



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Produção de celulases por fermentação submersa em sistema de co-cultivo com as linhagens mutantes *Trichoderma atroviride* 102C1 e *Streptomyces misionensis* B4

**Lucas do Nascimento Silva¹, Rodrigo Pires do Nascimento², Celuta Sales Alviano¹,
Daniela Sales Alviano¹**

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Cidade Universitária, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Departamento de Engenharia Química, Cidade Universitária, 21941-909, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

E-mail: rodrigopires@eq.ufrj.br / lucas_nsc@hotmail.com

RESUMO

RESUMO – A produção de enzimas pode ser melhorada através de técnicas de mutação e co-cultivo em matéria-primas renováveis. Assim, o presente trabalho objetivou a produção de celulases por co-cultivo utilizando as linhagens mutantes *Streptomyces misionensis* B4 e *Trichoderma atroviride* 102C1 em fermentação submersa. Foram utilizados meios específicos para ambos os microrganismos. As fermentações foram realizadas em frascos cônicos contendo meio de Mandels modificado suplementado com 3,0% de bagaço de cana-de-açúcar e 0,3% de milhocina e 25 ml de meio de Breccia suplementado com 1,0% de bagaço de cana-de-açúcar e 1,2% de milhocina. O volume de inóculo foi igual para ambos os mutantes (concentração final de 10^6 UFC/ml). A fermentação foi conduzida por 5 dias. A melhor atividade de CMCase (1,1 U/ml) foi obtida no meio de Mandels enquanto a melhor atividade de FPase (0,25 FPU/ml) foi observada em ambos os meios, sendo possível a produção de celulases por sistema de co-cultivo.

INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos eucarióticos aclorofilados, ubiquamente distribuídos no ambiente que apresentam uma grande versatilidade metabólica, sendo conhecidos como grandes produtores de bioprodutos, como enzimas (celulases, lipases, amilases, proteases, peroxidases) e antibióticos (cefalosporinas e penicilinas). Dentre os principais gêneros de relevância industrial, destacamos *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* (Margulis e Chapman, 2009, Gusakov, 2011).

As actinobactérias são bactérias filamentosas Gram-positivas de vida livre, saprofíticas, distribuídas amplamente em uma grande variedade de ambientes naturais, como rios, mares e na atmosfera, sendo o solo seu habitat mais comum. Pertencentes ao domínio Bactéria, este grupo apresenta mais de 1.000 espécies diferentes distribuídas em 6 Ordens. Devido a sua versatilidade fisiológica, as actinobactérias são consideradas grande produtoras de biomoléculas, principalmente antibióticos, enzimas e pigmentos (Coelho e Nascimento, 2008).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Dentre as enzimas holocelulolíticas produzidas por *Trichoderma* e *Streptomyces* destacamos as endoglucanases (EC 3.2.1.4), as celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), as β -glucosidases (EC 3.2.1.21), as endoxilanasas (EC 3.2.1.8), as β -xilosidases (EC 3.2.1.37). Essas enzimas são de suma importância quando se objetiva um melhor aproveitamento da biomassa vegetal, através da despolimerização da celulose e das outras fibras polissacarídicas. Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar a produção de celulases através do co-cultivo de duas linhagens mutantes, *Streptomyces misionensis* B4 e *Trichoderma atroviride* 102C1, sob condições submersas em resíduo agro-industrial.

MATERIAL E MÉTODOS

FERMENTAÇÃO MISTA UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

A fermentação mista utilizando o fungo *T. atroviride* 102C1 e a actinobactéria *S. misionensis* B4 foi realizada em Erlenmeyers (125 ml) contendo 25 mL de meio de sais de Mandels (Mandels & Weber, 1969) contendo (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 e suplementado com 3,0% (p/v) bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e 0,3% (p/v) de milhocina (p/v) ou meio de sais de Breccia (Breccia et al, 1995) contendo (g/l): 2,0 NaCl; 3,0 KH₂PO₄; 6,0 K₂HPO₄; 0,5 MgSO₄.7H₂O; 0,05 CaCl₂.2H₂O; 0,011 FeSO₄.7H₂O; 0,079 MnSO₄.7H₂O; 0,015 ZnSO₄.7H₂O; 0,064 CuCl₂ suplementado com 1,0% (p/v) bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e 1,2% (p/v) de milhocina. 25 μ l da suspensão de esporos de cada microrganismo foram utilizados como inóculo, sendo o fungo 8,0 x 10⁹ UFC/mL e a actinobactéria 2,8 x 10⁹ UFC/mL, de modo que a concentração final no meio fosse 10⁶ UFC/ml. A fermentação foi conduzida durante 5 dias, sendo amostras coletadas diariamente, filtradas e congeladas a -20°C para análises posteriores.

ENSAIOS ENZIMÁTICOS

A determinação da atividade de endoglucanase (CMCase) foi conduzida através da quantificação dos açúcares redutores gerados na presença de 2.0% (p/v) carboximetilcelulose em tampão citrato de sódio, 50 mM, pH 4,8, pelo método DNS (Miller, 1959), como descrito por Ghose (1987). O sistema enzimático foi incubado a 50 °C por 20 min e a leitura foi realizada por espectrofotômetro a 540 nm. A determinação da atividade de celulases total (FPase) foi conduzida através da quantificação dos açúcares redutores gerados a partir da degradação de uma tira de papel de filtro Whatman N° 1 medindo 1,0 cm x 6,0 cm (\approx 50 mg) em tampão citrato de sódio, 50 mM, pH 4,8, pelo método DNS (Miller, 1959), como descrito por Ghose (1987). O sistema enzimático foi incubado a 50 °C por 60 min e a leitura foi realizada por espectrofotômetro a 540 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dois microrganismos foram cultivados em 2 diferentes meios de cultivo suplementados com subprodutos da agro-indústria, na forma de co-cultivo, visando a produção de celulases. Após 120 horas de fermentação submersa foi possível observar uma nítida interferência dos dois meios de cultivo na produção de CMCases pelos dois microrganismos testados (Figura 1). Contudo, o mesmo fenômeno não foi observado para a produção de FPases (Figura 2).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

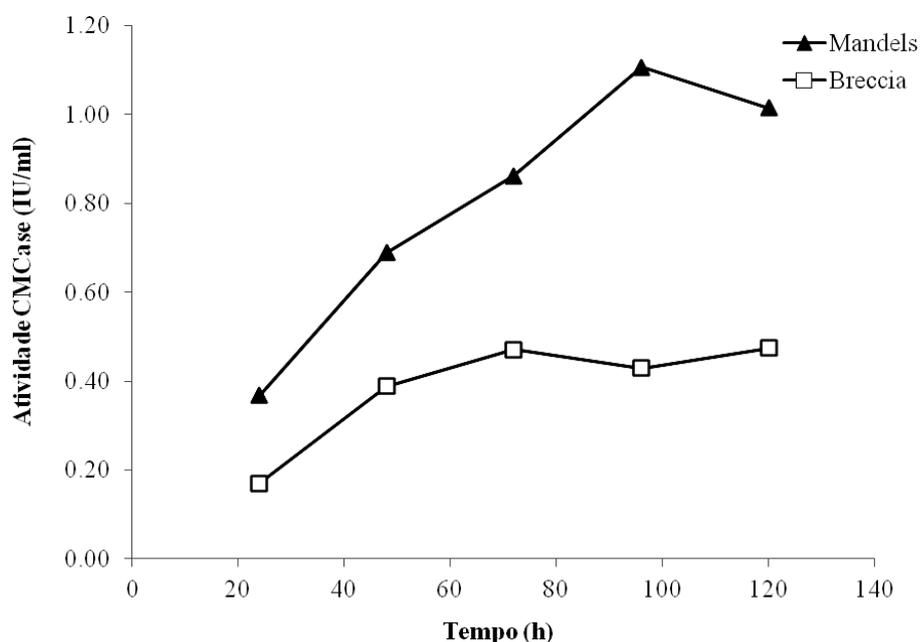


Figura 1 – Cinética de produção de endoglucanase (CMCase) a partir da fermentação mista de *T. atroviride* 102C1 e *S. misionensis* B4 nos meios de cultivo Mandels (▲) e Breccia (□), ao fim de 120 horas.

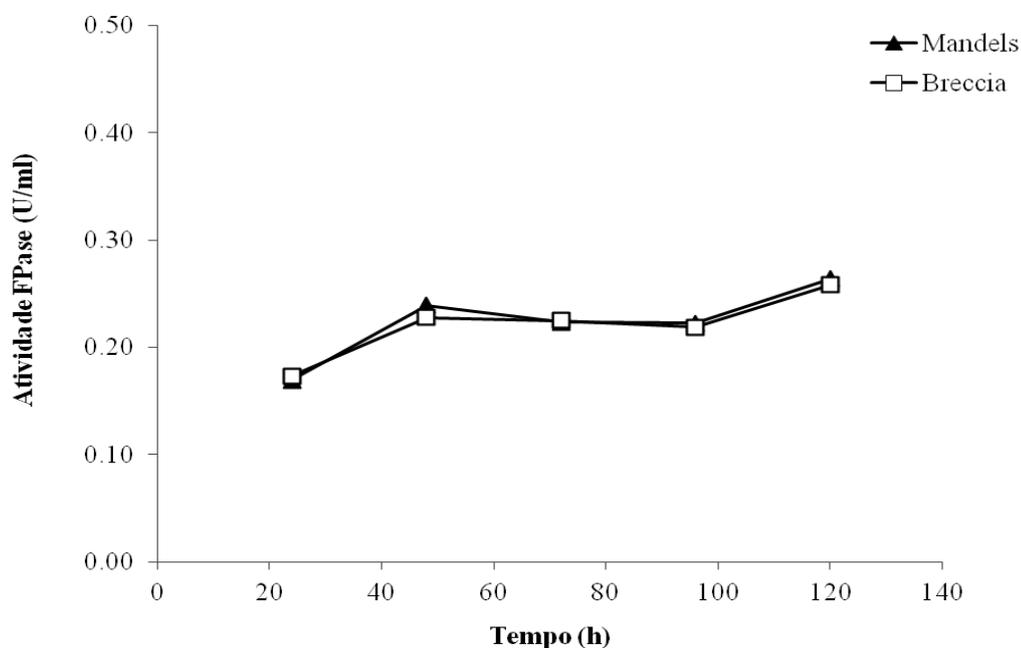


Figura 2 – Cinética de produção de celulase total (FPase) a partir da fermentação mista de *T. atroviride* 102C1 e *S. misionensis* B4 nos meios de cultivo Mandels (▲) e Breccia (□), ao fim de 120 horas.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

A máxima produção de CMCCase (1,10 IU/ml) em sistema de co-cultivo foi observada quando se utilizou o meio de Mandels, ao fim de 96 horas. Este valor de atividade se mostrou superior ao valor obtido com fungo *T. atroviride* 102C1, no mesmo meio em cultivo axênico (0,43 IU/ml), representando um aumento de cerca de 60%. Contudo, esse valor se mostrou inferior ao obtido com a actinobactéria *Streptomyces misionensis* B4, cultivada em meio de Breccia, no qual a atividade máxima de CMCCase foi 2,0 IU/ml, ao fim de 120 horas de fermentação.

Quando se utilizou o meio de cultivo Breccia em sistema de co-cultivo, a máxima atividade de CMCCase (0,46 IU/ml) foi observada ao fim de 72 horas de fermentação. Este valor de atividade se mostrou praticamente o mesmo quando o fungo *T. atroviride* 102C1 foi cultivado de forma axênica no meio de Mandels. Mesmo utilizando sistema de co-cultivo em meio Breccia, não houve melhoras na produção de CMCCase quando comparado ao cultivo axênico da actinobactéria, sendo uma redução de aproximadamente 80% na atividade.

Com relação a atividade de FPase, o perfil em ambos os meios se mostrou praticamente idêntico, durante as 120 horas de fermentação, com um valor máximo de 0,25 U/ml. Esse valor foi inferior ao observado na cultura de *S. misionensis* B4 em cultivo axênico, quando o máximo foi 0,43 U/ml, ao fim de 96 horas.

CONCLUSÕES

A utilização de co-cultivos entre actinobactérias e fungos filamentosos se mostrou uma alternativa interessante a ser adotada para a produção de enzimas celulolíticas. Os valores de atividade CMCCase observados no co-cultivo em meio de Mandels foram superiores aos níveis de produção do fungo em cultivo axênico, porém foram inferiores aos observados pela actinobactéria nas mesmas condições. Os valores aqui apresentados se mostraram aquém aos observados na literatura, sendo necessários novos estudos para otimizar as condições dos meios de cultivo para melhorar a produção de celulasas (CMCase e FPase).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bader, J.; Mast-Gerlach, E.; Popovic, M.K.; Bejpai, R.; Stahl, U. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 2010.
- Breccia, J. D. Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method. *Journal of Applied Bacteriology*, 78 469-472, 1995.
- Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem.*, 59, 257-268.
- Gusakov AV. 2011. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends Biotechnol.* vol. 29, pp.
- Mandels, M., Weber, J. 1969. Production of cellulases. *Adv. Chem. Ser.* 95, 391-414.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P. 2012. *Brock Biology of Microorganisms*. 13. ed. San Francisco: Benjamin Cummings.
- Margulis L, Chapman MJ. 2009. Chapter Four – KINGDOM FUNGI. *Kingdoms and Domains* pp. 379-409. 419-425.
- Miller, L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.