

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CELULASE PRODUZIDA POR *Botrytis sp.*

Fabiana Sarmento de Albuquerque^{1*}, Fernanda Kyvia M. Mendonça¹, Tatielle Pereira Silva², Hugo Juarez Vieira Pereira³, Luiz Carlos Caetano⁴.

1. Estudante de IC do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL
2. Estudante de Doutorado do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL
3. Professor pesquisador do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL
4. Professor pesquisador do IQB da UFAL/Orientador

Resumo:

A obtenção de enzimas microbianas vem recebendo grande atenção nas últimas décadas, tendo em vista que as mesmas possuem um grande valor devido à ampla aplicação industrial. Diante disso, esse trabalho buscou a determinação da atividade da celulase produzida pelo fungo filamentosso *Botrytis sp.* em meio de baixo custo (batata dextrose). Para essa determinação os ensaios foram conduzidos em erlenmeyers de 250 mL por 10 dias a 28°C e agitação em incubadora shack a 200 rpm. Diante disso esse estudo buscou determinar o tempo ótimo para a produção de celulase, sendo este em 96 horas de incubação, o que demonstra um excelente resultado, uma vez que o gasto energético é pequeno, favorecendo a futura aplicação biotecnológica dessa enzima. Além da caracterização enzimática procedeu-se uma caracterização do perfil proteico por SDS-PAGE da amostra, demonstrando relativa complexidade, além de zimografia específica para atividade enzimática em estudo, celulásica.

Palavras-chave: *Botrytis sp.*; celulase; enzima.

Apoio financeiro: UFAL; CAPES.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFAL

Introdução:

Os processos biotecnológicos vêm sendo amplamente difundidos em vários segmentos industriais e possuem uma série de vantagens em relação aos processos químicos convencionais. Um dos motivos de tal vantagem é devido a maioria dos materiais de natureza orgânica, subprodutos da agroindústria e de baixo valor comercial, que possuem potencial biotecnológico significativo (CASTRO; PEREIRA, 2010).

Em países de cultura agrícola, como o Brasil, por exemplo, o conteúdo de biomassa gerado pode atingir de 10^7 a 9×10^7 milhões de

toneladas. Para a cana de açúcar, por exemplo, a cada uma tonelada moída, 280 Kg de bagaço são gerados, o que corresponde a aproximadamente 30% do peso líquido total (UDOP, 2015). Basicamente, esses subprodutos são constituídos de compostos lignocelulósicos, os quais são os recursos renováveis mais abundantes na natureza, sendo esses constituídos majoritariamente de celulose, hemicelulose e lignina (CASTRO; PEREIRA, 2010). Nesse sentido, as pesquisas com bioprocessos crescem exponencialmente e o foco da maioria delas é produzir compostos com alto valor agregado, entre estes as enzimas, que são catalisadores biológicos altamente versáteis e eficientes (COUTO; SANROMAN, 2006; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Dentre essas enzimas destaca-se o estudo com a celulase, que está classificada com o EC 3.2.1.4, possui como nome sistemático, segundo a IUBMB -International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1,4-β-D-glucana-4-glucano-hidrolase. É a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise de homopolissacarídeos de glicose. Tal enzima hidrolisa as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e outro não redutor (ZANDONÁ, 2001).

As celulasas têm ganhado todo esse destaque devido sua versatilidade em aplicações na hidrólise de resíduos agrícolas visando à liberação da glicose contida na celulose (OLSSON et al., 2003). A sua principal aplicação é na desconstrução da celulose para liberar produtos fermentáveis, gerando o etanol de segunda geração (AGONTINHO, 2014; HIMMEL et al., 1999).

Diante disso o objetivo desse trabalho foi a identificação da atividade celulase produzida pelo fungo filamentosso *Botrytis sp.*, em meio BD (batata dextrose) induzido por tiras de papel Whatman nº1 (1,0 cm x 1,0 cm), na perspectiva de purificação, identificação e aplicação biotecnológica dessa enzima.

Metodologia:

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentosso *Botrytis sp.*. A cultura foi esporulada em placas contendo meio BDA (batata dextrose agar) e incubada em estufa de microbiológica por 10 dias a 28°C. Em seguida foi realizado a suspensão dos esporos em solução de Tween 80 e contada em câmara de Neubauer.

O estudo para determinação do tempo ótimo de produção da atividade celulase foi conduzido em erlenmeyers de 250 mL, contendo meio BD enriquecido com tiras de papel Whatman nº1 (1,0 cm x 1,0 cm) 3,5% p/v, inoculado numa concentração 10^7 esporos/mL por 240 horas (10 dias), sob agitação de 200 rpm em incubadora shack a 28°C, e a cada 24 horas foi aferido a atividade celulase pelo método de DNS proposto por Miller 1959 que consiste em , adicionar 100 µL de extrato enzimático, 100 µL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e 100 µL de uma solução com carboximetilcelulose (CMC) 2%. A mistura foi incubada a 50°C por 30 minutos em banho maria. Posteriormente 200 µL de reagente Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS) foram adicionados em cada eppendorf e eles foram levados a banho de água fervente (100°C) por tempos de 10 minutos para que houvesse a reação entre a amostra e o DNS. Após cada amostra ser retirada do banho fervente, foram resfriados e adicionados 500 µL de água destilada. As amostras foram homogeneizadas e a absorbância a 540 nm aferida em espectrofotômetro.

Para determinação das bandas proteicas foi realizado uma eletroforese com gel de poliacrilamida como é descrito em LAEMMLI (1970). E em seguida foi feito o estudo da atividade enzimática em gel de poliacrilamida (zimograma), adaptado por Sun et al. 2008).

Resultados e Discussão:

A determinação do perfil fermentativo foi realizado a fim de se obter um tempo ótimo, para a produção de celulase. O processo procedeu fixando uma temperatura 28°C e agitação 200 rpm ideais para crescimento do fungo filamentosso *Botrytis sp.*, como descrito por Santos, et al, 2011.

A figura 1 apresenta o perfil fermentativo, do meio BD enriquecido com papel whatman nº1 (1,0 cm x 1,0 cm) pelo fungo *Botrytis sp.*, para obtenção do tempo ótimo para a produção de celulase.

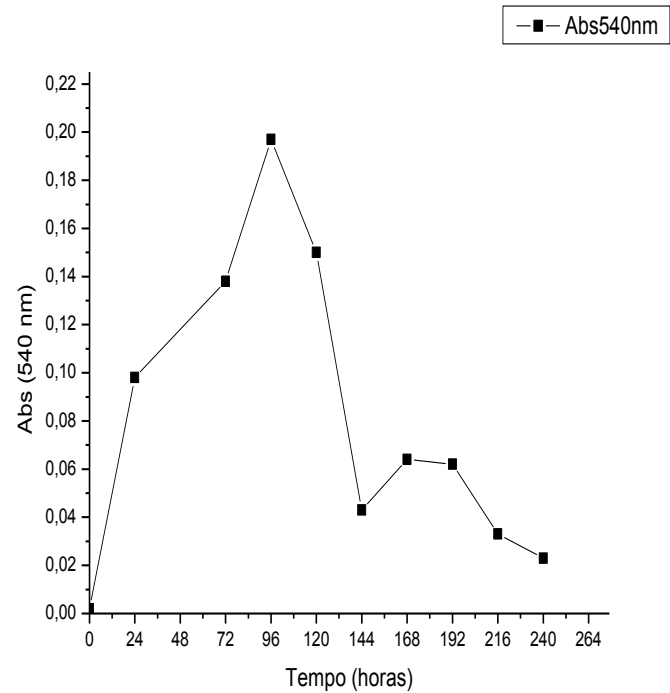


Figura 1: Perfil fermentativo para determinação do tempo ótimo de produção da atividade celulase pelo fungo filamentosso *Botrytis sp.*

Observando a figura 1 observa-se que o melhor tempo para a obtenção de celulase foi em 96 horas, seguido de um decréscimo na atividade, levando a conclusão de que está havendo uma redução de nutrientes, que em consequência leva ao decréscimo no crescimento microbiano e em consequência excreção de enzimas.

O gel de eletroforese apresentou poucas bandas proteicas sendo duas mais intensas, de alto peso molecular.

O gel de atividade enzimática (zimograma) apresentou um rastro de atividade celulolítica bem intenso caracterizando uma alta atividade, conforme figura 2.

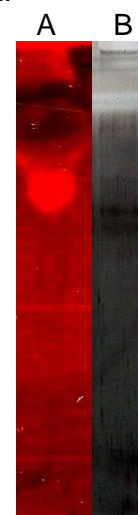


Figura 2: Zimograma (A) e SDS-PAGE (B) do sobrenadante da cultura do fungo filamentosso

Botrytis sp., inoculado em meio BD (batata dextrose) enriquecido por tiras de papel whatman nº1 (1,0 cm x 1,0 cm).

Conclusões:

Os resultados experimentais confirmaram a viabilidade da produção da celulase a partir da inoculação do *Botrytis* sp., em meio batata dextrose. É importante ressaltar que o fungo excretou a enzima tendo como indutor ou suprimento apenas o papel e o caldo de batata.

Referências bibliográficas

AGONTINHO F. et al., Influence of enzyme production on the energetic-environmental performance of lignocellulosic ethanol. **Ecological Modelling**, 2014, 315, 46-56.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A Review. **Journal of Food Engineering**, Califórnia, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

HIMMEL, M.E., RUTH, M.F., WYMANS, C.E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Curr. Opin. Biotechnol.** 1999, 10, 358-364.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

Santos TC, Brito AR, Bonomo RCF, Pires AJV, Aguiar-Oliveira E, Silva TP, Franco M (2017) Statistical optimization of culture conditions and characterization for ligninolytic enzymes produced from *Rhizopus* sp. using prickly palm cactus husk. **Chem Em Commu** 204:55-63.

Socol, C. R.; Prado, F. C.; Vandenberghe, L. P. S. and Pandey, A. (2003), General aspects in citric acid production by submerged and solid-state fermentation. In: **Concise Encyclopedia of Bioresource Technology**. New York : The Haworth Press. pp. 652-664.

UDOP – Usinas e Destilarias do Oeste Paulista.
Disponível em: www.udop.com.br
Acesso em março 2017.

ZANDONÁ FILHO, A. **Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas**. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.