

14368 - Bioprospecção de fungos degradadores de madeira e produtores de celulases

Bioprospection wood degrading fungi and producers of cellulases

LOUREIRO, Cristiane Bianchi¹; BALDONI, Daiana Bortoluzzi²; JACQUES, Rodrigo Josemar Seminoti³; MONTAGNER, Daiane Fiuza⁴; SILVEIRA, Andressa de Oliveira⁵.

1 Universidade Federal de Santa Maria, cs.agro@globo.com; 2 Universidade Federal de Santa Maria, daianabio@hotmail.com; 3 Universidade Federal de Santa Maria, rodrigo@ufsm.br; 4 Universidade Federal de Santa Maria, daiafiuza@hotmail.com; 5 Universidade Federal de Santa Maria, aosilveira@hotmail.com

Resumo: A celulose presente em resíduos agrícolas e agroindustriais pode ser hidrolisada enzimaticamente pela ação de microrganismos para a geração de açúcares fermentescíveis, que podem ser utilizados para produção de biocombustíveis. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar cinco espécies de fungos degradadores de madeira quanto à produção de celulases, em resposta à presença de celulose como única fonte de carbono. Cinco espécies de fungos degradadores de madeira foram isolados em áreas de florestas de *Pinus* sp. da Estação Experimental da FEPAGRO Florestas, Santa Maria, RS. Foi avaliado o potencial dos isolados para a produção de celulases em resposta à presença da celulose, como única fonte de carbono, em meio de cultura. Para tanto, foi utilizada a técnica de coloração com vermelho congo. A maioria dos isolados testados apresentou reação celulase positiva, exceto a espécie de degradação branca *Pycnoporus sanguineus* (DBB17), que não apresentou halo indicativo da reação.

Palavras-chave: biotecnologia, etanol, biocombustíveis.

Abstract: The cellulose present in agricultural and agroindustrial residues can be enzymatically hydrolyzed by the microorganisms action for the generation of fermentable sugars used in the production of cellulosic ethanol. This study aimed to evaluate five species of wood degrading fungi for the production of cellulases, in response to the presence of cellulose as the only carbon source. Five species of wood degrading fungi isolated from soil in areas of *Pinus* sp. Experimental Station FEPAGRO Forests, Santa Maria, RS, were analyzed to assess their potential to produce cellulases in response to the presence of cellulose as the only carbon source in the culture medium. For this, we used the technique of staining with Congo red. Most isolates tested showed positive reaction cellulase, except the white-rot fungi *Pycnoporus sanguineus* (DBB17) that showed no halo indicative of the reaction.

Keywords: biotechnology, ethanol, biofuels.

Introdução

O etanol é um biocombustível que pode ser obtido a partir de qualquer material que contenha açúcares simples ou complexos (PRASAD et al., 2007) e apresenta boas perspectivas como uma alternativa de energia renovável e menos poluidora que os combustíveis fósseis. A cana-de-açúcar é amplamente utilizada na produção de etanol, entretanto, a ampliação excessiva do cultivo de canaviais pode comprometer outras culturas agrícolas e causar grande impacto ambiental (CONÇALVES et al., 2008). Para minimizar esses riscos, uma alternativa bastante vantajosa é a exploração de resíduos lignocelulósicos, como materiais agroindustriais, resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas (SÁNCHEZ, 2009). Os materiais como bagaço e palha de cana, palha de soja, palha de arroz e sabugo de milho são pouco aproveitados, sendo utilizados apenas na geração de energia

elétrica, enquanto a maior parte é queimada ou simplesmente descartada no solo constituindo um passivo ambiental (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010). A conversão desses resíduos em produtos de valor comercial poderá gerar benefícios econômicos, além de contribuir para a remoção de poluentes ambientais (SAKUMARAN et al., 2009). Desse modo, muitas pesquisas têm sido realizadas visando a conversão de materiais lignocelulósicos em etanol (OKAMOTO et al., 2011).

Muitos microrganismos desempenham um importante papel na produção de etanol celulósico, pois possuem sistemas enzimáticos capazes de degradar os resíduos celulósicos em açúcares fermentescíveis, dentre eles, destacam-se os fungos degradadores de madeira pertencentes ao filo Basidiomycota. Segundo Arantes e Milagres (2009), o complexo celulase envolve no mínimo três enzimas, as quais apresentam modos de ação bastante característicos, β -1,4-glicano-glicanoidrolase (uma endoglicanase), β -1,4-glicanocelobioidrolase (uma exoglicanase) e β -1,4-glicosidase (uma celobiose). A primeira enzima cliva a celulose nativa ao acaso formando cadeias menores de celotriose, celobiose e glicose, enquanto a segunda atua nas extremidades das cadeias, separando moléculas de celobiose e finalmente as glicosidases hidrolisam celobiose a glicose (REYES et al., 1997).

Porém, enzimas como as celulases, que convertem celulose em glicose, apresentam um alto custo e podem ser um fator limitante no processo de obtenção de etanol a partir de resíduos (BALAT et al., 2008). Portanto, a bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas celulásicas é de suma importância para a viabilização da rota biológica de produção de etanol celulósico.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar cinco espécies de fungos degradadores de madeira quanto à produção de celulases, em resposta à presença de celulose como única fonte de carbono.

Metodologia

Os basidiomas dos fungos degradadores de madeira foram coletados em uma área de cultivo de *Pinus* sp. na Estação Experimental da FEPAGRO/Florestas, em Santa Maria-RS. Durante a coleta, os basidiomas foram fotografados e envoltos em papel absorvente, acondicionados individualmente em potes plásticos e transportados ao laboratório de Biologia do Solo e Microbiologia do Ambiente Prof. Marcos Rubens Fries, na Universidade Federal de Santa Maria. No laboratório foi realizado o isolamento dos espécimens fúngicos até a obtenção de culturas puras, conforme o método de Brundrett et al. (1996). Após a etapa de isolamento as amostras foram mantidas em meio de cultivo ágar extrato de malte (glicose: 20,0 g L⁻¹; peptona: 1,0 g L⁻¹; extrato de malte: 20,0 g L⁻¹; ágar: 20,0 g L⁻¹) a 4 °C, até a utilização nas demais avaliações. Os isolados utilizados para esse estudo foram previamente identificados morfológicamente como: *Gelatoporia subvermispora* (DBB3), *Amyloporia sinuosa* (DBB4), *Fomes fasciatus* (DBB11), *Pycnoporus sanguineus* (DBB17) e *Phlebia tremellosa* (DBB19).

Para avaliar a capacidade da produção de celulases os isolados fúngicos foram cultivados em meio sintético com carboximetilcelulose (CMC), previamente preparado, como única fonte de carbono, (NaNO₃: 3 g L⁻¹; K₂HPO₄: 1 g L⁻¹; MgSO₄: 0,5 g L⁻¹; KCl: 0,5 g L⁻¹; FeSO₄.7H₂O: 10,0 mg L⁻¹, CMC: 10,0 g L⁻¹, ágar: 20,0 g L⁻¹). Os inóculos

(discos de 1cm de diâmetro de cada isolado) foram colocados no centro de placas de Petri e incubadas por 7 dias a 28°C, no escuro. Todas as inoculações foram realizadas em triplicatas. Após esse período, foram adicionados 10 mL de solução corante de vermelho congo ($2,5 \text{ g L}^{-1}$) 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. A presença de zonas claras ao redor das culturas indicou a atividade de celulase, além da magnitude desta. Os diâmetros das colônias e os halos produzidos foram medidos com Paquímetro digital King Tools. Após a mensuração das colônias e dos halos foi calculado o índice enzimático através da razão entre o halo de hidrólise, evidenciado pela formação de uma zona clara ao redor da cultura e, o halo de crescimento da cultura.

Resultados e discussões

O halo indicador da atividade de celulase foi observado em quatro das cinco espécies analisadas (TABELA 1). Uma espécie destacou-se das demais em relação ao índice enzimático, *Fomes fasciatus* apresentou índice enzimático (Ie) de 1,55.

Comparando-se o isolado de *Fomes fasciatus* com os demais, observou-se que apesar de apresentar maior índice enzimático, ele apresentou o menor diâmetro de colônia entre as espécies analisadas, corroborando com os dados obtidos por Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004). Esses resultados mostram que mesmo apresentando menor crescimento micelial e, conseqüentemente, menor produção de biomassa, algumas espécies possuem um grande potencial de produção e excreção enzimática de celulase. Esse fato revela a importância da análise do índice enzimático obtido através do teste do vermelho congo.

Dos cinco isolados fúngicos, apenas o isolado de degradação branca, *Pycnoporus sanguineus* (DBB17), não apresentou reação positiva para o teste da celulase. O isolado de degradação marrom utilizado no estudo, *Amyloporia sinuosa* (DBB4), foi positivo para o teste da celulase, mas não apresentou halo indicativo do crescimento da cultura.

De acordo com Arantes e Milagres (2009), os fungos de degradação branca produzem todas as enzimas extracelulares necessárias para a hidrólise completa da celulose (endo-1,4- β -glucanase, exo-1,4- β -glucanase e 1,4- β -glicosidase), embora o nível de cada atividade enzimática varie entre os fungos, como ocorrido neste estudo. Entretanto, esses fungos não são considerados bons produtores de celulases e a seletividade por lignina de algumas espécies está relacionada a uma baixa atividade de celulase total. Por outro lado, os fungos de degradação marrom produzem as enzimas endo-1,4- β -glucanase e a 1,4- β -glicosidase, mas não a exo-1,4- β -glucanase (ENOKI et al., 1997). A espécie *Amyloporia sinuosa* (DBB4) apresentou atividade celulolítica apesar de ser incapaz de crescer em meio contendo carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono, sugerindo que a produção da enzima seja regulada pela fonte de carbono ou substrato utilizado (SOUZA et al., 2008). O resultado sugere que os fungos necessitam de indutores que são fontes de crescimento celular ou da síntese enzimática, através da presença de glicose ou outros açúcares no meio de crescimento (GONG; TSAO, 1975). Entretanto, o processo enzimático envolvendo celulases é bastante complexo, podendo ser inibido por vários produtos solúveis originados na própria reação enzimática. Celobiose e glicose, por exemplo,

têm sido identificados como inibidores do complexo celulase, enquanto que β -glicosidase pode também ser inibida pelo seu substrato, celobiose (LADISCH et al., 1983).

Esses resultados indicam que alguns microrganismos podem apresentar menor crescimento, mas possuir um grande potencial de produção e excreção de enzimas celulolíticas.

TABELA 1. Atividade da celulase de espécies de fungos de degradação branca e marrom, cultivados em meio de cultivo contendo carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono por 7 dias a 28 °C.

Espécie	Código	Tipo de degradação	$\varnothing h$	$\varnothing c$	le
<i>Amyloporia sinuosa</i>	DBB4	Marrom	59,63	-	-
<i>Gelatoporia subvermispora</i>	DBB3	Branca	76,41	53,98	1,42
<i>Fomes fasciatus</i>	DBB11	Branca	49,98	32,10	1,55
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	DBB17	Branca	-	78,61	-
<i>Phlebia tremellosa</i>	DBB19	Branca	51,57	40,85	1,26

$\varnothing c$ = diâmetro da colônia (mm); $\varnothing h$ = diâmetro do halo (mm); le = índice enzimático; (-) = não produziu halo ou não apresentou crescimento.

Conclusões

Os fungos *Gelatoporia subvermispora* (DBB3), *Fomes fasciatus* (DBB11), *Pycnoporus sanguineus* (DBB17) e *Phlebia tremellosa* (DBB19) apresentaram atividade celulolítica em meio de cultura contendo carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono e apresentam potencial para serem utilizados em futuros estudos de produção enzimática de etanol.

Referências bibliográficas

- ARANTES, V., MILAGRES, A. M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Quim. Nova**, v. 32, p.1586-1595, 2009.
- BALAT, M., BALAT, H., OZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 551–573, 2008.
- BRUNDRETT, M. et al. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR, monograph 32, 1996.
- CASTRO, A. M., JUNIOR, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quím. Nova**, v.33, p. 181 – 188, 2010.
- CONÇALVES, A. R., MORIYA, R.Y., OLIVEIRA, L. R. M., SAAD, M. B. W. Xylanase recycling for the economical biobleaching of sugarcane bagasse and straw pulps. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 43, p.157-163, 2008.

- ENOKI, A., ITAJURA, S., TANAKA, H. The involvement of extracellular substances for reducing molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric ion to ferrous iron in wood **degradation by wood decay fungi**. **J. Biotechnol.**, v. 53, p. 265 - 272, 1997.
- GONG, C. S., TSAO, G. T. Cellulase and biosynthesis regulation. Annual Reports on Fermentation Processes, New York, v. 3, p. 111 - 139, 1975.
- LADISCH, M. R., GONG, C. S., TSAO, G.T. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 5, p. 82 - 102, 1983.
- OKAMOTO, K., NITTA, Y., MAEKAWA, N., YANASE, H. Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 48, n. 3, p. 273–277, 2011.
- PRASAD, S., SINGH, A., JOSHI, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural industrial and urban residues. **Resour Conserv Recycl.**, v. 50, p. 1-39, 2007.
- REYES, J., PERALTA-ZAMORA, P., DURÁN, N. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases . Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Quim. Nova**, v. 21, p.140-143, 1998.
- RUEGGER, M. J.S.; TAUKE-TORNISIELO S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.
- SAKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, p. 421-424, 2009.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.
- SOUZA, H. Q., OLIVEIRA, L. A., ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28, p. 116-124, 2008.