

Área: Engenharia de Alimentos

PRODUÇÃO DE CELULASE FÚNGICA VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Heloisa Tibolla, Elenizi Prigol, Luciane M. Colla, Tanara Sartori, Telma Elita Bertolin*

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

**E-mail: 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. A bioconversão destes resíduos em glicose, para utilização como fonte de energia, é realizada pelas celulases (celulases totais, endo-glucanases e β -glicosidases). Objetivou-se produzir celulase fúngica via serragem de eucalipto, sabugo de milho e farelo de soja como substrato e indutores papel de filtro e carboximetilcelulose. Durante as fermentações avaliou-se: crescimento microbiano, consumo de substrato, produção de celulases totais, endo-glucanases e β -glicosidases, conversão de substrato em célula (Y_x/s), conversão de substrato em produto (Y_p/s), produtividade máxima do complexo celulolítico e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$). Os maiores valores de Y_x/s foram obtidos utilizando serragem de eucalipto (2,244 mgPtn/mgART) e farelo de soja (2,097 mgPtn/mgART) como substrato e indutor carboximetilcelulose. Os melhores resultados de Y_p/s e produtividade foram obtidos utilizando farelo de soja como substrato, independente do indutor. As velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{máx}$) foram obtidas em intervalos de tempo de fase log (24 h e 48 h) utilizando farelo de soja como substrato e ambos indutores. De acordo com os resultados, a síntese de celulases por *Trichoderma viride* é favorecida com o substrato farelo de soja como fonte de carbono e carboximetilcelulose como indutor. A utilização dos resíduos serragem de eucalipto, sabugo de milho e farelo de soja, nas condições estudadas mostrou-se viável para a síntese de celulases por microrganismos e representa a busca de fontes renováveis para a substituição da matriz energética fóssil.

Palavras-chave: Complexo celulolítico; celulose; bioconversão; matriz energética.

1 INTRODUÇÃO

O crescimento exacerbado da população e a exploração indiscriminada dos recursos naturais tendem ao seu esgotamento. 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 (REYES et al., 1998).

O desenvolvimento agrícola tem resultado no crescimento da quantidade de resíduos que muitas vezes se acumulam tornando-se problema ambiental, necessitando de uma alternativa de utilização.

O complexo enzimático celulase constitui-se de um conjunto de hidrolases glicosídicas, secretadas por microrganismos, plantas e alguns animais. Estas enzimas são glicoproteínas capazes de romper as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 da cadeia de celulose, principal polímero natural renovável presente nas paredes de células vegetais, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose (CASTRO, 2007).

A maior dificuldade para o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos está representada pela barreira física formada pela lignina, o que impede o aproveitamento da celulose nativa, pois as enzimas não conseguem penetrar com facilidade nesta barreira, dessa forma, o difícil acesso das mesmas às fibras de celulose constitui o principal problema para o desencadeamento do processo de degradação (RUEGGER; TAU-K-TORNISIELO, 2004).

Os microrganismos produtores de celulase são encontrados em grande variedade na natureza, sendo que os fungos recebem atenção especial, pois são seres eucarióticos, filamentosos, naturalmente encontrados em solos e outros ambientes, também conhecidos como grandes produtores de antibiótico (penicilina) e enzimas de interesse industrial (celulases, xilanases, amilases) e ambiental (OLIVEIRA et al., 2007).

O gênero *Trichoderma* sp. destaca-se na produção destas enzimas, demonstrando capacidade de sintetizá-las a partir de diversos substratos, como resíduos de milho, serragem, casca, papel jornal, entre outros. O fungo *Trichoderma viride*, sob condições otimizadas, apresenta a capacidade de produzir diferentes enzimas, dentre elas a celulase (LIMING; XUELIANG, 2004).

A produção de enzimas extracelulares por fungos pode ser conduzida por fermentação em submerso (FSM) ou fermentação em estado sólido (FES), a qual se caracteriza pela ausência de água livre no meio. A FES consiste no cultivo de microrganismos sobre uma matriz sólida úmida, que simula as condições ambientais sob as quais esses microrganismos crescem naturalmente (BORZANI et al., 2001).

As celulases, assim como as demais enzimas extracelulares de hidrólise, são induzidas quando há necessidade de serem secretadas pelos microrganismos para que estes utilizem

celulose. Os indutores enzimáticos são substâncias que apresentam capacidade de aumentar atividade das enzimas, aumentando a metabolização de determinados agentes (REGULY, 1996).

O problema do emprego prático dessas enzimas reside no fato de que o seu custo de obtenção é elevado. Portanto, o estudo de microrganismos que as produzam em grande quantidade e o desenvolvimento de técnicas de produção econômicas tem sido interesse de pesquisas científicas, visto a disponibilidade de matéria prima no ambiente e também por ser mais uma alternativa na busca de novas matrizes energéticas (CALLONI, 2007).

O presente trabalho, objetivou a produção de celulases fúngicas via fermentação em estado sólido, a partir de resíduos como serragem de eucalipto, sabugo de milho e farelo de soja.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Microrganismo e manutenção

O microrganismo utilizado foi o *Trichoderma viride*, obtido da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello – Campinas – SP, estes foram mantidos em meio ágar papel de filtro. Os repiques foram realizados em intervalos de 30 dias e mantidos sob refrigeração a 4 °C.

2.1.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em erlenmeyers de 1000 mL com 50 mL de meio ágar papel de filtro, aos quais foi adicionado 1 mL de suspensão de esporos. Os erlenmeyers foram mantidos em estufa a 30 °C por 7 d, para posterior suspensão dos esporos com adição de água destilada e esterilizada, a qual foi filtrada em funil contendo algodão.

2.1.3 Deslignificação do substrato

A deslignificação das fontes de carbono foi realizada a partir de uma concentração de substrato (matéria-prima lignificada) de 10 % (p/v), cuja solução reagente foi NaOH 0,25 mol/L. Essa mistura foi submetida a autoclavagem a 121 °C por 1 h à 1,1 atm. Após adicionou-se H₂SO₄ 1 M a uma concentração de 0,125 mLácido/mLbase para neutralizar o material deslignificado. O excesso de reagentes foi removido e o substrato deslignificado foi submetido à estufa 35 °C para remoção total da umidade, produzindo substratos 50 % deslignificado.

2.1.4 Preparo do meio de cultivo

As fontes de carbono utilizadas foram serragem de Eucalyptus spp, sabugo de milho e farelo de soja, deslignificadas e trituradas com mesh entre 50 e 14. A estes substratos foram adicionados solução de macro e micronutrientes, segundo Mandels; Reese (1957), a uma proporção de 1:1. A umidade do substrato foi ajustada em 63 % com adição de água e o pH do meio em 4,8 com solução ácida (H₂SO₄ 0,5 mol/L) proporcionando condições ótimas para a condução da fermentação.

2.1.5 Fermentação em estado sólido

A fermentação foi conduzida em erlenmeyers de 250 mL, os quais continham 10 g do meio de cultivo, 0,5 g do indutor (Carboximetilcelulose (CMC) ou Papel de filtro) e 1,0 mL de suspensão de esporos (inóculo) que deveria conter 10⁷ esporos/mL. Os experimentos foram incubados em estufa 30 °C, sendo amostras coletadas nos tempos inicial e a cada 24 h até o tempo de 192 h, totalizando 8 d de fermentação.

2.1.5.1 Determinação do consumo de substrato ao longo do tempo de fermentação

O consumo de substrato ao longo do tempo de fermentação foi avaliado a partir da determinação do teor de açúcares redutores totais nos ensaios, a partir do substrato, água destilada e HCl 1,5 M, autoclavados à 120 °C por 10 min. O produto obtido da extração foi

neutralizado e desproteínizado. A determinação do consumo de substrato foi realizada a partir do método de DNS, segundo Miller (1959).

2.1.5.2 Determinação do crescimento microbiano

O crescimento microbiano foi estimado a partir da extração da proteína realizada com substrato adicionado de tampão fosfato pH 6,0 em agitador rotativo a 150 rpm por 30 min a 30 °C, com posterior filtração. A técnica utilizada foi a determinação de proteínas pelo método de Biureto, utilizando caseína como padrão, segundo Lowry (1951).

2.1.6 Determinação da atividade das celulases

A extração da enzima celulase foi conduzida a partir da amostra adicionada de tampão citrato 0,05 M, pH 4,8, submetida à agitação 150 rpm por 30 min. A suspensão obtida foi utilizada para posteriores análises de endo β -1,4 glucanase, celulases totais e β -glicosidase, adaptadas do método descrito por Ghose (1987). Os resultados foram expressos em unidades por grama (U/g), sendo que uma unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 mg de açúcar redutor por hora, sob as condições de experimento.

2.1.7 Fatores de conversão e produtividade

Para obtenção dos parâmetros cinéticos da fermentação foram realizados cálculos dos fatores de conversão de substrato em biomassa (YX/S) e em produto (YP/S) expressos em (mgptn/mgART), da eficiência de fermentação (E), da produtividade em produto (PP) expressa em U/(g.h) e velocidade específica máxima de crescimento celular (BORZANI et al., 2001).

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 1 e 2, apresentam os resultados de conversão de substrato em células (YX/S), conversão de substrato em produto (YP/S), produtividade máxima do complexo celulolítico, velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), intervalo de tempo da fase logarítmica de crescimento (Δt) e coeficiente de determinação (R^2) da regressão exponencial

utilizada para o cálculo do μ_{\max} , obtidas para os bioprocessos de produção de celulases utilizando diferentes fontes de carbono e indutores.

A utilização das diferentes fontes de carbono e do indutor carboximetilcelulose está representada na Figura 1 (a, c, e) respectivamente. As Figuras 1 (b, d, f) apresentam os resultados utilizando papel de filtro como indutor e as mesmas fontes de carbono. Estas mostram os resultados obtidos para o consumo de substrato pelo microrganismo (açúcar redutor total), a síntese do crescimento celular representada pela concentração de proteína e a atividade enzimática das celulases totais, endo-glucanases e β -glicosidases durante o tempo de fermentação.

Tabela 1: Conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) obtidas para os bioprocessos de produção de celulases utilizando diferentes fontes de carbono e indutores

Experimento	Fonte de Carbono	Indutor	$Y_{X/S}$ ($\text{mg}_{\text{Ptn}} \cdot \text{mg}_{\text{ART}}^{-1}$)	$Y_{P/S}$ ($\text{U} \cdot \text{mg}_{\text{ART}}^{-1}$)		
				Endo-glucanases	Celulases totais	β -glicosidases
1	Serragem eucalipto	CMC	2,244	0,520	0,480	2,443
2	Serragem eucalipto	PF	0,287	0,171	0,164	0,751
3	Sabugo de milho	CMC	0,304	1,105	0,469	0,358
4	Sabugo de milho	PF	1,524	0,821	0,984	0,132
5	Farelo de soja	CMC	1,000	1,318	0,799	1,065
6	Farelo de soja	PF	2,097	1,473	0,720	0,786

O fator $Y_{X/S}$ relaciona a quantidade de células obtidas em função do consumo do substrato pelo microrganismo. Na Tabela 1 o $Y_{X/S}$ foi relacionado levando-se em consideração o tempo onde foi obtido maior crescimento celular, indicado pela determinação de proteína de farelo fermentado.

Tabela 2: Produtividade máxima do complexo celulolítico, velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), intervalo de tempo da fase logarítmica de crescimento (Δt) e coeficiente de determinação (R^2) da regressão exponencial utilizada para o cálculo do $\mu_{\text{máx}}$, obtidas para os bioprocessos de produção de celulases utilizando diferentes fontes de carbono e indutores

Experimento	Fonte de Carbono	Indutor	Produtividade ($\text{U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)			$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	Δt (h)	R^2
			Endo-glucanases	Celulases totais	β -glicosidases			
1	Serragem eucalipto	CMC	0,010	0,028	0,041	0,022	96	0,991
2	Serragem eucalipto	PF	0,015	0,017	0,047	0,014	72	0,961
3	Sabugo de milho	CMC	0,291	0,126	0,097	0,023	96	0,886
4	Sabugo de milho	PF	0,132	0,165	0,022	0,044	48	0,925
5	Farelo de soja	CMC	0,696	0,424	0,453	0,103	48	0,829
6	Farelo de soja	PF	0,404	0,147	0,160	0,006	144	0,909

Os maiores valores de YX/S , verificados na Tabela 1, foram obtidos para os experimentos 1 (serragem de eucalipto e carboximetilcelulose) e 6 (farelo de soja e papel de filtro), respectivamente. Embora o experimento 1 tenha obtido elevados valores de conversão de substrato em células, verifica-se na Figura 1 (a) que as quantidades de proteínas obtidas e de açúcares redutores totais consumidos foram baixas para este bioprocessamento em comparação com os demais, apresentados na Figura 1 (b, c, d, e, f).

Considerando os experimentos 2 a 5 verifica-se que as maiores conversões de açúcares em células foram obtidas utilizando-se farelo de soja como fonte de carbono e papel de filtro como indutor.

Avaliando os resultados de Y_P/S (Tabela 1) e produtividade para as enzimas endo-glucanases, celulases totais e β -glicosidases (Tabela 2) verifica-se que os melhores resultados foram obtidos utilizando farelo de soja como fonte de carbono, independente do indutor utilizado.

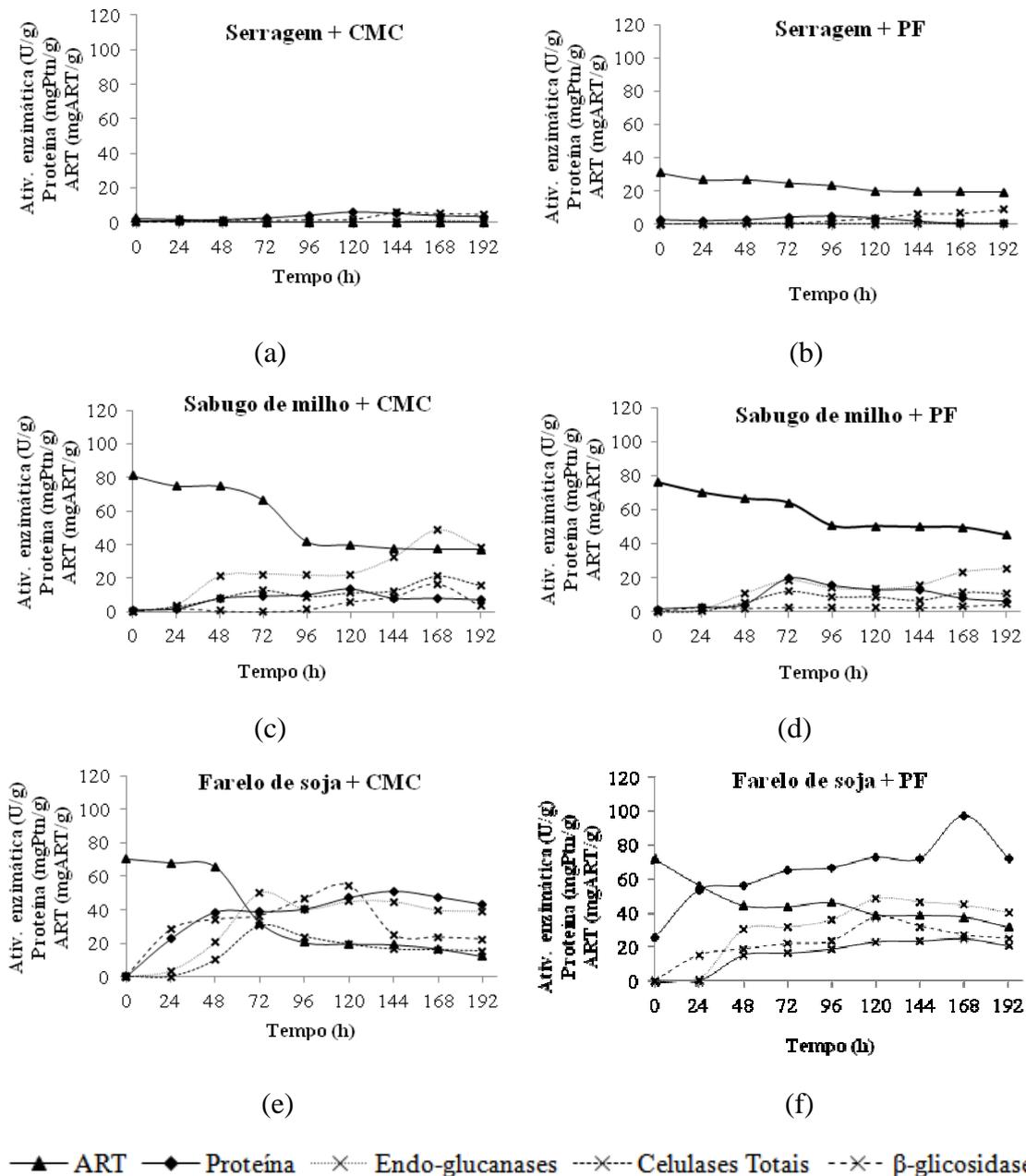


Figura 1: Atividade enzimática do complexo celulolítico, variação da concentração de açúcar redutor total (ART) e da concentração de proteína em função do tempo de fermentação, utilizando diferentes fontes de carbono e indutores

Com relação aos experimentos que utilizaram sabugo de milho como fonte de carbono verifica-se que os melhores resultados de YP/S e produtividade para as enzimas do complexo celulolítico, foram obtidos com o indutor carboximetilcelulose. Entretanto, considerando as

celulases totais, que representam a atuação das 3 enzimas de forma sinérgica, o indutor papel de filtro foi o que apresentou os melhores resultados. Isso pode ser explicado pela maior dificuldade do microrganismo na obtenção de fonte de carbono para os processos metabólicos, induzindo a uma maior síntese enzimática.

As maiores velocidades específicas de crescimento foram obtidas nos experimentos 5 e 6, em intervalos de fase log entre 24 h e 48 h, indicando a facilidade de multiplicação do microrganismo neste meio. Isso deve-se ao fato do farelo de soja conter substratos não celulósicos como amido e proteínas, que são de fácil assimilação pelo microrganismo.

A serragem de eucalipto não foi uma boa fonte de carbono para a produção de enzimas, que pode ser verificado pelas baixas velocidades específicas de crescimento obtidas. Para este mesmo substrato e indutor carboximetilcelulose, maiores valores de YX/S e YP/S foram obtidos devido a carboximetilcelulose ser uma fonte de carbono mais assimilável que o papel de filtro. Entretanto, seu uso não ocasionou melhorias na produtividade das enzimas.

3 CONCLUSÃO

A síntese das enzimas do complexo celulolítico é favorecida utilizando farelo de soja como substrato e indutores papel de filtro e carboximetilcelulose. As máximas atividades das celulases totais, das endo-glucanases e das β -glicosidases foram obtidas utilizando o indutor carboximetilcelulose.

O substrato farelo de soja nas condições estudadas mostrou-se viável para a síntese de celulases por microrganismos e desta forma apresenta importância, visando a geração de energia renovável.

REFERÊNCIAS

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biotechnology Industrial*. 1. ed. v. 1/2. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, 2001.

CALLONI, R.; MARCHETTO, R.; BRANCHER, L.; ROMIO, T.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. *Perfil de secreção de fenol-oxidases e celulases por Lentinula edodes em serragem de Eucalyptus spp.* Sinaferm, 2007.

CASTRO, A. M.; PEDRO, K. C. N. R.; FERREIRA, M. C.; CRUZ, J. C.; LEITE, S. G. F.; PEREIRA, N. J. Produção e caracterização das celulases de *Aspergillus niger* obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar. Sinaferm, 2007.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. International Union of Pure and Applied Chemistry, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

LIMING, X., XUELIANG, S. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. Bioresource Technology 91, 259-262, 2004.

LOWRY, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; J. Biol. Chem. 1951, 193, 265.

MANDELS, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in *Trichoderma Viride* as influenced by carbon sources and metals. Journal of Bacteriology, v. 73, n. 2, p. 269-278, 1957.

MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem., 31, 426-428, 1959.

OLIVEIRA, G. S.; CARVALHO, W.R.; FARIA, F. P. Produção de celulases pelo fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* em celulose e substratos lignocelulolíticos. Sinaferm, 2007.

REGULY, J. C. Biotecnologia dos Processos Fermentativos. 1. ed. v. 1. Pelotas: Editora Universitária UFPel, 1996.

REYES, J.; ZAMOURA, P. P.; DURÁN, N. Hidrólise enzimática da casca de arroz utilizando-se celulases. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. Química Nova, v. 21, n. 2, p. 140-143, 1998.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da estação ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Botânica, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.