



**ATIVIDADE DE ENZIMAS LIGNINOCELULOLÍTICAS ENVOLVIDAS
NA DEGRADAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR LINHAGENS
FÚNGICAS DA CAATINGA**

OSVALDO L. FERREIRA JR.¹; ELKE S. D. VILELA²; JONATHAN S. GIOVEDY³; CÉLIA M. M.
S. SILVA⁴; ITAMAR S. MELO⁵

Nº 11419

RESUMO

Atualmente o bagaço de cana-de-açúcar é o maior resíduo da agroindústria brasileira, assim sendo, de alta importância que sejam desenvolvidas novas utilidades para o uso de tal substrato. Com esse fim, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade lignocelulolítica de fungos isolados de serrapilheira da Caatinga. A seleção inicial foi feita em meio de cultivo contendo Remazol Brilliant Blue e observado o crescimento e a degradação de bagaço de cana com e sem tratamento químico. Destes, foi selecionada a linhagem fúngica 3.3 F2 na qual se observou uma atividade enzimática maior. Este isolado apresentou as seguintes atividades enzimáticas: Lignina Peroxidase (4,9046 U.L⁻¹), Lacase (54,9148 U.L⁻¹), Endoglucanase (4,4966 U.L⁻¹), β-glicosidase (5,1494 U.L⁻¹) sendo que não foi verificada nenhuma atividade para as enzimas Manganês Peroxidase e Xilanase. Observou-se que a atividade enzimática foi maior no resíduo sem tratamento, em relação ao resíduo tratado. Os resultados obtidos sugerem a possibilidade da substituição do uso de enzimas, por linhagens fúngicas produtoras das mesmas para otimização do processo de produção de etanol de segunda geração.

¹Bolsista da Embrapa Meio Ambiente: Técnico em Química, ETECAP, Campinas-SP, vardo.jr18@gmail.com.

²Colaboradora: Analista, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

³Bolsista : Graduação em Engenharia Ambiental, Faculdade de Jaguariúna, Jaguariúna-SP.

⁴Coordenadora: Professora, Faculdade de Jaguariúna, Jaguariúna – SP.

⁵Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

ABSTRACT

Sugar cane bagasse nowadays is one of the biggest waste produced by Brazilian agroindustry, becoming relevant the development of new uses for it. The objective of this study was to evaluate the lignocellulolytic activity in sugar cane bagasse of fungi isolated from litter in Caatinga biome. Screening was performed on Petri dishes, where 4 isolates were selected for quantification of lignolytic enzyme by discoloration of Remazol Brilliant Blue, with growth observation and degradation of sugarcane bagasse with and without chemical treatment. From the fungal isolates, strain 3.3 F-2 showed increased activity and was selected for evaluation of lignocellulolytic enzymes. It showed the following enzymatic activities: Lignin Peroxidase (4.9046 U.L^{-1}), Laccase (54.9148 U.L^{-1}), endoglucanase (4.4966 U.L^{-1}), β -glucosidase (5.1494 U.L^{-1}) and Manganese Peroxidase and Xylanase displayed no activity. The enzymes showed higher activity with the untreated material. These results suggest the possibility of replacing the use of enzymes for enzyme-producing fungal strains to optimize the process of ethanol production.

INTRODUÇÃO

Em 2007 o Brasil tornou-se o segundo maior produtor de etanol e açúcar, liderando o mercado internacional, com exportação de 3,5 bilhões de litro de etanol, equivalente à metade das exportações mundiais. Além do aumento da produtividade de etanol e açúcar entre 1990 e 2007 tem-se o crescimento na plantação de cana-de-açúcar de 55,81 % (LEVI, 2009). A previsão total de cana moída para 2011/2012 deverá ter um aumento de 2,9% em relação à 2010/2011 e a produção de etanol deverá ter um aumento de 6,11% (Conab, maio 2011). O bagaço da cana-de-açúcar é resultado da extração do caldo após esmagamento nas moendas, e, por conseguinte o maior resíduo da agroindústria brasileira. Apesar do uso secundário de bagaço de cana por várias indústrias estima-se que o excedente de bagaço atinja cerca de 20% do total de bagaço gerado, o que equivaleria a uma sobra anual de 15 milhões de toneladas de bagaço. (TEIXEIRA et al, 2007)

O bagaço de cana-de-açúcar é constituído basicamente de material lignocelulósico, tendo como componentes principais celulose, fibras e ligninas. Um dos papéis biológicos desenvolvidos por micro-organismos é a degradação de matéria orgânica, por meio das quais devolvem micro e macro nutrientes para o ecossistema. Tais processos são realizados por grupos enzimáticos requeridos para quebra de moléculas biológicas, como por exemplo, enzimas produtoras de oxidases tais como

lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase, pois são capazes de realizar essa tarefa degradando a parte ligninolítica, resultando em um bagaço teoricamente livre de lignina, restando somente a celulose livre para ser quebrada em glicose para, posteriormente, ser utilizada na produção de bioetanol. (SANTOS, 2010)

Este trabalho teve, portanto, como objetivo maior avaliar a utilização de linhagens fúngicas, obtidas de serrapilheira da Caatinga, no tratamento de resíduos de bagaço de cana-de-açúcar por meio da hidrólise enzimática.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras e Isolamento de fungos ligninocelulolíticos

A coleta de amostras da serrapilheira foi realizada em 11 pontos da Caatinga. O isolamento das linhagens fúngicas foi realizado por meio de diluições seriadas e plaqueamento em meio Czapeck modificado para isolamento de fungos lignolíticos (NaNO_3 0,5 g ; K_2HPO_4 1,0 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g ; Extrato de levedura 1,0 g ; CMC 10 g ; ágar 16 g ; água destilada 1 L), substituindo a sacarose por farelo de trigo. As placas foram incubadas à 28 °C, por 30 dias. Após o período de crescimento os isolados foram purificados e armazenados em placas de Czapeck a 28 °C para realização dos testes.

Screening e teste em meio líquido com Remazol Brilliant Blue

Para análise de atividade enzimática ligninolítica, foi realizado preliminarmente testes qualitativos por meio da formação de halos em meios contendo extrato de malte 25 g.L⁻¹, agar 15 g.L⁻¹ e Remazol Brilliant Blue (RBB) 0,05%.

As linhagens que obtiveram os melhores halos de atividade enzimática, foram submetidas a quantificação em 50 mL de meio líquido contendo RBB. Foram repicados 2 discos de micélio fúngico com 9 mm de diâmetro em cada frasco. Após 3 dias de crescimento, sob agitação, foi determinada a descoloração do meio pela leitura em espectrofotômetro à 595 nm. O resultado foi expresso como redução do valor da absorvância em meio contendo Remazol.

Avaliação de produção enzimática fúngica em bagaço de cana-de-açúcar

Tratamento do Bagaço de cana-de-açúcar

Para o tratamento foi utilizado 90 g de resíduo industrial de bagaço de cana-de-açúcar, ao qual foi adicionada na proporção 1:3 (p/p) solução contendo 16% de NaOH; 0,3% H_2O_2 ; 0,2% Antraquinona. A mistura foi autoclavada por 20 minutos à 120 °C.

Após resfriamento, o resíduo foi lavado com água aquecida a 60 °C até pH 7. O resíduo foi seco em estufa a 60 °C e peneirado para obtenção de fibras com 4,75 mm.

Avaliação da produção de enzimas ligninocelulolíticas pela linhagem fúngica

Após o crescimento da linhagem em BDA por 15 dias foi preparada uma suspensão de esporos na concentração de 1×10^6 ufe. mL⁻¹ e colocadas 10% v/v no meio contendo 1 g de resíduo tratado e não tratado e 20 mL de solução de sais (g L⁻¹): 20 g KH₂PO₄; 13 g (NH₄)₂SO₄; 3 g Uréia; 3 g MgSO₄.7H₂O; 3 g CaCl₂; 0,05 g FeSO₄.7H₂O; 0,0156 g MnSO₄.7H₂O; 0,014 g ZnSO₄.7H₂O e 0,0020 g CoCl₂. Após incubação a 28 °C, foram coletados extratos nos tempos de 0, 5, 10, 16 e 23 dias e adicionados 10 mL de água destilada gelada, 17 mL de tampão citrato 0,05 mol L⁻¹, pH 5,0 e centrifugado à 4000 rpm por 10 minutos, o qual foi usado para as análises enzimáticas. Efetuaram-se os testes em triplicata e posterior análise estatística pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

Atividades enzimáticas

Lignina Peroxidase (LiP): coletou-se 250 µL de caldo enzimático para a determinação da atividade pelo aparecimento do aldeído veratrílico a partir da leitura da absorbância à 310 nm no espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601PC, segundo Tien e Kirk (1984). Uma unidade de LiP corresponde a quantidade de enzima que oxida 1 µmol de álcool veratrílico por minuto à 37 °C.

Manganês Peroxidase (MnP): coletou-se 500 µL de caldo enzimático para determinação da atividade que foi feita pela leitura da absorbância à 610 nm realizada em espectrofotômetro, segundo Kuwahara et al. (1984). Uma unidade de MnP é definida como a quantidade de enzima que oxida 1 µmol de vermelho de fenol por litro por minuto à 30 °C.

Lacase: coletou-se 600 µL de caldo enzimático para a determinação da atividade para a qual foi utilizado o método da orto-dianisidina, com leitura da absorbância à 460 nm em espectrofotômetro, segundo Szklarz *et al.*, (1989). Uma unidade de Lacase é definida como a quantidade de enzima que oxida 1 µmol de orto-dianisidina por minuto.

β-Glucosidase: coletou-se 50 µL do caldo enzimático para determinação da atividade que foi feita pela leitura da absorbância à 410 nm realizada em espectrofotômetro, segundo Leite et al. (2007). A atividade da enzima foi medida através da quantidade de açúcar redutor presente no final da reação enzimática em µmol por mL de extrato (MILLER, 1959).

Endoglucanase: utilizou-se o método com CMC, com a reação ocorrendo por 30 minutos e leitura da absorbância à 540 nm em espectrofotômetro, segundo Ruegger et al., 2004. A atividade da enzima foi medida através da quantidade de açúcar redutor presente no final da reação enzimática em umol por mL de extrato (MILLER, 1959).

Xilanase: coletou-se 500 µL de caldo enzimático para determinação da atividade que foi feita pela leitura da absorbância à 540 nm realizada em espectrofotômetro, segundo Nascimento (2006) com adaptações na concentração do substrato utilizado. A atividade da enzima foi medida através da quantidade de açúcar redutor presente no final da reação enzimática em umol por mL de extrato (MILLER, 1959).

Avaliação do potencial de crescimento fúngico utilizando o bagaço da cana-de-açúcar como substratos

Para determinar a cinética de crescimento foi utilizado o método de contagem de esporos em câmara de Newbauer, coletando-se 1000 µL do meio de cultivo a cada 5 dias para determinação da curva de crescimento do fungo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados um total de 99 linhagens fúngicas de amostras de serrapilheira, das quais 27 apresentaram atividade ligninolítica, havendo maior degradação do substrato para quatro isolados, denominados 3.3 F-2, 7. MF-4, 5.1 MF-6 e 1. FF-16.

A maior oxidação do corante Remazol, produzindo a redução da absorbância foi causada pela linhagem 3.3 F-2 (Figura 01 B), sendo, por isso, o selecionado para futuras pesquisas de degradação do bagaço de cana.

Foi observada baixa atividade de LiP no bagaço tratado e elevada atividade no não tratado (Figura 01 A), provavelmente porque no resíduo tratado as ligações de lignina já tenham sido quebradas. A lignina peroxidase degrada unidades não-fenólicas da lignina que corresponde até 90% dos polímeros de lignina. (MARTINEZ et al., 2005).

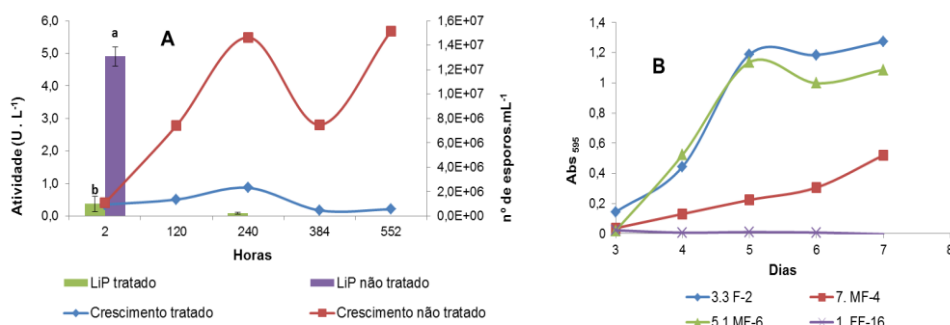


FIGURA 01. A: Atividade de lignina peroxidase e cinética de crescimento do fungo 3.3 F-2 da Caatinga utilizando bagaço de cana como fonte de carbono. Análise estatística para comparação dos tratamentos em cada tempo feita pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$. **B:** Redução de absorbância do corante RBB em meio líquido produzida pela ação do fungo.

A endoglucanase e β -glicosidase apresentaram maior atividade com material não tratado (Figura 02), podendo indicar como substituto do tratamento enzimático do bagaço de cana, havendo auxiliado na quebra de ligações intermoleculares e das ligações β (1-4) da celulose, sendo a atividade de β -glicosidase superior àquela obtida por Silva (2001) mesmo tendo sido realizado em diferentes substratos. Quanto à endoglucanase, verificou-se atividade oito vezes maior do que as obtidas por Basso et al. (2010) que utilizou fungos isolados do bagaço de cana para atividade enzimática em meio com o mesmo substrato.

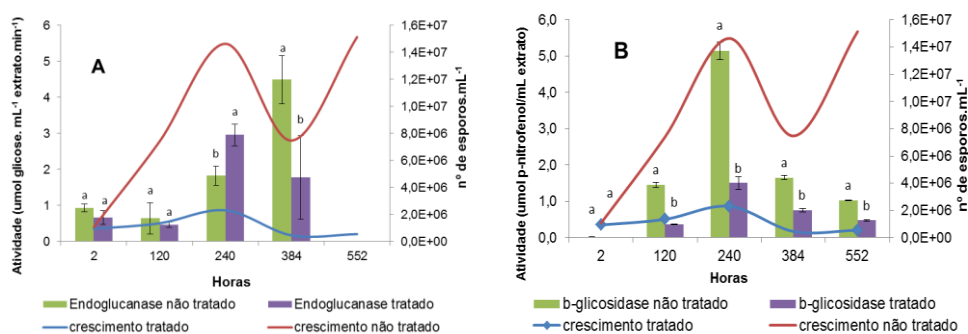


FIGURA 02. A) Atividades enzimáticas Endoglucanase (A), β -glicosidase (B) e crescimento do isolado 3.3 F-2 da Caatinga utilizando bagaço de cana como fonte de carbono. Análise estatística para comparação dos tratamentos em cada tempo feita pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

Com 23 dias de crescimento o fungo passou a produzir uma maior quantidade de lacase (Figura 03 A), rompendo ligações da lignina com a hemicelulose, tanto no meio tratado quanto no meio não tratado, mostrando atividade superior quando

comparado com experimentos realizados por Silva (2001) que fez a dosagem enzimática no mesmo tempo e com diferentes substratos.

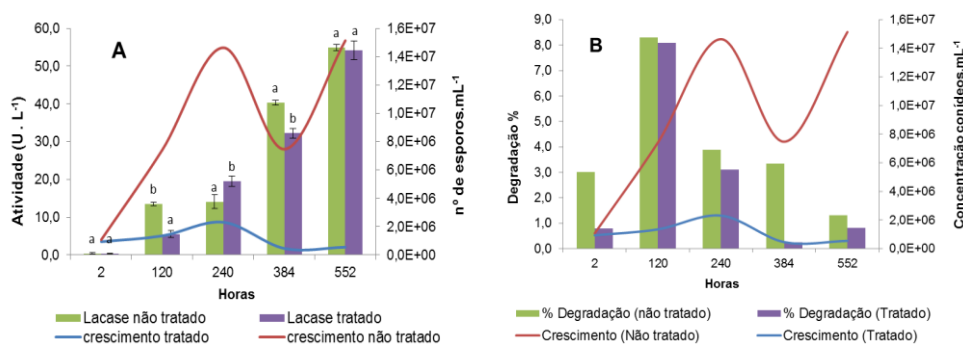


FIGURA 03. A - Atividade de lacase e crescimento do isolado 3.3 F-2 da Caatinga utilizando bagaço de cana como fonte de carbono. Análise estatística para comparação dos tratamentos em cada tempo feita pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$. **B - Degradação de bagaço de cana-de-açúcar e crescimento do isolado 3.3 F-2 contendo bagaço de cana de açúcar tratado e não tratado.**

Não houve diferença na degradação entre os resíduos tratado e não tratado, mas houve melhor crescimento do fungo com o resíduo não tratado, indicando sua capacidade de degradação do bagaço de cana pelas enzimas avaliadas (Figura 03 B). A fase exponencial de crescimento do fungo que se deu por volta dos 5 dias, correspondeu a fase que se verificou maior degradabilidade do resíduo (Figura 03 B).

Levando em consideração a função de cada enzima na degradação do bagaço, além do crescimento fúngico, pode-se afirmar que, inicialmente se verificou considerável atividade de LiP no bagaço não tratado nas duas primeiras horas, seguida de atividades de endoclucanase e β -glicosidase, além de alta atividade de lacase ao longo do processo com máxima produção aos 23 dias.

Em relação ao bagaço de cana-de-açúcar tratado, a atividade de endoclucanase, β -glicosidase e lacase foram mais baixas e não houve uma atividade significativa de LiP indicando, assim, que o tratamento efetuado foi eficiente, quebrando as ligações da lignina com a celulose, não sendo necessária a atividade de LiP, ocorrendo somente a atividade de lacase removendo, por fim, as ligações da lignina com a hemicelulose.

CONCLUSÃO

É plausível sugerir que a Caatinga fornece novas fontes de fungos nativos termotolerantes. Em particular, pôde-se constatar que fungos obtidos a partir de

serrapilheira podem ser fortes candidatos para deslignificação do bagaço de cana, produzindo as enzimas envolvidas no processo ligninolítico.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Meio Ambiente pelo apoio com a bolsa de iniciação científica, suporte e estrutura para realização dos experimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.11, p.1282-1289, nov. 2010.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar, primeiro levantamento, maio/2011**. Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab 2011.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. N.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**; vol. 169, pp.247–250, 1984.
- LEITE, R. S. R.; GOMES, E.; SILVA, R. Characterization and comparison of thermostability of purified b-glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry** vol. 42, pp. 1101-1106, 2007.
- LEVI, E. R. **Análise do Mercado e Estimação das Demandas de Cana-de-Açúcar, Açúcar e Etanol Brasileiro**. Rio de Janeiro, 2009. Graduação em Eng. De Petróleo. Orientação: Rosemarie Bröker Bone e Fernando Pellon de Miranda. Escola Politécnica. UFRJ.
- MARTINEZ, A. T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUENÁS, F. J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTINEZ, M. J.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RIO, J. C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International microbiology the official journal of the Spanish**, 8(3), pp. 195-204. 2005.
- MILLER, G. L. **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar**. **Analytical Chemistry**, vol. 31, nº 03, pp. 426-428, 1959.
- NASCIMENTO, R. P. **Otimização da produção de endoxilanases por *Streptomyces malaysiensis* AMT-3 utilizando resíduos agro-industriais**. Rio de Janeiro, 2006. Doutorado em Ciências (Microbiologia). Orientação: Rosalie Reed Rodrigues Coelho, Elba Pinto da Silva Bom e Nei Pereira-Jr. UFRJ.
- RUEGGER, M. J. S., TAU-K-TOMISIELO. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. **Revista Brasileira de Botânica**. vol. 27. nº. 2, 2004.
- SANTOS, V. T. O. **Composição e digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído em reator estático**. Lorena, 2010. Mestrado em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada. Orientação: Walter de Carvalho. Escola de Engenharia de Lorena. USP.
- SILVA, E. R. **Biodegradação Fúngica de Resíduos Agroindustriais para a Produção de Biomassa Microbiana, Enzimas Lignocelulolíticas e Redução de Fitatos**. Campinas, 2001. Doutorado em Eng. de Alimentos. Orientação: Dr^a Lúcia Regina Durrant. Departamento de Ciência de Alimentos, Unicamp.
- SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, vol. 81, pp. 234-240. 1989.
- TEIXEIRA, A. F.; PIRES, A. V.; NASCIMENTO, P. V. N. **Bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de bovinos**. *Revista Electrónica de Veterinaria* 1695-7504, vol. 08 nº 6. 2007.
- TIEN, M.; KIRK, T. K. 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** vol. 81, pp. 2280-2284, April 1984.