

Lignocelulases de basidiomicetos cultivados em biomassas vegetais residuais da agroindústria do dendê

Ruben Romero Peláez¹, Carla M. Camelini², Arailde Fontes Urben³, Cristiane Vieira Helm⁴, Thais Demarchi Mendes⁵, Simone Mendonça⁶, Félix Gonçalves de Siqueira⁷

Resumo

Os fungos de podridão-branca produzem enzimas extracelulares capazes de modificar os componentes de celulose, hemicelulose e lignina da parede celular vegetal. Foi avaliada a capacidade de produção de enzimas lignocelulolíticas (lignocelulases) por basidiomicetos, também conhecidos como fungos de podridão-branca ou do inglês white-rot fungi (WRF), quando cultivados em fermentação estado sólido (FES) em formulações contendo três resíduos lignocelulósicos da agroindústria do dendê. Foram avaliadas 60 cepas de basidiomicetos quanto à taxa de crescimento micelial (mm.dia^{-1}) e densidade micelial em ágar contendo os resíduos lignocelulósicos. Os macrofungos *Lepiota fuscipes* CC402, *Trametes versicolor* CC124, *Panus lecontei* CC40, *Ganoderma lipsiense* CC36 e *Oudemansiella canarii* CC37 tiveram as melhores taxas de crescimento. Esses WRFs foram cultivados em FES em frascos (tipo erlenmeyer) contendo 30 g (massa seca) de biomassas lignocelulósicas de dendê em três formulações diferentes: F1) cacho vazio 100% (CV100); F2) fibra de prensagem 100% (FP100); e F3) mistura de cacho, fibra e borra do decantador (CV60:FP30:BD10). Os extratos enzimáticos, obtidos a partir da FES, foram avaliados quanto às atividades celulolíticas, hemicelulolíticas, lignolíticas, lipolíticas e proteolíticas. Os extratos obtidos do cultivo dos WRFs apresentaram maiores atividades para proteases e enzimas oxidativas, tais como peroxidases totais, lacases e manganês peroxidases, do que celulases e hemicelulases, nos três

¹ Biólogo, mestrando em Biotecnologia, Universidade Federal de Tocantins, ruben.pelaez@coloaborador.embrapa.br

² Farmacêutica tecnóloga de alimentos, doutora em Biotecnologia, carla.camelini@colaborador.embrapa.br

³ Bacharel em História Natural, doutora em Biologia, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, arailde.urben@embrapa.br

⁴ Química Industrial, doutora em Ciência dos Alimentos, pesquisadora da Embrapa Florestas, cristiane.helm@embrapa.br

⁵ Biólogo, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁶ Farmacêutica, doutora em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

⁷ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

tipos de formulações de substratos, com melhor desempenho da formulação mista (F3). Os extratos brutos fúngicos, pela presença de enzimas lignolíticas e peroxidases que têm atuação na deslignificação e complexos fenólicos, podem ser empregados na formulação de coquetéis enzimáticos (*enzyme blend*) para desconstrução de biomassa vegetal.

Introdução

O óleo de palma ou óleo de dendê (Brasil) é o óleo vegetal mais produzido no mundo, sendo utilizado para obtenção de biodiesel, cosméticos e na indústria de alimentos. A cultura agrônômica dessa palmeira tem alta produtividade (4 a 5,5 toneladas de óleo por hectare por ano), com menor custo de produção em comparação com outros óleos vegetais. Durante o processo agroindustrial, apenas 10% de todo cacho com as sementes são convertidos em óleo, gerando assim um volume significativo de resíduos lignocelulósicos. Esses resíduos podem ser utilizados na obtenção de produtos de valor agregado, tais como biocombustíveis (etanol celulósico), químicos (monossacarídeos, ácidos orgânicos, compostos bioativos), ração animal ou enzimas lignocelulolíticas, por exemplo.

Os white-rot fungi (WRFs) são reconhecidos pela capacidade de degradar os componentes da parede celular vegetal, principalmente a lignina, por meio da atuação de enzimas como lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases. O uso desses macrofungos em processos de pré-tratamento ou na produção dessas enzimas pode servir para deixar a celulose mais acessível às celulasas e, assim, obter maiores rendimentos de glicose na hidrólise enzimática de biomassa vegetal.

O objetivo deste trabalho foi utilizar os resíduos lignocelulósicos da agroindústria do óleo de palma (cacho vazio, fibra de prensagem e borra do óleo de dendê gerada no decantador, aqui chamada de borra do decantador) como substrato para o crescimento de macrofungos (WRFs) e produção de lignocelulasas.

Materiais e métodos

Microrganismos

Os macrofungos utilizados neste trabalho pertencem às coleções de microrganismos da Embrapa Agroenergia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Embrapa Florestas. A manutenção e preservação das cepas foi

feita por repicagens regulares em meio BDA (Batata dextrose ágar) em placas Petri e incubadas a 28 °C. Placas totalmente colonizadas foram armazenadas em câmara fria (4 °C).

Capacidade de crescimento micelial dos macrofungos

Foram avaliados 60 macrofungos quanto à capacidade de crescimento em meios a base de biomassa de dendê. Cada macrofungo foi avaliado individualmente em ágar contendo 10% (m/v) de cacho vazio (CV), fibra de prensagem (FP) ou borra do decantador (BD) como único substrato. Os meios foram esterilizados (121 °C, 30 minutos), por duas vezes (tindalização), com intervalo de 24 horas, antes de serem vertidos nas placas. As placas foram inoculadas, no ponto central, com um disco de 5 mm de diâmetro (massa micelial). O crescimento micelial foi avaliado pela medição do diâmetro micelial nos tempos de 3, 5, 7 e 9 dias de cultivo a 28 °C (Figura 1). Também foram registradas as características morfológicas quanto à densidade micelial (qualitativamente).

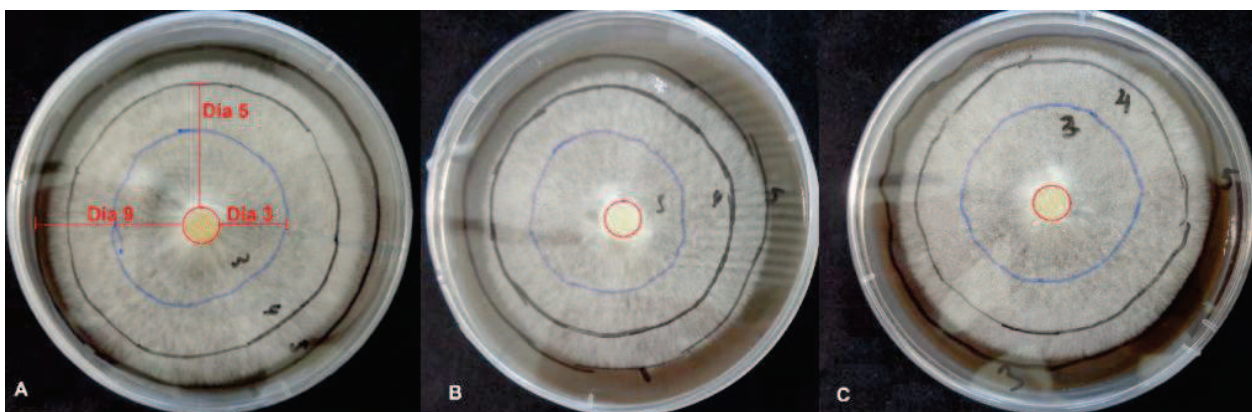


Figura 1. Crescimento micelial de *Panus lecomtei* CC40 nos três substratos à base de ágar + biomassa vegetal residual da agroindústria de extração de óleo de dendê: Borra do decantador (A); Fibra de prensagem (B); Cacho vazio (C).

Macrofungos: cultivos em fermentação em estado sólido (FES)

Em frascos de vidro, foram adicionados 30 g (massa seca) de resíduos lignocelulósicos (biomassa residual da agroindústria do óleo de dendê) e água destilada para atingir ~65% de umidade. As formulações do meio de cultivo foram: CV 100% (F1); FP 100% (F2); e, CV/FP/BD relação 6:3:1 (F3). Cada frasco foi inoculado com cinco discos de 5 mm de massa micelial de cada macrofungo (cinco macrofungos selecionados previamente) e transferidos para incubação a 28 °C por 15 dias.

Atividades enzimáticas

Em frascos Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 10 g do sólido fermentado (micélio crescido nas formulações de biomassas vegetais) e solução Triton X100 0,1%, em relação 1:5 (massa úmida/volume). Os frascos foram submetidos a agitação em shaker a 200 rpm, 5 °C por 40 minutos. O conteúdo foi transferido para tubos de 50 mL e centrifugados por 10 minutos, 10.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante, agora denominado extrato enzimático, foi transferido para tubos de 50 mL com 0,02% de azida sódica. Os extratos enzimáticos foram usados para avaliação das atividades enzimáticas. As atividades de FPase (celulases totais), endoglicanase, xilanase e poligalacturonase foram determinadas por ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a 540 nm, usando-se como substratos papel filtro Whatman®, carboximetilcelulose, xilana (beechwood) e ácido poligalacturônico, respectivamente. A atividade beta-glicosidase foi determinada com base em Ghose (1987) com celobiose como substrato. As atividades de lacase e peroxidases totais foram determinadas pela oxidação de ABTS a 420 nm sem e com presença de H₂O₂ (WOLFENDEN; WILSONS, 1982). A lignina peroxidase e as peroxidases totais foram determinadas pela oxidação do álcool veratrílico a 310 nm. A manganês peroxidase foi determinada pela oxidação de MnSO₄ em presença de H₂O₂. A atividade proteolítica foi determinada com azocaseína como substrato. As lipases foram determinadas por titulação dos ácidos graxos liberados, usando como substrato óleo de oliva (DIAZ et al., 2006). As proteínas solúveis totais foram quantificadas pela metodologia do ácido bicinconínico (BCA). Todas as atividades foram expressas em Unidades internacionais (UI) por mL em função da liberação dos produtos de cada reação.

Resultados e discussão

Crescimento micelial

Dentre os 60 basidiomicetos testados, 55 cresceram nos distintos meios de cultura contendo ágar e os resíduos lignocelulósicos como substrato. Os melhores resultados quanto ao crescimento micelial foram observados para os macrofungos *L. fuscipes* CC402 em BD, *G. lipsiense* CC36 em CV e *T. versicolor* CC124 em FP com a medida de 8,4 mm.dia⁻¹. Com base em dados quantitativos (crescimento) e qualitativos (densidade micelial), cinco cepas apresentaram

melhores resultados (*L. fuscipes* CC402, *T. versicolor* CC124, *G. lipsiense* CC36, *O. canarii* CC37 e *P. lacomtei* CC40) e foram selecionadas para cultivo em estado sólido contendo como substrato apenas os resíduos lignocelulósicos para então determinar as atividades enzimáticas.

Atividades enzimáticas

Os cinco macrofungos mostraram atividade enzimáticas residuais para celulasas totais nas três formulações e não houve diferenças significativas ($p < 0.005$), conforme apresentado nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1. Perfil enzimático de extrato obtido de cultivo de cinco basidiomicetos em Fermentação Estado Sólido (FES) usando cacho vazio do dendê (F1) como substrato, durante 15 dias, com incubação a 28 °C e ~65% de umidade. Os valores estão apresentados em U/mL para atividades enzimáticas e em mg/mL para proteínas totais, seguido dos valores do desvio padrão.

Enzimas	<i>G. lipsiense</i> CC36	<i>O. canarii</i> CC37	<i>P. lacomtei</i> CC40	<i>T. versicolor</i> CC124	<i>L. fuscipes</i> CC402
Celulasas totais	0,09 ± 0,03	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,03
Endoglicanase	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,04 ± 0,03
β-glicosidase	ND	ND	ND	ND	ND
Xilanase	ND	ND	ND	ND	ND
Peroxidase totais	ND	10,76 ± 2,40	12,5 ± 0,00	20,83 ± 0,00	26,04 ± 2,08
Lacase	ND	9,37 ± 2,75	4,16 ± 0,00	31,25 ± 0,00	12,5 ± 0,00
Manganês Pox	0,40 ± 0,09	0	28,46 ± 0,35	6,09 ± 0,28	31,37 ± 0,33
Lignina Pox	ND	ND	ND	ND	ND
Oxidases (AV)	ND	ND	ND	ND	ND
Protease	32,06 ± 1,14	33,39 ± 0,76	44,99 ± 4,26	6,94 ± 0,96	3,54 ± 1,96
Lipase	ND	ND	ND	ND	ND
Poligalacturonase	ND	ND	ND	ND	ND
Proteína total (BCA)	3,05 ± 0,03	2,8 ± 0,03	3,72 ± 0,07	2,83 ± 0,05	3,10 ± 0,03

ND: não detectada; Pox: peroxidase; BCA: ácido bicinconínico; AV: álcool veratrílico.

As atividades celulolíticas foram baixas em comparação à literatura. Por outro lado, é de interesse a busca de fungos com alta especificidade na degradação oxidativa da parede celular.

As atividades oxidativas relacionadas ao processo de deslignificação mostraram atividades enzimáticas com diferenças significativas para alguns macrofungos nas diferentes formulações. Os extratos enzimáticos dos macrofungos *P. lacomtei* CC40, *T. versicolor* CC124 e *L. fuscipes* CC402 apresentaram as maiores atividades para as oxidases e peroxidases; *T. versicolor* CC124 obteve a maior atividade para lacase (44,79 U/mL) e *L. fuscipes* CC402 para manganês peroxidase (48,71 U/mL), ambas na formulação F3. O *Ganoderma lipsiense* CC36 não apresentou atividade para lacase em nenhuma das formulações. Atividades de beta-glicosidase, xilanase, lignina peroxidase, oxidases álcool veratrílico, lipase e poligalacturonase não foram observadas em nenhum dos macrofungos nas três formulações de meios (Tabelas 1 a 3).

Tabela 2. Perfil enzimático de extrato obtido de cultivo de cinco basidiomicetos em Fermentação Estado Sólido (FES) usando fibra de prensagem do dendê (F2) como substrato, durante 15 dias, com incubação a 28 °C e ~65% de umidade. Os valores estão apresentados em U/mL para atividades enzimáticas e em mg/mL para proteínas totais, seguido dos valores do desvio padrão.

Enzimas	<i>G. lipsiense</i> CC36	<i>O. canarii</i> CC37	<i>P. lacomtei</i> CC40	<i>T. versicolor</i> CC124	<i>L. fuscipes</i> CC402
Celulase total	0,07 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,01
Endoglicanase	0,08 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,00
β-glicosidase	ND	ND	ND	ND	ND
Xilanase	ND	ND	ND	ND	ND
Peroxidase totais	ND	ND	6,94 ± 0,00	26,04 ± 2,08	6,25 ± 0,00
Lacase	ND	4,17 ± 0,00	4,16 ± 0,00	31,25 ± 4,16	4,16 ± 0,00
Manganês Pox	0,05 ± 0,01	0	9,78 ± 0,29	6,09 ± 0,29	32,99 ± 0,56
Lignina Pox	ND	ND	ND	ND	ND
Oxidases (AV)	ND	ND	ND	ND	ND
Protease	40,95 ± 1,89	31,03 ± 0,93	42,98 ± 3,09	29,36 ± 1,57	17,98 ± 1,63
Lipase	ND	ND	ND	ND	ND
Poligalacturonase	ND	ND	ND	ND	ND
Proteína total (BCA)	1,48 ± 0,01	1,56 ± 0,05	1,82 ± 0,04	3,07 ± 0,02	1,57 ± 0,03

ND: não detectada; Pox: peroxidase; BCA: ácido bicinconínico; AV: álcool veratrílico.

A degradação seletiva de lignina em função de alta atividade lacase em *T. versicolor* CC124 já foi observada por Zhu et al. (2011), usando palha de milho

como substrato. *L. fuscipes* CC402 ainda não foi reportado na literatura em relação a pré-tratamentos de biomassas lignocelulósicas e atividades enzimáticas.

No presente trabalho, o extrato de *L. fuscipes* CC402 apresentou alta atividade de peroxidases totais, lacases e proteases, indicando que esse fungo, ainda pouco explorado, pode ser melhor estudado como fonte de enzimas oxidativas. Os extratos dos cinco macrofungos, nas três formulações de substratos, apresentaram atividade proteolítica. Os maiores resultados foram obtidos nos cultivos com formulação (F3), nos quais foram obtidos valores próximos a 50 U/mL, com exceção do *L. fuscipes* CC402, que apresentou atividade 25 U/mL, mas superior às outras duas formulações.

Tabela 3. Perfil enzimático de extrato obtido de cultivo de cinco basidiomicetos em Fermentação Estado Sólido (FES) usando mistura de cacho vazio, fibra de prensagem e borra do decantador do dendê em uma relação 6:3:1 (F3) como substrato, durante 15 dias, com incubação a 28 °C e ~65% de umidade. Os valores estão apresentados em U/mL para atividades enzimáticas e em mg/mL para proteínas totais, seguido dos valores do desvio padrão.

Enzimas	<i>G. lipsiense</i> CC36	<i>O. canarii</i> C37	<i>P. lacomtei</i> CC40	<i>T. versicolor</i> CC124	<i>L. fuscipes</i> CC402
Celulase total	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,06 ± 0,04	0,07 ± 0,01
Endoglicanase	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,06 ± 0,04	0,11 ± 0,04	0,05 ± 0,03
β-glicosidase	ND	ND	ND	ND	ND
Xilanase	ND	ND	ND	ND	ND
Peroxidase totais	ND	14,93 ± 2,40	8,33 ± 0,00	37,5 ± 0,00	16,67 ± 0,00
Lacase	ND	16,66 ± 2,16	8,33 ± 0,00	44,79 ± 2,08	8,33 ± 0,00
Manganês Pox	0,45 ± 0,11	2,54 ± 0,24	41,05 ± 0,43	8,05 ± 0,50	48,71 ± 0,43
Lignina Pox	ND	ND	ND	ND	ND
Oxidases (AV)	ND	ND	ND	ND	ND
Protease	51,32 ± 5,22	50,67 ± 7,63	54,79 ± 1,85	47,78 ± 5,53	25,51 ± 7,13
Lipase	ND	ND	ND	ND	ND
Poligalacturonase	ND	ND	ND	ND	ND
Proteína total (BCA)	3,59 ± 0,27	3,73 ± 0,29	4,06 ± 0,11	3,78 ± 0,16	2,46 ± 0,12

ND: não detectada; Pox: peroxidase; BCA: ácido bicinconínico; AV: álcool veratrílico.

Conclusões

Os basidiomicetos são macrofungos que podem ser explorados quanto ao potencial de produção de algumas ligninases e proteases quando cultivados em biomassas lignocelulósicas da agroindústria do dendê como fonte nutritiva. Essas enzimas podem ser utilizadas em coquetéis enzimáticos empregados na desconstrução de biomassa vegetal para obtenção de açúcares solúveis. São enzimas atuantes na degradação da lignina ou componentes fenólicos/peróxidos de hidrogênio liberados nas etapas de pré-tratamento.

Referências

- DIAZ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 5, p. 1042-1050, 2006.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxon, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of 2 extracellular H₂O₂- dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 169, n. 2, p. 247-250, 1984.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical biochemistry**, Washington, DC, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- WOLFENDEN, B.; WILSON, R. Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, Londres, n. 7, p. 805-812, 1982.
- ZHU, Y; ZHANG, H; ZHANG, Y; HUANG, F. Lignocellulose degradation, enzyme production and protein enrichment by *Trametes versicolor* during solid-state fermentation of corn stover. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 10, n. 45, p. 9182-9192, 2011
- TIEN, M.; KIRK, T. T. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences**, Washigton, DC, v. 81, n. 8, p. 2280-2284, 1984.