

COMPARAÇÃO DA SÍNTESE DE CELULASES PELOS FUNGOS *Trichoderma reesei* E O FSDE15

K. S. do BONFIM¹, R. K. P. da SILVA¹, E. J. F. CHAVES², L.C. T. de CARVALHO², D. A. M. de ARAÚJO² e S. F. de M. SANTOS¹.

¹ Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Engenharia Química

² Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biotecnologia

E-mail para contato: sharlinefm@hotmail.com

RESUMO – Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. A produção eficaz de celulases é importante para a definição de biorrefinaria, na utilização de materiais lignocelulósicos renováveis para produção de combustível e produtos químicos com alto valor agregado. Este trabalho avaliou a síntese de celulases por dois fungos, o *Trichoderma reesei*, conhecido na literatura como bom produtor de celulases, cedido pela Fundação André Tosello, e o FSDE15, isolado do solo de uma usina sucroalcooleira. Os cultivos foram realizados utilizando farelo de trigo como substrato, 90 gramas com umidade de 50%, dispostos em frascos erlenmeyer de 1000 mL e esterilizados. Após o resfriamento, o meio foi inoculado com uma concentração de 10⁶ esporos/g e incubados sob condições estáticas em estufa a 37°C, durante 6 dias com análises de atividade de CMCase realizadas a cada 24 horas de cultivo. O pico de atividade de CMCase para os fungos avaliados foram com 4 dias de cultivo.

1. INTRODUÇÃO

O novo conceito de etanol (ou bioetanol) corresponde a sua produção utilizando como matéria-prima biomassa lignocelulósica. A utilização dessa matéria-prima, obtida a partir de resíduos agroindustriais, é essencial para o aumento da produção de etanol, uma vez que a produção já está quase limitada pela disponibilidade de área plantada, seja por competir com a produção de alimentos ou devido aos preços relativos. O uso da biotecnologia para converter celulose em etanol fornece oportunidades para as empresas na área de desenvolvimento de enzimas, principalmente celulases e hemicelulases (Goldbeck *et al.*, 2013).

Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (Castro e Perreira Jr., 2010).

As celulasas desempenham um importante papel na bioconversão de materiais celulósicos em biocombustíveis. O grande gargalo para uma aplicação mais ampla de celulasas na produção de etanol de segunda geração é o seu custo, especialmente porque grandes quantidades das enzimas são necessárias (Delabona *et al.*, 2012).

A produção de celulasas em escala industrial começou em meados da década de 80, visando sua aplicação como um aditivo para ração animal, de forma a aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos. Em seguida, essas enzimas começaram a ser utilizadas como um insumo para a indústria de alimentos, cujo objetivo era de melhorar propriedades sensoriais de massas. Nesse setor, as celulasas também começaram a atuar no processamento de bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos e a manutenção de uma reologia estável do produto final. Posteriormente, as enzimas celulolíticas começaram a ser utilizadas em larga escala nas seguintes indústrias: têxtil, nos então implementados processos de biopolimento (desfibrilação de tecidos como algodão, linho, lã e viscose) e bioestonagem (amaciamento e desbotamento do brim); de polpa e papel, para a modificação controlada de propriedades mecânicas da polpa e liberação de tintas da superfície das fibras a ser recicladas; e em lavanderia, de forma a aumentar o brilho, a remoção de sujeiras e a maciez dos tecidos. Já na década de 90, as celulasas, juntamente com as hemicelulasas, representavam mais de 20% do mercado mundial de enzimas (Castro e Perreira Jr., 2010).

A busca por celulasas eficientes e alta produtividade na síntese enzimática microbiana são fatores essenciais para aplicação dessas enzimas na produção de bioetanol. As celulasas podem ser produzidas por diversos fungos e bactérias. A seleção de cepas fúngicas possuindo alta capacidade de expressão e uma diversidade de enzimas celulolíticas com elevada atividade específica é essencial, a fim de obter complexos enzimáticos capazes de hidrolisar biomassa vegetal a custo reduzido. Os fungos são os organismos mais estudados, devido à sua capacidade de produzir complexos celulolíticos completos e em grandes quantidades. A maior parte dos estudos é focada em fungos com capacidade superior de produzir celulasas, como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Humicola*, sendo o gênero *Trichoderma* relatado como o mais eficiente na degradação da celulose (Saad, 2010; Lynd *et al.*, 2002).

Neste trabalho foram comparados dois fungos o *Trichoderma reesei* e o FDSE15 quanto à síntese de celulasas através do cultivo em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato.

2. METODOLOGIA

2.1. Microrganismos

Foram utilizados dois fungos, o FSDE15 e o *Trichoderma reesei*. O fungo FSDE15 foi cedido pelo Prof. Dr. Demetrius Antônio Machado de Araújo do Centro de Biotecnologia-UFPB, isolado do solo de descanso do cultivo de cana-de-açúcar da Usina Japungu Agroindustrial S.A, localizada no município de Santa Rita, no estado da Paraíba, pela aluna do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, (Renorbio), Laís Campos Teixeira de Carvalho. O mesmo foi selecionado como produtor de celulasas, pela medida do diâmetro do halo de degradação, em

meio com carboximetilcelulose (CMC) como fonte de carbono.

O *Trichoderma reesei* foi cedido pela Fundação André Tosello e pertence à Coleção de Culturas Tropicais (CCT), com número CCT 2768. Os fungos foram conservados em meio BDA (Batata Dextrose Ágar) sob refrigeração.

Inóculo: Foi feito o repasse dos fungos do estoque para placas de Petri contendo o meio BDA e clorafenicol a 0,1%. As placas foram incubadas em estufa por 5 dias a 37°C. Após o crescimento, os esporos foram suspensos em água destilada estéril, e recolhidos em um tubo para posterior contagem e inoculação no meio.

Para obter a concentração desejada de 10^6 esporos/g foi feita a contagem de esporos utilizando a câmara de Neubauer no microscópio eletrônico. Assim o volume de inóculo foi obtido pela equação 1:

$$Volume\ do\ in\acute{o}culo_{(mL)} = \frac{Conc.\ esporos\ desejada\left(\frac{esporos}{g}\right) * Massa\ substrato\ g}{Conc.de\ esporos\ \left(\frac{esporos}{mL}\right)} \quad (1)$$

Onde:

Concentração de esporos desejada (esporos/g) = 10^6 esporos/g

Massa substrato = 90g

2.2. Cultivo em estado sólido

Como meio de cultivo foi utilizado farelo de trigo. A umidade do farelo foi determinada por secagem em estufa a 105°C por 24h. A umidade foi ajustada para 50% através do acréscimo do meio Mandels e Weber (1969) ((g/L) Uréia 0,3; $(NH_4)_2SO_4$ 1,4 ; KH_2PO_4 2 ; $CaCl_2$ 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,3; Peptona 0,75; extrato de levedura 0,25 e 1 mL/L de solução estoque ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g/L, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,2 g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,16g/L, $ZnSO_4 \cdot H_2O$ 0,14 g/L)).

Os cultivos foram realizados em duplicata, em erlenmeyer de 1000 mL, com 90 g do farelo de trigo umedecido. O meio foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C. Após o resfriamento, foi inoculado com o volume de inóculo anteriormente calculado e incubado em estufa por 6 dias a 37°C, com extração feita a cada 24h.

Extração: Para a extração da enzima foi utilizado como solvente o tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8; na proporção de 5 mL por grama de amostra. A cada 24h de cultivo foi retirada uma amostra de 2 a 3 g do meio e acondicionado em tubos. O tampão foi adicionado e após mistura, aguardava uma hora de extração. Em seguida a mistura era filtrada com papel de filtro. O filtrado armazenado sob refrigeração em frascos foi utilizado como fonte de enzimas (extrato bruto) nas análises de atividade enzimática.

Atividade enzimática CMCase: As amostras das enzimas recolhidas do cultivo foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos à 17°C. O sobrenadante foi utilizado para realizar a

análise da atividade, seguindo a metodologia proposta por Ghose (1987).

Foi preparada solução de carboximetilcelulose (CMC) 4% (Sigma C-5678) em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8. Em tubos foram adicionados 0,25 mL do extrato enzimático e 0,25 mL da solução de CMC 4%, agitando vigorosamente em vortex. A mistura foi aquecida em banho-maria a 50°C por 10 minutos para que ocorresse a reação. Após a reação foi adicionado 0,5 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS), agitando em seguida no vortex.

Para o branco do espectrofotômetro foram adicionados aos tubos 0,25 mL da solução de CMC 4%, 0,25 mL do tampão citrato de sódio e 0,5 mL de DNS. Para o branco das amostras foram adicionados 0,25 mL do tampão e 0,25 mL do extrato enzimático, depois de aquecimento em banho por 10 minutos foram adicionados 0,5 mL de DNS.

Em seguida, os tubos foram aquecidos em água fervente por 5 minutos. Depois resfriados em banho de gelo. As amostras foram diluídas para serem lidas na leitora ELISA a 540 nm, foram colocados em cada um dos 96 poços 40µL de cada amostra para 300µL de água destilada. Os valores obtidos na leitura foram convertidos a partir da curva de glicose previamente feita, onde as concentrações variaram de 0,1 a 3 mg/mL. O valor da atividade enzimática era obtido pela equação 2:

$$\text{CMCase } \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \frac{(A-B) \times f \times d \times 0,5 \times R}{(0,18 \times 10 \times 0,25)} \quad (2)$$

Onde:

A = absorbância da amostra

B = absorbância do branco da amostra

f = fator de conversão da curva de calibração (mg/mL)

d = diluição da amostra

0,5 = volume total do meio de reação (mL)

0,18 = fator de conversão de miligramas para µmol de glicose

10 = tempo de reação (min)

0,25 = volume da enzima no meio de reação (mL)

R = razão volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo FSDE15, isolado do solo de descanso do cultivo de cana-de-açúcar foi selecionado pela medida do halo de degradação após crescimento em meio contendo carboximetilcelulose como fonte de carbono. A placa mostrando o halo de degradação é mostrada na Figura 1.



Figura 1- Presença do halo de hidrólise da carboximetilcelulose.

Para avaliação da produção de celulasas pelos fungos, os mesmos foram crescidos em meio de farelo de trigo em cultivo em estado sólido. Durante o crescimento foi possível observar que nas primeiras 24 horas de cultivo os fungos já apresentavam crescimento aparente.

As cinéticas de produção enzimática do FSDE15 e do *Trichoderma Reesei* CCT 2768 em meio de farelo de trigo estão representadas pela Figura 2. Podemos observar que o pico de produção enzimática do FSDE15 ocorre com 4 dias de cultivo, com valor de Atividade de CMCase de 6,265 U/g. E para o *Trichoderma Reesei* CCT 2768 ocorre também com 4 dias de cultivo, no entanto, visto que já conhecemos da literatura que o mesmo se trata de um bom produtor de celulasas, encontramos um valor maior de atividade de 16,90 U/g.

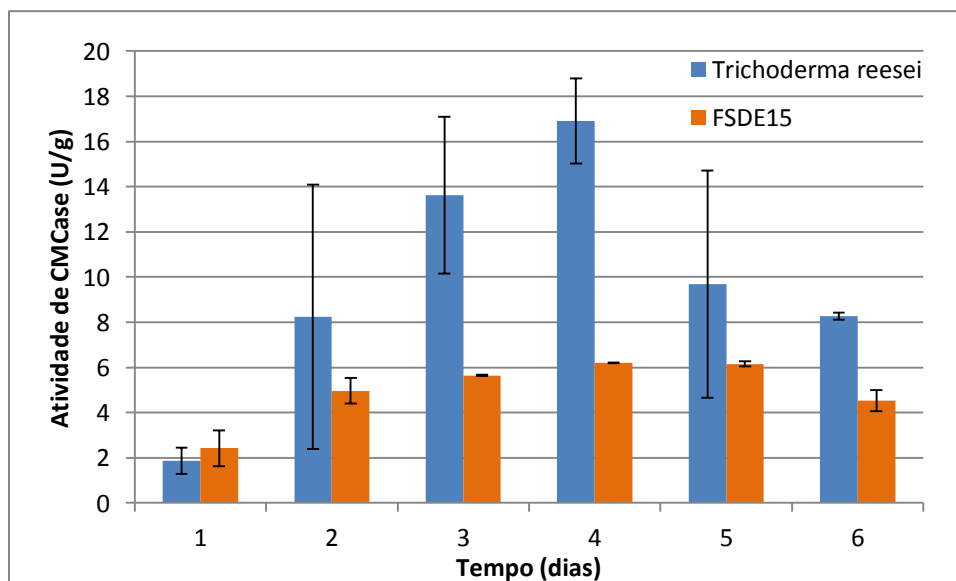


Figura 2 – Cinética de produção de atividade enzimática.

Podemos observar ainda que para o *Trichoderma Reesei* CCT 2768 os valores das atividades em duplicata, apresentaram certo desvio da normalidade, pois nos tempos de cultivo de 2 e 5 dias os valores obtidos são distantes. No entanto, não foi possível identificar com exatidão o

que acarretou esta diferença. Visto que existem muitas variáveis que podem ter levado ao ocorrido.

Comparando os resultados com os do trabalho de Almeida (2012) para o *Trichoderma reesei* RUT C-30 cultivado em farelo de trigo com umidade de 50%, apresentando pico de atividade no tempo de 21 dias com valor de 27,113 UI/g. Podemos perceber que o *Trichoderma reesei* CCT 2768 apresenta um valor inferior de atividade enzimática, mas se comparado em termos de produtividade o *Trichoderma Reesei* CCT 2768 apresenta uma produtividade de 4,25 U/g dia, enquanto que o *Trichoderma reesei* RUT C-30 e o FSDE15 de 1,29 U/g dia e 1,55 U/g dia respectivamente, o que mostra que os fungos utilizados neste trabalho apresentam potencial para produção de CMCase.

Ainda fazendo a comparação com Almeida (2012) podemos também avaliar a atividade enzimática do *Penicillium variable* cultivado também em farelo de trigo com umidade de 50% apresentando pico de atividade no tempo de 21 dias com valor de 65,030 UI/g, que é superior ao deste trabalho, mas em termos de produtividade (3,09 U/g dia) é inferior ao do *Trichoderma reesei* CCT 2768 cultivado neste trabalho.

Fazendo uma análise com outros substratos como, por exemplo, o pó da casca do coco verde estudada por Oliveira (2010) cujos valores de atividade enzimática para o CZ01(Zigomicetos) e o CD03(Deuteromicetos) são $1,26 \pm 0,09$ UI/g e $0,42 \pm 0,05$ UI/g. Podemos perceber que os valores obtidos são bem inferiores aos do *Trichoderma reesei* CCT 2768 e do FSDE15 o que indica que o farelo de trigo é um substrato mais indicado para produção de celulasas e que estes fungos apresentam boa atividade enzimática.

4. CONCLUSÃO

O fungo FSDE15 obtido do isolamento do solo da indústria sucroalcooleira obteve um resultado apreciável de produção enzimática quando comparado ao *Trichoderma Reesi* CCT 2768. Além disto, apresentou mesmo tempo para atingir o pico de atividade. Sendo, portanto uma boa alternativa para produção de celulasas.

5. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. C. O. Indução de celulasas e xilanasas por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variable* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química 2012.
- CASTRO, A.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. Quím. Nova [online]. 2010, vol.33, n.1, pp. 181-188.
- DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S.; SILVA, M. R.; AZZON, S. F.; PRADELLA, J. G. C. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with

pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production, *Bioresource Technology* 107 (2012) 517–521.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Che.*, v. 59, p. 257-268, 1987.

GOLDBECK, R.; RAMOS, M. M.; PEREIRA, G. A. G., MAUGERI-FILHO, F., Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates, *Bioresource Technology*, 66: 797-803 (2013).

LYND, L.R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H. AND PRETORIUS, I. S., (2002), Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 506–577.

MANDELS, M. AND WEBER, J. (1969), Production of cellulases. *Advances Chemical Ser*, 95: 391-414.

OLIVEIRA, S. L. R. Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera L.*) para produção de celulasas. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias. Dep. de Tecnologia de Alimentos, Fortaleza-CE, 2010.