

Avaliação da biotransformação de lignina kraft pelo isolado fúngico e análise do perfil de metabólitos

Evaluation of lignin kraft biotransformation by fungal isolate and metabolite profile analysis

RESUMO

O polímero natural lignina representa uma fonte de compostos orgânicos aromáticos de interesse de vários setores da indústria brasileira, podendo ser obtidos por degradações enzimáticas promovidas pela enzima lacase de fungos. Este trabalho visa isolar fungos de madeira em decomposição e avaliar o crescimento em meio sólido contendo lignina (0,5%), acrescidos ou não de glicose (1%), bem como selecionar fungos produtores de lacase constitutiva. Ao total foram isolados e conservados 47 fungos, sendo que os oito microrganismos avaliados em meio sólido apresentaram crescimento mais rápido com a adição da glicose. O isolado fúngico JUMAD053 apresentou os maiores valores de atividade de lacase constitutiva, com 5,37 U/mL, medida a partir do substrato ABTS. Para o substrato DMP, a maior atividade enzimática foi relatada para o isolado JUMAD072b, com 0,16 U/mL. A análise por CLAE indicou a presença de produtos da biodegradação, como o ácido benzoico. Este trabalho contribui para estudos de valorização biológica da lignina, através da utilização dos fungos selecionados na biodegradação e/ou biotransformação da lignina.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade de lacase. Fungos. Biotransformação. Polímero aromático.

Beatriz Redondo Ribeiro
redondoribeirobeatriz@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Londrina, Paraná, Brasil

Juliana Feijó de Souza Daniel
julianafeisouza@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Londrina, Paraná, Brasil

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

Aneli de Melo Barbosa Dekker
anelibarbosa@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

The natural lignin polymer represents a source of aromatic organic compounds of interest in various sectors of Brazilian industry, and can be obtained by enzymatic degradations promoted by the fungal laccase enzyme. This work aims to isolate decaying wood fungi and evaluate the growth in solid medium containing lignin (0.5%), added or not with glucose (1%), as well as selecting constitutive laccase-producing fungi. A total of 47 fungi were isolated and preserved, and the eight microorganisms evaluated in solid medium showed faster growth with the addition of glucose. The fungal isolate JUMAD053 presented the highest values of constitutive laccase activity, with 5.37 U / mL, measured from ABTS substrate. For DMP substrate, the highest enzymatic activity was reported for JUMAD072b isolate, with 0.16 U / mL. HPLC analysis indicated the presence of biodegradation products such as benzoic acid. This work contributes to studies of lignin biological valorization, through the use of the selected fungi in the biodegradation and / or biotransformation of lignina.

KEYWORDS: Laccase activity. Fungus. Biotransformation. Aromatic polymer.

INTRODUÇÃO

A biodiversidade das florestas representa a principal fonte de materiais genéticos, matérias-primas, alimentos e combustíveis na natureza, sendo a madeira um importante recurso renovável, de grande valor ecológico, econômico e social (ZABEL; MORREL, 1992). Os fungos ligninolíticos são importantes agentes no beneficiamento da madeira, pois apresentam um potencial de produção de metabólitos de interesse industrial, a partir da degradação da lignina existente na madeira (RAGAUSKAS et al., 2014).

Para tanto, os fungos ligninolíticos produzem enzimas como a lacase, a manganês peroxidase e a lignina peroxidase (SUKUMARAN; ABRAHAM; MATHEW, 2017). As lacases são enzimas muito versáteis, com capacidade de catalisar a oxidação por transferência de um elétron de fenóis para radicais fenoxila, agindo na degradação de uma variedade de compostos (KADRI et al., 2017). Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar fungos colonizadores da madeira e selecioná-los a partir da atividade da enzima lacase na presença de lignina.

MATERIAL E MÉTODOS

Quarenta e sete isolados fúngicos foram obtidos a partir de basidiocarpos e troncos de árvores em decomposição, coletados em diferentes cidades do Paraná (bioma Mata Atlântica). Os espécimes foram retirados com o auxílio de uma faca e colocados em sacos plásticos. Após assepsia externa com álcool 70% e hipoclorito de sódio, foram inoculados em meio sólido de batata-dextrose-ágar (BDA) e purificados por repiques sucessivos. A conservação foi realizada em frascos com água destilada (CASTELLANI 1967) e tubos com glicerol, mantidos à temperatura ambiente, compondo a micoteca do laboratório QuiMiBio da UTFPR Londrina. Uma cepa de *Neurospora* sp JUANT070, isolada da larva do inseto *Anticarsia gemmatalis* e pertencente à micoteca Quimibio - UTFPR, também foi utilizada neste trabalho.

Para avaliar o potencial de crescimento dos isolados na presença de lignina, bem como a influência da glicose no crescimento dos isolado fúngicos: oito microrganismos previamente selecionados pelo rápido crescimento em meio sólido foram inoculados ao centro da placa e cultivados em 20mL de meio sólido basal de Vogel (VOGEL, 1956) nas três condições abaixo (quintuplicata):

1. Glicose (1%) como única fonte de carbono
2. Lignina (0,5%) e glicose (1%);
3. Lignina (0,5%) como única fonte de carbono;

Os microrganismos foram incubados em BOD, 28°C e durante 7 dias, momento em que os halos de crescimentos dos micélios foram medidos com o auxílio de régua e as taxas de inibição foram calculadas pela equação Inibição (%) = 1 – (tratamento/controle) (TARIQ; YASMIN; HAFEEZ, 2010). Placas controle em

quintuplicata foram acompanhados em caso de contaminação para cada uma das condições.

Posteriormente, os quarenta e sete isolados fúngicos foram avaliados quanto à produção de lacase constitutiva, normal ao metabolismo fúngico. Esses microrganismos foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA durante 7 dias, 28°C, posteriormente, quatro discos (plugs) de 5 mm de diâmetro contendo o micélio dos fungos foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 125 ml contendo 25 ml de meio líquido basal de Vogel enriquecido com glicose (1%), extrato de levedura (1%), agitados à 180 rpm, 28 °C, por um período de 5 dias.

Os cultivos foram filtrados e os sobrenadantes foram utilizados para determinação da atividade de lacase conforme Sacchetto e colaboradores (2018) para o substrato 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6- sulfônico) (ABTS) e conforme Martinez e colaboradores (2009) para 2,6-dimetoxifenol (DMP).

Nos ensaios de biotransformação, o isolado fúngico JUMAD053 foi cultivado conforme as duas condições otimizadas neste estudo: 1,125% de extrato de levedura, 0,5% de lignina Kraft e 10 dias de cultivo para ABTS e 1,125% de extrato de levedura, 0,25% de lignina Kraft e 7 dias de cultivo para DMP. Os testes foram realizados em quintuplicata. Posteriormente, os cultivos foram centrifugados à 6000 rpm durante 10 minutos e filtrados em papel Whatmann n. 5. Os micélios foram extraídos com 10 mL de acetato de etila enquanto os sobrenadantes foram submetidos à precipitação ácida: adição de ácido clorídrico até pH 2 e deixados estáticos durante 12 horas, 7°C (VELIOGLU; UREK, 2014). Os precipitados foram extraídos com 20 mL de metanol: clorofórmio (2:1) enquanto os sobrenadantes foram extraídos três vezes com acetato de etila (1:1).

Os perfis de metabólitos da lignina foram determinados por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um equipamento UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific), software Chromeleon, pertencente ao Departamento de Química da UTFPR Londrina. Foram utilizados os padrões analíticos: 2,6-dimetoxibenzaldeído, ácido benzoico, ácido ferúlico, ácido p-coumárico, ácido siríngico, álcool vanílico, veratraldeído. Foi utilizada uma coluna cromatográfica 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 fase móvel: solução A, composta de água com 1 mM de ácido trifluoracético (TFA) e solução B, composta de acetonitrila (JARAMILLO-CARMONA et al., 2008). O tempo total de análise foi de 60 minutos por amostra, sendo que os compostos foram caracterizados pelos seus espectros na faixa da luz ultravioleta e visível (UV-VIS), em 220, 272, 289 e 309 nm. Os extratos secos dos micélios, precipitados e sobrenadantes, obtidos na etapa 4.6, foram dissolvidas em 1 mL de metanol grau HPLC e filtradas em filtros de seringa Agilent com porosidade de 0,45 µm, de forma a identificar a presença dos metabólitos destacados anteriormente.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste trabalho, 47 fungos de madeira e potenciais degradadores da lignina foram isolados e conservados. Os halos de crescimento dos oito isolados fúngicos são apresentados na Tabela 1. Para todos os microrganismos avaliados, a glicose

mostrou-se um importante fator de desenvolvimento, uma vez que todos os halos de crescimento foram maiores com sua presença. Estudos realizados por Silva e colaboradores (2009) demonstraram que a glicose (1%) foi um importante fator para o aumento da biomassa do basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, avaliado na biodegradação do composto 2,4-diclorofenol.

Tabela 1 – Halos de crescimento dos isolados fúngicos avaliados em meio sólido de Vogel contendo glicose 1% (condição 1), glicose 1% e lignina 0,5% (condição 2) e lignina 0,5% (condição 3).

Isolado Fúngico	Halo(cm)		
	Glicose (1%)	Lignina (0,5%) e glicose (1%)	Lignina (0,5%)
JUMAD042b	5,2	6,2	4,8
JUANT070	9,6	9,7	8,8
JUMAD053	9,0	8,6	5,6
JUMAD066	9,0	8,3	4,4
JUMAD054	9,1	8,1	5,4
JUMAD075	4,1	3,5	2,7
JUMAD002	6,1	3,6	2,6
JUMAD072a	6,9	3,8	2,7

Os valores de inibição, quando comparadas as condições 1 e 2, foram nulos para os isolados JUMAD042b e JUANT070, os quais apresentaram maiores halos de crescimento na presença de lignina, não sendo inibidos pela presença do polímero. Os isolados JUMAD053 e JUMAD066 também apresentaram baixos valores de inibição: 4,4 e 7,7%, respectivamente.

A produção de lacase dos quarenta e sete isolados fúngicos foi avaliado utilizando-se os substratos ABTS e DMP. Os resultados das atividades de lacase dos melhores produtores de enzima estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade de lacase medida com os substratos ABTS e DMP dos isolados fúngicos. A atividade de lacase é expressa pelo número de micromols oxidados do substrato por minuto (U/mL).

Isolado Fúngico	Atividade em ABTS (U/ml)	Atividade em DMP(U/ml)
JUMAD053	5,37	0,01
JUMAD026b	0,36	0,08
JUMAD002	0,32	0,03
JUMAD072b	0,15	0,16
JUMAD042a	0,06	0,03

O isolado fúngico que se destacou como melhor produtor de lacase constitutiva medida pelo substrato ABTS foi o JUMAD053 (5,37 U/mL) e para o substrato DMP o melhor resultado foi dado pelo isolado JUMAD072B (0,16 U/mL). Comparando os dados com o estudo realizado por Martinez e colaboradores (2009), os cultivos agitados do isolado *Pleurotus ostreatus*, um basidiomiceto produtor de lacase, obtiveram uma produção de lacase constitutiva de 0,27 U/mL para ABTS e 0,06 U/mL para DMP. Vasconcelos e

colaboradores (2000) relataram atividade de lacase na faixa de 5,6 U/mL para uma cepa de *Botryosphaeria rhodina*, induzida pelo álcool veratrílico.

O fungo JUMAD053 apresentou mostrou-se um isolado de grande interesse, tendo apresentado boa velocidade de crescimento em meio sólido contendo lignina como indutor presente no meio, além da maior atividade de lacase constitutiva para ABTS. Levando-se em conta que a produção de lacase pode aumentar dependendo dos nutrientes presentes, e por indução da lignina, estudos de otimização desses constituintes serão realizados com o isolado JUMAD053, considerando seu potencial de biodegradação do polímero.

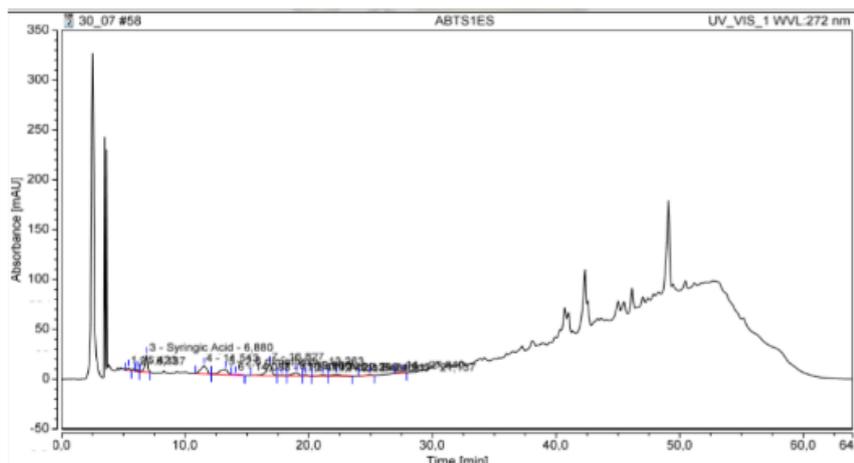
Os cromatogramas apresentaram alguns picos nas amostras de lignina kraft tratada pelo isolado JUMAD053, sendo que os extratos dos sobrenadantes, otimizados para ABTS, revelaram a presença exclusiva de ácido benzoico.

Tabela 3 – Áreas obtidas para o composto ácido benzoico (tempo de retenção: 21,140 min) em suas respectivas amostras.

Amostra	Área (m AU)	Área relativa (%)
MC+Lignina+fungo	0,74±0,22	3,14±0,91
MC+Fungo	0	0
MC+Lignina	0	0
MC	0	0

MC= meio de cultivo

Figura 1 – Cromatograma da lignina kraft tratada pelo isolado JUMAD053, extrato obtido a partir do sobrenadante em condições otimizadas para ABTS.



Fonte: Próprio autor.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, 47 fungos de madeira e potenciais degradadores da lignina foram isolados e conservados. Os resultados mostraram que a glicose é uma importante fonte de carbono para os microrganismos na colonização de meio sólido enriquecido com lignina, além disso, os isolados JUMAD042b e JUANT070 não foram inibidos pela presença desse polímero. Dentre os isolados fúngicos avaliados, o fungo JUMAD053 destacou-se pela atividade de lacase constitutiva de 5,37 U/mL, medida pelo substrato ABTS, enquanto o fungo JUMAD072b

demonstrou a maior atividade enzimática para o substrato DMP, com 0,16 U/mL. Este estudo traz contribuições significativas para futuras pesquisas, que podem otimizar as condições de cultivo para produção de enzimas dos microrganismos aqui selecionados e aplicar no beneficiamento da lignina.

AGRADECIMENTOS

A Prof Dr^a Juliana Feijó pelo apoio dedicado à elaboração deste trabalho, colaboração do aluno de mestrado Igor Shoiti Shiraishi do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal Do Paraná. A Fundação Araucária pela bolsa concedida para execução e realização do projeto.

REFERÊNCIAS

CASTELLANI, A. **Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in sterile distilled water.** Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.70, p. 181-184, 1967

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

KADRI, T. et al. **Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review.** Journal of Environmental Sciences (China), v. 51, p. 52-74, 2017.

MARTINEZ et al. **Seleção de isolados de Colletotrichum da biodiversidade da Amazônia como produtores de lacases utilizando uma metodologia simplificada.** Semina: Ciências Agrárias, v. 30, n. 2, p. 397-406, 2009.

RAGAUSKAS, A. et al. **Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery.** Science, v. 344, n.6185, p. 1246843, 2014.

SACCHETTO, J.P. et al. **Botryosphaeria spp. as Producers of Laccase When Cultivated on Vegetable Oils as Sole Carbon Source: Optimizing Laccase Production by Botryosphaeria rhodina MAMB-05 on Soybean Oil.** Orbital: The Electronic Journal of Chemistry, v. 10, n. 7, p. 568-577, 2018.

SUKUMARAN, R. K.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K. **Enzymes for Bioenergy.** In: SUGATHAN, S.; PRADEEP, N. S.; ABDULHAMEED, S. (Ed.). Bioresources and Bioprocess in Biotechnology. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 3–43.

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.

VASCONCELOS, A.F.D. et al. **Optimization of laccase production by Botryosphaeria sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method.** Process Biochemistry, v. 35, n. 10, p. 1131-1138, 2000.

VELIOGLU, Z.; UREK, R.O. **Concurrent Biosurfactant and Ligninolytic Enzyme Production by Pleurotus spp. In Solid-State Fermentation.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 174, p. 1354-1364, 2014

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

ZABEL, R. A.; MORREL, J. J. **Wood Microbiology Decay and Its Prevention.** United States: Harcourt Brace Jovanovich, 1992.