



ATIVIDADE β -XILOSIDASE DE CEPAS AMAZÔNICAS DOS FUNGOS *Pycnoporus sanguineus* (L.F.) MURR E *Lentinus crinitus* (L.) Fr.

Activity β - xilosidase of the mushrooms amazonian *Pycnoporus sanguineus* (L.F.) Murr and
Lentinus crinitus (L.) Fr.

Cynara Carmo Bezerra¹

Ademir Castro e Silva²

Resumo

As enzimas de natureza hidrolíticas e hemicelulolíticas como celulasas, xilanases, glicosidasas e xilosidasas e/ou outros agentes não enzimáticos produzidos por fungos que degradam a madeira, apresentam um enorme potencial biotecnológico. Com o intuito de investigar o potencial hidrolítico de cepas amazônicas dos fungos degradadores de madeira, *Pycnoporus sanguineus* (L.:F.) Murr e *Lentinus crinitus* (L.) Fr, foi realizado o estudo sobre a determinação da atividade enzimática de β -xilosidase, sob a condição estacionária e sob agitação a 180 rpm. Os resultados demonstram que a atividade enzimática dos fungos foi maior sob a condição de agitação. O estudo revelou que os fungos apresentam grande atividade lignocelulolítica. Faz-se mister, portanto, estudos posteriores para se buscar novos meios de cultura para a obtenção da máxima atividade dessas enzimas de natureza hidrolíticas visando viabilizar a purificação para possíveis usos biotecnológicos.

Palavras-chave: enzimas hidrolíticas; xilosidase; fungos basidiomicetos.

Abstract

Enzymes of a hydrolytic and hemicellulolytic nature, such as cellulases, xylanases, glycosidases and xylosidases and/or other non-enzymatic agents produced by fungi that degrade wood, have an enormous biotechnological potential. In order to investigate the hydrolytic potential of Amazonian strains of the wood-degrading fungi, *Pycnoporus sanguineus* (L.:F.) Murr and *Lentinus crinitus* (L.) Fr, a study was carried out on the determination of the enzymatic activity of β -xylosidase, under the stationary condition and under agitation at 180 rpm. The results demonstrate that the enzymatic activity of the fungi was higher under the shaking condition. The study revealed that the fungi present great lignocellulolytic activity. Therefore, further studies are necessary to seek new culture media to obtain the maximum activity of these enzymes of a hydrolytic nature, in order to enable purification for possible biotechnological uses.

Keywords: hydrolytic enzymes; glycosidase; basidiomycete fungi.

Introdução

Dentre a grande biodiversidade amazônica, se insere a grande diversidade micológica. Alguns fungos têm em comum a habilidade de produzir enzimas extracelulares que oxidam

¹ Professora Associada do Centro de Estudos Superiores da Universidade do Estado do Amazonas (CESP/UEA). Dra. em Biotecnologia/PPGBIOTEC/UFAM. E-mail: cynara_carmo@yahoo.com.br

² Professor Titular do Centro de Estudos Superiores da Universidade do Estado do Amazonas (CESP/UEA). Dr. em Botânica/INPA. Email: adcastro@gmail.com



compostos fenólicos relacionados à lignina e são particularmente úteis na bioconversão da madeira, como por exemplo, no pré-tratamento biológico de cavacos de madeira na indústria de papel e celulose, o que permite a economia de energia no processo mecânico e termomecânico de produção de pasta celulósica (CASTRO E SILVA, 2002; BOOMINATHAN & REDDY, 1992).

Uma fonte de α -amilase foi identificada em *Pycnoporus sanguineus* (DE ALMEIDA; MIZUTA & GIGLIO, 1997 *apud* PANDEY *et al*, 2000). Este fungo possui um “pool” enzimático que de acordo com Castro e Silva *et al* (1993), que estudaram uma cepa amazônica deste fungo, passa pela produção em meio “agar-malte” de lignina-peroxidase, peroxidase, lacase- Mn-peroxidases, β -glicosidase, celulase e xilanase. As principais enzimas para celulose são endo-1,4- β -glucanases, exo-1,4- β -glucanases e 1,4- β -glucosidases. As hemiceluloses exigem uma maior quantidade de enzimas em função de sua complexidade estrutural, sendo algumas delas, a endo-1,4-xilanase, 1,4- β -xilosidase, seus equivalentes em manana e em muitas acetil esterases. (PUTZKE, 2002; CASTRO E SILVA, 1996). Não resta dúvida que a nossa biodiversidade micológica é ainda um tanto desconhecida na sua totalidade, e também tem potencial para inserir a Amazônia no contexto mundial de produção de enzimas para diversas aplicações industriais.

Pycnoporus sanguineus e *Lentinus crinitus*

O fungo *Pycnoporus sanguineus* é um basidiomiceto da ordem Polyporales e família Polyporaceae (NOBLES, 1965 citado por CASTRO E SILVA, 2008). É um fungo amplamente distribuído na natureza sendo encontrado em florestas tropicais, como a Floresta Amazônica (ESPOSITO *et al.*, 1993). É encontrado sobre a madeira, na qual se fixa e da qual se alimenta, sendo por isso denominado popularmente como orelha de pau e tornou-se conhecido por suas características fitoterápicas, antibacteriana, antifúngica e atividade adstringente (Fig. 01).

O fungo *Pycnoporus sanguineus* é endêmico do Brasil e pode ser encontrado nos seguintes estados: Região Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará e Rondônia), Região Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte), Região Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul e Mato Grosso), Região Sudeste (Espírito Santo, Rio de



Janeiro e São Paulo), Região Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) (GIBERTONI 2020).

Figura 01: *Pycnoporus sanguineus*



Fonte: os autores

O fungo *Lentinus crinitus* é uma espécie de basidiomiceto bastante comum no Brasil, sendo frequentemente associada a troncos em decomposição. São fungos que apresentam basidioma centralmente estipitado, infundibuliforme e superfície abhymenial verrugosa a estrigosa (Fig. 02). Apesar de frequentemente degradarem a madeira, os fungos apresentam grande versatilidade com relação aos substratos a serem degradados, podendo ser utilizados nas mais diversas áreas de biorremediação, desde que são capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos, compostos bifenílicos, produtos originados em indústria têxtil, papel e celulose (PUTZKE, 2002; BARR, 1994; AUST, 1990).



Figura 02: *Lentinus crinitus*



Fonte: os autores

Os fungos são capazes de crescer sob as condições de estresse que limitam o crescimento bacteriano. Além disso, o modo de crescimento dos fungos, induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono, por meio do alongamento e ramificação das hifas, permite a colonização de grandes áreas, aumentando o contato superficial com o contaminante, melhorando os níveis de biodegradação. Se a contaminação é relativamente resistente a biodegradação, geralmente se utilizam-se fungos basidiomicetos inoculados para iniciar o ataque metabólico (MATHEUS & MACHADO 2002).

Os fungos de podridão branca possuem a capacidade de degradar lignina, um dos componentes da madeira, o que os torna o grupo mais interessante dentre os fungos para utilização em biorremediação. O sistema que degrada extensivamente a lignina também é



responsável pela degradação de alguns compostos poluentes orgânicos como clorofenóis, nitrofenóis e hidrocarbonetos poliaromáticos. (BALLAMINUT, 2007).

Souza e Rosado (2009) destacam que a utilização de fungos ligninolíticos em bioprocessos envolvendo descontaminação ambiental, principalmente basidiomicetos degradadores da podridão branca, vem crescendo grandemente nos últimos tempos, no que se refere à utilização de sistemas enzimáticos, devido às suas vantagens. Entre essas vantagens pode-se destacar a diminuição de compostos tóxicos durante o processo de descontaminação, uma vez que se trata de um processo natural, não necessitando de substâncias químicas. Fungos basidiomicetos como o *Lentinus crinitus* mostraram-se eficientes em processos de biodegradação e descoloração de efluentes têxteis.

Para Phan *et al.* (1998) devido à diversidade tanto de microrganismos quanto de enzimas, muitas são as áreas da pesquisa que envolvem a produção de enzimas hidrolíticas em larga escala para fins industriais. Dentro deste contexto estão as xilanases, enzimas que podem ser produzidas por uma variedade de microrganismos, incluindo os fungos filamentosos, que se destacam como principais produtores.

Uma especial atenção tem sido dada ao uso da enzima β -xilosidase purificada devido à sua importância em reações de transxilosilação na síntese de β -xilósídeos (PAN *et al.*, 2001). Várias técnicas para extração e purificação de β -xilosidase, incluindo precipitação e extração líquido-líquido, têm sido reportadas (CORTEZ, PESSOA Jr, 1999; PAN *et al.*, 2001; HASMANN *et al.* 2001;).

Portanto, esta pesquisa objetivou estudar a atividade de enzimas hidrolíticas excretadas pelos fungos basidiomicetos, *Pycnoporus sangüíneus* e *Lentinus crinitus* e os resultados oriundos deste trabalho se revestem de grande importância para o estado ainda incipiente da biotecnologia no Estado do Amazonas, uma vez que se volta a aplicação industrial de fungos que notadamente são reconhecidos apenas como deterioradores de madeira, ainda com pouco conhecimento sobre o seu grande potencial biotecnológico.



Material e métodos

Material biológico

Foram utilizadas amostras dos fungos *Pycnoporus sanguineus* e *Lentinus crinitus* pertencentes à Coleção de Cultura de Basidiomicetos (CCB) do Laboratório de Biotecnologia MBT/UEA (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais/Universidade do Estado do Amazonas), a partir de linhagens que se encontram armazenadas em meio Sabouraud.

Preparo do inóculo

A inoculação do fungo ocorreu em meio malte líquido com e sem glicose como fonte de carbono. Amostras de 2 mL do meio de cultivo (caldo filtrado) foram consideradas como fonte enzimática, essas amostras foram coletadas no 2°, 4°, 6°, 8°, 10° e 12° dias para observação do período de maior produção enzimática, as quais foram centrifugadas por 15 minutos a 12000 g, para posteriores dosagens enzimáticas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Durante o período de cultivo foi investigada a enzima β -Xilosidase.

Determinação da atividade enzimática

Atividade β -xilosidase

Para determinar a atividade da β -Xilosidase foi utilizada a metodologia proposta por Tan *et al.*, (1987). O método utiliza p-nitrofenil- β -Xilosideo (pNPX) como substrato para a atividade β -Xilosidase. Para determinação da atividade, 0,1 mL de caldo filtrado e 0,4 mL de uma solução 0,2% (p/v) de pNPX, em 50 mM de tampão acetato de sódio (pH 4,8), foram incubados a 50°C durante 30 minutos. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de uma solução 10% (p/v) de bicarbonato de sódio. O p-nitrofenil liberado foi medido por absorbância em 410 nm, e comparado com uma curva padrão de xilanose.



Resultados e discussão

Atividade enzimática de *Pycnoporus sanguineus*

O fungo mostrou capacidade de produzir quantidades mensuráveis de enzimas celulolíticas nas duas condições testadas (cultura sob agitação e estacionária), na realidade, no crescimento sob agitação (180 rpm), foi detectada uma atividade para β -xilosidase, de 3.821 U/mL, enquanto na cultura estacionária a atividade foi de 2.461 U/mL, ou seja, aproximadamente 55% maior. Com o intuito de verificar a influência da glicose na atividade enzimática foi realizado teste acrescentando a glicose ao meio líquido como fonte de carbono na condição estacionária, obtendo-se como resultados, com glicose, 2.551 U/mL e sem glicose 2.461 U/mL, o que demonstra a não influência da glicose na determinação desta enzima (Tabela 01).

Tabela 01: Atividade enzimática do fungo *P. sanguineus* sob condição de agitação e estacionária em meio malte com e sem acréscimo de glicose como fonte de carbono a 30⁰ C.

ENZIMA	AGITAÇÃO (U/mL)	ESTACIONÁRIO (U/mL)
β -XILOSIDASE (sem glicose)	3.821	2.461
β -XILOSIDASE (com glicose)		2.551

Dekker (1989), mostrou que *Trichoderma reesei*, conhecido fungo produtor de elevadas taxas de celulasas, apresenta um sistema celulolítico induzido por celulose e fortemente reprimido pela presença da glicose no meio de cultivo. De modo geral, o fungo *P. sanguineus* apresentou atividades celulolíticas comparáveis às do fungo *T. reesei*, apesar de seus sistemas enzimáticos apresentaram grandes diferenças quanto a indução e repressão. Ressalta-se, entretanto, que a regulação da produção celulolítica de *P. sanguineus* deve ainda ser



esclarecida através de estudos mais detalhados. O *P. sanguineus* foi capaz de produzir xilosidase nos substratos em que ele foi cultivado. Entretanto, a maior atividade ocorreu na condição de agitação sem a presença de glicose, resultado contrário ao obtido por Herrera (1991) para *Thermoascus aurantiacus* com o qual obteve a maior atividade com meio suplementado com 1,5% glicose.

Atividade enzimática do fungo *Lentinus crinitus*

Assim como ocorreu para o *P. sanguineus* nestas condições, esse fungo também mostrou maior atividade enzimática sob a condição de agitação, sendo que apresentou atividade β -xilosidase de 8.363 U/mL, ou seja, 118,86% maior do que *P. sanguineus* nas mesmas condições. Herrera (1991) não detectou atividade β -xilosidase em cultura estacionária na presença de glicose para *Thermoascus aurantiacus*, enquanto no nosso estudo ocorreu a produção dessa enzima por *Lentinus crinitus*, nas mesmas condições testadas por aquele autor, inclusive sem a presença de glicose (Tabela02). Praticamente não existe diferença na produção de xilosidase na presença ou não de glicose em condições estacionária. A atividade β -xilosidase foi detectada vinte e quatro horas depois da incubação sob condição de agitação, alcançando valores máximos no décimo quarto dia de crescimento (último dia do experimento).

Tabela 02: Atividade enzimática do fungo *Lentinus crinitus* sob condição de agitação e estacionária em meio malte sem acréscimo de glicose como fonte de carbono a 30⁰ C.

ENZIMA	AGITAÇÃO (U/mL)	ESTACIONÁRIO (U/mL)
β -XILOSIDASE	8.363	4.431

Conclusão

Ambos possuem uma apreciável atividade enzimática, sendo que o *Lentinus crinitus* evidencia uma maior atividade hemicelulolítica, apresentando uma atividade de β -xilosidase



cerca de 118,86% maior que o fungo *Pycnoporus sangüíneus*. O crescimento sob agitação, a 180 rpm, é onde se obtém a maior atividade enzimática para ambos os fungos. Diferentemente do que encontramos na literatura especializada, a atividade de β -xilosidase em condição estacionária e meio de cultura suplementado com glicose não foi acompanhada pela atividade endo-glucanase.

O estudo da produção de β -xilosidase por *P. sanguineus* e *Lentinus crinitus* foi importante por oferecer subsídios para etapas posteriores de purificação e caracterização desta enzima.

Referências bibliográficas

- BALLAMINUT, N. **Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB274 empregado em biorremediação de solo**. 2007. 176f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, 2007.
- BOOMINATHAN, K. e REDDY, A. **Fungal Degradation of Lignin: Biotechnological Applications**. Vol. 4. Editado por Marcel Dekker Inc, N. York. 1992.
- CASTRO E SILVA, A. **Micromorfologia da degradação de madeira da espécie amazônica *Hura creptans* L. Por fungos lignolíticos pertencentes a classe Hymenomycetes**. Tese de doutorado. Manaus: INPA/FUA. 1996.
- CASTRO E SILVA, et al. **O inexplorado potencial enzimático da biodiversidade amazônica**. Paper. Manaus, 2002.
- CORTEZ, E. V., PESSOA-Jr. A. **Xylanase and β -xilosidase separation by fractional precipitation**. *Process Biochem.*, London, v. 35, p. 277-283, 1999.
- DE ALMEIDA, M.L.O. em **“Composição Química dos Materiais” em Celulose e Papel – Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica**. Vol.I. Ed. IPT – São Paulo, SP, 1982.
- DEKKER, R.F.H.. **Hidrólisis Enzimática de Lignocelulósicos**. Apostila do IX Curso International de Ingenieria Bioquimica. Escuela de Ingenieria Bioquimica. Universidad Católica de Valparaiso (Chile), p. 1- 132. 1989.



- HASMANN, F. A., PESSOA-Jr., A., ROBERTO, I. C. **Screening of variables in β -Xilosidase recovery using cetyl trimethyl ammonium bromide reversed micelles.** *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Clifton, v. 91-93, p. 719-728, 2001.
- HERRERA, A E. M. ***Thermoascus aurantiacus* (CEPA BRASILEIRA: Aspecto do Crescimento, Produção Enzimática e Utilização no Tratamento de Materiais Lignocelulósicos.** Dissertação de Mestrado. Campinas: Universidade de Campinas. 1991.
- MATHEUS, D. R. & MACHADO, K. M. G. **Biorremediação: potencial de aplicação para POPs.** In: Fernicola, N. A. G & Oliveira, S. S. (Orgs.). Produtos orgânicos Persistentes – POPs, CRA, Salvador. 13: 479-500. 2002.
- PAN, I-H, YAO, H. J., LI, Y. K. **Effective extraction and purification of β -xylosidase from *Trichoderma koningii* fermentation culture by aqueous two-phase portioning.** *Enz. Microb. Technol.*, Surrey, v.28, p.196-201, 2001.
- PANDEY, A. ; NIGAM, P; SOCCOI, C.R; SOCCOI, V.T.; SINGH, D; MOHAN, R. **Advances in microbial amylases.** *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31: 131-152. 2000.
- GIBERTONI, T. B. **Flora do Brasil 2020 em construção. «Polyporales».** Consultado em 28 de janeiro de 2022
- PUTZKE, Jair. **Os reinos dos fungos.** Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002. v.1 e v.2.
- SOUZA, A.F.; ROSADO, F.R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em agronegócios e meio ambiente.** v.2, p. 121-139, 2009.
- TAN, L. U. L. et al. Purificación and Characterization of a Thermostable Xylanase from a Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal Microbiology** 33:689-694.1987.

Apresentado em 12/08/2022

Aprovado em 11/10/2022