

Obtenção de enzimas lignocelulolíticas de monocultivos e cocultivos de fungos filamentosos em fermentação submersa usando biomassas vegetais da agroindústria do dendê

Ruben Darío Romero-Peláez¹, Thais Demarchi Mendes², Thállyta Fraga Pacheco³, Arailde Fontes Urben⁴, Cristiane Vieira Helm⁵, Simone Mendonça⁶, Félix Gonçalves de Siqueira⁷

Resumo

Determinaram-se as atividades enzimáticas lignocelulolíticas de extratos brutos de basidiomicetos e ascomicetos, em monocultivos e cocultivos com *Trichoderma reesei* ATCC 60787, em fermentação submersa. Para tal, utilizou-se meio sintético (BDA) enriquecido com biomassas vegetais da Agroindústria do dendê, quais sejam: fibra de mesocarpo (FM) e borra do decantador (BD – Resíduo sólido resultante do óleo de dendê processado em tridecantador). Verificou-se que fungos filamentosos mostraram maiores atividades enzimáticas hidrolíticas e oxidativas no meio enriquecido com BD. Os cocultivos mostraram que a presença de *T. reesei* ATCC 60787 induziu a maior liberação de enzimas hidrolíticas e oxidativas por *Panus lecomtei* CC40 e *Lepiota fuscipes* CC402, quando comparadas com os monocultivos.

Palavras-chave: interação fungo-fungo, lacase, fungos da podridão-branca.

Introdução

As análises comparativas entre a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa têm sido avaliados em função de produção de enzimas e bioativos. Tipicamente, a fermentação submersa é usada para microrganismos que precisam de alta quantidade de água livre, como as bactérias e leveduras; já a FES é adequada para organismos como os fungos filamentosos que podem crescer com quantidades de umidade entre 20% e 70% (SINGH et al., 2008). No entanto, a maioria das enzimas celulolíticas comerciais produzidas atualmente são derivadas de fungos

¹ Biólogo, mestre em Biotecnologia, Universidade Federal de Tocantins, ruben.romero2204@gmail.com

² Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia thais.demarchi@embrapa.br

³ Engenheiro químico, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thallyta.pachecho@embrapa.br

⁴ Historia Natural, doutora em Biologia, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, arailde.urben@embrapa.br

⁵ Química Industrial, doutora em Ciências de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Florestas, cristiane.helm@embrapa.br

⁶ Química farmacêutica, doutora em Saúde Pública, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

⁷ Biólogo, doutor em Biologia Molecular (Enzimologia), pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

filamentosos cultivados em fermentação submersa e, inclusive, tem sido demonstrado que esse tipo de fermentação contribui positivamente na liberação de celulases de fungos da podridão-branca (ELISASHVILI et al., 2008).

O alvo deste trabalho foi explorar a capacidade de produção de enzimas lignocelulolíticas de basidiomicetos e ascomicetos usando fermentação submersa por meio de mono ou cocultivos utilizando biomassas derivadas do dendê. Os cultivos foram feitos usando os basidiomicetos *P. lecomtei* CC40, *T. versicolor* CC124 e *L. fuscipes* CC37, além de organismos modelos para produção de celulases e hemicelulases como as linhagens *T. reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Laetisaria arvalis* e *Schizophyllum commune* e *Coprinus* sp. FPB 125 (isolado da Embrapa Agroenergia). A determinação do potencial de produção de enzimas lignocelulíticas é condição ímpar para que se possam obter coquetéis enzimáticos com potencial para o processo de sacarificação de biomassas vegetais.

Materiais e métodos

Microrganismos

Utilizou-se oito linhagens de fungos filamentosos nos cultivos por fermentação submersa, quais sejam: *P. lecomtei* CC40, *T. versicolor* CC124, *L. fuscipes* CC402, *Schizophyllum commune* CC328 *Coprinus* sp. FPB 125, *Chrysosporium lucknowense* ATCC® 44006, *Laetisaria arvalis* ATCC® 52088 e *Trichoderma reesei* ATCC® 60787. Todos os fungos foram repicados em BDA (placas Petri) e incubados a 28 °C até completa colonização.

Interação de crescimento dos fungos em placa de petri

Para entender a compatibilidade *in vitro* dos basidiomicetos e *T. reesei* ATCC® 60787, foram colocados discos miceliais de cada fungo em extremidades opostas das placas com meio BDA esterilizado, distanciados aproximadamente 4 cm. Foram realizados registros fotográficos e descrição dos cocultivos durante 9 dias. A análise do tipo de interação foi feita com base no critério usado em Molla et al. (2001).

Monocultivos em fermentação submersa

Adicionou-se 1,25 g de biomassa de dendê (borra de decantador- BD ou Fibras de mesocarpo-FM), previamente triturada (diâmetro ≤ 2 mm) e seca a 65 °C por 2 dias, 50 mL de meio Mandels Weber (MW) e PEG6000 0,1% (m/v) em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Em seguida, adicionaram-se 5 discos miceliais (5 mm de diâmetro) de ágar totalmente colonizado, fazendo-se incubação em agitador a 150 rpm e 28 °C por 5 dias.

Cocultivos em fermentação submersa

No cocultivo, adotou-se o modelo de Ma e Ruan (2015), mudando-se a forma de inoculação dos fungos, com inoculação dos basidiomicetos 14 horas antes do *T. reesei* ATCC® 60787 e incubação 28 °C por 5 dias.

Obtenção de extrato enzimático e atividades enzimáticas

Após 5 dias de cultivo, o conteúdo dos frascos Erlenmeyer foi filtrado e centrifugado a 10.000 rpm a 5°C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, adicionando-se solução azida sódica, com concentração final de 0,02% (m/v), para evitar crescimento microbiano. Para a atividade FPase (celulases totais) foram utilizados discos de papel filtro tipo Whatman® como substrato e a reação foi feita em termociclador por 60 minutos a 50 °C. Para as xilanases usou-se xilana de birchwood 2% (m/v) como substrato. A liberação de açúcares foi determinada pelo método DNS (MILLER, 1959), com leitura em espectrofotômetro a 540 nm de comprimento de onda. A atividade β-glicosidase foi feita usando celobiose 15 Mm como substrato, numa reação de 30 minutos a 50 °C. A glicose liberada foi quantificada usando-se o método GOD-POD, com o kit reagente Glicose oxidase - Bioclin®, e leitura em espectrofotômetro a 505 nm. As atividades da lacase e peroxidases totais foram feitas usando ABTS 5 Mm e H₂O₂ 2mM (peroxidases) como substrato, com leitura a 420 nm a cada 30 s, durante 1,5 min. Todos os experimentos foram feitos em triplicata biológica e técnica.

Resultados e discussão

No caso dos monocultivos em FM, as atividades para FPase e xilanase foram detectadas em todas as linhagens de fungos filamentosos utilizadas. Os valores máximos de atividade, de 0,48 U.mL⁻¹ e 0,65 U.mL⁻¹, respectivamente, foram observados no extrato de *T. reesei* ATCC® 60787. Não se verificou valores significativamente altos de atividade da β-glicosidase. *L. fuscipes* CC402 mostrou alta atividade para lacase (180,42 U.mL⁻¹). Quanto às peroxidases totais, verificou-se atividade significativa nos extratos de *L. fuscipes* CC402 (99,39 U.mL⁻¹) e *T. versicolor* CC124 (7,65 U.mL⁻¹), como pode ser visto Figura 1. No cultivo com BD, a atividade FPase em *T. reesei* foi 2,16 vezes maior quando comparada com a do extrato obtido com FM. Para xilanase, os extratos das linhagens *Coprinus* sp. FPB125 e *P. lecomtei* CC40 apresentaram atividade 8,5 e 2,8 vezes maior que dos extratos obtidos do cultivo em FM, respectivamente. A atividade β-glicosidase no extrato de *T. reesei* foi 9 vezes maior que o obtido em FM. Para lacases, verificou-se picos altos de atividade no extrato de *L. fuscipes* CC402 (794,01 ± 30,5 U.mL⁻¹), *P. lecomtei* CC40 (383,11 U.mL⁻¹) e *T. versicolor* CC124 (270,39 U.mL⁻¹). O padrão de atividades para peroxidases foi similar, com maior atividade no extrato de *L. fuscipes* CC402 (341,43 U.mL⁻¹), *P. lecomtei* CC40 (106,22 U.mL⁻¹), *T. versicolor* CC124 (87,01 U.mL⁻¹) (Figura 2).

T. reesei ATCC® 60787 apresentou interações positivas com os basidiomicetos *P. lecomtei* CC40, *T. versicolor* CC124, *L. fuscipes* CC402 e *Coprinus* FPB125 (Figura 3). Esse resultado contrasta com o observado por Mohammad et al. (2013), que trabalhou com uma linhagem de *T. reesei* que foi inibida quando incubada em cocultivo com basidiomicetos.

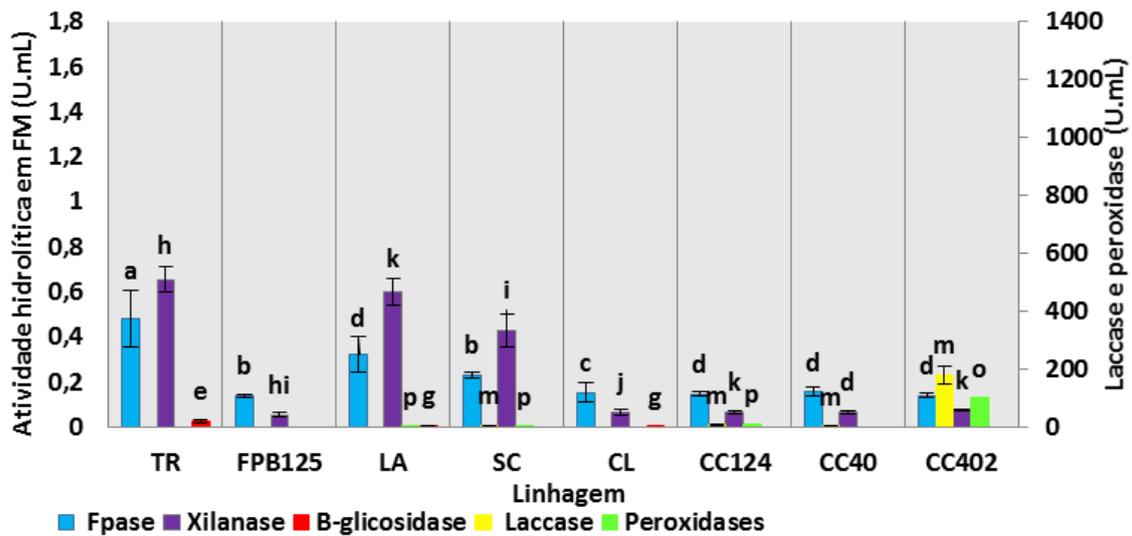


Figura 1. Perfil enzimático dos extratos obtidos em fermentação submersa usando meio MW enriquecidos com fibra do mesocarpo (FM) para os monocultivos dos fungos. Legenda: *T. reesei* ATCC® 60787 (TR); *Coprinus* sp. (FPB125); *L. arvalis* ATCC® 52088 (LA); *S. commune* CC328 (SC); *C. lucknowense* ATCC® 44006 (CL); *T. versicolor* CC124; *P. lecomtei* (CC40); e *L. fuscipes* CC402. Letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas a $p < 0.05$ no teste Tukey.

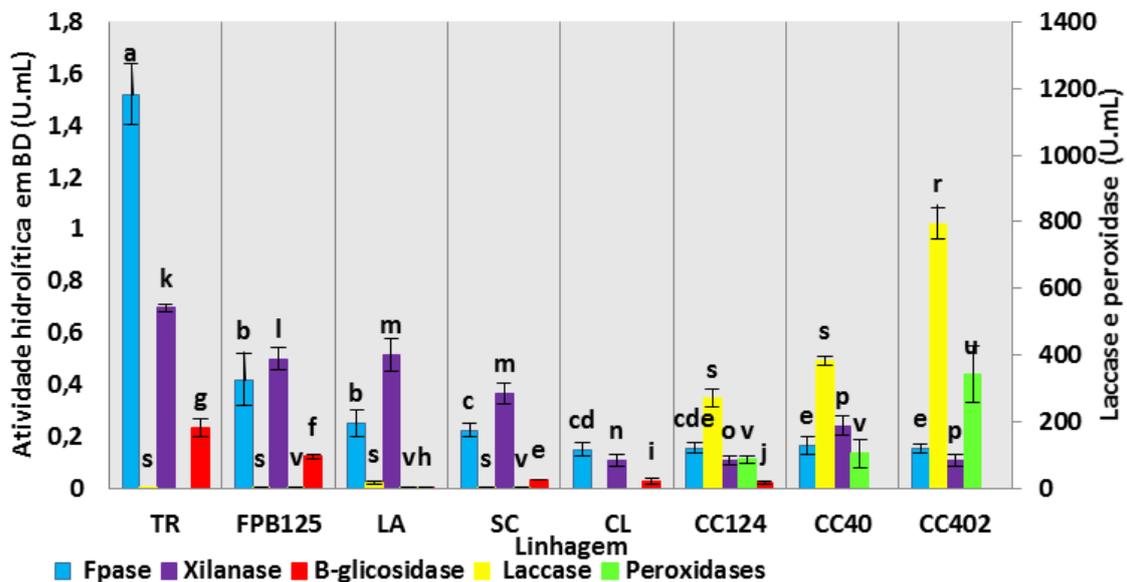


Figura 2. Perfil enzimático dos extratos obtidos em fermentação submersa usando meio Mandels e Weber (1969) enriquecidos com borra do decantador para os monocultivos dos fungos. Legenda: *T. reesei* ATCC® 60787 (TR); *Coprinus* sp. (FPB125); *L. arvalis* ATCC® 52088 (LA); *S. commune* CC328 (SC); *C. lucknowense* ATCC® 44006 (CL); *T. versicolor* CC124; *P. lecomtei* (CC40); e *L. fuscipes* CC402. Letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas a $p < 0.05$ no teste Tukey.

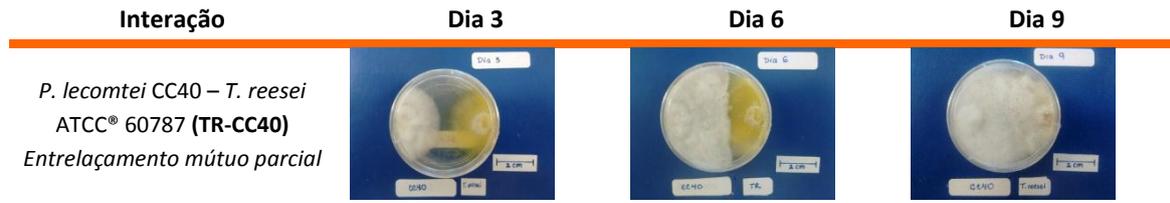


Figura 3. Interação entre *P. lecomtei* CC40 – *T. reesei* ATCC® em cultivo em placas (BDA).

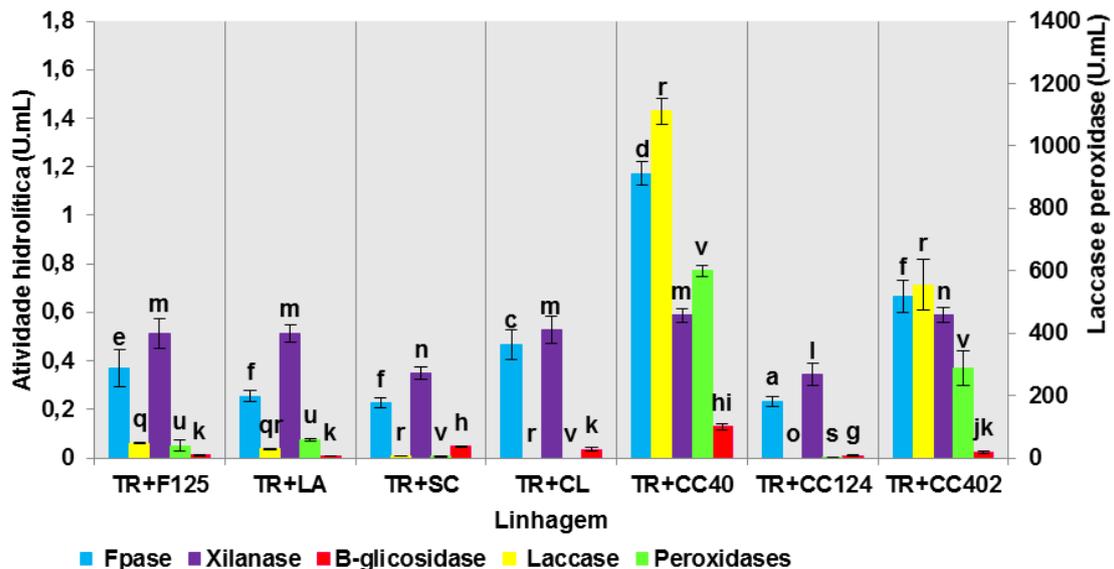


Figura 4. Atividades enzimáticas dos extratos brutos obtidos em fermentação submersa de fungos quando cocultivados com *T. reesei* ATCC® 60787, fazendo uso de meio sintético enriquecido com borra do decantor. Os basidiomicetos utilizados no cocultivo foram *Coprinus sp.* (TR+F125); *L. arvalis* ATCC® 52088 (TR+LA); *S. commune* CC328 (TR+SC); *C. lucknowense* ATCC® 44006 (TR+CL); *P. lecomtei* (TR+CC40); *T. versicolor* (TR+CC124) e *L. fuscipes* (TR+CC402). Letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas a $p < 0.05$ no teste Tukey.

Os cocultivos em fermentação submersa com BD mostraram que os extratos de algumas linhagens tiveram atividades em algumas enzimas ausentes nos monocultivos, e incremento em enzimas já detectadas. O cocultivo TR+CC40 com *T. reesei* mostrou maior atividade lacase e peroxidase total ($1111,44$ e $599,74$ $U.mL^{-1}$, respectivamente) que nos monocultivos, maior atividade Fpase ($1,17$ $U.mL^{-1}$) que do extrato do monocultivo de *P. lecomtei* CC40 e menor que de *T. reesei* ATCC® 60787. As atividades β -glicosidase e xilanase foram maiores que nos extratos dos monocultivos de *P. lecomtei* CC40, porém menores que do monocultivo de *T. reesei* ATCC® 60787 (Figura 4).

Os maiores valores de atividade foram medidos nos extratos obtidos dos cultivos em BD em relação aos obtidos dos cultivos FM, o que pode estar relacionado ao maior conteúdo de proteínas e lipídeos disponíveis no primeiro, uma vez que estes ainda são predominantemente estruturais no segundo. Já foi demonstrado que a composição das biomassas determina o perfil das enzimas liberadas pelos fungos filamentosos, inclusive, em substratos do mesmo tipo e de origens diferentes (SINDHU et al., 2016). O cocultivo TR+CC40 conseguiu melhorar mais o rendimento nas

atividades oxidativas como lacases e peroxidases que o cultivo individual *P. lecomtei* CC40 e teve alta atividade hidrolítica quando comparado com o monocultivo de *T. reesei* ATCC® 60787. Esse resultado é comparável com Ma e Ruan (2015), com cocultivos de *T. reesei* e *Coprinus comatus* quando crescidos em fermentação submersa suplementada com palha de milho. Da mesma forma, como reportado por Qi-He et al. (2011), demonstrando que fungos de podridão-branca tiveram maior atividade específica de lacase do que quando comparados com os cultivos individuais.

Conclusão

O cultivo de alguns fungos filamentosos (basidiomicetos e ascomicetos) em fermentação submersa enriquecida com biomassa vegetal da agroindústria de dendê mostrou-se positivo para a obtenção de enzimas microbianas de degradação da parede celular vegetal.

Observou-se maiores atividades enzimáticas das linhagens fúngicas testadas no meio enriquecido com borra do decantador do que no meio com fibra do mesocarpo.

Cocultivos de *T. reesei* x *P. lecomtei* CC40 e *T. reesei* x *L. fuscipes* CC40 mostraram interação positiva, com aumento das atividades enzimáticas em relação a seus monocultivos.

Agradecimentos

À Embrapa Agroenergia/Capes, pelo financiamento de recursos para a execução do trabalho.

Referências

- ELISASHVILI, V.; PENNINGCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKAURI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; KVESITADZE, G. Lentinus edodes and Pleurotus species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 3, p. 457-462, 2008 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852407000788>>. Acesso em: jul. 2017
- MA, K.; RUAN, Z. Production of a lignocellulolytic enzyme system for simultaneous bio-delignification and saccharification of corn stover employing co-culture of fungi. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 586-593, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414016009>>. Acesso em: jul. 2017
- MANDELS, M.; WEBER, J. The Production of Cellulases. In: HAJNY, J; REESE, E. **Cellulases and their applications**. Washington, DC: American Chemical Society, 1969. p. 391-414. (Advances in Chemistry, v. 95).
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>>. Acesso em: jul. 2017
- MOHAMMAD, N.; ALAM, M. Z.; KABASHI, N. A. Development of composting process of oil palm industrial wastes by multi-enzymatic fungal system. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 15, n. 3, p. 348-356, 2013.
- MOLLA, A. H.; FAKHRU'L-RAZI, A.; ABD-AZIZ, S.; HANAFI M.M.; ALAM, M.Z. In-vitro compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. **World Journal of**

Microbiology and Biotechnology, v. 17, n. 9, p. 849-856, 2001. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/A:1013844306960> >. Acesso em: jul. 2017

QI-HE, C.; KRÜGENER, S.; HIRTH, T.; RUPP, S.; ZIBEK, S.. Co-cultured production of lignin-modifying enzymes with white-rot fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 2, p. 700-718, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12010-011-9289-9>>. Acesso em: jul. 2017

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass: an overview. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 76-82, 2016.

SINGH, S. K.; SCZAKAS, G.; SOCCOL, C.R.; ASHOK PANDEY, A. Production of enzymes by solid-state fermentation. (Ed.). **Current developments in solid-state fermentation**. New York: Springer, 2008. p. 183-204.