

PRODUÇÃO DE CELULASES POR *PENICILLIUM SP.*

J. X. LACERDA¹ e L. M. PINOTTI¹

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Engenharias e Tecnologia
E-mail para contato: pinotti2008@hotmail.com

RESUMO – O interesse na produção de celulases está relacionado com seu potencial tecnológico na produção de bioetanol, a partir de rejeitos industriais, como exemplo a indústria sucroalcooleira. Entretanto, o custo das enzimas muitas vezes inviabiliza o seu emprego industrial, tornando fundamental pesquisas que reduzam seu custo no processo. Nesse contexto, este trabalho objetiva estudar a produção do complexo enzimático celulolítico, empregando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. Será utilizado o fungo *Penicillium sp.*, empregando fermentação submersa, sendo estudadas a temperatura de cultivo (28, 33 e 38°C) e a concentração de bagaço (0,5; 1,6 e 2,7%), através de um planejamento fatorial (3²), para bagaço de cana *in natura*, tratado com ácido e base e tratado com peróxido de hidrogênio. Para os diferentes bagaços utilizados verificou-se que a temperatura e a concentração do bagaço interferiram na produção enzimática. A atividade enzimática variou nos ensaios entre 0,121 UI/mL_{extrato} e 0,491 UI/mL_{extrato}, sendo o melhor resultado obtido no ensaio a 38°C e utilizando 2,7% de bagaço de cana tratado com ácido e base.

1. INTRODUÇÃO

A produção de açúcar e álcool a partir de cana-de-açúcar são processos consagrados no Brasil. Segundo a Conab (2010), estima-se que na safra de 2009/10 foram produzidos mais de 604 milhões de toneladas de cana. Embora sejam processos muito utilizados, toneladas de fontes lignocelulósicas são produzidas anualmente sem nenhum destino ou tratamento adequado. Esse resíduo pode ser aproveitado como matéria-prima para produção de bioetanol através de processos enzimáticos, físico-químicos e microbiológicos (HAHN-HAGERDAL et al., 2006).

Existe, porém dificuldade na conversão dos materiais lignocelulósicos em insumos químicos aproveitáveis, a qual é atribuída às características químicas e morfológicas do mesmo (MILÉO, 2011). Uma vez que a conversão da celulose em açúcares redutores fermentáveis é de fundamental importância para a utilização bem sucedida de materiais celulósicos como fontes renováveis de energia, o estudo da aplicação da hidrólise enzimática torna-se interessante. Esses açúcares podem então ser utilizados posteriormente como substrato para a produção de combustíveis líquidos, alimentos e outros produtos químicos de interesse (FUKUDA et al, 2004).

As celulases são enzimas que hidrolisam a ligação glicosídica entre duas ou mais unidades de glicose ou entre um carboidrato e uma porção não carboidrato produzindo celobiose e/ou glicose. O sistema celulolítico é composto por três classes de enzimas: endo-β-

1,4-D-glucanases (EC 3.2.1.4); exo- β -1,4-D-glucanases (EC 3.2.1.91); e β -glucosidades (EC 3.2.1.21) (STOLP, 1988).

Segundo Zeng et al. (2006), cerca de 40% do custo total do processo pode ser devido ao custo da celulase, o que torna necessário a pesquisa e o desenvolvimento de processos tecnológicos economicamente viáveis para a produção enzimática. Pesquisas em busca de microrganismos capazes de produzir a celulase tornam-se, então, de fundamental importância, tendo em vista sua aplicabilidade industrial. Fungos filamentosos vêm sendo particularmente estudados por sua capacidade de produzir celulases (MAGALHÃES e MILAGRES, 2008).

Diante deste cenário este trabalho objetivou estudar a produção de celulases pelo fungo filamentoso *Penicillium sp.* utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. Investigou-se o efeito da temperatura e da concentração da fonte de carbono para bagaço de cana-de-açúcar tratado por diferentes métodos utilizando a técnica de planejamento fatorial de experimentos.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção e Propagação do Microrganismo

O *Penicillium sp.* foi isolado e cedido pelo grupo de pesquisa LABSAN/DEA/UFES. O microrganismo foi mantido em ágar-slant e congelado em solução de glicerol 20% (-80°C). A propagação dos esporos foi realizada em um período de 5 dias a 28°C em meio de PDA 3,9% (potato dextrose agar).

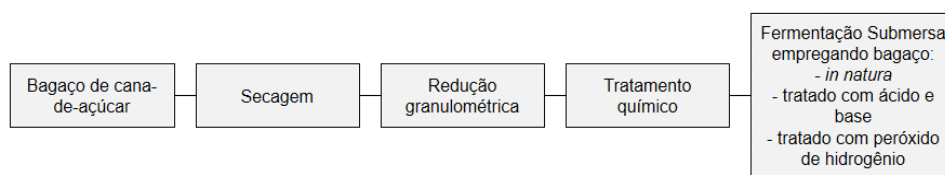
2.2. Obtenção do Inóculo

O fungo foi cultivado em meio de PDA 3,9% a 28°C. O tempo de inóculo foi estudado e para isso foram retiradas amostras a cada 24 horas e analisada a concentração de esporos. Para isso os esporos foram raspados com 10mL de twen80 (0,1% v/v) e contados em câmara de Neubauer.

2.3. Produção Enzimática

Para a produção enzimática foram utilizados bagaço de cana *in natura* e bagaço de cana pré-tratado segundo dois diferentes métodos: empregando peróxido de hidrogênio e empregando ácido e base. O bagaço utilizado foi previamente seco e peneirado até granulometria entre 0,8 e 2,0 mm de diâmetro. A Figura 1 a seguir expõe uma representação esquemática do procedimento realizado.

Figura 1 – Fluxograma do procedimento de fermentação submersa.



Pré-tratamento com uso de peróxido de hidrogênio: O pré-tratamento do bagaço de cana foi realizado de acordo com metodologia descrita por Nunes *et al.* (2011). Para tanto foram utilizados 15g de bagaço para 600mL de solução contendo peróxido de hidrogênio 7,3% (v/v). O pH do meio foi ajustado para 11,5 através da adição de NaOH 5M. O tempo de contato foi de 1 hora, mantendo-se o sistema sob agitação e com temperatura controlada a 25°C. Após esse tempo, o bagaço foi lavado com uso de água por 12 vezes sucessivas e levado para estufa a 45°C por 48 horas.

Pré-tratamento com uso de ácido e base: O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado de acordo com metodologia descrita por Carli et al. (2011). O bagaço foi inicialmente submetido a uma solução 1% (m/v) de ácido sulfúrico, na proporção de 1,0L para 50g de bagaço por 30min a 120°C. Em seguida, o material foi filtrado e lavado com água destilada (a quente) até pH neutro. Em seguida realizou-se o tratamento alcalino, sendo empregado solução de NaOH 7% (m/v) por 30min a 120°C, na mesma proporção do ácido. Em seguida foi realizada filtração e lavagem do material a quente até pH neutro. A amostra foi levada a estufa por 48h a 45°C.

Fermentação submersa: O bagaço de cana foi adicionado em frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de solução salina de Mandels concentrada (Mandels, 1957). O pH foi ajustado para 5,3 e, em seguida, os frascos foram autoclavados a 121°C por 20 minutos e, após resfriamento, inoculados com 1mL de inóculo líquido até concentração de 10^7 esporos/mL. Foi estudada a concentração de bagaço de cana adicionado (0,5, 1,6, e 2,7%) e o efeito da temperatura de cultivo (28, 33 e 38°C) para bagaço tratado por diferentes métodos com tempo de cultivo de 120 horas. Após a fermentação as amostras foram centrifugadas a 6.000g por 30 minutos, sendo retirado o sobrenadante para realização da análise enzimática. Para a realização desses experimentos utilizou-se planejamento estatístico fatorial do tipo 3^2 com 2 pontos centrais, totalizando 11 experimentos para cada tipo de tratamento.

2.4. Determinação da Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi determinada incubando-se 5mL do extrato enzimático bruto com 5mL de solução de CMC a 2% em solução tampão de citrato de sódio (pH 4,8) a 50°C por 30 minutos, retirando-se 1mL do sobrenadante a cada 5 min e inserindo em tubo contendo previamente 2mL de DNS (ácido dinitrosalicílico) para estanque da reação. A atividade celulolítica foi determinada pela dosagem de açúcares redutores formados utilizando-se o método espectrofotométrico do DNS, no qual a leitura espectrofotométrica ocorre em 540nm, segundo metodologia descrita por Miller (1959). Uma unidade de celulase (U) foi considerada como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 μ mol de açúcar redutor por 1 mL por minuto.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cinética de Crescimento do *Penicillium sp.*

O estudo da cinética de crescimento do *Penicillium sp.* foi realizado a 28°C com contagem de esporos a cada 24h. O fungo *Penicillium sp.* atingiu uma fase estacionária de crescimento entre o tempo de 96h e 144h, dessa forma o tempo de 120h foi selecionado para realização do inóculo com o fungo.

3.2. Produção Enzimática

Os resultados de produção enzimática a partir do fungo *Penicillium sp.*, com bagaço de cana-de-açúcar usado como fonte de carbono, são apresentados na Tabela 1:

Tabela 1 – Resultados obtidos nas fermentações utilizando o microrganismo *Penicillium sp* para o tempo de cultivo de 120h.

Ensaio	Concentração de bagaço (%)	Temperatura de cultivo (°C)	Atividade Enzimática (UI/mL _{extrato})		
			Bagaço <i>in natura</i>	Bagaço tratado com peróxido	Bagaço tratado com ácido e base
1	0,5	28	0,121	0,136	0,127
2	1,6	28	0,125	0,230	0,215
3	2,7	28	0,172	0,322	0,351
4	0,5	33	0,101	0,167	0,124
5	1,6	33	0,240	0,201	0,299
6	2,7	33	0,312	0,307	0,389
7	0,5	38	0,289	0,254	0,256
8	1,6	38	0,351	0,349	0,330
9	2,7	38	0,349	0,450	0,491
10	1,6	33	0,249	0,198	0,287
11	1,6	33	0,241	0,196	0,301

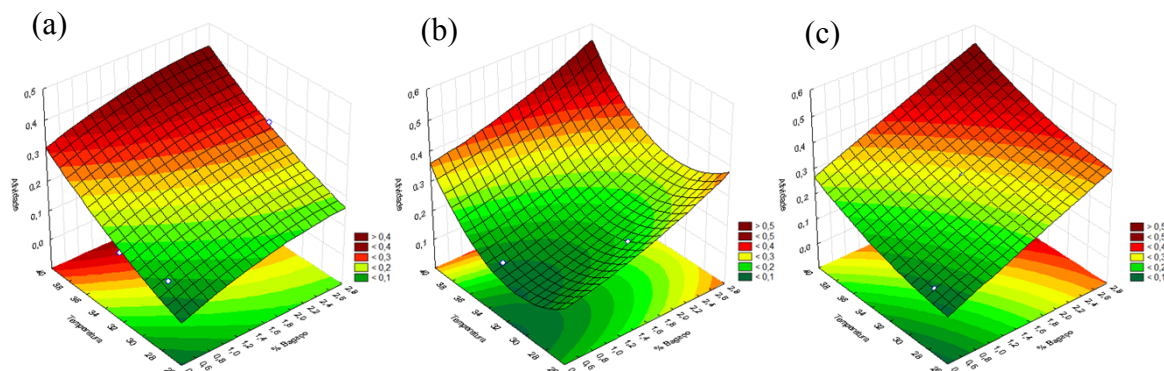
Os resultados obtidos foram tratados no *software* Statistica® 7 com nível de significância de 95%. Os dados referentes ao efeito e ao p-valor, para cada um dos tratamentos, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Estimativas de efeitos extraídas do *software* Statistica® 7.

Fator	Bagaço <i>in natura</i>		Bagaço tratado com peróxido		Bagaço tratado com ácido e base	
	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
% Bagaço de cana (L)	0,10733	0,017094	0,17400	0,000018	0,24133	0,000028
% Bagaço de cana (Q)	0,02021	0,454477	-0,01884	0,134623	0,00079	0,962994
Temperatura (L)	0,19033	0,001158	0,12167	0,000137	0,12800	0,000936
Temperatura (Q)	-0,01129	0,670832	-0,07134	0,000608	-0,01521	0,387368

Pela análise da Tabela 3, os fatores % Bagaço de cana (L) e Temperatura (L) foram significativos para os três tipos de tratamento, o que indica que esses fatores exercem influência na fermentação submersa para produção de celulases. Para o bagaço tratado com peróxido, o fator quadrático da temperatura também foi significativo. A influência da temperatura e da concentração de bagaço para cada tratamento é apresentada graficamente na Figura 2:

Figura 2 – Gráfico de superfície para análise da atividade enzimática em função da temperatura e do percentual de bagaço de cana-de-açúcar (a) *in natura*, (b) tratado com peróxido de hidrogênio e (c) tratado com ácido e base.



Buscou-se encontrar os níveis das variáveis independentes que maximizam a resposta estimada. Contudo, para o estudo em questão não foi possível localizar ponto que maximize a produção de celulases para nenhum dos tratamentos, sendo possível observar que, nos três casos, maiores temperaturas de cultivo associadas a maiores concentrações de bagaço resultam em uma maior produção enzimática.

4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o fungo *Penicillium sp.* produz celulase através de fermentação submersa com uso de bagaço de cana-de-açúcar como única fonte de carbono. A temperatura de cultivo e a concentração do bagaço de cana influenciaram a produção de celulases para todas as amostras de bagaço utilizadas (com e sem tratamento prévio), sendo, portanto, variáveis que requerem estudos posteriores.

5. REFERÊNCIAS

CARLI, C.M., CRUZ, A.J.C., SILVA, R.G., Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com alta carga de sólidos para produção de bioetanol. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul, RS, 2011.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. (2010), Avaliação da Safra Agrícola de Cana-de-açúcar. Brasília: Conab.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDIA, S. (2009), Bioenergy: sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell. Biocatalist Biochemistry Engineering Journal, v. 44, p.2–12.

HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDEN, G.; ZACCHI, G. (2006). Bioethanol the fuel of tomorrow from residues today. Trends in Biotechnology . v. 24, p. 549-556.

MAGALHÃES, P.O; MILAGRES, A.M.F. (2008), Importância das celulases produzidas por basidiomicetos causadores de podridão branca na biodegradação de lignocelulósicos. Microbiologia em foco . Ano 2, nº4, p 4-11.

MANDELS, M., REESE, E. T. Induction of cellulose in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. Biology Branch, Pioneering Research Division, U.S. Army Quartermaster Research and Development Center Natick, Massachusetts, 1956.

MILÉO, P.C. Aplicações da cellulose de palha de cana-de-açúcar: obtenção de derivados partindo da celulose branqueada e de biocompósitos com poliuretana obtida a partir de óleo de mamona (*Ricinus communis* L.). Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2011.

MILLER, G.L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry , v. 31, n.3, p.426-428.

NUNES, J.M.N., CARVALHO, P.I.N, PINHEIRO, I.R., Estudo da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com peróxido de hidrogênio, XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul, RS, 2011.

STOLP, H., Microbial ecology : organisms, habitats, activities. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1988.

ZENG, G.M.; SHI, J.G.; YUAN, X.Z.; LIU, J.; ZHANG, Z.B.; HUANG, G.H.; LI, J.B.; XI, B.D.; LIU, H.L. (2006), Effects of Tween 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of *Penicillium simplicissimum* isolated from compost. Enzyme and Microbial Technology , v. 39, p.1451-1456.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UFES e à FAPES pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.