



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Padronização da Produção de Celulases pelo Fungo Filamentoso *Aspergillus* TA3.7

Tarcísio Michael Ferreira Rosa¹, Adriele Mercia Alves Santos¹, Barbhara Mota
Marinho¹ e Vivian Machado Benassi¹

¹Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) *campus* Janaúba
Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia (IECT), 39440-000 Janaúba - MG
E-mail para contato: tarcisio.michael@yahoo.com.br

RESUMO

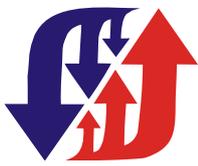
*Atualmente os processos biotecnológicos estão em destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, principalmente com a preocupação sobre a consequência de uma escassez mundial de combustíveis fósseis, sendo as celulases de grande aplicação industrial e valor econômico. O trabalho objetivou analisar as atividades celulolíticas dos fungos filamentosos isolados no Norte de Minas Gerais, sendo cultivados em meio CP com diferentes soluções de sais, durante 4 dias, à 30°C, sendo determinadas as atividades da endoglucanase CMCase, Filter Paperase (FPase) e Avicelase empregando-se o carboximetilcelulase (CMC), o papel filtro e o AVICEL como substrato, respectivamente, em tampão succinato de sódio 100 mM, pH 4,8, a 60°C. Diante disso, pode-se observar uma melhor produção celulolítica com a adição dos sais, sendo um bom indutor na produção celulolítica, verificando-se uma alta produção de açúcares fermentecíveis a partir dos substratos, demonstrando que as enzimas produzidas por *Aspergillus* 3.7 possui potencial biotecnológico.*

Palavras-chave: Enzimas, Celulase, Fungos Filamentosos, Biotecnologia.

INTRODUÇÃO

A grande preocupação com a escassez dos combustíveis fósseis requer uma transição de fontes de carbono não-renováveis para biorecursos renováveis como a lignocelulose (DESWAL *et al.*, 2011). Independentemente da fonte lignocelulolítica, os materiais consistem em três principais polímeros: celulose, um homopolímero de glicose; hemicelulose, um heteropolímero de pentoses e hexoses; e lignina, um polímero amorfo de fenil unidades de propanoide (BASSO *et al.*, 2010).

A indústria agrícola produz milhões de toneladas de resíduos sólidos e líquidos, que contém valiosas substâncias naturais em especial as fibras. Nos últimos anos, houve um crescente interesse no desenvolvimento de novos métodos para aproveitar-se dos nutrientes encontrados nos resíduos (LAUFENBERG *et al.*, 2004). A utilização dos fungos filamentosos para a biotecnologia tem-se pela capacidade de degradação desses resíduos naturais e por sintetizar grandes grupos de enzimas como a celulase.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Dessa forma, esse trabalho objetivou padronizar o cultivo do fungo filamentososo *Aspergillus* TA3.7 para uma maior produção enzimática, sendo analisados o meio de cultura e a solução de sais do meio.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletou-se amostra da palha da cana-de-açúcar na usina de álcool e açúcar São Judas Tadeu-SADA Bio-Energia e Agricultura LTDA, na cidade de Jaíba no Norte de Minas Gerais, para isolamento de fungos filamentosos, onde isolaram seis micro-organismos, que foram caracterizados macroscopicamente e microscopicamente.

Os seis fungos isolados foram cultivados em meio de cultura líquido CP (PEIXOTO *et al.*, 2003) com fonte de carbono farelo de trigo, durante quatro dias, a 30°C, de forma estacionária. Após o tempo de crescimento, determinou a atividade das enzimas CMCase, Fpase e Avicelase, observando que dentre os micro-organismos isolados, o *Aspergillus* TA3.7 mostrou-se produzir as celulases com maior atividade, sendo padronizado esse fungo.

Em seguida, testaram-se diferentes meios de cultura líquidos, sendo eles: SR modificado (RIZZATTI *et al.*, 2001), Czapeck modificado (WISEMAM, 1975), CP (PEIXOTO *et al.*, 2003) e Khanna modificado (KHANNA, 1995), utilizando-se o farelo de trigo como fonte de carbono. As culturas foram obtidas mediante inóculo de 1,0 mL de solução de esporos em 25 mL de meio de cultivo contidos em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, previamente autoclavados durante 20 minutos a uma pressão de 1,5 atm, e temperatura de 120°C. O crescimento ocorreu em estufa bacteriológica, de forma estacionária, a 30°C, por quatro dias.

Em seguida, analisou-se diferentes soluções de sais no meio de cultura CP, sendo essas: (1) os próprios sais do meio CP (0,03 g de KH₂PO₄ e 0,05 g de MgSO₄ . 7 H₂O); (2) solução de sais do meio SR; (3) 0,05 g de Sais Wesson e (4) os sais CP e Wesson acrescidos juntos no meio. Os meios foram mantidos durante quatro dias em estufa bacteriológica, de forma estacionária, a 30°C.

A quantificação da atividade celulolítica foi realizada utilizando-se diferentes substratos, dependendo da atividade enzimática analisada. A atividade da CMCase (endo-1-4-β-D-glucanase) foi realizada utilizando-se o substrato CM-celulose SIGMA 2% em tampão citrato de sódio 100 mM, pH 4,8, enquanto que a atividade da Avicelase (exoglucanase) foi determinada utilizando o Avicel Flucar 1% em tampão citrato de sódio 100 mM pH 4,8. A determinação ocorreu através da formação dos açúcares redutores durante a incubação da enzima com o substrato específico, utilizando-se o reagente DNS (ácido 3',5'-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959), a 55°C. Em relação a atividade da *Filter Paperase* (FPase) utilizou-se Papel Filtro Whatman N° 1 (1,0 x 6,0 cm) como substrato de acordo com a metodologia de Ghose (1987). O método foi previamente padronizado por uma curva padrão de glicose (0,1 a 1,0 mg/mL), sendo a unidade de atividade (U) definida como a quantidade de enzima que hidrolisa um μmol de substrato por minuto, nas condições de ensaio. A atividade total (U total) = μmol/mL x volume do filtrado.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Coletou-se a palha de cana-de-açúcar na usina de álcool e açúcar São Judas Tadeu – SADA Bio-Energia e Agricultura LTDA, Jaíba-MG, e realizou-se o *screening* a partir do



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

material coletado, sendo isolados seis distintos micro-organismos. Após o isolamento, os mesmos foram cultivados em meio CP modificado (PEIXOTO *et al.*, 2003) com farelo de trigo como fonte de carbono, sendo mantidos durante quatro dias, de forma estacionária em estufa, a 30°C, sendo quantificado a enzima FPase.

Pode-se observar que dentre os fungos filamentosos isolados o *Aspergillus* 3.7 mostrou-se potencial produtor da enzima em estudo, obtendo uma média de atividade de, aproximadamente 4,5 U totais, muito superior aos outros micro-organismos que não mostraram-se como potenciais produtores de celulases .

Selecionado o fungo *Aspergillus* 3.7, objetivou determinar qual o meio de cultura induz uma maior produção enzimática. Então, o micro-organismo foi cultivado em diferentes meios de cultura utilizando o farelo de trigo como fonte de carbono, durante quatro dias, a 30°C, de forma estacionária, em estufa bacteriológica. A partir da Tabela 1, pode-se afirmar que os meios CP modificado, Khanna modificado e SR tiveram uma indução enzimática semelhante quando se tratou da enzima FPase, com uma média de 0,987 U totais, entretanto, tiveram uma diferença significativa quanto a produção da Avicelase, observando que em relação a essa enzima o meio CP modificado mostrou-se como um melhor indutor (0,81 U totais). Dessa forma, padronizou-se esse meio para cultivo do *Aspergillus* 3.7.

Tabela 1 – Determinação do meio de cultura para uma maior produção celulolítica pelo *Aspergillus* TA3.7

Meio de Cultivo	FPase (U totais)	CMCase (U totais)	Avicelase (U totais)
Czapeck	0,78	9,06	0,67
CP modificado	0,95	9,80	0,81
Khanna modificado	1,11	9,40	0,45
SR	0,90	9,90	0,54

Objetivando analisar a atividade da celulase em meios de cultura com diferentes soluções de sais, o fungo foi cultivado em meio CP com diferentes sais: (1) os próprios sais do meio CP (0,03 g de KH₂PO₄ e 0,05 g de MgSO₄ . 7 H₂O); (2) solução de sais do meio SR; (3) 0,05 g de Sais Wesson e (4) os sais CP e Wesson acrescidos juntos no meio.

Observando a Tabela 2, pode-se visualizar que a atividade da FPase não teve uma diferença significativa entre os distintos sais componentes do meio CP, entretanto a atividade da CMCase e Avicelase foi semelhante entre as distintas soluções de sais, com exceção da solução de sais CP com uma atividade de 9,90 U totais, e 0,84 U totais, respectivamente. Assim, o meio padronizado foi o CP composto com as soluções de sais Wesson para cultivo do fungo, durante quatro dias, a 30°C, de forma estacionária.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Tabela 2 – Determinação da solução de sais do meio de cultura CP para cultivo do *Aspergillus* TA3.7 e produção celulolítica.

Solução de Sais do Meio	FPase (U totais)	CMCase (U totais)	Avicelase (U totais)
Sais CP + Sais Welson	4,76	14,96	2,09
Sais Welson	5,94	15,21	1,88
Sais SR	4,47	15,25	1,87
Sais CP	4,12	9,90	0,84

CONCLUSÕES

Conclui-se que dos seis fungos filamentosos isolados dois mostraram-se potenciais produtores de celulases, em especial o *Aspergillus* 3.7. Assim como, observou-se que o meio CP com a solução de sais Welson teve uma maior indução da produção enzimática por esse micro-organismo, quando comparado à produção em outros meios, a qual obteve uma excelente hidrólise dos substratos, liberando uma grande quantidade de açúcares passíveis de fermentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASSO, P. B.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. *Pesq. agropec. bras., Brasília*, v.45, n.11, p.1282-1289, 2010.
- DESWAL, D.; KHASA, Y.P.; KUHAD, K.C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 6065 – 6072, 2011.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.* v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- KHANNA, P.; SUNDARI, S.S. & KUMAR, N.J. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 11, p. 242-243, 1995.
- LAUFENBERG, G.; ROSATO, P.; KUNZ, B.; Adding value to vegetable waste: Oil press cakes as substrates for microbial decalactone production. *Europ J Lipid Sci Technol* 106:207–217
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 11, p. 426-428, 1959.
- PEIXOTO, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. *Int Microbiol.* v. 6, p. 269-273, 2003.
- WISEMAN, A. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Ltd John Wiley & Sons, editors. pp. 148, 1975.
- RIZZATTI, A. C. S.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and properties of thermostable extracellular β -xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *J Ind Microbiol biotech.* V 26, p.156-160, 2001