



## **PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Thermomucor indicae-seudaticae* POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Eduardo da Silva Martins<sup>1</sup>

### **Reaproveitamento, Reutilização e Tratamento de Resíduos (sólidos e líquidos)**

#### *Resumo*

As celulases formam um grupo de enzimas com diversas aplicações, como na indústria de detergentes, têxtil, de processamento de papel, de ração animal, de suco de frutas, alimentos e bebidas e biocombustíveis. O presente estudo objetivou avaliar a produção de celulases (endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase) pelo fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae*, por cultivo em estado sólido de diferentes resíduos agroindustriais. Foram utilizados como substratos para a produção da enzima palha de cana-de-açúcar, palha de milho, farelo de trigo e uma mistura dos três substratos (1:1:1 p/p). O cultivo ocorreu por 10 dias, a 45 °C, com amostras retiradas a cada 48 horas. A maior produção de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase ocorreu no farelo de trigo, após 8 e 10 dias de cultivo, respectivamente. O estudo mostrou que o farelo de trigo como substrato proporcionou alta produção da enzima  $\beta$ -glicosidase.

**Palavras-chave:** Endoglucanase;  $\beta$ -glicosidase; Farelo de trigo.

## **I**NTRODUÇÃO

Para a produção de enzimas com aplicação industrial, o cultivo em estado sólido (CES) é um processo que possibilita o uso de resíduos agroindustriais como substratos para o crescimento microbiano, o que agrega valor a estes materiais (ASGHER et al., 2016). A aplicação destes resíduos em bioprocessos tornou-se importante sob o ponto de vista ambiental, reduzindo problemas relacionados ao seu manejo inadequado e consequentes danos ambientais. Além disso, o baixo custo e a grande disponibilidade desses materiais fazem dos mesmos excelentes substratos alternativos para obtenção de produtos utilizados em processos industriais, como as enzimas (PANDEY et al., 2000).

As celulases representam um complexo enzimático, cujas enzimas atuam sinergicamente na transformação da molécula em monômeros e dímeros de glicose, sendo, de maneira geral,

---

<sup>1</sup>Prof. Dr. Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG) unidade Frutal, Departamento de Ciências e da Terra, eduardo.martins@uemg.br.



subdivididas em três classes: endo-1,4-β-D-glicanases ou endoglucanases (que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais); exo-1,4-β-D-glicanases ou celobiohidrolases (responsáveis pela ação nos terminais levando à celobiose); e 1,4-β-D-glicosidades (que hidrolisam a celobiose à glicose) (YOON et al., 2014).

Uma das mais importantes aplicações das enzimas do complexo celulolítico é a hidrólise de biomassas. As matérias-primas de origem lignocelulósica, que contém de 20 a 60% de celulose, podem ser totalmente convertidas em glicose, por ação enzimática. Em etapas seguintes, esse monossacarídeo pode ser utilizado como bloco de construção para a obtenção de uma imensa gama de produtos, que abrange desde biocombustíveis até polímeros (CASTRO et al., 2010).

Diante do exposto, objetiva-se com este trabalho avaliar a produção de celulases pelo fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* com o aproveitamento de diferentes resíduos agroindustriais.

## METODOLOGIA

### *Microorganismo*

Foi utilizada uma linhagem do fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae*, isolado de palha de cana-de-açúcar proveniente de uma usina sucroalcooleira de Frutal/MG. A cultura pura foi mantida em tubos de ensaio contendo meio Agar Sabouraud, no Laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado de Minas Gerais, unidade Frutal.

### *Pré-inóculo e cultivo em estado sólido (CES)*

Para cada cultivo por CES, um pré-inóculo foi feito em frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio nutriente sólido inclinado (Agar Malte 2%). O fungo foi inoculado na superfície deste meio, por estrias, e incubado a 45 °C até completo crescimento (micelial ou esporulação). Após este período, o microrganismo foi suspenso, com auxílio de alça de inoculação, em 150 mL de solução nutriente esterilizada composta por (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (todos a 0,1%). 20 mL desta suspensão (com cerca de 0,7mg de micélio seco/mL) foram utilizados como inóculo para cada recipiente de cultivo contendo 5,0 g de substrato.

O fungo foi cultivado a 45 °C em embalagens de polipropileno (12 x 20 cm) contendo 5,0g dos seguintes substratos: palha de cana-de-açúcar (PC), farelo de trigo (FT), palha de milho (PM), e em uma mistura de destes três materiais (1:1:1 p/p), denominada como MIX. Em cada substrato, foi adicionado a massa micelial junto à solução nutriente (proporcionando uma umidade inicial de cerca de 70%) sendo o pH ajustado para 5,0.

As amostras foram retiradas em intervalos de 48 horas, durante 10 dias. A cada amostra retirada, foram adicionados 80 mL de água destilada, sendo a mistura homogeneizada manualmente e mantida sob agitação em shaker (100 rpm), por 20 minutos. Após este período, o material foi filtrado em disco de tecido nylon, centrifugado a 10000 g por 10 min. e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática.

#### *Determinação das atividades enzimáticas*

A atividade de endoglucanase (CMCase) foi determinada em mistura de reação contendo 0,1 mL da solução enzimática e 0,9 mL de solução de substrato carboximetilcelulose (Sigma) (40,0 g/L), em tampão acetato 0,10 M, pH 5,0. A reação foi mantida a 60°C por 10 minutos e então, interrompida pela adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

Para a determinação da atividade de β-glicosidase, 0,05 mL do extrato enzimático foram adicionados à mistura de 0,25 mL de solução tampão acetato (0,1 M, pH 5,0) e 0,25 mL de 4-nitrofenol-β-D-glicopiranosídeo (4 mM) - Sigma. A reação foi mantida a 60°C, por 10 minutos, e então interrompida com a adição de 2,0 mL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2M). O nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de nitrofenol por minuto de reação utilizando reta padrão obtida com solução de nitrofenol em variadas concentrações.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O substrato que proporcionou maior produção das enzimas foi o farelo de trigo, com as maiores atividades de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase ocorrendo após 8 e 10 dias de cultivo, respectivamente. Os substratos formados apenas por palha de cana-de-açúcar ou de milho proporcionaram menores valores de atividade enzimática, o que reforça a importância do farelo de trigo como bom indutor para a produção das duas enzimas pelo fungo (Tabela 01). Este fato é mais evidente quando se compara os valores de atividade de  $\beta$ -glicosidase, muito superiores no farelo de trigo em relação aos demais substratos.

Tabela 01: Produção de celulases pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae*, em diferentes substratos\*.

| Tempo de cultivo (dias) | Atividade enzimática (U/g) |    |     |     |                      |     |     |     |
|-------------------------|----------------------------|----|-----|-----|----------------------|-----|-----|-----|
|                         | Endoglucanase              |    |     |     | $\beta$ -glicosidase |     |     |     |
|                         | FT                         | PC | PM  | MIX | FT                   | PC  | PM  | MIX |
| 2                       | 0                          | 0  | 0   | 0   | 12,0                 | 0   | 0   | 1,7 |
| 4                       | 0,3                        | 0  | 0,1 | 0,2 | 36,0                 | 0,2 | 1,0 | 1,6 |
| 6                       | 0,8                        | 0  | 0,6 | 0,6 | 50,0                 | 0,3 | 2,0 | 1,9 |
| 8                       | 1,2                        | 0  | 0,8 | 1,0 | 58,0                 | 0,5 | 1,6 | 3,5 |
| 10                      | 0                          | 0  | 1,0 | 0,8 | 70,0                 | 0,5 | 1,7 | 3,7 |

\* FT: farelo de trigo; PC: palha de cana-de-açúcar; PM: palha de milho; MIX: mistura dos três substratos (1:1:1).

O farelo de trigo é um dos substratos mais utilizados em estudos de cultivo em estado sólido para produção de enzimas microbianas. Tal fato se justifica por este material rico em proteínas, carboidratos e minerais, que promovem um adequado suprimento de

macro e micronutrientes para o crescimento microbiano (SINGHANIA et al., 2011).

## CONCLUSÕES

A utilização de resíduos agroindustriais mostrou-se viável para a produção de celulases pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae*, principalmente o farelo de trigo como substrato para a produção da enzima  $\beta$ -glicosidase.

## AGRADECIMENTOS

À Fapemig e UEMG, pela Bolsa de Pós-Doutorado no Programa de Capacitação Docente (PCRH).

## REFERÊNCIAS

ASGHER, M.; KHAN, S. W.; BILAL, M. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by *Pleurotus eryngii* WC 888 utilizing agro-industrial residues and bio-ethanol production.

**Romanian Biotechnological Letters**, v. 21, p. 11133- 11143, 2016.

CASTRO, A. M. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.

**Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, mar. 1959.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; RAJASREE, K. P. MATHEW, A.; GOTTUMUKKALA, L.; PANDEY, A. Properties of a major  $\beta$ -glucosidase-BGL1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 7, p. 1521–1524, 2011.

YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production.

**Biomass and Bioenergy**, v. 76, p. 319-338, 2014.