

ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FUNGOS LIGNOCELULÓTICOS CULTIVADOS EM EUCALIPTO (*Eucalyptus*)

CAIO RODRIGUES PINHEIRO¹, FERNANDA MANOELA POTZIK²,
DEBORA AYAME HIGUCHI³

¹ Graduando em Licenciatura em Química, IFSP Campus Suzano, c.rodrigues@aluno.ifsp.edu.br.

² Graduanda em Licenciatura em Química, Bolsista PIBIFSP, IFSP Campus Suzano,

³ Docente do Curso de Licenciatura em Química, IFSP Campus Suzano, da.higuchi@ifsp.edu.br.

Área de conhecimento: 2.08.02.00-5 Bioquímica dos Microrganismos.

Apresentado no 10º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP
27 e 28 de novembro de 2019- Sorocaba-SP, Brasil

RESUMO: O número de pesquisas científicas que visam encontrar recursos para a diminuição do consumo de petróleo vem aumentando nas últimas décadas e, dentre elas, as que buscam matérias-primas para a produção de biocombustíveis em alternativa ao uso de combustíveis fósseis são protagonistas. Neste trabalho foi analisado a utilização de madeira de eucalipto como fonte de celulose para a produção de bioetanol através da ação de microrganismos degradadores de substratos lignocelulósicos. Para tal, foi feita a coleta de cavacos de madeira em decomposição na cidade de Salesópolis – SP, isolamento e crescimento das cepas, e fermentação em meio sólido contendo maravalhas de eucaliptos tratadas com peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio. A fim de comparar a eficácia do tratamento, a fermentação também foi feita em substrato não tratado, para servir de controle. Após as fermentações, as soluções enzimáticas foram analisadas quanto à atividade através dos métodos de análise de açúcares redutores utilizando como substrato papel filtro e carboximetilcelulose (para verificar as ações da exoglicanase e endoglicanase, respectivamente). A solução que apresentou maior atividade em ambos os casos foi analisada através de eletroforese em gel e os resultados se mostraram condizentes com os valores encontrados na literatura para as glicanases estudadas.

PALAVRAS-CHAVE: biocombustíveis; bioetanol; exoglicanase; endoglicanase; celulasas

ANALYSIS OF ENZYMATIC ACTIVITY OF LIGNOCELLULOSIC FUNGI GROWN IN EUCALYPTUS (*Eucalyptus*)

ABSTRACT: The number of scientific researches aimed at finding resources to reduce petroleum consumption has been increasing in the last decades and, among them, those that seek raw materials for biofuels production instead of fossil fuels are protagonists. In this work we will study the use of eucalyptus wood as a cellulose source for bioethanol production through the action of lignocellulosic substrate degrading microorganisms. To this end, decaying wood chips were collected in the city of Salesópolis - SP, isolation and growth of strains, and fermentation in solid medium containing eucalyptus shavings treated with hydrogen peroxide and sodium hydroxide. In order to compare the effectiveness of the treatment, fermentation was also performed on untreated substrate as a control. After fermentations, the enzymatic solutions were analyzed for activity by reducing sugar analysis methods using filter paper and carboxymethylcellulose as substrate (to verify the actions of exoglycanase and endoglycanase, respectively). The solution with the highest activity in both cases was analyzed by gel electrophoresis and the results were consistent with the values found in the literature for the studied glycanases.

KEYWORDS: biofuels; bioethanol; exoglycanase; endoglycanase; cellulases

INTRODUÇÃO

A busca por soluções alternativas para o consumo de petróleo vem sendo discutida com maior afinco nas últimas décadas. Diversos países têm se empenhado em pesquisas científicas para minimizar esse problema mundial e, dentre essas pesquisas, algumas das que mais se destacam são as

que estudam novas matérias-primas para a produção de biocombustíveis, de modo a minimizar a utilização de combustíveis fósseis. Com o Brasil não é diferente. O país é referência mundial na produção de biocombustíveis líquidos, como o biodiesel e, principalmente, o bioetanol. A produção nacional de bioetanol é majoritariamente proveniente da cana de açúcar que é utilizada, também, como matéria-prima para o bioetanol de 2ª geração, produzido a partir do seu bagaço que possui uma grande concentração de celulose (LEITE; LEAL, 2007; FERNANDO DE LIMA LUZ JR et al., 2009; RODRIGUES; MENDES; PACHECO, 2013)

Atualmente um dos principais substratos lignocelulósicos conhecidos é a madeira de Eucalipto (*Eucalyptus*) que, no Brasil, foi introduzida na década de 50 como matéria-prima na indústria de papel e celulose, principalmente por suas características de rápido crescimento e adaptação às condições edafoclimáticas do país (MOTTA; DA SILVA; DINIZ, 2010). Considerando que a região de Suzano conta com uma das maiores companhias no ramo de Papel e Celulose e que esse processo utiliza como matéria-prima a madeira de eucalipto, que assim como o bagaço de cana, é rico em celulose, pensou-se na utilização da celulose contida nessa planta como matéria-prima alternativa na produção de bioetanol de 2ª geração a partir da ação de microrganismos.

MATERIAL E MÉTODOS

Semeadura dos fungos utilizados nos ensaios de atividade enzimática

Os fungos foram isolados de cavacos de eucalipto em decomposição recolhidos na cidade de Salesópolis – SP. As amostras da madeira em decomposição foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose e deixadas em repouso por três dias em temperatura ambiente. Após esse período foi possível observar a proliferação de microrganismos.

Isolamento das cepas

Após o crescimento dos microrganismos realizou-se o isolamento das cepas transferindo, com o auxílio de uma alça bacteriológica, cada uma das espécies de fungos observadas para novas placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura. Após o isolamento, as cepas foram mantidas com repiques a cada 7 dias.

Crescimento das cepas em meio líquido

Foram selecionados seis fungos para seguirem para fermentação, onde seria promovido o aumento no número de microrganismos. As cepas selecionadas foram devidamente transferidas cada uma para um erlenmeyer contendo 250 mL de caldo triptonado e incubadas à 25 °C, sob agitação por 72 horas.

Preparo dos substratos da fermentação

O eucalipto utilizado foi tratado quimicamente adicionando-se 100 g de maravalhas (eucalipto em raspas) a um recipiente contendo 20 mL de peróxido de hidrogênio, 15 g de hidróxido de sódio e quantidade suficiente de água destilada para uma 1 L de solução (resultando em uma solução com concentrações de H₂O₂ igual à 2% V/V e de NaOH igual à 1,5% m/V). O controle foi feito utilizando a mesma quantidade de maravalhas adicionadas à 1 L de água destilada. Tanto o controle quanto a amostra tratada foram autoclavados à 121 °C.

Após a autoclavagem a amostra tratada foi lavada repetidamente com água para neutralizar os efeitos do tratamento. Tanto a amostra tratada quanto o controle foram secos em estufa à 60 °C por aproximadamente 24 horas e autoclavados novamente antes do uso para garantir a esterilidade do substrato.

Essas maravalhas foram utilizadas como substrato na fermentação sólida para produção de celulases.

Fermentação dos fungos para produção de celulases

Após o período de fermentação os conteúdos dos erlenmeyers foram transferidos a tubos Falcon de 50 mL e centrifugados durante 15 minutos à 7000 RPM. Após a centrifugação houve a separação do conteúdo em duas fases: o sobrenadante (parte líquida), que foi descartado, e o sedimentado (parte sólida), contendo as células de interesse que foram transferidas para dois béqueres, um contendo 10 g de maravalhas de eucalipto tratadas e outro a mesma quantidade de substrato não tratado. Em seguida foram adicionados 10 mL de meio mineral em cada um dos béqueres e incubados durante 10 para fermentação.

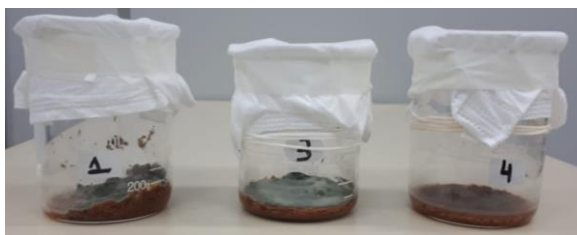


FIGURA 1. Fermentação sólida em substrato controle.

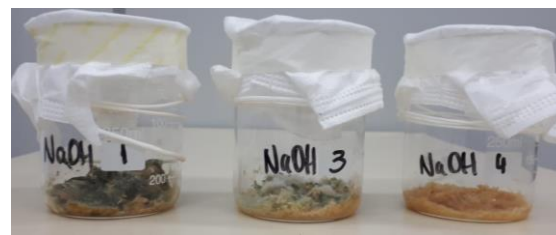


FIGURA 2. Fermentação sólida em substrato tratado.

Os produtos dessas fermentações (caldos enzimáticos fúngicos) foram recolhidos, filtrados em microfiltros de 0,22 µm, armazenados em tubos eppendorf de 2 mL e congelados.

Determinação da atividade de enzimas celulolíticas

Com os caldos enzimáticos fúngicos foi possível realizar a análise da atividade enzimática de duas enzimas: a exo-1,4-β-D-glicanase (exoglicanase) e a endo-1,4-β-D-glicanase (endoglicanase).

▪ Atividade da Exo-1,4-β-D-glicanase

Esse ensaio foi realizado utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) em papel filtro. Para tal, uma folha de papel filtro cortada em tiras de 1 x 6 cm foi utilizada como substrato. As tiras foram enroladas e inseridas em tubos de ensaio onde foram acrescentados 500 µL das amostras filtradas (caldos enzimáticos fúngicos) e 1000 µL de tampão citrato 0,05 M e pH 4,8.

Para a determinação da curva padrão foi feita uma solução estoque de glicose 10 mg/mL e a partir da solução estoque foram preparados os padrões de glicose. Para o branco utilizou-se 1000 µL de tampão citrato e para as diluições foram utilizados 5, 10, 20, 40 e 80 µL de solução estoque de glicose diluídas em 995, 990, 980, 960 e 920 µL de tampão citrato, originando diluições de concentrações 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 e 0,8 mg/mL, respectivamente.

Tanto as amostras quanto os padrões de glicose foram incubados em banho maria a 50 °C por 60 minutos. Após o período de incubação, e para parar a reação, foi adicionada à cada um dos tubos quantidades de solução do reagente DNS de modo a manter a proporção 1:1 (nas amostras foram adicionados 1500 µL de DNS e nos padrões foram adicionados 1000 µL de DNS). Após a adição do DNS as amostras e os padrões foram fervidos em banho maria por 5 minutos para a produção da coloração. Na sequência os tubos foram arrefecidos em temperatura ambiente e a leitura foi feita em espectrofotômetro UV-Vis a 540 nm.

A partir da curva padrão de glicose foi possível determinar a quantidade de açúcar liberado (mg de glicose / 0,5 mL de amostra) para cada amostra. Com isso foi possível determinar a FPU (atividade em papel filtro) para cada amostra de acordo com as equações abaixo:

$$UI_{FPU} = \frac{va}{M \times t} \quad (1)$$

em que,

UI_{FPU} – Unidade Internacional;

va – valor absoluto de glicose, mg;

M – massa molar da glicose, mg/µmol;

t – tempo, min;

Ve – volume da solução enzimática, mL.

▪ Atividade da Endo-1,4-β-D-glicanase

Esse ensaio foi realizado utilizando o método da carboximetilcelulose (CMC). Para tal, uma solução estoque a 2% (p/V) foi preparada dissolvendo 50 mg de CMC em 25 mL de tampão citrato. Essa solução foi utilizada como substrato.

Em tubos de ensaio foram adicionados 500 µL das amostras e diluídas em 1000 µL de tampão citrato. Uma curva padrão foi preparada seguindo a mesma metodologia descrita no tópico anterior. Tanto os tubos contendo os padrões de glicose quanto os que continham as amostras foram aquecidos em banho maria a 50 °C por 5 minutos. Após essa incubação, somente nos tubos contendo os caldos enzimáticos fúngicos, foram adicionados 500 µL do substrato 2% de CMC e, então, colocados novamente em banho maria a 50 °C por 30 minutos.

Após o período de incubação foi adicionado aos tubos DNS suficiente para manter a proporção de 1:1 (1000 µL de DNS nos padrões de glicose e 2000 µL de DNS nas amostras). Os tubos foram fervidos em banho maria por 5 minutos para a produção de coloração e então resfriados em

temperatura ambiente. Após o resfriamento foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-Vis a 540 nm.

A partir da curva padrão de glicose foi possível determinar a quantidade de açúcar liberado (mg de glicose / 0,5 mL de amostra) para cada amostra. Com isso foi possível determinar a atividade em CMC para cada amostra de acordo com a equação 2.

$$UI_{CMC} = \frac{va}{p \times Ve \times t} \quad (2)$$

em que,

UI_{CMC} – Unidade Internacional;

va – valor absoluto de glicose, mg;

p – produto liberado por hidrólise, 0,18 mg/min quando o produto é glicose;

t – tempo, min;

Ve – volume da solução enzimática, mL.

Eletroforese em gel SDS-PAGE

Preparou-se um gel de acrilamida, 12,5% para a corrida e um gel de empilhamento 3% para a aplicação. O gel foi submetido à pré-corrida por 30 minutos à 170 V. Amostras contendo as alíquotas retiradas do caldo enzimático fúngico FSN1 foram adicionadas a igual volume de tampão de amostra (glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%, SDS 2,3%, Tris-HCl pH 6,8 0,0625 M), fervidas a 95 °C por três minutos e aplicadas no gel. Aplicou-se as amostras no gel de poliacrilamida já preparado na cuba e submerso em tampão adequado. Em seguida iniciou-se a corrida eletroforética, sob tensão de 170 V, e uma corrente de 30 mA por aproximadamente 1:30h. Retirou-se o gel da cuba e corou-se as proteínas com uma solução de nitrato de prata em meio levemente ácido, impregnando o gel e, na sequência, a prata é reduzida em solução alcalina mediante a adição de formaldeído.

As massas moleculares das enzimas foram determinadas por comparação de seus fatores de migração com de proteínas de massas moleculares conhecidas padrão (Unstained Protein Marker Broad Range, com tamanhos de 2 a 212 kDa).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os seis fungos selecionados foram identificados por algarismos arábicos de 1 a 6, contudo, somente os fungos 1, 3 e 4 seguiram para a fermentação em meio sólido. Nessa fermentação, o fungo número 4 não se mostrou eficiente e, por esse motivo, nas etapas seguintes somente foram utilizados os fungos números 1 e 3. Esses dois microrganismos seguiram para a fermentaram bem em meio sólido utilizando como substrato as maravalhas tratadas e não tratadas. Para identificação dos produtos dessas fermentações foram utilizados códigos alfanuméricos organizados da seguinte forma: “FS” (para indicar que foram os produtos das fermentações sólidas, já que outras fermentações foram realizadas, mas não utilizadas) + “N” ou “C” (sendo N a letra selecionada para se referir a fermentação no substrato tratado e C para se referir a fermentação no substrato controle) + “1” ou “3” (para se referir à identificação do fungo mencionada anteriormente). Dessa forma, as atividades enzimáticas foram medidas para as quatro combinações (FSN1, FSC1, FSN3 e FSC3).

A partir da equação da reta de cada uma das curvas padrões foi possível calcular a quantidade de glicose produzida na degradação da celulose pelas enzimas contidas nos caldos enzimáticos fúngicos e, aplicando essas concentrações nas equações descritas anteriormente, foi possível calcular a atividade enzimática. Esses resultados estão apresentados na tabela 1.

Como nas duas análises a amostra FSN1 foi a que apresentou melhores resultados de atividade enzimática, optou-se por aplicar a ela a técnica de Eletroforese em Gel SDS-PAGE. O resultado da corrida eletroforética para essa amostra está apresentado na figura 3.

TABELA 1. Concentração de glicose produzida pela atividade enzimática da exoglicanase e da endoglicanase.

Amostra	Exo-1,4- β -D-glicanase			Endo-1,4- β -D-glicanase		
	Absorbância (A)	Concentração (mg/mL)	Atividade FPU ($\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	Absorbância (A)	Concentração (mg/mL)	Atividade CMC ($\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
FSN1	0,5080	0,1477	0,3039	0,3030	0,0880	0,0204
FSC1	0,4670	0,1371	0,2675	0,1510	0,0419	0,0097
FSN3	0,3340	0,1030	0,2119	0,0720	0,0179	0,0041
FSC3	0,2630	0,0847	0,1743	0,0360	0,0070	0,0016

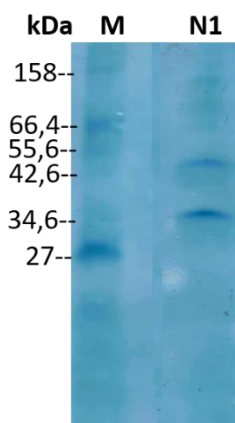


FIGURA 3. Gel SDS-PAGE - verificação da expressão de enzimas após 10 dias de fermentação sólida (Legenda: **M** - Marcador de proteína Broad Range (2-212 kDa), New England Biolabs. **N1** - Identificação da cepa de fungo isolada).

Conforme pode ser observado na figura ao lado, na região referente à cepa isolada FSN1, duas marcações se destacaram indicando que pelo menos duas proteínas se mostraram bastante expressadas, sendo que uma delas se situa entre 34 e 38 kDa e a outra entre 46 e 52 kDa. Ao consultar a literatura acerca das massas molares das enzimas que tiveram sua atividade analisada, encontram-se valores que variam entre 22 e 45 kDa para a endoglicanase e entre 50 e 65 kDa para a exoglicanase (RAGAUSKAS, 2014, p. 131), indicando que, possivelmente, as duas proteínas expressadas com maiores destaques podem se tratar, justamente, das enzimas em questão, uma vez que suas massas moleculares se encontram entre os valores mencionados na literatura.

CONCLUSÕES

O tratamento químico realizado nas maravalhas de eucalipto ocasionou quebras nas fibras do substrato, possibilitando uma maior exposição da celulose o que gerou melhores resultados quando comparados com o controle. Dos seis fungos selecionados inicialmente, três deles não apresentaram fermentação eficiente em meio líquido e um deles não foi capaz de degradar o substrato sólido, mesmo fornecendo condições adequadas. Dessa forma, somente dois dos fungos isolados se mostraram eficientes o suficiente para o objetivo deste trabalho, mas as próximas etapas serão realizadas fazendo uso de apenas um deles, o FSN1, que foi o que apresentou melhores atividades em ambas as análises.

Para as próximas etapas pretende-se ainda fazer a caracterização do fungo que forneceu melhores resultados e, se possível, sequenciar as duas proteínas identificadas na eletroforese, de modo a verificar se realmente se trata das enzimas estudadas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de São Paulo (PIBIFSP) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS

- DE MARCO, É. G. Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de *Bacillus* sp. 2012.
- FERNANDO DE LIMA LUZ JR, L.; KAMINSKI, M.; HENRIQUE KOZAK, R.; MATAR NDIAYE, P. Bioetanol, Biodiesel E Biocombustíveis: Perspectivas Para O Futuro*. p. 53–57, 2009.
- LEITE, R. C. de C.; LEAL, M. R. L. V. O biocombustível no Brasil. **Novos Estudos CEBRAP**, n. 78, p. 15–21, 2007.
- MOTTA, D.; DA SILVA, W. F.; DINIZ, E. N. Rentabilidade na plantação do eucalipto. 2010.
- RAGAUSKAS, A. J. **Materiais para biocombustíveis**. World Scientific, 2014.
- RODRIGUES, D. de S.; MENDES, T. D.; PACHECO, T. F. Catálise Enzimática para desconstrução de biomassa lignocelulósica. **Microrganismos na Produção de Biocombustíveis Líquidos**, p. 145–188, 2013. Disponível em: <<http://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00052920.pdf>>.