

Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal

Characterization of fungi isolated from the Amazon region for the potential of biomass-degrading enzymes production

Rosângela Donizete Perpetua Buzon Pirota^{I,II} Mariana Tonelotto^{I,II}
Priscila da Silva Delabona^{II,III} Célia Regina Tremacoldi^{IV} Cristiane Sanchez Farinas^{I*,II}

RESUMO

A conversão da biomassa vegetal proveniente de resíduos agroindustriais e florestais em biocombustíveis e bioprodutos, dentro do conceito de biorrefinarias, é de grande interesse, principalmente para o Brasil, onde a agroenergia possui um enorme potencial de desenvolvimento. Entretanto, para garantir a viabilidade do processo de conversão, é fundamental reduzir o custo das enzimas utilizadas na etapa de hidrólise. Para isso, deve-se dispor da peça chave deste processo, que é o microrganismo. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar fungos isolados da região Amazônica em relação ao potencial de produção das enzimas celulases e xilanases. De um total de 40 isolados cultivados por fermentação em estado sólido (FES), durante 10 dias, os fungos que se destacaram quanto à produção de endoglucanase (351,79Ug⁻¹ em 120h) e β -glicosidase (62,31Ug⁻¹ em 72h) foi o P47C3 (*A. niger*), e na produção de xilanase (1076,94Ug⁻¹ em 72h) e FPase (2,46Ug⁻¹ em 120h) foram o P6B2 (*A. oryzae*) e o P40B3, respectivamente. Os resultados obtidos demonstram o enorme potencial de aplicação das enzimas produzidas pelos fungos isolados da Amazônia, contribuindo, assim, para gerar os avanços tecnológicos necessários para o aumento da eficiência do uso da biomassa vegetal como fonte de energia renovável.

Palavras-chave: Amazônia, enzimas, celulases, xilanases, fermentação em estado sólido, agroenergia.

ABSTRACT

The conversion of biomass from forestry and agro-industrial residues into biofuels and bioproducts, within the biorefinery concept, is of great interest, especially to Brazil, where bioenergy has a huge potential for development. However, to ensure the viability of the conversion process it is essential to reduce the cost of the enzymes used in the hydrolysis step. For this, one must have the key element of this process, which is the microorganism.

In this context, the objective of this study was to evaluate different fungi isolated from the Amazon region for their potential in terms of the production of cellulase and xylanase enzymes. Of a total of 40 strains cultivated under solid state fermentation (SSF) for 10 days, the strain that stood out for the production of endoglucanase (351.79Ug⁻¹120h) and β -glucosidase (62.31Ug⁻¹ at 72h) was P47C3 (*A. niger*) whereas for xylanase (1076.94Ug⁻¹ in 72 hours) and FPase (2.46Ug⁻¹ in 120 hours) were P6B2 (*A. oryzae*) and P40B3, respectively. These results demonstrate the great potential application of the enzymes produced by the Amazon isolated fungi, thus contributing to generate the necessary technological advances in order to increase the efficiency of the use of biomass as a renewable energy source.

Key words: Amazon, enzymes, cellulases, xylanases, solid-state fermentation, bioenergy.

INTRODUÇÃO

Em um país como o Brasil, onde a agricultura é a principal atividade econômica, os resíduos e subprodutos agrícolas, agroindustriais e florestais são extremamente abundantes. A conversão dessa biomassa vegetal em produtos de valor comercial poderá, além de contribuir para a remoção de poluentes ambientais, trazer grandes dividendos à economia. Dessa forma, uma das possibilidades promissoras de utilização desses materiais lignocelulósicos é a sua conversão em biocombustíveis e outros bioprodutos, dentro do conceito de biorrefinarias (KAMM & KAMM, 2004).

^IEmbrapa Instrumentação, CP 741, 13560-970, São Carlos, SP, Brasil. E-mail: cristiane.farinas@embrapa.br. *Autor para correspondência.

^{II}Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPG-Biotec), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil.

^{III}Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), Campinas, SP, Brasil.

^{IV}Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, Brasil.

No entanto, para garantir a viabilidade econômica do processo de conversão, é fundamental reduzir o custo das enzimas utilizadas na etapa de hidrólise da biomassa. Para isso, deve-se dispor da peça chave desse processo, que é o microrganismo produtor de enzimas.

A seleção de microrganismos produtores das enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal, como as celulasas e xilanases, é uma das possíveis estratégias para contribuir com a viabilização da produção do etanol celulósico. Nesse sentido, o Brasil se destaca em biodiversidade, tendo um vasto campo a ser explorado na busca de microrganismos que apresentem as características desejadas para tal aplicação. Dentre os diferentes biomas do país, o bioma Amazônico representa uma fonte em potencial de microrganismos, devido às suas condições edafoclimáticas peculiares, que propiciam a constante degradação da biomassa rasteira da floresta. Apesar desse enorme potencial, a literatura relacionada a esse tema ainda é bastante escassa. MEDEIROS et al. (2003) isolaram 10 espécies de fungos da floresta Amazônica e avaliaram sua capacidade de produzir as enzimas xilanases durante o crescimento em meio líquido. SOUZA et al. (2008) estudaram a produção de enzimas por linhagens de Basidiomicetos oriundas de áreas de floresta da Amazônia, sendo possível detectar a produção de celulasas e proteases por todos os isolados. Além disso, 40% das linhagens produziram amilases, 50% produziram fenoloxidasas e 10% produziram pectinases. DURAN et al. (1995) utilizaram a técnica de triagem em placas para avaliar a atividade de xilanase produzida a partir de 18 espécies de *Penicillium* e 10 espécies de *Aspergillus*, isolados da região Amazônica. No entanto, o número de isolados avaliados nesses trabalhos é ainda pequeno, comparado ao potencial que o bioma Amazônico oferece.

As tecnologias existentes para a produção de enzimas por microrganismos utilizam processos fermentativos que podem ser conduzidos tanto no estado líquido, chamados de fermentação submersa (FS), como também no estado sólido, chamados de fermentação em estado sólido (FES). O uso da FES tem se mostrado particularmente vantajoso para o crescimento de fungos filamentosos, uma vez que simula o habitat natural desses microrganismos. Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando uma maior produtividade, quando comparada à FS (HOLKER et al., 2004). No entanto, não há ainda relatos de estudos que tenham buscado aliar as vantagens dos cultivos em estado sólido para a caracterização abrangente de fungos isolados do bioma Amazônico em

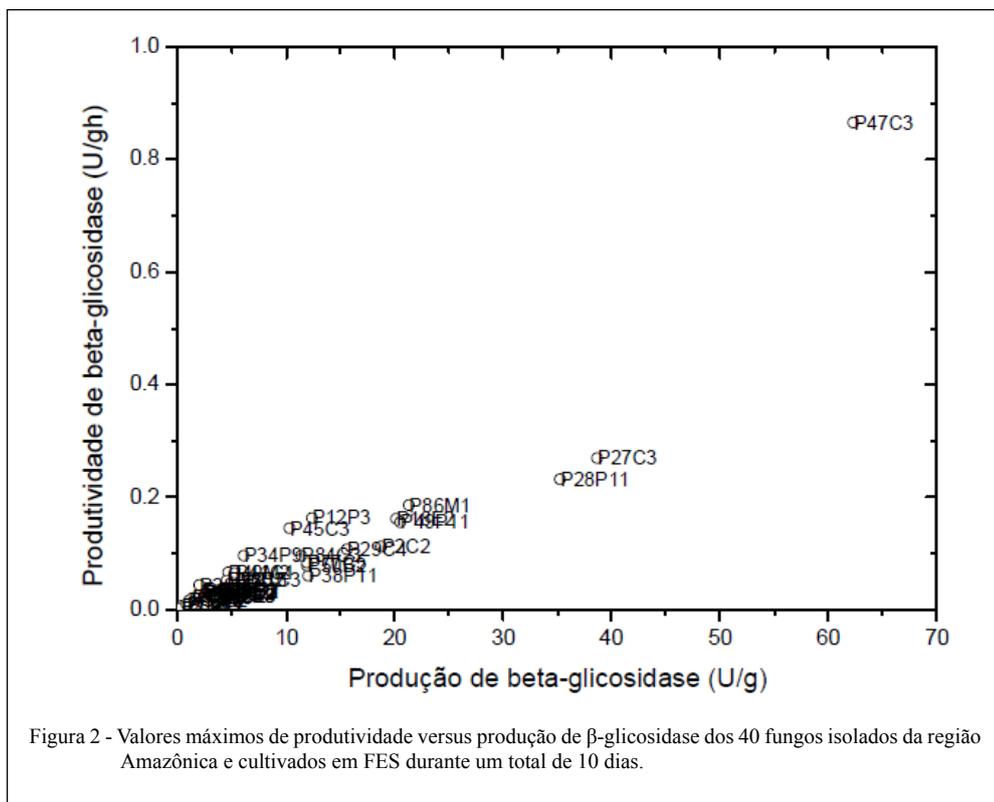
relação ao potencial de produção das enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal.

Embora seja muitas vezes considerado que biomassa vegetal possui uma composição uniforme, pode haver uma substancial diversidade na sua composição. Compatível com a diversidade na composição da biomassa vegetal, os microrganismos evoluíram inúmeras estratégias para atacar os componentes da parede celular, apresentando, assim, um arsenal enzimático capaz de realizar a degradação da biomassa vegetal. Esse complexo de enzimas é necessário, devido à elevada recalcitrância dos materiais lignocelulósicos, sendo que esses coquetéis enzimáticos possuem celulasas, hemicelulasas, pectinases e outras enzimas acessórias atuando de forma sincronizada e sinérgica no processo de degradação (LYND et al., 2002). As celulasas formam um complexo de enzimas que atua na conversão do polímero insolúvel de celulose em açúcares fermentescíveis. O mecanismo de hidrólise enzimática da celulose mais aceito descreve a ação sinérgica de pelo menos três classes de enzimas: as endoglucanases, as exoglucanases e as β -glicosidasas ou celobiasas (ZHANG & LYND, 2004). As xilanases (endo-1,4- β -xilanase) são as enzimas responsáveis pela degradação da xilana, que é tipo mais abundante de hemicelulose (DODD & CANN, 2009). Além disso, as enzimas celulasas e xilanases possuem uma ampla variedade de aplicações biotecnológicas nas indústrias de alimentos, ração animal, têxteis, papel e celulose e outros setores (BHAT, 2000).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar 40 isolados de fungos da Floresta Amazônica em relação ao potencial de produção das enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal. Para isso, os 40 isolados foram cultivados em fermentação em estado sólido (FES) durante 10 dias e os extratos enzimáticos produzidos durante esse período foram quantificados em termos das atividades de endoglucanase, β -glicosidase, FPase e xilanase e comparados em termos dos parâmetros produção e produtividade enzimática.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 40 isolados de fungos foi avaliado quanto à produção (U/g de substrato) e produtividade enzimática (Ug⁻¹ h) em FES. Os fungos avaliados foram isolados do solo e de madeira em decomposição da região Amazônica, conforme descrito em (DELABONA et al., 2012). Os isolados são mantidos em placas em meio PDA à temperatura ambiente.



Com relação ao perfil da atividade de endoglucanase (Figura 1), pode-se observar que duas linhagens se destacaram em termos de produção e produtividade: a linhagem P40M2 ($294,33\text{Ug}^{-1}$ após 24h de cultivo) e a linhagem P27C3 ($242,12\text{Ug}^{-1}$ após 24h de cultivo). Essas duas linhagens foram identificadas em um trabalho anterior (DELABONA et al., 2012), sendo a linhagem P40M2 pertencente à espécie *Aspergillus fumigatus* e a P27C3 pertencente à espécie *Aspergillus oryzae*. A linhagem P47C3, identificada como *Aspergillus niger*, também se destacou em termos da produção de endoglucanase ($351,79\text{Ug}^{-1}$). No entanto, esse valor foi obtido somente após 120h de cultivo, comprometendo a eficiência em termos do parâmetro produtividade. SONI et al.(2010) obtiveram uma produção máxima de endoglucanase pelo fungo *A. fumigatus* de $98,5\text{Ug}^{-1}$ em um estudo de seleção de substratos. Após a otimização das condições de cultivo, a atividade de endoglucanase aumentou para $240,2\text{Ug}^{-1}$ após 120 horas de cultivo. GRIGOREVSKI-LIMA et al. (2009) obtiveram atividade de endoglucanase pelo *A. fumigatus* de $21,06\text{Ug}^{-1}$ após 96 horas de FES, utilizando uma combinação de bagaço de cana e água de maceração de milho como substrato. DHILLON et al.(2011)

obtiveram uma atividade máxima de endoglucanase de $48,2\text{Ug}^{-1}$ após 120 horas de FES em farelo de trigo, utilizando o fungo *A. niger*. Como se pode observar, os valores reportados neste trabalho para as atividades de endoglucanase foram significativamente superiores aos relatados na literatura. Além disso, a maioria dos fungos avaliados apresentou atividades máximas de endoglucanase em períodos de cultivo entre 72 e 120 horas, caracterizando uma vantagem em termos de aplicação destes fungos na produção dessas enzimas.

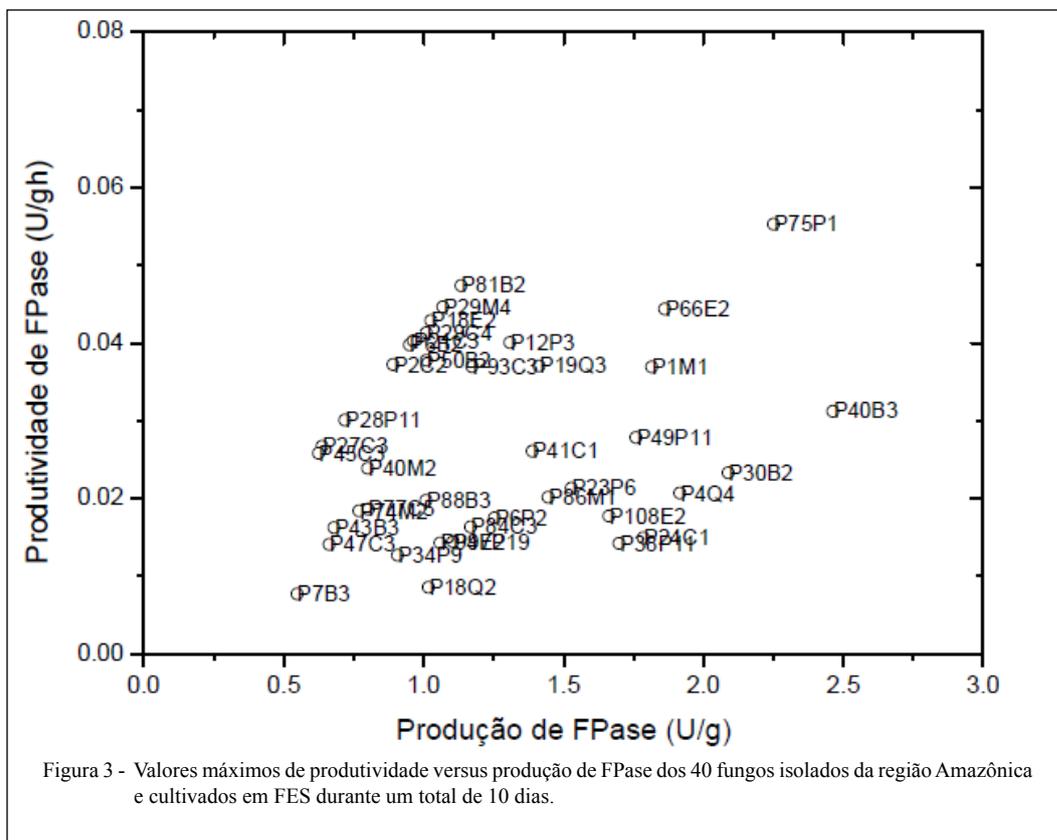
Em termos da atividade de β -glicosidase (Figura 2), a linhagem P47C3 (*A. niger*) destacou-se consideravelmente com relação tanto à produção quanto à produtividade, com valores de β -glicosidase de $62,31\text{Ug}^{-1}$ (após 72h de cultivo) e $0,87\text{Ug}^{-1}\text{h}$, respectivamente. Todas as outras linhagens avaliadas apresentaram valores de produção inferiores a 40Ug^{-1} . Da mesma forma que para a atividade de endoglucanase, os resultados obtidos para a atividade de β -glicosidase foram superiores ou da mesma ordem de grandeza aos relatados na literatura. GUPTE & MADAMWAR(1997) avaliaram o cultivo isolado dos fungos *A. ellipticus* e *A. fumigatus* e obtiveram valores máximos de atividade de β -glicosidase de $11,75$ e $7,65\text{Ug}^{-1}$, respectivamente, após 8 dias de cultivo em FES. DHILLON et al. (2011) obtiveram

uma atividade máxima de β -glicosidase de $21,69\text{Ug}^{-1}$ após 96 horas de FES em farelo de trigo, utilizando o fungo *A. niger*. GAO et al. (2008) reportaram valores de β -glicosidase de 128Ug^{-1} após 96 horas de cultivo do fungo *A. terreus* M11 em FES. Apesar de o fungo *Trichoderma reesei* ser um dos microrganismos mais estudados em relação à produção de celulases, uma vez que produz altas concentrações do complexo enzimático hidrolítico, a quantidade de β -glicosidase contida no complexo é relativamente baixa, acarretando uma desvantagem do ponto de vista do processo de sacarificação (KIM et al., 1997). Nesse sentido, a utilização do fungo *Aspergillus niger* tem sido apontada como alternativa para superar esta desvantagem, podendo ser avaliada em fermentações com culturas simples ou em co-culturas. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho destacam a linhagem P47C3 (*A. niger*) como potencial para a produção de β -glicosidase, uma vez que este fungo apresentou um valor bastante interessante em termos de atividade em um tempo de cultivo de 72 horas.

Quanto à atividade de FPase (Figura 3), a linhagem P75P1 se destacou em relação às demais linhagens em termos de produção ($2,25\text{Ug}^{-1}$ após 120h de cultivo) e produtividade ($0,058\text{Ug}^{-1}\text{h}$). SONI et al. (2010) reportaram uma produção de FPase pelo *A.*

fumigatus de $3,37\text{Ug}^{-1}$ após 120 horas de cultivo em FES em um estudo de seleção de substratos. GUPTA & MADAMWAR (1997) avaliaram o cultivo isolado dos fungos *A. ellipticus* e *A. fumigatus* e obtiveram valores máximos de atividade de FPase de 2,1 e $3,75\text{Ug}^{-1}$, respectivamente, após 8 dias de cultivo em FES. Os valores reportados no presente trabalho em termos de atividade de FPase são, portanto, da mesma ordem de grandeza ou superiores dos valores reportados na literatura, sendo que a maioria dos isolados avaliados apresentou atividades máximas para FPase em períodos de cultivo entre 24 e 72 horas.

Na figura 4, pode-se observar que, dos 40 isolados avaliados, o P6B2 (*A. oryzae*) foi o que apresentou a maior produção ($1076,94\text{Ug}^{-1}$ após 72h de cultivo) e produtividade ($34,85\text{Ug}^{-1}\text{h}$) em termos da enzima xilanase. Muitas espécies de *Aspergillus* são reportadas na literatura como boas produtoras de xilanase. DHILLON et al. (2011) reportaram uma produção máxima de xilanase de $2604,06\text{Ug}^{-1}$ após 96 horas de cultivo do *A. niger* em FES. COURI et al. (2000) obtiveram $76,55\text{Ug}^{-1}$ de xilanase após 42 horas de cultivo FES de uma linhagem mutante do fungo *A. niger* (3T5B8), utilizando farelo de trigo como substrato. MAMMA et al. (2008), utilizando



das enzimas produzidas pelos fungos isolados da região Amazônica, contribuindo, assim, para gerar os avanços tecnológicos necessários para o aumento da eficiência do uso da biomassa vegetal como fonte de energia renovável.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, e ao pesquisador Dr. Paulino R. Villas Boas, pelo auxílio na análise dos dados e elaboração das figuras; ao prof. Dr. André Rodrigues, pelo auxílio na identificação dos isolados.

REFERÊNCIAS

- BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.18, n.5, p.355-383, 2000. ISSN 0734-9750. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975000000410>>. Acesso em: 25 fev. 2015.
- COURI, S. et al. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v.36, n.3, p.255-261, 2000. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003295920002090>>. Acesso em: 25 fev. 2015.
- DELABONA, P. et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass & Bioenergy**, v.37, p.243-250, 2012. ISSN 0961-9534.
- DHILLON, G.S. et al. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, v.34, n.1, p.1160-1167, 2011. ISSN 0926-6690. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669011001117>>. Acesso em: 25 fev. 2015.
- DODD, D.; CANN, I. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global Change Biology Bioenergy**, v.1, n.1, p.2-17, 2009. ISSN 1757-1693.
- DURAN, N. et al. Amazonian lignocellulosic materials - screening of xylanolytic fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.53, n.2, p.155-162, 1995. ISSN 0273-2289. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9712586>>. Acesso em: 25 fev. 2015.
- GAO, J. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v.99, n.16, p.7623-7629, 2008. ISSN 0960-8524.
- GHOSE, T. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, n.2, p.257-268, 1987. ISSN 0033-4545.
- GRIGOREVSKI-LIMA, A.L. et al. *Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglucanases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.155, n.1-3, p.321-329, 2009. ISSN 0273-2289. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19127443>>. Acesso em: 25 fev. 2015.
- GUPTE, A.; MADAMWAR, D. Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulase and beta-glucosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. **Biotechnology Progress**, v.13, n.2, p.166-169, 1997. ISSN 8756-7938. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1021/bp970004g/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+disrupted+on+21st+March+from+10%3A30+GMT+%2806%3A30+EDT%29+for+up+to+six+hours+for+essential+maintenance.+Apologies+for+the+inconvenience.>>>. Acesso em: 25 fev. 2015.
- HOLKER, U. et al. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, n.2, p.175-186, 2004. ISSN 0175-7598.
- HU, H. et al. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.65, p.248-252, 2011.
- KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, n.2, p.137-145, 2004. ISSN 0175-7598.
- KIM, S.W. et al. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**, v.59, n.1, p.63-67, 1997. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852496001277>>. Acesso em: 25 fev. 2015.
- LYND, L. et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, n.3, p.506, 2002. ISSN 1092-2172.
- MAMMA, D. et al. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. **Bioresource Technology**, v.99, n.7, p.2373-2383, 2008. ISSN 0960-8524.
- MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulase technology. **Journal of Fermentation Technology**, v.54, n.4, p.267-286, 1976. ISSN 0385-6380.
- MEDEIROS, R.G. et al. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.52, n.2, p.97-100, 2003. ISSN 0964-8305. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830502001798>>. Acesso em: 25 fev. 2015.
- MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959. ISSN 0003-2700.
- SONI, R. et al. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. **Industrial Crops and Products**, v.31, n.2, p.277-283, 2010. ISSN 0926-6690. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669009002283>>. Acesso em: 25 fev. 2015.
- ZHANG, Y.; LYND, L. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.88, n.7, p.797-824, 2004. ISSN 0006-3592.