

AVALIAÇÃO DO TEMPO DE HIDRÓLISE DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS DE FUNGOS BASIDIOMICETOS

Leonardo de Castro Brandam¹, KJeber Hoffmann*, -Cristiane Vieira Helm, -Edson Alves de Uma, -Washington Luiz Esteves Magalhães

¹Graduando de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia Univesidade Federal. do Plmmá, Curitiba - Paraná, estagiário da Embrapa Florestas, Colombo- Paraná,

** Pesquisador da Embrapa Florestas, Caiu Postal 319, 83411-000, Colombo, PR

Email: leobrandani@gmail.com

Resumo

Madeira pré-tratada de *Eucalyptus benthamii* foi enzimicamente hidrolisada com extratos produzidos por basidiomicetos dos gêneros *Ganoderma* e *Lentinula* da coleção de macrofungos da *Embrapa Florestas*. Estes isolados têm um grande potencial para produção de enzimas oxidantes e hidrolíticas envolvidas na degradação de lignina e celulose. A produção das enzimas foi realizada por fermentação em meio líquido obtendo-se um extrato enzimático para cada isolado. Os três pré-tratamentos aplicados a madeira foram com licor verde, licor verde combinado com etanol e hidróxido de sódio combinado a etanol. Dois tempos de hidrólise foram testados, 1 hora de exposição e 24 horas de exposição. Foram então quantificados teor de açúcares redutores dos extratos filtrados. O uso do isolado *Ganoderma lucidum* 33, resultou nos maiores valores para os teores de açúcares redutores para todos os pré-tratamentos aplicados. As diferenças entre os dois tempos de hidrólise foram pequenas, em muitos casos com maiores teores para os extratos obtidos com 1 hora de hidrólise. Entretanto, as taxas de conversão da celulose em açúcares redutores foram baixas para todos os isolados. Novas condições para a obtenção de enzimas hidrolíticas a partir dos isolados deste estudo deverão ser desenvolvidas para otimização do processo e obtenção de uma conversão maior da celulose.

Abstract

EVALUATION OF THE HYDROLYTIC ENZYME ACTIVITY OF LIGNOCELLULOLYTIC FUNGUS BASIDIOMYCETES OF THE GENERA GANODERMA AND LENTINULA

Pre-treated wood of *Eucalyptus benthamii* were enzymatically hydrolyzed with extract produced from Basidiomycetes of genera *Ganoderma* and *Lentinula* from the *Embrapa Florestas* macro fungi Collection. These isolates have a great potential for production of oxidants and hydrolytic enzymes involved in the degradation of lignin and cellulose. The production of enzymes was carried out by fermentation in liquid medium to yield an enzyme extract for each isolate. The wood pre-treatments were green liquor, green liquor combined with ethanol and sodium hydroxide combined with ethanol. Two hydrolysis times were tested, 1 hour exposure and 24 hours of exposure. Were then quantified reducing sugar content of the extracts filtered. The use of *Ganoderma lucidum* isolate 33, obtained the best results in reducing sugars for all pre-treatments applied. The differences between the two hydrolysis times were small, in many cases with higher concentrations of the extracts obtained with 1 hour of hydrolysis. However, rates of conversion of cellulose into sugars were low for all isolates. New conditions for obtaining hydrolytic enzymes from these isolates of this study should be developed to process optimization and to obtain a higher conversion of cellulose.

INTRODUÇÃO

Com a crescente preocupação na obtenção de energia limpa e renovável, muitos trabalhos em bioenergia têm sido desenvolvidos com a finalidade de obterem-se ganhos substanciais para o meio ambiente.

Devido ao grande impacto ambiental que o uso contínuo de combustíveis fósseis apresenta, a produção de etanol de 2^a geração, a partir de material lignocelulósico, tem sido muito explorada, mostrando um potencial ambiental, econômico e social.

A biomassa lignocelulósica, constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, pode ser submetida a pré-tratamentos com a finalidade de facilitar a hidrólise enzimática que por sua vez pode converter açúcares redutores em etanol. Entretanto, faz-se necessário o ajuste das melhores condições para obtenção de um

pré-tratamento adequado, bem como a obtenção de enzimas hidrolíticas com atividade alta e custo baixo, para que todo o processo seja viável economicamente.

Os pré-tratamentos podem ser classificados como físicos, químicos, físico-químicos e biológicos, conforme o agente que atua na alteração estrutural da matéria prima (SCHLITFLER. & PEREIRA JÚNIOR, 2008). O objetivo de qualquer tecnologia de pré-tratamento é alterar ou remover impedimentos à hidrólise quer sejam estruturais ou de composição, de forma a aumentar a taxa da hidrólise enzimática e os rendimentos de açúcares fermentescíveis a partir da celulose ou da hemicelulose (MOSIER et al. 2005).

Os Fungos filamentosos da classe dos basidiomicetos têm propriedades fisiológicas, enzimáticas e bioquímicas que os permitem se destacar entre os organismos que podem crescer em substratos lignocelulósicos. Os gêneros *Ganoderma* e *Lentinula* pertencem a classe dos basidiomicetos, compreendendo uma classe de organismos com uma capacidade de degradar a madeira pela ação de suas enzimas oxidativas (peroxidases e lacases) e hidrolíticas (beta-glicosidases e celulasas) (Fernandes et al., 2005).

Este trabalho está inserido no projeto de "Florestas Energéticas na Matriz de Agroenergia Brasileira" e foi iniciado em abril de 2010, sendo um projeto que está no início e tem um grande potencial biotecnológico. Dentro dessa visão em buscar soluções inovadoras para o uso dos resíduos lignocelulósicos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da síntese de enzimas lignocelulolíticas de basidiomicetos da coleção de culturas da *Embrapa Florestas*, tendo em vista a hidrólise, em diferentes tempos de exposição, de substratos de madeira na conversão a etanol de segunda geração.

MATERIAL E MÉTODOS

Cinco isolados, três do gênero *Ganoderma* e dois do gênero *Lentinula* (Tabela 1), mantidos em método Castellani contendo água destilada, foram replicados em placas de Petri com meio PDA a 25 ± 1 °C e incubados por 7 dias. Após o crescimento, foram transferidos para o meio Socarean, onde permaneceram por mais 7 dias à 25 ± 1 °C,

Tabela 1 –Basidiomicetos avaliados da coleção de culturas da *Embrapa Florestas*. Evaluated basidiomycetes from the culture collection of *Embrapa Florestas*

Registro CNPF	Isolado
0027	<i>Lentinula edodes</i>
0029	<i>Lentinula edodes</i>
0020	<i>Ganoderma lucidum</i>
0033	<i>Ganoderma lucidum</i>
0039	<i>Ganoderma lucidum</i>

Para induzir a produção de enzimas hidrolíticas, os isolados foram cultivados em um meio sintético, o meio Socarean, composto por: (NaNO₃): 3,0 g"L⁻¹; K₂HPO₄: 1,0 g"L⁻¹; MgSO₄: 0,5 gr¹ ; KCl: 0,5 gr¹ ; FeSO₄.7H₂O: 0,01 gL¹ ; ágar: 30,0 g"L⁻¹). Este meio seletivo contém como fonte de carbono e atuantes na indução da produção de celulasas carboximetilcelulose (CMC) e Avicel, ambos na concentração de 5 g"L⁻¹. O pH do meio é ajustado para 5,5.

Para obtenção dos micélios foram retirados 10 discos (plugs com 7mm de diâmetro) do centro de cada placa de Petri, provenientes do meio Socarean, então foram realizadas três etapas. Primeiramente uma fermentação submersa com a finalidade de se obter micélios desenvolvidos. Posteriormente uma etapa que consiste na filtração do meio contendo micélios, para separação do extrato enzimático livre da biomassa. Por último, o extrato é adicionado a amostras de madeira de *Eucalyptus benthamii* triturado, algumas submetidas á pré-tratamentos, para a hidrólise do substrato pelo complexo enzimático.

Na fermentação submersa a composição do meio líquido de cultura foi a mesma das placas contendo meio Socarean, com a exclusão do componente Agar. O pH do meio foi ajustado para 5,5. Foram adicionados aos frascos de Erlenmeyer de 250 mL, 200 mL deste meio, que depois de autoclavados foram inoculados com 5 discos dos respectivos isolados, totalizando 10 Erlenmeyers. Os frascos foram incubados em um agitador, a 25°C, por 7 dias, em duplicata.

Após a fermentação, foi realizada uma filtração para separação dos micélios desenvolvidos e obtenção do extrato enzimático. Foram utilizados funil de Büchner com papel filtro acoplado com Kitassato. O sistema foi submetido à atuação de uma bomba, gerando um sistema de vácuo, aumentando assim a eficiência do processo" Os micélios retidos no papel filtro foram posteriormente congelados e armazenados. Uma fração do extrato

enzimático foi reservada para quantificação do teor de proteínas totais.

Para determinação de proteínas totais foi utilizado o método micro KJELDAHL (ADOLFO LUTZ, 2005). Este método tem uma sensibilidade para detecção de proteínas de 0,5 g.L⁻¹.

Para a hidrólise da madeira foram adicionados em 15 mL de solução de extrato enzimático em 0,5 g de *Eucalyptus benthamii* triturado (granulometria de 0,5 mm) em Erlenmeyers de 100mL. Para cada isolado, cada erlenmeyer e para cada pré-tratamento, foram utilizados três erlenmeyers. Três pré-tratamentos para o eucalipto foram submetidos à hidrólise enzimática: Licor Verde, Licor verde e etanol/ hidróxido de sódio e etanol. Uma amostra de eucalipto não tratada foi utilizada como controle. Além destes tratamentos um segundo teste foi realizado com um resíduo da indústria de papel e celulose. A hidrólise enzimática foi realizada em agitador, 150 rpm, a temperatura de 25 °C e as amostras foram submetidas a duas exposições diferentes com relação ao tempo de hidrólise: 1 hora e 24 horas.

Após as hidrólises enzimáticas, os Erlenmeyers foram retirados do agitador, e as amostras em triplicata foram filtradas em funis de vidro e papel filtro, diretamente em tubos de rosca. O volume do filtrado variou de acordo com o pré-tratamento. O resíduo úmido de eucalipto retido no papel filtro foi descartado e o filtrado armazenado em tubos para posterior avaliação do teor de açúcares redutores. Algumas amostras foram separadas para medição do pH.

Para quantificação de açúcares redutores foi utilizado o método do ácido dinitrosalicílico (DNS). Este método, em meio fortemente alcalino a quente, é baseado na formação de enedióis, derivados de hexoses, que cedem elétrons que reduzem o reagente 3,5- dinitrosalicilato (amarelo forte) a 3-amino-5-salicilato (laranja-marrom forte).

Foi realizada a construção de uma curva de calibração para a determinação da concentração de açúcares redutores. Para isto, foi feita uma solução padrão de glicose. Esta solução consistiu da adição de 45mg de glicose em 25mL de água destilada.

A solução de DNS foi composta por: 10g de DNS dissolvidos em 200mL de NaOH 2N; solução composta de 300g de sal de RocheUe dissolvidos em 500 mL de água destilada. Misturam-se as soluções e promove-se aquecimento por cerca de 40° C para completa dissolução do DNS. Após a dissolução a solução é avolumada em balão volumétrico para 1000mL com água destilada.

A curva padrão foi feita com um gradiente de concentração da solução de glicose (Tabela 2).

Tabela 2- Curva de Calibração para o método DNS. Calibration curve to DNS method

Tubos	Solução de Glicose 10µmol/mL (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (g/L)	DNS (mL)
0	0,0	1,0	0,0	1
1	0,1	0,9	0,18	1
2	0,2	0,8	0,32	1
3	0,3	0,7	0,54	1
4	0,4	0,6	0,72	1
5	0,5	0,5	0,9	1
6	0,6	0,4	1,08	1
7	0,7	0,3	1,26	1
8	0,8	0,2	1,44	1
9	0,9	0,1	1,62	1
10	1,0	0,0	1,8	1

Após a construção da curva de calibração, os tubos foram levados a fervura durante 5 minutos, resfriados a temperatura ambiente e então completados com 13mL de água destilada formando um volume total no tubo de 15mL. A amostra recebe o seguinte procedimento: 1mL de DNS é adicionado a 1mL de amostra. Então os tubos foram levados a fervura por 5 minutos e completados com 13mL de água destilada. Prontos todos os tubos, amostras e curva, os tubos foram levados para leitura em espectrofotômetro com ajuste de leitura para 540 nm. Primeiramente são lidos os tubos da curva de calibração, zerando o equipamento com o tubo zero, e construindo a curva do menos para o mais concentrado. Em seguida são lidos os tubos contendo as amostras. O espectrofotômetro apresenta resultados diretamente em valores concentração (g.L⁻¹).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os pré-tratamentos utilizados foram previamente analisados quanto a parâmetros essenciais para este estudo. A Tabela 3 mostra os teores de celulose e outros parâmetros importantes para esta análise.

Tabela 3- Composição do *Eucalyptus benthamii* com e sem pré-tratamento. Composition of *Eucalyptus benthamii* with or without pretreatment.

Pré-Tratamento	Insolúveis (%)	Extrativos (%)	Lignina (%)	Relação S/G	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Cinzas (%)
Branco	100	5,52	28,4	2,78	46,7	26,6	0,028
ETNa	87,4	0,64	24,6	2,93	59,4	9,3	0,138
LV	77,7	0,79	22,5	3,48	57,6	13,8	0,109
LVETOH	77	0,99	22,9	3,45	59,5	13,4	0,14

"Legenda dos pré-Tratamentos para as tabelas apresentadas: Branco- Sem tratamento; ETNa- Etanol e NaOR; LV- Licor Verde; LVETOR- Licor verde e etanol.

Observou-se que os teores de celulose disponível, variaram de acordo com o pré-tratamento aplicado, tendo como maior teor de celulose disponível o eucalipto tratado com licor verde combinado com etanol. Este mesmo pré-tratamento obteve os menores teores de hemicelulose, o que foi interessante para o processo, pois hemiceluloses possuem açúcares com maior dificuldade de serem hidrolisados que são pentoses. Logo, um bom pré-tratamento para expor uma grande quantidade de celulose a hidrólise enzimática seria o LVETOR.

Os resultados dos testes de proteínas totais pelo método de micro KJELDAHL foram todos inferiores a 0,5 mg.L⁻¹. Futuramente, um método com uma maior sensibilidade será utilizado para a quantificação de proteínas. Os resultados obtidos mostraram que o teor de enzimas produzidas é pequeno e, portanto vai interferir diretamente nos valores de açúcares totais.

A curva padrão utilizada para cada basidiomiceto estão nas figuras de 1 a 5, abaixo.

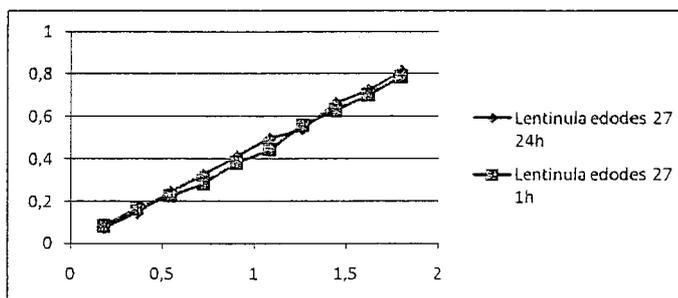


Figura 1- Curva padrão para *Lentinula edodes 27*. Standard curve to *Lentinula edodes 27*

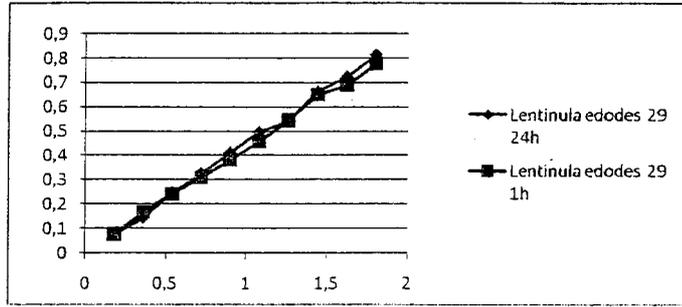


Figura 2- Curva padrão para *Lentinula edodes* 29. Standard curve to *Lentinula edodes* 29

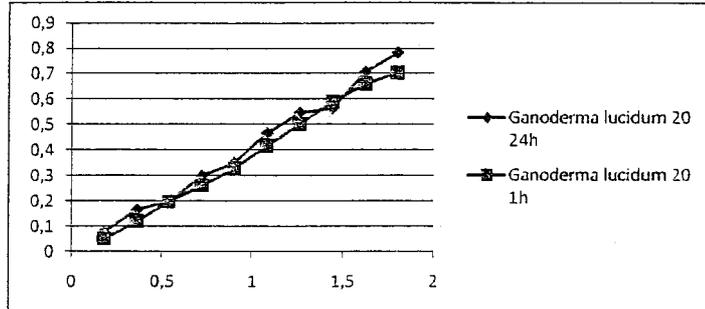


Figura 3- Curva padrão para *Ganoderma lucidum* 20. Standard curve to *Ganoderma lucidum* 20

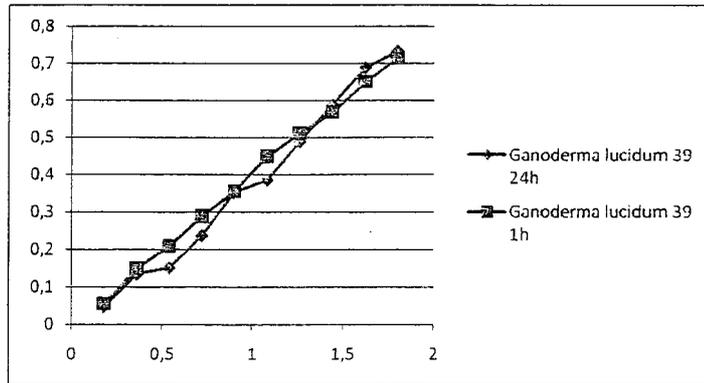


Figura 4- Curva padrão para *Ganoderma lucidum* 39. Standard curve to *Ganoderma lucidum* 39

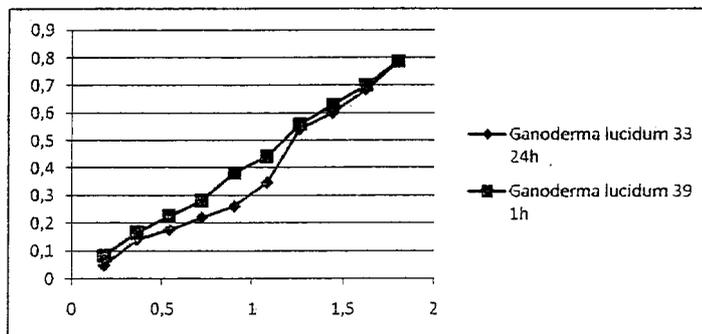


Figura 5- Curva padrão para *Ganoderma lucidum* 33. Standard curve to *Ganoderma lucidum* 33

Os valores de pH aferidos antes que os testes de teores de açúcares redutores fossem executados, tiveram uma faixa de variação de 4,7 a 6,3. Estando dentro dos pH ótimos para hidrólise enzimática de celulases.

A seguir, os resultados dos teores de açúcares em g.L⁻¹ para cada isolado e também para cada pré-tratamento, levando em consideração 1 e 24 horas de hidrólise, a temperatura de 25° C e 150 rpm de agitação. Os resultados são as médias das triplicatas testadas. As Tabelas 4 e 5 são relativas a 1 hora de hidrólise enzimática para os tubos 1 e 2 e as Tabelas 6 e 7 são referentes a 24 horas de hidrólise.

Tabela 4: Resultados das análises por DNS de açúcares redutores em g.L⁻¹ para 1 hora de hidrólise tubos 1. Analysis results for reducing sugar by DNS in g.L⁻¹, 1h hydrolysis, tubes 1.

Substrato	<i>Lentinula edodes</i> 27 (g.L ⁻¹)	<i>Lentinula edodes</i> 29 (g.L ⁻¹)	<i>Ganoderma lucidum</i> 20 (g.L ⁻¹)	<i>Ganoderma lucidum</i> 39 (g.L ⁻¹)	<i>Ganoderma lucidum</i> 33 (g.L ⁻¹)
Branco	0,163	0,306	0,196	0,242	0,329
ETNa	0,072	0,132	0,099	0,126	0,270
LV	0,083	0,145	0,088	0,147	0,287
LVETOH	0,092	0,183	0,168	0,161	0,299

Tabela 5: Resultados das análises por DNS de açúcares redutores em g.L⁻¹ para 1 hora de hidrólise tubos 2. Analysis results for reducing sugar by DNS in g.L⁻¹, 1h hydrolysis, tubes 2.

Substrato	<i>Lentinula edodes</i> 27 (g.L ⁻¹)	<i>Lentinula edodes</i> 29 (g.L ⁻¹)	<i>Ganoderma lucidum</i> 20 (g.L ⁻¹)	<i>Ganoderma lucidum</i> 39 (g.L ⁻¹)	<i>Ganoderma lucidum</i> 33 (g.L ⁻¹)
Branco	0,140	0,328	0,189	0,229	0,342
ETNa	0,071	0,133	0,108	0,139	0,256
LV	0,095	0,154	0,132	0,158	0,303
LVETOH	0,112	0,181	0,134	0,109	0,299

Tabela 6: Resultados das análises por DNS de açúcares redutores em g.L⁻¹ para 24 horas de hidrólise tubos 1. Analysis results for reducing sugar by DNS in g.L⁻¹, 24h hydrolysis, tubes 1.

Substrato	<i>Lentinula edodes</i> 27 (g.L ⁻¹)	<i>Lentinula edodes</i> 29 (g.L ⁻¹)	<i>Ganoderma lucidum</i> 20 (g.L ⁻¹)	<i>Ganoderma lucidum</i> 39 (g.L ⁻¹)	<i>Ganoderma lucidum</i> 33 (g.L ⁻¹)
Branco	0,150	0,188	0,154	0,302	0,477
ETNa	0,060	0,073	0,009	0,106	0,245
LV	0,070	0,121	0,052	0,168	0,143
LVETOH	0,088	0,076	0,091	0,143	0,153

Tabela 7: Resultados das análises por DNS de açúcares redutores em g.L⁻¹ para 24 horas de hidrólise tubos 2. Analysis results for reducing sugar by DNS in g/L, 24h hydrolysis, tubes 2.

Substrato	<i>Lentinula edodes</i> 27 (g.L ⁻¹)	<i>Lentinula edodes</i> 29 (g.L ⁻¹)	<i>Ganoderma lucidum</i> 20 (g.L ⁻¹)	<i>Ganoderma lucidum</i> 39 (g.L ⁻¹)	<i>Ganoderma lucidum</i> 33 (g.L ⁻¹)
Branco	0,132	X	0,140	0,326	3,06
ETNa	0,065	0,069	0,032	0,109	0,371
LV	0,066	0,070	0,06	0,044	0,043
LVETOH	0,107	0,100	0,076	0,160	0,233

Comparando os valores de teores de celulose em cada amostra (O.Sg), com os valores obtidos, podemos calcular a taxa de conversão de celulose em açúcares redutores. A tabela 8 mostra os valores das taxas de conversão da celulose. Os valores usados como referência foram os dos tubos com melhor resultado de teor de açúcares.

Tabela 8: Porcentagem de conversão de celulose em açúcares redutores. Percent conversion of cellulose into reductoring sugars

Substrato	<i>Lentinula edodes</i> 27 (%)	<i>Lentinula edodes</i> 29 (%)	<i>Ganoderma lucidum</i> 20 (%)	<i>Ganoderma lucidum</i> 39. (%)	<i>Ganoderma lucidum</i> 33 (%)
Branco	1,04	2,12	1,26	2,1	1,87
ETNa	0,37	0,67	0,55	0,70	1,88
LV	0,49	0,80	0,69	0,88	1,58
LVETOH	0,56	0,93	0,85	0,81	1,51

Observando os resultados obtidos, concluímos que obtivemos uma taxa de conversão de celulose em açúcares redutores baixa. Estas análises demonstraram que os isolados do gênero *Ganoderma* e *Lentimula* testados ainda não foram capazes de converter substancialmente os substratos lignocelulósicos em açúcares redutores. No presente trabalho, os resultados esperados ainda não foram satisfatórios, porém este trabalho foi necessário para otimização de novos parâmetros para uma maior produção de enzimas bem como uma hidrólise mais eficiente do substrato. Um dos possíveis motivos para o a baixa conversão de celulose em açúcares redutores seria a baixa eficiência da produção de enzimas ao meio líquido. Estes foram os primeiros resultados que o presente projeto obteve, futuramente, a partir deste primeiro trabalho, novas condições serão ajustadas para que melhores resultados possam ser obtidos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L.D.; MARINO, R.R.; MESQUITA, J.E.; RIBEIRO, A.T. Degradação da madeira de *Eucalyptus* sp. por basidiomicetos de podridão branca. *Arq. Inst. Biol.*; São Paulo, v.74, nA, p.321-328, 2007.
- BA YSAL, E.; PEKER, R.; YALINKILIÇ, M.K.; TEMIZ, A. Cultivation of oyster mushroom on waste paper with some added supplementary materials. *Bioresource Technology*, v.89, 0.1, p. 95-97, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Métodos Físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Luiz. Brasília, 1ª edição, 1018 p., 2005.
- FERNANDES, J.; LEITE, C.L.; ESPOSITO, E.; REIS, M.M. *In vitro* wood decay of *Eucalyptus grandis* by the basidiomycete fungus *Phellinus flavomarginatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.55, p.187-193, 2005.
- MILLER, A. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 31, p. 426-428, 1959.
- NOGUEIRA, E.B.S.; CAVALCANTI, M.A.Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats, *Revista de Microbiologia*, v.27, p.7-9, 1996.
- NOVO INDUSTRIA SA (Dinamarca). *Celulose determination: Division Enzymes*, N.AF149/5, GB, 1978.
- WOOD, T.M.; GARCIA-CAMPAYO, V. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation*; v.1, p. 147-161, 1990.