

PRODUÇÃO DE CELULASES PELO FUNGO *FSDE3* EM CULTIVO SEMISSÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS DA CANA-DE-AÇÚCAR

Thaiane Vasconcelos Fenelon de Barros¹, Karina Soares do Bonfim¹, Andressa Laís Maria de Melo¹, Felipe Augusto Santos¹, Sharline Florentino de Melo Santos^{2*}

1. Discente do curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

2. Professora Adjunta. Departamento de Engenharia Química (DEQ), Centro de Tecnologia (CT), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Cidade Universitária, CEP: 58059-900, João Pessoa-PB. Email: sharlinefm@hotmail.com

RESUMO

O termo cultivo semissólido, aplica-se ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. A principal vantagem desse processo é a possibilidade de utilização de meios de cultivo de baixo custo, como resíduos agroindustriais. Nesse trabalho foi avaliada a produção de celulases pelo fungo isolado do solo da indústria sucroalcooleira, o *FSDE3*, através do cultivo semissólido utilizando como substrato, o bagaço da cana (50%) + farelo de trigo (50%) e palha da cana (50%) + farelo de trigo (50%), ambas em duplicatas. Os cultivos foram realizados em erlenmeyer de 1000 mL, contendo 100g do substrato, com umidade de 50%. Após a esterilização, o meio resfriado foi inoculado usando 10^6 esporos/g de meio. Os frascos foram incubados em estufa por 120 horas a 37°C, a cada 24 horas foi analisado a atividade CMCase, umidade e pH. Para a extração das enzimas foi utilizado solução salina 0,9%, na proporção de 11 mL por grama de amostra. Não foi observado crescimento de fungo no bagaço. Na palha, o fungo se desenvolveu bem, o pico de atividade de CMCase para o *FSDE3* ocorreu nos dois últimos dias de cultivo, com valores médios de produção enzimáticas iguais a 6,13 e 6,21 U/g.

Descritores: cultivo semissólido, celulases, CMCCase

CELLULASE PRODUCTION BY *FSDE3* FUNGI ON SOLID-STATE CULTIVATION UTILIZATION OF CANE SUGAR WASTE

ABSTRACT

The term solid state fermentation is applicable to the process of microorganism development over solid non-aqueous substrate. The main advantage in this process is that the less expensive semisolid state fermentation can be used. This project evaluated the cellulases' produced by *FSDE3*, an isolated fungus from the sugar industry's ground, through the semisolid cultivation using bagasse (50%) + wheat bran (50%) and sugar cane straw (50%) + wheat bran (50%) as substrate. The crops were made in Erlenmeyer of 1000mL, containing 100g of the substrate, with moisture equivalent to 50%. After sterilization, the freeze environment was inoculated using 10^6 spores/g of state. The flasks were incubated in a glass-house for 120 hours at a temperature of 37C, and every 24 hours the CMCCase activity, moisture and the pH were analyzed. The 0.9% saline solution, in the proportion of 11 mL per 1g of sample, was employed in the extractions of enzymes. There was no fungus development on the bagasse; thus, the analysis of the activities in these samples was unnecessary. The fungus increased markedly on the straw; the *FSDE3*'s maximum activity occurred in the last two days of cultivation, and the average values of enzymatic production ranged from 6.13 to 6.21 U/g.

Keywords: solid state fermentation, cellulases, CMCCase.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma planta de suma importância para a economia brasileira, tornando-se grande geradora de empregos e de energia via industrialização desta em açúcar e álcool (1). O bagaço de cana é um resíduo gerado em grandes quantidades pelas indústrias de açúcar e álcool no Brasil (2). Após a extração da sacarose, aproximadamente 75% do bagaço excedente é utilizado na geração de calor e energia para a usina e cerca de 25% é estocado ou disposto em aterros (3). Em virtude da importância do bagaço de cana como resíduo industrial, existegrande interesse no desenvolvimento de métodos para a produção biológica de combustíveis e produtos químicos que oferecem vantagens econômicas, ambientais e estratégicas (2).

Entre os diferentes tipos de biomassa lignocelulósica, a palha de cana-de-açúcar se destaca como fonte energética. A palha apresenta grande potencial para geração de calor, eletricidade e produção de etanol celulósico. O aproveitamento da palha deverá ocupar um lugar de destaque como matéria-prima para a produção de etanol combustível. De acordo com Ripoli, uma tonelada de palha equivale a algo entre 1,2 a 2,8 EBP (equivalentes barris de petróleo). Consequentemente, a não utilização dessa biomassa provoca o desperdício energético (4).

A produção de enzimas, pelo cultivo em estado sólido é uma alternativa atraente, sob o ponto de vista econômico para produção de celulases(5), para a produção de lipases (6). Em ambos os casos, nos quais foram utilizados resíduos agroindustriais como substrato, a obtenção das enzimas por FES, quando comparada com a FSm, apresentou significativa redução dos custos, o que foi atribuído, principalmente, ao baixo valor econômico do substrato utilizado. (7)

Vários microrganismos são citados como fontes produtoras de xilanase e celulase, mas a busca por novas linhagens permite a seleção de novos isolados capazes de produzirestes bioprodutos através da degradação de diferentes substratos. É de grande importância a seleção de cepas selvagens capazes de produzirem enzimas, especialmente em países que apresentam elevada biodiversidade como o Brasil (8). Neste sentido, fazem referencia a enorme biodiversidade brasileira, que é pouco explorada para descoberta de novos organismos produtores de enzimas de interesse industrial (9).

A grande disponibilidade de biomassa lignocelulósica de baixo custo, como a do bagaço de cana-de-açúcar, no Brasil, estimula a busca por microrganismos mais eficientes no uso desse resíduo. Para a produção de etanol, a hidrólise química

apresenta baixo rendimento, em razão da degradação parcial desses resíduos pelo uso de ácido e pela formação de compostos que, além de não serem fermentescíveis, podem inibir a atividade da levedura. Ademais, o uso frequente de ácido causa corrosões nos equipamentos e aumenta os riscos de acidentes pelo seu manuseio. Assim, a hidrólise enzimática tem sido preferida (10).

O bagaço de cana é uma fonte potencial para a produção de enzimas lignocelulolíticas para utilização em processos industriais e biotecnológicos, além de possibilitar uma importante alternativa para a reciclagem de resíduos lignocelulósicos provenientes das atividades agrícolas, contribuindo assim para resolver os problemas ambientais decorrentes do acúmulo destes resíduos na natureza (11).

Esse artigo tem como objetivo avaliar a produção de celulases, pelo fungo isolado do solo da indústria sucroalcooleira, no caso o *FSDE3*, através do cultivo semissólido, usando a combinação do bagaço e a palha de cana-de-açúcar com o farelo de trigo como substrato.

MATERIAL E MÉTODOS

O bagaço e a palha de cana-de-açúcar foram obtidos junto às usinas localizadas na região metropolitana de João Pessoa. Após a lavagem a palha foi seca em uma estufa a uma temperatura de 60°C, durante 24 horas. Em seguida, foi triturada e armazenada em recipiente de plástico a temperatura ambiente.

Para secagem do bagaço foi utilizada uma secadora com circulação de ar a uma temperatura de 55°C, com velocidade do ar de 55,1m/s, durante 1h20min. Não foi necessária a trituração do mesmo, sendo armazenado nas mesmas condições da palha.

Caracterização físico-química do resíduo seco

A caracterização físico-química dos resíduos quanto a umidade, pH, °Brix e densidade aparente, foi realizada conforme procedimentos descritos a seguir. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Umidade: Para a análise de umidade, pesou-se 1g da amostra em placas de petri previamente seca e tarada. As placas de petri com as amostras foram colocadas na estufa a 105°C por 24 horas. Em seguida, foi determinada a umidade dos resíduos.

pH: Preparou-se uma suspensão com 20mL de água destilada e 1g da amostra sólida. Após a homogeneização, a suspensão foi deixada em repouso por um período

de 30 minutos. Em seguida, o pH foi mensurado em um potenciômetro digital, previamente calibrado com as soluções padrões.

Teor de sólidos solúveis (°Brix): Para medir o °Brix, foram usadas as mesmas suspensões utilizadas para medir o pH, no qual foram filtradas com papel de filtro e feita a leitura em refratômetro.

Densidade aparente: O resíduo foi introduzido em uma proveta de 250mL, sem haver compactação da amostra, em seguida, esse resíduo foi pesado.

Microrganismos

Foi utilizado o fungo filamentoso *FSDE3* o qual foi cedido pelo Prof. Dr. Demetrius Antônio Machado de Araújo do Centro de Biotecnologia – UFPB. Este fungo foi isolado do solo de descanso do plantio de cana-de-açúcar de uma usina de açúcar e álcool, pela aluna do Programa de Pós – Graduação em Biotecnologia, (Renorbio), Laís Campos Teixeira de Carvalho e selecionado como produtor de celulases. O microrganismo foi conservado sob refrigeração, em placas de Petri com meio Agar Batata Dextrose (BDA).

Inoculo

Foi feito o repasse dos fungos do estoque para placas de petri contendo o meio BDA (Batata Dextrose Ágar) e clorafenicol 0,1%. As placas contendo o *FSDE3* foram incubadas em estufas por cinco dias a 37°C. Após o quinto dia de crescimento, os esporos foram suspensos em água destilada estéril.

Para a obtenção da concentração desejada de 10⁶esporos/g, foi feita a contagem de esporos utilizando a câmara de Neubauer no microscópio eletrônico. Obtendo o volume do inoculo pela Eq.(1):

$$Volume\ do\ inóculo_{(mL)} = \frac{Conc.\ esporos\ desejada\left(\frac{esporos}{g}\right) * Massa\ substrato_g}{Conc.de\ esporos\left(\frac{esporos}{mL}\right)} \quad Eq. (1)$$

Sendo:

Conc. de esporos desejada = 10⁶esporos/g

Massa de substrato = 100g

Conc. de esporos(esporos/mL) = (Σ esporos nas 5 regiões)*5*10⁴*diluição

Cultivo

Foram utilizados como substrato as combinações de: farelo de trigo (50%) + bagaço de cana-de-açúcar(50%) e farelo de trigo (50%) +palha de cana-de-açúcar (50%), ambos em duplicata e com 50% de umidade.

O volume de líquido adicionado ao meio foi obtido pela seguinte equação:

$$m_{H_2O} = \frac{m_s(x_2 - x_1)}{1 - x_2} \text{ Eq.(2)}$$

Sabendo que:

m_s = massa do substrato = 100g

x_1 =umidade da média entre o farelo e a palha e o farelo e o bagaço

x_2 = umidade desejada = 0,5

Os cultivos foram realizados em Erlenmeyer de 1000 mL, onde foi introduzido 100g do substrato umedecido com meio Mandels, o qual foi preparado pela mistura dos reagentes Uréia (0,3g/L), NH_4SO_4 (1,4g/L), KH_2PO_4 (2,0g/L), $CaCl_2$ (0,3g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,3g/L), Peptona (0,75g/L), Extrato de levedura (0,25g/L), Solução estoque (1mL).

Os Erlenmeyer foram tampados com algodão e alumínio e esterilizados por quinze minutos a 120°C. Após a esterilização, o meio resfriado e em seguida, foi feita a inoculação e a incubação em estufa por 120 horas a 37°C, a cada 24 horas uma amostra foi retirada para análise de atividade CMC_{Case}, umidade e pH.

Extração

A cada dia de cultivo foram retirados amostras de 2 a 4 gramas do meio, onde utilizou para análise de pH e umidade utilizando a metodologia já descrita. Para a extração da enzima, foi utilizada a proporção de 1g do cultivo por 11 mL de solução salina 0,9% (pH 4,6) a temperatura ambiente. A amostra foi homogeneizada e após 35 minutos de extração, foi feita a filtração com papel filtro. O filtrado foi armazenado sob refrigeração.

Atividade de CMC_{Case}

A análise de atividade enzimática (CMC_{Case}) foi baseada no método proposto por Ghose (1987). Assim, foi preparada solução decarboximetilcelulose (CMC) 4% em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8. Foi adicionado 0,25 mL do sobrenadante nos tubos contendo 0,25 mL da solução de CMC 4% (substrato) e agitados vigorosamente. Para o branco, utilizado para zerar o espectro, foi utilizado uma solução composta por

0,5 mL do tampão citratomais 0,5 mL de DNS. Para o controle da amostra, branco da amostra, foi utilizada uma solução composta por 0,25 mL do tampão, 0,25 mL da enzima extraída. Todos os tubos foram colocados no banho a 50°C por 10 minutos para que ocorresse a reação. As análises de atividade foram realizadas em duplicata.

Após os 10 minutos foram adicionados 0,5 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) aos tubos sendo em seguida agitados em Vortex.

Esses tubos foram introduzido em outro banho-maria a 100°C durante 5 minutos. Após esse período, os tubos foram colocados em um banho de gelo e em seguida, foram adicionados aos tubos 6,5 mL de água destilada seguida pela homogeneização.

Por fim, as amostras foram analisadas no espectrofotômetro a 540nm para a análise da absorbância. Os valores de absorbância foram transformados em concentração de glicose liberada, usando a curva padrão de glicose.

O valor da atividade enzimática é obtido pela equação:

$$\text{CMCase } \left(\frac{U}{g}\right) = \frac{(A-B)*f*d*0,5*R}{(0,18*10*0,25)} \quad \text{Eq.(3)}$$

Sabendo que:

A = absorbância da amostra

B = absorbância do branco da amostra

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

d = diluição da amostra (mL/g)

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) = 11

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização

Os resíduos do bagaço e da palha da cana-de-açúcar foram caracterizados em relação à umidade, pH, °Brix e densidade aparente. Os resultados são apresentados na Figura 1.

Resíduos	Umidade (%)	pH	°Brix	Densidade Aparente (g/mL)
Bagaço	8,5789	6,12	6,12	0,1085
Palha	6,1019	6,03	6,03	0,0804

Figura 1: Caracterização dos resíduos.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, em relação a umidade mostra que os resíduos podem ser armazenados na temperatura ambiente, pois apresentam valores de umidade baixo. Em relação pH, os resíduos analisados são semelhantes, estando o pH próximo da neutralidade. A densidade aparente da palha é muito menor que o do bagaço, o que implica que o volume ocupado pela palha é maior que o do bagaço para uma mesma massa, neste caso, a altura do meio com a palha foi maior que o bagaço.

Cultivo

A Figura 2 mostra o pH e a umidade do bagaço e da palha durante os cinco dias de cultivo. O teor de umidade manteve o valor próximo ao esperado de 50%, tendo pequenas variações, mas sem distanciar significativamente da umidade esperada. Esses resultados são importantes, pois em processos de cultivo semissólido, a limitação de água pode afetar os processos de germinação, esporulação e formação de metabólitos. Já o excesso de água reduz os espaços vazios assim como o volume de fase gasosa no interior do substrato, o que aumenta a resistência de transferência de massa de oxigênio e gás carbônico e a possibilidade de contaminação (12).

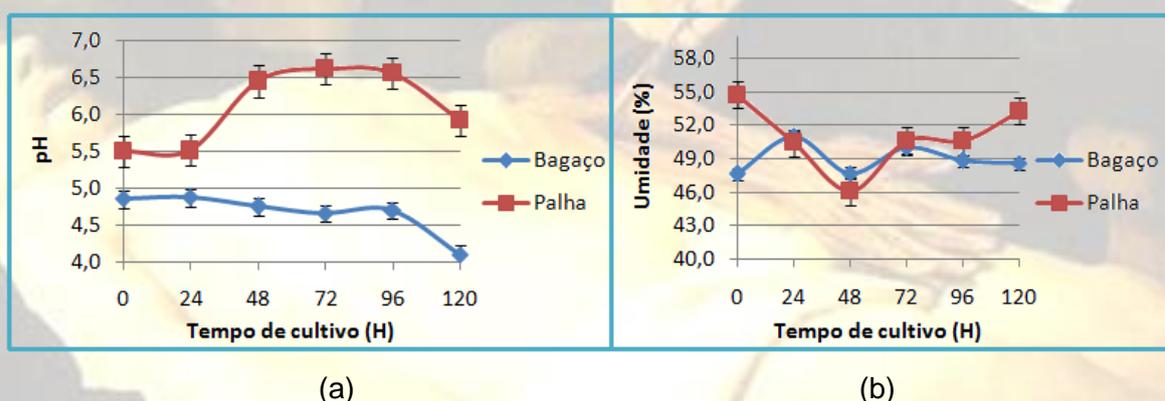


Figura 2: Mostra os resultados da (a) umidade e do (b) pH versus o tempo de cultivo (H) durante as 120H de cultivo.

Durante as 120 horas de cultivo não foi observado crescimento do fungo filamentososo FSDE3, no meio contendo bagaço + farelo de trigo. O não desenvolvimento

do fungo no meio pode ter sido devido as condições de processo não estarem favoráveis ao seu desenvolvimento, entre os fatores pode citar a condição de umidade do meio, que ficou em torno de 48% bem como a temperatura de 37°C.

Este fungo se desenvolve bem na temperatura de 37°C no meio BDA, no entanto no meio contendo bagaço de cana-de-açúcar, por apresentar maior quantidade de lignina que os outros resíduos estudados (palha de cana-de-açúcar e farelo de trigo), o torna mas difícil ao ataque microbiano.

A Figura 3, apresenta o resultado de atividade CMCCase em função do tempo, para o cultivo realizado com a palha da cana e farelo de trigo. A atividade CMCCase está expressa em unidade de (U) por grama de substrato (g). Os pontos representam a média das repetições (os experimentos foram realizados em duplicata).

Não foi necessário a análise de atividade CMCCase do bagaço da cana, pois visualmente já concluía-se que não havia crescimento do fungo.

Pela Figura 3 é possível observar que o pico de atividade para o *FSDE 3* ocorreu no quarto e quinto dia de cultivo, com valores médios de produção enzimáticas para o *FSDE3* iguais a 6,13 U/g e 6,21 U/g. Como a curva ainda apresenta um perfil crescente seria necessário deixar o fungo por mais tempo no cultivo, para ver se atingia uma maior produção. O uso da palha de cana-de-açúcar traz benefícios para produção de celulases por este fungo, que apresenta como vantagem o baixo custo, além de ser mais acessível para usinas de produção de etanol.



Figura 3: Atividade de CMCCase durante o cultivo com palha de cana-de-açúcar.

Os resultados obtidos evidenciam que a produção de celulases depende de muitos fatores, como o tipo de substrato e as condições de cultivo, já que o mesmo fungo não se desenvolveu em meio contendo bagaço, mas, cresceu bem em meio com

palha de cana-de-açúcar. É necessária a caracterização das celulases produzidas, com relação à estabilidade as diferentes temperaturas e pH, levando em consideração que a enzima foi produzida na de 37 °C.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram que o cultivo semissólido utilizando como substrato a combinação da palha da cana e o farelo de trigo inoculado com o fungo filamentosos, isolado do solo de descanso do plantio de cana-de-açúcar, o *FSDE3*, é possível.

É necessário novos experimentos utilizando o mesmo fungo com diferentes combinações de substrato, temperatura de cultivo, concentração de esporos e umidade para se ter uma melhor avaliação do fungo *FSDE3* na produção de celulases.

O não crescimento do fungo não descarta a utilização do resíduo para o crescimento de fungos filamentosos, sendo necessários outros experimentos utilizando outras condições de cultivo com outros tipos de fungos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MANZANO, R. P.; FUKUSHIMA, R. S.; GOMES, J. D. F.; GARIPPO, G. Digestibilidade do bagaço de cana-de-açúcar tratado com reagentes químicos e pressão de vapor. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, n. 4, p. 1196-1204, 2000;
2. CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugar cane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010;
3. DAWSON, L.; BOOPATHY, R. Cellulosic ethanol production from sugarcane bagasse without enzymatic saccharification. *Bioresources*, v. 3, n. 2, p. 452-460, 2008;
4. SANTOS, F. A. et al. POTENCIAL DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL. *Quim. Nova*, Vol. 35, No. 5, 1004-1010, 2012;
5. TENDERDY, R.P. Solid substrate fermentation for enzyme production. In: PANDEY, A. (Ed.) *Advances in Biotechnology*. New Delhi: Educational Publishers & Distributors, p.13-16, 1998;
6. CASTILHO L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A; SANT'ANNA JR., G.L.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, 4: 239 – 247, 2000b;
7. MELO, G. R. Produção de celulases e xilanases pelo fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* em diferentes substratos lignocelulósicos. 2010. 85f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. 2010;
8. ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 30, p. 126-131, jan./mar. 2010;

9. DO CANTO, W.L.; MENEZES, T. J. B. Estudos Econômicos – Alimentos Processados. Produção, usos e mercado de enzimas. Campinas: Ital. 1995;
10. MENEZES, T.J.B. de. Etanol, o combustível do Brasil. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 233p;
11. MENEZES, C.R; SILVA, I. S; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. Estudos Tecnológicos - Vol. 5, nº 1:68-78 (jan/abr 2009);
12. Cen, P., Xia, L. (1999) Production of cellulase by solid-state fermentation. Adv. Biochem. Eng./ Biotechnol. 65, 69-92.

