

Biotransformação da lignina Kraft pelos isolados fúngicos Br-274 e JUMAD002

RESUMO

Igor Shoiti Shiraishi
igorshiraishi@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Londrina
Londrina, Paraná, Brasil

Robert Frans Huibert Dekker
xylanase@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Londrina
Londrina, Paraná, Brasil

Aneli de Melo Barbosa Dekker
anelibarbosa@gmail.com
Universidade Estadual de Londrina
Londrina, Paraná, Brasil

Juliana Feijó de Souza Daniel
julianasouza@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Londrina
Londrina, Paraná, Brasil

OBJETIVO: Analisar os perfis de metabólitos da biotransformação da Lignina Kraft (LK) pela ação enzimática de dois isolados fúngicos. **MÉTODOS:** Nove fungos foram avaliados, em meio sólido contendo LK, pelos parâmetros: velocidade de crescimento micelial, taxa de inibição e modificações na coloração. Posteriormente, selecionou-se dois fungos para biotransformar a LK em meio líquido por 7, 14 e 21 dias. Para cada tempo, obteve-se um extrato livre de células (ELC), utilizado para determinar a atividade da enzima lacase e o perfil dos metabólitos por cromatografia líquida. **RESULTADOS:** Os resultados demonstraram baixa inibição (8,1%) do crescimento micelial no meio com LK, comparado ao meio com glicose do JUMAD002 e mudanças da coloração. Estudos prévios com o fungo Br-274 relataram capacidade ligninolítica, sendo esses dois microrganismos selecionados. A atividade média da lacase para o Br-274 mostrou-se crescente, com máximo de 9,0 U/mL em 21 dias e 4,0 U/mL para o JUMAD002 aos 14 dias. O perfil de metabólitos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do Br-274 não apresentou compostos diferentes do padrão, indicando a possível degradação completa. Já o JUMAD002 apresentou possíveis metabólitos de degradação. **CONCLUSÕES:** Os resultados obtidos no presente estudo incentivam a identificação dos produtos formados e avaliação da viabilidade da produção em grande escala.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade enzimática. Biorrefinaria. Cromatografia líquida de alta eficiência

1. INTRODUÇÃO

As substâncias presentes na lignina têm grande potencial como matérias-primas em diversos ramos da indústria como: bioenergético, químico, farmacêutico e alimentício. Pouco se sabe sobre a transformação biológica da lignina, sendo os processos químicos mais presentes na literatura. A transformação do polímero por microrganismos tende a agregar grande quantidade de valor ao processo, uma vez que tratamentos biológicos costumam ser menos prejudiciais ao meio ambiente e mais baratos. Isto aumenta a possibilidade de aceitação do processo tanto pela sociedade quanto pela indústria.

Assim, este trabalho tem por objetivo analisar os perfis de metabólitos resultantes da biotransformação da lignina Kraft, a partir da ação enzimática de dois isolados fúngicos.

2. METODOLOGIA

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Os fungos utilizados no estudo, Br-274 e JUANT070 (presentes na micoteca QuiMiBio – UTFPR Londrina) e os novos isolados JUMAD001, JUMAD002, JUMAD003, JUMAD004, JUMAD005, JUMAD006 (material vegetal em decomposição) e JUCAF001 (borra de café), foram reativados em placa de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar). Após crescimento em incubadora BOD por 7 dias, no escuro, 28°C, os fungos foram inoculados em placas com 20 mL de meio sólido Vogel (VOGEL, 1956), 0,3% de glicose e 1,5% de ágar. As placas foram incubadas durante 7 dias, nas mesmas condições descritas.

2.2 ANÁLISE DO CRESCIMENTO EM MEIO SÓLIDO CONTENDO LIGNINA KRAFT (LK)

Discos de 9 mm de diâmetro, contendo o meio sólido coberto por micélio fúngico, foram retirados de placas colonizadas e inoculados no centro de novas placas para a análise do crescimento em meio sólido. A composição do meio foi 20 mL de meio Vogel com 0,3% de LK dissolvida em 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,5% de ágar por placa. Paralelamente, placas contendo 20 mL de meio Vogel com 0,3% de glicose, 2% de DMSO e 1,5% de ágar foram utilizadas como controle. O período de incubação foi de até 7 dias.

A análise do crescimento em meio sólido foi dividida em três parâmetros: velocidade do crescimento micelial, pela mensuração do diâmetro do micélio em quatro eixos, taxa de inibição (TARIQ; YASMIN; HAFEEZ, 2010) e presença de modificações na coloração do meio sólido. A partir desta análise, dois fungos foram selecionados para as etapas seguintes.

2.3 CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO LK

Os fungos selecionados, Br-274 e JUMAD002, foram cultivados em frascos de Erlenmeyer contendo 25mL meio líquido de batata com 0,3% de glicose. Os frascos foram incubados em mesa agitadora à 180 rpm, por um período de 72h e temperatura ambiente. Posteriormente, a biomassa fúngica foi coletada e

homogeneizada em água destilada, formando uma solução de esporos (inóculo). Um volume de 1 mL dessa solução, contendo 20,8 mg de biomassa, foi inoculado em frascos de Erlenmeyers contendo 25 mL de meio Vogel com 0,3% de LK e 2% de DMSO. Os frascos foram incubados à 180 rpm, por um período de 7, 14 e 21 dias e temperatura ambiente. As culturas foram realizadas em triplicata para cada tempo de coleta.

Paralelamente, fez-se os controles dos cultivos, em que as soluções de esporos foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer contendo 25 mL de meio Vogel, 0,3% de glicose e 2% de DMSO. Os controles foram incubados nas mesmas condições descritas para os tratamentos. Após 7, 14 e 21 dias de incubação, o meio líquido contendo foi filtrado, gerando o Extrato Livre de Células (ELC). Uma alíquota de 2 mL de cada ELC foi reservada para a quantificação da atividade enzimática (BARBOSA; DEKKER; HARDY, 1996) enquanto o restante foi utilizado para extração de metabólitos.

2.4 EXTRAÇÃO E GERAÇÃO DO PERFIL DE METABÓLITOS

O ELC de cada tempo de cultivo foi extraído por partição líquido-líquido com acetato de etila (1:1) e seco em rotaevaporador, sendo que as triplicatas foram extraídas como uma única amostra. A massa total de extrato seco, para cada tempo de cultivo, foi dissolvida em 1 mL de metanol grau HPLC e filtrada em filtros de seringa com porosidade de 0,45 μm . O mesmo procedimento de extração e filtração foi realizado para 125 mg da lignina Kraft original, não degradada, posteriormente dissolvida em 2 mL de metanol.

O perfil dos metabólitos extraídos foi obtido por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em um equipamento UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific) pertencente ao Departamento de Química da UTFPR Londrina. A coluna cromatográfica acoplada foi uma C18 Phenomenex de fase reversa, com dimensões de 250 x 4,6 mm. A injeção da amostra foi de 20 μL , ao fluxo de 1mL/min com mistura de duas soluções como eluente: solução A, composta de água com 1% de ácido trifluoracético (TFA) e solução B, composta de acetonitrila com 1% TFA (JARAMILLO-CARMONA et al., 2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE DO CRESCIMENTO EM MEIO SÓLIDO CONTENDO LIGNINA KRAFT (LK)

Um dos fungos selecionados para cultivo em meio líquido, JUMAD002 com provável gênero *Oudemansiella* pelas características morfológicas do cogumelo (GUERRERO; HOMRICH, 1999), apresentou a quinta maior velocidade de crescimento, taxa de inibição de apenas 8,1% e presença de um halo vermelho escuro no meio sólido. O fungo Br-274, também selecionado, apresentou a segunda maior velocidade de crescimento e taxa de inibição de 36,0%. Estudos anteriores com esse fungo comprovaram sua capacidade ligninolítica (BASHTAN-KANDYBOVICH et al., 2012), contribuindo para sua seleção.

3.2 ATIVIDADE DA LACASE

O fungo Br-274 apresentou valores crescentes de atividade de lacase com máximo de 9,0 U/mL aos 21 dias. O resultado positivo quanto à presença da lacase nos tratamentos indica a possibilidade de o microrganismo em estudo ter utilizado essa enzima para biotransformar a lignina Kraft. Além disso, o controle não apresentou atividade enzimática, indicando que a lignina Kraft induziu o fungo a produzir lacase.

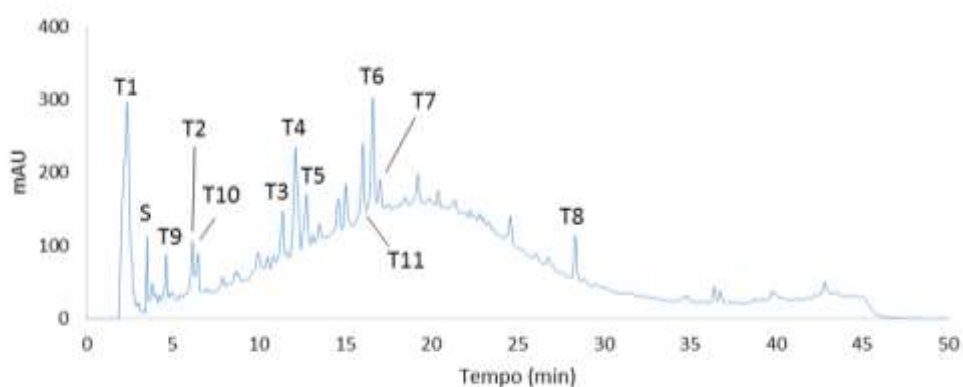
Já o fungo JUMAD002 apresentou máxima atividade de lacase aos 14 dias de cultivo (4,0 U/mL). Resultado semelhante foi relatado por Balaraju e colaboradores (2010), que testaram a produção da enzima por uma cepa de *Oudemansiella radicata*. As amostras de controle apresentaram atividade nula para esse fungo também.

3.2 ANÁLISE DO PERFIL DE METABÓLITOS

Os cromatogramas de tratamento da lignina Kraft pelo fungo Br-274, destacam a presença de sete compostos principais (T1 – T7), todos já presentes no perfil de metabólitos da lignina Kraft sem tratamento. Dessa forma, para a metodologia utilizada, não foi possível a detecção de novos metabólitos, mas sim uma possível degradação completa dos fragmentos do polímero para esse fungo.

O cromatograma da Figura 1, referente ao tratamento da LK com o fungo JUMAD002 aos 21 dias, evidencia três compostos, T9, T10 e T11, exclusivos no experimento com esse fungo. Os respectivos tempos de retenção são 4,47, 6,47 e 15,03 minutos. Esses três compostos representam possíveis metabólitos da biotransformação.

Figura 1 – Cromatograma do extrato do JUMAD002 aos 21 dias



Fonte: Elaborada pelos autores.

Dessa forma, o fungo JUMAD002 apresentou melhores resultados quanto à principal análise proposta: a formação de novos metabólitos a partir da lignina Kraft. Esses metabólitos possuem provável origem da quebra dos compostos da lignina por intermédio da enzima lacase, registrada até 14 dias para o fungo JUMAD002.

Vale destacar os máximos de absorção no espectro de UV-VIS dos novos compostos não se assemelham aos dos principais produtos da degradação da lignina, como o álcool coniferílico, o álcool sinapílico e o ácido trans-cinâmico,

relatados por Jaramillo-Carmona e colaboradores (2008). Também se diferem dos espectros apresentados por Rittsiegl e colaboradores (2002) dos compostos guaiacol, erol e siringaldeído. Assim, há a possibilidade que os compostos formados não tenham sido relatados pela literatura.

Finalmente, os resultados obtidos incentivam futuros estudos com o microrganismo JUMAD002, envolvendo a identificação dos metabólitos formados e sua incubação em grande escala, para produção e purificação dos compostos de interesse.

4. CONCLUSÃO

A presença de possíveis metabólitos pelo tratamento com o fungo JUMAD002 validam os objetivos propostos no estudo e incentivam futuros trabalhos com o microrganismo. Os compostos formados serão identificados com padrões analíticos por CLAE ou espectrometria de massas. Caso os compostos sejam de interesse comercial, pode-se avaliar sua viabilidade na produção em grande escala e validar a técnica à biorrefinaria na indústria.

Biotransformation of Kraft lignin by the fungal isolates Br-274 and JUMAD002

ABSTRACT

OBJECTIVE: To analyze the metabolites profiles from the biotransformation of Kraft Lignin (KL) by the enzymatic action of two fungal isolates. **METHODS:** Nine fungi were evaluated in solid medium containing KL by the following parameters: mycelial growth rate, inhibition rate and changes in coloration. Subsequently, two fungi were selected to biotransform KL in liquid medium for 7, 14 and 21 days. For each time, a cell-free extract (CFE) was obtained and used to determine the activity of laccase enzyme and the profile of the metabolites by liquid chromatography. **RESULTS:** The results showed low inhibition of JUMAD002 (8.1%) in utilizing KL instead of glucose and color changes. Previous studies with the fungus Br-274 reported ligninolytic capacity, being these two microorganisms selected. The mean laccase activity for Br-274 showed to be increasing, with a maximum of 9.0 U / mL in 21 days and 4.0 U / mL for JUMAD002 at 14 days. The metabolite profile of Br-274 did not present different compounds compared to the standard, indicating the possibility of complete degradation. On the other hand, the profile from JUMAD002 presented possible metabolites originated from degradation. **CONCLUSIONS:** The results obtained in the present study encourage the identification of the products formed and evaluation of the viability of production on a large scale.

KEYWORDS: Enzymatic activity. Biorefinery. High Performance Liquid Chromatography.

REFERÊNCIAS

BALARAJU, K.; PARK, K.; JAHAGIRDAR, S.; KAVIYARASAN, V. Production of cellulase and laccase enzymes by *Oudemansiella radicata* using agro wastes under solid-state and submerged conditions. **Research in Biotechnology**, v.1, n.1, p. 408-414, 2010.

BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; HARDY, G.E. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 93-96, 1996.
GUERRERO, R.T.; HOMRICH, M.H. Fungos macroscópicos comuns no Rio Grande do Sul: guia para identificação. ed. 2, Porto Alegre: Ed. Universidade/ UFRGS, 1999.

JARAMILLO-CARMONA, S. et al. Characterization of *Asparagus* Lignin by HPLC. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 7, 2008.

TARIQ, M.; YASMIN, S.; HAFEEZ, F.Y.; Biological control of potato black scurf by rhizosphere associated bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 439-451, 2010.

RITTSIEG, K.; SUURNAKKI, A.; SUORTTI, T.; KRUUS, K.; GUEBITZ, G.; BUCHERT, J. Investigation on the laccase-catalyzed polymerization of lignina model compounds using size-exclusion HPLC. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 403-410, 2002.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microbial Genetics Bulletin**, v.13, p.42-43, 1956.

Recebido: 31 ago. 2017.

Aprovado: 02 out. 2017.

Como citar:

SHIRAISHI, I. S. et al. Biotransformação da lignina Kraft pelos isolados fúngicos Br-274 e JUMAD002. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 18, out. 2017, Londrina. **Anais eletrônicos...** Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: <<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>>. Acesso em: XXX.

Correspondência:

Igor Shoití Shiraishi
Estrada dos Pioneiros, número 3131, Jardim Portal dos Pioneiros, Londrina, Paraná, Brasil.

Direito autoral:

Este resumo expandido está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-NãoComercial 4.0 Internacional.

