

Combinação de extratos enzimáticos de basidiomicetos e ascomicetos para hidrólise do cacho vazio de dendê

Elias Alves da Silva¹, Thályta Fraga Pacheco², Thais Demarchi Mendes³, Marivane Lemos⁴, Felipe B.P. Carvalho⁵, Léia Cecília de Lima Favaro⁶, Simone Mendonça⁷, Felix Gonçalves de Siqueira⁸, Manoel Teixeira Souza Júnior⁹

Resumo

A cadeia de produção e uso do dendê (*Elaeis guineensis*) tem buscado se alinhar à lógica de biorrefinaria, visando à sustentabilidade e competitividade do setor. Nesse contexto, o aproveitamento integral de resíduos para a geração de outros produtos de maior valor agregado ganha relevância. Os cachos vazios são abundantes resíduos lignocelulósicos dessa cadeia. Na natureza, os basidiomicetos degradam eficientemente os componentes estruturais da parede celular vegetal, em função do arcabouço enzimático, enquanto alguns fungos filamentosos são eficientes em determinado componente. O presente estudo objetivou verificar a capacidade lignolítica e hidrolítica de extratos enzimáticos de basidiomicetos (coleção Embrapa Agroenergia – FPB), combinados com extratos de dois ascomicetos *Trichoderma reesei* ATCC60787 (Tr) e *Aspergillus aculeatus* F-50 [NBRC108796] (Aa), sobre o cacho vazio de dendê pré-tratado (autohidrólise). Os basidiomicetos FPB's 26; 28; 102; 104; 109; 115 e 116 foram cultivados sobre o cacho vazio (fermentação estado sólido), para obtenção dos extratos. Os Ascomicetos *T. reesei* ATCC 6087[®] e *A. aculeatus* F-50 [NBRC108796][™] foram cultivados em condição submersa em meio Mandels Weber (1969), suplementado com 2,5 % de borra (sólido obtido no tridecantador de óleo de dendê), para também obtenção de extratos. A hidrólise foi realizada em placas tipo *Deep Well* contendo 0,45g de fibra e 6 mL da mistura constituída por extratos, tampão e água destilada por poço. Os resultados evidenciaram maiores teores de glicose nas misturas contendo extratos de *T. reesei* e *A. aculeatus* e FPB's 109; 115e 116, levando à produção de (2,73 g. L⁻¹), (2,38 g. L⁻¹) e (2,58 g. L⁻¹), respectivamente.

Palavras-chave: fungos de podridão-branca. agroindústria do dendê. coquetel enzimático. açúcares solúveis.

¹ Biólogo, mestre em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, doutorando em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras (UFLA) / CAPES-EMBRAPA, elias.silva@colaborador.embrapa.br

² Engenheira química, mestre em Engenharia química, Analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

³ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁴ Farmacêutica analista clínica, Universidade de Caxias do Sul, pós-doutoranda CAPES/ EMBRAPA, marivane.lemos@colaborador.embrapa.br

⁵ Engenheiro bioquímico, analista da Embrapa Agroenergia, felipe.carvalho@embrapa.br

⁶ Bióloga, doutora em genética e melhoramento de plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.com

⁷ Farmacêutica bioquímica, doutora em saúde pública, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

⁸ Biólogo, doutor em biologia molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

⁹ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia e Biologia Molecular de Plantas, pesquisador da Embrapa Agroenergia, manojel.souza@embrapa.br

Introdução

A agricultura tem buscado suprir a demanda da sociedade cada vez mais exigente. Com isso, durante o processamento de matérias-primas, as cadeias produtivas acabam se deparando com resíduos, resultantes de uma ou mais etapas de beneficiamento. Em virtude dessa e de outras problemáticas, nasceu o conceito de bioeconomia, que consiste em um modelo de desenvolvimento sustentável em que a utilização dos recursos naturais deve ocorrer de forma cíclica e com responsabilidade de gerar tecnologias ambientalmente corretas como a bioenergia (PHILP, 2015).

Nesse cenário, encontra-se a cadeia produtiva da palma de óleo (*Elaeis guineensis*), uma cultura oleaginosa altamente produtiva que supera a produtividade de outras oleaginosas tradicionais, como a soja, o girassol e a canola (MALAYSIAN PALM OIL BOARD, 2017). Apesar do alto rendimento de óleo, a indústria do dendeeiro (fazendas e agroindústrias) produz milhões de toneladas de biomassa lignocelulósica anualmente.

Os cachos vazios do dendê EFB (*Empty Fruit Bunch*), resultantes da extração dos frutos para obtenção do óleo, é uma das frações da cadeia produtiva do setor, e que apresenta características para obtenção de açúcares solúveis e fermentescíveis a etanol e outros produtos de polissacarídeos lignocelulósicos (CHIESA; GNANSOUNOU, 2014). O fator limitante de sua utilização é a lignina, constituinte altamente recalcitrante da parede celular (PARK et al., 2013), o que pode ser contornado com pré-tratamentos da biomassa.

O método de auto-hidrólise ou hidrotérmico consiste numa técnica que envolve a mistura de água e biomassa lignocelulósica em reator de alta pressão à altas temperaturas, isso promove a ruptura do material lignocelulósico, permitindo o acesso à celulose pelas enzimas hidrolíticas. No entanto, após o procedimento, parte da lignina solúvel fica adsorvida nas fibras de celulose, dificultando o aproveitamento destas (SINGH et al., 2016).

Os fungos de podridão-branca ou basidiomicetos têm a capacidade de degradar materiais lignocelulósicos (SAHA et al., 2016). Isso é possível em virtude da eficiência dos seus sistemas enzimáticos extracelulares, por apresentarem compostos de baixa massa molar (ligninases e oxidases) que infiltram a parede celular e agem sobre os componentes macromoleculares. Em seguida, ocorre a quebra de polissacarídeos com a ação das hidrolases (AGUIAR; FERRAZ, 2011; DASHTBAN et al., 2010), já os ascomicetos como *Trichoderma reesei* e *Aspergillus aculeatus*, possuem predominantemente em seu arcabouço enzimático a presença de hidrolases, o que justifica os estudos para produção em grande escala visando à utilização em biorrefinarias (GUPTA et al., 2014).

Nesse sentido, percebe-se que o tratamento da biomassa lignocelulósica proveniente dos cachos vazios do dendê é algo necessário para melhor aproveitamento do conteúdo de celulose e consequente produção de bioetanol e outros produtos de valor agregado. Dessa forma, o propósito deste trabalho foi observar os extratos brutos enzimáticos de basidiomicetos da biodiversidade Cerrado Brasileiro em conjunto com enzimas de fungos filamentosos já consolidados na literatura, de forma a compor um coquetel enzimático capaz de sacarificar o cacho vazio do dendê.

Material e métodos

Biomassa

Cachos vazios de dendê foram triturados e submetidos à secagem a 45 °C por 3 dias e, em seguida, a 60 °C por mais 3 dias. Posteriormente, o material foi acondicionado em saco plástico fechado e armazenado em local seco e protegido da luz.

Microrganismos

Foram selecionadas sete espécies de basidiomicetos pertencentes à coleção FPB (Embrapa Agroenergia), a partir de cultivos *in vitro* sobre o cacho vazio triturado e borra do decantador do óleo de dendê. Então, foram cultivados em potes de 200 mL contendo a fibra do cacho vazio de dendê (FC) (30g) ou em uma mistura composta de fibra do cacho vazio mais borra do decantador (FCB) (9:1). A umidade foi ajustada para aproximadamente 70% com adição de água destilada. Na sequência, os potes foram fechados e autoclavados a 121 °C durante 1 hora. Após resfriamento, os frascos foram inoculados asépticamente em câmara de fluxo vertical com 10 discos miceliais de 7 mm de cada fungo e, posteriormente, mantidos a 28 °C por 30 dias em câmara de crescimento até completa colonização.

Obtenção dos extratos enzimáticos

A biomassa colonizada pelos basidiomicetos foi lavada com uma solução de Tritox X-100 0,1% na proporção de 1:10. O extrato foi filtrado com gaze, centrifugado a 10.000 rpm, 4 °C, durante 10 minutos, e o sobrenadante denominado extrato enzimático, recolhido em tubos Falcons de 50 mL. Para obtenção dos extratos dos ascomicetos *Aspergillus aculeatus* F-50 [NBRC108796] e *Trichoderma reesei* ATCC®60787™, os mesmos foram cultivados em meio de cultura líquido (MANDELS; WEBER, 1969) (modificado – suplementado com 2,5% de borra do decantador de dendê moída) (ROMERO-PELAEZ, 2017). Foram utilizados seis discos miceliais de 7 mm de *T. reesei* e *A. aculeatus* separadamente para o cultivo submerso, que teve duração de 7 dias. Decorrido esse tempo, os cultivos foram filtrados com gaze e centrifugados a 10.000 rpm, 4 °C, durante 10 minutos, e os sobrenadantes recolhidos e armazenados em geladeira até utilização no preparo da mistura. Para realização dos ensaios, foi determinado o teor de proteínas solúveis totais de cada extrato de cada fungo pelo método BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit Thermo scientific™) (SMITH et al., 1985).

Hidrólise da fibra pré-tratada

Para hidrólise, a fibra do cacho vazio de dendê foi pré-tratada pelo processo físico-químico de auto-hidrólise (hidrotérmico) em reator de alta pressão (Parr Illinois EUA), com relação sólido/líquido de 1:10, temperatura de 180 °C durante 40 minutos. Em seguida, utilizando placas de 24 células tipo *Deep Well*, pesou-se 0,45 g de fibra pré-tratada por auto-hidrólise em cada poço, o que corresponde a 5% de biomassa sólida juntamente com um volume de 6,460 mL da mistura enzimática constituída de extratos de basidiomicetos (20 mg de proteína) juntamente com extratos de *Trichoderma reesei* (13 mg de proteína), de *Aspergillus aculeatus* (7 mg de proteína), tampão acetato de sódio/ ácido cítrico 0,3 M pH 5,0 e água destilada. As placas foram seladas com filme adesivo e mantidas em shaker a 250 rpm, 50 °C, durante 24 h. A

concentração de glicose foi determinada pelo método glicose oxidase (Kit BIOCLIN[®]) (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 1995).

Resultados e discussão

Os resultados mostraram que a mistura de extratos de basidiomicetos juntamente com os extratos dos ascomicetos teve efeito positivo na hidrólise da celulose do cacho vazio de dendê, uma vez que a soma da concentração de glicose gerada nas hidrólises usando Tr + Aa ou os extratos brutos dos basidiomicetos separadamente foi menor do que quando combinados

As adições dos extratos FC 109, FC 115 e FC 116 tiveram efeito positivo quando combinadas com Tr e Aa, levando à liberação de 2,73 g L⁻¹, 2,38 g L⁻¹ e 2,58 g L⁻¹ de glicose respectivamente. Os menores teores de glicose observados foram produzidos pelos tratamentos FC 26 e FCB 115 (0,64 g L⁻¹) (Gráfico 1). Também foi observado que os fungos FCB 102, FC 104 e FCB 116, juntamente com *T.reesei* e *A. aculeatus*, apresentaram baixa liberação de glicose quando comparados com o controle, indicando que esses fungos não tiveram efeito positivo na mistura.

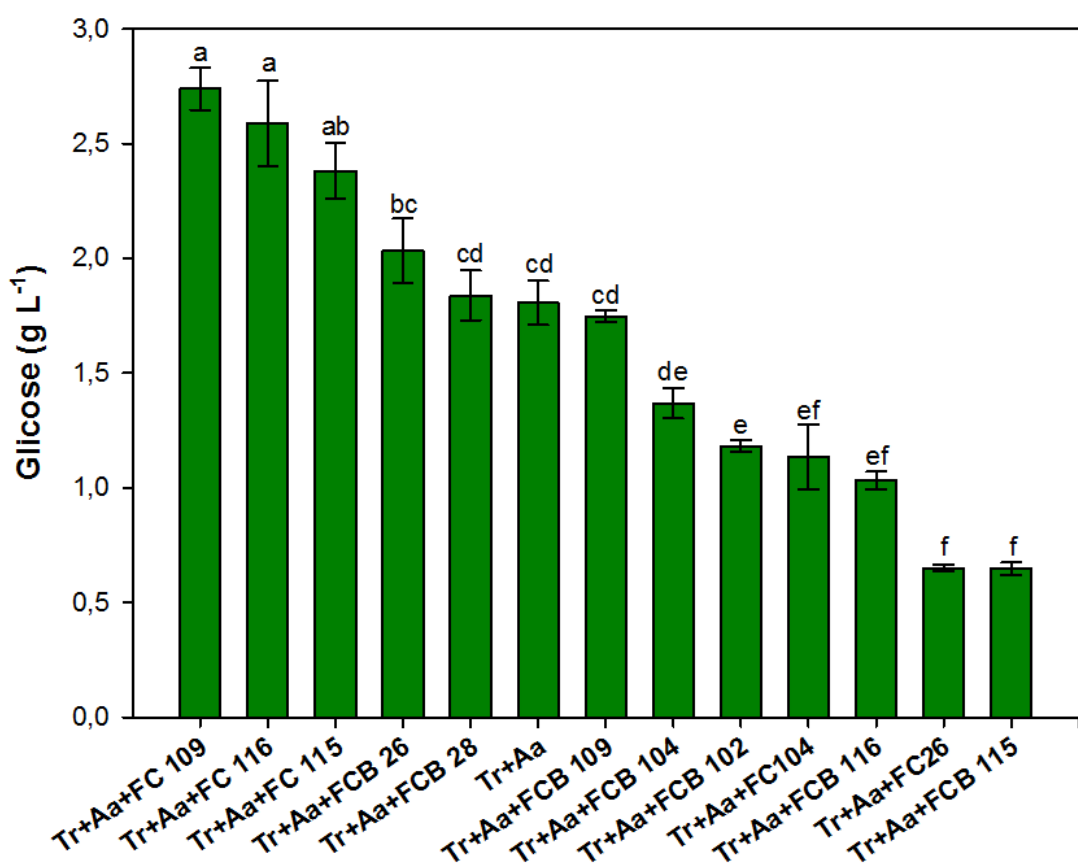


Figura 2. Teores de Glicose liberados após 24 horas de hidrólise enzimática utilizando misturas de enzimas Tr (*Trichoderma reesei* ATCC60787) com Aa (*Aspergillus aculeatus* F-50 [NBRC108796] mais extratos brutos de basidiomicetos (FPB). Legenda: FC (Fibra do cacho), FCB (Fibra do cacho mais Borra do decantador). Os números que sucedem as siglas correspondem aos códigos dos fungos utilizados. Letras diferentes evidenciam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Os fungos filamentosos como *Trichoderma reesei* são muito estudados e utilizados na indústria para produção de enzimas (celulases); contudo, o pool de enzimas obtido a partir de seu cultivo submerso é pobre em alguns componentes. Com base nisso, algumas pesquisas têm buscado a melhoria dessas enzimas por meio de cocultivos com outras espécies de fungos (AHAMED; VERMETTE, 2008; BERLIN et al., 2007).

A produção de enzimas capazes de auxiliar na quebra da lignina tem incentivado a identificação e caracterização de outras espécies de basidiomicetos com potencial para produção de enzimas lignolíticas bem como de enzimas acessórias que agem sinergicamente com celulases e hemicelulases (MORGENSTERN et al., 2014). A lignina que fica adsorvida sobre a fibra após a explosão a vapor, é fator que pode dificultar a ação de enzimas celulolíticas, sugerindo um incremento de ligninases ou oxidases nos coquetéis enzimáticos. Com base nisso e nos resultados obtidos no presente trabalho, observamos que houve um efeito sinérgico entre os extratos de alguns basidiomicetos quando combinados com extratos de *T. reesei* e *A. aculeatus*, sugerindo uma interação positiva entre enzimas hidrolíticas desses fungos e enzimas oxidativas ou acessórias daqueles.

Um recente estudo evidenciou a importância da utilização de diferentes coquetéis enzimáticos para diferentes biomassas lignocelulósicas. A atuação diferencial de enzimas acessórias como as LPMOs, enzima que faz parte do arcabouço de muitos basidiomicetos sugere que o tipo de resíduo lignocelulósico também é fator limitante na hidrólise por meio de misturas, fato que ainda precisa ser elucidado (CHYLENSKI et al., 2017).

Também é preciso reportar o fato de que o tipo de biomassa lignocelulósica pode proporcionar diferenças na expressão de genes nos basidiomicetos levando à produção/supressão de enzimas que atuam sobre a degradação da celulose, hemicelulose e lignina (WYMELENBERG et al., 2011). Os resultados obtidos reforçam em parte essa afirmação, pois, como pôde ser observado, os extratos agiram de modo diferente, o que levanta a hipótese de que a formulação (com ou sem borra do decantador) ou a relação espécie/substrato pode ter ocasionado diferenças na composição de enzimas. Mas, para que isso se confirme, são necessárias abordagens de transcriptômica, metabolômica e proteômica para elucidar as alterações e efeitos sinérgicos observados nos extratos utilizados.

Conclusões

A adição de alguns extratos obtidos a partir da fermentação em estado sólido em fibra do cacho vazio de dendê apresentou efeito positivo na liberação de glicose pela quebra da celulose, quando combinados com extratos de *A. aculeatus* e *T. reesei*. Isso indica uma possibilidade para desenvolvimento de coquetéis para o pré-tratamento de fibra do cacho do dendê e de outras biomassas lignocelulósicas. Contudo, são necessários mais estudos a fim de obter misturas enzimáticas que alcancem rendimentos expressivos de açúcares fermentáveis, o que levaria, por exemplo, à geração de produtos de maior valor agregado na cadeia produtiva do dendê.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Capes, pela concessão de bolsas de estudo, e à Embrapa Agroenergia, pelos materiais e equipamentos disponibilizados durante a execução do trabalho.

Referências

- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, 2011.
- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 1, p. 41-46, 2008.
- BERLIN, A.; MAXIMENKO, V.; GILKES, N.; SADDLER, J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 287-296, 2007.
- CHIESA, S.; GNANSOUNOU, E. Use of empty fruit bunches from the oil palm for bioethanol production: a thorough comparison between dilute acid and dilute alkali pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 355-364, 2014.
- CHYLENSKI, P.; FORSBERG, Z.; STÅHLBERG, J.; VÁRNAI, A.; LERSCH, M.; BENGTSSON, O.; Eijsink, V. G. Development of minimal enzyme cocktails for hydrolysis of sulfite-pulped lignocellulosic biomass. **Journal of Biotechnology**, v. 246, p. 16-23, 2017.
- DASHTBAN, M.; SCHAFT, H.; SYED, T. A.; Qin, W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, n. 1, p. 36-50, 2010.
- GUPTA, V. G.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; UPADHYAY, R. S.; DRUZHININA, I.; TUOHY, M. **Biotechnology and biology of Trichoderma**. Amsterdam: Elsevier, 2014.
- MALAYSIAN PALM OIL BOARD. **Malaysian palm oil industry**. Disponível em: <http://www.palmoilworld.org/about_malaysian-industry.html>. Acesso em: 10 fev. 2017.
- MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. In: HAJNY, G. J.; REESE, E. T. **Cellulases and their applications**. Washington, DC: ACS Publications, 1969. p. 391-414. (Advances in chemistry, v. 95).
- MORGENSTERN, I.; POWLOWSKI, J.; TSANG, A. Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: from dysfunctional GH61 family to powerful lytic polysaccharide monooxygenase family. **Briefings in Functional Genomics**, v. 13, n. 6, p. 471-481, 2014.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (Estados Unidos). **How to define, determine, and utilize reference intervals in the clinical laboratory, approved guideline**. Villanova, 1995. (NCCLS publication C28-A).
- PARK, J. M.; OH, B. R.; SEO, J. W.; HONG, W. K.; YU, A.; SOHN, J. H.; KIM, C. H. Efficient production of ethanol from empty palm fruit bunch fibers by fed-batch simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 8, p. 1807-1814, 2013.
- PHILP, J. Global Perspectives on the Global Bioeconomy. In: AGRICULTURAL OUTLOOK FORUM, 91., 2015, Virginia, USA. **Smart Agriculture in the 21st Century**. Washington, DC: USDA, 2015.
- ROMERO-PELAEZ, R. **Enzimas lignocelulolíticas de basidiomicetos cultivados em biomassas vegetais oriundas da agroindústria do dendê e obtenção de açúcares fermentescíveis**. 2017. 142 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Tocantins, TO. Orientador Embrapa Agroenergia: Félix Gonçalves de Siqueira.

SAHA, B. C.; QURESHI, N.; KENNEDY, G. J.; COTTA, M. A. Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 109, p. 29-35, 2016.

SINGH, R.; KRISHNA, B. B.; KUMAR, J.; BHASKAR, T. Opportunities for utilization of non-conventional energy sources for biomass pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 398-407, 2016.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

WYMELENBERG, A. V.; GASKELL, J.; MOZUCH, M.; BONDURANT, S. S.; SABAT, G.; RALPH, J.; KERSTEN, P. J. Significant alteration of gene expression in wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium* by plant species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4499-4507, 2011.