

EFEITO DE SAIS NA PRODUÇÃO DE CELULASE POR FERMENTAÇÃO SOLIDA PELO FUNGO TERMOFÍLICO *Thermoascus aurantiacus*.

Lilian Andrade Rodrigues, Roberto da Silva, Rodolfo Travaini, Luiz Gustavo Covizzi, Eleni Gomes – Bacharelado em Química Ambiental - Depto de Química e Ciências Ambientais - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Ambientais - Campus São José do Rio Preto.

Termoenzimas ou enzimas termofílicas são denominações usadas para enzimas capazes de manter suas atividades catalíticas a altas temperaturas, apresentando boa estabilidade e autonomia em processos industriais. Além da estabilidade essas enzimas apresentam outras propriedades desejáveis à indústria, são mais resistentes a desnaturantes químicos e altas concentrações de sais além de permitir o uso de menor quantidade de água o que reduziria o custo de produção. Em termos de produção e uso de enzimas o Brasil encontra-se privilegiado devido à grande quantidade e variedade de biomassa passível de ser transformada ou aproveitada como substrato para a produção dessas enzimas. Atualmente, com o aumento populacional nota-se uma exaustiva exploração dos recursos naturais, gerando problemas ambientais devido o acúmulo de resíduos, principalmente oriundos das atividades agroindustriais. Com isso a reciclagem de resíduos agrícolas tem se tornado uma alternativa viável, visto que além de matéria prima de baixo custo sua utilização diminui o impacto ambiental. O fungo *Thermoascus aurantiacus* (CBMAI 756) foi isolado por DA SILVA e colaboradores em 1999 a partir de madeira em decomposição da Amazônia por destacar-se na produção de enzimas termofílicas de interesse industrial, como as celulasas, xilanases, pectinases, amilases etc (Da Silva et al., 2005; ; MARTIN, 2004) . As celulasas são glicoproteínas, de peso molecular de 50 a 90 KDa, que hidrolisam materiais celulósicos, seu mecanismo de atuação é descrito como o resultado da ação sinérgica entre endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase. As endoglucanases ou endo- β -1,4-glucanase hidrolisam regiões amorfas no meio das cadeias de celulose, atacando os polímeros internamente, resultando em uma rápida redução do tamanho da cadeia, exoglucanase ou exo- β -1,4-glucanase ou celobiohidrolase atua sobre a celulose, removendo unidades de celobiose a partir de extremidades não redutoras da molécula e a β -1,4-glicosidase ou celobiase hidrolisa a celobiose e outras celodextrinas a glicose. Todas as três enzimas do complexo sofrem repressão catabólica pelo produto final de hidrólise. Por prevenir o acúmulo de celobiose, a β -glicosidase é responsável pelo controle da velocidade global da reação de hidrólise celulolítica, desempenhando assim, um efeito crucial na degradação enzimática da celulose. O interesse na produção de celulasas está relacionado ao fato dessas enzimas hidrolisarem grupos celulósicos, podendo ser utilizada na indústria alimentícia na extração de componentes do chá verde, de proteínas, agar-agar, óleo vegetal, óleos essenciais; produção de vinagre, álcool; na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas; preparação de alimentos infantis; sopas; extratos vegetais; ração animal; na indústria farmacêutica na preparação de produtos digestivos, geriátricos, encontrando também uma vasta aplicação na área têxtil e em detergente.

O objetivo do presente trabalho avaliar o efeito de diferentes soluções salinas na produção de celulasas (Endoglucanase e β -glicosidase) por fermentação em estado sólido (FES) utilizando como farelo de trigo como substrato.

A seguinte metodologia foi empregada. O microrganismo foi crescido em frascos de erlenmeyer de 250 mL com 40 mL de ágar Sabouraud Dextrose, inclinado, a 50°C por 48 horas. A composição das soluções salinas foi: 1) 1g/L de NH_4NO_3 ; 1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1g/L de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, descrita por Sabouraud (1892); e 2) 10g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3 g/L de KH_2PO_4 ; 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g/L de CaCl_2 , descrita por Toyama (1978). A fermentação se deu em

frascos de erlenmeyer de 250 mL com 5 g de farelo de trigo e 10 mL de suspensão micelial, obtida através da suspensão da cultura com 100 mL da solução nutriente a ser analisada. A cada 24 horas foram retirados dois frascos (duplicata), até completar 144 horas, com material fermentado e adicionado 40 mL de água destilada, sendo em seguida agitado por uma hora em shaker a 100 rpm. O material foi filtrado e centrifugado a 15000 rpm por 10 minutos a 2°C, obtendo assim o extrato enzimático bruto. A atividade da β -glicosidase foi determinada com 50 μ L do filtrado enzimático, 250 μ L de tampão acetato 0,1M, pH 5,0 e 250 μ L de p-nitro-fenil-glicosídeo (PNPG, Sigma), reagindo por 10 minutos a 60°C, a reação enzimática foi paralisada com 2,0 mL de Na_2CO_3 2M e foi liberado nitrofenol. Foi quantificado por espectrofotometria UV-VIS a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de nitrofenol por minuto de reação. A atividade da Endoglucanase foi determinada com 100 μ L do filtrado enzimático, 900 μ L de tampão acetato 0,1M, pH 5,0 e 250 μ L de p-nitro-fenil-glicosídeo (PNPG, Sigma), reagindo por 10 minutos a 60°C, a reação enzimática foi paralisada com 1,0 mL de DNS (e foi liberado glicose. Foi quantificado por espectrofotometria UV-VIS a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose por minuto de reação.

Os resultados obtidos estão representados na figuras 1.

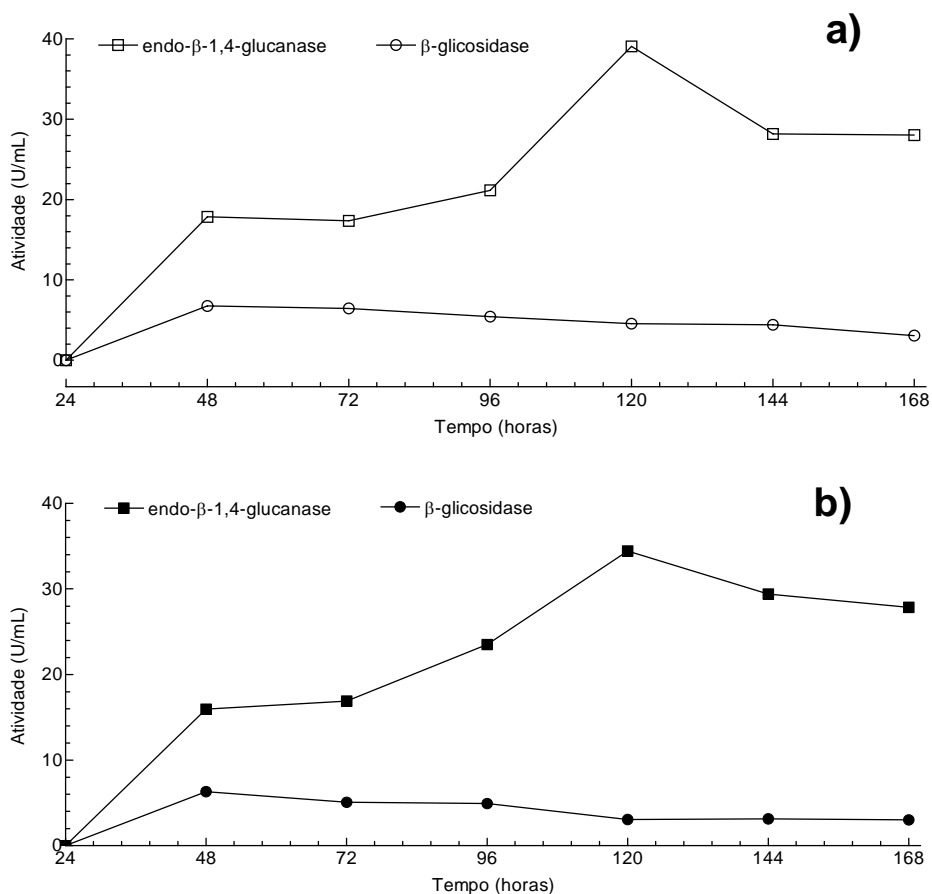


Figura 1: Produção de celulases nas diferentes soluções salinas. a) a produção de β -glicosidase e CMCase na solução Sabouroud; e b) perfil de produção pelo meio de Toyama.

Analisando a figura observa-se que não houve alteração no tempo de produção das enzimas em ambos os casos. A produção de endo- β -1,4-glucanase foi de 39,01 (U/mL) no meio de Sabouroud e de 34,43(U/mL) no meio com a solução Toyama. A produção de β -glicosidase apresentou o pico de produção em 48 horas com 6,67 U /mL para Sabouroud e de 6,31 U/mL para o meio de Toyama. Sendo que o perfil de produção da β -glicosidase também não foi alterado.

Por meio dos resultados obtidos é possível concluir, que o perfil de produção das duas celulases, nas duas soluções complementares avaliadas não sofreu alteração nas condições empregadas. Entretanto, a solução de Toyama reduziu as atividades de endo- β -1,4-glucanase e β -glicosidase em cerca de 12% e 7%, respectivamente.

Referências Bibliográficas:

1. DA-SILVA, R. Produção, purificação e caracterização de enzimas celulolíticas termoestáveis de *Humicola* sp. 179-5 e aplicação destas enzimas 1992. **Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos)**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
2. DA SILVA, R.; LAGO, E.S.; MERHEB, C.W.; MACCHIONE, M.M.; PARK, Y.K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Mische. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.235-241, 2005.
3. GOMES, E.; GUEZ, M.U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Microrganismos termófilos, enzimas termoestáveis e produção de enzimas termoestáveis para aplicação industrial - Revisão. **Química Nova**, in press, 2006.
4. MARTIN, N.; SOUZA, S.R.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial byproduct. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, p.813-819, 2004.
5. MARTINS E.S.; Silva D.; DA SILVA, R.; GOMES E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochem.**, v.37, p.949-954, 2002.
6. MARTINS, E.S.; SILVA, R.; SILVA, D.; LEITE, R.S.R.; GOMES, E. Purification and characterization of polygalacturonase produced by *Thermoascus aurantiacus* 179-5 in submerged. **Antonie van Leeuwenhoek**, in press, 2006.
7. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.**, v.31, p.426-428, 1956.
8. RABALHO, A.A. Isolamento de linhagens microbianas termofílicas amilolíticas, produção, caracterização e aplicação das amilases na hidrólise do amido de mandioca 2002. **Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos)**. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.
9. Sabouraud, R. **Ann. Dermatol. Syphilol.** v.3, p.1061, 1892.
10. Toyama, N., Ogawa, K., 1978. Cellulase production by *Trichoderma viride* in solid and submerged culture methods. In: Ghose, T.K. (Ed.), **Bioconversions of Cellulosic Substances into Energy, Chemicals and Microbial protein. Symp. Proc. 1977**, Indian Institute of Technology, New Delhi, p. 305-327.

Agradecimentos: FAPESP, CNPq