

PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Fomitella supina* UTILIZANDO CASCA DE COCO E FARELO DE TRIGO COMO FONTES INDUTORAS

Fernando Rocha Santana¹; Hélio Mitoshi Kamida²; Aline Simões da Rocha Bispo³; Islândia Ramos dos Anjos⁴

1. Bolsista PIBIC/FAPESB, graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: frsantana.uefs@gmail.com

2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: hmkamida@terra.com.br

3. Participante do projeto, doutoranda em Biotecnologia, Universidade Estadual de Santana, e-mail: alinesimoesbispo@gmail.com

4. Bolsista PIBIC/CNPq, graduando Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: islandia.r@hotmail.com

PALAVRAS CHAVES: Biotecnologia, Celulases, Planejamento fatorial

INTRODUÇÃO

Fungos são organismos de grande importância ecológica, participando da ciclagem de nutrientes no meio ambiente, pela decomposição da matéria orgânica. Dentre a grande diversidade de fungos basidiomicetos, o fungo *Fomitella supina* tem sido pouco estudado e não há relatos na literatura sobre seu potencial para produção de algumas enzimas. As enzimas celulolíticas, responsáveis pela hidrólise da celulose, constituem o segundo grupo de carboidratos mais explorados comercialmente. A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo (Bayer and Lamed, 1992). Graças à eficiência e à especificidade de ação das enzimas a ao seu apelo ambiental, a utilização de celulases em processos de hidrólise ganha cada vez mais importância em vários setores da indústria química e na agricultura (Van de Wyk, 1999; Lee; Park, 1999). Dentre várias aplicações de celulases, pode ser destacada sua utilização nas indústrias de detergentes, têxtil, de polpa de celulose e de papel, entre outros (Lynd et al., 1999; Ramos et al., 1999). As celulases fúngicas têm sido as mais estudadas e exploradas industrialmente, apesar da grande parte dos trabalhos estarem voltadas para obtenção de enzimas de *Trichoderma reesei*, muitas outras espécies têm apresentado bom potencial para produção de enzimas celulolíticas (Romero et al., 1999). Portanto esse trabalho tem como objetivo o estudo da potencialidade do fungo *Fomitella supina* para produção de celulases utilizando resíduos lignocelulósicos como substrato.

MATERIAIS E MÉTODOS

O fungo *F. supina* foi doado pela Coleção de Culturas de Micro-organismos da Bahia (CCMB), localizada na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Para reativação foi utilizado o meio extrato de Malte- Levedura (Ágar- 20%, Extrato de malte 15% e Extrato de levedura- 2%) em placas de Petri, incubadas a 28°C durante sete dias. Após este período, o experimento foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 200 mL contendo diferentes combinações de resíduo de casca de coco (*Cocos nucifera*), utilizado como fonte de carbono, e farelo de trigo (*Triticum sp.*), utilizado como fonte de nitrogênio (Tabela 1), através do planejamento composto central rotacional (DCCR), ou seja, um 2² incluindo 4 ensaios nas

condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, em fermentação em estado sólido a 28°C. A umidade foi ajustada com água destilada para 85% e a relação C/N foi mantida 30/1 em todos os ensaios.

A atividade enzimática das celulasas foi determinada através da quantificação dos açúcares redutores pelo método do DNS (ácido dinitrosalicílico), utilizando carboximetilcelulose (CMC) 2% (p/v) sal sódico em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) a 50°C por 20 minutos (Miller, 1959) e as leituras da absorbância em espectrofotômetro UV-Vis (Spectrum SP-2000 UV) a 540nm. Uma unidade de atividade enzimática corresponde à liberação de 1µmol de produto por minuto, nas condições dos ensaios.

Tabela 1- Valores codificados utilizados no DCCR para produção de celulasas

| Variáveis/Níveis | -1,41 | -1 | 0 | +1 | +1,41 |
|------------------|-------|-------|------|-------|-------|
| Fonte de C (g) | 1 | 1,58 | 3 | 4,42 | 5 |
| Fonte de N (g) | 0,593 | 0,937 | 1,78 | 2,622 | 2,967 |

RESULTADOS

Os ensaios 9, 10 e 11, correspondentes aos pontos centrais, apresentaram as melhores respostas para atividade. Estudos mostram que as concentrações das fontes de carbono e nitrogênio foram identificadas como sendo um dos principais fatores que afetam a produção de celulasas por micro-organismos. Assim sendo, estas variáveis, foram combinadas, utilizando diferentes concentrações de meio de cultivo. As análises foram conduzidas com os sobrenadantes obtidos no décimo quarto dia de fermentação. A melhor produção de CMCCase (0,87 U/mL) foi observada no ensaio 9, quando foi utilizado as concentrações [60% (p/v)] para os resíduos, ou seja, 3g de casca de coco e 1,78g do farelo de trigo (Tabela 2).

Tabela 2- Matriz do delineamento e respostas para produção de celulasas

| Ensaio | Fonte de C | Fonte de N | Ativ.CMCCase (U/mL) |
|--------|------------|------------|---------------------|
| 1 | -1 | -1 | 0 |
| 2 | +1 | -1 | 0 |
| 3 | -1 | +1 | 0 |
| 4 | +1 | +1 | 0 |
| 5 | -1,41 | 0 | 0 |
| 6 | +1,41 | 0 | 0,02 |
| 7 | 0 | -1,41 | 0,10 |
| 8 | 0 | +1,41 | 0,19 |
| 9 | 0 | 0 | 0,87 |
| 10 | 0 | 0 | 0,86 |
| 11 | 0 | 0 | 0,86 |

A análise de variância (ANOVA) mostrou que os valores de *p* observados para as fontes de C e N (quadrático) estão abaixo do nível de significância (0,5) estabelecido para as análises, indicando serem estes fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança. O

modelo forneceu um coeficiente de regressão, R^2 de 99%, o que garante a reprodutibilidade do modelo. A superfície de resposta para estimar a atividade celulásica sobre as variáveis independentes casca de coco e farelo de trigo, pode ser observada na Figura 1.

Como não há relatos na literatura sobre a produção de enzimas pelo *Fomitella supina*, a comparação com outros basidiomicetos permite afirmar que os valores obtidos neste estudo estão dentro daqueles valores observados para os mesmos, porém estudos mais aprofundados, para validação e otimização do processo de produção serão realizados.

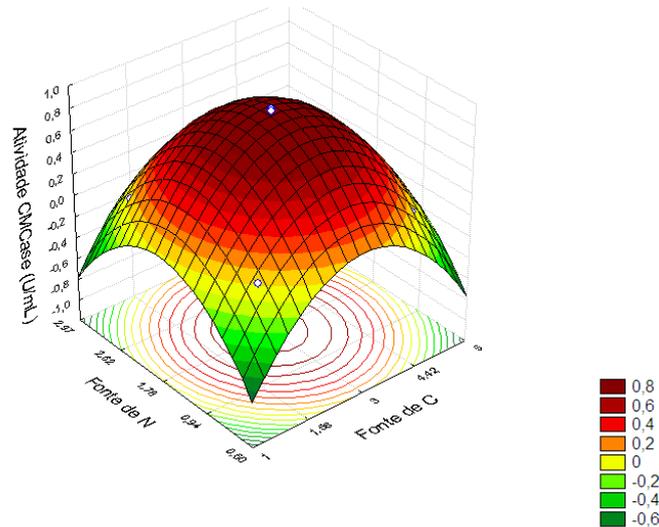


Figura 1- Superfície de resposta em função das fontes de C e N para atividade enzimática das celulases produzidas por *F. supina*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos posteriores serão realizados para testar a produção de celulase pelo fungo *F. supina* em diferentes condições com as mesmas variáveis e também com diferentes planejamentos, a fim de se obter uma maior produção da enzima pelo fungo. Esse estudo poderá ser utilizado por outros pesquisadores que tenham interesse em trabalhar com a mesma espécie, visto que são escassos registros na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAYER, E. A. & lamed, r. 1992. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? *Biodegradation* 3:171-188.

LYND, L. R.; wyman, c. E.; gencross, t. U. 1999. Biocomodicty engineering. *Biotechnol. Progress*, 15: 777- 793.

MILLER, L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* V. 31, pp. 426-428, 1959.

ROMERO, M. D.; aguado, j.; gonzález, l; ladero, m. 1999. Celullase production by *neurospora crassa* on wheat straw. *Enz. Microb. Technol.*, 25: 244- 250.

VAN DE WILK, J. P. H. 1999. Hydrolysis of pretreated paper materials by different concentrations of cellulase from *penicillium funiculosum*. *Biores. Technol.*, 69: 269- 273.