

AVALIAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ENZIMA CELULOLÍTICAS A PARTIR DA CULTURA DE ASPERGILLUS NIGER EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

André Vinícius Acipreste Ribeiro¹, Aurélio Antônio Martins de Melo Santos², Marcelo Andrade de Godoy³, Rafael Luiz Temóteo⁴, Adriana Maria Patarroyo Vargas⁵

Resumo: *Os objetivos deste trabalho foram produzir, caracterizar e avaliar enzimas produzidas pelo fungo Aspergillus niger, utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados foram alcançados por meio de etapas e métodos, como a caracterização bioquímica das enzimas quanto ao pH e à temperatura ótimos delas. Também, objetivaram-se determinar o teor de proteínas pelo Método de Bradford, assim como da atividade enzimática, e propor métodos para a purificação das enzimas obtidas.*

Palavras-chave: *Atividade enzimática, caracterização bioquímica, métodos, pH, temperatura.*

Introdução

A biomassa lignocelulósica é abundante, apresenta baixo custo e tem sido vista como fonte promissora para a produção de biocombustíveis (Galbe & Zacchi, 2002; Gomez et al., 2008). Contudo, os resíduos lignocelulósicos agrícolas apresentam composição físico-química complexa, que oferece resistência ao ataque químico ou bioquímico e dificulta a conversão desses, mediante a hidrólise, em materiais com alto valor agregado (Champagne, 2008).

Grande variedade de microrganismos tem sido usada para cultivo em bagaço de cana, com o objetivo de produção de celulasas (Pandey et al., 2000). Atualmente, as linhagens mais utilizadas para a produção de enzimas

¹Graduando do Curso de Engenharia Química – FACISA/UNIVIÇOSA. E-mail: avacipreste@gmail.com.

⁵Professora do Curso de Farmácia e Engenharia Química – FACISA/UNIVIÇOSA. E-mail: email2@grandemail.com

celulolíticas são as do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* (YUE; JIAN-XIN; LI-WEI, 2009). Pesquisas envolvendo potenciais fontes de enzimas são recorrentes, e uma delas está a investigação de novos microrganismos potenciais produtores de celulasas e xilanases, necessária para solubilização completa e efetiva do material lignocelulósico (DAS; ROYER; LEFF, 2007).

Aspergillus niger é fonte de celulase destinada principalmente ao uso alimentício e suas enzimas são concentradas e parcialmente purificadas antes de serem comercializadas (BIGELIS, 1993), podendo ser considerado, algumas vezes, superior aos outros fungos, reconhecidamente bons produtores dos complexos celulolíticos e hemicelulolíticos (GOKHALE, 1986).

Este trabalho teve como objetivos produzir, caracterizar e avaliar as enzimas produzidas por *Aspergillus niger* por meio do bagaço de cana-de-açúcar.

Material e Métodos

Coleta da matéria-prima

Coletaram-se bagaços de cana provenientes de uma lanchonete do município de Viçosa, MG. A cana foi lavada em água corrente e deixada de molho durante 10 min, repetindo-se o processo. Depois de lavada, deixou-se secar ao ar livre, por cerca de 12h.

O bagaço coletado foi seco em estufa de ar circulante, a 40°C, durante 72h. Posteriormente, o material foi triturado em moinho de facas e peneirado, obtendo-se o extrato bruto, que foi conservado.

Coleta e Cultivo dos fungos

Os fungos foram coletados na região de Viçosa, dentro dos limites da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde (FACISA/Univçosa). Realizaram-se as coletas em solo e registraram-se as datas, as horas e a temperatura ambiente no momento de cada coleta. A manutenção do fungo foi feita em meio de cultura ágar a 4 °C com repicagens periódicas (AGUIAR, 2011).

Efetuuou-se a análise da presença do fungo no extrato coletado no

Laboratório de Microbiologia da Univiçosa pela técnica de plaqueamento direto em Placas de Petri, contendo meio de cultura ágar acidificado.

De acordo com a metodologia seguida por Oliveira (2011), coletaram-se cerca de 10 g do extrato bruto para cada amostra a ser analisada, onde cada amostra foi submetida a diluições seriadas em 90 mL de água peptonada 10-3. Por meio da técnica de *pour plate* (técnica de contagem), alíquotas de 1mL de cada diluição foram inoculadas em 15 mL do meio ágar acidificado fundido, seguido de homogeneização. Após a solidificação do ágar, as placas foram invertidas e incubadas durante sete dias, a 25 °C. Posteriormente, contaram-se as colônias, e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

Isolamento e identificação do fungo

Fez-se a investigação da presença de *Aspergillus niger* a partir da detecção de colônias típicas do gênero *Aspergillus* nos cultivos fúngicos, pela técnica do ponto central, onde, com o auxílio de um fio de platina, foi inoculada uma amostra de uma colônia suspeita na parte central de uma placa de Petri, contendo meio ágar acidificado, seguido de incubação a 25 °C por sete dias. Na observação morfológica da colônia, avaliaram-se a textura e coloração da superfície e do reverso.

A análise das características microscópicas seguiu a técnica de microcultivo (técnica de *slides*) entre lâmina e lamínula (Sutton, 1980). Para tanto, realizou-se o repique das colônias suspeitas no centro de um bloco de 1 cm² de ágar acidificado, depositado sobre uma lâmina estéril e coberto com uma lamínula estéril. Cada lâmina foi depositada sobre um suporte de vidro, no interior de uma placa de Petri, contendo, no fundo, um papel umedecido em água destilada, todos previamente esterilizados, seguindo-se de incubação a 25 °C por três dias. Após o período de cultivo, as lamínulas foram coradas com lactofenol azul de algodão e observadas sob microscópio óptico. A identificação do gênero foi efetuada a partir da chave de classificação dos fungos deteriorantes comuns em alimentos.

Centrifugação

Após a esterilização, os frascos foram inoculados com três discos de micélio fúngico e incubados por 30 dias a 30 °C, sem agitação (cultivo estacionário). Coletaram-se amostras em triplicatas a cada cinco dias, a partir do quinto dia de incubação até o 30º dia. O fluido extracelular cultivado foi centrifugado a 4 °C por 15 min. Os sobrenadantes foram utilizados como extrato enzimático bruto.

Determinação do Teor de Proteínas Totais

A determinação da concentração de proteína se deu pelo método de Bradford (1976). Esse método baseia-se na interação entre o corante *Coomassie Brilliant Blue G 250 (Sigma-Aldrich)* e as macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alta massa molecular e o corante BG-250 (reagente de Bradford) provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve em 595 nm. O cálculo para a dosagem de proteínas foi feito a partir de uma curva de calibração com o padrão soroalbumina bovina da *Sigma-Aldrich* na faixa de 0,01-0,2 mg/mL.

Efetuuou-se a quantificação do teor de proteínas pelo método de Bradford com 1 mL do reagente de Bradford mais 0,1 mL da amostra, que permaneceram incubados por 5 min. Após o período de incubação, realizou-se a leitura das amostras em cubetas para espectrofotômetro de 1,5 mL no espectrofotômetro a 595nm. As análises foram feitas em triplicata.

Determinação da atividade enzimática – Metodologia de atividade enzima celulolítica pelo método DNS

As concentrações de açúcares redutores foram determinadas pelo método do ácido Dinitrosalicílico (DNS), descrito por Miller (1959), e obtiveram-se as curvas-padrão de açúcares redutores fazendo-se leituras em $\lambda=540\text{nm}$ no espectrofotômetro. Os resultados de atividade enzimática foram expressos em U mL⁻¹.

Estudo da Estabilidade

- pH

As enzimas têm um pH ótimo (ou um intervalo de pH), onde a sua atividade é máxima. Em um pH maior ou menor, a atividade diminui (LEHNINGER, 1977).

No estudo das enzimas, torna-se extremamente importante determinar no início da investigação o pH ótimo e a extensão de seu platô. A mistura de reação pode então ser cuidadosamente controlada com tampões de capacidade tamponante adequada (CONN e STUMPF, 1975).

Controlaram-se os níveis de pH (1-8) pelas reações-tampão para determinar qual o pH ótimo da enzima obtida.

- Temperatura (termoestabilidade)

As amostras foram encubadas em banho-maria em diferentes temperaturas (30-40 °C).

Resultados e Discussão

Esperaram-se obter ao final desta pesquisa as enzimas celulasas e xilanases, que são boas para utilização nas indústrias alimentícias. Ao se obterem as enzimas, realizaram-se testes para testar a atividade enzimática delas e determinar o pH ótimo e a temperatura que melhor proporciona um crescimento enzimático. Ao final, propuseram-se metodologias para a purificação delas.

Conclusões

Por meio dos testes que foram realizados, esperaram-se obter pelo menos um tipo de enzima e realizar metodologias de purificação e identificação dessa, como a precipitação fracionada com sulfato de amônio, cromatografia de exclusão molecular, cromatografia de troca iônica e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Referências Bibliográficas

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CONN, E.E.; STUMPF, P.K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 1975. cap 8 . p. 139-152.

CORTÊS, M. V. C. B. Purificação e caracterização parcial de uma enzima lacase (EC 1.10.3.2) extracelular obtida através de fermentação em fase sólida. **Revista Anhanguera**, n. 11, p. 9-21, 2010.

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

SLIVINSKI, C. T. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido**. 2007. 128f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Ponta Grossa, Ponta Grossa. 2007.

Como citar esse trabalho:

RIBEIRO, A. V. A.; SANTOS, A. A. M. M.; GODOY, M. A.; TEMÓTEO, R. L.; VARGAS, A. M. P. Avaliação da produção de enzima celulolítica a partir da cultura de *Aspergillus niger* em bagaço de cana-de-açúcar. In: VI SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE, 6, 2014, Viçosa. **Anais...** Viçosa: FACISA, Outubro, 2014.