

PRODUÇÃO DE CELULASE A PARTIR DE FUNGOS FILAMENTOSOS UTILIZANDO SERRAGEM DE EUCALIPTO (*Eucalyptus robusta*) COMO FONTE DE CARBONO

**Tanara Sartori, Ana Rúbia Koepe, Bruna Seguenka, Elenizi Prigol, Heloisa Tibolla,
Jackson Dullius Pilger, Luciane Maria Colla, Telma Elita Bertolin***

Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo

**Email: telma@upf.br*

RESUMO

O interesse em novas alternativas para obtenção de energia renovável e aproveitamento de resíduos lignocelulósicos é uma estratégia importante na busca de novas matrizes energéticas. As enzimas do complexo celulolítico fazem a bioconversão destes resíduos em glicose. O presente trabalho visou verificar a atividade celulolítica dos fungos filamentosos *Trichoderma viride* e *Trichoderma sp.* E-13, por fermentação em meio sólido da serragem de eucalipto utilizando como indutor a carboxi metil celulose (CMC). A quantificação da atividade enzimática da celulase foi determinada pelo método analítico da CMCcase. Os resultados mostram que dentre os fungos estudados o *Trichoderma sp.* E-13 apresentou a maior atividade enzimática com máxima produtividade de $1,38 \text{ U.g}_{\text{ff}}^{-1}$, no tempo de 288 h de fermentação.

Palavras-chave: celulose; bioconversão; matriz energética.

1 INTRODUÇÃO

A busca de novas matrizes energéticas renováveis em substituição aos combustíveis fósseis tem sido importante, visto que, além de serem abundantes, como a celulose, apresentam baixo impacto ambiental, sem afetar o balanço térmico ou composição atmosférica do planeta.

Os resíduos lignocelulósicos, tais como a serragem de madeira e as cascas dos grãos do café, constituem resíduos de baixo custo, renováveis, ambientalmente corretos e potencialmente capazes de contribuir como combustível alternativo na geração de energia.

A celulose é um polímero natural renovável, sendo o componente principal das paredes celulares das plantas e constituindo cerca de um terço da matéria orgânica vegetal. Este material é constituído principalmente de lignina, celulose e hemicelulose.

As celulasas são enzimas de grande interesse industrial, como por exemplo: no processamento de papel e celulose, nos processos da indústria têxtil; na melhoria da indústria de alimentos e na hidrólise de biomassa de celulose, visando a posterior conversão dos açúcares fermentecíveis em etanol, seja de forma simultânea ou seqüencial (BHAT, 2000; CASTRO et al., 2007).

A degradação enzimática completa da celulose é realizada por um complexo celulolítico que apresenta três diferentes classificações das celulasas: endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidasas. Os três complexos atuam em sinergismo. Essa classificação depende do local de atuação no substrato celulósico (BHAT, 2000; LYND et al., 2002; CASTRO et al., 2007).

A hidrólise da celulose por celulasas resulta no produto final glicose. Estas enzimas, porém, não conseguem penetrar com facilidade a barreira da lignina das células vegetais e, dessa forma, o difícil acesso das mesmas às fibras de celulose constitui o principal problema para o desencadeamento desse processo de degradação.

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulasas; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos. Entre os microrganismos produtores de celulasas, os fungos recebem atenção especial. O gênero *Trichoderma sp.* destaca-se na produção destas enzimas, demonstrando capacidade de produzi-las a partir de diversos substratos, como resíduos de milho ou ainda papel jornal sujeito a um tratamento alcalino prévio. Fungos filamentosos, como *Trichoderma sp.*, são os microrganismos mais utilizados em fermentação em estado sólido, devido à sua baixa necessidade de água para crescimento. A fermentação em estado sólido se caracteriza pela ausência de água livre e é apropriada para a utilização de fungos filamentosos.

Neste contexto objetiva-se verificar a atividade celulolítica de diferentes fungos filamentosos no substrato celulósico de serragem de eucalipto por fermentação em estado sólido.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e Métodos

2.1.1 Microrganismos e sua manutenção

Os microrganismos utilizados no desenvolvimento de todos os ensaios de fermentação foram o *Trichoderma viride*, obtido da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello – Campinas – SP e o *Trichoderma sp.* E-13 segundo Colla et al. (2009). Esses microrganismos foram mantidos em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) comercial. Os repiques foram realizados em intervalos de dois meses em tubos de ensaio com o meio de cultura inclinado e mantidos refrigerados a 4 °C.

2.1.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em erlenmeyers de 1000 mL com 50 mL de meio PDA comercial, aos quais foi adicionado 1 mL de suspensão de esporos, proveniente de cultivo em tubo de ensaio com ágar inclinado. Os erlenmeyers foram mantidos em estufa a 30 °C por cinco dias, para posterior suspensão dos esporos com adição de água destilada e esterilizada, a qual foi filtrada para posterior utilização como inóculo.

2.1.3 Meio de cultivo – Fermentação em estado sólido

A principal fonte de carbono utilizado foi serragem de eucalipto com mesh menor que 14. Foram adicionados a esta serragem nutrientes ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - $6,3 \cdot 10^{-5}$ %; ZnSO_4 - $6,2 \cdot 10^{-5}$ %; MnSO_4 - $1 \cdot 10^{-6}$ %; KH_2PO_4 - 0,2 %; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,4 %; MgSO_4 - 0,1 %). A umidade do substrato foi ajustada em 63 % com adição de água e o pH do meio em 4,8 com solução ácida (H_2SO_4 0,5 M) com a finalidade de proporcionar condições ótimas para a condução da fermentação.

A fermentação foi conduzida em erlenmeyers de 125 mL, os quais continham 5 g do meio de cultivo e 0,25 g de indutor (CMC) onde foi realizada a inoculação de 0,4 mL de suspensão de esporos que continha 10^7 esporos/mL. A concentração de esporos na suspensão foi estimada pela contagem em microscópio, usando-se uma câmara de Neubauer. Estes

foram submetidos à estufa 30 °C, sendo que as amostras foram retiradas no tempo 0 h e a cada 24 h até o tempo de 302 h.

2.1.4 Deslignificação da serragem

Para a deslignificação da serragem utilizou-se uma concentração de substrato (matéria-prima lignificada) de 10% (p/v), cuja solução reagente foi NaOH 0,25 N, essa mistura foi colocada em frascos de vidro fechados com papel alumínio para posterior autoclavagem, permanecendo a 21 °C por 1 h a 1,1 atm. Após a decompressão da autoclave esse material foi retirado e resfriado, e em seguida lavado em água corrente utilizando peneiras para que não houvesse perda da parte sólida, até que o material deslignificado atingisse pH próximo da neutralidade, após a serragem deslignificada foi levada à estufa 50 °C para secagem. Obteve-se um material com 50 % de deslignificação.

2.1.5 Extração da enzima

A extração da enzima celulase foi conduzida a partir da adição de 75 mL de tampão citrato 0,05 M, pH 4,8 à amostra, a qual foi submetida à agitação 150 rpm por 30 min, passado este tempo filtrou-se a suspensão a qual foi utilizada para análise.

2.1.6 Determinação da atividade da celulase

A atividade enzimática foi determinada utilizando-se uma solução de carboxi metil celulose 1% como substrato. Foram adicionados à tubos de ensaio 0,5 mL do extrato enzimático e 0,5 mL da solução de CMC os quais foram incubados a 50 °C por 30 min.

O teor de açúcares redutores produzidos no ensaio de CMCase foi determinado pelo método do DNS e glicose foi utilizada como padrão. As leituras foram feitas em espectrofotômetro com λ de 546 nm. Os resultados foram expressos em Unidades, sendo que uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto sobre as condições do experimento.

2.2 Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta os resultados da atividade enzimática da CMCase para os fungos *Trichoderma viride* e *Trichoderma sp.* E-13 no tempo de 302 h de fermentação.

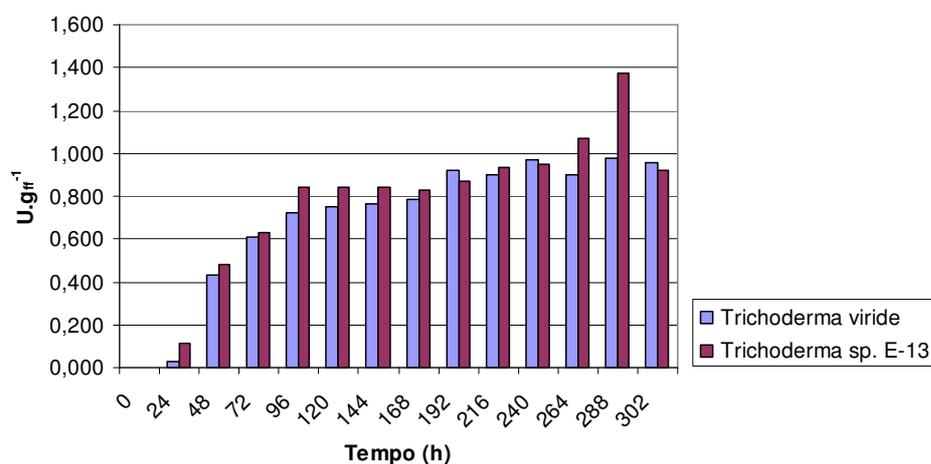


Figura 1 Atividade enzimática de CMCase dos microrganismos *Trichoderma sp.* E-13 e *Trichoderma viride* em função do tempo de fermentação.

A análise da atividade enzimática do fungo *Trichoderma viride* mostrou um aumento significativo nas primeiras 96 h atingindo o valor de $0,72 \text{ U.g}_{\text{ff}}^{-1}$, o qual se manteve constante até o tempo de 302 h.

O microrganismo *Trichoderma sp.* E-13 apresentou um comportamento semelhante ao *Trichoderma viride*, Figura 1, porém, neste caso, houve uma elevação na produção de celulasas no tempo de 288 h com atividade de $1,38 \text{ U.g}_{\text{ff}}^{-1}$, e a após este período houve uma tendência de decréscimo.

Estes resultados mostram que o substrato serragem de eucalipto utilizado como fonte de carbono para a produção de celulasas, por conter celulose e hemicelulose na sua estrutura, induz o fungo a produzir enzimas celulolíticas. A continuidade destes estudos objetiva a investigação de outros microrganismos e outras fontes de carbono para a produção de celulasas.

3 CONCLUSÃO

Os fungos *Trichoderma viride* e *Trichoderma sp.* E-13 apresentaram a maior atividade celulolítica no tempo de 288 h sendo $0,98 \text{ U.g}_{\text{ff}}^{-1}$ e $1,38 \text{ U.g}_{\text{ff}}^{-1}$ respectivamente.

A utilização da serragem de eucalipto como fonte de carbono e carboxi metil celulose como indutor induziram a formação de celulase por fermentação em estado sólido.

REFERÊNCIAS

BHAT, M.K. Cellulase and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, 18. 355-383. 2000.

CASTRO, A. M., RODRIGUES PEDRO, K.C.N., FERREIRA M.C., CRUZ, J.C., LEITE, S.G.F., PEREIRA JR., N. Produção e Caracterização das Celulases de *Aspergillus niger* Obtidas a Partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar. In: **Anais do XVIII Simpósio Nacional de Fermentações**, 2007.

COLLA, L. M., REZZADORI, K., CÂMARA, S. K., DEBON, J., TIBOLLA, M., BERTOLIN, T. E., COSTA, J. A. V. A Solid-State Bioprocess for Selecting Lípase-Producing Filamentous Fungi. **Z. Naturforsch.** 64 c, 131-137 (2009)

LYND, L.R., ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. **Biotechnological Bioengineering**, 77 (4): 467-475. 2002.

AGRADECIMENTOS

PIBIC/UPF, BIC/FAPERGS, PIBIC/CNPq e ao Lab. Engenharia Bioquímica FURG.