

## Área: Engenharia de Alimentos

# PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO USANDO *Trichoderma reesei* NRRL 3652 EM CASCA DE SOJA E PALITO DE *Illex paraguariensis*

Viviane Astolfi<sup>1\*</sup>, Angela Luiza Astolfi<sup>1</sup>, Ana Paula Picolo<sup>1</sup>, Márcia Santin Trentini<sup>1</sup>,  
Clarissa Dalla Rosa<sup>1</sup>, Elisadra Rigo<sup>2</sup>, Marco Di Luccio<sup>3</sup>, Helen Treichel<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Campus de Erechim, Curso de Engenharia de Alimentos; <sup>2</sup>Universidade do Estado de Santa Catarina - Campus de Pinhalzinho, Departamento de Engenharia de Alimentos; <sup>3</sup>Universidade Federal de Santa Catarina - Campus Trindade, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos; <sup>4</sup> Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus de Erechim. \*E-mail: vivi\_ast@yahoo.com.br

**RESUMO** – Atualmente tem se buscado esforços para o desenvolvimento e a implementação de tecnologias para produção de etanol celulósico a partir de resíduos agrícolas com baixo valor agregado, como bagaço de cana, casca de soja, resíduos de madeira, palitos de erva mate, entre outros. A biomassa vegetal é constituída principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, sendo a celulose o polímero mais abundante. A hidrólise enzimática é um importante passo para a bioconversão da fração celulósica e hemicelulósica de resíduos lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção enzimática de FPase, Carboximetilcelulase e xilanase por fermentação em estado sólido (FES) usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em casca de soja e pó de palito de erva mate. As FES foram conduzidas em béqueres contendo 10 g de substrato seco com umidade de 70%. Após a esterilização, inoculou-se  $1 \times 10^7$  esporos/g de substrato seco, e em seguida incubados em câmara climatizada. O comportamento cinético do processo de produção de celulases e xilanase foi acompanhado, realizando-se atividades enzimáticas nos intervalos de tempo de 0; 3; 6; 9; 12 e 15 dias. A máxima produção para FPase ocorreu após 3 dias de fermentação para casca de soja ( $6,71 \text{ U.g}^{-1}$ ). Já a máxima produção de CMCase ( $20,77 \text{ U.g}^{-1}$ ) foi encontrada após 6 dias de fermentação para os ensaios de fermentação com substrato misto. Observou-se alta produção de xilanase para casca de soja no terceiro dia, porém, o valor máximo de  $1130,70 \text{ U.g}^{-1}$  foi obtido em 6 dias de fermentação.

**Palavras-chave:** Produção de celulases e xilanase, casca de soja, pó de palito de erva mate.

## 1 INTRODUÇÃO

O etanol é atualmente produzido através da conversão de carboidratos a partir de culturas como o milho (EUA), cana (Brasil) e beterraba (Europa). No entanto, o uso da terra para esses combustíveis compete com o fornecimento de alimentos e preservação ambiental (GOTTSCHALK et al., 2010). Como tal, têm-se buscado esforços para o desenvolvimento e implementação de tecnologias para produzir etanol celulósico a partir de resíduos agrícolas com baixo valor agregado, como palha de milho, palha de trigo, bagaço de cana, casca de soja, resíduos de madeira, palito de erva mate, entre outros (LUO et al., 2009). Segundo Sarkar et al. (2012), é constante o esforço para utilizar resíduos em bioprocessos, seja na forma de suporte e/ou de substrato, entretanto, a seleção adequada do substrato é de fundamental importância para o sucesso de qualquer tipo de fermentação. Além dos biocombustíveis, celulases e hemicelulases são amplamente utilizadas na indústria química, têxtil, papel e celulose, detergente, bebidas, agricultura e alimentação animal, entre outros (JABASINGH e VALLINACHIYAR, 2011).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de celulases e xilanase por fermentação em estado sólido (FES) usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em casca de soja e pó de palito de erva mate como substrato.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material Biológico

A produção de celulases e hemicelulase foi conduzida com o uso do *Trichoderma reesei* NRRL 3652, obtido da ARS Culture Collection (NRRL). A cepa do fungo filamentosos foi cultivada em meio PDA (Potato Dextrose Agar) durante 7 dias em estufa a 30°C e a contagem dos esporos efetuada em câmara de Neubauer (Inlab) segundo metodologia de Freire (1996), na concentração de  $1 \times 10^7$  esporos/g de substrato seco (DHILLON et al., 2011).

### 2.2 Obtenção do substrato-suporte

Os substratos utilizados no processo fermentativo foram: a casca de soja (CS), que consiste no resíduo da extração do óleo de soja, obtido após a prensagem de grãos e extração com solventes, doado por uma indústria de óleo de soja local (Olfar, Erechim, RS); o pó do palito de erva mate (PPE) é um resíduo do processamento da erva mate obtido após o peneiramento do palito moído, sendo a menor granulometria da peneira, doado por uma indústria de erva mate (Barão Comércio e Indústria de Erva Mate Ltda., Barão de Cotegipe, RS). Os substratos foram estocados a temperatura ambiente e utilizados sem tratamento prévio.

### 2.3 Bioprodução de Celulases e Xilanase

As FES foram conduzidas em béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica, contendo 10 g de substrato seco com umidade ajustada para 70% com água destilada (DESWAL et al., 2011). Após a esterilização (121°C, 15 min), procedeu-se a inoculação do substrato utilizando-se 2 mL de inóculo com  $1 \times 10^7$  esporos/g de substrato seco. Os béqueres foram incubados em câmara climatizada (Tecnal TE-410) a  $30 \pm 1$  °C, com injeção de ar úmido segundo Dhillon et al. (2011).

O comportamento cinético do processo de produção de celulasas e hemicelulase foi acompanhado, realizando-se amostragem do fermentado nos intervalos de tempo de 0; 3; 6; 9; 12 e 15 dias.

Para o processo de extração foi adicionado tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,5 ao meio fermentado na razão 1:15 (3,33 g de substrato fermentado para 50 mL de tampão) e em seguida, incubado por 30 min a 50 °C e 100 rpm em agitador orbital. Após a incubação, as amostras foram filtradas, utilizando-se tecido de nylon e pressão manual obtendo-se o extrato enzimático bruto.

## 2.4 Dosagem das Atividades Enzimáticas

As dosagens das atividades de celulase total (atividade de papel filtro, FPase) e da Carboximetilcelulase (CMCase) foram determinadas como recomendado pela IUPAC (GHOSE, 1987).

A dosagem da atividade de xilanase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir de xilana “birchwood” (Sigma), conforme descrito por Bailey et al. (1992). Os açúcares redutores (glicose e xilose) foram dosados espectrofotometricamente, pelo método do DNS (MILLER, 1959) onde, uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de açúcares redutores (glicose ou xilose), por minuto, por mL nas condições de cada ensaio. Como fins comparativos e de padronização, as atividades enzimáticas finais para FPase, carboximetilcelulase e xilanase, foram expressas em produção enzimática do substrato seco ( $U \cdot g^{-1}$ ).

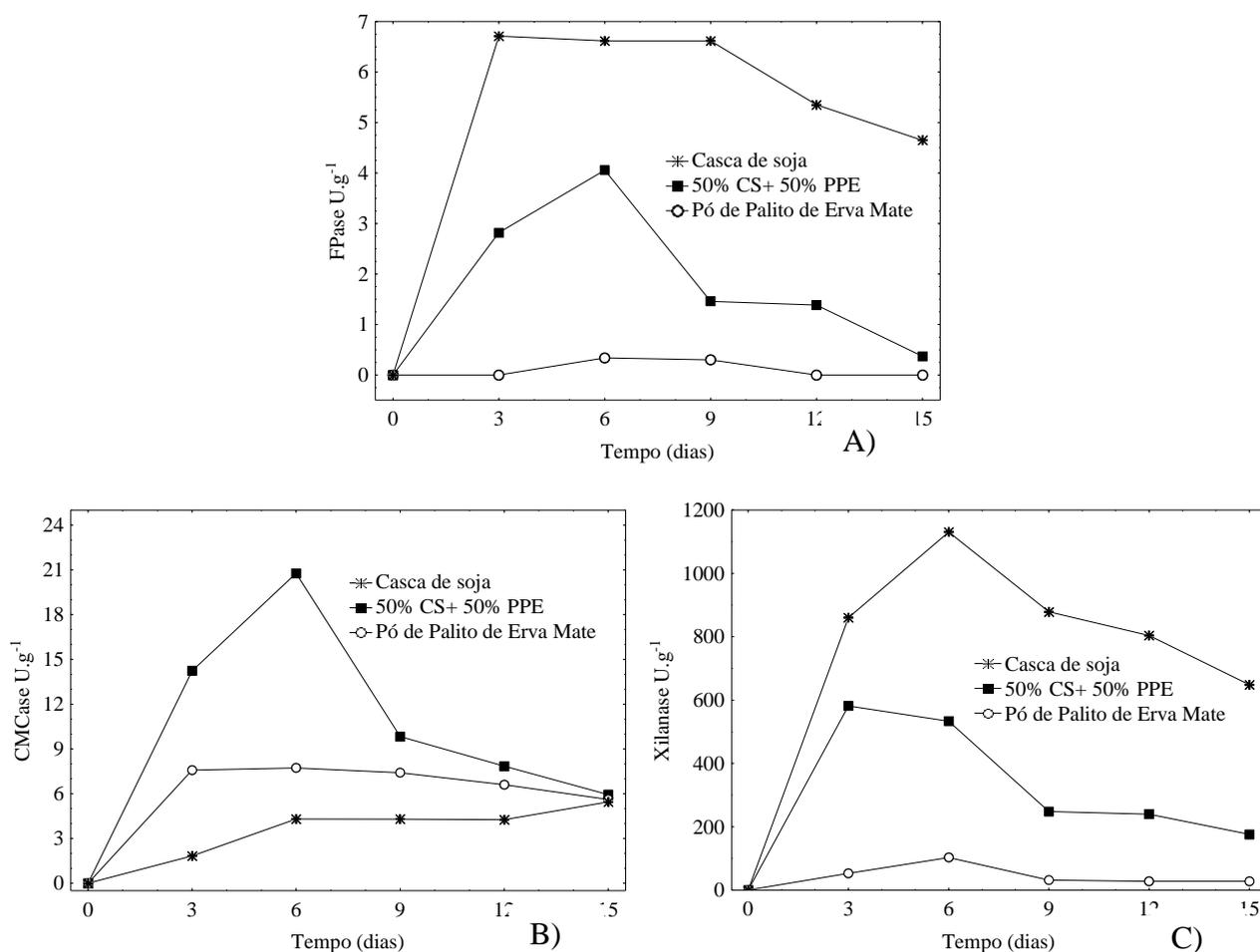
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade FPase é considerada como a atividade celulolítica total. Como mostra a Figura 1A, a produção máxima para FPase ocorreu após 3 dias de fermentação para casca de soja ( $6,71 U \cdot g^{-1}$ ) mantendo-se até o nono dia ( $6,62 U \cdot g^{-1}$ ) e após, observou-se diminuição de cerca de 30 % da produção até o décimo quinto dia. Porém, para a fermentação mista de casca de soja e pó de palito, observou-se a máxima produção de  $4,06 U \cdot g^{-1}$  após 6 dias, valor este 40% menor se comparado com casca de soja ( $6,62 U \cdot g^{-1}$ ). Praticamente, não se observou a produção de FPase quando utilizado apenas pó de palito de erva mate como substrato.

Como pode ser visto na Figura 1B, a atividade máxima para CMCase foi encontrada em 6 dias ( $20,77 U \cdot g^{-1}$ ) para os ensaios de fermentação com substrato misto. Para o pó do palito de erva mate a atividade manteve-se estável a partir do terceiro dia até o décimo segundo dia de fermentação ( $7,58 U \cdot g^{-1}$  –  $6,61 U \cdot g^{-1}$ , respectivamente). A produção de CMCase obtida a partir de casca de soja foi cerca de 74 % menor se comparada com a fermentação de substrato misto.

A Figura 1C mostra alta produção de xilanase para casca de soja no terceiro dia, porém, o valor máximo de  $1130,70 \text{ U.g}^{-1}$  foi obtido em 6 dias de fermentação. Depois disso, a atividade decresce cerca de 40 % ( $648,38 \text{ U.g}^{-1}$ ) no décimo quinto dia. Para a fermentação com substrato misto observou-se a máxima produção em 3 dias de fermentação e em seguida os rendimentos da enzima diminuem gradualmente. Quando utilizado apenas pó de palito de erva mate como substrato observou-se o mesmo comportamento que para FPase, ou seja, a ausência da produção da enzima. Segundo Kamat e Gawande, (1999) a presença de lignina na biomassa agrícola, inibe a produção das enzimas lignocelulolíticas assim como a sua ação sobre a celulose e hemicelulose

Figura 1: Perfil cinético para: A) produção de FPase; B) produção de CMCCase; C) produção de xilanase, respectivamente, usando casca de soja, substrato misto (50 % casca de soja e 50% pó de palito de erva mate ) e pó de palito de erva mate como substrato em FES.



Brijwani et al. (2010) estudaram a produção de enzimas celulolíticas em FES com cultura mista usando casca de soja suplementada com farelo de trigo, do qual obtiveram resultado semelhante se comparado com este trabalho na produção de FPase ( $6,55 \text{ U.g}^{-1}$ ), no entanto para a produção de xilanase, os autores obtiveram duas vezes menos a que aqui produzida.

## 4 CONCLUSÃO

Entre os substratos lignocelulolíticos testados, a casca de soja foi mais eficaz para a produção de FPase e xilanase. Isto ocorreu provavelmente porque a casca de soja é um material lignocelulósico basicamente composto por açúcares fermentáveis, polimerizados como celulose (glucose) e hemicelulose (xilose e arabinose), e apresenta uma proporção muito baixa de lignina (compostos fenólicos), facilitando o acesso do micro-organismo ao substrato. No entanto quando a produção de CMCase foi realizada em fermentação com substrato misto observou-se maior produção se comparado aos substratos individuais.

## 5 AGRADECIMENTOS

À URI – Campus de Erechim pela infra-estrutura e à CAPES pelo suporte financeiro.

## 6 REFERÊNCIAS

- BAILEY, M.J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, vol. 23, p. 257-270, 1992.
- BRIJWANI, K.; OBEROI, H.S.; VADLANI, P.V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v. 45, p.120-128, 2010.
- DESWAL, D.; KHASA, Y.P.; KUHAD, R.C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6065-6072, 2011.
- DHILLON, G.S.; OBEROI, H.S.; KAUR, S.; BANSAL, S.; BRAR, S.K. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1160-1167, 2011.
- FREIRE, D. M. G. **Seleção de micro-organismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum***. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ. 1996.
- GAWANDE, P.V., KAMAT, M.Y., Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. **Journal of Applied Microbiology**, 87, 511-519, 1999.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- GOTTSCALK, L.M.F.; OLIVEIRA, R.A.; BOM, E.P.S. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, 51, 72-78, 2010.
- JABASINGH, S.A.; VALLINACHIYAR, C. Optimization of cellulose production by *Aspergillus nidulans*: application in the biosoftening of cotton fibers. **World Journal of Microbiology**, 27, 85-97, 2011.

LUO, L.; VOET, E.; HUPPES, G., Life cycle assessment and life cycle costing of bioethanol from sugarcane in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 13, 1613-1619, 2009.

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

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K., Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27, 2012.