

PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE *Penicillium chrysogenum* EM FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA USANDO O BAGAÇO DO COCO COMO SUBSTRATO.

OLIVEIRA JÚNIOR, Sérgio Dantas¹; PADILHA, Carlos Eduardo de Araújo¹; ASEVEDO, Estefani Alves¹; PIMENTEL, Vanessa Carvalho¹; ARAÚJO, Fernanda Rodrigues de¹; MACEDO, Gorete Ribeiro de¹; SANTOS, Everaldo Silvino dos¹

¹Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química

E-mail para contato: sergiodantas100@hotmail.com

RESUMO

*O aproveitamento de resíduos agroindustriais como substrato na produção de enzimas é uma prática convencional que visa reduzir custos de operação, além de reduzir o impacto ambiental causado pelo acúmulo destes subprodutos. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi estudar a cinética de produção de enzimas celulolíticas (CMCase, Xilanase, Avicelase e FPase) de **Penicillium chrysogenum** através da fermentação semi-sólida (FSS) usando como substrato o bagaço do coco verde. Os valores máximos das atividades das enzimas CMCase = 2,58 UI/g, FPase = 2,24 UI/g, Avicelase = 2,38 UI/g e Xilanase = 6,72 UI/g. Portanto, concluiu-se que o microrganismo e o substrato utilizados apresentam potencial para processos de produção de enzimas em cultivo semi-sólido.*

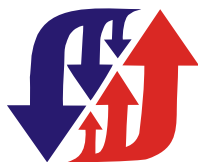
Palavras-chaves: Fermentação semi-sólida, celulases, fibra de coco

INTRODUÇÃO

O grande consumo de água de coco verde (*in natura* ou industrializada) vem aumentando a geração desse resíduo oriundo da casca desse fruto, ocasionando um grave problema quanto ao descarte desse material, principalmente nas grandes cidades onde são levados para lixões e aterros sanitários sem qualquer tipo de tratamento.

O processo de fermentação semi-sólida (FSS) envolve o crescimento e metabolismo de microrganismos, na ausência ou quase ausência de água livre, empregando um substrato sólido, ou suporte. A FSS se apresenta como uma tecnologia para utilizar resíduos gerados de indústrias, como substratos, diminuindo possíveis problemas ambientais (Rocha, 2010). Esta técnica tem muitas vantagens sobre a fermentação submersa incluindo altos rendimentos, biomoléculas concentradas e a baixa demanda de energia (Krishna, 2005).

No presente estudo avaliou-se a produção de enzimas celulolíticas (CMCase, FPase, Avicelase e Xilanase) através da FSS, utilizando como substrato a fibra de coco e o *Penicillium chrysogenum* 807 como agente fermentador. Além disso, a estabilidade da enzima CMCase foi investigada sob várias temperaturas e níveis de pH.



MATERIAL E MÉTODOS

FIBRA DE COCO

A casca e o mesocarpo fibroso foram utilizados para a obtenção do bagaço do coco verde. Após a seleção dos cocos, o material foi dilacerado com facão, lavado, seco, moído e armazenado.

MICROORGANISMO E INÓCULO

A cepa usada para a produção das enzimas foi a linhagem do fungo filamentosso *Penicillium chrysogenum* (807) da coleção ARS Culture Collection (EUA). O microrganismo (*Penicillium chrysogenum*) foi inoculado em placas contendo agar batata dextrose (BDA) e foram incubadas a ± 28 °C, por 5 dias. A obtenção do inóculo para a FSS foi realizada através da propagação dos esporos utilizando Erlenmeyers de 125 mL, contendo sabugo de milho, e foram condicionados na câmara incubadora a 30 °C por cinco dias. A concentração de esporos foi de 1×10^6 esporos/g de meio sólido (Coelho *et al.*, 2001).

FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA E EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS

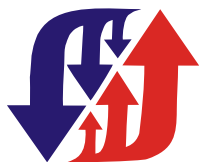
A produção foi realizada por 10 dias à temperatura de 30 ± 2 °C em câmara incubadora, sendo realizadas amostragens a cada 24 horas. As amostras foram analisadas determinando-se as atividades de Celulases, Xilanase, açúcares redutores totais, proteínas totais e celulose residual. As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Foram pesados 5 g do substrato em base seca, com uma concentração de $1,0 \times 10^6$ esporos/mL (Coelho *et al.*, 2001) e uma solução salina nutriente, com pH 5, e com a umidade de 75%. A extração do complexo enzimático ocorreu com adição de 6 mL de solução tampão acetato 200 mM (pH 4,5) por grama de bagaço. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

DOSAGEM DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS, PROTEÍNAS TOTAIS E CELULOSE RESIDUAL

A atividade de CMCase e FPase e Avicelase foi determinada conforme de Ghose (1987). A atividade da Xilanase foi determinada pela liberação da quantidade de açúcar redutor de uma solução a Xilana (1%) preparada em solução tampão citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,0 à 50 °C. A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido 3,5 -dinitrosalicílico (Miller, 1959). A determinação das proteínas foi de acordo com Bradford (1976). O conteúdo de celulose residual foi determinado pela metodologia Updegraff, (1969).

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA CMCcase

O efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas foi determinado realizando o ensaio padrão a uma faixa de temperatura de 30-70 °C. A estabilidade térmica das enzimas



secretadas pelo *P. chrysogenum* foi testada por determinação da atividade de enzima remanescente após incubação da enzima em banho-maria à temperatura de 30-70 °C, por 1 h. O pH ótimo das enzimas secretadas pelo fungo foi estimado no intervalo de pH de 2,0-10,0 utilizando diferentes tampões (0,2M) nos ensaios. Os seguintes tampões foram usados: tampão glicina-HCl para pH 2,0 e 3,0; tampão acetato de sódio para pH 4,0 e 5,0; tampão fosfato de sódio para pH 6,0 a 8,0 e tampão glicina-NaOH para pH 9,0 e 10,0. Cada mistura foi mantida a 4 °C por 1 hora. O ensaio das enzimas foi conduzido com o substrato (carboximetilcelulose).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 ilustra o perfil cinético apresentado pelo fungo *Penicillium chrysogenum* ocorreu durante 10 dias. Análises de proteína total (PT), açúcares redutores totais (ART), e celulose residual foram realizadas a cada 24 horas. Observa-se que o microrganismo consome a fonte de carbono, ou seja, ocorre à redução de ART com produção de metabólicos, inclusive proteína sendo que a concentração máxima dessa ocorreu após 96 horas de cultivo. Destaca-se a presença de celulose residual.

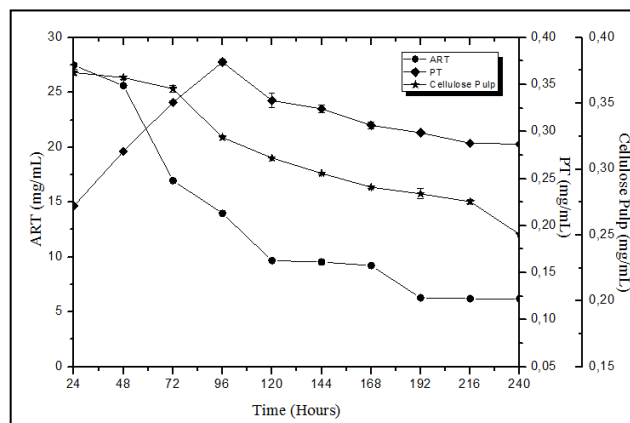


Figura 1 - Perfil dos teores de açúcares redutores totais, proteínas totais e celulose residual produzidos pelo fungo *Penicillium chrysogenum* durante 10 dias de cultivo.

A **Figura 2** ilustra o perfil cinético das quatro enzimas produzidas pelo fungo *Penicillium chrysogenum* durante os 10 dias. No que diz respeito à CMCase, a mesma apresentou o maior valor no quinto dia com atividade de 2,58 UI/g, sofrendo redução até o final do cultivo, ou seja, após 240 h. Para as enzimas Avicelase e Xilanase as atividades máximas foram alcançadas entre 72 e 96 horas, com uma produção de 2,38 UI/g e 6,72 UI/g, respectivamente. Para a FPase sua atividade máxima foi em 96 horas com uma produção de 2,24 UI/g ficando com atividade praticamente constante até o final do cultivo.

Destaca-se que a temperatura ótima da enzima CMCase foi de 50 °C. O resultado da estabilidade térmica indicou que durante 1h de incubação a pH 5,0, a enzima em extrato bruto manteve mais de 80% quando foi incubado a 50 °C.

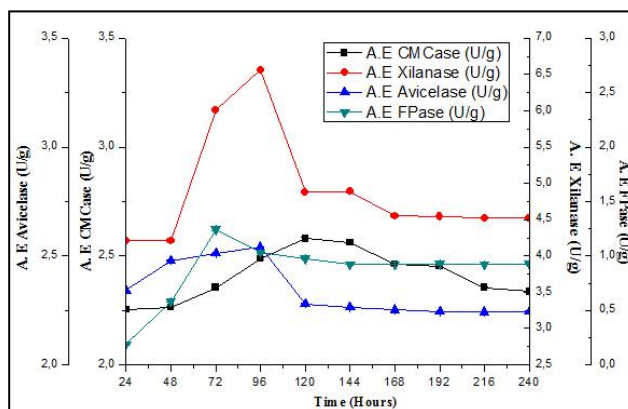
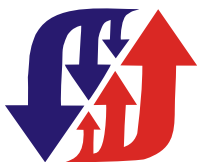


Figura 2 – Perfil das atividade enzimáticas (CMCase, Xilanase, Avicelase e FPase) durante os 10 dias na FSS, utilizando o fungo *Penicillium chrysogenum* e o coco como substrato.

CONCLUSÕES

A reutilização de resíduos oferece uma alternativa para a redução do impacto ambiental causado e também uma redução nos custos do processo fermentativo. A utilização de um resíduo lignocelulósico, o coco verde como substrato, mostrou ser bastante promissor ao crescimento do fungo *Penicillium chrysogenum*, além de possibilitar a expressão em níveis significativos de CMCase, FPase, Avicelase e Xilanase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Journal

Bradford, M. M.; Anal. Biochem. 1976, 72, 248.

Ghose, T. K. *Measurement of cellulose activities*. Pure Appl Chem; 59: 257-268, 1987.

Krishna, C. Solid-state fermentation systems - an overview. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 25 (1-2), p 1-30, 2005.

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

Updegraff, D.M. Semi micro determination of cellulose in biological materials, *Anal. Biochem.* 32 (1969) 420–424.

Book

Rocha, C.P. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido. 2010. 136f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

Coelho, M. A. Z. *et al.* Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. *Boletim Ceppa*, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.