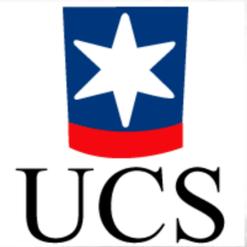


# Efeito de Nitrato de Potássio e Sulfato de Amônio na Produção de Celulases em *Penicillium echinulatum*



<sup>1</sup>Maurício Bettio (CNPq), <sup>1</sup>Dra. Marli Camassola, <sup>1</sup>Dr. Aldo José Pinheiro Dillon (orientador) [ajpdillo@ucs.br](mailto:ajpdillo@ucs.br)

<sup>1</sup>Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia – Laboratório de Enzimas e Biomassa

## INTRODUÇÃO

Estudos em tecnologias biológicas tem se mostrado promissores no processo de obtenção de combustíveis renováveis. Através de técnicas de melhoramento genético como mutagênese e seleção de linhagens fúngicas, é possível a obtenção de organismos secretores de exo-enzimas capazes de converter material lignocelulósico em glicose (Mandels, 1982), para a produção de etanol.

Segundo Dillon *et al*, 2006, as enzimas do complexo celulolítico provenientes da linhagem 9A02S1 de *Penicillium echinulatum* são eficazes na hidrólise de lignocelulósicos como a celulose, que naturalmente, é a própria substância indutora para estas enzimas. Entretanto, para otimizar a produtividade nas secreções de celulases, é imprescindível avaliar as condições ótimas de cultivo.

Nosso objetivo neste trabalho foi observar o comportamento da atividade enzimática e perfil de pH do complexo celulolítico da linhagem 9A02S1 de *P. echinulatum* na presença de duas fontes inorgânicas de nitrogênio, sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e nitrato de potássio  $\text{KNO}_3$ .

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Linhagem:** Utilizou-se a linhagem mutante 9A02S1 de *P. echinulatum* obtida através de sucessivos tratamentos mutagênicos com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Dillon *et al*, 2006), a partir da linhagem selvagem 2HH, isolada do trato intestinal de *A. punctatum*.

**Meio de cultivo:** O experimento foi conduzido em fermentação submersa. Todos os meios de produção continham como meio base, para um volume de 100 mL: 0,5% (m/v) de celulose, 0,2% (m/v) de farelo de soja, 0,1% (m/v) de sacarose, 0,05% (m/v) de *Prodex*<sup>®</sup>, 0,1% (v/v) *Tween* e 5% (v/v) de solução mineral 20X, baseada na formulação de Mandels & Reese (1957), porém, não acrescida de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , e sim de fosfato de potássio monobásico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Foram formulados cinco tratamentos, onde adicionaram-se diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{KNO}_3$  ao meio base, conforme a figura 1.

Após autoclavados, os frascos foram inoculados com  $1 \times 10^7$  conídios, mantidos sob agitação recíproca a 180 rpm, a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 5 dias, sendo coletadas a cada 24 horas alíquotas do sobrenadante a partir do 2º dia de cultivo, para determinação da atividade enzimática.

**Análises enzimáticas:** Foram determinadas FPases (em papel filtro) e endoglicanases (em carboximetilcelulose) conforme Ghose (1987) e  $\beta$ -glicosidases (em salicina) conforme Chahal *et al* (1985). As amostras foram analisadas por espectrofotômetro a 545 nm.

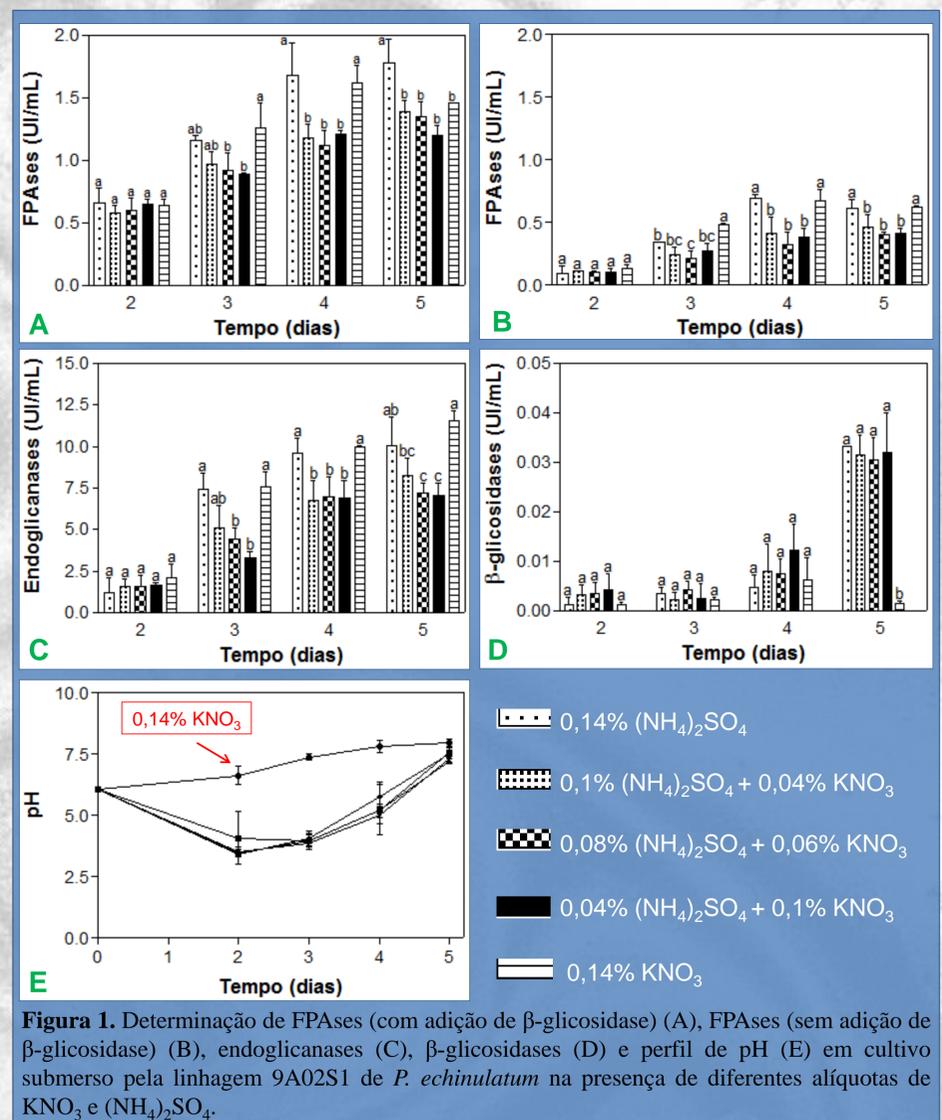
Para a determinação de FPases observada no gráfico (A) da figura 1, o método analítico foi incrementado, adicionando-se 10  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -glicosidase com atividade de 1,38 UI/mL, para cada amostra.

Uma unidade de FPase, endoglicanase e  $\beta$ -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor, medido como glicose por minuto, sobre as condições do teste.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como observado na figura 1 (E), a presença de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tende a acidificar o meio de cultivo na fase inicial do crescimento e  $\text{KNO}_3$  mantém um pH próximo da neutralidade. Observando este perfil, é possível inferir que o metabolismo deste microrganismo, que tende a acidificação natural do meio de cultivo, não é afetado quando a condição de pH para seu crescimento é mantida próxima a neutralidade.

Para FPases (A, B) e endoglicanases (C), os meios suplementados somente com  $\text{KNO}_3$  ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , apresentaram médias semelhantes ou superiores aos demais, sendo que a adição conjunta destes componentes, nas condições utilizadas, exerce um efeito negativo nas atividades.



**Figura 1.** Determinação de FPases (com adição de  $\beta$ -glicosidase) (A), FPases (sem adição de  $\beta$ -glicosidase) (B), endoglicanases (C),  $\beta$ -glicosidases (D) e perfil de pH (E) em cultivo submerso pela linhagem 9A02S1 de *P. echinulatum* na presença de diferentes alíquotas de  $\text{KNO}_3$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Embora neste experimento a atividade de  $\beta$ -glicosidases tenha sido baixa, como verificado em trabalhos anteriores, os meios com apenas  $\text{KNO}_3$  secretam níveis muito reduzidos deste componente enzimático, resultando possivelmente na baixa atividade de FPases, no gráfico (B). Quando adicionou-se  $\beta$ -glicosidases no processo analítico, a atividade de FPases, vista no gráfico (A), quase duplicou em ambas as condições. Tal resultado, deve-se ao fato de que  $\beta$ -glicosidases hidrolisam oligossacarídeos ou celobiose à glicose, que é detectada quando FPases são mensuradas.

## CONCLUSÃO

Para o microrganismo estudado, a presença de somente  $\text{KNO}_3$  ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  proporciona a condição mais favorável para a obtenção dos maiores títulos enzimáticos de endoglicanases e FPases, sendo que o pH expresso nestas condições não interfere na atividade enzimática. Aliado a isto, a adição de  $\beta$ -glicosidases no processo analítico mostra-se conveniente na determinação de FPases.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chahal, D. S. (1985). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 49, p. 205-210.  
Dillon, A. J. *et al.* (2006). *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 70, n. 6, p. 740-746.  
Ghose, T. K. (1987). *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, p. 257-268.  
Mandels, M. (1982). In: *Annual Reports on Fermentation Process*. Ed. G. T. Tsao, pg. 35-78.  
Mandels, M.; Reese, E. T. (1957). *J. Bacteriol.* 73: 269-278.