

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Uso de Sub-Produtos Agrícolas para Produção de Endoglucanases por *Penicillium* sp. I7-5

Matheus Uchoa Oliveira¹, Lucas do Nascimento Silva² e Rodrigo Pires do Nascimento¹

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Tecnologia, Escola de Química, Dep. Engenharia Bioquímica, Cidade Universitária, 21941-909, Rio de Janeiro, RJ.

² Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes

E-mail para contato: rodrigopires@eq.ufrj.br

RESUMO

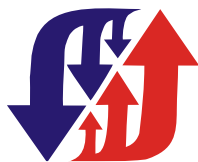
Os fungos apresentam grande potencial biotecnológico devido a sua versatilidade metabólica em produzir enzimas com diferentes propriedades bioquímicas, destacando os fungos dos gêneros Penicillium, Aspergillus e Trichoderma. Assim, o presente trabalho objetivou otimizar a produção de endoglucanases pelo fungo Penicillium sp. I7-05, isolado da região do Planalto das Agulhas Negras (> 2.400 m), sendo a estirpe I7-05 crescida em frascos cônicos contendo Meio de Mandels modificado (pH 5.5) suplementado com diferentes concentrações de Palha de Cana e Milhocina, de acordo com a matriz gerada pelo Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR). O sistema foi incubado por 5 dias / 28 °C / 180 rpm e a atividade de endoglucanase (CMCase) foi determinada através do método de DNS. O melhor resultado para atividade de endoglucanase (2.567,47 U/L) foi observado na presença de 1,5% (p/v) de palha de cana e 0,15% (p/v) de milhocina, sugerindo grande possibilidade de utilização desse fungo em bioprocessos industriais.

Palavras-chave: *Penicillium* sp. I7-05, celulasas, palha de cana, fermentação submersa.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta, reunindo cerca de 70% das espécies vegetais e animais do mundo, de acordo com os dados da *International Conservation*. O Parque Nacional de Itatiaia, é uma unidade de conservação brasileira, dentro do bioma Mata Atlântica, de proteção integral da natureza localizada na Serra da Mantiqueira, Rio de Janeiro. No interior do parque encontram-se alguns dos picos mais altos do Brasil, beirando os 2.800 m de altitude. Assim, a investigação de novos “hot spots” para a bioprospecção de microrganismos com importância biotecnológica é de suma importância. Dentre esses, os fungos se destacam como os principais degradadores de compostos orgânicos no meio ambiente, através da secreção de enzimas hidrolíticas (Delabona, 2011).

Os fungos são microrganismos eucarióticos saprófitas ou parasitas, que podem apresentar uma estrutura vegetativa unicelular ou filamentosa com reprodução sexuada e/ou assexuada (Margulis, Chapman, 2009). Os fungos desempenham importantes funções no



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

ecossistema, sendo capazes de decompor diferentes tipos de matéria orgânica no ambiente. Essa degradação é devido à liberação de enzimas que hidrolizam e/ou oxidam o substrato, desestruturando as estruturas poliméricas e macromoleculares. As principais enzimas secretadas pelos fungos são as hemicelulases, as, peptidases, as lipases e as peroxidases, sendo os fungos *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* de maior relevância biotecnológica. Atualmente, uma das enzimas mais estudadas são aquelas pertencentes ao complexo celulolítico. As celulasas são uma mistura complexa de enzimas que agem sinergeticamente na solubilização completa da celulose em açúcares que servirão de aporte nutricional para o metabolismo microbiano. Basicamente podem ser classificadas como endoglucanases (E.C. 3.2.1.4), que clivam randomicamente o polímero de celulose, alterando rapidamente o grau de polimerização da celulose, as celobiohidrolases (E.C. 3.2.1.91), que hidrolizam o polímero nos terminais não-redutores, liberando celobiose e as celobiasas (β -glucosidase, E.C. 3.2.1.21) que são responsáveis pela clivagem de pequenas cadeias de celooligossacarídeos e celobiose a glucose, utilizada nas vias metabólicas do microrganismo (Ghose, 1985; Cobucci-Ponzano *et al.*, 2013).

Assim sendo, o presente trabalho objetivou estudar a otimização da produção de endoglucanases pelo fungo *Penicillium* sp. I7-05, isolado do Planalto das Agulhas Negras no Parque Nacional de Itatiaia, utilizando Palha de Cana e Milhocina como substrato indutor, adotando a ferramenta estatística Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR).

MATERIAIS E MÉTODOS

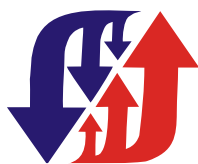
O microrganismo

O fungo *Penicillium* sp. I7-05 foi isolado de amostra de solo coletada na região do Planalto das Agulhas Negras (\cong 2.450 m), dentro do Parque Nacional de Itatiaia (PNI), em meio seletivo de celulose cristalina, purificado e conservado inicialmente em água estéril (Método de Castellani) a 10°C. A manutenção do microrganismo foi em meio de Agar Extrato de Malte, pH 5.5, incubado a 28°C.

Uma suspensão de esporos foi produzida para padronização do inóculo. Assim, o fungo *Penicillium* sp. I7-05 foi cultivado em Meio Agar Extrato de Malte, pH 5.5 por 12 dias a 30°C. Após esse período, as placas foram lavadas com solução fisiológica estéril, e os esporos foram filtrados, centrifugados e conservados em solução glicerol 20% a -20°C, sendo sua quantificação determinada pelo método das Diluições Seriadas.

Produção de celulasas por fermentação submersa

A produção de endoglucanases pelo fungo *Penicillium* sp. I7-05 foi conduzida em frascos Erlenmeyers (125 ml), contendo 25 ml de meio de sais (Mandels, Weber, 1969) modificado (pH 5,5) composto de (g/l): 2.0 K₂PO₄; 1.4 (NH₄)₂SO₄; 0.3 MgSO₄.7H₂O; 0.3 CaCl₂; 0.005 FeSO₄.7H₂O; 0.00156 MnSO₄.7H₂O; 0.0014 ZnSO₄.7H₂O; 0.002 CoCl₂. O meio foi suplementado com diferentes concentrações de palha de cana (X₁) e milhocina (X₂) como demonstrado na matriz do planejamento fatorial DCCR (Tabela 1). Os frascos foram inoculados com 25 μ l da suspensão de esporos padronizada (10⁹ UFC/ml) e incubados a 28°C / 5 dias / 180 rpm. Após esse período, o mosto fermentado foi filtrado, centrifugado e o sobrenadante congelado a -20°C para análises posteriores. As análises estatísticas serão



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

conduzidas no software Statsoft® 7.0. Após análises dos dados, foi realizada uma validação fixando o valor de milhocina em 0.15% (p/v) e variando a concentração de palha de cana (1,0, 1,25 e 1,5% p/v).

Ensaio Analítico

A determinação da atividade de endoglucanase (CMCase) foi realizada através da quantificação dos açúcares redutores gerados após incubação, a 50 °C / 10 min, do sobrenadante em solução tampão citrato de sódio, 50 mM, pH 4.8 contendo 2,0% (p/v) carboximetilcelulose (baixa viscosidade), pelo método DNS (Miller, 1959). Após o período de incubação enzima + substrato, a mistura reacional foi lida em espectrofotômetro a 540 nm, como descrito por Ghose (1987).

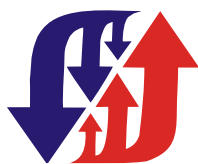
Os ensaios analíticos de CMCase foram realizados em duplicata sendo uma unidade de atividade enzimática (U) definida como μ moles de produto liberado (glucose) por minuto de reação, nas condições utilizadas no ensaio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A melhor condição observada no planejamento fatorial DCCR para a produção de endoglucanase (CMCase) foi no ensaio 1, quando se utilizou 1,5% (p/v) de palha de cana e 0,3% (p/v) de milhocina, com o máximo de atividade atingindo 1.871,47 U/l (Tabela 1). De acordo com os dados experimentais, quando se utilizou 1,5% (p/v) de palha de cana e 0,3% de milhocina, foi possível obter a melhor resposta dependente.

Tabela 1 – Matriz do DCCR 2² com as variáveis independentes – palha de cana *in natura* (X₁), e milhocina (X₂) para a produção de endoglucanase (CMCase). Os valores apresentados na Tabela são valores codificados (X₁ e X₂) e valores reais (fonte de C e N em %).

Ensaio	X ₁	X ₂	Palha de Cana (%)	Milhocina (%)	CMCase (U/l)
1	-1	-1	1,5	0,3	1.871,47
2	+1	-1	3,5	0,3	1.322,40
3	-1	+1	1,5	1,1	348,00
4	+1	+1	3,5	1,1	1.074,93
5	-1,41	0	1,09	0,7	750,13
6	+1,41	0	3,91	0,7	1.179,33
7	0	-1,41	2,5	0,15	1.388,13
8	0	+1,41	2,5	1,26	958,93
9	0	0	2,5	0,7	1.322,40
10	0	0	2,5	0,7	1.299,20
11	0	0	2,5	0,7	1.314,67



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

O coeficiente de variação obtido ($R^2=0,864$) indica que 86,4% da variabilidade dos resultados podem ser explicadas pelo modelo.

A validação mostrou que a otimização da atividade de endoglucanase produzida pela linhagem *Penicillium* I7-05 aconteceu na condição 1,5% de palha de cana e 0,15% de milhocina no 5º dia de fermentação, apresentando um máximo de 2.567,47 U/l. Grigorevski-Lima *et al.* (2013) observaram um máximo de produção de endoglucanase (1.930,0 U/l) pelo fungo *Trichoderma atroviride* na presença de bagaço de cana *in natura*, ao fim de 4 dias de fermentação submersa. Castro *et al.* (2010) observaram a produção das 3 enzimas do complexo celulase (endoglucanase, FPase e β -glucosidase) pelo fungo *Penicillium funiculosum* em diferentes substratos. As máximas atividades de cada enzima foram detectadas em diferentes substratos. A maior produção de endoglucanase (3.588,01 U/l) foi observada no substrato celuliginina ao fim de 15 dias de fermentação submersa ($Q_p = 239,20$ U/l.dia). Embora esses valores tenham sido superiores aos observados no presente trabalho, vale ressaltar que as biomassas, o tempo de fermentação e os microrganismos foram diferentes. A estirpe *Penicillium* sp. I7-05 apresentou uma produtividade (Q_p) de 513,49 U/l.dia, superior ao observado por Castro *et al.* (2010).

CONCLUSÕES

Novos estudos deverão ser conduzidos para avaliar o máximo da produção de endoglucanase pelo fungo *Penicillium* I7-05, variando as concentrações de palha de cana (1,75 e 2,0%) e milhocina (0,3%). Os resultados aqui obtidos, sugerem uma possível aplicação biotecnológica da linhagem *Penicillium* sp. I7-05 em processos fermentativos que visem a produção de celulases.

REFERÊNCIAS

- Barnett, H.L.; Hunter, B.B. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Minneapolis, ed. 14, 1999.
- Castro, A.M.; Carvalho, M.L.A.; Leite, S.G.F.; Pereira-Jr., N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 37, p. 151-158, 2010.
- Cobucci-Ponzano, B.; Ionata, E.; La Cara, F.; Morana, A.; Ferrara, M.C.; Maurelli, L.; Strazzulli, A.; Giglio, R. & Moracci, M. *Extremophilic (Hemi) cellulolytic microorganisms and enzymes*. In: FARACO, V. Lignocellulose Conversion – Enzymatic and microbial tools for bioethanol production. Naples: Springer, 111-124, 2013.
- Delabona, P.S. *Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para a produção de etanol celulósico*. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia), Universidade Federal de São Carlos, pp. 122, 2011.
- Figueiredo, M.B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. *O Biológico*, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 9-13, 1967.
- Ghose, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* v. 59, p. 257-268, 1987.
- GRIGOREVSKI-LIMA, A.L.; OLIVEIRA, M.M.Q.; NASCIMENTO, R.P.; BON, E.P.S.; COELHO, R.R.R. Production and partial characterization of cellulases and xylanases from *Trichoderma atroviride* 676 using lignocellulosic residual biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 169, p. 1373-1385, 2013.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; STAHL, D.A. & CLARK, D.P. *Brock Biology of Microorganisms*. 13. ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2012.
- MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulase. *Adv Chem Series*, v. 95, p. 391-414, 1969.
- MARGULIS, L.; CHAPMAN, M.J. *Kingdom Fungi. Kingdoms and Domains* 379-409, 2009.
- Miller, L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* v. 31, p. 426-428, 1959.