

FUNGO DO CERRADO COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE ENZIMA CELULASE

Revista da Universidade Vale do Rio Verde
ISSN: 1517-0276 / EISSN: 2236-5362
Vol. 17 | n. 2 | Ano 2019

Geisa Alves da Silva

Universidade Federal da Grande Dourados
geisardg@hotmail.com

Maria do Socorro Mascarenhas Santos

Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
maria_mascarenhas@outlook.com

Elane Galvão dos Santos

Universidade Federal da Grande Dourados
elanegalvao.santos@gmail.com

Margareth Batistote

Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
margareth@uem.br

Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Universidade Federal da Grande Dourados-UFGD
rodrigoleite@ufgd.edu.br

RESUMO

A região Centro-Oeste tem como Bioma predominante o Cerrado que contempla cerca de 5% da biodiversidade do planeta, incluindo uma pequena parcela de fungos já registrados. Estes microrganismos são de extrema importância para a natureza, por serem eficientes decompositores de matéria orgânica e grandes produtores de enzimas. Neste contexto, os resíduos lignocelulósicos tem sido foco de inúmeros estudos para a indução da produção de diferentes enzimas como as celulases e hemicelulases produzidas por diversos fungos. Desta forma o estudo visa isolar e caracterizar fungos basidiomicetos do cerrado, avaliar o crescimento em diferentes meios de cultivo e seu potencial de produção enzimática. Os fungos foram coletados em materiais lignocelulósicos em decomposição e foram inoculados em diferentes meios de cultivos e incubados em estufa a 28°C por 7 dias. Para a avaliação da produção da enzima celulase foi utilizado o meio sintético carboximetilcelulose como única fonte de carbono e fragmentos dos isolados foram inoculados, e após o crescimento a presença do halo foi analisado na presença do corante vermelho congo e medido com paquímetro. Os dados obtidos mostraram que o meio de cultivo que propiciou a formação de unidades formadoras de colônias foi o meio ágar aveia com um percentual de 82% de crescimento celular. Dois isolados dos fungos apresentaram diâmetro do halo enzimático entre 30mm a 6mm. A diversidade que estes microrganismos apresentam indica a necessidade de estudos mais aprofundados sobre as enzimas que podem vir a ser produzidas que apresentam grande interesse biotecnológico.

Palavras-chave: Biodiversidade. Bioma. Microrganismos. Biotecnologia.

CERRADO FUNGUS WITH CELLULASE ENZYME PRODUCTION POTENTIAL

ABSTRACT

The Central-West region has as a predominant Biome the Cerrado that includes about 5% of the planet's biodiversity, including a small part of fungi already registered. These microorganisms are extremely important to nature because they are efficient decomposers of organic matter and large producers of enzymes. In this context, lignocellulosic residues have been the focus of numerous studies to induce the production of different cellulases and hemicellulases produced by various fungi. In this way the study aims to isolate and characterize basidiomycete fungi of the cerrado, to evaluate the growth in different culture media and its potential of enzymatic production. The fungi were collected in lignocellulosic materials in decomposition, were inoculated in different culture media and incubated in an oven at 28°C for 7 days. For the evaluation of cellulase enzyme production the

synthetic medium carboxymethylcellulose was used as the only carbon source and fragments of the isolates were inoculated, and after growth the presence of the halo was analyzed in the presence of the Congo red dye and measured with a pachymeter. The obtained data showed that the culture medium that gave rise to the formation of colony forming units was the oat agar medium with a percentage of 82% cell growth. Two isolates of the fungi presented a diameter of the enzymatic halo between 30mm and 6mm. The diversity that these microorganisms present, encourages us to further study the enzymes produced that have great biotechnological interest.

Keywords: Biodiversity. Biome. Microorganisms. Biotechnology.

1. INTRODUÇÃO

O cerrado é um dos biomas mais ameaçados pela degradação, ocupando uma área de 2.036.448 km², cerca de 22% do território brasileiro, possui sua localização estratégica servindo de corredor de ligação entre outros biomas como o Pantanal, Floresta Amazônica e Caatinga, colaborando para a biodiversidade e o equilíbrio ecológico (SILVA et al., 2012). A sua extensão envolve os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além dos enclaves no Amapá, Roraima e Amazonas.

Neste espaço territorial estão situadas três importantes bacias hidrográficas, promovendo uma importante disponibilidade de água doce que favorece a diversidade de espécies deste bioma e apenas 8,21% desta área são unidades de conservação; desse total, 2,85% são unidades de conservação de proteção integral e 5,36 % de unidades de conservação de uso sustentável (MMA, 2015; MMA, 2010).

Os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística estimam que o cerrado é a savana tropical mais rica do planeta em

biodiversidade (IBGE, 2018). Este bioma contém 33% da diversidade biológica do território brasileiro, demonstrando assim a importância de estudos voltados não somente para a exploração dessa diversidade, mas também para a sua preservação segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA 2007). Neste cenário, estão presentes os microrganismos e entre eles os fungos que apresentam um importante papel no ambiente e também um elevado potencial de produção de enzimas, as quais podem ser utilizadas em inúmeros processos, tais como: alimentícios, industriais, farmacêuticos, medicinais, biocombustíveis entre outros.

Com isso, a riqueza de espécies de um bioma pode vir a ser um aspecto essencial para a biodiversidade, conjecturando a presença de organismos desiguais nas suas características morfológicas, fisiológicas e ecológicas. Isso dado a diversidade do Reino Fungi, que surpreendentemente, constitui o segundo grupo com maior variação dentre os organismos eucariontes em ambientes terrestres (ALEXOPOULOS et al., 1996, FORZZA et al., 2012).

Estes microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais para a sustentação de ecossistemas. Uma dessas funções é a produção de enzimas extracelulares que ajudam na mineralização da matéria orgânica, propiciando a liberação de carbono e nutrientes na medida em que são assimilados. Justamente por esses importantes fatores, é que cada vez mais aumenta a busca por enzimas que possam ser utilizadas nos diversos setores industriais com maior aproveitamento e baixo custo (ALVES et al., 2012). Neste sentido, os fungos têm se destacado na degradação dos compostos lignocelulósicos, em virtude de suas inúmeras enzimas, principalmente os microrganismos do grupo basidiomicetos.

Os fungos basidiomicetos da podridão-branca, por exemplo, são microrganismos capazes de produzir enzimas que degradam a madeira, pois apresentam uma notável capacidade de sintetizar inúmeras enzimas hidrolíticas importantes, como as celulasas, as hemicelulasas, além de outras extracelulares, tais como: as lignolíticas, as lacases, a manganês peroxidase e a lignina peroxidase, que atuam em associação na degradação dos componentes da biomassa transformando-os em compostos de baixo peso molecular que podem ser assimilados mais facilmente pelos fungos (FALKOSKI et al., 2012).

Estas enzimas são utilizadas em vários segmentos e em diferentes processos industriais devido a sua alta eficiência. Ademais, as reações mediadas por biocatalisadores podem possibilitar elevadas taxas de rendimentos com excelentes níveis de pureza, minimizando a formação de subprodutos (BAPTISTA, 2012).

Ainda, neste contexto, os resíduos lignocelulósicos tem sido foco de inúmeros estudos para a indução da produção de diferentes enzimas principalmente as celulasas e hemicelulasas por diversos fungos, sendo que, cada substrato pode induzir de forma diferente a produção de complexos enzimáticos, uma vez que estes apresentam diferenças na sua composição podendo, assim, também promover alterações na produção de celulose, hemicelulose e lignina (SANCHÉS, 2009; QUIROZ et al., 2011).

O estado do Mato Grosso do Sul encontra-se localizado na região Centro-Oeste que tem como bioma predominante o Cerrado, no qual detém cerca de 5% da biodiversidade do planeta, isso se deve a heterogeneidade espacial que é um fator determinante para a ocorrência de uma diversidade de espécies.

Deste modo, o presente estudo visou isolar fungos basidiomicetos do cerrado sul mato-grossense e avaliar o crescimento em diferentes meios de cultivo, bem como avaliar o potencial de produção da enzima celulase.

2. METODOLOGIA

O estudo foi desenvolvido no laboratório de Biotecnologia, Bioquímica e Biotransformação do Centro de Estudos em Recursos Naturais - CERNA da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - UEMS/Dourados-MS.

Os fungos basidiomicetos foram coletados na região de Dourados. Para o isolamento foi realizada inicialmente a higienização dos fungos, com procedimento de lavagem em água corrente. Em seguida foram

retirados fragmentos de aproximadamente 20 mm que passou por assepsia com álcool 70% por um período de 10 minutos, seguido de Cloreto de Sódio (0,85%) por 10 minutos e novamente as amostras foram colocadas em álcool 70% por mais 10 minutos, em seguida em solução peptonada por mais 10 minutos, e posteriormente foi realizada a lavagem dos fragmentos de fungos em água destilada e após foram dispostos em papel filtro estéril para a secagem. Os fragmentos dos fungos foram transferidos assepticamente para placas de Petri contendo os meios sólidos: ágar batata dextrose (BDA), ágar aveia (AvA) e extrato de levedo, peptona e glicose (YPD 2%), os quais foram previamente esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos e adicionado o antibiótico cloranfenicol (50mg/mL), para evitar o crescimento de bactérias. As placas de Petri foram incubadas a 28°C por 168 horas para o desenvolvimento de micélio.

Foi realizada uma pré-seleção de linhagens que seriam produtoras da enzima de interesse (CMCase), onde fragmentos das amostras foram inoculadas no centro da placa de Petri contendo o meio sintético Carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono, incubado por um período de 5 dias à 28°C. Para a avaliação qualitativa da produção de enzimas foram adicionados 10 mL de uma solução reveladora vermelho congo (2,5 g/L) em tampão Tris HCl 0,1 mol/L, pH 8,0. Decorrido 30 minutos a solução foi descartada e as placas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 mol/mL neste mesmo tampão, para análise da presença ou não de atividade enzimática. Para a avaliação do tamanho do halo foi utilizado um paquímetro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

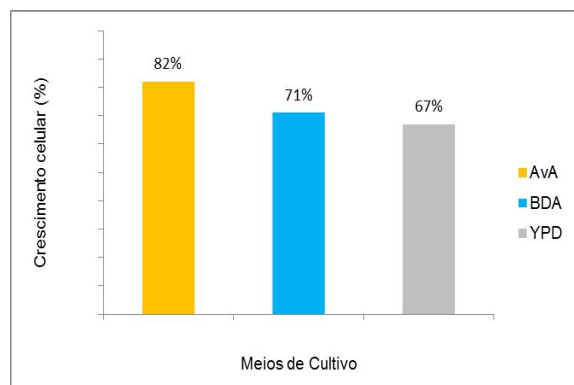
Os fungos basidiomicetos isolados em regiões do cerrado do sul mato-grossense em diferentes meios de cultivo, apresentaram um maior crescimento em meio ágar aveia com cerca de 82%. No meio BDA ocorreu um crescimento de 71% e o menor desenvolvimento micelial foi observado em meio YPD cerca de 67% dos isolados (Figura 1).

Estudos realizados com fungo *Magnaphorte grisea*, no qual foram avaliados a influência de vários meios de cultivo na esporulação, na temperatura de 25°C em foto período de 12 horas, incubados por 7 dias, os autores observaram um desenvolvimento diferenciado do microrganismo, pois houve uma maior produção de esporos no meio com base de aveia e que os demais meios que continham suco concentrado de tomate e ágar batata dextrose não ocorreu a indução de esporulação (DIAS NETO et al., 2010).

Para Pereira et al. (2006), analisando o crescimento de *Lasiodiplodia theobromae* em diferentes meios de cultivo, observou que o meio ágar aveia proporcionou um melhor desempenho no crescimento dos micélios. Os nossos estudos corroboram com a literatura, pois foi observado que o meio aveia proporcionou o melhor crescimento para as amostras isoladas dos fungos basidiomicetos.

Das amostras de fungos basidiomicetos isoladas, seis amostras mostraram um potencial enzimático no meio carboximetilcelulose. O isolado 1 apresentou um halo de 30 mm se destacando dos demais e o menor halo foi de 6 mm para o isolado 6 (Tabela 1).

Gráfico 1 – Avaliação de crescimento dos isolados de fungos basidiomicetos cultivados em diferentes meios, AvA - ágar aveia, BDA - ágar batata dextrose e YPD - extrato de levedo, peptona e glicose, na temperatura de 28°C por 7 dias.



Fonte: Elaborado pelos autores.

Segundo Delabona (2011), a busca por fungos com potencial para produção de celulases é uma das possíveis estratégias para a obtenção das enzimas necessárias para hidrolisar material lignocelulósico, visando contribuir para a degradação deste composto. Sendo que as enzimas celulases podem ser utilizadas em vários processos industriais, alimentos, bebidas, polpa de papel e indústria têxtil.

Na produção de enzimas microbianas, um dos principais postos-chaves para uma boa produtividade enzimática é a natureza do substrato, no qual deve dar suporte sólido para crescimento e conter fontes de nutrientes. Deste modo, o substrato considerado ideal para cultivo é aquele que fornece tanto a fonte de carbono como fonte de nitrogênio para o microrganismo, deve ser de baixo custo, ter grande disponibilidade, ser facilmente processável e sua composição deve enquadrar-se para a produção de enzimas celulolíticas, bem como para uma possível hidrólise comercial (PANDEY, 2003; KANG et al., 2004; JUHÁSZ et al., 2005).

Estudos utilizando 31 isolados de fungos basidiomicetos, com o intuito da produção das

enzimas lignocelulolíticas, os autores notaram a produção das enzimas Pox em 90% e CMCase em 58% dos isolados demonstrando assim que o meio de cultura pode influenciar na produção de enzimas (MOTATO-VÁSQUEZ et al., 2016). Ademais, as celulases têm sido empregadas na fabricação do etanol de segunda geração, obtido a partir da celulose de materiais lignocelulolíticos (SILVA, 2010).

Tabela 1 – Avaliação de halo e ação enzimática em meio sintético carboximetilcelulose

Isolados	Diâmetro do halo (mm)
Isolado 1	30
Isolado 2	14
Isolado 3	10
Isolado 4	10
Isolado 5	16
Isolado 6	6

Fonte: Elaborada pelos autores.

A figura 2 apresenta as características macroscópica, morfológicas e halo enzimático do Isolado 1, *in natura* (A) e cultivado em placa de Petri com meio sintético BDA (B) em (C) pode-se visualizar o tamanho do halo no meio carboximetilcelulose.

A formação do halo se dá através da formação de uma região esbranquiçada no centro da placa, diretamente relacionado à região de atuação das enzimas celulolíticas sob o substrato carboximetilcelulose, visto que o corante vermelho Congo tem a propriedade de se ligar a cadeias polissacarídicas quando realizado a lavagem dos meios com as células crescidas, sendo percebido um descoramento na região onde a celulose foi hidrolisada, ou seja, onde há a presença de celulases. Este teste apresenta-se como uma medida indireta e qualitativa para a avaliação do potencial de produção da enzima

celulolítica do microrganismo (CASTRO, 2006; BENOLIEL et al., 2010).

O desenvolvimento da tecnologia e a busca por enzimas é beneficiado no Brasil devido à biodiversidade e variedade de matérias-primas, principalmente de fontes renováveis. A maior biodiversidade do mundo concentra-se na região Amazônica entre outros biomas do país, e

estudos voltados para diversidade dos fungos basidiomicetos que apresenta potencial biotecnológico enzimático tem despertado interesse na busca de novos isolados destes microrganismos que produzam compostos e enzimas (ANDRADE, 2014).

Figura 2 – As imagens (A) apresenta o fungo na natureza, a (B) uma unidade formadora de colônia em meio de cultivo e a (C) a presença de halo no meio Carboximetilcelulose.



Fonte: Acervo dos autores.

4. CONCLUSÃO

O meio de cultivo que proporcionou um melhor crescimento micelial para os isolados de fungos basidiomicetos foi no meio aveia. Os isolados 1 e 5 apresentaram os maiores halos de degradação em relação ao método qualitativo em meio sintético carboximetilcelulose.

O cerrado guarda uma importante biodiversidade de fungos basidiomicetos com potencial para produção de enzimas, ressaltando a importância de explorar a biodiversidade deste bioma, visando contribuir para o conhecimento o isolamento de novos fungos produtores de enzimas com potencial biotecnológico.

REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C. W. & BLACKWELL, M. 1996. In-troductory mycology. 4ª, New York: John Wiley & Sons, 865 p.

ALVES, L. M. C.; SCHUCH, V.; SOUZA, J. A. M.; LEMOS, E. G. M. Metagenoma e a desconstrução da biomassa. In: LEMOS, E. G. M.; STRADIOTTO, N. R. **Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação**. São Paulo-SP: Cultura Acadêmica, 2012. p. 83-111.

ANDRADE, L. F. **Produção de etanol de segunda geração**. Monografia (Especialização em Microbiologia – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2014.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas: cerrado. Brasília: MMA, 2011. 200 p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. O bioma Cerrado (2015). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 30 ago. 2018.

BAPTISTA, N. M. Q.; SANTOS, A. C.; ARRUDA, F. V. F.; GUSMÃO, N. B. Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos. **Scientia Plena**, v. 8, p.1-7, 2012.

- BENOLIEL, B.; TORRES, F. A. G.; DE MORAES, L. M. P. A novel promising *Trichoderma harzianum* strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse in natura. **SpringerPlus**, v. 2, p. 656, 2013.
- CASTRO, A.M. **Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos, Obtidas a Partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum* spp.)**. 75p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
- DELABONA, P. S. **Bioprospecção de fungos produtores de celulases de etanol celulósico**. 121p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2011.
- DIAS NETO, J. J.; SANTOS, G. R.; CASTRO NETO, M. D.; ANJOS, L. M.; CUNHA, A. C. F.; IGNÁCIO, M. Influência do meio de cultura na esporulação de *Magnaporthe griseae* da concentração de conídios na severidade da Brusone do arroz. **Bioscience Journal, Uberlândia**, v.26, p.173-179, 2010.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Souza, E. S. Biodiversidade do bioma Cerrado. (2007). Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_2_111200610412.html> Acesso em: 26 de março de 2018.
- FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; ALMEIDA, M. N.; ALFENAS, C. C.; COLODETTE, J. L.; REZENDE, S. T. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.166, p.1586-1603, 2012.
- FORZZA, R. C. (Org.). 2012. Lista de Espécies da Flora do Brasil 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012>>. Acesso em: 27 agosto de 2018.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Brasil). Biomas, cerrado. Disponível em: <<http://7a12.ibge.gov.br/vamos-conhecer-o-brasil/nosso-territorio/biomas>> Acesso em: 04 de setembro de 2018.
- JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZER, K.; SIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v.40, p. 3519-3525, 2005.
- KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 153-156, 2004.
- MOTATO-VÁSQUEZ V., PIRES R.M., VITALI V.M.V., GUGLIOTTA A.D.M. Cultural and ligninolytic activity studies of some polypores (Basidiomycota) from brazilian Atlantic Forest, São Paulo State, Brazil. **Hoehnea**, v. 43, p. 289-300, 2016.
- PANDEY, A. Solid State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 81-84, 2003.
- PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização Fisiológica, Cultural e Patogênica de Diferentes Isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.572-578, 2006.
- QUIROZ, R. E. C.; PEREZ, N. M.; MARTINEZ, C. A.; ACOSTA; L. U., FOLCH; J. M. Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the Basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. **Biodegradation**, p.1-8, 2011.
- SANCHÉZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v.27, p.185-194, 2009.
- SILVA, S. M. F. Q.; PINHEIRO, S. M. B.; QUEIROZ, M. V. F.; PRANCHEVICIUS, M. C.; CASTRO, J. G. D.; PERIM, M. C.; CARREIRO, S. C. Atividade in vitro de extratos brutos de duas espécies vegetais do cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, p.1649-1656, 2012.
- SILVA, N.L.C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 123p. Dissertação de

Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

Geisa Alves da Silva

Universidade Federal da Grande Dourados
Pós-graduação em Ciências e Tecnologia Ambiental

Maria do Socorro Mascarenhas Santos

Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Mestra em Recursos Naturais

Elane Galvão dos Santos

Universidade Federal da Grande Dourados
Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental

Margareth Batistote

Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Docente do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais

Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Universidade Federal da Grande Dourados-UFGD
Docente do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
