

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE RESÍDUOS DA CADEIA DO BIODIESEL COMO FONTE DE CARBONO PARA PRODUÇÃO DE XILANASE POR *Aspergillus tubingensis* AN1257 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A. P. COURA¹, J. L. PIMENTA², R. S. SANTOS^{3,4}, A. P. F. C. VANZELA^{3,4}, L. A. PANTOJA^{1,3},
A. S. SANTOS^{2,3}

¹Departamento de Ciências Básicas – UFVJM

²Instituto de Ciências e Tecnologia – UFVJM

³Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis - UFVJM,

⁴Departamento de Farmácia - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

E-mail para contato: coura.andre.bio@gmail.com

RESUMO - O uso de fontes de carbono derivadas de biomassas residuais é uma alternativa para a produção de enzimas xilanolíticas, pois implica em redução de custos. Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a produção de xilanase por *Aspergillus tubingensis* utilizando resíduos derivados da exploração do óleo de caroço de algodão, dendê, girassol, macaúba, mamona e pinhão-manso como fontes de carbono em processo de fermentação em estado sólido. Todas as tortas testadas foram capazes de induzir a produção de xilanase por *A. tubingensis* em processo conduzido por 14 dias, com destaque para a torta de algodão, que produziu extrato com 90U/mL de xilanase com 11 dias de fermentação, o equivalente à 590U/g de torta. A utilização de resíduos provenientes da extração lipídica de oleaginosas para produção de xilanase se mostrou relevante, por agregar valor a coprodutos subutilizados.

1. INTRODUÇÃO

A busca por alternativas que solucionem o problema do acúmulo e descarte de resíduos agroindustriais e que causam menos impactos ao meio ambiente, vêm sendo amplamente estimulados nos últimos anos por órgãos governamentais e pelo setor produtivo empresarial (Sukumarana *et al.*, 2009). Neste cenário, milhões de toneladas de resíduos oriundos do processamento de oleaginosas para a produção do biodiesel são produzidas anualmente. Geralmente, a torta ou farelo gerado na extração do óleo não passam por processo de agregação de valor porque são desconhecidas as suas potencialidades nutricionais e econômicas, salvo algumas exceções como soja, algodão e girassol (Abdalla *et al.*, 2008). O aproveitamento destes resíduos ainda se constitui em um desafio, necessitando de estudos que possam promover maior agregação de valor tornando a indústria do biodiesel mais competitiva.

As biomassas supracitadas apresentam em sua constituição três grupos principais de polímeros, a lignina, celulose e hemicelulose. Devido à presença dos carboidratos, uma estratégia possível para promover uma maior agregação de valores a estes resíduos seria a sua utilização como fontes de carbono em processos fermentativos por micro-organismos para produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas.

Alguns resíduos das indústrias de biodiesel têm sido relatados como fontes de carbono para produção de enzimas lignocelulolíticas, como torta de dendê (Alam *et al.*, 2005), resíduos de amendoim (Vyas e Vyas, 2005), torta de pinhão-mansão (Ncube *et al.*, 2012), torta de mamona (Herculano *et al.*, 2011). A utilização de resíduos da cadeia do biodiesel em bioprocessos para obtenção de enzimas tem se mostrado como ferramenta economicamente promissora, pois além de agregar valores aos coprodutos, permitirá a redução do custo do processo de produção de enzimas hidrolíticas.

Uma variedade de micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos têm sido utilizados para produzir enzimas lignocelulolíticas. Os fungos filamentosos vêm demonstrando uma grande capacidade de secretar uma variedade de xilanases, sendo o gênero *Aspergillus* sp. um dos mais extensivamente estudados e revistos entre os produtores de enzimas xilanolíticas. Estes biocatalizadores podem ser produzidos biotecnologicamente por fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação submersa (Pandya *et al.*, 2012). No entanto, a FES oferece vantagens sobre a fermentação submersa, incluindo menor possibilidade de contaminação, pela ausência de água livre no sistema, maiores produtividade e concentração final do produto e menor volume de resíduos líquidos gerado. (Santos *et al.*, 2012).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial indutor das tortas de algodão, dendê, girassol, macaúba, mamona e pinhão-mansão quando utilizadas como fontes de carbono em processo de fermentação em estado sólido (FES) para produção de xilanase por *Aspergillus tubingensis* AN1257.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção e preparo das tortas

A torta de algodão utilizada neste estudo foi doada pela Indústria de Óleo, Rações e Plásticos Montes Claros LTDA – localizada no município de Montes Claros, MG; a torta de girassol foi doada pela empresa BIOSEP, localizada no município de Três Pontas, MG; a torta de macaúba foi doada pela Unidade de Beneficiamento do Coco de Macaúba - UBCM, localizada na cidade de Mirabela – MG; as tortas de mamona e pinhão manso foram obtidas a partir do processamento de sementes doadas pela empresa de pesquisa agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, fazenda experimental de Nova Porteirinha, MG; a torta de dendê foi doada pela indústria e refinaria AGROPALMA, PA.

2.2. Obtenção e manutenção das linhagens de fungos

A linhagem do fungo filamentosos utilizada neste estudo, *Aspergillus tubingensis* AN1257, foi selecionada a partir de resultados de triagem realizada anteriormente. O micro-organismo foi mantido no Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação - UFVJM, estocado em tubos de ensaio contendo meio PDA (potato dextrose ágar) e conservado sob refrigeração ($4\pm 1^\circ\text{C}$).

2.3. Processo fermentativo para produção de xilanase

O crescimento da linhagem *Aspergillus tubingensis* AN1257 para obtenção do inóculo foi realizada por repicagem da cultura estoque em placas de Petri com meio sólido PDA, as quais foram incubadas a 30°C por 7 dias. A solução de conídios foi obtida assepticamente por adição de 5 mL de meio líquido segundo Mandels e Sternberg (1976) em cada placa de cultura, seguida de raspagem com alça de drigalski. Posteriormente as soluções de conídios foram coletadas com auxílio de pipeta de Pasteur e filtradas através de gaze estéril. A concentração de conídios da solução obtida foi determinada por contagem em Câmara de Neubauer. O inóculo foi preparado a partir da solução filtrada de conídios devidamente diluída em meio líquido (Mandels e Sternberg, 1976) de forma a se obter uma concentração final de $1,43 \times 10^7$ conídios/mL.

A linhagem *Aspergillus tubingensis* foi avaliada quanto ao desempenho na produção de xilanase em processos de fermentação em estado sólido (FES), em meios elaborados com tortas de algodão, dendê, girassol, macaúba, mamona e pinhão-manso como fontes de carbono. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 50mL contendo 3 gramas de torta seca acrescidos de 2,1 ml de inóculo (70% de umidade). Deste modo a concentração final do inóculo foi de $1,0 \times 10^7$ conídios/grama de torta. O processo fermentativo foi conduzido por 14 dias, a 30°C em estufa incubadora sem agitação, onde a cada 48 horas foi realizada a determinação da atividade xilanolítica.

A obtenção dos extratos enzimáticos foi realizada por adição de 20 ml de tampão citrato, pH 5, 100mM, gelado, em cada ensaio seguido de agitação vigorosa em vórtex. Posteriormente os extratos foram filtrados em funil de Büchner a vácuo utilizando papel de filtro e recolhidos em tubos de ensaio imersos em gelo em escama contido dentro de Kitassato. Os filtrados foram mantidos em gelo até a quantificação das enzimas com atividade FPásicas.

A atividade xilanolítica foi determinada por quantificação de açúcares redutores (Miller, 1959) liberados após 10 minutos em um meio reacional, à 50°C , contendo 300 μL de xilana de Birchwood (Sigma) e 300 ml de extrato enzimático devidamente diluído em tampão pH 5. A atividade da enzima xilanase foi expressa em U/g de torta, onde uma unidade (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar $1\mu\text{mol}$ de açúcares redutores, por minuto de reação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Processo fermentativo para produção de enzimas lignocelulolíticas

O gráfico representado pela Figura 1 ilustra as atividades máximas de xilanase (U/g de torta) dos extratos brutos produzidos pela linhagens AN1257 (*Aspergillus tubingensis*), por processo de fermentação em estado sólido (FES), em meios elaborados com as tortas de algodão, dendê, girassol, macaúba, mamona e pinhão-manso. Observa-se que todas as tortas induziram a produção de xilanase, porém a que melhor induziu a produção desta enzima foi a torta de algodão, gerando um extrato com 90U/mL de xilanase com 11 dias de fermentação, o equivalente à 590U/g de torta.

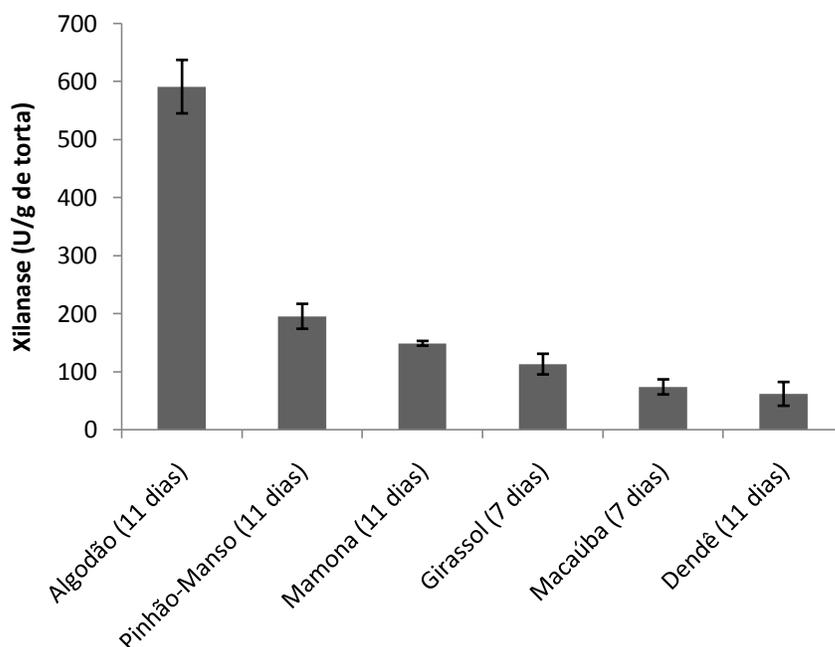


Figura 1 – Valores de produção máxima da enzima xilanase pelas linhagens *Trichoderma reesei* CCT2768, *Aspergillus tubingensis* AN1257, *Penicillium* sp. T1.1, e PV, em processo de fermentação em estado sólido

O gráfico representado na Figura 2 demonstra o perfil fermentativo para produção de enzimas com atividade xilanolítica por *Aspergillus tubingensis* AN1257 em processos de fermentação em estado sólido utilizando as tortas de algodão e pinhão-manso como fonte de carbono.

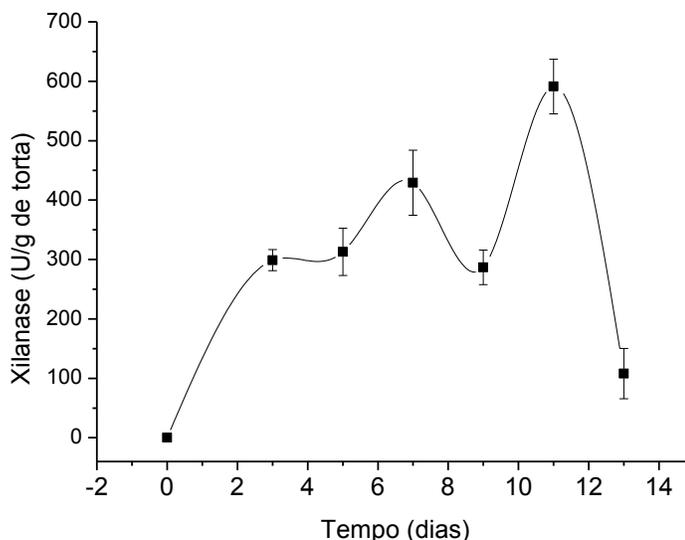


Figura 1 – Perfil de produção de enzimas com atividade xilanolíticas por *A. tubingensis* AN1257 em fermentação em estado sólido utilizando tortas de algodão e pinhão-mansão como fonte de carbono.

Cabe destacar que os resultados deste estudo foram superiores a diversos trabalhos recentes que utilizaram linhagens de fungos do gênero *Aspergillus* em processo fermentativos empregando resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono. A exemplo cabe citar os realizados por Gottschalk *et al.* (2010), Chapla *et al.* (2010) e Fachhini *et al.* (2011) que reportaram a produção de extratos com atividade xilanolíticas de 79 U/mL (Fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar), 52 U/mL (Fermentação submersa utilizando bagaço de cana-de-açúcar) e 26,2 U/mL (Fermentação submersa utilizando farelo de sabugo de milho) respectivamente.

Os resultados obtidos mostraram-se promissores induzindo a sequência de uma próxima etapa de estudos que será compreender as relações entre as variáveis relacionadas ao processo fermentativo (umidade, concentração e tipos de fontes de nitrogênio, concentração de conídios, temperatura, pH, aeração) por meio de processos de otimização.

3. CONCLUSÕES

Apesar de enzimas xilanolíticas serem comumente comercializadas, vale ressaltar que o atual emprego destes catalisadores apresenta alto custo. Diante do exposto, há necessidade de estudos como este, voltados para a produção de enzimas lignocelulolíticas mais acessíveis e com baixo custo. Sendo assim, este trabalho contribuiu de forma positiva na obtenção de dados científicos relevantes para a modificação deste cenário. Deve-se salientar que utilização de resíduos oriundos da cadeia de produção do biodiesel como fonte de carbono para produção de xilanase se mostrou relevante, por agregar valor a coprodutos subutilizados, bem como pela sua eficiência quando utilizados como substratos em processos fermentativos.

6. REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A. L.; SILVA FILHO, J.C.; GODOI, A.R.; CARMO, C.A.; EDUARDO, J.L.P.. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. *R. Bras. Zootec.* [online], v.37, p. 260-268, 2008.
- ALAM, M.Z.; MUHAMMAD, N.; MAHAMAT, M.E. Production of cellulase from oil palm biomass as substrate by solid state bioconversion. *Am. J. Appl. Sci.* v. 2, p. 569–572, 2005.
- CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. *Biochemical Engineering Journal*, 2008.
- FACCHINI, F. D. A.; VICI, A. C.; BENASSI, V. M.; FREITAS, L. A. P.; REIS, R. A.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Optimization of fibrolytic enzyme production by *Aspergillus japonicus* C03 with potential application in ruminant feed and their effects on tropical forages hydrolysis. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2011.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. *Pure and Ap. Chem.*, v. 59, p. 257–268, 1987.
- GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BOM, E. P. S. Cellulases, xylanases, glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemical Engineering Journal*, v. 51, p. 72–78, 2010.
- HERCULANO, P. N. *et al.* Cellulolytic Fungi from Castor *CurrMicrobiol*, v. 62, p. 1416–1422, 2011.
- MANDELS, M.; STERNBERG D. Recent advances in cellulase technology. *J Ferment Technol* v 54, p. 267-286, 1976.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal.Chem.*, v.31, p.426-428, 1959.
- NCUBE T., RACHMOND L. H., ABOTSI E. K., RENSBURG E. L. J., NCUBE I. Jatropha curcas seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, v. 37, p. 118– 123, 2012.
- PANDYA, J. J. Production of xylanase under solid-state fermentation by *Aspergillus tubingensis* JP-1 and its application. *Bioprocess Biosyst Eng*, v. 35, p. 769 – 779, 2012.
- SANTOS, R. S. Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por fungos filamentosos utilizando resíduos da cadeia do biodiesel como fonte do carbono. 2012, 113 p. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, UFVJM, Diamantina, 2012.
- SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, v. 34, p. 421–424, 2009.
- VYAS, A., VYAS, D. Production of fungal cellulases by solid state bioprocessing of groundnut shell wastes. *J. Sci. Ind. Res.* v. 64, p. 767–770, 2005.