



Influência do Meio Nutricional na Produção de Celulases em Fermentação Semi-Sólida do Bagaço de Cana-de-Açúcar por *Aspergillus niger*

Ursula Fabiola Rodríguez Zúñiga^{1,2}, Cristiane Sanchez Farinas², Francielle Midory Noda Gonçalves³, Victor Bertucci Neto¹, Sonia Couri⁴, Silvio Crestana¹.

¹Embrapa Instrumentação Agropecuária, CP 741, CEP: 13560-970, São Carlos, SP. ²Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo Itirapina CP. 292, CEP: 13.560-970 São Carlos, SP. ³Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química. CP 5790-CEP87020-900 - Maringá, PR. ⁴Embrapa Agroindústria de Alimentos, CP 29.501 Guaratiba, Rio de Janeiro/RJ, Brazil.

RESUMO

*A busca pela alta eficiência no processo de produção das enzimas celulases é de suma importância para contribuir com a viabilização da rota biológica de produção de etanol celulósico. Dada a crescente demanda pelo desenvolvimento de processos que melhorem o rendimento e desempenho dessas enzimas, a fermentação semi-sólida (FSS) e o uso de bagaço de cana-de-açúcar como substrato se inserem como uma alternativa de alto potencial para a redução de custos e produção de enzimas com elevada especificidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de celulases pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger* quando cultivado em FSS com bagaço de cana suplementado com três diferentes meios nutricionais complexos. As melhores produtividades registraram valores de 0,59U/g de FPase; 43U/g de xilanase e 41U/g de endoglicanase no meio Mandels com a adição de CMC. Esses resultados representaram aumentos na produtividade de até 20 vezes em função do acréscimo de fontes indutoras de carbono e nitrogênio, demonstrando que uma adequada formulação das mesmas é essencial para viabilizar a produção de celulases a partir de resíduos lignocelulósicos.*

Palavras-chave: Celulases, indutores, fermentação semi-sólida, *Aspergillus niger*, bagaço de cana-de-açúcar.

INTRODUÇÃO

O processamento da biomassa lignocelulósica para a produção de biocombustíveis envolve as etapas de pré-tratamento e hidrólise destes materiais com a subsequente fermentação dos açúcares produzidos. Embora a hidrólise enzimática seja considerada como o processo mais promissor para a produção de etanol celulósico devido às suas características operacionais e ambientais, a sua viabilidade econômica está fortemente relacionada ao custo das enzimas celulases utilizadas na deconstrução da biomassa (ZHANG et al., 2006).

Neste sentido, a tecnologia de fermentação semi-sólida (FSS) através do uso de resíduos lignocelulósicos como substrato para a produção enzimática, oferece uma alternativa na redução destes custos (PANDEY, 2002, CHANDRA et al., 2007). Com isto, a produção de celulases a partir do bagaço de cana-de-açúcar (BC), abundantemente gerado nas usinas de etanol representa um modelo de integração em termos de biorefinaria com vantagens associadas à manufatura de enzimas altamente específicas ao material a ser hidrolisado.



Como todo processo biotecnológico, a FSS é influenciada pelas condições de cultivo, como meio de cultura, tipo e concentração da fonte de carbono, nitrogênio e fósforo, pH, temperatura entre outras. O nível de umidade é um dos fatores determinantes do processo e varia de acordo com a natureza do substrato e necessidade do microrganismo (PANDEY, 2002). Níveis de umidade muito altos resultam na diminuição da porosidade, baixa difusão de oxigênio, aumento no risco de contaminação, redução no volume de gás e redução de troca gasosa. Baixos níveis de umidade levam a um crescimento baixo em relação ao ótimo e baixo grau de substrato realmente utilizado (LONSANE et al., 1985).

Diversos meios de suplementação são usados na literatura a fim de suprir os requerimentos nutricionais microbianos em termos de carbono, nitrogênio, fósforo, minerais e vitaminas são utilizados (AGUIAR & MENEZES, 2000). Em relação ao sistema celulolítico da maioria das linhagens fúngicas, este precisa ser induzido pela presença do substrato. Gong & Tsao (1975) reportaram diversas fontes de celulose complexa (ex. bagaço de cana e resíduos lignocelulósicos), gentibiose, sofrorose e lactose como indutoras da produção de celulasas em fermentação submersa. No entanto, a resposta das células fúngicas aos diferentes meios varia dependendo da concentração e tipo de indutor, tornando necessário o conhecimento das exigências nutricionais do microrganismo com o intuito de estimular uma efetiva biossíntese enzimática e atingir expressivas produtividades de celulasas.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção enzimática de celulasas pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* quando cultivado em fermentação semi-sólida com o BC suplementado com três diferentes meios nutricionais complexos: Czpaeck Dox (CHANDRA et al., 2007), Sacarose (PINTO, 1998) e o meio de Mandels (MANDELS & WEBER, 1969). A escolha do meio líquido foi realizada com base na literatura, sendo que estes meios selecionados são amplamente utilizados para produção de celulasas por fermentação submersa. Além disso, procurou-se suprir a deficiência do meio sólido da FSS a partir da análise da sua composição, a fim de avaliar a viabilidade da utilização do BC como substrato na FSS para a produção de celulasas.

MATERIAL E MÉTODOS

Substrato:

O bagaço de cana-de-açúcar (BC), proveniente de uma usina de etanol, foi moído e peneirado até uma granulometria 16 mesh. A fração selecionada para a FSS foi lavada em água corrente e seca em estufa a 60 °C até atingir massa constante.

Microrganismo de Fermentação:

O microrganismo empregado foi uma linhagem de *Aspergillus niger*, pertencente à coleção da Embrapa, RJ. Os esporos foram preservados em tubos de ensaio com tampas rosqueadas com solo estéril e estocados a -18 °C. A ativação aconteceu em duas etapas de transferência, segundo COURI (1993). A suspensão de esporos para inoculação foi preparada a partir de diluição salina do sabugo de milho e a sua quantificação obtida através de contagem dos esporos em Câmara de Neubauer.

Produção Enzimática:

No estudo das condições de produção das celulasas por FSS em BC verificou-se a influência de diferentes meios de suplementação: Sacarose (PINTO, 1998), Mandels (MANDELS & WEBER, 1969) e Czpaeck Dox (CHANDRA et al., 2007) cujas composições estão especificadas na Tabela 1.



Tabela 1: Composição dos meios usados para a produção de celulases a partir do BC por *A. niger*.

Meio	Componente	Concentração (g/L)
Mandels	Uréia	0,30
	Peptona	0,75
	Extrato de levedura	0,25
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,40
	Minerais ¹	2,70
Mandels + CMC	Carboximetilcelulose	5,00
Sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	20,0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,5
	Minerais ²	1,06
Czapeck Dox + CMC	Carboximetilcelulose	5,00
	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30,00
	NaNO ₃	2,00
	Minerais ³	2,00

¹. KH₂PO₄=2,00 g/l; MgSO₄.7H₂O=0,30 g/l; CaCl₂.2H₂O= 0,40 g/l; ZnSO₄=1,40 mg/l; FeSO₄.7H₂O=5,00 mg/l; CoCl₂.6H₂O=2,00 mg/l; MnSO₄.5H₂O=1,60 mg/l.

². KH₂PO₄=1,00 g/l; MgSO₄.7H₂O=0,50 g/l; KCl 0,1 g/l; ZnSO₄ 5,0 mg/l; FeSO₄.7H₂O 23,0 mg/l; CuSO₄.6H₂O 6,0 mg/l; MnSO₄.5H₂O 20,0 µg/l.

³. KH₂PO₄=1,00 g/l; MgSO₄.7H₂O=0,50 g/l; KCl=0,50 g/l; FeSO₄.7H₂O=0,01mg/l

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 500 mL contendo 5 g do BC. A umidade foi ajustada adicionando o meio de suplementação até atingir valores de 60%, 70% e 80%, em base úmida. Os frascos foram tampados com tampão e autoclavados a 1 atm por 15 min. O volume de suspensão de esporos adicionado foi ajustado de modo a ter-se um inóculo de 2×10^8 esporos por g de substrato sólido, posteriormente o meio de FSS foi incubado a 32°C em estufa úmida durante 72 horas segundo Rodríguez-Zúñiga et al. (2008). A extração do complexo enzimático foi realizada adicionando-se 10 mL/g de meio fermentado de tampão acetato 0,2 M pH 4,5 (COURI, 1993). Após homogeneização, as amostras foram incubadas em câmara rotativa por 1 h a 100 rpm a 30 °C e depois filtradas e centrifugadas. Os extratos assim obtidos foram submetidos a análises enzimáticas para determinar a sua concentração em relação à FPase, xilanase e endoglicanase (CMCase).

Determinação da Atividade Enzimática:

As atividades de celulase total e endoglicanase foram avaliadas segundo metodologias propostas por MANDELS (1974), utilizando-se como substratos papel de filtro e carboximetil celulose, respectivamente. A atividade de xilanase foi avaliada segundo BAILEY et al. (1992), usando se xilana como substrato. As quantidades de açúcares redutores produzidas, expressas em glicose, foram determinadas pelo método do ácido dinitrossalicílico, DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como aquela que libera um µmol do açúcar redutor correspondente por minuto a 50 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A escolha dos nutrientes necessários para se atingir as condições de cultivo apropriadas para determinado microrganismo é uma das etapas chaves do processo de fermentação. No

caso da produção de celulases, ainda existe muitas controvérsias em relação ao tipo e concentrações da fonte de carbono ideal para estimular a biossíntese enzimática.

Inicialmente neste trabalho, selecionou-se meios de cultivo já estabelecidos na literatura a fim de avaliar a viabilidade de se utilizar um sub-produto abundantemente disponível no país, o bagaço de cana-de-açúcar. A Figura 1 mostra os resultados da atividade FPase no extrato obtido com os diferentes teores de umidade inicial para todos os tipos de meios utilizados.

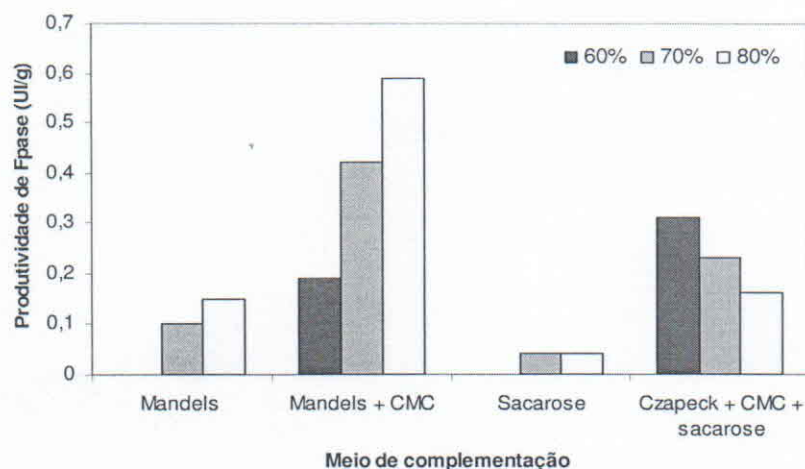


Figura 1. Efeito da umidade na a produção de FPase a partir do BC por *Aspergillus niger*.

Esse resultado mostrou o efeito positivo do aumento da umidade inicial na produção de celulases quando se usou BC e o meio de Mandels na FSS. Desta forma, a partir desses dados selecionou-se a condição de umidade de 80% para realizar a comparação em termos do complexo enzimático produzido utilizando os diferentes meios de complementação nutricional (Figura 2).

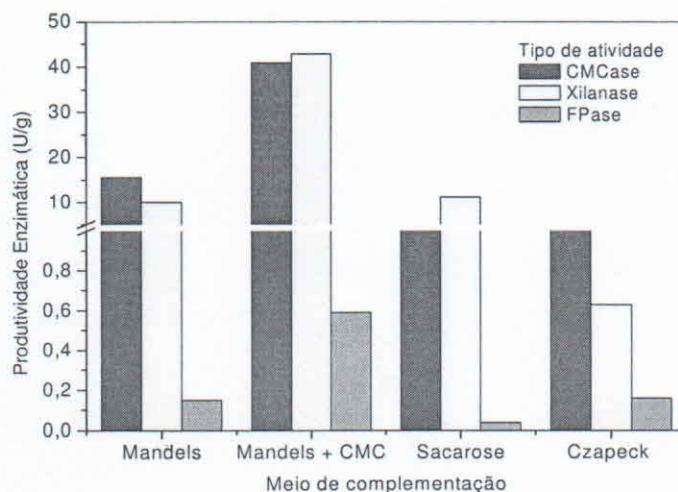


Figura 2. Efeito do meio nutricional na a produtividade enzimática por *Aspergillus niger* em BC.



Para todas as enzimas do complexo celulásico quantificadas, os melhores resultados foram obtidos utilizando o meio de Mandels com a adição de CMC (Figura 2). Como condição de controle em relação à suplementação da fonte de carbono do BC utilizou-se o meio de Mandels. Neste caso, foi possível observar o efeito positivo da adição de CMC ao meio, atuando como um indutor. Atividades de FPase (0,59 U/g) superiores ao dobro em relação ao meio Mandels usado como controle foram alcançadas após 72 horas de fermentação.

O efeito indutivo foi ainda mais expressivo nas atividades de endoglicanase e xilanase, (40,99 e 42,97 UI/g, respectivamente) cujos valores obtidos foram entre cerca de 3 e 4 vezes as atividades obtidas utilizando o meio controle (15,57 e 9,98 UI/g, respectivamente).

A suplementação da fonte de carbono com sacarose (contida nos meios Czapeck-Dox e Sacarose, Tabela 1) foi baseada em dados da literatura: Chen & Wyman (1991) e Chandra et al (2007) reportaram que a adição de açúcares solúveis (sacarose, glicose, etc.) favoreceu o crescimento inicial de massa celular e com isto obteve-se uma produção mais eficiente de celulases. Da mesma forma, Olsson et al. (2003) usaram uma combinação de celulose e polpa de beterraba pré-tratada (fonte de sacarose) para potencializar a produção de endoglicanases.

No entanto, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se observar que a presença da sacarose no meio nas concentrações estabelecidas não favoreceu a produção enzimática, quando comparado ao meio de Mandels (Figura 2). Provavelmente, a relação sacarose/celulose não foi adequada para permitir o mencionado aumento da produtividade, evidenciando a necessidade da sua otimização.

No caso dos meios avaliados contendo sacarose, a presença do indutor CMC (meio Czapeck-Dox) não foi suficiente para compensar o efeito repressor apresentado pela sacarose. Esses resultados corroboram com o trabalho de Suto e Tomita (2001), no qual os autores descrevem que o sistema celulolítico é suscetível à repressão catabólica na presença de açúcares simples como glicose, maltose, arabinose, etc.

É relevante mencionar que a presença de diversas fontes de nitrogênio orgânico no meio de Mandels (uréia, peptona, extrato de levedura) certamente intensificou as produtividades alcançadas. Kowala & Sengupta (1992) avaliaram a seletividade do microrganismo *Aspergillus niger* por diversas fontes suplementares de nitrogênio, os resultados expressos em função do crescimento e síntese de celulases seguiram a seguinte seqüência: Uréia>peptona>NaNO₃>extrato de levedura.

Contudo, as condições mais favoráveis do presente estudo permitiram atingir valores de 0,59 FPU/g de FPase; 43 U/g de xilanase e 41 U/g de endoglicanase para a FSS do *Aspergillus niger* em BC. Estes resultados serão futuramente aprimorados após um planejamento experimental visando uma adequada seleção dos tipos e concentrações das fontes suplementares de carbono, nitrogênio e fósforo, bem como da seleção das condições operacionais relevantes da FSS.

CONCLUSÕES

Entre os meios nutricionais avaliados, o meio de Mandels com a adição de CMC se destacou como a melhor meio de suplementação ao BC na produtividade celulásica em FSS. Os meios que continham sacarose (Czapeck-Dox e Sacarose) resultaram nas menores produtividades. A partir da suplementação das carências nutricionais bagaço de cana-de-açúcar, pode-se verificar o seu potencial uso como substrato na produção de celulases com



elevada especificidade na hidrólise dos resíduos da cadeia de etanol. Finalmente, o conhecimento de uma adequada formulação do meio de cultura com oligossacarídeos e substâncias nitrogenadas orgânicas e inorgânicas permitirá fornecer bases científicas para a viabilização da produção de celulases em grande escala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Aguiar, C. L. e Menezes, T. J. (2000), Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* iz9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar, *CEPPA, Curitiba*, v. 25, p 61-76.
- Bailey, M. J.; Biely, P.; Poutanen, K. (1992), Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, v. 23, p. 257270.
- Chandra, M. S.; Viswanath, B., e Reddy, B. R. (2007), Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. *Indian Journal of Microbiology*, v.47, p. 323-328.
- Chen, S. e Wyman, M. (1991). Cellulase production induced by carbon sources derived from waste newspaper. *Process Biochemistry*, v. 26, p. 93-100.
- Couri, S. (1993), Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- Gong, C. S., Tsao, G. T. (1975), Cellulase and biosynthesis regulation. *Annual Reports on Fermentation Process*, v. 3, p. 111-139.
- Khowala S, Sengupta S. (1992), Secretion of 6- β glucosidase by *Termitomyces clypeatus*: Regulation by carbon catabolic products. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 14, p. 144-149.
- Lonsane, B. K., Ghidyal, N. P., Budiartman, S., Ramakrishna, J. (1985), Engineering aspects of solid state fermentation. *Enz. Microbiol. Technol.*, v. 7, p. 285.
- Mandels, M. e Weber, J. (1969), The production of cellulases. *Advances in Chemistry Series*, v. 95, p. 391-414.
- Mandels, M. (1974), *Production and application of cellulase*. Massachusetts: Laboratory Procedures, Army Natick Laboratories.
- Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428.
- Olsson, L., Christensen Tove, M. I. E., Hansen Kim, P., & Palmquist Eva, A. (2003), Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 612-619.
- Pandey, A. (2002), Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 3636, p. 1-4.
- Pinto, G. A. S. (1998), Produção de uma mistura hidrolítica por *Aspergillus niger* 3T5B8 em fermentação submersa. *Tese Mestrado*, Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- Rodríguez-Zúñiga, U.F.; Lemo, V.; Farinas, C.S.; Bertucci Neto, V.; Couri, S. (2008) Evaluation of agroindustrial residues as substrates for cellulolytic enzymes production under solid state fermentation. *VII Encontro da SBPMat (Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais)*, Guarujá, v. 1. p. 134.
- Singhanian, R. R.; Patel, A. K.; Soccol, C. R.; Pandey, A. (2009), Recent advances in solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, p.13-18.
- Suto M; Tomita F. (2001) Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 92, p 305-11.
- Zhang, Y.H.P., Himmel, M.E., Mielenz, J. R. (2006) Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, v. 24, p. 452-481.