

# PRODUÇÃO DE CELULASES E FORMAÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS PELA DEGRADAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

## *PRODUCTION OF CELLULASE AND SUGAR FERMENTABLE FORMATION BY THE DETERIORATION OF SUGAR CANE BAGASSE*

Tarcísio Michael Ferreira Rosa <sup>(1)</sup>  
Barbhara Mota Marinho <sup>(2)</sup>  
Vivian Machado Benassi <sup>(3)</sup>

### Resumo

A prospecção por micro-organismos produtores de enzimas celulolíticas tem sido o foco de muitos estudos com o interesse de utilizar resíduos agrícolas na produção de etanol celulósico. Este trabalho objetivou selecionar um fungo filamentosos potencial produtor de celulase isolados no norte de Minas Gerais, além de determinar as melhores condições da fermentação submersa para produção de celulase. Os seis fungos filamentosos isolados da bagaço de cana-de-açúcar foram caracterizados macro e microscopicamente e submetidos ao *screening* para a produção da enzima FPase. O *Aspergillus* 3.7TA foi selecionado para avaliação dos melhores parâmetros para a produção de FPase, CMCase e Avicelase. Para determinação do melhor meio de cultura, avaliou-se os meios: Khanna modificado, SR modificado, Czapeck, e CP. Analisou-se também o efeito de diferentes soluções de sais: sais do próprio meio CP; sais do meio SR; sais Wesson acrescido dos sais do meio CP; e sais Wesson, o efeito de diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura e peptona), o tempo (dias) de crescimento fúngico e diferentes fontes de carbono no crescimento e na produção enzimática. Todas as fermentações submersas foram conduzidos à 30°C de forma estacionária e a determinação da atividade FPase, CMCase e Avicelase foram determinadas pela formação de açúcares redutores segundo Miller (1959). Observou-se que o *Aspergillus* 3.7TA apresentou melhor produção celulolítica em meio CP associado com sais Welson, empregando o extrato de levedura e o farelo de trigo como fonte de nitrogênio e de carbono, respectivamente, durante seis dias, à 30°C, de forma estacionária.

**Palavras-chave:** Bioprospecção. Fermentação submersa. Fungos filamentosos.

---

<sup>1</sup> Graduando em Bacharelado em Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales dos Jequitinhonha e Mucuri, Janaúba, Minas Gerais, Brasil. Endereço eletrônico: tarcisio.michael@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri *campus* Diamantina, Minas Gerais, Brasil. Técnica do Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Janaúba, Minas Gerais. Farmacêutica. Endereço eletrônico: barbharamarinho@hotmail.com

<sup>3</sup> Doutora em Bioquímica pelo Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Docente do Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais. Bióloga. Endereço eletrônico: vivian.benassi@ufvjm.edu.br

## **Abstract**

*Prospecting of cellulolytic enzymes produced by micro-organisms has been the focus of many studies in the interest of using agricultural residues in the production of cellulosic ethanol. This study aimed to select a filamentous fungus potential cellulases producer isolated in the north of Minas Gerais, as well as determine the best conditions of submerged fermentation for the production of cellulases. The six filamentous fungi isolated straw sugarcane were characterized macroscopically and microscopically and subjected to screening for the production of FPase enzyme. *Aspergillus sp. 3.7TA* was selected for evaluation of the best parameters for the production of FPase, CMCase and Avicelase. To determine the best medium were analysed different culture medium such as: Khanna modified, SR modified, Czapeck and CP. It was analyzed the effect of different salt solutions: salts CP of the itself medium; SR medium salts; Wesson salts plus of CP salts; and Wesson salts, the effect of different nitrogen sources (yeast extract and peptone), time (days) of fungal growth and different carbon sources in the growth and enzyme production. All the submerged fermentations were conducted at 30°C, stationary conditions, and determining the FPase, CMCase and Avicelase activity were determined by formation of reducing sugars second Miller (1959). It was noted that the *Aspergillus sp. 3.7TA* showed better cellulase production on CP medium associated with Wesson salts, employing yeast extract and wheat bran as a source of nitrogen and carbon, respectively, while six days, at 30°C, in a stationary way.*

**Keywords:** *Bioprospection. Filamentous Fungi. Submerged Fermentation.*

## **1 Introdução**

Novas opções de energia tornaram-se necessárias devido ao uso indiscriminado de hidrocarbonetos e crescimento de emissões de poluentes, tornando um desafio para a comunidade científica ampliar a oferta de energia a partir de fontes renováveis (AZEVEDO, 2016).

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou selecionar micro-organismos bons produtores de celulases, bem como padronizar os parâmetros físico-químicos do cultivo do *Aspergillus sp. 3.7TA* para uma maior produção de celulases, e verificar a degradação do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* para liberação de açúcares passíveis de fermentação.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1 Coleta e isolamento de fungos filamentosos**

Coletou-se, de forma asséptica, bagaço de 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. O isolamento ocorreu em meios de cultivo sólidos contendo aveia Quaker® 4% (m/v) e Ágar 2% (m/v) (EMERSON,

1941), à 30°C, no decurso de quatro dias, sendo analisados a cada 24 horas o crescimento de fungos filamentosos.

Para a realização do inóculo  $1,44 \cdot 10^7$  conídios/cultura foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido. Os meios foram mantidos em estufas bacteriológicas, à 30°C.

Após escolha do fungo para produção celulolítica, testaram-se diferentes meios de cultura: Khanna modificado (KHANNA, 1995), SR modificado (RIZZATTI *et al.*, 2001), Czapeck (WISEMAM, 1975), e CP (PEIXOTO *et al.*, 2003).

Assim como, testou-se o efeito de diferentes soluções de sais do meio: (1) os próprios sais do meio CP (0,03% (m/v) de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,05% (m/v) de  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ); (2) meio CP sem sais com solução de sais do meio SR modificado (0,3% (m/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,24% (m/v)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ); (3) meio CP sem sais com 0,05% (m/v) de sais Wesson; e (4) sais do meio CP acrescidos de sais Wesson. Além de serem analisadas diferentes fontes de nitrogênio: (1) 0,8% (m/v) de extrato de levedura ou (2) 0,8% (m/v) de peptona.

Por fim, avaliou-se a influência de diferentes fontes de carbono: Farinha de Chia Fito Alimentos<sup>®</sup>, Farinha de Linhaça Fito Alimentos<sup>®</sup>, Farelo de Trigo Fito Alimentos<sup>®</sup>, Farelo de Aveia Fito Alimentos<sup>®</sup>, Farinha de Trigo Integral Fito Alimentos<sup>®</sup>, Farinha de Aveia Quaker<sup>®</sup>, Fubá Sinhá<sup>®</sup>, Bagaço de cana-de-açúcar, Farinha de Trigo Vilma<sup>®</sup>, Farinha de Rosca, Palha da Bananeira, Fibra do Coco e Extrato de Soja Viver Bem<sup>®</sup>; para controle utilizou-se o meio de cultura que não continha fonte de carbono.

## 2.2 Obtenção do extrato e quantificação da atividade enzimática

A massa micelial foi separada do meio de cultivo através de filtração à vácuo, os filtrados contendo as enzimas extracelulares foram submetidos à determinação da atividade celulolítica. A atividade FPase, CMCase e Avicelase foram realizadas pela formação de açúcares redutores à partir dos substratos: Papel Filtro Whatman<sup>®</sup> n° 1 (1,0 x 6,0 cm) (GHOSE, 1987); CMC baixa viscosidade Sigma<sup>®</sup> 2% (m/v) em tampão citrato de sódio 100 mM, pH 4,8, e Avicel Fluca<sup>®</sup> 1% (m/v) em tampão citrato de sódio 100 mM, pH 4,8; respectivamente.

A determinação das atividades enzimáticas ocorreu através da formação dos açúcares redutores de acordo com MILLER (1959), à 55°C. 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  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto, nas condições de ensaio. A atividade total (U total) =  $\mu\text{mol}/\text{mL} \times \text{volume do filtrado}$ .

### 2.3 Análise da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar

Para a reação de hidrólise foram usados tubos reacionais contendo 0,02 g de bagaço de cana, 1 mL de tampão citrato de sódio 100 mM, pH 4,8, e 1 mL de enzima, mantidos à 55°C, por distintos tempos. Após o tempo, as reações foram fervidas à 100°C por cinco minutos. Após resfriados, realizou-se a quantificação de açúcares de acordo com MILLER (1959). O branco da reação constituiu do tempo zero da incubação da enzima com o substrato bagaço de cana-de-açúcar.

## 3 Resultados e Discussão

No presente estudo, obteve-se o isolamento de seis diferentes fungos filamentosos à partir do bagaço de cana-de-açúcar, sendo esses: 3.2TA, 3.3TA, 3.4TA, 3.5TA, 3.7TA e 3.8TA. Os mesmos foram identificados como *Mucor sp.* (3.2TA, 3.4TA e 3.8TA), *Neurospora* (3.3TA), e *Aspergillus sp.* (3.5TA e 3.7TA).

Realizou-se um *screening* com a finalidade de selecionar entre os isolados um potencial produtor de enzimas celulolíticas. Pode-se observar que, o *Aspergillus sp.* 3.7TA apresentou-se como melhor produtor enzimático com uma atividade de CMCase 13,00 U totais, Avicelase 3,01 U totais e FPase 5,01 U totais, mostrando ter um grande potencial industrial.

Para otimizar a produção de enzimas celulolíticas pelo fungo *Aspergillus sp.* 3.7 TA, avaliou-se diferentes variáveis na cultura do micro-organismo. Segundo Bravo e colaboradores (2000) diferentes parâmetros afetam à produção enzimática, e esses devem ser investigados uma vez que diferentes micro-organismos apresentam diferentes condições ótimas para produção de diferentes enzimas.

Pode-se afirmar que todos os meios analisados tiveram uma indução enzimática semelhante, entretanto, observou-se que as atividades celulolíticas obtidas pelo fungo em estudo cultivado em meio CP sem sais, acrescido de sais Welson, com 15,22 U totais de atividade CMCase; 2,882 U totais de Avicelase e atividade da FPase foi de 5,95 U total.

Pode-se inferir que o extrato de levedura mostrou-se como uma melhor fonte de nitrogênio indutora da produção enzimática pelo *Aspergillus sp.* 3.7TA em comparação à peptona, assim como, tanto para a atividade da FPase quanto para a atividade da CMCase, o

farelo de trigo foi a melhor fonte de carbono, obtendo uma atividade de 5,52 U totais e 66,65 U totais, respectivamente. Pode-se inferir que ambas as atividades das celulasas obtidas foram expressivamente superiores as encontradas nas outras fontes de carbono.

Objetivando analisar a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pelas celulasas, pode-se verificar que com o passar do tempo (0 a 300 minutos) das celulasas em contato com o bagaço de cana-de-açúcar houve liberação de açúcares passíveis de fermentação, sendo constatado que a enzima não sofreu desnaturação durante esse período, assim como, teve uma liberação de, aproximadamente, 2 mg de glicose/ mL de reação.

## 4 Conclusões

Dessa forma, pode-se inferir que as enzimas celulolíticas produzidas pelo fungo filamentososo isolado a partir do bagaço de cana-de-açúcar, obtido no Norte de Minas Gerais, após padronização das condições de cultivo do micro-organismo mostrou-se potencial para aplicação na hidrólise do próprio bagaço como substrato enzimático para liberação de açúcares fermentescíveis.

## Referências

- AZEVEDO, A., SOUZA, D., SCHNEIDER, R. C. S., HOELTEZ, M. Análise do ciclo de vida aplicada à produção de bioetanol a partir de material lignocelulósico remanescente em dejetos bovinos. **TECNO-LÓGICA**. Santa Cruz do Sul, v. 20, n. 2, p. 118-128, jul./dez. 2016.
- BRAVO, C. E. C., CARVALHO, E. P., SCHWAN, R. F., GÓMEZ, R. J. H. C., PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, edição especial, p. 137-152, 2000.
- EMERSON, R. An experimental study of the life cycles and taxonomy of *Allomyces*. **Lloydia**. v. 4, p. 77-144, 1941.
- 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.
- 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.

RIZZATTI, A.C.S.; JORGE, J.A.; TERENZI, H.F.; RECHIA, C.G.V.; POLIZELI, M.L.T.M. Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **J. Ind Microbiol Biotech.** v. 26, p. 156–160, 2001.

WISEMAN, A. Handbook of Enzyme Biotechnology. **Ltd John Wiley e Sons**, editors. p. 148, 1975.