

ESTUDO DAS ATIVIDADES DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS E DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Lentinula edodes* CULTIVADO EM RESÍDUO DE EUCALIPTO

Forganes, S. ¹, Silva, E. ², Brienzo, M. ³, Milagres, A. ⁴

¹DEBIQ/FAENQUIL, Cx.P.116 Lorena/SP 12600970, stellaforganes@yahoo.com.br

²DEBIQ/FAENQUIL Cx.P.116 Lorena/SP 12600970, mike@debiq. faenquil.br

³DEBIQ/FAENQUIL Cx.P.116 Lorena/SP 12600970, michelbrienzo@yahoo.com.br

⁴DEBIQ/FAENQUIL Cx.P.116 Lorena/SP 12600970, adriane@debiq. faenquil.br

Palavras-chave: *Lentinula edodes*, shiitake, enzimas hidrolíticas, crescimento micelial

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Resumo - Este trabalho visa contribuir com o entendimento dos aspectos enzimáticos envolvidos no processo de degradação de resíduos de eucalipto por linhagens de *Lentinula edodes*. As atividades das enzimas hidrolíticas foram investigadas nos extratos obtidos durante o período de 30, 60, 90, 95 e 100 dias de cultivo. Diferenças visuais na colonização do substrato foram observadas entre as nove linhagens a partir de 30 dias de cultivo. As enzimas hidrolíticas xilanases, β -xilosidase e β -glicosidase apresentaram picos de atividade no quinto dia do choque térmico. A celulase apresentou este pico aos 60 dias para a maior parte das linhagens.

Introdução

Lentinula edodes (Berkeley) Pegler é um fungo de decomposição branca pertencente ao filo Basidiomycetes, conhecido como shiitake. Durante seu ciclo de vida, utiliza compostos lignocelulósicos como fonte de carbono e energia para seu desenvolvimento. A literatura destaca que a grande capacidade de reprodução de *L. edodes* está ligada às enzimas extracelulares que atuam sobre a lignina, celulose e hemicelulose que compõem a estrutura da parede celular da biomassa vegetal.

A conversão de celulose à glicose dá-se pela ação sinérgica de três enzimas hidrolíticas: a endo-1,4- β -glucanase, exo-1,4- β -glucanase e a β -glicosidase. A enzima endo-1,4- β -glucanase hidrolisa as ligações internas β -1,4-glicosídicas, preferencialmente nas regiões amorfas das microfibrilas de celulose. Essa ação leva a formação de novos terminais redutores e não redutores da cadeia de celulose. Nestes finais redutores e não redutores ocorre a ação enzimática das exo-1,4- β -glucanases, as quais hidrolisam a cadeia de celulose em unidades de celobiose (duas unidades de glicose). Por fim, a enzima β -glicosidase cliva a ligação β -1,4 da unidade de celobiose em duas moléculas de glicose [1].

A hemicelulose, um heteropolímero ramificado, difere da celulose pela composição variada de açúcares e por possuir menor cadeia molecular, sendo constituído de xilose e arabinose. A hidrólise de hemicelulose exige um conjunto de enzimas extracelulares que são classificadas de acordo com o substrato sobre o qual elas atuam. Um sistema enzimático incluindo

endo e exo-xilanases, mananases, β -xilosidase, β -glicuronidase e β -arabinofuranosidase é necessário para a hidrólise completa desses heteroxilo-oligossacarídeos [2].

Muitos estudos foram realizados para seleção de espécies produtoras de cogumelos, mas não se sabe exatamente quais os metabólitos produzidos pelos fungos que são responsáveis pela frutificação. O objetivo deste estudo é fazer uma análise aprofundada das principais enzimas hidrolíticas participantes da biodegradação do resíduo lignocelulósico a partir de nove linhagens de *Lentinula edodes*, de procedências distintas, encontrando diferenças na atividade enzimática durante o crescimento micelial.

Materiais e Métodos

Foram utilizadas nove linhagens de *Lentinula edodes* cuja codificação e procedência são, respectivamente: SJC, São José dos Campos - SP; DEBIQ, Lorena - SP; UFV-52, Viçosa-MG; FEB-14 e as outras cinco linhagens CCB-514, CCB-558, CCB-515, CCB-581 e CCB-559 pertencentes a uma coleção de cultura de basidiomicetos – Instituto de Botânica – SP.

O resíduo de eucalipto, após moagem adequada, foi colocado em água destilada por 12 horas. O excesso de água foi escoado e cerca de 750 g da mistura úmida foram acondicionadas em sacolas plásticas de polipropileno (25 x 30 cm) e introduziu-se um tubo de ensaio no centro do meio de cultivo para formar um canal de inoculação. As sacolas foram fechadas com o auxílio de dois anéis concêntricos de PVC e papel impermeável e autoclavadas duas vezes

consecutivas a 115 °C por 2 horas com intervalo de 24 horas. Após resfriamento destes meios, retirou-se o tubo de ensaio e introduziu-se cerca de sete discos de micélio de culturas estoque contidas em placas de Petri.

O substrato inoculado foi mantido no escuro em sala com temperatura controlada a 27 ± 2 °C por períodos de 30, 60 e 90 dias. A umidade relativa da sala de incubação foi mantida entre 60 e 70%.

Para a indução dos corpos de frutificação, substratos cultivados com 90 dias foram mantidos em geladeira a 4 ± 2 °C por 10 dias e duas coletas da mesma cultura foram realizadas neste período (5 e 10 dias).

Cerca de 1/3 da parte superior do substrato cultivado em cada período foi homogeneizado em béquer. Para cada 20 g de substrato cultivado foram adicionados 100 mL de tampão acetato de sódio (50 mM; pH 5,0) e transferidos para um banho a 10°C sob agitação por 24 horas. Terminada a agitação, o extrato foi filtrado duas vezes através de papel de filtro sob vácuo.

Para os ensaios enzimáticos de celulases, as atividades foram determinadas utilizando-se papel de filtro Whatman no. 1 como substrato enzimático [3]. A atividade xilanase foi determinada pela liberação de açúcares a partir do substrato xilana de "birch" [4]. Os açúcares liberados nos ensaios foram determinados como açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) [5]. Os valores de absorbância foram convertidos em μ moles de xilose e glicose por comparação com uma curva padrão de xilose e glicose, respectivamente.

Para a determinação da β -glicosidase e da β -xilosidase utilizou-se como substratos o p-nitrofenil- β -D-glicosídeo (pNPG) e o p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX), respectivamente. O p-nitrofenol liberado após ação das enzimas foi determinado pela leitura da absorbância em 410 nm e comparado com uma curva de calibração de p-nitrofenol [6].

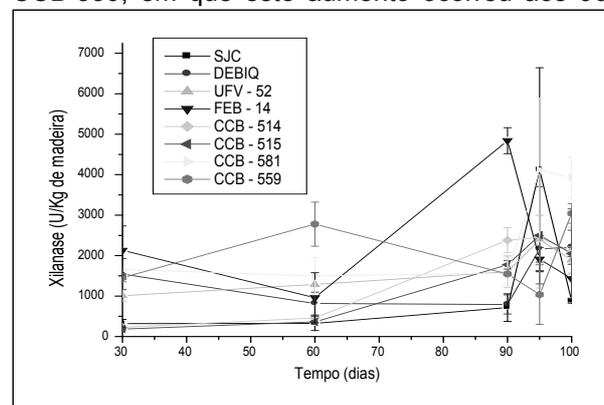
Resultados

Foi possível constatar diferenças no crescimento micelial entre as nove linhagens de *L. edodes* cultivadas em resíduo de eucalipto. Verificou-se que no primeiro mês de cultivo nenhuma linhagem apresentou crescimento micelial significativo. No segundo mês notou-se que as linhagens DEBIQ, FEB-14, e CCB-514 foram as que mais se desenvolveram. Finalmente, no terceiro mês de cultivo, observou-

se que todas as linhagens apresentaram crescimento micelial intenso, com exceção da linhagem CCB-558, que após várias tentativas pôde-se concluir que ela não apresenta desenvolvimento em resíduo de eucalipto.

A linhagem FEB-14 foi a que apresentou crescimento micelial mais intenso. Em contrapartida, durante todo o período analisado não houve aparecimento de primórdios, o que ocorreu também com a linhagem SJC. A linhagem CCB-515 foi a que apresentou o maior número de primórdios com 90 dias de cultivo, seguida por CCB-581, UFV-52, DEBIQ, CCB-514 e CCB-559.

As oito linhagens que se desenvolveram no resíduo de eucalipto apresentaram atividade de xilanase durante a fase de colonização e frutificação. Com 95 dias de cultivo todas as linhagens tiveram um aumento significativo da mesma com exceções das linhagens FEB-14 e CCB-559, em que este aumento ocorreu aos 90



dias e 60 dias de cultivo, respectivamente (Figura 1).

Figura 1 – Produção de xilanase pelas oito linhagens de *L. edodes* em resíduo de eucalipto

As atividades de β -glicosidase tiveram um comportamento semelhante entre as linhagens analisadas, com maior produção durante o choque térmico. Observou-se que as linhagens que apresentaram as maiores atividades foram CCB-515 e CCB-581, enquanto que DEBIQ e FEB-14 apresentaram valores muitos baixos de atividade durante todo o período (Figura 2).

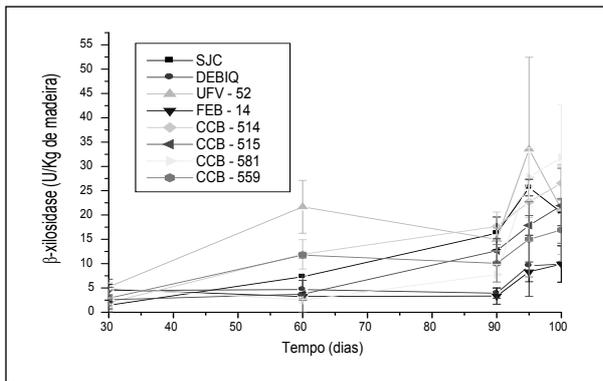


Figura 2 – Produção de β -glicosidase pelas oito linhagens de *L. edodes* em resíduo de eucalipto

Todas as linhagens tiveram um desempenho semelhante na atividade da β -xilosidase destacando-se a UFV-52 por apresentar os valores mais altos de atividade entre as oito linhagens analisadas. Novamente observa-se uma elevação acentuada da atividade durante o choque térmico e que as linhagens DEBIQ e FEB-14 apresentaram os valores mais baixos de atividade durante todo o período (Figura 3).

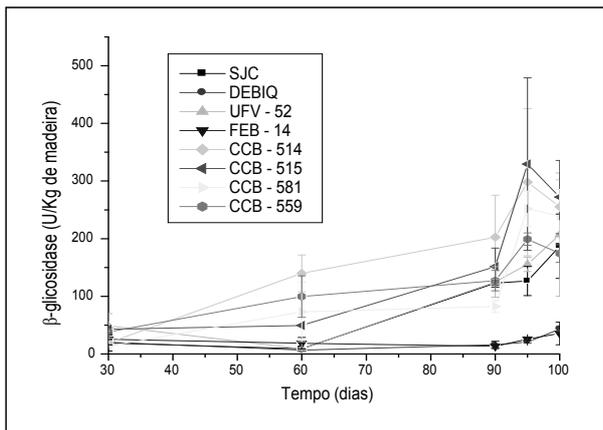


Figura 3 – Produção de β -xilosidase pelas oito linhagens de *L. edodes* em resíduo de eucalipto

As atividades celulolíticas das linhagens apresentaram pouca variação durante os períodos de cultivo analisados e entre as linhagens. Pôde-se observar que as máximas atividades foram obtidas em diferentes tempos. Durante o choque térmico as linhagens apresentaram variação no comportamento. As linhagens SJC, DEBIQ, UFV-52 e FEB-14 tiveram uma queda na atividade durante os primeiros cinco dias continuando a cair até os 10 dias. As atividades das linhagens restantes aumentaram durante os primeiros cinco dias seguidas por um decréscimo até os 10 dias, com exceção da linhagem CCB-559 que aumentou durante toda esta fase (Figura 4).

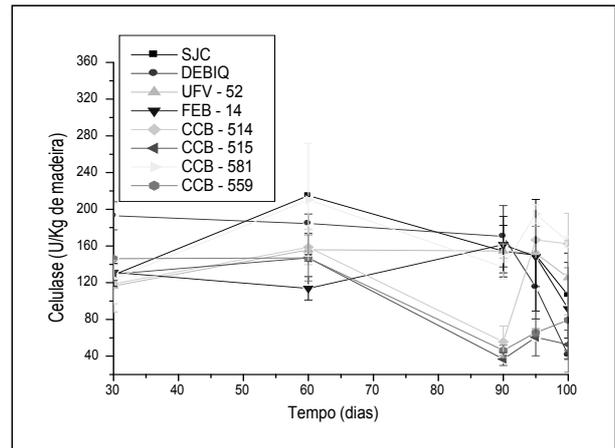


Figura 4 – Produção de celulases pelas oito linhagens de *L. edodes* em resíduo de eucalipto

Discussão

Em trabalhos anteriores foi demonstrado que durante a fase vegetativa, *L. edodes* é altamente ativo na produção de xilanases resultando em um aumento marcante de xilana solúvel [7] e que a atividade xilanase diminui com o aparecimento do corpo de frutificação [8]. Os resultados aqui apresentados indicam que a maioria das linhagens apresenta valores máximos de atividade de xilanase entre 90 dias de cultivo e o quinto dia do choque térmico. Após este pico de atividade todas as linhagens apresentaram significativa queda até a fase final do choque térmico confirmando, assim, a tendência apresentada na literatura.

Quando *L. edodes* foi cultivado em palha de trigo observou-se um aumento significativo na atividade da β -glicosidase com o aparecimento de primórdios seguido de uma queda durante a frutificação [9]. No cultivo em resíduo de eucalipto pôde-se confirmar a mesma tendência.

A β -xilosidase age sobre a xilobiose produzindo xilose para ser utilizada pelo fungo, assim, uma maior atividade desta enzima pode indicar uma maior eficiência na hidrólise das hemiceluloses do meio. Como a atividade desta enzima foi relativamente baixa, provavelmente o tempo de cultivo não foi suficiente para a hidrólise total da hemicelulose do substrato.

Em cultivo de *L. edodes* sobre serragem suplementada com farelo de arroz, trigo e milho (7:1:1:1) [10], também se observou a diminuição na atividade celulase com a formação dos primórdios e os picos de atividade foram encontrados durante o desenvolvimento do corpo de frutificação. A análise dos dados obtidos mostra que a maioria dos valores máximos de atividade está concentrada na fase vegetativa

quando não é usado nenhum tipo de suplementação.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos durante este período pôde-se concluir que as linhagens de *Lentinula edodes* que possuíram desenvolvimento micelial mais intenso foram DEBIQ e FEB-14. Verifica-se que crescimento micelial mais intenso não implica em aparecimento de primórdios durante a frutificação. As linhagens CCB-515, CCB-581 e UFV-52 foram as que apresentaram maiores quantidades de primórdios.

As maiores atividades hidrolíticas foram obtidas pela linhagem CCB-581. Pôde-se observar também que a maioria das atividades enzimáticas foi alta na fase final do cultivo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-03/07378-7) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-PIBIQ) pelo suporte financeiro.

Referências

[1] KIRK, T. K., DAN CULLEN. Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. New York: John Wiley and Sons, Capítulo 9, 1998.

[2] BIELY, P. Biotechnological potential and production of xylanolytic systems free of cellulases. ACS SYMP SER, v.15, p 25-28,1994.

[3] MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Mandels, M.; Andreotti, R. e Roche, C. Measurement of saccharifying cellulase. Biotechnology and Bioengineering Symposium, v. 6, p. 21-23, 1976.

[4] BAYLEY, M.J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J. Biotechnol., v. 23, p. 257-270,1992.

[5] MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry, v. 31, p. 424-426, 1959.

[6] TAN, L.U.L.; MAYERS, P.; SADDLER, J.N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus

Thermoascus aurantiacus Can.J.Microbiol., v.33, p.689-692, 1987.

[7] DARE, P.H.; CLARK, T.A.; CHU-CHOU, M. Consumption of substrate components by the cultivated mushroom *Lentinula edodes* during growth and fruiting on softwood and hardwood-based media. Process Biochem, p.156-160, 1988.

[8] MATSUMOTO, T. Changes in activities of carbohydrases, phosphorylase, proteinases and phenol oxidases during fruiting of *Lentinula edodes* in sawdust cultures. Tottori Mycological Institute, v.26, p. 46-54, 1988.

[9] MATA, G.,SAVOIE, J.M. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. Word J Microbial Biotechnol, v.4, p.513-519, 1998.

[10] OHGA, S.; ROYSE, D. J..Transcriptional regulations of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust, FEMS Microbiology, 2001.