

# OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES PELO FUNGO *ANNULOHYPOXYLON STYGIUM* PARA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

Guilherme Bucci Dias<sup>1</sup>, Andreia de Araújo Morandim-Giannetti<sup>2</sup>  
Departamento de Engenharia Química, Centro Universitário FEI  
guilhermebuccid@gmail.com; preamorandim@fei.edu.br

**Resumo:** Fungos têm se mostrado eficientes fontes para obtenção de enzimas devido ao rápido crescimento e possibilidade de aumento da produção. Assim, neste trabalho foram otimizadas as condições de produção de celulases a partir do fungo *Annulohyphoxylon stygium* isolado a partir de caules de mandioca variando-se o tempo e a temperatura de fermentação. O tempo ideal foi de 14 dias a temperatura de 22°C. A avaliação da fonte de carbono mostrou uma maior produção de celulases utilizando-se bagaço de cana.

## 1. Introdução

A busca por biocombustíveis tem crescido significativamente nos últimos anos devido ao forte apelo ambiental pela redução do uso de combustíveis fósseis. Neste cenário, o bioetanol se mostra um biocombustível promissor devido à grande diversidade de matérias primas para sua obtenção tanto a partir de fontes direta de açúcar (bioetanol 1G) ou a partir de resíduos lignocelulósicos (bioetanol 2G)

Destes, para a produção de bioetanol 2G, várias etapas são necessárias para a obtenção dos açúcares fermentescíveis sendo as etapas principais o pré-tratamento do material lignocelulósico, a etapa de hidrólise e, por último, a fermentação. Com relação ao pré-tratamento, atualmente os mais utilizados são os tratamentos básicos, ácidos e hidrotérmicos que levam a modificações na composição do material lignocelulósico, principalmente com relação a redução do teor de lignina e, assim, favorecem a etapa posterior de hidrólise. Já, com relação a etapa de hidrólise, o processo mais utilizado é o ácido, porém, muitos estudos têm mostrado a eficiência do processo enzimático utilizando hidrolases. Porém, o processo de hidrólise enzimática apresenta elevado custo, o que motiva o desenvolvimento de pesquisas de novas fontes de celulases visando a redução do valor da enzima, foco do presente trabalho.

## 2. Metodologia

Inicialmente, o fungo *Annulohyphoxylon stygium* (CA4) foi submetido a repiques consecutivos em meio batata dextrose agar (BDA) por 7 dias a 24°C. Após essa etapa, o fungo foi submetido ao crescimento em meio líquido [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3,5 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,0 (g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0,5 g/L), peptona (0,5%), extrato de levedura (0,20%), ureia (0,03%) e, 0,1 % de uma mistura de sais composta por FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (5 mg/L), MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (1,6 mg/L), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,4 mg/L)] variando-se o tempo e a temperatura. Todos os processos foram realizados utilizando-se uma rotação de 160 rpm e os resultados avaliados utilizando-se o programa

Statistica 14.0.0.15. Também foi avaliada a melhor fonte de carbono sendo testada a utilização de bagaço de cana, celulose, sacarose e glicose.

Durante a determinação da atividade de celulases, 100 mg de papel de filtro nº 1 foram colocadas em contato com 1 mL de extrato enzimático e, 2 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) e o sistema incubado por 60 min a 50°C. A atividade das exopeptidases foi determinada utilizando-se 0,5 g de celulose microcristalina misturadas com 10 mL de tampão citrato de sódio 0,1 mol/L pH 4,8 e, 3,3 mL do extrato enzimático obtido. Os sistemas reacionais foram aquecidos a 40°C, sob agitação, durante 40 h e 200 rpm. Já, para determinação da atividade das endoglucanases, foi utilizada uma solução de CMC 2% (2 mL) que foram misturados com 1 mL de extrato enzimático a 50°C durante 30 min. A concentração de açúcares em ambos os casos foi determinada utilizando-se a metodologia do DNS via espectroscopia UV/VIS a 540 nm. Para a avaliação da presença de β-glicosidase, 0,9 mL de uma solução de p-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo 50 mM, pH 4,8 (0,03 mol/L) foram misturados com 0,1 mL do extrato enzimático e, a mistura foi incubada por 15 min a 50 °C e 125 rpm. As concentrações de p-nitrofenol foram determinadas via HPLC. Também foi avaliada a concentração de proteínas em cada extrato pelo método de Bradford.

Após a produção da celulase na condição ideal estipulada, a mesma foi utilizada para a realização da hidrólise enzimática do bagaço de cana previamente submetido ao pré-tratamento em meio básico (solução de soda 9%) e, posteriormente ao processo de fermentação utilizando-se o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* Y-904.

## 3. Resultados e Discussões

No presente trabalho, inicialmente o fungo CA14 foi submetido ao crescimento em meio BDA e, posteriormente, ao crescimento em meio líquido modificando-se a temperatura e o tempo (Figura 1) para otimização da produção de celulases.



Figura 1 – Crescimento em meio BDA e meio líquido

Após o crescimento em meio líquido levando em conta diferentes condições de tempo e temperatura, foi realizada a avaliação das atividades enzimáticas referentes a produção de celulases, bem como a determinação da concentração de proteínas. Desse modo os resultados obtidos demonstraram que o CA14 produz mais enzimas em condições de baixa temperatura e longo tempo de crescimento.

Tabela I – Atividade específica - produção de celulases

T °C	t (dia)	Exoglucanase (U/mg)	Endoglucanase (U/mg)	$\beta$ -glicosidase (U/mg)	Celulase (U/mg)
40	8	1,99	0,114	0,000	0,236
40	8	1,86	0,102	0,000	0,256
40	2	4,01	0,109	0,002	0,249
61,2	8	1,79	0,097	0,000	0,047
40	14	2,55	0,104	0,033	0,204
55	12	1,98	0,081	0,028	0,489
25	4	2,05	0,188	0,000	0,361
18,8	8	1,44	0,197	0,317	0,257
25	12	7,11	0,342	5,443	0,752
55	4	2,76	0,107	0,073	0,042

Os resultados obtidos foram analisados via superfície de contorno nos fornecendo os intervalos em que o fungo apresentou melhor desempenho (Figura 2). A fim de se obter um valor mais exato sobre a condição de crescimento do fungo, os dados também foram avaliados utilizando-se a função de desejabilidade (Figura 3), sendo possível verificar que a temperatura ideal foi de 22°C e o tempo de crescimento do fungo de 14 dias.

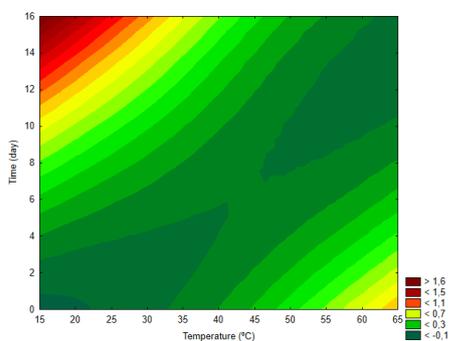


Figura 2 – Superfície de contorno obtida

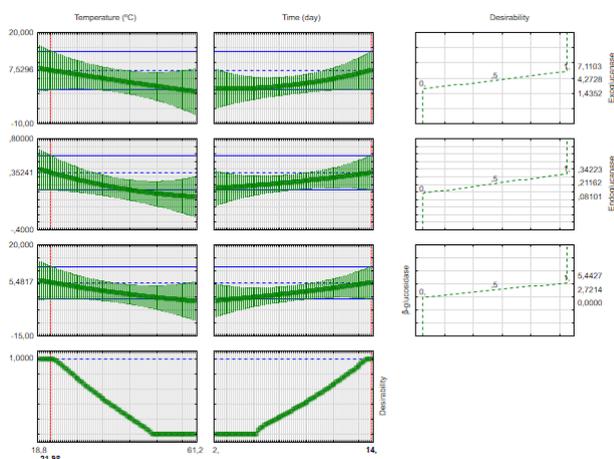


Figura 3 – Determinação do tempo e temperatura ideais de crescimento

Analisando-se a melhor fonte de carbono, verificou-se que o bagaço de cana se mostrou mais efetivo na produção de celulases sendo obtida uma maior concentração de açúcares durante a análise da produção de endoglucanase e celulase (Figura 4).

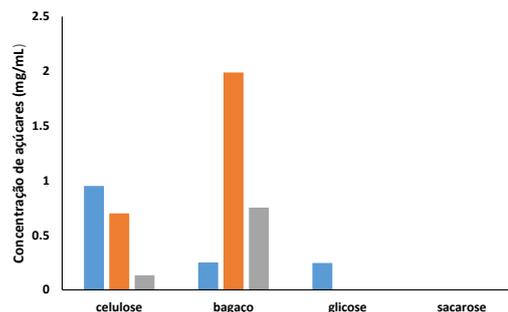


Figura 4 – Determinação da melhor fonte de carbono (● exoglucanase, ● endoglucanase, ● celulase)

Na hidrólise do bagaço de cana foi obtida uma conversão da holocelulose em açúcares fermentescíveis de 0,63 %. Salienta-se que a baixa concentração se deve ao fato da não realização da pré-purificação da celulase e baixa atividade enzimática, que levou a baixa conversão da celulose em açúcares fermentescíveis. O hidrolisado foi então submetido a etapa de fermentação, sendo verificado um rendimento de 98 % durante esse processo.

#### 4. Conclusões

A partir do presente trabalho verificou-se que as condições ideais para o crescimento do fungo tempo de fermentação de 14 dias, temperatura de 22°C e, como fonte de carbono, o bagaço de cana. Verifica-se também a eficácia do extrato enzimático na hidrólise do bagaço sendo necessária à realização de etapas de purificação visando o aumento da conversão da celulose em açúcares fermentescíveis. Em trabalhos futuros será importante a realização da purificação da enzima e avaliação do aumento da eficácia da hidrólise enzimática.

#### 5. Referências

- [1] AGUIAR, A. et al. Sugarcane straw as a potential second generation feedstock for biorefinery and white biotechnology applications. *Biomass and Bioenergy*, v. 144, p. 105896, 2021.
- [2] ESPADA, J.J.; VILLALOBOS, H.; RODRÍGUEZ, R. Environmental assessment of different technologies for bioethanol production from *Cynara cardunculus*: A Life Cycle Assessment study. *Biomass and Bioenergy*, v. 144, p. 105910, 2021.
- [3] ARIAEENEJAD, S.; MOTAMEDI, E.; SALEKDEH, G.H. Stable cellulase immobilized on graphene oxide@CMC-g-poly(AMPS-co-AAm) hydrogel for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Carbohydrate Polymers*, v. 230, p. 115661, 2020.

#### Agradecimentos

Ao Centro Universitário FEI pelo incentivo ao desenvolvimento do trabalho e suporte necessário.

<sup>1</sup> Aluno de IC do Centro Universitário FEI. Projeto com vigência de 09/21 a 08/22.