

Biodegradação de carboximetilcelulose utilizando fungo *Pleurotus*: Produção de oligossacarídeos e açúcares fermentescíveis para a indústria de etanol

*Biodegradation of carboxymethylcellulose using *Pleurotus* : oligosaccharides production and fermentable sugars for ethanol industry*

Cristiano Ragagnin de Menezes¹, Andressa Ribas Barreto²

¹Doutorado em Ciência de Alimentos, Professor do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Santa Maria, RS, Brasil

²Graduanda em Tecnologia em Alimentos, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Santa Maria, RS, Brasil

Resumo

No presente estudo, o fungo *Pleurotus* sp BCCB068 foi utilizado para a degradação de matriz de celulose para produção de enzimas usando fermentação submersa. O hidrolisado obtido foi aplicado como fonte enzimática para a hidrólise de carboximetilcelulose, onde foi degradado 54,8%, durante o período de 0 a 60 minutos de hidrólise, formando oligossacarídeos, como também vários monômeros de açúcar (celobiose, manose, maltose, frutose e glicose). Estes resultados indicaram um grande potencial deste fungo para degradar materiais celulósicos e na obtenção de monômeros de açúcar para utilização nas indústrias de etanol.

Palavras-chave: Enzimas. CMC. *Pleurotus*. Biodegradação.

Abstract

In this present study, white-rot fungi *Pleurotus* sp BCCB068 were evaluated as regards the degradation of the cellulose matrix with production of enzymes using submerged fermentation. The crude extract obtained from the fungi growths was used as enzyme source for carboxymethylcellulose hydrolysis, reached 54.8% of degradation during 0-60 minutes of reaction period, with formation of oligosaccharides, as well as several sugar monomers (cellobiose, mannose, maltose, fructose and glucose). These results indicate great potential of these fungal strains to degrade cellulosic materials and produce sugar monomers to be used in ethanol industries.

Keywords: Enzymes, CMC, *pleurotus*, biodegradation.

1 Introdução

Os polímeros solúveis podem ser divididos em três grupos: os naturais, sintéticos e semi-sintéticos. Os polímeros de celulose são os mais abundantes polímeros semi-sintéticos, tendo o sódio carboximetilcelulose (CMC) como o mais importante representante. O polímero de CMC possui propriedades emulsificantes e ligante, sendo utilizado em vários processos de revestimento, em cosméticos, detergentes, alimentos, produtos têxteis, farmacêuticos e indústria de óleos (OREHEK, 2014).

A biodegradação de CMC envolve a hidrólise enzimática em ligações glicosídicas por enzimas celulasas (BATELAAN et al., 1992). Pode-se dividir este sistema de enzimas em três grandes grupos: β -D-glucanases ou celobiasas (EC 3.2.1.21), celobiohidrolases ou exoglucanases (EC 3.2.1.91), e 1,4-D-glucanohidrolases ou endoglucanases (EC 3.2.1.4). As β -glucosidases hidrolisam celobiose e alguns celo-oligossacarídeos promovendo a formação de glicose. As exoglucanases atuam nas celobioses de terminais não redutores da celulose e atuam sobre as partes não cristalinas.

Os benefícios do desenvolvimento da tecnologia para a produção de etanol através do uso da biomassa são vários, como o aumento da energia nacional segura, redução da emissão de gases poluentes na atmosfera, uso dos recursos renováveis, elaboração de carboidratos utilizáveis nos processos industriais, benefícios macroeconômicos para as comunidades rurais e na sociedade em geral (WYMAN, 2003).

Espécies de *Pleurotus* são relatados como sendo eficientes colonizadores e degradadores de lignoceluloses. Estes fungos realizam a degradação enzimática da porção lignocelulósica dos substratos pela elaboração das enzimas como celulasas, β -glucosidase, xilanases, lacases, manganês-peroxidases e lignina peroxidases que estão envolvidas na degradação de ligninoceluloses (QINNGHE et al., 2003; PALMIERI et al., 2000).

Os fungos formadores de cogumelos comestíveis formam um grupo altamente degradativo que atuam sobre constituintes maiores de resíduos ligninocelulósicos, como a celulose, a hemicelulose e a lignina (SHISHIDO, 1992).

Atualmente, os maiores usos da celulose concentram-se nas polpas e indústrias de papéis, em meios tecnológicos de alimentação, além de terem enorme potencial para a geração de energia através da produção de etanol. Os fungos do gênero *Pleurotus* realizam a degradação enzimática da porção lignocelulósica dos substratos pela elaboração de diversas enzimas lignocelulolíticas, formando um grupo altamente degradativo, que atuam sobre os constituintes maiores de resíduos ligninocelulósicos, como a celulose, a hemicelulose e a lignina. Estas enzimas possuem grande valor para o mercado biotecnológico, devido à sua aplicação direta nos processos de biopolpação como também para a indústria de alimentos e de produção de etanol (MENEZES, 2007).

Este trabalho objetivou a produção de monômeros de açúcares fermentáveis através das enzimas hidrolíticas produzidas por *P. sp* BCCB068 sob a matriz de celulose (carboximetilcelulose).

2 Metodologia

A metodologia de cultivo utilizada foi recomendada por SILVA (2001). O fungo utilizado foi mantido em tubos de ensaio, contendo o meio de cultivo batata dextrose ágar (BDA-Difco), esterilizado a 121°C por 15 min. Após o crescimento fúngico por 7 dias a 30°C, os tubos foram refrigerados a 4°C. O micélio fúngico cultivado em placa de Petri com agar BDA por 7 dias, foi utilizado como inóculo na forma de discos de 6 mm de diâmetro.

A fermentação submersa foi realizada em frascos Erlenmeyers contendo 30 ml de meio basal (em pH 5,5) adicionado de 1% (m/v) de farelo de arroz. O meio basal apresenta a seguinte composição: 1,4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,0 g/L de KH_2PO_4 ; 0,1 g/L de uréia; 0,3 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g/L de CaCl_2 ; 5,0

mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,56 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 2,0 mg/L de CoCl_2 e 1,4 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a pH 5,5. Os frascos foram fechados e esterilizados a 121°C por 15 minutos.

Após a esterilização os frascos foram inoculados com 3 discos de micélio fúngico (6 mm de diâmetro), foi incubado por 10 dias a 30°C , sem agitação (cultivo estacionário). Foram coletadas amostras em triplicatas. O fluido extracelular cultivado foi centrifugado a 33.450 g, a 4°C por 15 min. Os sobrenadantes foram utilizados como extrato enzimático bruto.

2.1 Determinação da atividade enzimática

As atividades enzimáticas iniciais foram determinadas em espectrofotômetro ultravioleta, acompanhadas por controles (caldos enzimáticos e substratos analisados isoladamente), para descartar possíveis interferentes com os métodos de determinação.

2.1.1 Atividade das enzimas ligninolíticas

As atividades das enzimas lacase (Lac, EC 1.10.3.2) e manganês peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13), foram determinadas, a partir do cálculo da diferença de absorbância, conforme descrito a seguir. Todas as atividades foram expressas em $\text{U/L} \cdot \text{min}^{-1}$ ($\mu\text{moles produto/min.L}$). Os cálculos realizados a partir da equação:

$$\text{U/L} = \Delta \text{ abs} \times 10^6 / \text{E} \times \text{R} \times \text{t} = \text{U/L} \cdot \text{min}^{-1}$$
, onde A, absorbância final - absorbância inicial; E, ϵ (do produto formado); R, quantidade de caldo enzimático (L); t, tempo de reação (minutos).

2.1.1.1 Atividade da lacase

A atividade da lacase foi determinada, utilizando-se siringaldazina como substrato enzimático (SZKLARZ *et al.*, 1989). A oxidação de siringaldazina até sua forma quinona foi acompanhada por 10 minutos a 525 nm, a temperatura ambiente. A mistura da reação foi constituída por 0,6 mL de caldo enzimático, 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0), 0,1 mL água destilada e 0,1 mL de siringaldazina 1,0mM preparada em etanol.

2.1.1.2 Atividade da manganês peroxidase

A atividade de peroxidase dependente de Mn(II), foi determinada pela oxidação de vermelho de fenol (KUWAHARA *et al.*, 1984). A mistura de reação (1,0 mL) foi constituída por 0,5 mL de caldo enzimático, 0,1mL de lactato de sódio 0,25M, 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,05 mL de MnSO_4 2,0 mM, 0,05 mL de uma solução de H_2O_2 2,0 mM preparada em tampão succinato de sódio 0,2 M (pH 4,5) e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%. A mistura foi incubada durante 5 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 40 μL de NaOH 2,0 N, com a leitura em absorbância de 610 nm.

2.1.2 Atividade de enzimas celulolíticas

Nas determinações de carboximetilcelulase e avicelase, a glicose foi utilizada como padrão. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como o número de μmoles de açúcar redutor produzido por minuto por ml de enzima.

2.1.2.1 Atividade de avicase

A atividade de avicelase (EC 3.2.1.91) consiste na adição de 1mL do extrato enzimático bruto em 1 mL de solução 1% de celulose microcristalina (avicel), em tampão acetato 0,05M, pH 5,0 e incubado a 50°C , por 30 minutos. Periodicamente, o sistema sustrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS), de acordo com Miller (1959).

2.1.2.2 Atividade de carboximetilcelulose (CMCase)

A atividade de Carboximetilcelulase (CMCase, EC 3.2.1.4) consiste na adição de 1mL do extrato enzimático bruto em 1 mL de solução de carboximetilcelulose 1% em tampão acetato 0,05M, pH 5,0 e incubado a 50°C, por 30 minutos. Periodicamente, o sistema substrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS), de acordo com MILLER (1959).

2.1.2.3 Atividade da β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase (EC 3.2.1.21) ou mais especificamente aril- β -D-glicosidase foi determinada incubando 1mL do substrato p-nitrofenil- β -D-glicosídeo 0,005M, em tampão acetato 0,05M, pH 5,0 com 0,5 mL de extrato enzimático, por 15 minutos, a 50°C. A reação foi interrompida pela adição de 2,0 mL de bicarbonato de sódio 1,0 M e a absorbância medida a 410 nm. A unidade de atividade enzimática expressa com a liberação de 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto por mL de enzima.

2.1.3 Atividade de enzima xilanolítica

2.1.3.1 Atividade de xilanase

A atividade da enzima xilanase (endo-1,4- β -xilanase, EC 3.2.1.8) foi determinada segundo MILLER (1959). A reação consiste na mistura contendo 1 mL de sobrenadante da cultura (extrato enzimático), 1 mL de solução de 1% de xilana (Sigma) em 0,05 M de tampão acetato pH 5,0, e 2 mL da solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi incubado em 50° C por 30 minutos, e o sistema enzima-substrato foi agitado periodicamente para manter a xilana em suspensão. Os tubos contendo as reações foram lidas em espectrofotômetro em 550nm. Os valores foram expressos em U/mL , onde 1 unidade representa 1 μ mol de xilose produzido por minuto.

2.2 Utilização do hidrolisado em matriz celulósica

Foram utilizados os complexos enzimáticos provindos das 2 linhagens escolhidas no item 4.2.1, estas utilizando farelo de arroz como fonte de carbono para a produção das enzimas lignocelulolíticas (10 dias de incubação). Para tal reação, colocou-se quantidades de hidrolisado na proporção de 1:1 em solução de 1% Carboximetilcelulose, monitorando-se os tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 minutos de incubação, na temperatura fixa de 50°C, coletando alíquotas de cada tempo de reação para análise dos compostos degradados.

A degradação de carboximetilcelulose foi analisada no cromatógrafo Shimadzu LC-6a usando coluna de troca iônica Supelcogel C-610H fase estacionária: poliestireno divinilbenzeno (Supelco). Um volume de 20 μ l foi previamente filtrado em membrana PVDF 0,22 (Milipore) e injetado, usando como fase móvel 0,1% de ácido fosfórico em água deionizada, com uma vazão de 0,5 mL.min⁻¹, utilizando detector de índice de refração RID 10A (Shimadzu), específico para análises de carboidratos e ácidos orgânicos.

3 Resultados e discussão

3.1 Atividade Enzimática

Os resultados mostraram o seguinte perfil do hidrolisado utilizado para a degradação da matriz celulósica: avicelase (0,09 U/mL), carboximetilcelulose (0,07 U/mL), β -glicosidase (0,62 U/mL), Lacase (1,60 U/L), manganês peroxidase (16,32 U/L) e xilanase (0,40 U/mL).

3.2 Utilização do hidrolisado em matriz celulósica

Tabela 1- Degradação de Carboximetilcelulose, produção de oligossacarídeos e monômeros de açúcares do hidrolisado por *Pleurotus sp* BCCB068 no período de 60 minutos.

Mínutos de reação	5	10	15	20	25	30	40	50	60
% degradação de CMC	53%	53%	53%	53%	53%	53%	53%	54,83%	54,83%
oligossacarídeos ^a	+++				++	+++	+++	+	+++
Monômeros de açúcar	Glicose ^b , frutose ^c , celobiose ^d	Maltose ^e	Maltose ^e	Celobiose ^d	Celobiose ^d , frutose ^c	Celobiose ^d		Celobiose ^d , maltose ^e , frutose ^c	Celobiose ^d , xilose ^f , arabinose ^g
Metabólicos não identificados ^h	++	+	++	+++	+++	+	+	+	+

^a Produção expressa em intensidade +/++/+++ através da comparação das áreas dos picos nos cromatogramas

^{b,c,d,e,f,g} Monômeros de açúcar identificados em comparação com os tempos de retenção dos carboidratos padrões dos cromatogramas previamente testados

^h não identificados

Foi detectada a degradação da matriz de CMC (carboximetilcelulose) no 5º minuto de hidrólise, com uma elevada percentagem de degradação de 53% (Tabela 1). Estes níveis se repetiram no 30º minuto com 50,08% e no 50º minuto com a maior entre todas (54,83%). Os tempos 10, 15 e 20 minutos apresentaram sobreposição de picos, devido a produtos formados possuírem o tempo de retenção muito próximo ao do pico padrão de CMC, inviabilizando assim, a leitura da degradação. Com os produtos de degradação da CMC, formaram-se compostos oligossacarídicos, como também compostos monômeros identificados como celobiose, maltose e frutose, e vários compostos não identificados no experimento. A formação dos oligossacarídeos começou desde o 5º minuto, reaparecendo no 25º, 30º e 50º minuto.

Basicamente, 3 classes de enzimas estão envolvidas na biodegradação de celulose. As endoglucanases, que hidrolizam celulose em glucooligossacarídeos. As celobiohidrolases, que liberam celobiose de celulose microcristalina. As β -glicosidases, que degradam os oligossacarídeos em glicose. Todas estas classes de enzimas tem sido frequentemente identificadas na maioria das espécies de fungos (SINGH *et al.*, 1996). O hidrolisado provindo da linhagem *Pleurotus sp* BCCB068 promoveu a degradação da matriz de carboximetilcelulose, utilizando as enzimas identificadas no item 3.1. O hidrolisado com a maior taxa degradativa situou-se no tempo de 50 minutos para *Pleurotus sp* BCCB068 com 54,83% de degradação. Trabalhos conduzidos por SIEGER *et al.* (1995), utilizaram a linhagem *Agrobacterium sp* para degradar carboximetilcelulose, obtendo oligômeros de CMC de diversos graus de polimerização, como também compostos como glicose e celobiose.

4 Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o complexo enzimático produzido pela linhagem *Pleurotus sp* BCCB068 apresentou grande capacidade de degradação da matriz celulósica, gerando pentoses e hexoses potencialmente fermentáveis para a utilização em processos biotecnológicos, como a produção de etanol.

5 Referências bibliográficas

KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. **Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium***. FEBS Letters, v. 169, p. 247-250, 1984.

MENEZES, C. R. **Estudo da atividade prebiótica de hidrolisados lignocelulósicos**. 2007. 215f. Tese de (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

MILLER, G.L. **Use of the dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. Analytical Chemistry, v.31, p.426-428, 1959.

OREHEK, J.; PETER, K.; DOGSA, I.; STOPAR, D.; **New carboxymethyl cellulose tosylate with low biodeterioration**. Carbohydrate Polymers. v.113, p.16-21, 2014.

PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; FONTENELLA, B.; SANNIA, G. **Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus***. Appl and Environmental Microbiology. p.920-924, 2000.

QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N. CHENG, J. QIUGANG, M.. **The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus***. Process Biochemistry. v.39, p. 561-566, 2004.

SHISHIDO, K. **The application of molecular genetics to oriental mushrooms**. Applied molecular genetics of filamentous fungi. London: Blackie Academic and Professional, Chap.9, p.201-213, 1992.

SIEGER, C.H.N.; KROON, A.G.M.; BATELANN, J.G.; VAN GINKEL, C.G. **Biodegradation of carboxymethyl celluloses by *Agrobacterium* CM-1**. Carbohydrate Polymers. v.27, n.2, 137-143, 1995.

SILVA, E.R. **Biodegradação fúngica de resíduos agroindustriais para a produção de biomassa microbiana, enzimas lignocelulolíticas e redução de fitatos**. UNICAMP. Campinas, SP:[s.n], 2001.

SINGH, S.; BRAR, K.; SANDHU, D.K.; KAUR, A.; **Isozyme Polymorphism of cellulases in *Aspergillus terreus***. J. Basic Microbiol. v.36, p.289-296, 1996.

SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A. **Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi**. Mycologia. v.81, p.234-240, 1989.

WYMAN, C.E. **Ethanol production from lignocellulosic biomass: overview**. In: Wyman, C.E. (Ed.), Handbook on bioethanol: production and utilization. Washington, DC:Taylor & Francis, p.11-12, 1996.