

# **PRODUÇÃO DE ENZIMAS PELO FUNGO *Penicillium chrysogenum* E UM FUNGO ISOLADO DA CASCA DO COCO (*Aspergillus fumigatus*) EM FSS UTILIZANDO RESÍDUO DE COCO COMO SUBSTRATO**

S. D. de OLIVEIRA Jr<sup>1</sup>, P. F. de SOUZA FILHO<sup>1</sup>, G. R. MACEDO<sup>1</sup>, E. S. dos SANTOS<sup>1</sup>, C. F. ASSIS<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Farmácia

E-mail para contato: sergiodantas100@hotmail.com

**RESUMO** - O termo fermentação semi-sólida refere-se ao crescimento de microrganismos sobre um substrato sólido. O bagaço de coco (*Cocos nucifera* L.), um fruto encontrado principalmente na região Nordeste do Brasil, pode ser utilizado como substrato para este tipo de fermentação como um cultivo alternativo e de baixo custo econômico, sendo uma boa alternativa para o aproveitamento deste resíduo e com isso diminuindo danos ao meio ambiente. Este estudo avaliou o potencial deste resíduo como substrato para produção de enzimas celulolíticas em cultivo semi-sólido, utilizando os fungos *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus fumigatus* (isolado do resíduo da casca do coco). Avaliou-se as condições de cultivo (umidade e pH) utilizando um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> mais 3 pontos centrais. A máxima atividade enzimática para CMCase foi 0,282 UI/mL e para a Avicelase foi 0,018 – 0,020 UI/mL para as fermentações usando o fungo isolado. Já para o fungo *Penicillium chrysogenum* os valores encontrados para CMCase foi 0,233 UI/mL e para a Xilanase foi 0,735 UI/mL. A fermentação foi realizada a 30 °C em BOD. Os dois fungos sintetizaram as enzimas sem a necessidade de qualquer indutor ou suprimento além da celulose presente no resíduo.

## **1. INTRODUÇÃO**

O grande consumo de água de coco verde (*in natura* ou industrializada) vem aumentando a geração de resíduo desse fruto, o que acaba representando um grave problema quanto ao descarte desse material. O “coir” nome dado às fibras que constituem o mesocarpo grosso ou casca do coco (*Cocos nucifera* L.) é usado para produção de tapetes, esteiras e como substrato agrícola. As cascas de coco verde correspondem aproximadamente a 85% do peso bruto do fruto e a sua degradação leva em torno de 8 anos (Rosa *et al.*, 2001). Este material é composto principalmente por celulose e hemicelulose.

Uma alternativa para utilizar esse material, que seria descartado e sem qualquer tipo de cuidado, é sua utilização como substrato para produção de enzimas por fermentação semi-sólida utilizando fungos filamentosos, por serem microrganismos que se adaptam a condições adversas, como baixa umidade, pH e temperaturas variadas. O processo de fermentação semi-sólida (FSS) envolve o crescimento e metabolismo de microrganismos na ausência ou quase ausência de água

livre, empregando um substrato sólido, ou suporte. A FSS se apresenta como uma tecnologia para usar resíduos gerados como substratos, diminuindo possíveis problemas ambientais (Rocha, 2010). Esta técnica tem muitas vantagens sobre a fermentação submersa incluindo altos rendimentos e a baixa demanda de energia (Krishna, 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da umidade e do pH em fermentações para a produção de enzimas utilizando os fungos filamentosos *Penicillium chrysogenum* e um fungo isolado da casca do coco (*Aspergillus fumigatus*).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Bagaço de coco**

A casca e o mesocarpo fibroso foram utilizados para a obtenção do bagaço da casca de coco verde. Após a seleção dos cocos, as etapas do processo foram a dilaceração do material com facão, lavagem, secagem, moagem e armazenamento. A desidratação dos resíduos da casca de coco foi realizada em secador do tipo bandeja a 70 °C por cinco dias, triturado em moinho de facas tipo Willey e a fração foi coletada, sendo em seguida classificados em peneira de 20 *mesh*, e posteriormente, armazenados em sacos plásticos à temperatura ambiente.

### **2.2. Caracterização química e físico-química do bagaço de coco verde**

Foi determinado o teor de extrativos (Pitarelo, 2007), polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e lignina (Sluiter *et al.*, 2011) e cinzas (Vasconcelos, 2012) da biomassa conforme os procedimentos descritos na literatura. A quantidade de pectina foi determinada pelo método gravimétrico por precipitação com pectato de cálcio descrito por Rangana (1979).

### **2.3. Microrganismos utilizados nas fermentações**

Utilizou-se uma linhagem do fungo filamentoso *Penicillium chrysogenum* (807) da coleção ARS Culture Collection – BFPM Research Unit, National Center for Agriculture Utilization Research e um fungo isolado casca do coco.

### **2.4. Isolamento de uma linhagem fúngica produtora de celulase**

Um fungo produtor de celulases foi isolado da casca de coco. A linhagem foi inoculada em frascos Erlenmeyer contendo caldo batata-dextrose e incubadas a 30 °C em Incubadora Refrigerada com Agitação orbital a 200 rpm (TE-421, TECNAL). Após 48 horas, as cepas foram transferidas para placas de Petri contendo ágar celulose com a seguinte composição: 0,5 g/L de MgSO<sub>4</sub> (sulfato de magnésio); 0,5 g/L de KCl (cloreto de potássio); 3,0 g/L de NaNO<sub>3</sub> (nitrato de sódio); 0,01 g/L de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (sulfato de ferro); 1,0 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (fosfato de potássio); 15 g/L de ágar-ágar; 5,0 g/L de celulose microcristalina. As placas foram incubadas a 30 °C por 120 horas seguindo metodologia descrita por Braga *et al.* (2009). O microrganismo foi identificado no laboratório BIOTRENDS, localizado em Fortaleza, sendo identificado como *Aspergillus fumigatus*.

## 2.5. Condições das fermentações

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, cobertos com tampão de algodão. Foram pesados 5 g do substrato em base seca, adicionados 5 mL do inóculo com uma concentração de  $1,0 \times 10^6$  esporos/mL (Coelho *et al.*, 2001) e uma solução salina nutriente (sulfato de amônio 0,1%, nitrato de amônio 0,1% e sulfato de magnésio heptahidratado 0,1% (p/v), com pH corrigido para 3, 5 ou 7 (com ácido clorídrico 3 M ou hidróxido de sódio 0,1 M) cujo volume variava de acordo com a umidade desejada (66, 70,5 e 75%). Essas medições foram realizadas de acordo com o planejamento experimental. A mistura foi incubada em BOD a 30 °C e, após 120 horas de fermentação, foi realizada a etapa de extração do complexo enzimático.

O programa computacional STATISTICA© (versão 7.0, StatSoft, Inc, 2004) foi utilizado para obtenção dos efeitos principais das variáveis e de suas interações, dos dados de análise de variância e para a obtenção de superfícies de resposta.

## 2.6. Extração das enzimas

A extração das enzimas ao término da fermentação foi realizada com adição de 4 mL de solução tampão acetato 200 mM (pH 4,5) por grama de bagaço utilizado no processo fermentativo, agitando-se manualmente com um bastão de vidro durante 1 hora em banho-maria à 30 °C. O material foi filtrado com papel de filtro, em seguida foi centrifugado por 20 minutos a 3500 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado e armazenado a -18 °C. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 representa a caracterização química e físico-química do bagaço do coco.

Tabela 1 – Caracterização química e físico-química do bagaço do coco

Análises	Bagaço do coco verde
Teor de Umidade (%)	$9,24 \pm 0,14$
Teor de Extraíveis (%)	$25,39 \pm 0,24$
Teor de Cinzas (%)	$0,46 \pm 0,02$
Lignina Total (%)	$36,23 \pm 0,12$
Hemicelulose (%)	$23,79 \pm 0,31$
Celulose (%)	$39,09 \pm 0,48$
Pectina (%)	$1,64 \pm 0,06$

O teor de extraíveis do material vegetal, composto por ceras, álcoois, lipídeos, esteroides, ácidos graxos, hidrocarbonetos, flavonoides etc., foi de 25,39%. O restante dos materiais é considerado substâncias não extrativas, pois compõem as cinzas que restam quando a matéria orgânica é queimada. O teor de cinza do bagaço do coco foi de 0,46%. A composição do bagaço do coco de acordo com Rosa *et al.*, (2001) apresentou as seguintes porcentagens de lignina (35 a 45%), celulose (23 a 43%) e de hemicelulose (3 a 12%), comparando com os resultados obtidos com o do autor, confirma-se que o bagaço de coco é material lignocelulósico com potencial para ser utilizado como substrato, apresentando uma porcentagem de celulose de 39,09%, de hemicelulose de 23,79% e o teor de lignina total encontrado foi 36,23%.

### 3.1. Valores das atividades enzimáticas em função da umidade e pH, usando um fungo isolado (*Aspergillus fumigatus*) da casca do coco nas fermentações com o bagaço do coco como substrato.

A Tabela 2 apresenta o planejamento experimental e os resultados obtidos de atividade celulolítica do extrato enzimático produzido pelo fungo isolado por fermentação semi sólida, em função da umidade e do pH, dos quais foram avaliados as atividades enzimáticas CMCase e Avicelase.

Tabela 2 – Planejamento fatorial (2<sup>2</sup>) e resultados das atividades enzimáticas CMCase e Avicelase produzida pelo fungo isolado (*Aspergillus fumigatus*) em fermentação semi sólida.

Experimentos	pH	Umidade(%)	A. E. CMCase (UI/mL)	A. E. Avicelase (UI/mL)
1	3	66	0,282 ± 0,002	0,011 ± 0,002
2	3	75	0,252 ± 0,003	0,013 ± 0,021
3	7	66	0,279 ± 0,006	0,010 ± 0,001
4	7	75	0,267 ± 0,023	0,010 ± 0,021
5*	5	70,5	0,216 ± 0,001	0,018 ± 0,008
6*	5	70,5	0,218 ± 0,003	0,019 ± 0,003
7*	5	70,5	0,224 ± 0,002	0,020 ± 0,004

\*Ponto central

De acordo com o diagrama de Pareto da Figura 1A, para atividade CMCase, apenas a umidade é estatisticamente significativa para um nível de 95% de confiança. O pH e a interação entre as duas variáveis não influenciaram na produção da CMCase. Pode-se, portanto, apontar a umidade como um parâmetro importante para a síntese da enzima. O mesmo não ocorre para o diagrama de Pareto da Figura 1B para atividade de Avicelase. Nenhum dos efeitos nem a interação entre eles foram significativos, mostrando assim que os fatores estudados não influenciam a produção desta enzima dentro das condições estudadas.

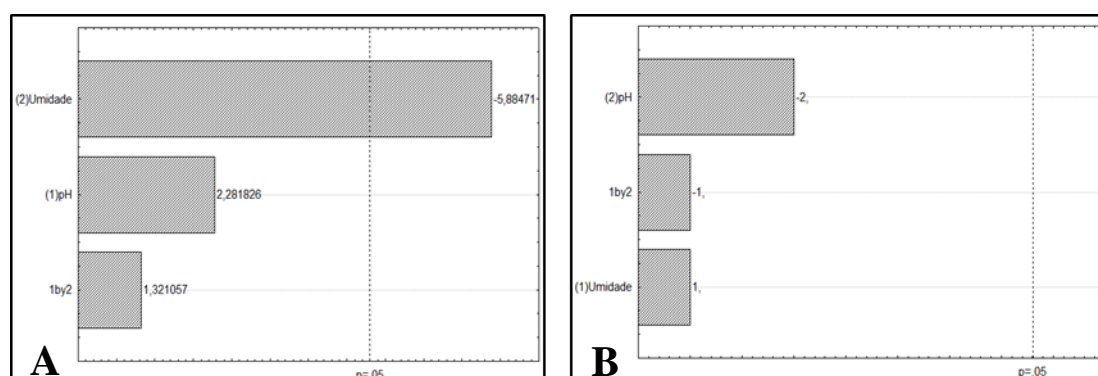


Figura 1 - Gráficos de Pareto do pH, umidade e da interação entre eles, para as atividades da CMCase (A) e Avicelase (B) para o fungo isolado (*Aspergillus fumigatus*) usando o bagaço do coco como substrato.

As fermentações ocorreram com a temperatura fixa (30 °C). As melhores condições apresentadas para a produção da enzima CMCase foram dos experimentos 1 e 3. A umidade de 66% consistiu no melhor resultado para a produção da enzima CMCase, com atividades enzimáticas de 0,282 e 0,279 UI/mL. No caso da atividade da Avicelase os experimentos que apresentaram a melhor produção da enzima foram os 5, 6 e 7, ou seja, os pontos centrais, apresentando os valores de 0,018, 0,019 e 0,020 UI/mL, neste caso a umidade e pH intermediários (70,5% e 5, respectivamente) resultaram em uma maior produção da enzima. Observa-se pouca inclinação da superfície de resposta (Figura 2), indicando que os efeitos não são significativos, para 95% de confiança, para os níveis avaliados.

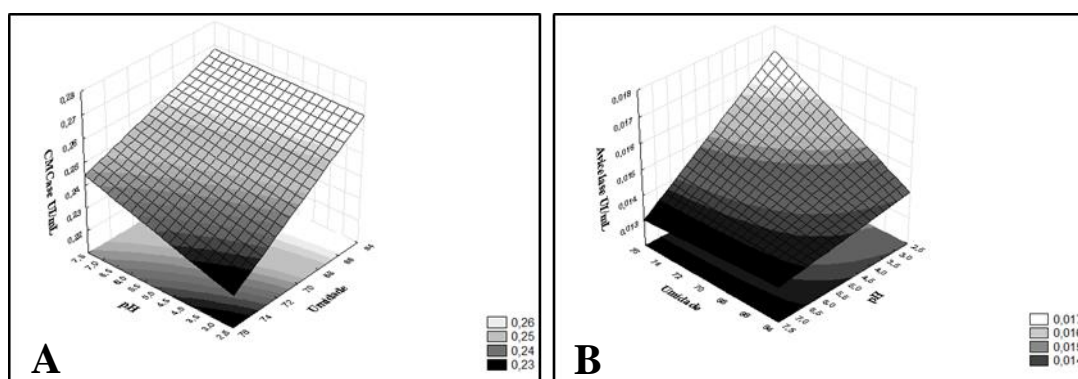


Figura 2 - Superfícies de resposta para a determinação das atividades enzimáticas CMCase (A) e Avicelase (B) para o fungo isolado (*Aspergillus fumigatus*) usando o bagaço do coco como substrato.

### 3.2. Valores das atividades enzimáticas em função da umidade e pH, usando o *Penicillium chrysogenum* nas fermentações com o bagaço do coco como substrato.

A Tabela 3 apresenta o planejamento experimental e os resultados obtidos de atividade celulolítica do extrato enzimático produzido pelo fungo *Penicillium chrysogenum* por fermentação semi-sólida, em função da umidade e do pH, dos quais foram realizados ensaios das atividade enzimáticas CMCase e Xilanase usando o bagaço do coco no tempo de 120 horas e na temperatura de 30 °C.

Tabela 3 – Planejamento fatorial (2<sup>2</sup>) e resultados das atividades enzimáticas CMCase e Xilanase produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum* em fermentação semi sólida.

Experimentos	pH	Umidade(%)	A.E. CMCase (UI/ml)	A.E. Xilanase (UI/ml)
1	3	66	0,067 ± 0,0084	0,541 ± 0,0078
2	3	75	0,029 ± 0,0084	0,588 ± 0,011
3	7	66	0,176 ± 0,011	0,513 ± 0,0035
4	7	75	0,233 ± 0,0084	0,735 ± 0,0014
5*	5	70,5	0,049 ± 0,0021	0,611 ± 0,0021
6*	5	70,5	0,055 ± 0,0007	0,608 ± 0,0056
7*	5	70,5	0,052 ± 0,0028	0,619 ± 0,0014

\*Ponto central



De acordo com o diagrama de Pareto da Figura 3A para atividade da CMCase, o pH e a interação entre os parâmetros é significativa para um nível de 95% de confiança. A umidade não influenciou de maneira significativa para a produção dessa enzima nessas condições. Já para atividade da Xilanase, como é representado na Figura 3B, o pH, a umidade e a interação entre estes influenciaram de maneira significativa para a produção desta enzima.

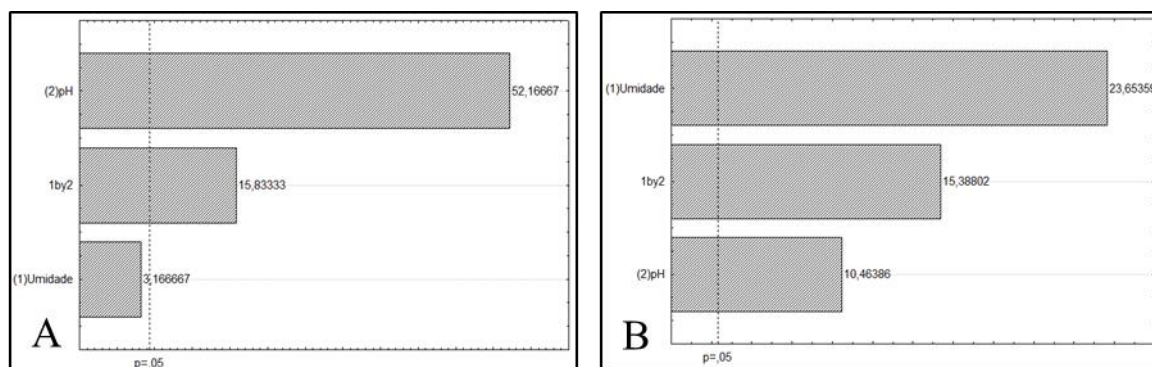


Figura 3 - Gráficos de Pareto do pH, umidade e da interação entre eles, para as atividades da CMCase (A) e Xilanase (B) para o fungo *Penicillium chrysogenum* usando o bagaço do coco como substrato.

Os maiores valores atingidos para as atividades enzimáticas de CMCase e Xilanase foram obtidos em valores de umidade de 75% para o bagaço do coco como substrato. Confirmando novamente que a umidade é um parâmetro importante para a produção das enzimas.

A Figura 4A ilustra o efeito das combinações de variáveis independentes pH e umidade sobre a atividade da enzima CMCase, a atividade enzimática máxima foi de 0,233 UI/mL o valor correspondente ao experimento 4, onde a umidade utilizada foi 75% e com pH 7. Já para a produção da Xilanase (Figura 8), a atividade enzimática máxima foi de 0,735 UI/mL os valores correspondente ao experimento 4, onde a umidade utilizada foi 75% e com pH 7.

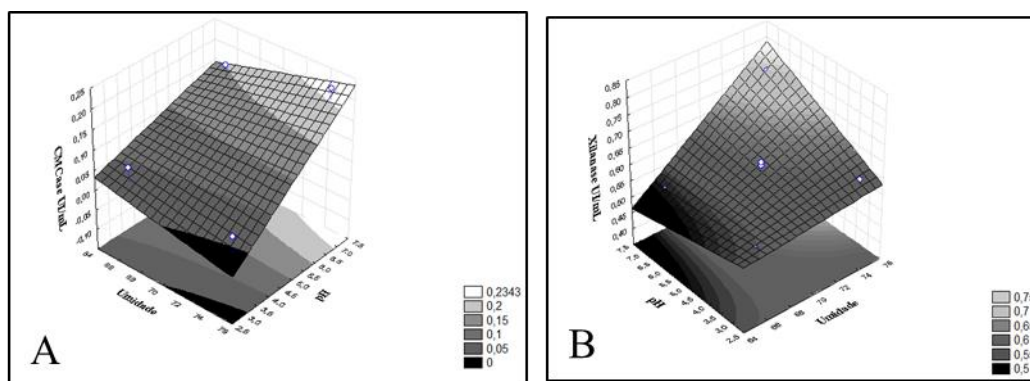


Figura 4 - Superfícies de resposta para a determinação das atividades enzimáticas CMCase (A) e Avicelase (B) para o fungo *Penicillium chrysogenum* usando o bagaço do coco como substrato.

## 4. CONCLUSÕES

A caracterização química e físico-química do resíduo bagaço do coco indicou seu potencial como substrato para produção de enzimas. O fungo isolado (*Aspergillus fumigatus*) apresentou potencial para a produção das enzimas CMCase e Avicelase, já o fungo *Penicillium chrysogenum* apresentou atividades enzimáticas CMCase e Xilanase utilizando o bagaço do coco como substrato no tempo de 120 horas e na temperatura de 30 °C.

## 5. REFERÊNCIAS

- BRAGA, R. M., *et al.* Avaliação da produção de celulase por cepas de *Fusarium*. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 17., 2009, Natal. Anais.Natal, 2009.
- COELHO, M. A. Z. *et al.* Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. *Boletim Ceppa*, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.
- PITARELO, A. P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. 2007, 142f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- RANGANA, S. Manual of analysis of fruits and vegetable products. New Delhi: Tata McGraw-Hill, 1979. 634p.
- ROCHA, C.P. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido. 2010. 136f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
- ROSA, M. de F.; SEIXAS, F. J de S.; MONTENEGRO, A.A. T.; ABREU, F. A. P de.; CORREIA, D.; ARAÚJO, F. B.; NORÕES, E.R. de V. Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola. *Comunicado Técnico Embrapa Agroindústria Tropical*, N 54, p.1-6, maio 2001.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 2011.
- VASCONCELOS, S. M. Pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com ácido fosfórico diluído para aplicação em biorrefinarias. 2012. 184f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.