



# PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

V. M. OLIVEIRA<sup>1</sup>, F.M. AMBROZIM<sup>1</sup> e I. R. PINHEIRO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias,  
Departamento de Engenharia Rural  
E-mail para contato: vivianemarquesolv@gmail.com

**RESUMO** – O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção enzimática de celulases pelo fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* IOC-3844 por fermentação em estado sólido, utilizando resíduos agroindustriais. Foram realizados ensaios variando-se a umidade, tempo de fermentação e composição do meio de cultivo, a fim de avaliar a melhor condição para produzir as celulases, onde foram avaliadas como resposta a atividade CMCase das enzimas produzidas. A maior produção de CMCase ( $23,89\text{U.gms}^{-1}$ ) foi observada para a condição de 9,1% de farelo de trigo, 35,9% de cacau e 55% de bagaço de cana, 81,89% de umidade e em 72 horas de cultivo.

Palavras-chave: Casca de cacau. Bagaço de cana-de-açúcar. *Trichoderma harzianum*.

## 1. INTRODUÇÃO

As cadeias produtivas geram uma grande quantidade de resíduo vegetal, principalmente proveniente da casca do fruto, que representam a maior parte da sua composição. Levando em consideração que os resíduos gerados se enquadram como recursos, subprodutos ou produtos secundários, muitos estudos têm sido realizados visando o seu aproveitamento de forma sustentável e economicamente viável (MÉLO, 2016).

O interesse pelas celulases nos últimos anos tem se renovado devido a seu potencial uso na conversão de biomassa em açúcares fermentescíveis, integrando assim uma nova rota para a produção de álcool combustível. Atualmente, este processo é economicamente impraticável, principalmente em razão do custo elevado das celulases. Como tecnologia promissora para a produção dessas enzimas, é possível realizar a fermentação em estado sólido (FES), o qual possui como principal característica a ausência de água livre, onde são utilizados substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais. Esse material sólido tem a função de atuar como suporte físico e, muitas vezes, como fonte de nutrientes para o crescimento microbiano (PANDEY, 2003).

Dessa forma, o presente trabalho estudou a FES em composições diferentes de meio de cultivo. Com os substratos bagaço de cana-de-açúcar, casca de cacau e farelo de trigo o microrganismo utilizado foi o *Trichoderma harzianum* IOC-3844, visto que, essa espécie e suas linhagens são produtoras eficientes de enzimas celulolíticas. O objetivo foi avaliar a



melhor composição de substratos e a influência da umidade no processo, onde foram avaliadas como resposta a atividade CMCase das enzimas produzidas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Cultivos Sólidos

As fermentações foram realizadas com o fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* IOC-3844, em meio sólido constituído de uma mistura de três resíduos agroindustriais: casca de cacau e bagaço de cana, os quais foram secos em estufa a 105°C, moídos e peneirados; e farelo de trigo, sendo armazenados sob refrigeração a -4 °C.

Em frascos Erlenmeyers de 500 mL, foram pesadas as quantidades referentes a cada experimento, conforme a Tabela 1, totalizando 10g. A umidade de cada experimento foi obtida, em base úmida, pela adição de solução salina (Urbánszki, Szakacs e Tengerdy, 2000), sendo uma parte do volume adicionada antes da esterilização e outra parte utilizada para solubilizar 0,1g de inóculo. Os frascos foram mantidos em estufa a 30 °C por 120 horas, sendo que a cada 24 horas foram realizadas a determinação da umidade e a extração das enzimas.

### 2.2. Extração e atividade enzimática CMCase

Cerca de 1g de sólido fermentado foi diluído em uma mistura de 20 mL, sendo 50% água e 50% tampão citrato de sódio ( pH4,8 e 0,05mol/L) e foi adicionado uma gota de Tween 80. Manteve-se sob agitação a 180 rpm por 60 minutos. Após o tempo de agitação, o material foi filtrado e centrifugado a 3500 rpm por 30 minutos, obtendo no sobrenadante o extrato enzimático.

Para a medida da atividade enzimática, foi adicionada 0,5 ml do carboximetilcelulose (CMC) 2% (m/v) em tampão citrato (pH 4,8), e 0,5ml do extrato enzimático em tubos de ensaio, mantidos em banho-maria a 50 °C por 30 minutos. Após a reação, foram adicionados 1,5 ml de DNS em cada tubo e estes foram colocados num banho de água fervente por 5 minutos, seguidos do banho de gelo. Posteriormente o volume foi completado com água destilada para 10 ml e a absorbância foi lida no espectrofotômetro a 540nm (Nunes,2014; Ghose, 1987).

Neste trabalho a atividade enzimática foi expressa em U.gms<sup>-1</sup>, que é a quantidade de enzima capaz de liberar 1 micromol de açúcares redutores por minuto por grama de massa seca.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra a matriz de planejamento do projeto e a melhor produção de CMCase para cada experimento com o seu respectivo tempo de cultivo.

Tabela 1 – Condições dos experimentos e resultados de atividade CMCase

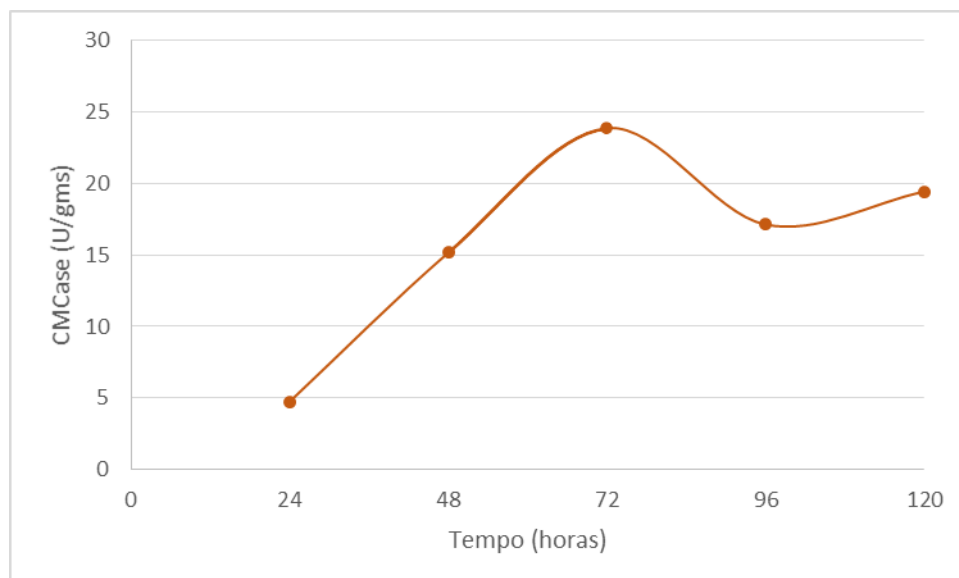
Experimentos.	CC (%)	FT (%)	BC (%)	Umidade (%)	CMCase máxima (U/gms)
1	9,1	9,1	81,8	58,11	4,65 (96 horas)
2	35,9	9,1	55	58,11	4,80 (72 horas)
3	9,1	35,9	55	58,11	5,98 (72 horas)
4	35,9	35,9	28,2	58,11	16,92 (96 horas)
5	9,1	9,1	81,8	81,89	18,40 (96 horas)
6	35,9	9,1	55	81,89	23,89 (72 horas)
7	9,1	35,9	55	81,89	18,28 (120 horas)
8	35,9	35,9	28	81,89	11,87 (72 horas)
9	0	22,5	77,5	70,00	16,94 (72 horas)
10	45,0	22,5	32,5	70,00	12,71 (96 horas)
11	22,5	0	77,5	70,00	11,69 (48 horas)
12	22,5	45,0	32,5	70,00	11,03 (48 horas)
13	22,5	22,5	55	70,00	9,07 (96 horas)

CC: Casca de cacau; FT: Farelo de Trigo; BC: Bagaço de cana.

Para obter melhores resultados é importante que o meio esteja mais úmido. Observa-se que a melhor condição de fermentação atingida foi no experimento 6, em 72 horas de cultivo, atingindo uma umidade média de 83,81 %, o qual foi obtido uma atividade de CMCase de 23,89 U.gms<sup>-1</sup>.

Para melhor representar esse experimento, traçou a cinética de reprodução enzimática apresentada pela Figura 1.

Figura 1– Atividade enzimática CMCase em função do tempo de fermentação para o experimento 6.





Ambrozim *et al.* (2018) também realizaram o estudo de fermentação em estado sólido utilizando o microrganismo *Trichoderma harzianum* IOC-3844 e a casca de cacau como substrato e obteve a maior atividade enzimática ( $4,95 \text{ U.gms}^{-1}$ ) em 72 horas de cultivo, com 40% de casca de cacau, 60% de bagaço de cana e 70% de umidade. Assim, percebe-se que este trabalho encontrou valores superiores, indicando melhores condições para o crescimento microbiano e produção de celulases.

Deschamps *et al.* (1985) alcançaram atividade de 198 U/gms de CMCase em cultivos com BC; Rahnema *et al.* (2016) encontraram CMCase de 111,31 U/g de substrato, utilizando palha de arroz.

O presente estudo obteve atividades enzimáticas inferiores às encontradas na literatura, mas vale ressaltar que publicações sobre produção de celulases utilizando a mistura de resíduos agroindustriais são escassas. Dessa forma, os resultados se tornam relevantes por realizar outros experimentos visando a condição ótima do processo.

#### 4. CONCLUSÃO

Os cultivos sólidos para a produção de celulases apresentaram resultados satisfatórios, o que torna a casca de cacau e o farelo de trigo bons resíduos em potencial para o uso em FES. O fungo *Trichoderma harzianum* se mostrou capaz de produzir as enzimas, sendo que os melhores resultados foram para umidades mais altas, atingindo o valor máximo de produção de CMCase ( $23,89 \text{ U.gms}^{-1}$ ) no tempo de 72 horas.

#### 5. REFERÊNCIAS

- AMBROZIM, F. M. et al. Estudo da Utilização da Casca de Cacau na Fermentação em Estado Sólido para produção de celulases com *T. harzianum*. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 22, 2018, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia Química, 2018.
- DESCHAMPS F *et al.* Cellulase production by *Trichoderma harzianum* in static and mixed solid-state fermentation reactors under nonaseptic conditions. *Biotechnol Bioeng.* 1985.
- GHOSE TK. Measurement of cellulase activities. *Pure App. Chem.*, v. 59, n. 2, 1987.
- MÉLO, B. C. A. *Produção de Celulases por Fermentação em Estado Sólido em Resíduo de Acerola (Malpighia sp.) Utilizando Trichoderma reesei.* 2017. 116 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- NUNES, J. M. N. *Produção de Enzimas Celulolíticas por Linhagens do Fungo Trichoderma.* 2014. 37 f. TCC (Graduação) – Curso de Engenharia Química, Departamento da Engenharia Rural, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2014.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* v. 13, p. 81-84, 2003.



RAHNAMA N *et al.* Production and characterisation of cellulase from solid state fermentation of rice straw by *Trichoderma harzianum* SNRS3. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 39 (4). 2016.

URBÁNSZKI K, SZAKACS G, TENGÉRDY RP. Standardization of the filter paper activity assay for solid substrate fermentation. *Biotechnol. Lett.* 22. 2000.