

PRODUÇÃO DE CELULASE POR *PENICILLIUM SP.* UTILIZANDO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

N. A. DARONCH¹, J. ZENI¹, L. N. SALAZAR¹, G. TONIAZZO¹, R. L. CANSIAN¹, N. L. D. NYARI¹, M. M. SILVEIRA²

¹Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Departamento de Engenharia de Alimentos

²Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia
E-mail para contato: naionaradaronch@hotmail.com

RESUMO – Neste trabalho objetivou-se otimizar a produção de celulase a partir do micro-organismo *Penicillium sp.* em termos de concentração de esporos e umidade utilizando planejamento estatístico de experimentos. Para a determinação dos valores de concentração de esporos e umidade foi realizado um planejamento fatorial completo 2², onde a concentração de esporos variou de 4,6Log a 7,4Log e umidade de 34% a 76%. A determinação da atividade enzimática da celulase total foi realizada adicionando-se 0,5mL de enzima a 1,0 mL de tampão citrato 0,05M pH 4,9 e uma fita de 1 × 6 cm de papel de filtro Whatman nº 1 como substrato padrão segundo metodologia de Mandels et al. (1976). De acordo com os resultados obtidos no planejamento estatístico experimental, a enzima celulase apresentou a maior atividade enzimática (1,19 U/g), com concentração de esporos 5Log e umidade de 70%.

1. INTRODUÇÃO

O forte da economia brasileira é a agricultura com a grande produção de grãos. Anualmente, muitos resíduos são gerados destas produções e consequentemente descartados. Os resíduos vegetais constituem o maior recurso natural renovável.

O uso de enzimas microbianas para a hidrólise de polissacarídeos em materiais lignocelulósicos é amplamente pesquisado por causa da importância dos produtos de hidrólise (açúcares solúveis) em processos de fermentação para a produção de combustíveis, produtos químicos e de alimentos e forragens.

Atualmente, a produção de celulasas está em terceiro lugar na produção de enzimas industriais comercializadas no mundo. No entanto, devido às suas aplicações difundidas na crescente indústria de biocombustíveis, o mercado de celulasas deverá expandir-se para se tornar a maior enzima com volume industrial. Com exceção dos biocombustíveis, elas são amplamente utilizadas na indústria química, têxtil, papel e celulose, detergente, extração de suco, agricultura e alimentação animal, entre outros (DHILLON, G.S. et al, 2012).

O crescente aumento das pesquisas na área da enzimologia estimula a descoberta de novos micro-organismos a fim de aumentar a produtividade, a especificidade e a estabilidade das enzimas (Geok *et al.*, 2003).

Com base no que foi abordado anteriormente, o objetivo geral deste trabalho foi a otimização da produção da enzima celulase em fermentação em estado sólido por *Penicillium sp.*, empregando substrato agroindustrial de casca de soja, variando as concentrações de esporos e a umidade do substrato, usando planejamento estatístico de experimentos.

2. METODOLOGIA

2.1 Produção de celulase

A produção da enzima celulase foi realizada através do crescimento do fungo identificado como *Penicillium sp.* em 10g de substrato de casca de soja, com a umidade regulada no substrato com variações de 34U%, 40U%, 55U%, 70U% e 76U% e variações de concentração de esporos 4,6Log, 5Log, 6Log, 7Log e 7,4Log. A germinadora se manteve com umidade 100% e temperatura de 30°C.

2.1.1 Substrato Agroindustrial

O resíduo agroindustrial utilizado foi a casca de soja cedida Empresa Olfar, Erechim/RS.

2.1.2. Efeito da concentração de esporos

Para avaliar se a quantidade de esporos apresentava algum efeito na produção de enzima celulase foram realizados estudos em diferentes concentrações de esporos de *Penicillium sp.* de 4×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 e $2,5 \times 10^7$ esporos por grama de meio úmido e tempos de bioprodução de 7 e 14 dias, respectivamente.

O teor de umidade é um fator determinante no crescimento dos micro-organismos, portanto foi analisada a influência do teor de umidade na produção enzimática de celulase em diferentes tempos de bioprodução (7 e 14 dias). No meio de bioprodução composto por casca de soja foi ajustada a umidade a 34, 40, 55, 70 e 76 % (b.u.). A quantidade volumétrica de água a ser adicionada foi dimensionada através de cálculo de balanço de massa, descontando a umidade inicial da mistura e a alíquota de suspensão de esporos.

Como estratégia foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 (Delineamento Central Composto Rotacional - DCCR), incluindo 4 ensaios fatoriais, 4 ensaios nos pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. As variáveis independentes foram: concentração de esporos (X_1), e umidade (X_2). A Tabela 1 apresenta as variáveis independentes e seus respectivos níveis. A variável dependente (resposta) foi a medida da atividade enzimática (U/g) da FPase.

Tabela 1: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2² para a extração da FPase.

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0*	+1	+1,41
[] esporos (Log)	X ₁	4,6	5	6	7	7,4
Umidade (%)	X ₂	34	40	55	70	76

* Triplicata do ponto central

2.1.3 Extração Enzimática

Após cada tempo de fermentação (7 e 14 dias) 10g de meio fermentado foi transferido para *elernmeyer* de 250mL e diluído em solução de citrato de sódio 0,2M pH 4,9 na razão 1:15 (3,33g de substrato fermentado para 50 mL de tampão). Os frascos foram colocados em um agitador orbital mecânico (Nova Ética, incubadora 430 RDB) por 30 minutos a 50°C e 100 rpm.

2.1.4 Método do Papel Filtro (FPase)

Técnicas para medir a atividade de celulase total são necessárias para comparar a eficácia da atividade da celulase entre micro-organismos ou suas enzimas secretadas. O FPA é o método-chave para análise da atividade celulase total. Em 1976, o FPA foi desenvolvido por Mandels *et al.* (1976) e se tornou amplamente utilizado desde 1984, quando a Comissão de Biotecnologia da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) propôs uma série de procedimentos padrão para a medida da atividade da celulase. Tradicionalmente, o FPA usa uma fita de 1 × 6 cm de papel de filtro Whatman nº 1 como substrato padrão, pois é barato e de fácil disponibilidade (COWARD-KELLY *et al.*, 2003).

A Unidade Internacional (UI) de atividade de papel de filtro (FPase) (FPU) é definida como um micromol de glicose equivalente liberada por minuto, em filtrado de cultura em condições de ensaio. As condições de ensaio referem-se às condições como pH e temperatura do ensaio e dependem em grande parte sobre as propriedades da enzima, variando muito entre celulasas e micro-organismos. Em seguida, a liberação de açúcares redutores totais (ART) é medida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

2.1.5 Análise estatística

Os resultados foram tratados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA) e a comparação entre as diferenças das médias, com o Software *Statistica* versão 8.0, a nível de significância de 95 %.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a FPase com 7 dias de fermentação a máxima atividade foi de 1,19U/g (Ensaio 3, Tabela 2), onde o meio de cultivo apresentava as concentrações de 10 g de casca de soja com a concentração de esporos igual a 5Log e umidade igual a 70%. Já para a FPase com 14 dias de fermentação a máxima atividade foi de 0,94U/g (Ensaio 8, Tabela 2), onde o meio de cultivo apresentava as concentrações de 10 g de casca de soja com a concentração de esporos igual a 5Log e umidade igual a 70%.

Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 valores reais e codificados e respostas em produção das enzimas FPase.

	<i>X1 (conc. de esporos)</i>	<i>X2 (U%)</i>	FPase (U/g) 7 dias	FPase (U/g) 14 dias
1	-1 (1.10^5)	-1 (40)	0,18	0,33
2	1 (1.10^7)	-1 (40)	0,17	0,17
3	-1 (1.10^5)	1 (70)	1,185	0,73
4	1 (1.10^7)	1 (70)	0,905	0,52
5	-1,41 (4.10^4)	0 (55)	0,37	0,33
6	1,41 ($2,5.10^7$)	0 (55)	0,37	0,32
7	0 (1.10^6)	-1,41 (34)	0,1	0,17
8	0 (1.10^6)	1,41 (76)	1,055	0,935
9	0 (1.10^6)	0 (55)	0,71	0,7
10	0 (1.10^6)	0 (55)	0,81	0,72
11	0 (1.10^6)	0 (55)	0,85	0,72

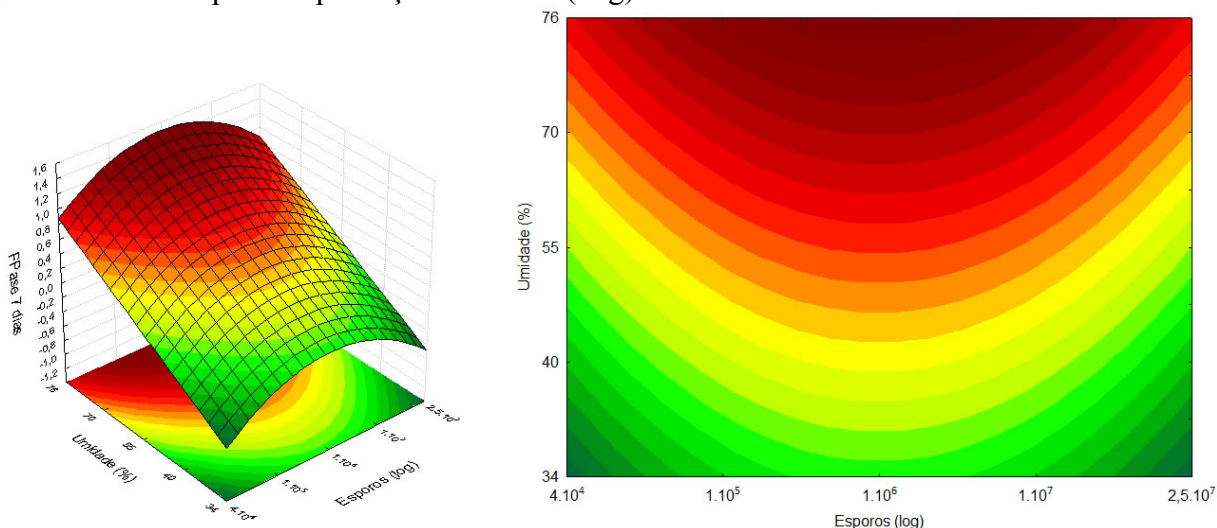
X_1 = Concentração de esporos (Log); X_2 = Umidade (%). Variáveis independentes fixas: 30°C.

A Equação 1 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da FPase em função da concentração e esporos e umidade, dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, com um coeficiente de correlação de 0,97 e F calculado 9,70 vezes maiores que o valor do F tabelado. Os quais permitiram a construção de superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 01.2 demonstrando que a máxima produção de FPase em 7 dias se dará com concentração de 5Log e 70% de umidade, referente ao ensaio 3.

$$FPase = 0,79 - 0,17. X_1^2 + 0,39.X_2 \quad (X)$$

Onde, FPase = Atividade de FPase (U/g); X_1 = Concentração de esporos (Log), X_2 = Umidade (%).

Figura 01.3: Superfícies de resposta e curvas de contorno em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de FPase (U/g).

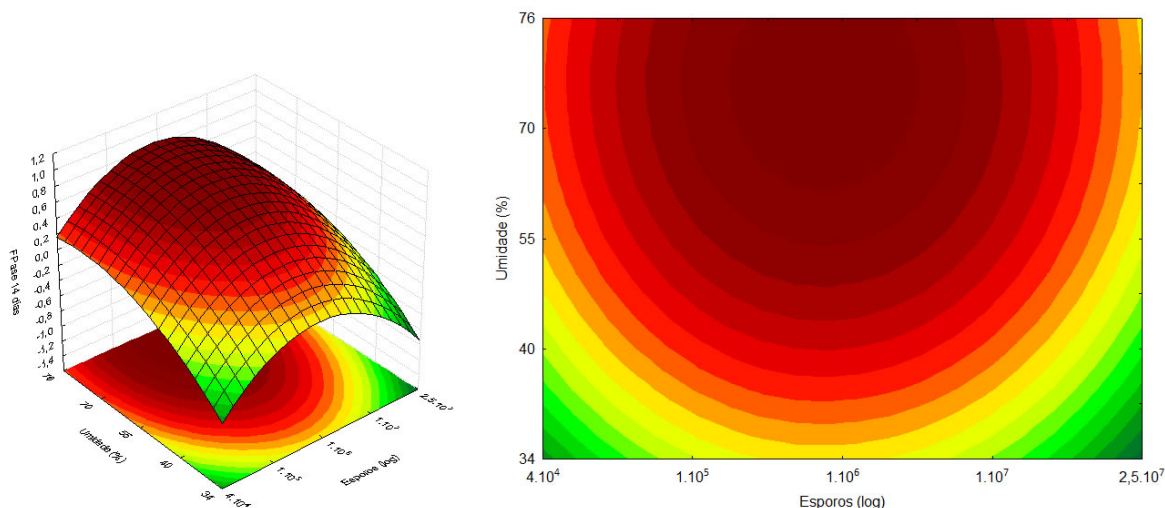


A Equação 2 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da FPase de 14 dias em função da concentração de esporos e umidade, dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, com um coeficiente de correlação de 0,98 e F calculado 7,81 vezes maiores que o valor do F tabelado. Os quais permitiram a construção de superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 02.3 demonstrando que a máxima produção de FPase em 14 dias se dará com concentração de 6Log e 76% de umidade, referente ao ensaio 8.

$$FPase = 0,71 - 0,05 \cdot X_1 - 0,20 \cdot X_1^2 + 0,23 \cdot X_2 - 0,08 \cdot X_2^2 \quad (X)$$

Onde, FPase = Atividade de FPase (U/g); X_1 = Concentração de esporos (Log), X_2 = Umidade (%).

Figura 01.4: Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de FPase (U/g) em 14 dias.



4. CONCLUSÃO

Neste trabalho observou-se que a concentração de esporos não apresenta diferença significativa quando comparado no mesmo tempo de fermentação, porém pôde-se observar que o teor de umidade são variáveis importantes na produção da enzima FPase. O melhor rendimento na produção da FPase foi verificado quando utilizado casca de soja a uma concentração de esporos de 5×10^5 /10 gramas de bioproduto no tempo de 7 dias (1,19U/g) e o teor de umidade de 70%, quando comparado ao tempo de 14 dias (0,94 U/g) no valor da atividade enzimática. Portanto, o sucesso da produção comercial de enzimas depende dos parâmetros de processo, visando à minimização dos custos do meio de cultura utilizado na fermentação.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Uri Erechim, FAPERGS, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

COWARD-KELLY, G.; AIELLO-MAZZARI, C.; KIM, S.; GRANDA, C.; HOLTZAPPLE, M., Suggested improvements to the standard filter paper assay used to measure cellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, p. 745-749, 2003.

DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; KAUR, S.; METAHNI, S. M'HAMDI, N. Lactoserum as a moistening medium and crude inducer for fungal cellulase and hemicellulase induction through solid-state fermentation of apple pomace. **Biomass and Bioenergy**, v.41, p. 165-174, 2012.

GEOK L.P. et al. Source: **Biochemical Engineering Journal**, Volume 13, Number 1, January , pp. 73-77(5) 2003.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C., Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnology & Bioengineering Symposium** , v. 21-33, 1976.

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