

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Mucor circinelloides*

T. C. MACIEL¹, L. M. N. PAIXÃO², S. L. R. OLIVEIRA¹, S. O. SANCHO², S. RODRIGUES^{1,2}

¹ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química

² Universidade Federal do Ceará, Departamento de Tecnologia de Alimentos

E-mail para contato: tatimaciel87@yahoo.com.br

RESUMO – As celulasas são enzimas que têm se destacado no mundo científico em virtude do interesse na produção do etanol de segunda geração. Desta forma, diversas pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento de novos bioprocessos para a produção de celulasas microbianas mais eficientes e estáveis que as disponíveis atualmente. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do pH e da temperatura na produção de celulasas a partir de *Mucor circinelloides*, um micro-organismo recentemente isolado por nosso grupo de pesquisa, sendo utilizado bagaço de cana-de-açúcar como substrato para a fermentação em estado sólido. Diferentes combinações de pH e temperatura foram estudadas através de um planejamento fatorial composto central (22). Os resultados observados a partir da superfície de resposta, mostraram um ponto de máximo, pH 5,48 e 34,4 °C, no qual a atividade enzimática foi igual a $6,00 \pm 0,32$ FPU/g.

1. INTRODUÇÃO

Celulasas são enzimas amplamente usadas em processos industriais (Long *et al.*, 2009). No entanto, devido às grandes quantidades requeridas nos processos, o uso dessas enzimas torna-se dispendioso, o que tem restringido sua aplicação em processos em grande escala (Cunha *et al.*, 2012), 2012).

Neste contexto, a produção de celulasas utilizando resíduos agroindustriais como substrato torna-se interessante por aumentar o rendimento econômico desse processo. Esta aplicação tem como principais motivadores a abundância destes materiais, ricos em nutrientes, além de não possuírem custos diretos de produção, contribuindo para a sustentabilidade dos sistemas de produção (Ncube *et al.*, 2012).

Entretanto, a fim de se obter a máxima produção da enzima, além de se dispor de um micro-organismo com boa capacidade de produção e secreção e de um meio de produção com composição adequada para suprir suas necessidades, também é fundamental que se investigue quais são as condições ótimas de cultivo, tais como o pH do meio e temperatura de incubação (Delabona *et al.*, 2012; Deswal *et al.*, 2011). Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar a influência destes parâmetros na produção de celulasas por *Mucor circinelloides* utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo produtor de celulasas

O micro-organismo utilizado foi isolado, por nosso grupo de pesquisa e identificado molecularmente como *Mucor circinelloides*.

2.2. Preparo do inóculo

A linhagem foi cultivada em Ágar Batata Dextrose, durante 10 dias à 30 °C. A preparação do inóculo ocorreu pela adição de 20 mL de solução de Tween 80 0,2% à placa contendo os esporos, sendo transferidos para a solução com o auxílio de alça de Drigalski. Em seguida determinou-se a concentração de esporos (câmara de Neubauer), sendo inoculado no meio de fermentação 1 mL desta suspensão na concentração de 1×10^6 esporos/ mL (Ncube *et al.*, 2012).

2.3. Substrato empregado na fermentação

O bagaço de cana-de-açúcar “in natura” foi utilizado como substrato, com tamanho de partícula entre 3 e 8 mm (Herculano *et al.*, 2011).

2.4. Otimização do pH e temperatura de incubação

A produção de celulasas foi obtida a partir de um meio contendo 3,0 g de bagaço de cana e 2,0 mL de uma solução salina composta por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 nas concentrações de 9,0 e 1,0 g/L, respectivamente. O pH da solução e a temperatura de incubação do meio foram otimizado através de planejamento fatorial composto central (2^2) (Tabela 1). A faixa de pH da solução salina avaliada foi de 4,0 a 7,0 e temperatura entre 25 e 35 °C. Foram realizadas três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. Após a preparação dos meios, os mesmos foram autoclavados a 121°C por 15 minutos e posteriormente inoculados com uma suspensão de esporos (item 2.2), sendo incubados de acordo com a matriz do planejamento. A incubação ocorreu em estufa B.O.D. por 24 horas. Os resultados foram avaliados com o auxílio do software Statistica 7.0.

Tabela 1 – Matriz do planejamento fatorial composto central (2^2) para otimização do pH inicial do meio de produção de celulasas e da temperatura do processo fermentativo na produção de celulase por *M. circinelloides*

Ensaio	pH	Temperatura (°C)
1	4,0	25
2	4,0	35
3	7,0	25
4	7,0	35
5	4,0	30
6	7,0	30
7	5,5	25
8	5,5	35
9*	5,5	30
10*	5,5	30
11*	5,5	30

*pontos centrais

2.5. Recuperação da enzima do meio fermentado e quantificação da atividade de celulase total

Decorrido o período de fermentação, procedeu-se com a recuperação da enzima do meio fermentado, para isto foi adicionado tampão acetato de sódio ao Erlenmayer, sendo submetido à agitação de 200 rpm, em *shaker*, por 30 minutos a 30 °C, de acordo com Oliveira (2010). Em seguida foi realizada uma filtração em papel de filtro Whatman nº 1, para separar o resíduo da fermentação do sobrenadante (extrato enzimático bruto). A atividade celulásica total foi quantificada segundo Ghose (1987). Após o período de reação, a mesma foi interrompida pela adição do reagente ácido 3,5 - dinitrosalicílico (DNS). A atividade hidrolítica foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores liberados durante a reação pelo método do DNS (Miller, 1959). A atividade enzimática foi expressa em FPU/g.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura é uma das variáveis mais importantes que afeta a FES, estando relacionada com o transporte de massa e com a transferência de oxigênio (Wang; Yang, 2007), influenciando assim, o crescimento do micro-organismo, a formação de esporos e produção de metabólitos de interesse (Pandey, 2003). O pH do meio, por sua vez, é um dos fatores ambientais de maior relevância para esse tipo de fermentação, pois afeta diretamente o crescimento do micélio e o transporte de vários componentes através da membrana celular, influenciando assim a produção da enzima (Kapoor *et al.*, 2008).

O efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis analisadas exerceu sobre a atividade enzimática do extrato produzido é dado pelo Diagrama de Pareto (Figura 1).

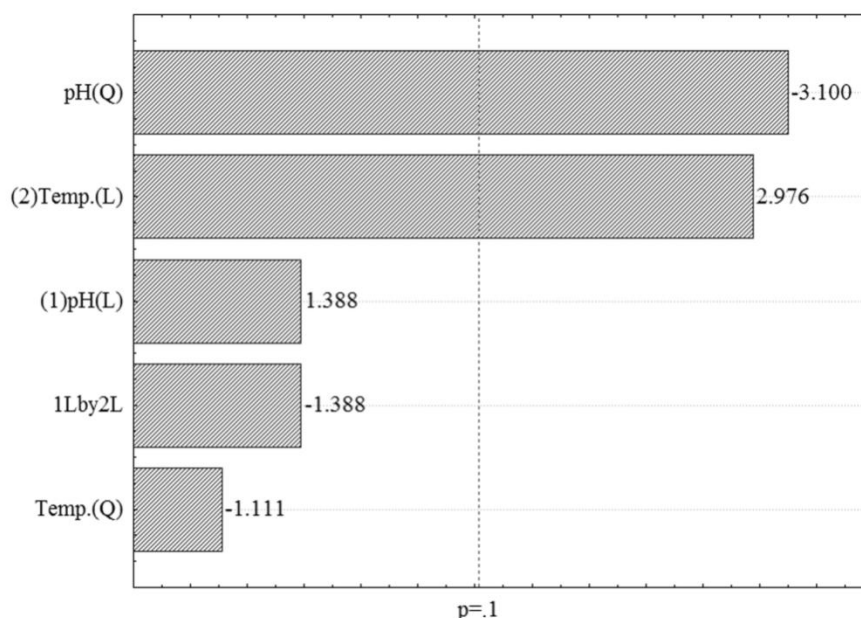


Figura 1 - Efeito estimado do pH e da temperatura na produção de celulase por *M. circinelloides*

No presente estudo, apenas o efeito linear da temperatura foi significativo e positivo sobre a atividade enzimática, ao nível de 90% de confiança. O efeito quadrático do pH da solução salina apresentou efeito significativo negativo dentro do intervalo de confiança analisado. Tal resultado sugere que esta enzima é mais sensível a variações de pH do que de temperatura.

O modelo de regressão obtido para prever a atividade enzimática de celulase em função das variáveis independentes, pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulasas e temperatura de condução do processo fermentativo está representado pela Equação 1:

$$Z = -80,92 + 14,41x - 0,98 x^2 + 2,76y - 0,03y^2 - 0,11 x*y \quad (1)$$

Onde:

Z = Atividade enzimática (FPU/g);

x = pH;

y = Temperatura (°C)

A significância estatística do modelo matemático foi determinada por análise de variância (ANOVA). De acordo com os resultados da ANOVA, o valor de F calculado para o modelo estatístico foi 5,27, ou seja, maior que o valor de $F_{5,5}$ tabelado (3,45) no intervalo de 90% de confiança. Assim, o modelo pôde ser considerado estatisticamente significativo, de acordo com teste de F. O modelo apresentou um bom coeficiente de determinação ($R^2 = 0,84$) mostrando proximidade entre os resultados experimentais e os valores teóricos previstos pelos resultados de Equação 1.

Após ajuste e validação do modelo, os resultados da atividade enzimática de *M. circinelloides* obtidos foram analisados através do gráfico de superfície de resposta (Figura 2), que demonstrou que a combinação dos parâmetros estudados que conduziu a atividade enzimática máxima ($6,00 \pm 0,32$ FPU/g) foi pH 5,38 e 34,4 °C, determinados através do ponto crítico.

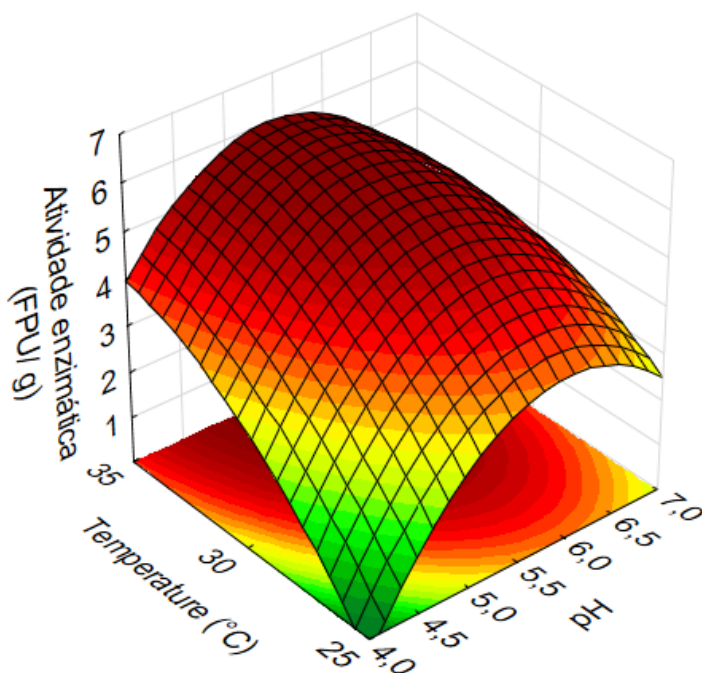


Figura 2 – Gráfico de superfície de resposta obtida a partir dos resultados do planejamento experimental.

Brijwani *et al.* (2010) produziram celulase a partir de uma cultura mista de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae* em FES. O pH do meio e a temperatura de incubação que conduziram a maior atividade enzimática foram 4,5 e 30 °C, respectivamente. Resultados similares (5,0 e 30 °C) foram obtidos por Guowei *et al.* (2011), em seu estudo com *T. reesei* HY07.

Narra *et al.* (2012) avaliaram o pH do meio de produção de celulases utilizando *A. terreus* como agente da FES da palha de arroz no intervalo de pH entre 3,0 e 7,0, tendo 5,0 como o valor ótimo para este parâmetro. Herculano *et al.* (2011), por sua vez, ao avaliar a produção de celulases por *A. japonicus* URM5620, encontraram valores da ordem de 6,0 e 25 °C.

Deswal *et al.* (2011) também avaliaram a influência destes parâmetros na produção de celulases por *Fomitopsis* sp. RCK 2010, encontrando maior atividade enzimática em pH 5,5 e 30 °C, sendo este resultado dez vezes inferior ao encontrado no presente estudo. Resultado semelhante (pH 5,7 e 30 °C) foi observado por Liu *et al.* (2011), na produção de celulases por *Penicillium decumbens* ML-017.

4. CONCLUSÃO

M. circinelloides foi capaz de utilizar o bagaço de cana-de-açúcar para produzir celulases e a atividade enzimática máxima (6,00 FPU/g) foi obtida em pH 5,38 e 34,4 °C, o que está de acordo com a faixa normalmente empregada destes parâmetros para a produção de celulases por fungos filamentosos.

5. REFERÊNCIAS

- BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochem.*, v. 45, p. 120–128, 2010.
- CUNHA, F. M.; ESPERANÇA, M. N.; ZANGIROLAMI, T. C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulose. *Bioresource Technol.*, v. 112, p. 270-274, 2012.
- DELABONA, P. S.; FARINAS, C.S.; SILVA, M.R.; AZZONI, 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 Technol.*, v. 107, p. 517-521, 2012.
- DESWAL, D.; KHASA, Y.P.; KUHAD, R.C. Optimization of cellulose production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresource Technol.*, v. 102, p. 6065-6072, 2011.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* v. 59, p. 257-268, 1987.
- GUOWEI, S.; MAN, H.; SHIKAI, W.; HE, C. Effect of some factors on Production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. *Procedia Environ. Sci.* v. 8, p. 25-26, 2011.

- HAQ, I.; S, K.; H, U.; JAVED, M. M.; QADEER, M. A. Solid-state fermentation of cellulases by locally isolated *Trichoderma harzianum* for the exploitation of agricultural by products. *Pak. J. Biol. Sci.*, v. 9, p. 1779-1782, 2006.
- HERCULANO, P.N.; PORTO, T.S.; MOREIRA, K.A.; PINTO, G.A.S.; MOTTA, C.M.S.; PORTO, A.L.F. Cellulase production by *Aspergillus japonicus* URM5620 using waste from castor bean (*Ricinus communis* L.) under solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 165, p. 1057-1067.
- KAPOOR, M.; NAIR, L. M.; KUHAD, R.C. Cost effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. *Biochem. Eng. J.* v. 38, p. 88-97, 2008.
- LIU, Y. T.; LUO, Z. Y.; LONG, C. N.; WANG, H. D.; LONG, M. N.; HU, Z. Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by solid state fermentation with rice bran. *New Biotechnol.*, v. 28, p. 733-737, 2011.
- LONG, C.; OU, Y.; GUO, P.; LIU, Y.; CUI, J.; LONG, M.; HU, Z. Cellulase production by solid state fermentation using bagasse with *Penicillium decumbens* L-06. *Ann. Microbiol.*, v. 59, p. 517-523, 2009.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-428, 1959
- NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. R. Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. *Bioresour. Technol.*, v. 121, p. 355-361, 2012.
- NCUBE, T.; HOWARD, R. L.; ABOTSI, E. K.; RENSBURG, E. L. J.; NCUBE, I. Jatropha curcas seed cake as substrate for production of xylanase and cellulose by *Aspergillus niger* FGSCA 733 in solid-state fermentation. *Ind. Crops Prod.*, v. 37, p. 118-123, 2012.
- OLIVEIRA, S. L. R. Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera* L.) para produção de celulases. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 81-84, 2003.
- WANG, W.; YANG, S. Solid State Fermentation and Its Applications. In: YANG, S (Ed.). *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. Elsevier, 2007, ch. 18, p. 465-489.