



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Produção de enzimas holocelulolíticas acessórias pelo fungo mutante *Trichoderma atroviride* 102C1 em sub-produtos agrícolas

Jessica Caroline Araujo Silva<sup>1</sup>, Matheus Uchoa Oliveira<sup>2</sup>, Daniela Sales Alviano<sup>1</sup>,  
Celuta Sales Alviano<sup>1</sup>, Rodrigo Pires do Nascimento<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Departamento de Microbiologia Geral, 21941-902, Rio de Janeiro – RJ

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro – Escola de Química, Departamento de Engenharia Bioquímica, 21941-909, Rio de Janeiro – RJ - E-mail: [rodrigopires@eq.ufrj.br](mailto:rodrigopires@eq.ufrj.br)

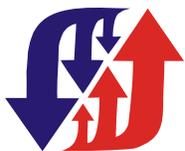
#### RESUMO

Os fungos são microrganismos considerados decompositores da matéria orgânica, pela ação de diversas enzimas que podem apresentar potencial biotecnológico, destacando as holocelulases (endoglucanases, exoglucanases,  $\beta$ -glucosidases, endoxilanasas, amilases, entre outras). Desta forma, o presente trabalho objetivou estudar a produção de enzimas holocelulolíticas acessórias ( $\beta$ -glucosidases,  $\beta$ -xilosidases e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases) do fungo mutante *Trichoderma atroviride* 102C1. Através da ferramenta estatística Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), foi utilizado como variáveis independentes as concentrações da fonte de C (farelo de trigo) e N (milhocina), na presença do Meio de Mandels. O sistema foi incubado a 28°C, 200 rpm, por 5 dias. As melhores atividades enzimáticas para  $\beta$ -glucosidases (48,6 U/ml),  $\beta$ -xilosidases (24,5 U/ml) e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (19,2 U/ml) foram detectadas quando se utilizou 3,41% (p/v) farelo de trigo e 1,0% (p/v) milhocina, após 3 dias de fermentação. Os resultados sugerem que a linhagem mutante 102C1 apresenta potencial para uso biorrefinaria.

Palavras-chave: *Trichoderma atroviride* 102C1, farelo de trigo,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases.

#### INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos eucarióticos aclorofilados, podendo ser saprófitas ou parasitas, pertencentes ao domínio Eukarya e classificados no reino Fungi (Margulis e Chapman, 2009). Eles desempenham um importante papel no meio ambiente como degradadores de matéria orgânica vegetal. Dentre os gêneros de maior relevância temos *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Fusarium* e *Trichoderma*. O gênero *Trichoderma* pertence ao filo Ascomycota, sendo um dos gêneros mais estudados entre os fungos, devido ao seu grande potencial de aplicação industrial e biotecnológico. As enzimas produzidas por diferentes espécies do gênero *Trichoderma* são amplamente utilizadas em bioprocessos industriais, em função do seu alto nível secretório e também pela variedade de enzimas com diferentes especificidades. Os fungos holocelulolíticos pertencentes a este gênero (*T. viride*, *T. longibrachiatum*, *T. harzianum*, *T. reesei*) têm sido considerados mais produtivos, e as preparações de holocelulases comerciais baseadas em estirpes mutantes de *T. reesei* são produzidas em escala industrial por muitas empresas em todo o mundo (Gusakov, 2011). Dentre as enzimas holocelulolíticas produzidas pelos fungos do gênero *Trichoderma*,



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

destacamos as endoglucanases (EC 3.2.1.4), as celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), as  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21), as endoxilanasas (EC 3.2.1.8), as  $\beta$ -xilosidases (EC 3.2.1.37), as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), entre outras. Essas enzimas são de suma importância quando se objetiva um melhor aproveitamento da biomassa vegetal, através da hidrólise enzimática. Desta forma, o presente trabalho objetivou otimizar a produção das enzimas acessórias  $\beta$ -glucosidases (BGL),  $\beta$ -xilosidases (BXL) e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (ARF) em farelo de trigo e milhocina por fermentação submersa, utilizando a ferramenta estatística Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) para otimizar a produção enzimática.

### MATERIAL E MÉTODOS

A produção das enzimas acessórias pelo fungo mutante *T. atroviride* 102C1 foi conduzida em frascos Erlenmeyers (125 mL), contendo 25 mL de meio de sais (Mandels modificado, pH 4.8) suplementado com diferentes concentrações de farelo de trigo ( $X_1$ ) e milhocina ( $X_2$ ), de acordo com a Tabela 1. Através do planejamento fatorial DCCR  $2^2$  foi gerado uma matriz com 11 ensaios (Tabela 1). A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o programa Statistica®7.0. Após esterilização, os frascos foram inoculados com 25  $\mu$ L da suspensão de esporos padronizada ( $10^9$  UFC/mL).

**Tabela 1:** Matriz do DCCR  $2^2$  com as variáveis independentes – farelo de trigo ( $X_1$ ) e milhocina ( $X_2$ ). Os valores apresentados na Tabela são valores codificados ( $X_1$  e  $X_2$ ) e valores reais (fonte de C e N em %).

Ensaios	$X_1$	$X_2$	Fonte de C (%)	Fonte de N (%)
1	-1	-1	1,0	0,43
2	+1	-1	3,0	0,43
3	-1	+1	1,0	1,57
4	+1	+1	3,0	1,57
5	-1,41	0	0,59	1,0
6	+1,41	0	3,41	1,0
7	0	-1,41	2,0	0,2
8	0	+1,41	2,0	1,8
9	0	0	2,0	1,0
10	0	0	2,0	1,0
11	0	0	2,0	1,0

Os sistemas de fermentação foram incubados a 28°C, 200 rpm por 5 dias. Diariamente 1 frasco de cada um dos 11 ensaios era coletado, e os sobrenadantes filtrados em membrana de microfibras de vidro (Millipore) para então serem congelados, a -20°C, até o momento da determinação da atividade das enzimas BGL, BXL e ARF.

As atividades foram determinadas através da liberação de *p*-nitrofenol obtido pela hidrólise dos substratos 10mM *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (SIGMA-ALDRICH®) para BGL; 10mM *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (SIGMA-ALDRICH®), para BXL; 10 mM *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (SIGMA-ALDRICH®), para ARF. Os sistemas foram preparados com 0,65 ml (para BGL e BXL) ou 0,60 ml (para ARF) de água destilada;

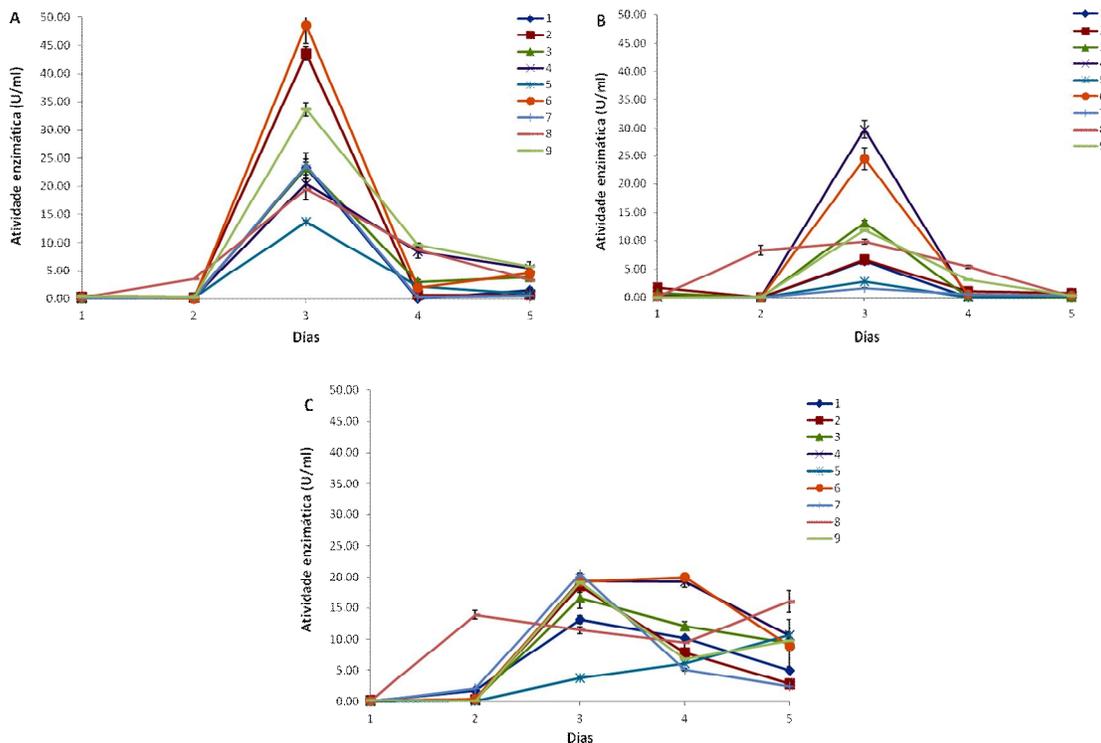


## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

0,2 ml de tampão acetato de sódio (0,5M – pH 5,0); 0,05 ml (para BGL e BXL) ou 0,1 ml (para ARF) do sobrenadante enzimático e deixados em repouso durante 5 minutos a 50°C, para a completa estabilização da temperatura. Em seguida adicionou-se 0,1 ml do substrato correspondente à cada enzima e os sistemas foram incubados por 10 minutos. A interrupção da reação aconteceu pela adição de 0,5ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1M – pH 10,0) na mistura reacional, a 50°C. A leitura da quantidade de *p*-nitrofenol liberado durante o processo foi realizada em espectrofotômetro a 420nm (Da Silva *et al.*, 2010).

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

A produção de BGL, BXL e ARF pelo fungo mutante *T. atroviride* 102C1 foi analisada através do planejamento DCCR 2<sup>2</sup>. Com esta ferramenta estatística pode-se verificar o melhor tempo de incubação para a fermentação, as melhores concentrações de farelo de trigo e milhocina determinadas dentro do planejamento. As máximas atividades das três enzimas foram obtidas ao fim de 3 dias de fermentação (Figura 1), sendo a melhor condição para a produção de BGL (48,59 U/ml) o ensaio 6 (3,41% farelo de trigo + 1,0% milhocina); BXL (29,76 U/ml) o ensaio 4 (3,0% farelo de trigo + 1,57% milhocina) e ARF (20,45 U/ml) o ensaio 7 (2,0% farelo de trigo + 0,2% milhocina).



**Figura 1** – Cinética da produção de BGL (A), BXL (B) e ARF (C) pelo *T. atroviride* 102C1 em farelo de trigo nos diferentes ensaios determinados pela matriz do planejamento fatorial (legenda em cor).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Assim, baseado nos resultados do presente estudo, as análises estatísticas foram realizadas utilizando os dados do melhor dia (3<sup>o</sup>) de produção das enzimas BGL, BXL e ARF. O software utilizado foi o Statistica 7.0. No farelo de trigo, a produção de BGL atingiu valores de atividade enzimática que variaram de 13,63 a 48,59 U/ml (Figura 1A). O coeficiente de variação obtido ( $R^2=0,705$ ) indica que 71% da variabilidade dos resultados podem ser explicadas pelo modelo matemático. A produção de BXL pelo *T. atroviride* 102C1 no farelo de trigo resultou em uma atividade enzimática que variou de 1,68 a 29,76 U/ml (Figura 1B). O coeficiente de variação obtido ( $R^2=0,834$ ) indica que 83% da variabilidade dos resultados podem ser explicadas pelo modelo matemático. A produção de ARF pelo *T. atroviride* 102C1 no farelo de trigo resultou em uma atividade enzimática que variou 3,68 a 22,73 U/ml (Figura 1C). O coeficiente de variação obtido ( $R^2=0,556$ ) indica que 56% da variabilidade dos resultados podem ser explicadas pelo modelo matemático.

Alguns trabalhos reportam sobre a produção de BGL pelo microrganismo de mesmo gênero e também espécie do nosso estudo, o *Trichoderma atroviride*. Rana et al., 2014 observaram uma máxima produção de BGL (4,77 U/ml) pela linhagem *T. reesei* RUT-C30 (ATCC 56765) ao fim de 7 dias de fermentação em biorreator utilizando palha de milho pré-tratado com explosão alcalina (fração sólida) como fonte de C. Em relação à produção de BXL, na literatura vemos que a linhagem *T. reesei* RUT-C30 (ATCC 56765) mostrou 0,25 U/ml de atividade enzimática, na presença de 1,0% de lactose durante 7 dias (Jiang et al., 2011). Quanto à produção de ARF por microrganismos, a literatura nos mostra que o fungo *Penicillium pinophilum* apresentou 0,27 U/ml da enzima após crescer em 3% de capim-elefante durante 7 dias (Visser et al., 2013).

### CONCLUSÕES

O fungo mutante *T. atroviride* 202C1 foi capaz de produzir bons títulos de atividade enzimática de  $\beta$ -glucosidases,  $\beta$ -xilosidases e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases na presença de farelo de trigo e milhocina em condições submersas, superiores aos observados na literatura. Estes dados corroboram com seu potencial biotecnológico para aplicações em processos dentro do conceito de biorrefinaria.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Da Silva AS, Inoue H, Endo T, Yano S, Bon EPS. 2010. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technol.* vol. 101, pp. 7402-7409.
- Gusakov AV. 2011. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends Biotechnol.* vol. 29, pp. 419-425.
- Jiang X, Geng A, He N, Li Q. 2011. New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. *J. Biosci. Bioeng.* vol. 111, pp. 121-127.
- Margulis L, Chapman MJ. 2009. Chapter Four – KINGDOM FUNGI. *Kingdoms and Domains* pp. 379-409.
- Rana V, Eckard AD, Teller P, Ahring BK. 2014. On-site enzymes produced from *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus saccharolyticus* for hydrolysis of wet exploded corn stover and loblolly pine. *Bioresource Technol.* vol. 154, pp. 282-289.
- Visser EM, Falkoski DL, de Almeida MN, Maitan-Alfenas GP, Guimarães VM. 2013. Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresource Technol.* vol. 144, pp. 587-594.

**APOIO FINANCEIRO:** FINEP, FAPERJ, CNPq