

## PRODUÇÃO DE ENZIMAS A PARTIR DE FUNGOS *TRICHODERMA* SP. ENCONTRADOS NA REGIÃO DO NORTE DE MINAS GERAIS

SILVEIRA, V.G.S.<sup>1</sup>; BRITTO, L.M.S.<sup>2</sup>; MAIA, H. A.R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Discente do curso de Engenharia de Alimentos do IFNMG – *campus* Salinas; <sup>2</sup>Discente do curso de Ciências Biológicas do IFNMG – *campus* Salinas; <sup>3</sup>Docente do IFNMG – *campus* Salinas.

Palavras chaves: Celulase; Fermentação submersa; Bagaço-de-cana; Método de Kjeldahl

### Introdução

O bagaço de cana-de-açúcar, é um dos mais abundantes subprodutos derivados da indústria sucroalcooleira, sendo um resíduo fibroso do colmo, é classificado como resíduo do processo de obtenção do caldo de cana para produção de açúcar e álcool. Ao ser hidrolisado, o produto apresenta uma fase líquida, constituída principalmente de glicose e xilose, entre outros açúcares (Bocchini et al., 2002).

Os fungos filamentosos mais comumente utilizados são os fungos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus*, tendo como produção principal as enzimas celulases, sendo essas formadas por três componentes principais: as exoglucanases ou celobiohidrolases; as endoglucanases ou celodextrinases; e as celobiasas ou  $\beta$ -glicosidasases, entretanto, essas últimas não são consideradas como celulases legítimas, mesmo desempenhando um importante papel na hidrólise da celulose (Martins et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade enzimática e enriquecimento proteico, a partir da produção por fungos do gênero *Trichoderma*, em fermentação submersa, analisando as variáveis que influenciam na produção de celulases usando o bagaço de cana-de-açúcar como substrato.

### Metodologia

As análises de determinação da concentração de enzimas foram realizadas nos Laboratórios de Microbiologia, Bromatologia e Físico-química do Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (IFNMG) – *campus* Salinas.

### Material

O microrganismo foi adquirido a partir de materiais provenientes de animais ruminantes, sendo esses materiais obtidos com ajuda de alunos do curso de Medicina Veterinária. Os meios de cultura, reagentes e materiais necessários para o desenvolvimento do projeto foram obtidos e disponibilizados pelo Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (IFNMG) - *campus* Salinas

### Métodos

O fungo teve sua manutenção a partir de repiques periódicos a cada três meses em meio Batata, Dextrose, Agar (BDA).

A produção das enzimas se deu a partir de fermentação submersa durante 10 dias em banho maria com agitação a 100 rpm, onde as amostras foram retiradas nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8 e 10. A fermentação sucedeu em meio contendo 0,5 g da fonte de carbono acondicionada em pequenos

sacos de tecido não tecido (TNT), juntamente com 25 mL de caldo Sabouraud e 0,025 mL de Ureia como fonte de nitrogênio.

O processo de fermentação ocorreu em tubos Falcon de 50 mL, auto clavados, utilizando uma suspensão do fungo *Trichoderma sp.* padronizado a um volume de 5ml, conforme a metodologia descrita por Rizzatti et al., (2001). Após o término das fermentações, as amostras foram centrifugadas a 4.000 g no período de 10 minutos, para obtenção do extrato enzimático.

A determinação da massa fúngica se deu de forma direta em balança analítica, após a secagem da mesma em placa de Petri em estufa a 40° C. A degradação do substrato foi obtida a partir da formula de % de degradação considerando os pesos iniciais e finais das amostras e de seus controles.

Para determinação de proteínas foi utilizado o método de Kjeldahl, descrito por CECCHI (2003) e a partir disso, foi possível a determinação do nitrogênio bruto utilizando a seguinte formula:  $NT = ((Va - Vb) \times F \times 0,1 \times 0,014 \times 100) / P1$ , onde NT é a porcentagem de nitrogênio total na amostra, Va é o volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra, Vb é o volume da mesma solução gasto na titulação do branco, sendo considerado 0,25 ml, F é o fator de correção do ácido clorídrico, considerando-se 0,1 mol/L, e P1 é a massa da amostra em gramas. Para a determinação da proteína total, o valor do nitrogênio total encontrado pelo método anterior foi multiplicado pelo fator conversão do nitrogênio em proteína, que é igual a 5,77.

## Resultados e discussão

A partir da análise do Gráfico 1 e dos resultados da Tabela 1, observa-se um aumento do percentual de degradação de forma lenta, seguido de um intenso aumento entre o segundo e o sexto dia de fermentação, e que, ao final apresenta uma pequena diferença nos valores que se seguem. Gerando um comportamento linear, assim como expressa a equação  $y = 0,0701x - 0,022$ , com um  $R^2 = 0,9157$ , onde x é a quantidade de dias envolvidos na análise e y o percentual de degradação.

Em relação ao Gráfico 2, evidencia-se um crescimento lento até o quarto dia e um grande salto de produção entre o quarto e o sexto dia, obtendo valores quase constantes ao final das observações. A partir disso, a equação linear se ajustou da melhor forma a essa curva, com um  $R^2 = 0,8263$ , produzindo a seguinte equação:  $y = 2,1694x + 8,2895$ , relacionando a variável “x” ao tempo, em dias, de fermentação e resultando na quantidade, em µg, de proteínas totais.

Para o comportamento do Gráfico 3, é possível notar um aumento até o sexto dia, onde entre o sexto e o oitavo dia apresenta-se diminuição na taxa de crescimento e, posteriormente, um decaimento desses valores até o décimo dia. Um comportamento quadrático se ajustou com um  $R^2 = 0,987$  a essa curva, expressando seus valores a partir da equação  $y = -1,38x^2 + 18,968x + 2,545$ , a qual relaciona os dias de fermentação em x e retorna a massa, em mg, de fungo presente no meio.

A partir dos dados da Tabela 1, foi possível estabelecer uma correlação a partir do coeficiente de correlação de Pearson, o qual resultou em 0,9816, onde nota-se que existe uma forte correlação positiva entre a porcentagem de degradação do substrato e a quantidade de proteínas presente nas amostras. Tal correlação também foi observada, utilizando o mesmo método, entre os valores de massa fúngica e os valores de proteínas totais, resultando em um coeficiente de correlação igual a 0,7059. Ambos os resultados evidenciam a produção e a atividade enzimática realizada pelo fungo *Trichoderma sp.* na degradação do bagaço de cana-de-açúcar.

Entretanto, observando os valores da massa fúngica tabelados, nota-se que para o tempo 0 foi registrado um teor de massa igual a 0 mg, mesmo que tenha sido inoculado 5 ml do fungo conforme a metodologia descrita no trabalho. O motivo de tal discrepância se deve, possivelmente, a degradação, por temperatura, desse inóculo não desenvolvido, no momento da extração em centrifuga não-refrigerada.

Portanto, é importante evidenciar que os valores de correlação entre a massa fúngica, a degradação do substrato, a quantidade de proteínas totais e, conseqüentemente, a atividade enzimática do fungo, certamente são maiores que os apresentados anteriormente.

## Considerações finais

O desempenho do *Trichoderma sp.* em relação a sua atividade enzimática na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, mostra-se bastante promissor, visto que foi constatada uma degradação de 60% do substrato, com uma variação percentual de 175% do valor inicial de proteínas no período de observação. Utilizando de alternativas de controle das condições do meio de fermentação e do fungo em escala industrial, torna-se possível uma futura produção enzimática a partir de materiais lignocelulósicos, possivelmente mais econômica e passível a utilização em diversos setores, como na produção de bebidas e também na nutrição animal.

## Referências

BOCCHINI, D.A.; ALVES-PRADO, H.F.; BAIDA, L.C.; ROBERTO, I.C.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology.

**Process Biochemistry**, v.38, p.727-731, 2002.

CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em análises de alimentos. 2. Ed. Campinas, SP: Unicamp, 2003.

MARTINS, L.F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P.; RAMOS, L.P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to the inactivity against various cellulosic substrates.

**Bioresource Technology**, v.99, p.1417-1424, 2008.

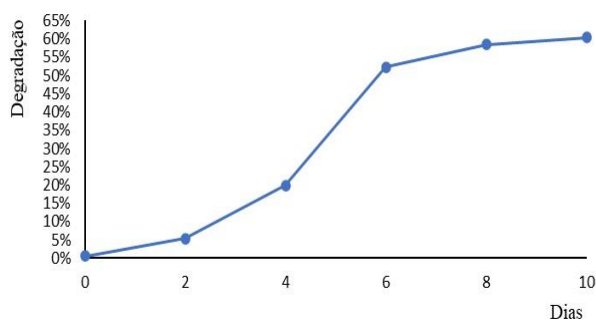
RIZZATTI, A.; JORGE, J.; TERENCE, H.; et al. Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *J Ind Microbiol Biotech* 26, 156–160 (2001).

**Tabela 1** – Resultados das análises

Dias de coleta	Degradação do substrato	Proteínas Totais ( $\mu\text{g/ml}$ )	Massa fúngica (mg)
0	1%	10,13	0,0
2	5%	11,01	40,17
4	20%	11,88	54,91
6	52%	26,88	65,14
8	58%	27,03	65,19
10	60%	27,89	55,29

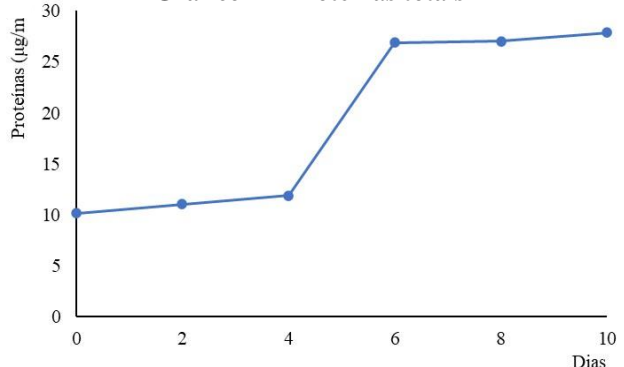
Fonte: Arquivo Pessoal (2022)

**Gráfico 1** – Percentual de degradação do substrato



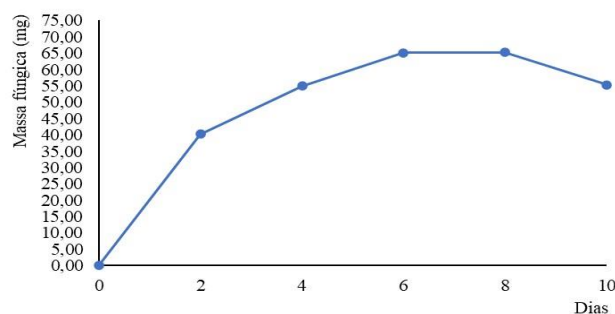
Fonte: Arquivo Pessoal (2022)

**Gráfico 2** – Proteínas totais



Fonte: Arquivo Pessoal (2022)

**Gráfico 3** – Massa fúngica



Fonte: Arquivo Pessoal (2022)