

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Comparação entre *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei* na produção de celulase e endoglucanase em cultivo estado sólido

Chiara Leal Alves¹, Raquel Brião Oliveira¹, Carolina Ferreira Nunes¹, Taiana Denardi de Souza¹ e Eliana Badiale-Furlong¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande – FURG; Escola de Química e de Alimentos – EQA; Campus Carreiros – Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos – Avenida Itália, km 08 – Caixa Postal, 474 – CEP: 96201-900 – Rio Grande/RS – Brasil. Telefone: 55-53-32336796. E-mail: chiaraleal@gmail.com

RESUMO

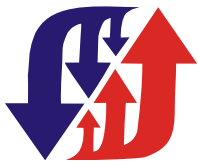
Para adaptar-se a meio ricos em material lignocelulótico, espécies fungicas produzem enzimas do complexo celulase que disponibilizam biomoléculas do substrato para o metabolismo microbiano. O objetivo deste trabalho foi cultivar duas espécies fungicas (Trichoderma reesei e Rhizopus oryzae) utilizando um coproduto da agroindústria, farelo de arroz integral, como substrato, tendo como finalidade recuperar compostos bioativos indicados pela liberação das enzimas do complexo celulase no meio de cultivo. Uma suspensão de esporos ($4,0 \times 10^6$ esporos.g⁻¹) foi adicionada aos substratos e cultivada durante 120 horas com retiradas de 24 em 24 horas. A atividade da enzima foi medida a partir da atividade da celulase total e da endoglucanase, sendo que para a atividade da celulase total foi utilizado como substrato papel filtro de 6 cm² e para a endoglucanase carboximetilcelulose, sendo medida a partir do resíduo de glicose liberado utilizando o reagente 3,5-dinitrosalicílico (DNS) sob ebulição com leitura em espectrofotômetro a 540 nm. O teor de proteína solúvel presente no extrato enzimático foi quantificado pelo método de Lowry (1951). Os resultados indicaram que a produção da enzima endoglucanase foi maior durante o cultivo de Rhizopus oryzae durante o tempo de 24 horas gerando uma atividade de até três vezes maior se comparado ao tempo de 96 horas, maior atividade na biomassa de Trichoderma reesei. Para a atividade de celulase total, ambos apresentaram atividade similar, porém, o fungo Rhizopus oryzae necessitou um menor tempo de cultivo (24 horas) para chegar a sua máxima atividade. Logo, a fim de otimização da obtenção do complexo celulase e disponibilidade de biomoléculas, o cultivo de Rhizopus oryzae em farelo durante 24 horas se mostrou o mais promissor.

Palavras-chave: farelo de arroz, enzima, coproduto agroindustrial

INTRODUÇÃO

Devido à alta demanda de produtos com matéria-prima proveniente de recursos naturais, o melhor aproveitamento destes vem sendo estudado a fim de diminuir impactos ambientais e econômicos das culturas de grande escala. A valoração e reciclagem de resíduos e coprodutos de matérias-primas, com alto custo de produção, é uma atividade que precisa ser integrada e viável economicamente (Oliveira, 2010). Uma alternativa para melhor aproveitamento do potencial nutricional destes coprodutos seria a extração e/ou modificação de suas biomoléculas que podem ser utilizadas como insumos para a formulação de diversos produtos (Paraskevoupoulou et al., 2003). Dentre as fontes disponíveis estão o farelo de arroz integral.

Ele é obtido a partir do processo de brunimento do grão, correspondendo de 5 a 8 % do total, possuindo vários nutrientes de alto valor comercial e importância nutritiva (Silva et al., 2001). Pelo fato do trato digestivo não produzir enzimas para a digestão de celulose, o uso



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

dessa enzima na dieta é justificada pelo aumento da disponibilidade de proteínas e outros micronutrientes ligada a parede lignocelulítica dos vegetais (farelos de arroz e trigo, grãos de trigo, centeio, cevada e aveia) (Campestrini et al., 2005).

O uso de microrganismos está entre as maneiras mais eficientes de converter o substrato durante o processo metabólico a fim de aumentar a acessibilidade destas moléculas dispersas na malha lignocelulítica (Pelizer et al., 2007). O cultivo em estado sólido que oferece vantagens sobre o cultivo submerso, especialmente para culturas fúngicas, e os metabólitos obtidos são geralmente mais concentrados e os procedimentos de purificação são mais baratos (Singhania et al., 2009).

O fungo filamentosso *Trichoderma reesei* é um dos organismos mais investigados pela produção completa do complexo enzimático celulotico (Zhong et al., 2012). Algumas cepas são geneticamente modificadas para melhorar sua capacidade de produção do complexo enzimático, porém, a manipulação genética pode afetar certas vias metabólicas, levando a produção de cepas mais frágeis (Kupski et al., 2015).

Em contraste, uma nova cepa selvagem isolada da casca de arroz e identificada como *Rhizopus oryzae* CCT 7560 foi estudada por Oliveira et al. (2010), como uma nova alternativa além das cepas geneticamente modificadas. O uso de uma nova cepa se torna interessante quando se considera a crescente necessidade de alternativas de degradação e agregação de valor aos coprodutos agroindustriais, e produção de compostos de importância industrial (Kupski et al. 2015).

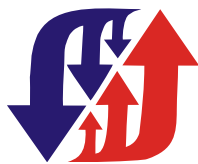
Considerando estes aspectos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de celulase total e endoglucanase a partir do cultivo de duas espécies de fungos filamentosos (*Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei*), uma selvagem e outra geneticamente modificada cultivados em farelo de arroz integral, com finalidade de disponibilizar biocompostos provenientes do farelo de arroz cuja eficiência pode ser indicada pela hidrólise da celulose presente na parede celular do substrato. Desta forma, também se pode recuperar enzimas do complexo celulase para aplicação industrial.

MATERIAL E MÉTODOS

Primeiramente, os fungos *Rhizopus oryzae* CCT 7560 e *Thricoderma reesei* QM 9414, foram repicados utilizando Agar PDA incubados em estufa durante 7 dias. O conteúdo dos tubos foi transferido com uma solução de Tween 0,2% para placas de Petri com Agar PDA, as quais foram incubadas durante 7 dias em estufa.

Uma suspensão de esporos foi obtida utilizando uma solução aquosa de Tween 80 0,2% para a raspagem de cada placa de Petri contendo o fungo. A concentração de esporos foi estimada a partir da contagem por câmara de Neubauer. Foi tomado um volume da suspensão de esporos que conferisse $4,0 \times 10^6$ esporos.g de meio⁻¹ e posteriormente foi adicionada em 40 g de farelo de arroz integral, bem como a solução nutritiva e a umidade foi corrigida em aproximadamente 50%. O cultivo foi controlado durante 120 horas, com retirada de 24 em 24 horas, começando pelo tempo zero.

O complexo enzimático foi extraído NaCl 0,5% na proporção 1:5 (p/v) durante 1 hora sob agitação orbital. A determinação da atividade de celulase total foi realizada utilizando Papel filtro como substrato, e da endoglucanase utilizando Carboximetilcelulose (CMC) 0,5%. A celulase total foi determinada utilizando Tampão Sódio-Citrato 0,05 M pH 4,8, papel filtro com área de 6 cm², quantificando com 3,5 DNS sob ebulição e medindo os monômeros



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

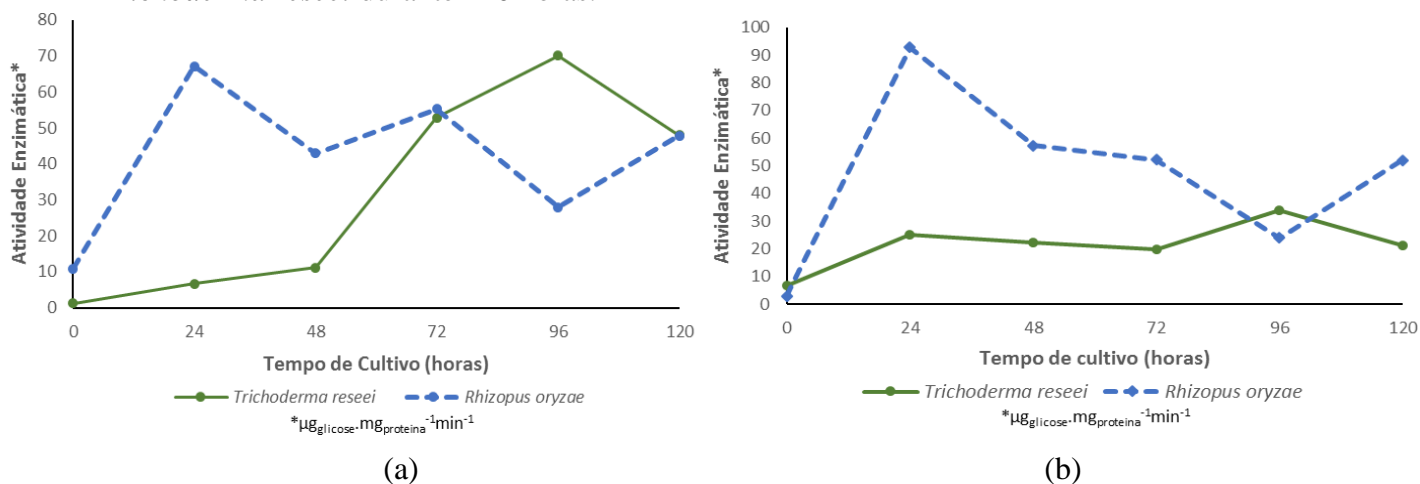
redutores liberados na reação enzimática em espectrofotômetro a 540 nm. A ação da endoglucanase foi determinada utilizando CMC 0,5% como substrato foi utilizado Tampão Sódio-Citrato 0,05 M pH 4,8, quantificando espectrofotometricamente o produto da redução do 3,5 DNS pelos resíduos de glicose liberados.

A partir do extrato bruto foi quantificado o teor de proteínas solúveis determinada pelo método de Lowry (1951), estimado de curva padrão de solução de albumina de soro bovino, medida espectrofotometricamente a 660 nm. A atividade enzimática específica foi definida como sendo quantidade de glicose liberada pela hidrólise enzimática em razão do teor de proteico e do tempo de reação.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

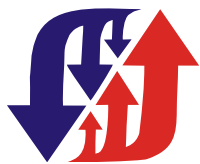
O fungo *Rhizopus oryzae* na produção de celulase utilizando farelo de arroz integral tem sido pouco estudado, porém, os resultados demonstram que ele pode produzir enzima endoglucanase com atividade de até 3 vezes maior em 24 horas de cultivo, se comparado ao *Trichoderma reesei* cujo pico é em 96 horas. Para a celulase total os resultados foram similares, porém, o *Rhizopus oryzae* tem um pico de atividade em um menor intervalo de cultivo (24 horas).

Figura 1. Atividades específicas para as enzimas endoglucanase (a) complexo celulotico (celulase total) (b) quantificadas a partir do cultivo de *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei* durante 120 horas.



A concentração de uma enzima de complexo afeta diretamente a ação dele na hidrólise de polímeros. Para a hidrólise da celulose, a ação conjunta das enzimas endo-exo ocorre da seguinte forma: exoglucanases funcionam como exoenzimas que agem no final das cadeias e liberam celobiose como principal produto; endoglucanases agem de forma aleatória ao longo da cadeia e produzem novos sítios para ação das exoglucanases; e as β -glicosidases completam o processo por meio da hidrólise da celobiose e outros oligossacarídeos curtos a glicose (Martins et al., 2008).

Das celulases totais, a enzima mais atuante é a exoglucanase, responsável por iniciar a hidrólise nas extremidades da cadeia. Esse comportamento pode explicar os valores mais elevados de produto de hidrólise em menor intervalo de cultivo para a endoglucanases do que



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

as atividades encontradas para as celulases totais. Fica demonstrado que a atuação desta enzima é importante para a posterior atuação das celulases totais (Santos et al., 2013). Logo, podemos afirmar que a concentração de endoglucanase em determinados intervalos de cultivo foi maior do que da exoglucanase, gerando assim atividades maiores da endo se comparada ao complexo (celulase total).

CONCLUSÕES

Dentre os fungos estudados e nos intervalos de cultivo, o fungo *Rhizopus oryzae* apresentou desempenho de até três vezes maior em relação a produção de endoglucanase e uma produção similar de celulase, porém, em um menor intervalo de cultivo (24 horas) se comparado ao *Trichoderma reesei* (96 horas). Logo, o cultivo de *Rhizopus oryzae* em farelo de arroz integral, demonstra um alto potencial para a obtenção de compostos bioativos e/ou das enzimas do complexo celulotico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Campestrini E, Silva VTM, Appelt MD. 2005. Utilização De Enzimas Na Alimentação Animal. Artigo Número 27. Revista Eletrônica Nutritime, v.2, n°6, p.259-272, novembro/dezembro 2005.
- Kupski L, Silvello MAC, Fontes MRV, Lima TS, Treichel H, Badiale-Furlong E. 2015. *R. Oryzae Cellulases: A New Approach To Degrading Lignocellulosic Material*. Journal of Food Biochemistry ISSN 1745-4514
- Martins LF, Kolling D, Camassola M, Dillon AJP, Ramos LP. 2008. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresour. Technol.* 99, 1417–1424.
- Oliveira MS, Feddern V, Kupski L, Cicolatti EP, Badiale-Furlong E, Souza-Soares LA. 2010. Changes in lipid, fatty acids and phospholipids composition of whole rice bran after solid-state fungal fermentation. *Bioresource Technology* 102 (2011) 8335–8338
- Oliveira MS, Kupski L, Feddern V, Cicolatti EP, Badiale-Furlong E, Souza-Soares LA. 2010. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. *CyTA – J. Food* 8, 229–236.
- Paraskevopoulou A, Athanasiadis I, Kanellaki M, Bekatorou A, Blekas G, Kiosseoglou V. 2003. Functional properties of single cell protein produced by kefir microflora. *Food Research International*, v. 36, p. 431-438, 2003.
- Pelizer HL, Pontieri HM, Moraes OI. 2007. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. São Paulo: *Journal of Technology Management & Innovation*, v. 2, 2007.
- Santos TC, Filho GA, Rocha TJH, Ferreira AN, Diniz GA, Franco M. 2013. Produção e quantificação de celulases por meio da fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais. *Scientia Agraria Paranaensis – SAP Mal. Cdo. Rondon*, v. 12, n. 2, abr./jun., p.115-123, 2013
- Silva MA, Sanches C, Amarante ER. 2001. Farelo de arroz: composição e propriedades. *Óleos e Grãos*, Julho/Agosto, 2001.
- Singhania RR, Patel AK, Soccol CR, Pandey A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, p. 13-18, 2009.
- Zhong Y, Wang X, Yu H, Liang S., Wang T. 2012. Application of T-DNA insertional mutagenesis for improving cellulase production in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bioresour. Technol.* 110, 572–577.