuo. Este estudo apresenta resultados de ações vinculadas ao projeto Regen, que incluem a reativação, a purificação e a preservação de 140 cepas de macrofungos da Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias (CMMAABio). Além disso, para contribuir com o objetivo de agregar informações sobre potenciais aplicações biotecnológicas dos microrganismos, foi feita uma triagem, por análise visual, de cepas com potencial para produção de pigmentos. Foram selecionadas 23 cepas que apresentaram coloração nos tons de amarelo, laranja, rosa, vermelho e roxo, seja no micélio ou secretada no meio ao redor das colônias. Adicionalmente à preservação dos microrganismos, foram também prospectadas características que demonstram o potencial biotecnológico do acervo da CMMAABio.

Termos para indexação: macrofungos, coleção de microrganismos, pigmentos naturais.

Introdução

Macrofungos são organismos que, na natureza, desempenham papel fundamental na decomposição de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes. As propriedades únicas desse grupo de fungos, como produção de compostos bioativos, de pigmentos/corantes, de enzimas e composição nutricional, têm despertado o interesse em sua exploração comercial em diversos setores, como indústria farmacêutica, de alimentos, de materiais, de nutrição animal e de bioinsumos para o setor agropecuário, entre outras (Kijpornyongpan, et al., 2022).

A manutenção desses microrganismos em coleções de cultura não só garante a disponibilidade do germoplasma para pesquisas e aplicações futuras como também mantém preservada a diversidade biológica. De maneira institucional, a Embrapa tem promovido a implementação e a manutenção de coleções de microrganismos. Um exemplo desse compromisso é a integração das coleções das Unidades da Empresa e o registro dos microrganismos no sistema Alelomicro. Outro exemplo é o desenvolvimento do projeto REGEN, financiado pelo Sistema Embrapa de Gestão (SEG), que tem como objetivo o enriquecimento, a documentação, a conservação e a caracterização de dez coleções de microrganismos. Entre elas, está a Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a

¹ Biotecnologista, Embrapa Agroenergia, kamilla.borges@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

³ Biólogo, Embrapa Agroenergia, guilherme.silva@colaborador.embrapa.br

⁴ Bióloga, doutora em Ciências, Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

⁵ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas, Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

Agroenergia e Biorrefinarias (CMMAABio), que possui em seu acervo milhares de microrganismos, dentre cepas de bactérias, leveduras, microalgas e fungos filamentosos, incluindo os macrofungos.

A preservação de macrofungos por longos períodos ainda é um desafio. O método mais utilizado é o de repique contínuo, porém essa técnica é muito laboriosa e a transferência sequencial para um novo meio de cultura pode levar ao acúmulo de mutações, mudanças fenotípicas e perda da diversidade genética. Outras estratégias de preservação por longos períodos, como criopreservação e preservação por Castellani, têm se demonstrado eficazes para a manutenção de algumas espécies.

Além da preservação do germoplasma dos microrganismos, a CMMAABio também tem como propósito caracterizá-los quanto às suas potenciais aplicações biotecnológicas, incluindo a produção de pigmentos naturais. A crescente demanda por substituição de corantes sintéticos por corantes naturais tem sido uma tendência nas últimas décadas. A produção de corantes por microrganismos é uma alternativa mais vantajosa em comparação com outras fontes naturais, como plantas e insetos, por causa da viabilidade de cultivo em condições controladas e otimizadas. Nesse contexto, algumas espécies de macrofungos se destacam pelas chamativas cores de seus corpos de frutificação. Além de coloridos, alguns desses compostos possuem propriedades bioativas, como ação antioxidante, antimicrobiana e anticancerígena (Suthar, et al., 2021).

O objetivo deste trabalho é organizar, preservar e manter cepas de macrofungos da coleção CMMAABio e selecioná-las visualmente quanto ao potencial de produção de pigmentos.

Materiais e métodos

Verificação da viabilidade e pureza

Cento e oitenta e cinco cepas de macrofungos previamente armazenadas na CMMAABio tiveram sua viabilidade e pureza checadas. Utilizando a técnica de repique, uma pequena quantidade de micélio do fungo foi transferida para o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), e as placas foram incubadas a 28 °C por sete dias a 15 dias. O crescimento dos fungos nas placas foi monitorado e sua pureza foi verificada, garantindo a ausência de contaminações por bactérias ou outros fungos. As cepas categorizadas como puras foram encaminhadas para a etapa de preservação e triagem das cepas com potencial para a produção de pigmentos.

Triagem de cepas com potencial para a produção de pigmentos

As placas com fungos com bom crescimento em meio BDA foram fotografadas de ambos os lados (frente e verso) para documentação das características morfológicas e fenotípicas das colônias. O meio BDA é indicado para promover o crescimento de macrofungos e por ser adequado para produção de pigmentos. Foram selecionados os macrofungos que apresentavam algum tipo de coloração rosa, roxa, laranja, amarelo, vermelho e marrom, tanto no micélio quanto secretada no ágar.

Preservação das cepas

Método de Castellani: discos de 10 mm de micélio crescido em meio BDA por sete dias a 14 dias foram transferidos para cinco criotubos e submersos em água destilada. Os tubos estão mantidos em temperatura ambiente.

Criopreservação: discos de 10 mm de micélio crescido em meio BDA por sete dias a 14 dias foram transferidos para cinco criotubos e submersos em solução crioprotetora de glicerol 20% (m/v). Os criotubos estão mantidos em ultrafreezer a -80 °C.

Repique contínuo: fragmentos de micélio crescido em ágar BDA foram transferidos para meio BDA solidificado de forma inclinada (slant) em tubos Falcon (duplicata). Os tubos foram incubados

na temperatura de 28 °C por sete dias a 14 dias. Após o desenvolvimento do micélio, os tubos foram armazenados a 10 °C. Esse método não garante a viabilidade do fungo por longos períodos, por isso, esse procedimento é repetido a cada quatro meses ou cinco meses.

Resultados e discussão

Verificação da viabilidade, pureza e preservação das cepas

O acervo de macrofungos da CMMAABio conta com cerca de 200 cepas. A criopreservação é o principal método de preservação da coleção. No entanto, por causa dos desafios de preservação dos macrofungos por esse método (sobrevivência após congelamento), as cepas também estão mantidas pelo método de Castellani e repique contínuo. A manutenção de macrofungos em coleções de cultura requer um trabalho cuidadoso e contínuo de verificação de viabilidade e pureza das cepas e renovação dos estoques do germoplasma preservado. Atualmente, esse trabalho é possibilitado pelo desenvolvimento do projeto REGEN. Até o momento, foi possível obter 140 cepas viáveis e livres de contaminação. Essas cepas foram fotografadas para a documentação das características morfológicas das colônias e foram preservadas pelos métodos de criopreservação, repique contínuo e Castellani.

Triagem de cepas potencialmente produtoras de corantes

Dentre as 140 cepas que se mostraram viáveis e puras, 23 apresentaram coloração intensa, seja no micélio ou secretada no ágar. Uma diversidade de colorações foi observada, sendo elas: rosa, roxa, laranja, amarela, vermelha e marrom. Informações referentes às cepas com potencial produtor de corante estão registradas na Tabela 1, enquanto a Figura 1 apresenta as imagens das cepas fotografadas em meio BDA após um período de cultivo de sete dias a 15 dias.

Tabela 1. Macrofungos selecionados como potencialmente produtores de corantes.

	Código BRM	Espécie ou grupo taxonômico	Coloração do meio	Coloração do micélio
1	BRM 067553	Basidiomycetes	Marrom	Branca/Amarela
2	BRM 062449	Basidiomycetes	Marrom	Branca/Marrom
3	BRM 063103	Basidiomycetes	Marrom	Branca
4	BRM 062453	Basidiomycetes	Roxa	Roxa
5	BRM 062377	Basidiomycetes	Amarela	Branca
6	BRM 062381	Basidiomycetes	Laranja	Branca
7	BRM 060013	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Laranja	Branca/Laranja
8	BRM 067565	Basidiomycetes	Marrom	Branca
9	BRM 067568	Basidiomycetes	Marrom	Branca
10	BRM 062542	Basidiomycetes	Laranja	Branca
11	BRM 063322	Basidiomycetes	Roxa/Rosa	Branca
12	BRM 067591	<i>Panellus stipticus</i>	Laranja	Branca
13	BRM 067593	<i>Laetiporus cincinnatus</i>	Laranja	Branca
14	BRM 067588	<i>Pholiota adiposa</i>	Marrom	Branca
15	BRM 055652	<i>Chlorophyllum molybdites</i>	Marrom/Laranja	Branca
16	BRM 059975	<i>Oudemansiella canarii</i>	Marrom/Amarela	Branca
17	BRM 056513	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Roxa/Vermelha	Roxa/Vermelha

Continua...

Tabela 1. Continuação.

	Código BRM	Espécie ou grupo taxonômico	Coloração do meio	Coloração do micélio
18	BRM 059978	<i>Tyromyces pulcherrimus</i>	Vermelha	Vermelha
19	BRM 056056	<i>Xylaria cubensis</i>	Roxa/Vermelha	Roxa/Branca
20	BRM 044248	<i>Ganoderma lobatum</i>	Marrom/Amarela	Branca
21	BRM 044601	<i>Flammulina velutipes</i>	Laranja	Branca
22	BRM 051906	Pleurotaceae	Amarela	Branca/Amarela
23	BRM 052849	Pluteaceae	Marrom	Branca

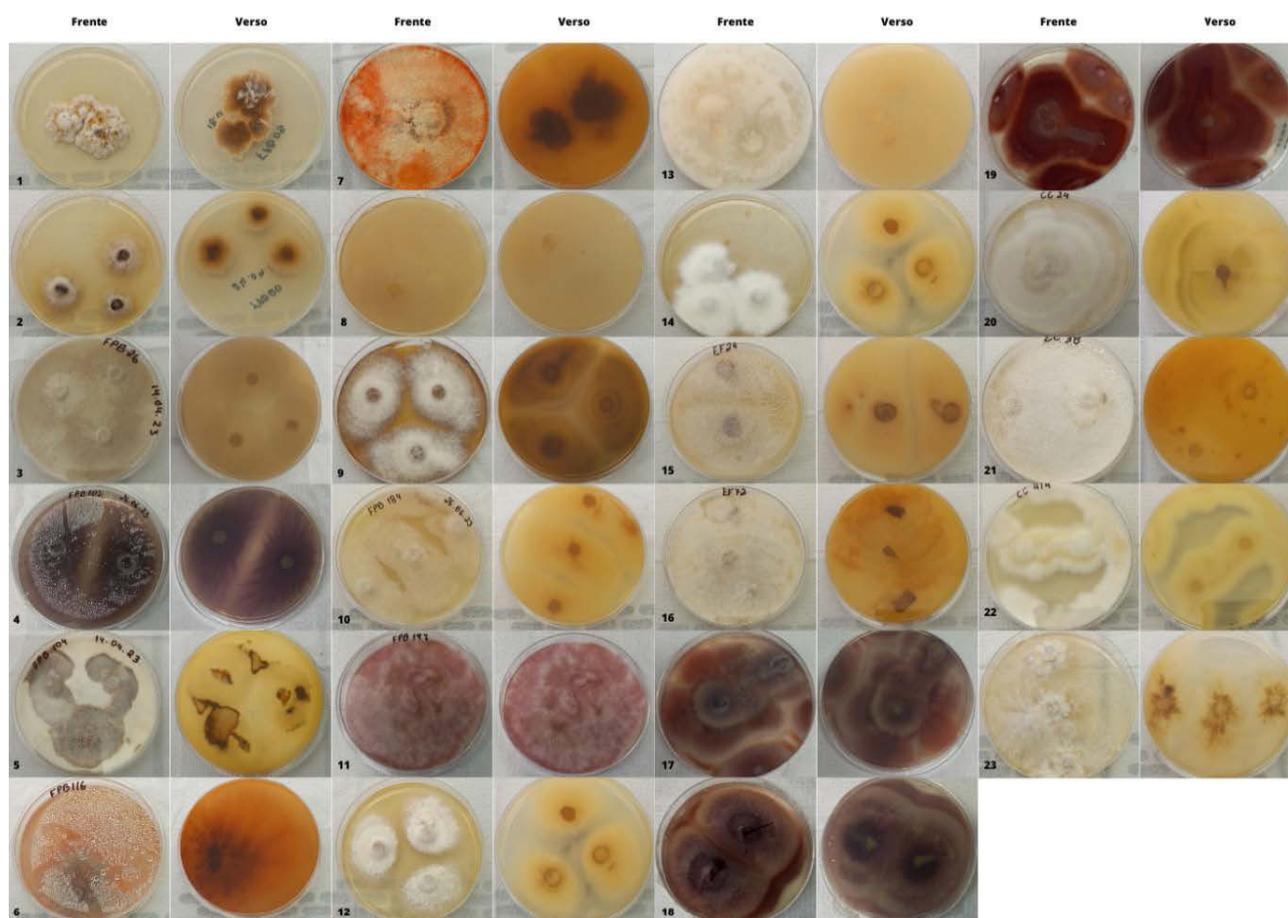


Figura 1. Imagens das cepas de macrofungos potencialmente produtoras de corantes.

1: BRM 067553; 2: BRM 062449; 3: BRM 063103; 4: BRM 062453; 5: BRM 062377; 6: BRM 062381; 7: BRM 060013 - *Pycnoporus sanguineus*; 8: BRM 067565; 9: BRM 067568, 10: BRM 062542; 11: BRM 063322; 12: BRM 067591 - *Panellus stipticus*; 13: BRM 067593 - *Laetiporus cincinnatus*; 14: BRM 067588 - *Pholiota adiposa*; 15: BRM 055652 - *Chlorophyllum molybdites*; 16: BRM 059975 - *Oudemansiella canarii*; 17: BRM 056513 - *Pleurotus pulmonarius*; 18: BRM 059978 - *Tyromyces pulcherrimus*; 19: BRM 056056 - *Xylaria cubensis*; 20: BRM 044248 - *Ganoderma lobatum*; 21: BRM 051906 - *Flammulina velutipes*; 22: BRM 051906 - Pleurotaceae; 23: BRM 0528944 - Pluteaceae.

A Tabela 1 apresenta informações que indicam se a coloração foi observada no micélio, indicando a produção de pigmentação intracelular, ou se foi observada no ágar (ao redor das colônias), indicando a secreção dos compostos coloridos. Para um processo de produção desses corantes,

a secreção para o meio extracelular é mais vantajosa, pois elimina uma etapa de extração intracelular a partir da massa micelial. Nesse sentido, merecem destaques as cepas BRM 062381 (6), BRM 060013 - *Pycnoporus sanguineus* (7), BRM 067568 (9) e BRM 063322 (11) e BRM 051906 - *Flammulina velutipes* (11), em razão da capacidade de secretar compostos de coloração intensa no meio ao redor das colônias.

Pode-se destacar, como potenciais produtoras de pigmentos amarelo/laranja, as cepas BRM 062381 (6), BRM 060013 - *Pycnoporus sanguineus* (7), BRM 059975 - *Oudemansiella canarii* (16) e BRM 051906 - *Flammulina velutipes* (21). *Pycnoporus sanguineus*, cogumelo orelha-de-pau, apresenta corpo de frutificação com coloração laranja intensa. Segundo Meng et al. (2022), os compostos majoritários responsáveis pela coloração, cinabarina, ácido cinabarínico e tramesaguin, apresentam também propriedades antivirais, antibacterianas e anti-inflamatórias.

As cepas BRM 062453 (4), BRM 063322 (11), BRM 056513 - *Pleurotus pulmonarius* (17), BRM 059978 - *Tyromyces pulcherrimus* (18) e BRM 056056 - *Xylaria cubensis* (19) podem ser destacadas como produtoras de intensa coloração rosa/vermelha. *Tyromyces pulcherrimus*, cogumelo “strawberry bracket”, possui corpo de frutificação com coloração rosa/vermelha, e a composição de seu pigmento ainda não está descrita na literatura.

A caracterização de cepas com potencial para a produção de pigmentos e a documentação dessas informações agrega valor à CMMAABio ao fornecer dados que podem ser futuramente utilizados como ponto de partida para a prospecção e avaliação da aplicação biotecnológica dessas cepas.

Conclusão

Cento e oitenta e cinco cepas de macrofungos foram reativadas e 140 tiveram a pureza checada e foram preservadas por criopreservação, repique contínuo e pelo método de Castellani. As cepas foram triadas visualmente e foi possível selecionar 23 macrofungos com potencial para serem posteriormente investigados quanto à produção de pigmentos. Além da preservação dos microrganismos, este trabalho contribuiu para a inclusão de informações que demonstram o potencial biotecnológico do acervo da CMMAABio.

Referências bibliográficas

KIJPORNYONGPAN, T.; SCHWARTZ, A.; YAGUCHI, A.; SALVACHU, D. Systems biology-guided understanding of white-rot fungi for biotechnological applications: a review. *iScience*, v. 25, n. 7, p. 1-24, 2022. 104640.

MENG, D.; SHAO, X.; LUO, S.-P.; TIAN, Q.-P.; LIAO, X.-R. Pigment production by a newly isolated strain *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L7 in solid-state fermentation. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 2022. 1015913.

SUTHAR, M.; LAGASHETTI, A. C.; RÄISÄNEN, R.; SINGH, P. N.; DUFOSSÉ, L.; ROBINSON, S. C.; SINGH, K. S. Industrial applications of pigments from macrofungi. In: SRIDHAR, S. K.; DESHMUKH, S. K. (Ed.) *Advances in microfungi*. Boca Raton: CRC Press, 2021. p. 221-251.