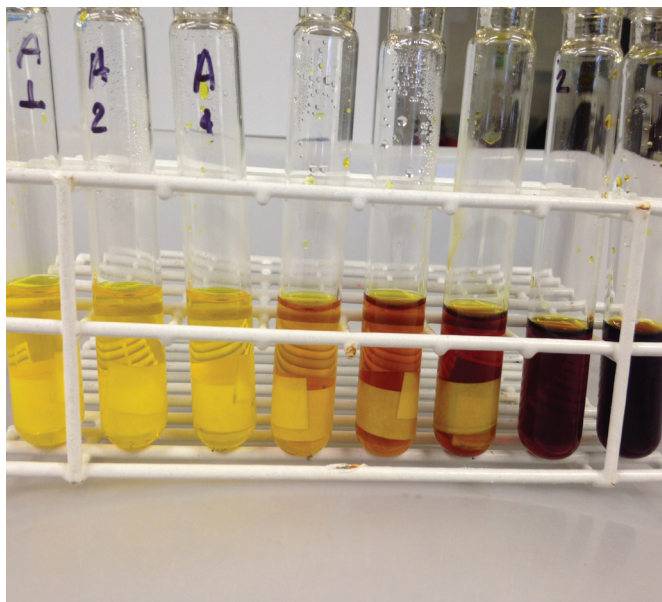


Banco de Extratos de Enzimas Fibrolíticas Isoladas de Conteúdo Ruminal (BEEFRUM)

Hévila Oliveira Salles¹
Antônio Silvío do Egito²
Jailton da Costa Carneiro³
Lidiane Viana Ximenes⁴
Marlice Teixeira Ribeiro⁵
Regislane Pinto Ribeiro⁶
Islan Cruz Barbosa⁷
Ana Márjory Paiva Sousa⁸

Foto: Hévila Oliveira Salles



Introdução

A crescente necessidade de ampliar de modo sustentável o uso de fontes renováveis de energia para proporcionar maior segurança ao suprimento energético e reduzir os impactos ambientais associados aos combustíveis fósseis, encontrou no bioetanol uma alternativa viável economicamente e com significativo potencial de expansão. Com isso, a produção de etanol de cana foi estimulada e hoje a cana-de-açúcar é a commodity mais produzida no mundo, são 1.884.246.253 t, sendo o Brasil o maior produtor mundial com 736.108.487 toneladas (FAO, 2014).

Como consequência dessa alta produção de cana, o Brasil também é o responsável pela geração de um grande volume de resíduo agroindustrial, pois apenas um terço da biomassa contida na planta é aproveitado para a produção de açúcar e etanol. São 280 Kg de bagaço de cana-de-açúcar (BCA) gerados para cada tonelada de cana-de-açúcar processada (CERQUEIRA et al., 2007).

De acordo com Knauf e Moniruzzaman (2004), matérias-primas de origem lignocelulósica contêm de 20% a 60% de celulose, podendo ser totalmente convertida à glicose por ação enzimática após etapa de pré-tratamento que desorganiza o complexo

¹ Médica-veterinária, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE.

² Médico-veterinário e farmacêutico, doutor em Bioquímica, pesquisador do Núcleo Nordeste da Embrapa Caprinos e Ovinos, Campina Grande/PB.

³ Zootecnista, doutor em Ciência Animal, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG.

⁴ Química, técnica da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE.

⁵ Farmacêutica e bioquímica, mestre em Microbiologia Veterinária, analista da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG.

⁶ Zootecnista, mestre em Biotecnologia, doutoranda em Biotecnologia, Universidade Estadual do Estado do Ceará, Fortaleza, Fortaleza/CE.

⁷ Acadêmico do curso Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFCE), bolsista da Iniciação Científica da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE.

⁸ Bióloga, mestre em Bioquímica, bolsista da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE.

lignocelulósico. A glicose, por sua vez, caracteriza-se por ser um monossacarídeo utilizado pela maioria dos micro-organismos, fazendo dessa molécula um importante bloco de construção para a obtenção de uma imensa gama de substâncias de interesse comercial, abrangendo desde combustíveis até polímeros.

O BCA é um material altamente energético. Ele se caracteriza por ser um material lignocelulósico, apresentando em sua estrutura celulose (40%-45%), hemicelulose (30%-35%) e lignina (20%-30%) interligadas (CARDONA et al., 2010), onde o tipo e a extensão dessas associações determinam as propriedades estruturais características desse material vegetal.

Hoje, grande parte do BCA produzido é utilizada para a geração de energia para as usinas por meio da queima do material. Porém, uma quantidade considerável do BCA é ainda desperdiçada nas agroindústrias. Diante dessa problemática, buscaram-se alternativas para o seu reaproveitamento de forma sustentável, seja pela utilização da celulose para a produção de álcool pelo processo de hidrólise enzimática ou ácida, a produção de compostos como o xilitol a partir da hemicelulose (CARVALHO et al., 2005), de derivados celulósicos como o acetato de celulose (CERQUEIRA et al., 2010), ou ainda, o uso do bagaço na alimentação animal, como avaliado por nosso grupo (GOMES et al., 2013; 2015).

Em decorrência de a energia do BCA não estar facilmente disponível, são necessários tratamentos biológicos, químicos e/ou físicos que promovam a desconstrução da fibra. Entre os tratamentos biológicos, está o uso de enzimas lignocelulolíticas, e uma das fontes em potencial para o isolamento dessas enzimas são os micro-organismos que vivem em simbiose no sistema digestório dos ruminantes. Wood et al. (1986) isolaram um fungo anaeróbio, *Neocallimastix frontalis*, do rúmen de ovinos que produziu celulase extracelular muito mais ativa do que a do mutante de *Trichoderma reesei* C-30, responsável por uma das celulases mais ativas disponíveis comercialmente.

Identificar e utilizar enzimas mais específicas para degradar a fibra do bagaço de cana permitirá aumentar a eficiência da degradação, levando ao sucesso da hidrólise da fibra, reduzindo os custos


de produção do etanol celulósico na indústria, assim como proporcionando o uso eficiente do bagaço na alimentação animal, ao aumentar a disponibilidade dos nutrientes desse resíduo.

Da mesma forma que os bancos de DNA (SANTOS et al., 2002), e de micro-organismos (ALMEIDA; BATISTA FILHO, 2001), um banco de extratos de enzimas fibrolíticas de conteúdo ruminal caracteriza-se como acervo que garante a conservação para estudo do patrimônio genético nacional, além do potencial para identificar e conservar enzimas capazes de hidrolisar o BCA. Essa conservação *ex situ* visa manter, durante longos períodos, a qualidade e a estabilidade das amostras de extratos proteicos de enzimas lignocelulolíticas de micro-organismos ruminais.

A criação do banco de extratos composto por enzimas fibrolíticas isoladas de conteúdo ruminal de bovinos, caprinos e ovinos, foi iniciativa da Embrapa Caprinos e Ovinos e da Embrapa Gado de Leite, através de projetos de pesquisa em parceria, e tem como objetivo salvaguardar extratos enzimáticos de nossa biodiversidade para utilização biotecnológica, visando caracterizar, avaliar e identificar possíveis aplicabilidades científicas e/ou industriais das enzimas contidas nesses extratos.

Caracterização do Banco de Extratos

As amostras que compõem o banco de extrato de enzimas fibrolíticas isoladas de conteúdo ruminal estão armazenadas em caixas identificadas. As caixas estão depositadas no Ultrafreezer CL880-86V, na Embrapa Caprinos e Ovinos, mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, no estado seco (liofilizado), acondicionadas em tubos de 2 mL (até 1 g/tubo) e identificadas por numeração sequencial e ano de depósito (00/ano). A numeração sequencial refere-se à ficha catalográfica da amostra conforme especificações da figura 1, que contém as informações referentes à identificação da amostra, ou seja, espécie de origem da amostra, local e data da coleta, pessoa responsável pela coleta, assim como informações técnico-científicas relativas à metodologia de obtenção do extrato e a sua caracterização. Para facilitar a identificação da espécie da amostra, a tampa dos tubos recebeu adesivo na cor amarela para a espécie bovina, verde para a ovina e rosa para a caprina.



Caprinos e Ovinos

LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA

BANCO DE EXTRATOS DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS ISOLADAS DE CONTEÚDO RUMINAL

No. registro XX/YY*

IDENTIFICAÇÃO

Espécie de origem bovina (ID **amarela) Raça: _____
 caprina (ID rosa) Raça: _____
 ovina (ID verde) Raça: _____

Local de coleta: Cidade-UF
 Data da coleta: dia/mês/ano
 Responsável pela coleta: Nome _____
 e-mail: _____
 Instituição: _____

Tipo de material depositado:
 cultura de isolado Identificação micro-organismo: _____
 cultura mista

Quantidade de material depositado:
 Número de tubos: _____ Conteúdo: _____ (g/tubo)

Local de depósito dos tubos:
 No. freezer: _____
 No. prateleira: _____
 No. caixa: _____
 Posição na caixa: _____

Caracterização:
 Concentração proteína: _____ (mg/g)
 Atividade de celulase (DGA^{***}) _____(UI)
 Atividade de xilanase (DGA) _____(UI)
 Atividade em papel de filtro _____(FPU*^{****})

* XX- numeração sequencial; YY- dois últimos dígitos do ano.
 **ID identificação da tampa dos tubos.
 *** DGA – difusão em gel de ágar.
 ****FPU – Unidade de atividade em papel de filtro.

Figura 1. Ficha catalográfica de amostras depositadas no banco de extratos de enzimas

Caracterização preliminar dos extratos armazenados

Os extratos de bovino armazenados foram submetidos à caracterização quanto à quantidade de proteína solúvel de 0,05 g/mL em tampão citrato de

sódio 0,1 M, pH 5, utilizando o método de Bradford (1976), quanto à atividade de endocelulases pelo ensaio de difusão em gel de ágar (SALLES et al., 2010), utilizando o substrato carboximetilcelulose (CMC), assim como quanto à atividade de celulase total determinada pelo ensaio com o substrato

papel de filtro pelo método do DNS (Miller, 1959). Na tabela 01, é apresentado o perfil bioquímico dos extratos obtidos de micro-organismos isolados do rúmen de bovinos cultivados *in vitro*.

Tabela 1. Perfil bioquímico de amostras de extratos enzimáticos de micro-organismos isolados do rúmen de bovinos e cultivados *in vitro* na presença de carboximetilcelulose (CMC).

Amostras de extratos enzimáticos	mg de proteína/mL	FPU (U/mL)*	Atividade específica (U/mg de proteína)	Halo de atividade em CMC (mm)**
CNPGL 108	0,105	0,011	0,106	***
CNPGL 143	0,227	0,035	0,154	14,07
CNPGL A4	0,135	0,026	0,194	15,00
CNPGL 1D4	0,143	0,040	0,281	20,00
CNPGL 1C1	0,049	0,045	0,913	19,06
CNPGL 2C1	0,053	0,022	0,424	18,18
CNPGL 4C1	0,059	0,050	0,844	18,21
CNPGL R3	0,083	0,007	0,083	13,53
CNPGL 52	0,040	0,097	2,428	19,57
CNPGL 72	0,036	0,039	1,075	14,12
CNPGL 85	0,047	0,021	0,441	10,93
CNPGL 89	0,045	0,014	0,319	10,92
Celulase <i>Aspergillus niger</i> (Sigma, ref 22178)	0,253	0,147	0,580	22,37

*FPU (U/mL) – Unidade de atividade em papel de filtro, ou seja, quantidade de enzima que hidrolisa o papel de filtro para gerar 1 µmol de glicose por minuto.

** 10 µg de proteína por poço de 50 µL.

*** Não mensurado.

Na figura 2, é apresentada a atividade específica em papel de filtro (U/mg de proteína) desses extratos de micro-organismos organizada em ordem decrescente de valor, onde se observa um destaque para o extrato CNPGL 52.

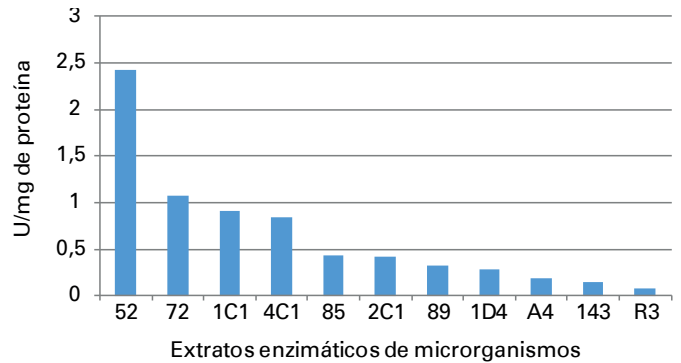


Figura 2. Atividade específica em papel de filtro (U/mg de proteína) de extratos enzimáticos (0,05 g/mL) de micro-organismos lignocelulolíticos do rúmen de bovinos organizada por ordem decrescente de valor. Controle: celulase de *Aspergillus niger* (0,01 g/mL: 0,58 U/mL)

Na figura 3, é apresentada a atividade de endocelulases dos extratos enzimáticos de bovino, mensurada através de ensaio de difusão em gel de ágar com CMC. Vê-se destaque para os extratos CNPGL 1D4, CNPGL 52, CNPGL 1C1, CNPGL 4C1 e CNPGL 2C1.

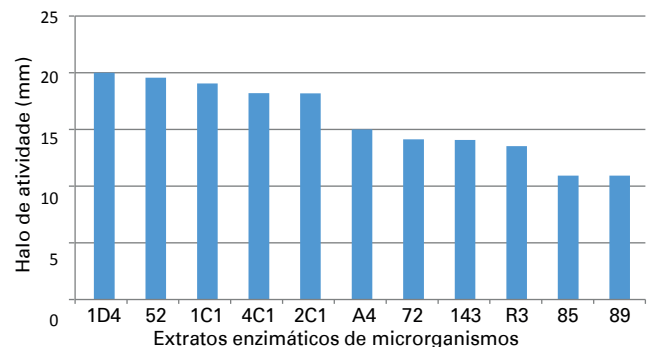


Figura 3. Atividade de endocelulases de extratos enzimáticos (0,05 g/mL) de micro-organismos lignocelulolíticos do rúmen de bovinos, em ensaio de difusão em gel de ágar com substrato carboximetilcelulose (1,0%), organizadas por ordem decrescente. Controle: celulase de *Aspergillus niger* (0,01 g/mL: halo de atividade 22,37 mm).

Para avaliar a termoresistência das endocelulases dos extratos enzimáticos de bovino, amostras dos extratos foram aquecidas a 70 °C, 80 °C, 90 °C e 100 °C, por 10 min, antes de serem submetidas ao ensaio de atividade de difusão em gel de ágar (2,0%) com 1,0% de CMC a 38 °C por 20 horas (Figuras 4).

Quanto à termoresistência dos extratos de bovinos, observa-se o destaque do extrato do micro-organismo CNPGL 1D4 em relação aos demais. Além de apresentar uma maior atividade a 38 °C (Figura 3), esse manteve sua atividade mesmo após aquecimento a 100 °C por 10 min (Figura 4 e

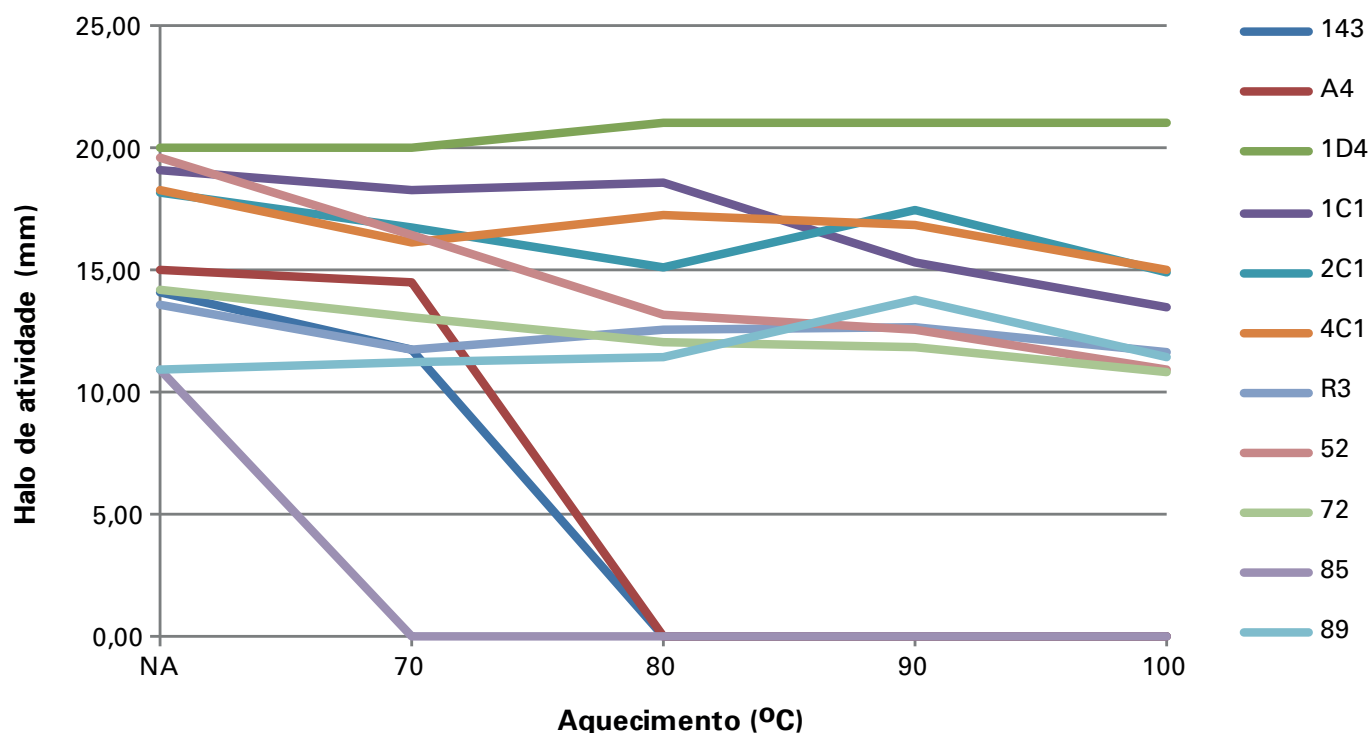


Figura 4. Atividade residual após 20h a 38 oC de endocelulases de extratos enzimáticos de micro-organismos ruminais de bovino (143, A4, 1D4, 1CW, 2C1, 4C1, R3, 52, 72, 85, 89) não aquecido (NA) e após aquecimento a 70 °C, 80 °C, 90 °C e 100 °C, por 10 min, 10 µg de proteína/poço de 50 µL, em placa com ágar (2,0%) contendo 1,0% de carboximetilcelulose (CMC). Celulase de *Aspergillus niger* 5 µg/poço foi utilizada como controle positivo do ensaio (halo de atividade médio 23,14 mm a 38 oC) e Tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,9 como controle negativo.

Tabela 2). O extrato do micro-organismo CNPGL 89 também se destaca como termoresistente (Tabela 2), porém apresenta uma atividade a 38 °C bem inferior ao extrato do CNPGL 1D4 (Figura 3).

Tabela 2. Porcentagem de atividade residual de endocelulases após aquecimento a 100 °C por 10 min.

Micro-organismo	Atividade %
CNPGL 1D4	105,00
CNPGL 89	104,64
CNPGL R3	85,67
CNPGL 4C1	82,20
CNPGL 2C1	81,65
CNPGL 72	76,42
CNPGL 1C1	70,51
CNPGL 52	55,49
CNPGL 143	0,00
CNPGL A4	0,00
CNPGL 85	0,00

Como revisado por Gomes et al. (2007), nos processos biotecnológicos as enzimas termoresistentes se destacam por permitirem a sua manipulação em temperaturas elevadas, diminuindo, assim, a contaminação por micro-organismos mesófilos, que são micro-organismos presentes no ambiente industrial. Nesse sentido, têm-se destacado os fungos termófilos como fonte de enzimas lignocelulolíticas (PEREIRA et al., 2015).

Conclusões

O banco de extratos de enzimas fibrolíticas de conteúdo ruminal (BEEFRUM) foi criado no ano de 2016 e está em expansão. Atualmente, mantém no acervo amostras de extratos de enzimas fibrolíticas da microbiota ruminal de bovino (12), ovino (04) e caprino (01), parcialmente caracterizadas quanto às suas propriedades bioquímicas e seu potencial de hidrólise de material lignocelulolítico. O banco abre inúmeras possibilidades, em que, por meio do uso de ferramentas de biologia molecular e bioquímica, serão possíveis prospectar, identificar e caracterizar espécies de micro-organismos e enzimas fibrolíticas para uso científico e/ou industrial.

Referências

- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. **Biociência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 20, n. 2, p. 30-33, maio/jun. 2001.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, Jul. 2010.
- CARVALHO, R. J.; MARTON, J. M.; FELIPE, M. G. A. Avaliação do sistema combinado de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com carvão ativo e resinas de troca iônica para sua utilização como meio de fermentação. **Revista Analytica**, n. 18, p. 48-55, ago./set. 2005.
- CERQUEIRA, D. A.; RODRIGUES FILHO, G.; CARVALHO, R. A.; VALENTE, A. J. M. Caracterização de acetato de celulose obtido a partir do bagaço de cana-de-açúcar por ¹H-RMN. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 85-91, 2010.
- CERQUEIRA, D. A.; RODRIGUES FILHO, G.; MEIRELES, C. da D. Optimization of sugarcane bagasse cellulose acetylation. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 69, n. 3, p. 579-582, 2007.
- FAO. **FAOSTAT**: statistics database. 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/>>. Acesso em: 15 out. 2017.
- GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 136-145, 2007.
- GOMES, G. M. F.; VASCONCELOS, A. M. de; EGITO, A. S. do; CARNEIRO, J. C.; FONTELES, N. L. de O.; SALLES, H. O. Biodegradação do bagaço de cana-de-açúcar por micro-organismos ruminais de caprinos e ovinos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 31, n. 1, p. 204-214, jan./fev. 2015.
- GOMES, G. M. F.; VASCONCELOS, A. M. de; EGITO, A. S. de; LIMA, A. R.; CARNEIRO, J. C.; LANDIM, A. V.; FONTELES, N. L. O.; SALLES, H. O. Degradabilidade in situ do bagaço de cana-de-açúcar para pequenos ruminantes de raças naturalizadas do Nordeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 65, n. 6, p. 1792-1800, 2013.
- KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. **International Sugar Journal**, Bucks, v. 106, p. 12-23, 2004.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- PEREIRA, J. de C.; MARQUES, N. P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, T. B. de; BOSCOLO, M.; SILVA, R. da; GOMES, E.; MARTINS, D. A. B. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 118, n. 4, p. 928-939, Apr. 2015.
- SALLES, H. O.; GOMES, G. M. F.; ANDRADE, L. B. da S.; ALBUQUERQUE, F. H. M. A. R. de; EGITO, A. S. do. **Ensaio alternativo para triagem de extratos protéicos com atividade celulolítica**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2010. 6 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado Técnico, 112). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31686/1/UMT-Cot112.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2017.
- SANTOS, F. R.; GUIMARÃES, P. E. M.; REDONDO, R. A. F. Bancos de DNA: coleções estratégicas para estudos da biodiversidade. **Lundiana**, Belo Horizonte, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2002.
- WOOD, T. M.; WILSON, C. A.; McCRAE, S. I.; JOBLIN, K. N. A highly active extracellular cellulase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 37-40, Mar. 1986.

Comunicado Técnico, 160

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos e Ovinos

Endereço: Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/Groaíras, Km 4. Caixa Postal 145. CEP 62010-970. Sobral - CE.

Fone: (88) 3112-7400

Fax: (88) 3112-7455

SAC: www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

On-line (2017)

CGPE 14297

**Comitê de Publicações**

Presidente: Vinícius Pereira Guimarães

Secretário-Executivo: Alexandre César Silva Marinho

Membros: Alexandre Weick Uchoa Monteiro, Ana Maria Bezerra Oliveira Lôbo, Carlos José Mendes Vasconcelos, Diônes Oliveira Santos, Maira Vergne Dias, Manoel Everardo Pereira Mendes, Tânia Maria Chaves Campelo, Viviane de Souza.

Expediente

Supervisão editorial: Alexandre César Silva Marinho

Revisão de texto: Carlos José Mendes Vasconcelos

Normalização: Tânia Maria Chaves Campelo

Editoração eletrônica: Maira Vergne Dias