República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102016011758-5 A2

(22) Data do Depósito: 24/05/2016

(43) Data da Publicação: 12/12/2017

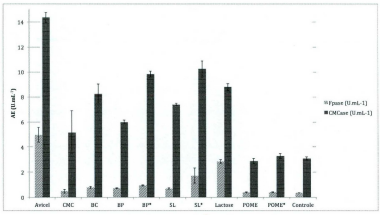
(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO EFLUENTE SANITÁRIO BRUTO.

(51) Int. Cl.: C12N 9/42; C12R 1/885; C12P 21/00

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

(72) Inventor(es): CARLOS RICARDO SOCCOL; NELSON LIBARDI JUNIOR; LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE; ARISTÓTELES GÓES-NETO

(57) Resumo: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO EFLUENTE SANITÁRIO BRUTO A presente invenção trata de um bioprocesso de produção de celulases (exo-celulases e endo-celulases) por fermentação submersa, utilizando efluente sanitário bruto como base do meio de produção. O(s) microrganismo(s) utilizado(s) é(são) do gênero Trichoderma sp. e propicia altos rendimentos em celuloses produzidas. O processo é caracterizado por ser simples e de baixo custo por empregar como base de meio de produção efluentes sanitários adicionados de componentes químicos.



PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO EFLUENTE SANITÁRIO BRUTO

Campo da Invenção

[001]. Esta invenção está inserida na área da biotecnologia ambiental e industrial, mais especificamente na área de tratamento de efluentes bem como na área de produção de enzimas industriais.

[002]. O uso do efluente sanitário insere-se na área de tecnologias para tratamento biológico de efluentes. A produção da enzima celulase tem como campo de aplicação processos de produção de combustíveis a partir de material lignocelulósico, processos têxteis, bem como processos de tratamento de efluentes.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[003]. Esta invenção refere-se a um método de produção de cellulases a partir de microrganismos do gênero *Trichoderma* sp., utilizando efluente sanitário bruto como base para meio de produção e fonte de nutrientes com o objetivo de reduzir os custos de produção da enzima.

[004]. Esta invenção objetiva a diminuição do impacto ambiental por meio do reaproveitamento de esgoto sanitário bruto para a produção de enzimas e, assim, reduzindo o consumo de água no processo produtivo e diminuindo a carga poluente em estações de tratamento de água.

[005]. Foi realizada uma pesquisa de anterioridade apresentada na Tabela 1 (Anexo 01), utilizando como critério de busca um conjunto de palavras-chave que representa a presente invenção.

[006]. Na base de dados WIPO, nenhum dos 14 resultados se referencia à invenção proposta. No INPI, não foram encontrados registros. Na base de dados européia Espacenet, nenhum dos resultados encontrados se

relaciona com esta invenção. Apenas a patente EP0455928 descreve a produção da enzima xilanase, utilizando efluente, porém, proveniente de um processo têxtil.

[007]. Na base de dados *Google Patents*, foi encontrado elevado número de registros porém, sem relação com esta invenção proposta, bem como na CIPO e na FPO - *Free Patents Online*.

[008]. A patente que mais se aproxima da presente invenção (ALAM et al. Method of producing cellulase. US0178144A1, 12 Jul. 2012), de autores da Malásia, relata a utilização de lodo de efluente sanitário como base para o meio de cultivo. O lodo de efluente foi obtido após o processo de decantação, em uma planta de tratamento de efluentes. Os autores relatam o uso de um meio de cultivo composto por celulose (1,5%), peptona (0,5%), polisorbato 80 (0,2%), sacarose (1%), fosfato de potássio dihidratado (0,25%) e sulfato de magnésio heptahidratado (0,03%). O bioprocesso foi realizado em reator de 30L, agitado mecanicamente a 100 rpm, e vazão de ar em 0,5 a 1 vvm. A produção máxima de celulase alcançada foi de 21 $U.ml^{-1}$, com valores de pH variando entre 3 e 3,5, em 169 horas, levando à produtividade máxima de 125 $U.l^{-1}.h^{-1}$.

[009]. As publicações pesquisadas, em todos os casos, relatam o uso de lodo de efluente sanitário. Nenhum registro nem de patente, nem de publicação científica foi encontrado reportando o uso do efluente sanitário bruto como base para o meio de cultivo para a produção de celulases.

[010]. Celulases são enzimas que possuem como característica principal a sua capacidade de hidrolisar as ligações glicosídicas β-1,4 da celulose, produzindo produtos como a glicose, celobiose e celo-oligosacarídeos (SAINI, R., SAINI, J. K., ADSUL, M., PATEL, A. K., MATHUR, A., TULI, D., SINGHANIA, R. R. Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum*

for bio-ethanol. Bioresource Technology. 2015). Esta capacidade de degradar material celulósico lhe atribui uma ampla aplicação, como no processamento e acabamento de produtos da indústria têxtil; na composição de coquetel enzimático de detergentes industriais; na extração, bem como na melhoria das propriedades aromáticas e estabilidade de sucos; na melhoria do silagens e outros produtos para alimentação animal e na remoção de biofilmes bacterianos. Sua utilização em biorrefinarias é uma das aplicações mais importantes, como a produção de biocombustíveis através da depolimerização da biomassa de origem vegetal para a produção de açúcares fermentescíveis e consequentemente a produção de biocombustíveis, como o etanol de segunda geração (JUTURU, V., WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 33, p. 188-203, 2014). Justamente estas aplicações e características à torna uma das enzimas mais estudadas e é considerada a terceira enzima mais produzida no mundo, devido sua diversidade de aplicações (SAINI, R., SAINI, J. K., ADSUL, M., PATEL, A. K., MATHUR, A., TULI, D., SINGHANIA, R. R. Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol. Bioresource Technology. 2015).

[011]. A produção de celulases é realizada tradicionalmente em processos de fermentação submersa, utilizando principalmente o fungo do gênero *Trichoderma*, o qual é identificado como um grande produtor de celulases.

[012]. A produção de celulases foi reportada na literatura, com valores de atividade enzimática de até 18 Uml^{-1}, utilizando o microrganismo *Trichoderma reesei* em reator agitado de 300 L (ESTERBAUER, H., STEINER, W., LABUDOVA, I., HERMANN, A., HAYN, M. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. Bioresource Technology. v. 36, p.51-65, 1991). Valores máximos de produtividade em celulases (10,7 $U.l^{-1}.h^{-1}$)

foram alcançados utilizando o fungo *Penicillium oxalicum* em reator agitado mecanicamente de 7 L, mantido na temperatura de 28ºC, pH 5.0 e1.5 vvm, em 120 horas de processo (SAINI, R., SAINI, J. K., ADSUL, M., PATEL, A. K., MATHUR, A., TULI, D., SINGHANIA, R. R. Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol. Bioresource Technology. 2015). Outros autores reportaram a produção de celulases, especificamente com o fungo do gênero *Trichoderma*, em diferentes métodos de cultivo, utilizando principalmente substratos celulósicos para a expressão de celulases, conforme Tabela 2 (Anexo 02).

[013]. Entretanto, devido ao elevado custo de produção de celulases, que caracteriza-se como um gargalo para processos como a produção de biocombustíveis, a utilização de resíduos na composição do meio de cultivo de produção torna-se uma estratégia que vem sendo estudada por diversos autores como medida de redução de custos de produção. O uso de resíduos agroindustriais é uma alternativa bastante explorada, sendo que há um interesse crescente no uso destes resíduos em processos fermentativos para a produção de diferentes biomoléculas. Pode-se citar como exemplo a polpa e cascas de café, cascas e bagaço de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de beterraba, polpa de maçã, polpa cítrica, melaço e vinhaça de cana-de-açúcar e de soja (SOCCOL, C. R., VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. Biochemical Engeneering Journal,13, 205-218, 2003). O uso de resíduos agroindustriais para a produção de celulases em fermentação em estado sólido já foi largamente descrito na literatura, entretanto, publicações acerca do uso de resíduos em fermentação submersa já são mais escassas.

[014]. A produção de celulases por *Trichoderma reesei* ZU-02 em frascos Erlenmeyer de 500 mL e em reator agitado de 30 m^3, utilizando resíduos de sabugo de milho, alcançou valores de produtividade máxima de 31,3

$U.l^{-1}.h^{-1}$ (FPAse) e 57 $U.l^{-1}.h^{-1}$ em 96 horas de processo, respectivamente (LIMING, L. and XUELIANG, S. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. Bioresource Technology. v. 91, p.259-262, 2004). A Tabela 3 (Anexo 03) exemplifica diferentes resíduos utilizados para a produção de celulases em fermentação submersa.

[015]. As publicações científicas acerca da produção de celulases utilizando efluente sanitário ou derivados de efluentes sanitários é ainda escassa, sendo que o uso específico do efluente sanitário como componente do meio de produção ainda não foi reportado. O emprego de lodo de efluente sanitário (0,75%), por sua vez, suplementado com farinha de trigo (2%) foi reportado para a produção de celulases em frascos Erlenmeyer de 500 mL agitados à 175 rpm, pH 5,0, percentual de inóculo de 2% e temperatura de 32,5°C, alcançando valores de atividade de 10,2 $U.ml^{-1}$ em 3 dias de bioprocesso, correspondendo à produtividade de 141 $U.l^{-1}.h^{-1}$ (ALAM, M.Z., MUYIBI, A., WAHID, R. Statistical optimization of process conditions for cellulase production by liquid state bioconversion of domestic wastewater sludge. *Bioresource Technology*, 2008, 99, 4709-4716). Lodo de efluente sanitário pré-tratado com hidrólise alcalina foi relatado como componente de meio de cultivo para a produção de celulases na concentração de 30 $g.l^{-1}$ em sólidos suspensos no meio de cultura. O bioprocesso foi realizado em reator de 15 L durante 96 horas, utilizando o microorganismo *Trichoderma viridae,* alcançando o valor de máxima atividade de celulase (150 $U.ml^{-1}$) após 36 horas de processo (VERMA, M., BRAR, S. K., TYAGI, R. D., SAHAI, V., PRÉVOST, D., VALÉRO, J. R., SURAMPALLI, R. Y. Bench-scale fermentation of *Trichoderma viride* wastewater sludge: Rheology, lytic enzymes and biocontrol activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41, 764-771). Lodo de efluente sanitário (0,5%) suplementado com celulose microcristalina (2%) e cachos vazios de palma (0,2%) foi utilizado para a produção de celulases em

frascos Erlenmeyer, contendo 50 mL de meio de cultivo, mantidos à 30ºC e 150 rpm, durante 120 horas, utilizando o fungo *Trichoderma* Rut-C 30, alcançando o valor de atividade enzimática de 0,384 $U.ml^{-1}$, levando à produtividade de 3,2 $U.l^{-1}.h^{-1}$ (DRANI, A., ALAM, M.Z., MUYIBI, S. A. Screening of Potential Strains and Co-substrate for Production of Cellulase Enzyme using Sewage Treatment Plant Sludge as Major Source. *Biotechnology*, 2011, 1-6).

[016]. Os líderes mundiais da produção de celulase comercial são a empresa dinamarquesa Novozymes e a norte-americana Genecor. A Genecor comercializa algumas celulases, tais como a Accelerase® 1500, produzida por uma cepa de *Trichoderma reesei* geneticamente modificada. Outro produto desta empresa é a Accelerase® XY, que contém um complexo de xilanase, que deve ser utilizada em conjunto com a Accelerase® 1500 para a hidrólise completa da biomassa. A Novozymes, por sua vez, comercializa celulases como a Cellusoft®, Carezyme®, Celluclast®, com aplicação na indústria têxtil. O desenvolvimento em pesquisa destas empresas tem contribuído para a redução de seu preço, que é o principal fator impeditivo para a produção de biocombustíveis a partir de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos para a produção de bioetanol de segunda geração.

[017]. A Tabela 4 (Anexo 04) apresenta celulases comerciais e seus fabricantes, atividade enzimática e o microrganismo utilizado para sua produção. Adaptado de (SINGHANIA, R. R., SUKUMARAN, R. K., PATEL, A. K., LARROCHE, C., PANDEY, A. Advanced and comparative profiles in the production Technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases, 2010, 46, 541-549).

[018]. Apesar de a produção comercial de celulases ser majoritariamente desempenhada por grandes corporações situadas em países com tecnologias consolidadas, novas pequenas empresas vem sendo

fundadas objetivando a produção de enzimas comerciais. Sendo assim, é crescente o interesse em pesquisas que levem à definição de novos processos e produtos enzimáticos com tecnologia integralmente nacional e com custo mais baixo, de forma a viabilizar a sua aplicação.

Descrição da abordagem do problema técnico

[019]. De acordo com o Plano Nacional de Saneamento Básico de 2014, 12.792.990,584 m^3 de esgoto são gerados anualmente, considerando que 80% da água produzida transforma-se em esgoto. Apenas cerca de 41% do esgoto sanitário gerado é coletado e, apenas cerca de 29% é tratado.

[020]. Encontrar soluções para o uso racional da água, bem como novas tecnologias para o tratamento e/ou reuso do esgoto vem sendo uma meta a ser alcançada pelo Brasil e por todo o mundo, principalmente onde há escassez de água. Neste contexto, ocorre uma tendência de migração de processos industriais que utilizam muita água, para processos mais "enxutos". A produção industrial de enzimas ocorre em sua maioria pelo método de fermentação submersa, método este em que são alcançadas as maiores produtividades de celulases.

[021]. A substituição da água tratada por esgoto sanitário bruto no processo de produção de celulases pode impactar fortemente no custo de produção da enzima, sendo que a demanda por água é um fator que impacta fortemente em processos industriais. Além disto, o esgoto sanitário bruto carreia nutrientes que podem ser reaproveitados pelo microrganismo produtor da enzima. Efluentes sanitários possuem em sua composição, diferentes nutrientes utilizados em meios de cultivo para fermentação industrial.

[022]. Na Tabela 5 (Anexo 05) está apresentada a composição de

efluente sanitário bruto caracterizado pela Companhia de Saneamento do Paraná – SANEPAR, coletados na Estação de Tratamento de Efluentes Atuba Sul, localizada na região de Curitiba, com valores médios representando amostragens realizadas entre os meses de Janeiro à Maio de 2015.

[023]. A produção de celulases agrega valor ao tratamento de efluente sanitário, o que leva a uma possível expansão do objetivo do sistema de tratamento de efluentes para além de depurar efluentes, ou seja, produzir um bioproduto de valor agregado. Além do reaproveitamento do esgoto sanitário para a produção da enzima, esta invenção propõe um método para o tratamento de efluente sanitário, utilizando o fungo do gênero *Trichoderma*.

[024]. A invenção apresenta o desenvolvimento de um novo processo de produção de celulases, utilizando efluente sanitário bruto como base do meio de cultivo. A utilização do efluente sanitário bruto para a produção de celulases possibilita o reaproveitamento de um resíduo gerado em grandes quantidades e a produção de um bioproduto de valor agregado.

[025]. Esta inovação aplica-se em:

- Desenvolvimento de processos industriais de custo reduzido;

- Viabilização da produção de celulases por pequenas empresas locais e em regiões com menor desenvolvimento;

- Desenvolvimento da produção de celulases *in situ*, ou seja, no próprio local onde há geração de efluente sanitário e onde haja o interesse do uso da enzima, como por exemplo, indústrias têxteis, biorrefinarias, plantas de produção de etanol de segunda geração,

estações municipais de tratamento de efluentes, indústrias de papel e celulose.

[026]. O processo desenvolvido apresenta as seguintes vantagens em relação às técnicas já existentes:

- Meio fermentativo de baixo custo;
- Diminuição de problemas ambientais com a utilização de um resíduo;
- Tecnologia simples;
- Elevada concentração de enzima produzida;

[027]. Como potenciais parceiros para futuros desenvolvimentos identificam-se as empresas municipais de saneamento, como a referida previamente SANEPAR. Há a possibilidade de parceria com empresas têxteis, para acoplar o sistema à sua estação de tratamento de efluentes e produzir celulases para utilização no processo fabril.

Descrição detalhada da Invenção

Inóculo

[028]. O microrganismo é do gênero *Trichoderma* sp., número de acesso CCMB660, e encontra-se depositado no banco de cepas da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). A cepa foi previamente armazenada em tubos inclinados contendo Agar Batata Dextrose, preparado na concentração de 39 $g.L^{-1}$. Após 7 dias de incubação (28-30°C) os tubos são mantidos sob refrigeração.

[029]. Os inóculos foram preparados por meio da produção de esporos em meio sólido contendo arroz. Foram utilizados frascos Erlenmeyer de

500 mL, contendo 100 g de arroz pré-cozido por 2 minutos em ebulição, inoculados com 2 mL da suspensão de esporos, resultando em, aproximadamente, 2 x10^6 esporos/g de arroz. Os frascos são cultivados por 7 dias à 30ºC.

[030]. A suspensão dos esporos é preparada a partir da extração aquosa dos esporos cultivados em arroz. A suspensão é submetida à contagem de esporos em câmara de Neubauer, para a determinação do volume à ser adicionado nos cultivos.

Meio de Produção de Celulases

[031]. O meio de cultura para a produção de celulases tem como base Efluente Sanitário Bruto proveniente da Estação de Tratamento de Efluentes Atuba Sul, da Companhia Paranaense de Saneamento – SANEPAR. O meio de cultivo, baseado em (ALAM et al. Method of producing cellulase. US0178144A1, 12 Jul. 2012), é adicionado dos seguintes componentes:

[032]. KH_2PO_4, com concentrações na faixa de 2,5 a 6,5 g.L^{-1}, sendo usado preferencialmente 2,5 g.L^{-1}; $MgSO_4.7H_2O$ foi utilizado em concentrações na faixa de 0,3 a 1,0 g.L^{-1}, sendo preferencialmente utilizado 0,3 g.L^{-1}; Peptona foi utilizada na faixa de concentração de 1,0 a 5,0 g.L^{-1}, sendo preferencialmente utilizada na concentração de 5 g.L^{-1}. Celulose microcristalina na faixa de concentração de 1,0 a 9,0 g.L^{-1}, preferencialmente na concentração de 5 g.L^{-1}, ou subprodutos agroindustriais (cachos vazios de palma, bagaço de cana-de-açúcar, cascas de cacau, soro de leite, lodo e celulose recuperada de estação de tratamento de efluentes domésticos) podem também ser utilizados como indutores de celulases, sendo utilizados na mesma concentração da celulose microcristalina. Além destes também são utilizados como

indutores a sacarose e a lactose nas mesmas concentrações indicadas para os outros indutores.

Produção de celulases por fermentação submersa

[033]. O processo de produção de celulases é realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultivo, descrito acima, inoculados com a suspensão de esporos previamente preparada com uma concentração de $1x10^7$ esporos. mL^{-1}. Após 7 dias de cultivo, o caldo fermentado, após separação das células, é submetido à análise para a determinação da atividade enzimática celulolítica , em FPase e CMCase.

Determinação da atividade enzimática

[034]. A determinação da atividade enzimática foi realizada com base no método proposto por CAMASSOLA, M., DILLON, A. J. P. Cellulase Determination: Modifications to Make the Filter Paper Assay Easy, Fast, Practical and Efficient. Open Access Scientific Reports, 2012, 1, 1-4.), por meio da miniaturização do ensaio utilizando microplacas de 96 poços. Foi realizada a quantificação de celulases utilizando os substratos Carboximetilcelulase - CMC e o Papel Filtro (FP), sendo designadas as atividades como CMCase e FPase, respectivamente.

[035]. Para a determinação da atividade de FPase, são preparadas tiras de papel-filtro de tamanho 0,6 cm x 1,0 cm como substrato. São adicionados tampão citrato 0,05 M, pH 4.8, e a enzima preparada, incubando a microplaca a 50ºC por 60 minutos. Posteriormente, é adicionado DNS e realiza-se uma nova incubação a ebulição por 5 minutos. Ao final, uma parte da solução é transferida para a placa e o seu volume é completado com água destilada. A leitura da absorbância é feita em 545 nm.

[036]. Para a determinação da atividade de CMCase, são adicionados ao poço 20 μl de solução de CMC 2% m/v (substrato) e 20 μl do extrato enzimático produzido. A microplaca é incubada a 50ºC por 30 minutos. Posteriormente, é adicionado o reativo DNS e nova incubação a 100ºC por 5 minutos. Ao final, é adicionada água destilada e uma parte da solução é transferida para a placa. A leitura da absorbância é feita em 540 nm.

Seleção de fonte de carbono, nitrogênio e indutor

[037]. Por meio do uso da metodologia *one-factor-at-time*, foram realizados experimentos para a seleção de fonte de carbono, nitrogênio e indutor da enzima celulase. Melaço de cana-de-açúcar, farelo de soja, farelo de milho e sacarose foram testados como fontes de carbono suplementares. Peptona, extrato de levedura, ureia e sulfato de amônia foram testados como fonte de nitrogênio. Celulose, carboximetilcelulose, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de palma, soro de leite e efluente da produção de óleo de palma foram testados como indutores da expressão de celulase.

[038]. Dentre as fontes de carbono testadas, o experimento Controle, sem nenhuma fonte de carbono, apenas com efluente e sais resultou em atividades (7,06 $U.mL^{-1}$ – FPAse; 11,24 $U.mL^{-1}$ - CMCase) similares às obtidas com o uso da sacarose (7,82 $U.mL^{-1}$ - FPAse; 11,96 $U.mL^{-1}$ – CMCase). Em relação às fontes de nitrogênio, o uso da peptona apresentou os melhores resultados de atividade celulolítica (5,25 $U.mL^{-1}$ – FPAse; 6,14 $U.mL^{-1}$ – CMCase). Todos componentes testados induziram a produção de celulases, de acordo com sua combinação com os outros componentes do meio de cultivo, de acordo com a Figura 1.

Otimização da produção de celulases

[039]. Com o suporte da metodologia de planejamento fatorial, variando as concentrações dos componentes do meio de cultivo, foram avaliados os efeitos de componentes a serem adicionados ao meio de produção sobre a atividade enzimática. Foram avaliados os seguintes fatores (todos os componentes do meio de cultivo): KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$, Peptona e celulose microcristalina, sendo aplicado um planejamento do tipo fatorial incompleto 2^{4-1} com três pontos centrais.

[040]. As concentrações dos componentes do meio de produção que resultaram nos maiores valores de atividade enzimática (FPAse: 1,61 U.ml-1) e (CMCase: 8,61 $U.ml^{-1}$) foram: KH_2PO_4 (2,51g.L-1), $MgSO_4.7H_2O$ (0,1g.L^{-1}), Celulose microcristalina (9 g.L^{-1}) e Peptona (5 g.L^{-1}). A celulose microicristalina (indutor) foi o único fator significativo (R^2 FPAse – 0,66; R^2 CMCase – 0,69).

[041]. O delineamento composto central rotacional (DCCR) foi utilizado na sequência para determinar as concentrações de componentes a serem adicionados ao meio de produção de celulases no meio de cultivo proposto para as faixas testadas. Foram avaliados os seguintes fatores: KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$ e celulose microcristalina, sendo utilizado um planejamento 2^3 + 6PA + 4PC (PA - Pontos Axiais; PC - Pontos Centrais) totalizando 18 experimentos.

[042]. As concentrações que resultaram nos maiores valores de atividade enzimática (FPAse: 8,36 U.ml-1) foram: KH_2PO_4 (2,5g.L-1), $MgSO_4.7H_2O$ (0,9 g.L^{-1}) e celulose microcristalina (5 g.L^{-1}). A concentração de Peptona foi fixada em 5 g.L^{-1}. Celulose microcristalina e $MgSO_4.7H_2O$ foram os únicos componentes estatisticamente significativos (R^2 FPAse – 0,96). Avaliando-se a atividade de CMCase, o maior valor de atividade (9,99 U.ml-1 foi obtido com a seguinte concentração dos componentes: KH_2PO_4 (4,5g.L-1), $MgSO_4.7H_2O$ (0,7g.L^{-1}) e celulose microcristalina (9 g.L^{-1}).

[043]. Após a otimização da composição do meio de cultivo para produção de celulases em frascos Erlenmeyer, é possível concluir que os valores de atividade enzimática estão na faixa de 8 a 11 $U.ml^{-1}$ para CMCase e de 2 a 8 $U.ml^{-1}$ para FPAse.

Produção em biorreator do tipo coluna de bolhas com condições otimizadas

[044]. A produção de celulases foi realizada em biorreator do tipo coluna de bolhas, com volume total de 4 L e volume de trabalho de 3 L. O bioprocesso foi mantido sob aeração a 1 vvm e temperatura controlada em 30ºC. Foi utilizada a concentração de inóculo de 1.10^7 esporos/mL. O bioprocesso foi mantido por 168 horas, sendo monitorada a atividade de celulases produzida.

[045]. A produção de celulases alcançada varia de acordo com a composição do meio de cultivo, bem como do biorreator utilizado. A composição do meio de produção e que maximiza a atividade enzimática é a seguinte: KH_2PO_4, (2,5 a 6,5 $g.L^{-1}$), sendo usado preferencialmente 2,5 $g.L^{-1}$; $MgSO_4.7H_2O$ (0,3 a 1,0 $g.L^{-1}$) sendo preferencialmente utilizado 0,3 $g.L^{-1}$; Peptona (1,0 a 5,0 $g.L^{-1}$), sendo preferencialmente utilizada na concentração de 5 $g.L^{-1}$ e celulose microcristalina, (1,0 a 9,0 $g.L^{-1}$), preferencialmente na concentração de 5 $g.L^{-1}$.

[046]. A máxima produção de celulases foi obtida em 120 horas para CMCase (7,0-9,0 U/ml) e 144 horas para FPAse (1,0 – 2,0 U/ml). A produtividade máxima para CMCase ficou na faixa de 60 $U.L^{-1}.h^{-1}$ e para FPAse na faixa de 10 $UL^{-1}.h^{-1}$. A curva de produção pode ser observada na Figura 2.

Descrição das Figuras

[047]. Figura 1 – Produção de celulases com diferentes indutores. (*: 30 g.l-1; CMC: carboximetilcelulose; BC: Bagaço de Cana-de-açúcar; BP: Bagaço de Palma; SL: Soro de Leite; POME: Efluente do processamento do óleo de palma).

[048]. Figura 2 – Curva de produção de celulases em biorreator.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CELULASES DE ORIGEM MICROBIANA, UTILIZANDO EFLUENTE SANITÁRIO BRUTO, caracterizado por ser realizado em fermentação submersa, utilizando como componente do meio de cultivo, um resíduo líquido, compreendido essencialmente de efluente sanitário bruto.

2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CELULASES DE ORIGEM MICROBIANA, UTILIZANDO EFLUENTE SANITÁRIO BRUTO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela definição de um meio de produção composto por peptona, a uma concentração variando de 1,0 a 5,0 $g.L^{-1}$, fosfato de potássio monobásico heptahidratado, a uma concentração de 2,5 a 6,5 $g.L^{-1}$, sulfato de magnésio heptahidratado, a uma concentração de 0,3 a 1,0 $g.L^{-1}$ e celulose microcristalina a uma concentração de 1 a 9 g/L ou subprodutos agroindustriais utilizados como indutores da atividade celulolítica tais como carboximetilcelulose, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de palma, soro de leite e efluente da produção de óleo de palma, cascas de cacau, lodo e celulose recuperada de estação de tratamento de efluentes domésticos e, além de sacarose e lactose, nas mesmas concentrações supracitadas.

3. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1 e 2, caracterizado por utilizar linhagens de *Trichoderma* sp.

4. PROCESSO, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pela fermentação durar até 168 horas, para a produção máxima de enzimas celulolíticas.

5. PRODUTO COMPOSTO POR CELULASES, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por ser produzido a partir de efluente sanitário bruto com a suplementação de fosfato de potássio, sulfato de magnésio heptahidratado, peptona e celulose microcristalina ou outros indutores da atividade celulolítica pelo fungo(s) filamentoso(s) do gênero *Trichoderma* sp. em fermentação submersa.

DESENHOS

Figura 1

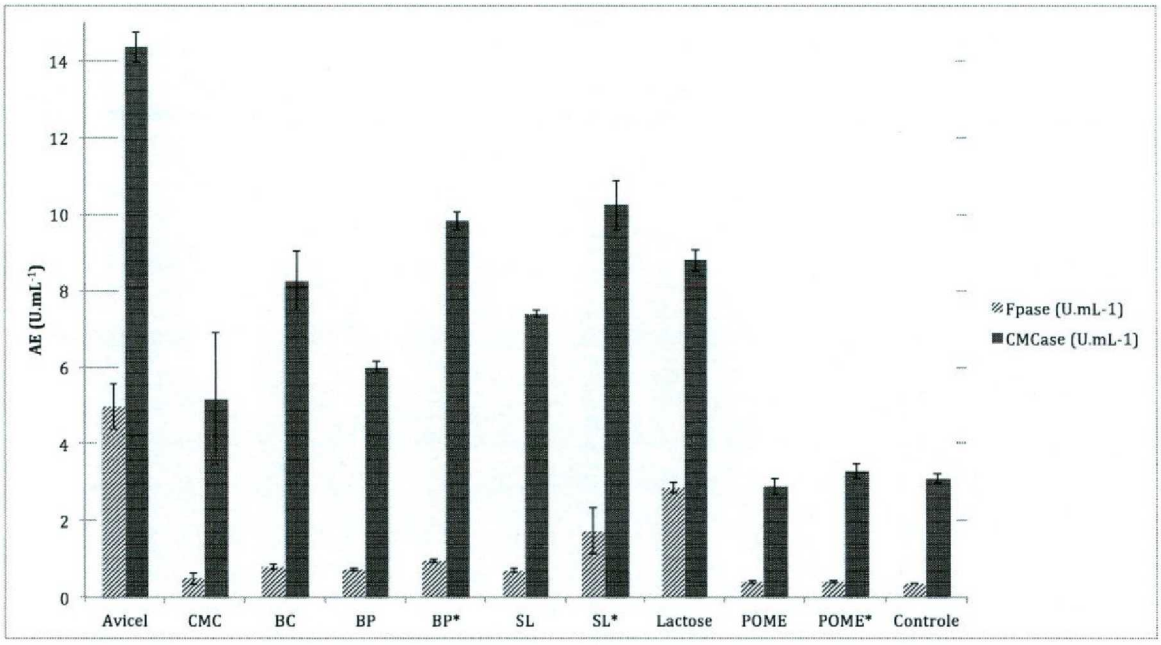
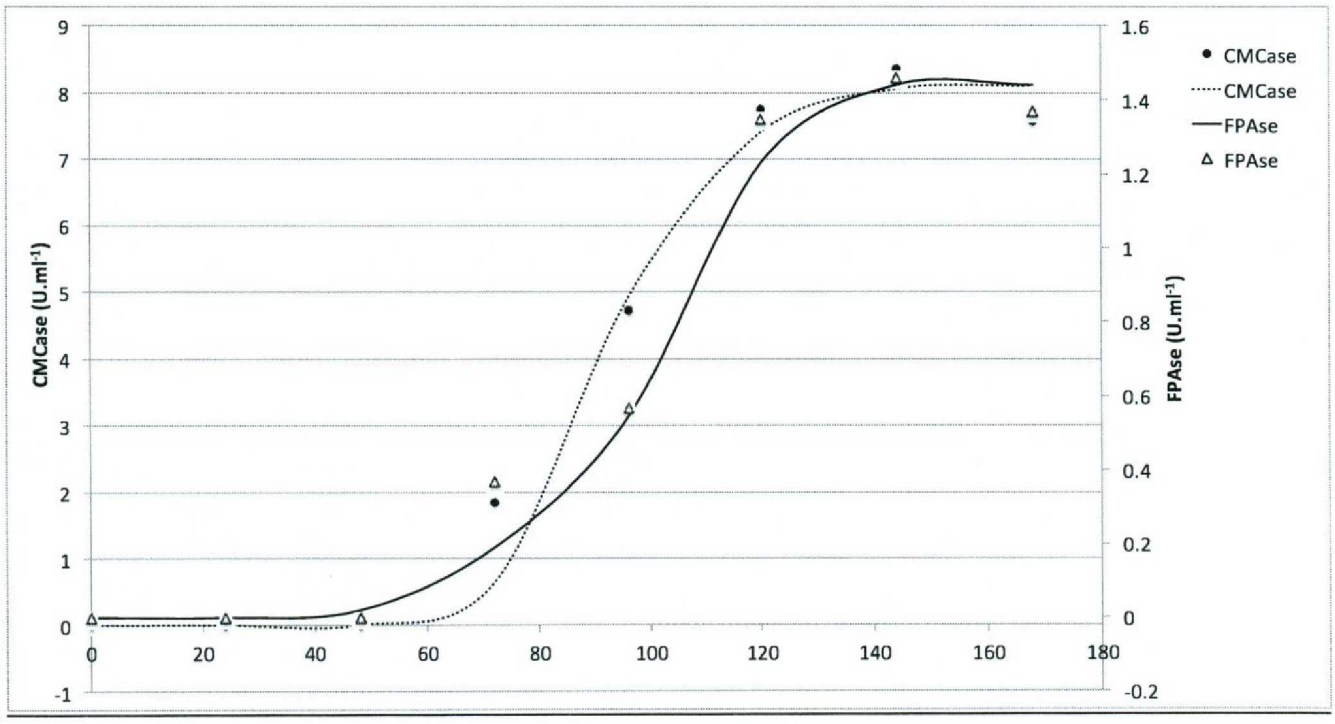


Figura 2



PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO EFLUENTE SANITÁRIO BRUTO

A presente invenção trata de um bioprocesso de produção de celulases (exo-celulases e endo-celulases) por fermentação submersa, utilizando efluente sanitário bruto como base do meio de produção. O(s) microrganismo(s) utilizado(s) é(são) do gênero *Trichoderma sp.* e propicia altos rendimentos em celulases produzidas. O processo é caracterizado por ser simples e de baixo custo por empregar como base de meio de produção efluentes sanitários adicionados de componentes químicos.