

PRODUÇÃO DE CELULASE POR *Trichoderma stromaticum* EM RESÍDUO DE PUPUNHA (*Bactris gasipaes* Kunth) FERMENTADO.

Camila Oliveira Bezerra¹, Andréa Miúra da Costa².

1. Estudante de IC da Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC.
2. DCB-UESC - Departamento de Ciências Biológicas / Orientadora.

Resumo:

A palmeira *Bactris gasipaes* Kunth é utilizada para produção de palmito *in natura* ou em conserva. Durante esse processo são produzidas toneladas de resíduos. Em busca da diminuição do impacto ambiental gerado pelo descarte de tais resíduos apresentamos neste estudo a utilização do resíduo como fonte de carbono para produção de carboximetilcelulase pelo fungo *Trichoderma stromaticum*. Após a fermentação em estado sólido do resíduo, as amostras apenas umedificadas com água de torneira e as suplementadas com fosfato de amônio apresentaram atividades enzimáticas de 3,8U/gss e 41,08U/gss, respectivamente. Os resultados obtidos foram promissores para a produção de enzimas celulolíticas.

Palavras-chave: Resíduo de pupunha, Celulase, *Trichoderma stromaticum*.

Apoio financeiro: CNPq/UESC

Introdução:

Comumente conhecida como pupunheira, a *Bactris gasipaes* Kunth é uma palmeira multicaule nativa dos trópicos úmidos da Amazônia. Caracterizada como versátil, produz frutos para consumo humano e animal e é utilizada para produção de palmito. (MORO, 1996). A cada 400g de palmito extraídos estima-se que 13kg de resíduo sejam produzidos. (FERMINO et al. 2010). Para minimizar o impacto ambiental causado pelo resíduo opta-se por utilizar esse subproduto da extração do palmito na produção de farinhas, de objetos artesanais, de compensado, como suplemento alimentar bovino e como adjunto biotecnológico (PELIZER, 2007).

Uma área da biotecnologia crescente e promissora é a produção de enzimas. As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores em várias reações químicas (LEHNINGER, 1995). Podem ser aplicadas em campos como a indústria têxtil, alimentícia, farmacêutica e na produção de biocombustíveis. Por conta de sua

complexidade molecular, a produção sintética de enzimas é complicada e custosa (HARTMEIER, 1988). Com isso, a melhor maneira de se obter enzimas é através da produção microbiana por fermentação em estado sólido ou fermentação submersa (ORLANDELI, 2012).

O Brasil possui uma vasta diversidade microbiológica e intensa exploração agroindustrial. Com isso, cria-se a oportunidade de utilização de resíduos, que possuem alto teor de fibras e outrora seriam descartados, como matéria prima e de microrganismos isolados do meio ambiente como produtores enzimáticos.

Os resíduos utilizados apresentam alto teor de celulose, portanto as principais enzimas obtidas nesse processo são as celulases, atuantes na degradação de celulose em açúcares mais simples. A quebra de polissacarídeos em monossacarídeos é a primeira etapa na produção de biocombustíveis. Esses açúcares posteriormente serão convertidos em álcool por outras enzimas.

Nessa perspectiva, em todo o mundo pesquisas são realizadas com o intuito de encontrar um resíduo que seja uma boa fonte para produção de enzimas microbianas e um microrganismo superprodutor. (OJUMU et al., 2003)

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do fungo *Trichoderma stromaticum* na produção de celulase (CMCase) utilizando o resíduo de pupunha como fonte de carbono e diferentes fontes de nitrogênio para posterior aplicação na produção de bioetanol.

Metodologia:

- 1- Cultivo do microrganismo.

O fungo *Trichoderma stromaticum* foi cultivado em placa de petri com meio BDA (batata dextrose ágar) a 25°C por 5 dias em BOD com fotoperíodo de 24 horas.

- 2- Fermentação em estado sólido.

A fermentação foi realizada em frascos erlenmeyers de 125mL, adicionou-se 2,5g de resíduo de pupunha triturado e

desidratado, 5mL do agente umidificante e após esterilização foi adicionado solução de esporos para obtenção de uma concentração final de 10^6 esporos/mL. Os frascos foram incubados a 30°C por 6 dias em shakers sem agitação. Após os 6 dias 25mL de água destilada estéril foram adicionadas aos frascos que foram posteriormente submetidos a agitação de 150 RPM por 30 minutos. A extração foi realizada por filtração em gase dobrada quatro vezes. Os extratos foram centrifugados a 12.000 RPM por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi armazenado e utilizado como extrato bruto enzimático. O experimento foi realizado em triplicata. Foram testados diferentes agentes umidificantes: água destilada (AD), água de torneira (AT), meio mínimo de sais 1 (0,3% NaNO_3 ; 0,1% KH_2PO_4 ; 0,05% MgSO_4 ; 0,05% KCl e 0,001% FeSO_4 pH 5,0) e meio mínimo de sais 2 (0,3% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,3% KH_2PO_4 e 0,6% $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ pH 6,0). Para o teste da melhor fonte de nitrogênio todo experimento foi repetido utilizando o melhor agente umidificante em todos os frascos e adicionando 0,5% da fonte de nitrogênio. As fontes de nitrogênio testadas foram sulfato de amônio (SA), fosfato de amônio (FA), farelo de soja (FS), extrato de levedura (EL), nitrato de amônio (NA), peptona (PEP). O experimento foi realizado em triplicata.

3- Dosagem da atividade enzimática.

A atividade enzimática foi mensurada segundo Ghose (1987) adaptado utilizando carboximetilcelulose sódica (CMC) a 1% diluída em tampão citrato de sódio 0,05M pH=5,0. 125 μL de substrato foram adicionadas em tubos com capacidade de 10mL com posterior adição de 125 μL do extrato enzimático. A reação aconteceu por 30 minutos a 50°C. A quantidade de glicose liberada foi medida através da reação do ácido dinitrosalicílico (DNS) com adição de 250 μL do reagente, fervura das amostras por 5 minutos e leitura da absorbância a 540nm em espectrofotômetro. Foram utilizados controles da reação colorimétrica o branco do substrato e o branco da enzima.

A unidade enzimática foi estabelecida como a quantidade de enzima necessária para

liberar 1 μmol de produto e é expressa como unidade por grama de substrato seco (U/gss).

Resultados e Discussão:

Primeiramente, realizou-se o teste para determinação do agente umidificante mais eficaz na produção de CMCase por *T. stromaticum* na fermentação sólida do resíduo de pupunha. Os melhores resultados obtidos foram para os agentes AT e MMS-2, 3,8U/gss e 4,16U/gss, respectivamente. Como a diferença entre os valores foi considerada não significativa optou-se pelo uso da água de torneira como umidificante.

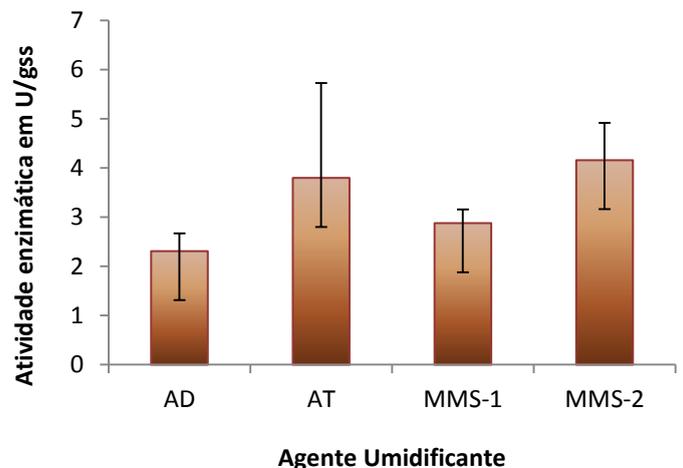


Gráfico 1: Atividade enzimática de CMCase produzida pelo *Trichoderma stromaticum* com o resíduo de pupunha e diferentes agentes umidificantes.

Posteriormente, realizou-se o teste para determinação da influência das fontes de nitrogênio na produção de celulase por *T. stromaticum* em fermentação sólida do resíduo de pupunha umidificado com água de torneira. O controle do experimento não possui nenhuma fonte de nitrogênio. A maior atividade obtida entre as fontes de nitrogênio inorgânicas foi de 41,08U/gss para o fosfato de amônio. Já entre as orgânicas o extrato de levedura apresentou 8,34U/gss. Em comparação ao controle que apresentou atividade de 4,59U/gss nota-se que a fonte de nitrogênio tem valor significativo na produção de CMCase.

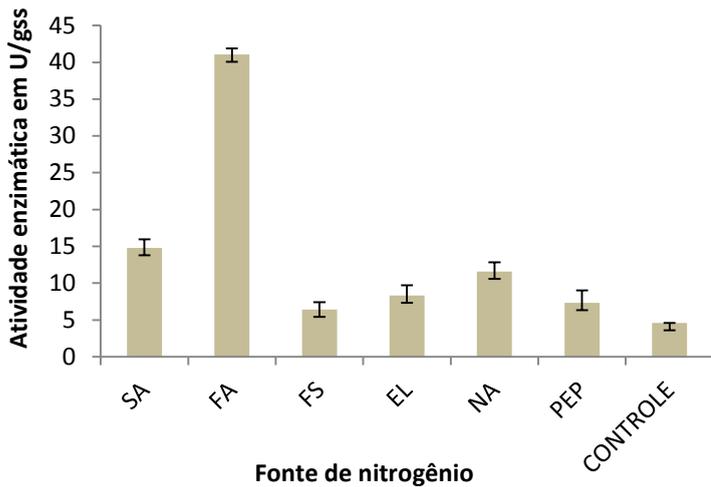


Gráfico 2: Atividade enzimática de CMCase produzida pelo *T. stromaticum* em fermentação sólida e diferentes fonte de nitrogênio.

Provavelmente, substâncias como cofatores enzimáticos e aminoácidos essenciais para a síntese protéica, foram obtidas no meio suplementado com a fonte de nitrogênio.

Segundo (PETERSON et al,2012) várias cepas de *Trichoderma spp* são utilizadas para produção de enzimas celulolíticas. Entretanto esse foi o primeiro relato da espécie *T. stromaticum* como produtor de celulases utilizando resíduo de pupunha como substrato.

Conclusões:

O resíduo de pupunha apresentou-se como ótima fonte indutora na produção de CMCase.

A composição do meio de fermentação influenciou na produção de enzimas pelo fungo testado. A adição de fosfato de amônio como fonte de nitrogênio, por exemplo, aumentou consideravelmente a produção de celulase.

Os resultados obtidos dão abertura a realização de outros experimentos para a otimização da produção de CMCase pelo fungo *Trichoderma stromaticum*.

A aplicação desse método de utilização de resíduos como adjunto biotecnológico apresentou resultados satisfatórios a nível laboratorial e possui potencial para reprodução em escalonamento industrial.

Referências bibliográficas:

MORO, J. R. **Manual Agricultura n. 87: Produção de palmito de pupunha.** Viçosa: CPT, 1996. 28p.

FERMINO, M. H.; GONÇALVES, R. S.; BATTISTIN, A.; SILVEIRA, J. R. P.; BUSNELLO, A. C.; TREVISAM, M. Aproveitamento dos resíduos da produção de conserva de palmito como substrato para plantas. **Horticultura Brasileira, Brasília**, v. 28, p. 282-286, 2010.

PELIZER, L. H.; PONTIRRI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, Chile, v.2, n.1, p.118 127, 2007.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica.** São Paulo: Sarvier, 1995.

HARTMEIER, W. **Immobilized biocatalysts: an introduction.** Berlin: Springer Verlag, 1988.

ORLANDELI, Ravelly Casarotti.; SPECIAN, Vânia.; FELBER, Aretusa Cristina.; PAMPHILE, João Alencar. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.97-109, set.-dez., 2012.

OJUMU T, V.; SOLOMON, B. O.; BETIKU, E.; LAYOKUN, S. K.; AMIGUN, B. Cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.2, n.6, p.150-52, 2003.

PETERSON, Robyn.; NEVALAINEN, Helena. *Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years of strain improvement. **Microbiology**. 158: 58-68. Janeiro, 2012

OLIVEIRA, Letícia Freire de. Resíduo do processamento de palmito de pupunha: Estudo físico, químico, tecnológico e toxicológico. **Pós-Graduação, em Ciências e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Goiás**, Goiânia, 2015.