

## Enzimas oxidativas microbianas envolvidas na biodegradação da lignocelulose: produção, características bioquímicas e importância biotecnológica





**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Agrobiologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

# **Documentos 284**

## **Enzimas oxidativas microbianas envolvidas na biodegradação da lignocelulose: produção, características bioquímicas e importância biotecnológica**

*Dayana da Silva Correia  
Flávia Hermelina da Rocha Santos  
Luis Henrique de Barros Soares  
Maria Elizabeth Fernandes Correia*

Embrapa Agrobiologia  
Seropédica, RJ  
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Agrobiologia**

BR 465, km 7, CEP 23.851-970, Seropédica, RJ

Caixa Postal 74505

Fone: (21) 3441-1500

Fax: (21) 2682-1230

Home page: [www.cnpab.embrapa.br](http://www.cnpab.embrapa.br)

E-mail: [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)

**Comitê de Publicações**

Presidente: Norma Gouvêa Rumjanek

Secretária-Executivo: Carmelita do Espírito Santo

Membros: Bruno José Alves, Ednaldo da Silva Araújo, Guilherme

Montandon Chaer, José Ivo Baldani, Luis Henrique de Barros Soares

Normalização bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo

Tratamento de ilustrações: Maria Christine Saraiva Barbosa

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

Foto da capa: Maria Elizabeth Fernandes Correia

**1ª edição**

1ª impressão (2011): 50 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Agrobiologia**

---

E61 ENZIMAS oxidativas microbianas envolvidas na biodegradação da lignocelulose: produção, características bioquímicas e importância biotecnológica / Dayana da Silva Correia et al. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2011. 34 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 284).

ISSN: 1517-8498

1. Peroxidases. 2. Biocatalisadores. 3. Lignocelulose.

4. Bioenergia. I. Santos, Flávia Hermelina da Rocha.

II. Soares, Luis Henrique de Barros. III. Correia, Maria Elizabeth Fernandes. IV. Embrapa Agrobiologia. V. Série.

572.56682 CDD 23. ed.

# **Autores**

## **Dayana da Silva Correia**

Doutoranda em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. E-mail: dayanasc\_bio@hotmail.com

## **Flávia Hermelina da Rocha Santos**

Acadêmica de Zootecnia, UFRRJ, Bolsista PIBIC/CNPq - Embrapa Agrobiologia.  
E-mail: flazootecnista@hotmail.com

## **Luis Henrique de Barros Soares**

Pesquisador da Embrapa Agrobiologia.  
E-mail: luis.henrique@cnpab.embrapa.br

## **Maria Elizabeth Fernandes Correia**

Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia.  
E-mail: ecorreia@cnpab.embrapa.br



# Apresentação

As atitudes de usar com responsabilidade os recursos naturais (solo, água, ar, flora, fauna, energia), de preservar e conservar a natureza são cada vez mais necessárias para a sociedade moderna acarretando em uma busca constante por sistemas de produção agropecuários apoiados em princípios ecológicos e naturais.

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia construiu o seu atual plano diretor de pesquisa, desenvolvimento e inovação, com a seguinte missão: “gerar conhecimentos e viabilizar tecnologias e inovação apoiados nos processos agrobiológicos, em benefício de uma agricultura sustentável para a sociedade brasileira”.

A série documentos nº 284 apresenta uma revisão sobre algumas características da composição da biomassa vegetal e os mecanismos biológicos enzimáticos gerados por microrganismos para a sua decomposição. Os compostos lignocelulósicos possuem uma função estrutural e são resistentes à degradação. Por isso, torna-se importante conhecer como essas enzimas atuam e podem se complementar de forma a aumentar a eficiência e acelerar os processos para obtenção de subprodutos da partição dos lignocelulósicos. O desenvolvimento de misturas enzimáticas mais eficazes possui um interesse estratégico para a geração de produtos biotecnológicos com ampla aplicação

na agricultura e na geração de energia. Esta publicação contém um material de leitura de interesse para estudantes, técnicos e pesquisadores que queiram ampliar seus conhecimentos sobre atuação dos mecanismos enzimáticos produzidos por microrganismos na degradação da biomassa vegetal.

*Eduardo Francia Carneiro Campello*  
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

# Sumário

<b>Introdução</b> .....	9
<b>Componentes da biomassa lignocelulósica</b> .....	11
Celulose .....	11
Hemicelulose .....	12
Lignina .....	14
<b>Enzimas oxidativas</b> .....	15
Lignina peroxidase .....	18
Manganês peroxidase .....	20
Lacase .....	23
Peroxidase versátil .....	24
<b>Considerações finais</b> .....	25
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	26



# **Enzimas oxidativas microbianas envolvidas na biodegradação da lignocelulose: produção, características bioquímicas e importância biotecnológica**

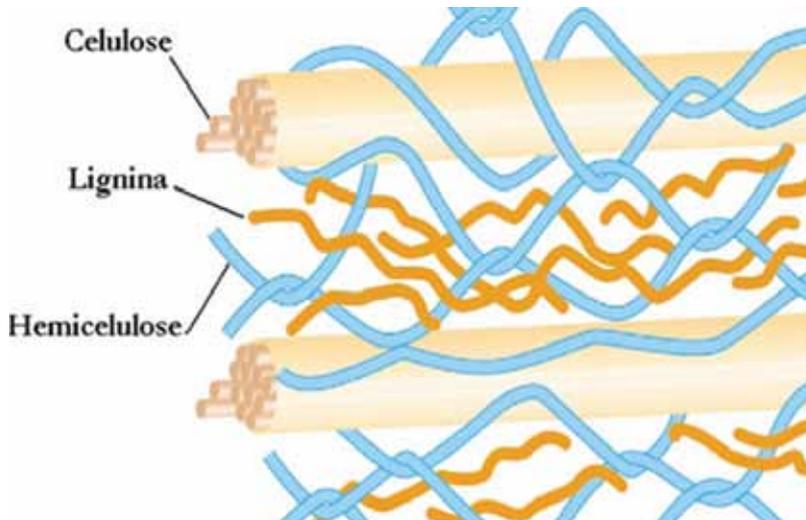
---

*Dayana da Silva Correia  
Flávia Hermelina da Rocha Santos  
Luís Henrique de Barros Soares  
Maria Elizabeth Fernandes Correia*

## **Introdução**

A lignocelulose é o grupo de compostos orgânicos mais abundantes na biosfera, representando 50% de toda biomassa terrestre (SARKO, 1997), e constitui a maioria dos materiais agroindustriais, muitos resíduos urbanos e pelas madeiras em geral, tanto de angiospermas quanto de gimnospermas (MALHERBE e CLOETE, 2002). A geração de resíduos orgânicos de origem vegetal vem crescendo rapidamente, em função da alta atividade agrícola (CORREIA et al., 2009). Estima-se que anualmente são produzidos em todo o mundo cerca de 20 a 50 bilhões de toneladas de material lignocelulósico, dos quais apenas quatro bilhões de toneladas são efetivamente utilizados (ASHWINI e SRIDHAR, 2006) para fins agroindustriais. Entretanto, recomenda-se que estes materiais tenham um aproveitamento mais racional (BON et al., 2008).

A biomassa lignocelulósica refere-se à parte vegetal que forma a parede celular, formada por agrupamentos de macromoléculas de natureza heterogênea, com composição química muito diversificada. Ela é caracterizada por uma matriz dura e fibrosa que contém 30-40% de celulose, 25-30% de hemicelulose e 25-30% de lignina (Fig. 1), e também estão presentes compostos como pectinas, proteínas, carboidratos solúveis, terpenos, alcalóides, saponinas,



**Fig. 1.** Esquema geral da estrutura lignocelulósica. A celulose é organizada em feixes de fibras. Adaptado de BOUDET et al.(2003).

**Tabela 1.** Composição química de alguns materiais lignocelulósicos.

Material Lignocelulósico	Componentes (%)			
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas
Bagaço de Cana	33-36	28-30	18-20	2-5
Palha de Cana	32-36	19-21	16-18	-
Palha de Arroz	32-37	19-24	9-13	12-18
Palha de Trigo	30-33	22-28	14-18	3-7
Palha de Sorgo	34-36	45-48	25-26	-
Sabugo de Milho	34-36	16-24	15-19	-
Papel	43	13	6	-
Madeira	50	20	10	5

Fonte: OLSSON e HAHN-HÅGERDAL, 1996; LEE, 1997.

polifenóis, gorduras, etc (MOHAN et al., 2006). A Tab. 1 mostra a composição química de alguns materiais lignocelulósicos que é diversificada em função da origem do material vegetal.

Do ponto de vista tecnológico, os carboidratos contidos na parede celular na forma celulósica (resíduos de glicose) e hemicelulósicas (polímeros contendo resíduos de arabinose, galactose, glicose, xilose, manose, e eventualmente outros açúcares e derivados) representam os substratos que podem ser convertido em produtos com potencial biotecnológico. Entretanto, a complexidade das interligações das três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina) na estrutura da parede celular, é o principal desafio na recuperação dos carboidratos (monômeros) com elevado grau de pureza (SUN e CHENG, 2002).

Desta forma a degradação dos materiais lignocelulósicos é um evento importante no processo de ciclagem do carbono devido à abundância desses materiais na maioria dos ecossistemas terrestres. De acordo com Singh e Gupta (1977) os materiais lignocelulósicos desempenham uma função relevante na formação e constituição de um ecossistema, por sua atuação como fonte de energia para organismos heterotróficos e como reservatório de nutrientes para a ciclagem dentro deste mesmo ecossistema.

## **Componentes da biomassa lignocelulósica**

### **Celulose**

A celulose é homopolímero natural, linear, constituído unicamente por unidades monoméricas (resíduos) de glicose unidas entre si através de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1, 4), (Fig. 2). Na geração de cada uma destas ligações ocorre a formação de uma molécula de água (FENGEL e WEGENER, 1989), resultando na fórmula geral de  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . As cadeias individuais estabelecem ligações de hidrogênio intermoleculares, sendo que a estrutura supramolecular é rígida e em forma de fita (BON et al., 2008).

A molécula de celulose pode conter até 10.000 unidades de glicose (FENGEL e WEGENER, 1989). A organização molecular da celulose determina as propriedades mecânicas da célula e promovem o suporte e resistência à parede celular (EMONS et al., 2002). Na estrutura microfibrilar da celulose existe diferentes graus de ordenação, desde regiões cristalinas muito ordenadas a regiões de menor ordenação (amorfa). Estas características conferem à molécula elevada resistência à hidrólise ácida e enzimática (ZHANG e LYND, 2004).

A glicose é um glicídio simples, pode ser fermentada para produzir etanol ou entrar em uma cadeia reacional e produzir inúmeros compostos tais como: etileno, buteno, propileno, ácidos acrílicos, poliésteres entre outros (SCHUCHARDT et al., 2001). Assim a molécula de celulose tem enorme valor comercial para diversos setores industriais (FRY, 1988; ENGLEHARDT, 1995).

## Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo com cadeias menores que a celulose, porém com muitas ramificações (BROGATTO, 2010). As cadeias hemicelulósicas são formadas por diversos grupos distintos de polissacarídeos constituídos por açúcares de cinco carbobos (pentoses, como xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetila (FENGEL e WEGENER, 1989).

O principal componente da fração hemicelulósica é a xilana, um polímero constituído por unidades de xilose, que são facilmente hidrolisadas com ácidos minerais (KHUAD e SINGH, 1993). A xilana possui uma estrutura linear constituída de unidades xilopiranosil unidos por ligações  $\beta$  (1,4). A hemicelulose pode constituir ligações cruzadas com as microfibrilas de celulose e lignina, formando o complexo lignina-carboidratos (*Lignin-Carbohydrate Complexes - LLC*) (LAWOKO et al., 2005 e 2006).

As duas principais enzimas capazes de despolimerizar a cadeia de hemicelulose são a endo- $\beta$ -1,4-D-xilanase e a endo-1,4- $\beta$ -D-mananase,

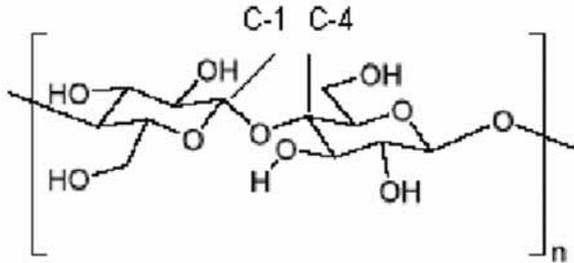


Fig. 2. Estrutura da Celulose. Fonte: FENDEL e WEGENER (1989).

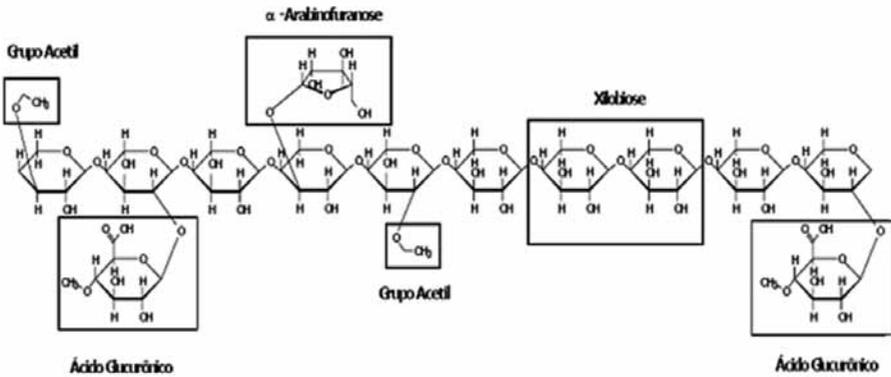


Fig. 3. Estrutura de Hemicelulose. Fonte: MUSSATO (2002).

ambas do grupo das glicosil-hidrolases (SINGH et al., 2003). A Fig. 3 ilustra a estrutura da hemicelulose, onde a cadeia linear representa a xilana.

Diferentemente da celulose, a estrutura hemicelulósica não contém regiões cristalinas, e é, portanto, mais suscetível a hidrólise química em condições mais brandas. As hemiceluloses são decompostas por um conjunto de microrganismos, em particular fungos filamentosos e actinomicetos (BON et al., 2008).

## Lignina

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante na superfície terrestre, e é superado apenas pela celulose (BRAGATTO, 2010). É um polímero fenólico, derivado de alcoóis aromáticos, caracterizado por conferir rigidez, impermeabilidade à água e resistência mecânica e microbiológica aos tecidos vegetais (CARDOSO, 2008). Embora sua decomposição seja indispensável para a reciclagem do carbono, ela representa um dos maiores estoques de carbono e energia da natureza, apresenta o maior depósito natural de estrutura química aromática, constituindo-se em uma fonte potencial de valiosos insumos para a indústria química e bioquímica (BON et al., 2008).

Com estrutura macromolecular tridimensional e alto peso molecular a lignina é composta por diferentes combinações de três tipos de ligninas: a lignina *p*-hidroxil-fenila (H), lignina guaiacila (G) e sirigila (S), tendo como seus precursores os três alcoóis do tipo fenilpropanóides (*p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico) (Fig. 4) (FENGEL e WEGENER, 1989). As unidade G e S são precursoras da lignina encontrada em madeiras de folhosas, já a lignina das coníferas é formada por unidades G (CHEN, 1991).

Por apresentar grande resistência ao ataque microbiano, a lignina corresponde a cerca de 25% da biomassa fotossintética produzida anualmente na Terra, retendo 50% mais carbono do que a celulose no longo prazo (BREEN e SINGLETON, 1999).

A biodegradação da lignina é um processo essencialmente oxidativo que envolve um complexo sistema enzimático extracelular de baixa especificidade, produzido por fungos que vivem em madeiras, como os fungos *Phanaerochaete chrysosporium*, *Trichoderma* sp., *Ceriporiopsis* sp. E por algumas bactérias, especialmente os actinomicetos (BON et al., 2008). As principais enzimas envolvidas na degradação da lignina são: lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase. De acordo com Singleton (1999), essas enzimas apresentam grande potencial de utilização na indústria de papel, no tratamento de efluentes

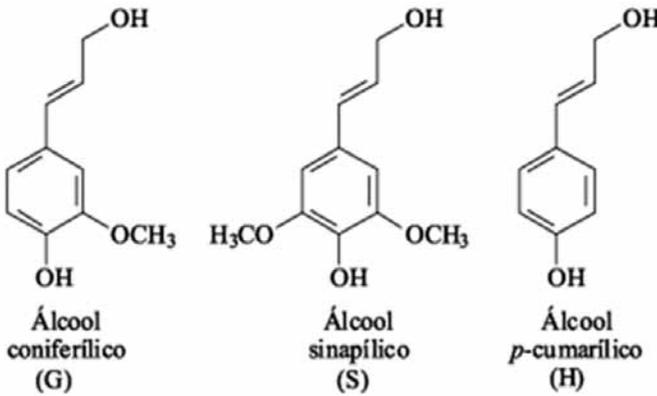


Fig. 4. Precursores primários da lignina. Fonte : BON et al. (2008).

recalcitrantes, na reciclagem de compostos orgânicos e na indústria de agroenergia. Neste caso, como basicamente a celulose e a hemicelulose é que podem ser aproveitadas na forma de açúcares fermentescíveis, capazes de produzir bioetanol mediante algum processo fermentativo, a lignina passa a ser encarada como um subproduto cauteloso da indústria agroenergética.

## Enzimas oxidativas envolvidas na biodegradação da lignocelulose

A biodegradação dos materiais lignocelulósicos é um processo natural de reciclagem da matéria orgânica, e a compreensão deste processo contribui no entendimento do ciclo natural do carbono. Entretanto, o ciclo do carbono tem início na biossíntese dos seus constituintes a partir de H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> e energia predominantemente solar, e termina com a mineralização destes constituintes e na liberação de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O em decorrência da decomposição. Esta parte final do ciclo é realizada principalmente por fungos, que apresentam maior eficiência na decomposição (ARANTES e MILAGRES, 2009), embora alguns grupos de bactérias também possam estar envolvidos na biodegradação (FENGEL e WEGENER, 1989).

A biodegradação inicia-se com a penetração de hifas fúngicas pelo lúmen da célula vegetal. Para se estabelecer, o fungo produz uma variedade de metabólitos extracelulares, especialmente enzimas, atuando na degradação dos componentes da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina), ocorrendo à conversão destes em moléculas menores, as quais podem ser transportadas através da membrana plasmática fúngica (KIRK e CULLEN, 1998).

Os fungos mais eficientes na degradação e ciclagem de material orgânico vegetal pertencem à classe Basidiomycetes, e são divididos em dois grupos que são classificados em função do tipo de degradação que realizam. Os fungos da podridão branca (*white-rot fungi*) são capazes de degradar os três componentes lignocelulósicos, inclusive a lignina. Os fungos da podridão parda ou castanha (*brown-rot fungi*) são os que promovem a despolimerização da celulose nos primeiros estágios de colonização. Outros fungos, chamados de fungos da podridão branda (*soft-rot fungi*) são pertencentes às divisões Ascomycota e Deuteromycota, e podem degradar tanto os polissacarídeos quanto a lignina, porém em velocidades muito reduzidas (KIRK e CULLEN, 1998).

Os fungos produzem várias enzimas durante a colonização e degradação do material lignocelulósico, as quais podem ser divididas em duas grandes famílias de complexos enzimáticos, com propriedades comuns, as enzimas hidrolíticas e as oxidativas. No grupo das enzimas hidrolíticas estão as celulasas e hemicelulasas, relacionadas à despolimerização da celulose e da hemicelulose.

No grupo das enzimas oxidativas há dois subgrupos: (1) fenoloxidasas, que são metaloproteínas que atuam por duas formas distintas: (a) enzimas dependentes de peróxido ou peroxidases, tais como as lignina peroxidases (LiPs) e as manganês peroxidases (MnPs), e (b) as não dependentes de peróxido, chamadas de lacases (Lacs). No outro subgrupo (2) estão as enzimas auxiliares, que favorecem a atuação

das citadas acima através da produção de peróxido de hidrogênio, permitindo a atuação das peroxidases (KIRK e CULLEN, 1998).

As Lacs e as MnPs apresentam potencial redox suficiente para abstrair elétrons somente de estruturas fenólicas, embora na presença de mediadores apropriados sua ação possa ser estendida também para estruturas não fenólicas (BAO et al., 1994; BOURBONNAIS e PAICE, 1990). As LiPs, por apresentarem potencial redox maior que as Lacs e MnPs, podem oxidar diretamente estruturas aromáticas não fenólicas dando origem a radicais catiônicos (KIRK e FERREL, 1987), exercem também ação catalítica mediada por compostos de baixa massa molar (TIEN e MA, 1997).

As enzimas que produzem peróxido de hidrogênio são acessórias às peroxidases. As principais enzimas produtoras de peróxido envolvidas na biodegradação da lignina incluem a glicose oxidase e a metanol oxidase que são intracelulares (KIRK e CULLEN, 1998; KUHAD et al., 1997), além da glioxal oxidase (KERSTEN e KIRK, 1987), a aril-álcool oxidase e a própria MnP que são extracelulares (ANDER e MARZULLO, 1997; FERRAZ, 2004).

As enzimas ligninolíticas são produzidas pelos fungos de degradação branca geralmente durante o metabolismo secundário (FARIA, 2010). A síntese e secreção destas enzimas são frequentemente induzidas pelos níveis de nutrientes (carbono e nitrogênio); ademais a produção de LiPs e MnPs por fungos de degradação branca geralmente é ótima em alta tensão de oxigênio, mas é reprimida pela agitação em culturas líquidas submersas, enquanto Lac é favorecida pela agitação (WESENBERG et al., 2003). De acordo com Faria (2010) o entendimento destes efeitos promovido pelo cultivo dos fungos e das características físico-químicas das enzimas ligninolíticas produzidas por eles é de fundamental importância para a aplicação destes fungos em diversos processos industriais (biopolpação, biorremediação, etc).

## Lignina peroxidase (LiP) [EC 1.11.1.14]

Foi identificada inicialmente em culturas do fungo *Phanerochaete chrysosporium* crescido em meio com limitação de nitrogênio (KIRK e FARREL, 1987). A LiP apresenta uma estrutura globular com uma dimensão aproximada de 50x40x40 Å de comprimento e domínios proximal (C- terminal) e distal (C- terminal).

A LiP é uma heme-proteína, não específica, sendo conhecida por oxidar substratos aromáticos fenólicos e também promover a clivagem oxidativa de ligações C-C e C-O-C na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estruturas aromáticas não fenólicas como a lignina bem como uma gama de compostos orgânicos com potencial redox acima de 1,4 V(WONG, 2009).

As isoenzimas de LiP são glicoproteínas com massa molar em torno de 38-42kDa, com ponto isoelétrico (pI) de 3,2-4,0 e possuem pH ótimo de atividade próximo de 3,0. Elas são heme-proteínas monoméricas com dois domínios: distal (C-terminal) e proximal (N-terminal); o Fe<sup>+3</sup> do grupo heme está localizado entre estes dois domínios, sendo penta-coordenado com quatro nitrogênios tetrapirrol e uma ligação com resíduo de histidina (HAMMEL e CULEN, 2008), como mostra a Fig. 5.

A LiP apresenta um típico ciclo catalítico, aonde o Fe contido no grupo heme da LiP passa por diferentes estados de oxirredução. A Fig. 6 mostra detalhadamente as três etapas do ciclo.

- **1ª Etapa:** compreende a oxidação do Fe<sup>+3</sup> da enzima nativa para Fe<sup>+4</sup>, pela ação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> um aceptor natural de elétrons, que atua como substrato na reação com a enzima nativa gerando o composto I oxidado, radical catiônico da LiP deficiente de dois elétrons;
- **2ª Etapa:** pela redução do composto I, por transferência de um elétron, é formado o composto II, em que o ferro está ainda como Fe<sup>+4</sup>, mas não como um radical livre. O agente redutor pode ser um substrato como o álcool veratrílico;

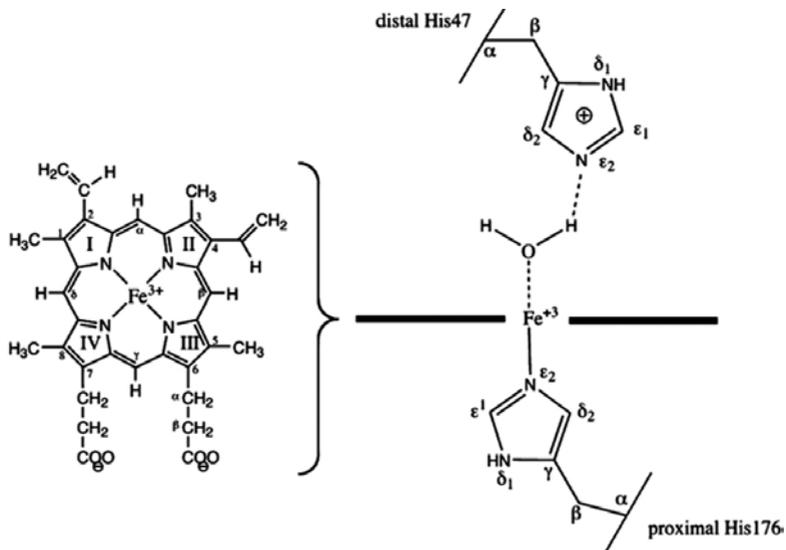


Fig. 5. Hemeproteína em lignina peroxidase. Fonte: WONG (2008).

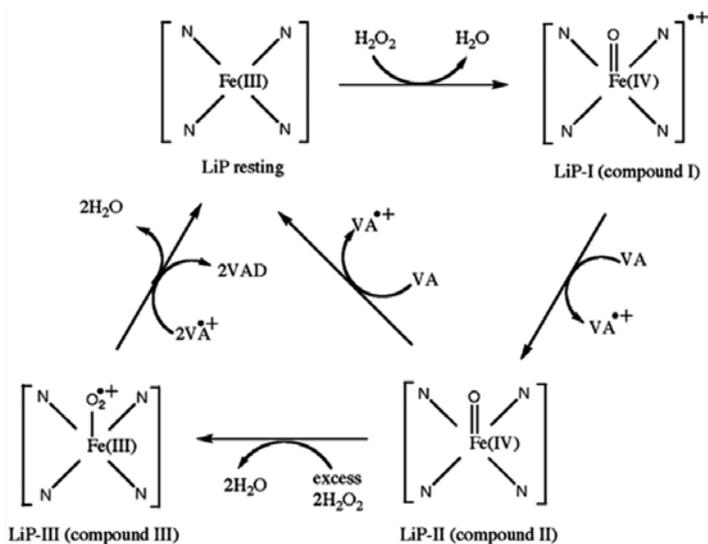


Fig. 6. Ciclo catalítico da Lignina peroxidase. Fonte: WONG (2008).

- **3ª Etapa:** ocorre a redução por um elétron doado por um segundo substrato, que retorna a enzima a seu estado nativo, completando o ciclo catalítico.

Na ausência do substrato redutor, o composto II é oxidado pelo  $H_2O_2$  para o composto III, uma forma da LiP com limitada capacidade catalítica gerada na presença de excesso de  $H_2O_2$  (HAMMEL e CULEN, 2008; MARTINEZ, 2002.; WONG, 2009).

O álcool veratrílico (AV) é um metabolito produzido juntamente com LiP por *P. chrysosporium*, o que promovendo o aumento na atividade de LiP e a taxa de mineralização de lignina (FAISON e KIRCK, 1985; SCHOEMARKER e LEISOLA, 1990). O (AV) pode atuar como um mediador redox em reações catalisadas por LiP, formando o radical álcool veratrílico (AV +) (HATAKKA, 2001). Este radical formando na primeira redução pelo composto I existe como um complexo com o composto II, que é cataliticamente ativo com uma segunda molécula de AV para formar um aldeído. Este radical é implicado supostamente na proteção da LiP pela inativação causada pela formação de composto III pela incubação prolongada da enzima com excesso de  $H_2O_2$ , onde o AV converte o composto III na enzima nativa via formação de AV + (VALLI et al., 1990) e atua como mediador redox, oxidando substrato que LiP não poderia oxidar diretamente (JOHJIMA et al., 1999).

### **Manganês peroxidase (MnP) [EC 1.11.1.13]**

São heme-proteínas glicosídicas, porém, são enzimas dependentes de  $Mn^{+2}$  e apresentam potencial de oxidação suficiente somente para separar elétrons de estruturas fenólicas. Frequentemente, apresentam peso molecular em torno de 45 kDa e ponto isoelétrico (pI) em pH inferior a 7,0 (HATAKKA, 1994; HOFRICHTER, 2002). A estrutura geral de *P. chrysosporium* MnP é similar a LiP, consistindo em dois domínio.

O ciclo catalítico da MnP é semelhante ao da LiP, como mostra a Fig. 7 e pode ser dividido em três etapas.

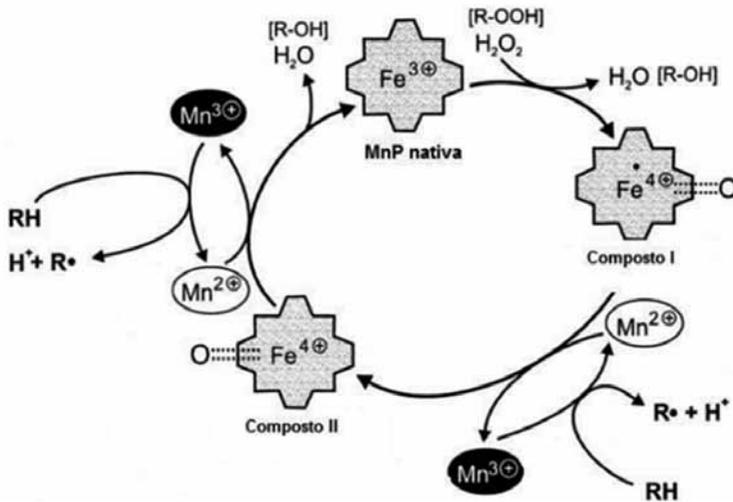


Fig. 7. Ciclo catalítico da Manganês peroxidase. Fonte: adaptado por Hofrichter (2002).

- **1ª Etapa:** inicia-se com a oxidação da MnP, por  $H_2O_2$  ou peróxido orgânico, que levam a enzima a um estado de oxidação deficiente em elétrons dominados composto I;
- **2ª Etapa:** a redução da enzima até a forma nativa ocorre através de dois passos sucessivos, por meio da formação de um intermediário denominado composto II;
- **3ª Etapa:** enquanto o composto I pode ser convertido em composto II tanto na presença de  $Mn^{+2}$  quanto de outros doadores de elétrons com potencial redox apropriado, a conversão do composto II até a enzima nativa ocorre somente na presença de  $Mn^{+2}$  (WARIISHI et al., 1988; HOFRICHTER, 2002). Além disso, elevadas concentrações de  $H_2O_2$  podem inativar reversivelmente a enzima através da formação de outro intermediário denominado composto III (WARIISHI et al., 1988).

O  $Mn^{+3}$  formado durante a catalise estabilizado por ácidos orgânicos produzidos pelo próprio fungo (AGUIAR et al., 2006), pode abstrair elétrons de vários compostos orgânicos (incluindo fenóis, amins aromáticas, compostos orgânicos sulfurados e ácidos graxos

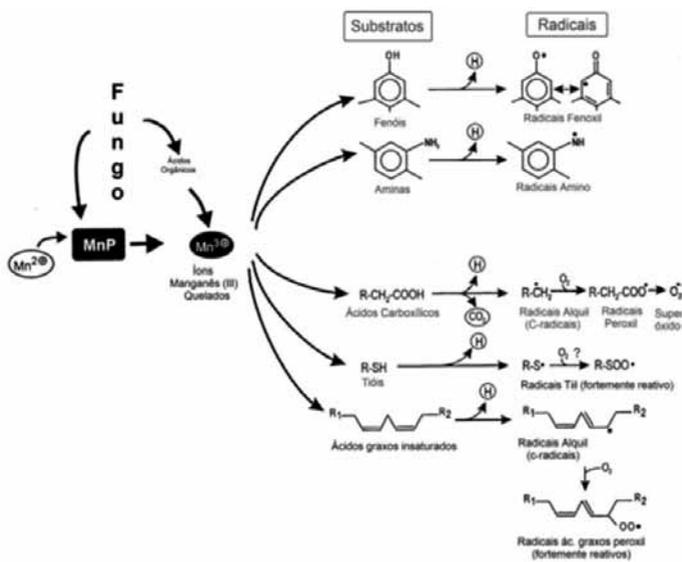


Fig. 8. Formação de radicais pelo sistema catalítico de Manganês peroxidase na presença de diferentes substratos. Fonte: HOFRICHTER, 2002.

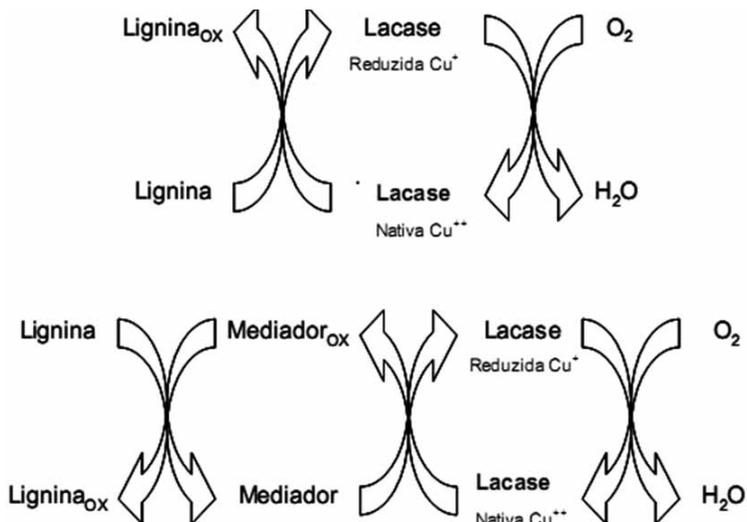


Fig. 9. Ciclo catalítico de Lacs (modificado de BREEN e SINGLETON, 1999).

insaturados) de maneira inespecífica, levando à formação de radicais bastante reativos (Fig. 8) que podem atacar estruturas recalcitrantes com alto potencial de redução (CARVALHO, 2009; HOFRICHTER, 2002; KAWAI et al., 1995; WARIISHI et al., 1988). Os quelatos mencionados acima, pela ação de  $Mn^{+3}$ , podem levar à formação de (radical superóxido), o qual se acredita ser uma fonte de peróxidos na ausência de  $H_2O_2$  (HOFRICHTER et al., 1998; URZÚA et al., 1998).

### **Lacase (Lac) [EC 1.10.3.2]**

É uma enzima que atua diretamente sobre as estruturas fenólicas, oxidando os fenóis pela abstração de um elétron, reação esta mediada pela redução de  $Cu^{+2}$  a  $Cu^{+1}$ , que por sua vez, reduz  $O_2$  a  $H_2O$ , permitindo que a enzima atue de forma cíclica (FERRAZ, 2004). As lacases são oxidases extracelulares N-glicosiladas produzidas por quase todos os basidiomicetos degradadores de material lignocelulósico, apresentando peso molecular em torno de 60-80 kDa e pI entre 3-6 (BADRIAN, 2006; HATAKKA, 2001; WESENBERG et al., 2003).

A estrutura molecular da enzima Lac consiste de quatro átomos de cobre (Cu) no seu sítio ativo que lhe confere suas diferentes propriedades e características específicas (WONG, 2009).

Na presença de mediadores adequados, como ABTS (ácido 2,2 - azino-bis-(3-etilbenzeno-tiazol-6-sulfônico), 1-hidróxi-benzotriazol e ácido 3-hidróxi-antranílico, as lacases (LACs) também podem oxidar compostos com elevado potencial redox, conforme demonstrado pelo esquema na Fig. 9 (MESTER e TIEN, 2000).

Durante o desenvolvimento fúngico a produção de LAC é afetada por muitos fatores, como a composição do meio de cultura (relação carbono e nitrogênio), pH, temperatura e taxa de aeração. A faixa de pH ótimo é bem ampla, variando de 2 a 10 e a temperatura ótima varia de 40 a 65°C (ASGHER et al., 2008). Essa variação existe devido à grande variedade de LACs entre as espécies fúngicas (ÜREK e PAZARLIOGLU, 2005). A presença de metais e as fontes de carbono

influenciam grandemente a produção e atividade de lacases. Embora o cobre esteja presente no sítio ativo de LACs, o excesso desse metal no meio de cultivo inibe a atividade de LACs secretadas por *Trametes villosa*, assim como diferentes fontes de carbono podem interferir na atividade de lacase desse fungo (YAMANAKI et al., 2008).

As Lacs ocorrem frequentemente como isoenzimas com estruturas de proteína monomérica ou dimérica. Ambas as isoenzimas são intracelular e extracelulares e podem ser produzidas a partir de um único organismo. O fungo *T. versicolor* produz cinco isoenzimas, dependendo do grau de glicosilação (BERTRAND, et al., 2002). As Lacs de origem fúngica apresentam uma arquitetura molecular similar consistindo de três domínios sequencialmente dispostos de uma estrutura do tipo  $\beta$ -barril, relacionadas com proteínas azuis de cobre, tais como azurina e plastocianina (WONG, 2008).

Lacases têm sido intensamente estudadas para aplicação industrial e são enzimas excepcionalmente versáteis, catalisando reações com diferentes substratos, alguns destes recalcitrantes (WESENBERG et al., 2003). São enzimas de ampla distribuição ocorrendo em grupos filogenéticos variados: bactérias, plantas, insetos e fungos (GIANFREDA et al., 1999; MAYER, 2006). Os fungos ligninolíticos são capazes de gerar grandes quantidades de radicais livres, muito atuantes durante a degradação de xenobióticos (DURAM e ESPOSITO, 2000; POINTING, 2001).

## **Peroxidases Versáteis (PVs)**

São enzimas da família das peroxidases secretadas por muitos basidiomicetos de degradação branca como *Pleurotus* sp. e *Bjerkandera* sp. (CAMARERO et al., 1999; KAMITSUJI, 2005; MOREIRA et al., 2005; POGNI et al., 2005). Estas enzimas não são específicas para Mn (II) como as MnPs, mas também oxidam compostos típicos de LiP na ausência de manganês. Uma explicação para isto é que na estrutura molecular das PVs há resíduos de aminoácidos típicos das MnPs no sítio de ligação de Mn (II), bem como resíduos típicos das

LiPs que envolvem a interação com álcool veratrílico e compostos aromáticos, o que gera na PV características tanto de MnP quanto de LiP (MARTINEZ, 2002; WONG, 2009).

O ciclo catalítico das PV é similar ao das demais peroxidases supramencionadas, em que a enzima catalisa a transferência de elétrons para um substrato oxidável como o  $H_2O_2$ , envolvendo a formação e redução dos intermediários Composto I e Composto II até a enzima nativa (WONG, 2009).

Portanto, um sistema altamente eficiente na produção de PV é desejado para aplicações biotecnológicas nos processos industriais e biorremediação de poluentes recalcitrantes (MARTINEZ, 2002). Para isso, uma análise detalhada do relacionamento estrutura-função desta enzima deverá ainda ser realizado (HAMEL e CULLEN, 2008).

## **Considerações finais**

A degradação de materiais lignocelulósicos é uma das etapas mais importantes do ciclo do carbono na natureza. Por sua natureza aromática, a lignina é o componente mais difícil de ser degradado, apesar de compor aproximadamente um terço de toda biomassa vegetal produzida no planeta. Parece óbvio que acelerar ou reduzir a sua taxa de decomposição, no solo, pode influir diretamente nos estoques de carbono disponíveis.

## Referências Bibliográficas

ANDER, P.; MARZULLO, L. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 115-131, 1997.

AGUIAR, A.; SOUZA-CRUZ, P. B.; FERRAZ, A. Oxalic acid,  $Fe^{3+}$  reduction activity and oxidative enzymes detected in culture extracts recovered from *Pinustaeda* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 873-878, 2006.

ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, 1586-1595, 2009.

ASGHER, M.; BHATTI, H. N.; ASHRAF, M.; LEGGE, R. L. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, v.19, p. 771-783, 2008.

ASHWINI, K. M.; SRIDHAR, K. R. Breakdown of plantation residues by pill millipedes (*Arthrosphaera magna*) and assessment of compost quality. **Current Science**, v. 90, p. 954-959, 2006.

BADRIAN, P. Fungal laccases: occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 215-242, 2006.

BAO, W. Oxidative degradation of nonphenolic lignin during lipid-peroxidation by fungal manganese peroxidase. **FEBS Letters**, v. 354, p. 297-300, 1994.

BERTRAND, T.; JOLIVALT, C.; BRIOZZO, P.; CAMINADE, E.; JOLY, N.; MADZAK, C. Crystal structure of a four-copper laccase complex with an arylamine: Insights into substrate recognition and correlation with kinetics. **Biochemistry**, v.41, 7325-7333, 2002.

BOUDET, A. M. **Towards an understanding of the supramolecular organization of the lignified wall**. In: ROSE, J. (Ed.). *the plant cell wall*. Oxford: Blackwell, 2003. p. 155-182.

BON, P. S.; PEREIRA JR., N.; GOTTCALK, L. M. F.; PEREIRA, P. S.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado**. In: BON, P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. *Bioprocessos para a produção de enzimas*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 95-115.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Letters**, v. 267, p. 99-102, 1990.

BREEN, A.; SINGLETON, F. L. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 252-258, 1999.

BROGATTO, J. **Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus* spp. para a produção de bioetanol**. 2010. Tese. (Doutorado em Ciências: Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CAMARERO, S. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 10324-10330, 1999.

CARVALHO, W. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, p. 2191-2195, 2009.

CHEN, C. L. **Linins**: occurrence in wood tissue, isolations reactions and structure. In: LEWIS, M.; GOLDSTEIN, I. S. (Ed.). Wood structure and composition. New York: Marcel Dekker, p. 183-261, 1991.

CORREIA, M. E. F. Ecologia da Interação entre Fauna do Solo e Microrganismo no Processo de Decomposição de Resíduos Vegetais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 32., 2009, Fortaleza. O solo e a produção de bioenergia: perspectivas e desafios: **anais...** Fortaleza: SBCS: UFC, 2009. Palestra.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase – like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B. Environmental**, v.28, p.83–99, 2000.

EMONS, A. M. C.; SCHEL, J. H. N.; MULDER, M. The geometrical model for microfibril deposition and the influence of the cell wall matrix. **Plant Biology**, v. 4, p. 22-26, 2002.

ENGLEHARDT, J. Sources, industrial derivatives, and commercial applications of cellulose. **Carbohydrates Europea**, v. 12, p. 5-14, 1995.

FAISON, B. D.; KIRK, T. K. Factors involved in the regulation of ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p. 299-304, 1985.

FARIA, R. A. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispota***. 2011. Dissertação. (Mestrado em Ciências: Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo de, Lorena, 2011. p. 28-37.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry ultrastructure reaction**. Berlín: Walter de Gruyter, 1989. p. 610.

FERRAZ, A. **Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos**. In: ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul.: EDUCS, 2004. cap. 6, p. 215-242.

FRY, S. C. **The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis**. London: Longman Scientific and Technical, 1988. p. 246.

GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J. M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal**, v. 3, p. 1-26, 1999.

HAMMEL, K. E.; CULLEN, D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 349-355, 2008.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 125-135, 1994.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.

JOHJIMA, T. Direct interaction of lignin and lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemistry**, v. 38, p. 1989-1994, 1999.

KAMITSUJI, H. Direct oxidation of polymeric substrates by multifunctional manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus* without redox mediators. **Biochemical Journal**, v. 386, p. 387-393, 2005.

KAWAI, S.; JENSEN, K. A.; BAO, W.; HAMMEL, K. E. New polymeric model substrates for the study of microbial ligninolysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3407-3414, 1995.

KERSTEN, P.J.; KIRK, T.K. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 2195-2201, 1987.

KHUAD, R. C.; SINGH, A. Lignocellulosic biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, p. 151-172, 1993.

KIRK, T. K.; FARREL, R. L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 41, p. 465-505, 1987.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. **Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi**. In: YOUNG, R.; AKHTAR, M. Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. New York: John Wiley & Sons, 1998. p. 273-308.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International**, Weinheim, v. 44, p. 3358-3393, 2005.

LAWOKO, M.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Structural differences between the lignin-carbohydrate complexes presents in wood and chemical pulps. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 3467-3473, 2005.

LAWOKO, M.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Characterization of lignin carbohydrate complexes (LCCs) of spruce wood (*Picea abies* L.) isolated with two methods. **Holzforschung**, v. 60, p. 156-161, 2006.

LEE, J. Biological Conversion of Lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24. 1997.

MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. **Reviews in Environmental Science & Biotechnology**, v. 1, p. 105-112, 2002.

MARTÍNEZ, A. T. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 425-444, 2002.

MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places - a review. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2318-2331, 2006.

MESTER, T.; TIEN, M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 46, p. 51-59, 2000.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of wood/ biomass for bio-oil: A critical review. **Energy and Fuels**, v. 20, p. 848-889, 2006.

MOREIRA, P. R. Molecular characterisation of a versatile peroxidase from a *Bjerkandera* strain. **Journal of Biotechnology**, v. 118, p. 339-352, 2005.

MUSSATTO, I. S. **Influência do Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz na Produção de Xilitol por *Candida guilliermondii***. Dissertação. (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Brasil. 2002.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates for Ethanol Production. **Enzyme Microbial Technology**, v. 18, p. 312 -331. 1996.

PIONTEK, K.; ANTORINI, M.; CHOINOWSKI, T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at resolution containing a full complement of coppers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 37663-37669, 2002.

POGNI, R. Tryptophan-based radical in the catalytic mechanism of versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. **Biochemistry**, v. 44, p. 4267-4274, 2005.

POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 20-33.

POULOS, T. L., EDWARDS, S. L., WARIISHI, H., GOLD, M. H. Crystallographic refinement of lignin peroxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 4429-4440, 1993.

SARKO, A. Cellulose: how much do we know about its structure. In: KENNEDY, J. F.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A.; HORWOOD, E. **Wood and cellulose: industrial utilization: biotechnology, structure and properties**. New York: John Wiley e Sons, 1997, p. 55-70.

SCHOEMAKER, H. E.; LEISOLA, M. S. A. Degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 101-109, 1990.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima. **Química Nova**, v. 24, n. 2, mar-abr. 2001.

SINGH, J. S.; GUPTA, S. R. Plant decomposition and soil respiration in terrestrial ecosystems. **Botanical Review**, v. 43, n. 4, p. 449-528, 1977.

SINGH, S.; MADLALA, A. M.; PRIOR, B. A. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 3-16, 2003.

SUN, Y.; CHENG, J. Hidrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p.1-11, 2002.

SUNDARAMOORTHY, M.; KISHI, K.; GOLD, M. H.; POULOS, T. L. The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06, resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 32759-32767, 1994.

SUNDARAMOORTHY, M.; KISHI, K., GOLD, M. H.; POULOS, T. L. Crystal structure of substrate binding site mutants of manganese peroxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 17547-17580, doi: 10.1074/jbc. 272.28.17574, 1997.

TIEN, M.; MA, D. Oxidation of 4-Methoxymandelic acid by lignin peroxidase: mediation by veratryl alcohol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 8912-8917, 1997.

URZÚA, U.; KERSTEN, P. J.; VICUÑA, R. Manganese peroxidase-dependent oxidation of glyoxylic and oxalic acids synthesized by *Ceriporiopsis subvermispota* produces extracellular hydrogen peroxide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 68-73, 1998.

ÜREK, R. Ö.; PAZARLIOGLU, N. K. Production and stimulation of manganese peroxidase by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 83-87, 2005.

VALLI, K.; WARIISHI, H.; GOLD, M. H. Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase: role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. **Biochemistry**, v. 29, p. 8535-8539, 1990.

WARIISHI, H.; AKALESWARAN, L; GOLD, M. H. Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. **Biochemistry**, v. 27, p. 5365-5370, 1988.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents.

**Biotechnology Advances**, v. 22, p. 161-187, 2003.

WONG, D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic

enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, p. 174-209, 2009.

YAMANAKA, R.; SOARES, C. F.; MATHEUS, D. R.; MACHADO, K.

M. G. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p.78-84, 2008.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems.

**Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.p.







**Embrapa**

---

**Agrobiologia**

Ministério da  
**Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA