

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA POR MEIO DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

R. L. S. FRANÇA¹, M. L. ARAÚJO², A. K. S. ABUD^{2,3}, A. M. OLIVEIRA Jr^{1,3}

¹ Universidade Federal de Sergipe, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química

² Universidade Federal de Alagoas, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química

³ Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Tecnologia de Alimentos

E-mail para contato: reginaquimica@gmail.com

RESUMO – A produção de componentes de alto valor agregado a partir de resíduos agroindustriais vem recebendo destaque com a crescente preocupação com o meio ambiente. Neste cenário, a fermentação semi-sólida é uma das tecnologias utilizadas na obtenção de enzimas celulolíticas, que se destacam na produção de etanol de segunda geração. O trabalho avalia o potencial da umidade e da proporção dos resíduos casca de coco verde e sabugo de milho na produção das enzimas avicelase e xilanase, por meio de 21 ensaios experimentais, delineados segundo planejamento fatorial completo 2^2+3 com triplicata de todos os experimentos. Os modelos possuíram boa qualidade de ajuste, com influência significativa das variáveis independentes na síntese enzimática, com nível de significância de 0,05, bem como a interação entre elas, para a atividade de xilanase. Umidades de resíduo maiores e menor proporção de casca de coco verde em relação ao sabugo de milho foram as condições mais adequadas para o processo fermentativo.

1. INTRODUÇÃO

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, sendo compreendidas, majoritariamente, pelos materiais agroindustriais, resíduos urbanos e madeiras de angiospermas e gimnospermas. Destacam-se os materiais agroindustriais pelo caráter de resíduo, conferido por sua obtenção após o processamento de matérias-primas e geração de enorme impacto ambiental pela sua incorreta destinação, bem como pela vocação natural que o Brasil possui para sua geração (Machado, 2013).

De acordo com Pelizer *et al.* (2007), a crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado, onde inúmeros órgãos governamentais e indústrias estão se preparando para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza. A importância dos resíduos está no fato de o mesmo conter muitas substâncias de alto valor e, sendo empregada uma tecnologia adequada, pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários (Laufenberg, 2003).

Para a produção de combustíveis renováveis, vem sendo dada atenção ao reaproveitamento de

resíduos agroindustriais nos diferentes processos de transformação, a exemplo dos processos fermentativos e da produção de enzimas, catalisadores biológicos bastante atraentes para a aplicação industrial, principalmente pela sua ação eficiente e seletiva. Um destes processos é a fermentação semi-sólida (FSS), também chamada de fermentação no estado sólido (FES), que tem se destacado nos estudos de produção de enzimas hidrolíticas e obtido avanços no aproveitamento dos resíduos agroindustriais, privilegiando a sustentabilidade ambiental e o uso racional dos recursos (Rahavarao *et al.*, 2003).

Entre as enzimas hidrolíticas, destacam-se as celulases, indispensáveis na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, via rota enzimática. A produção destas enzimas por fungos é amplamente disseminada na natureza, incluindo fungos do gênero *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* (Damaso *et al.*, 2013). O fungo *Trichoderma reesei* é o mais estudado, produzindo altas concentrações do complexo hidrolítico, mas a quantidade de β -glicosidases contida no complexo é relativamente baixa, acarretando uma desvantagem do ponto de vista do processo de sacarificação (Kim *et al.*, 1997). Nesse sentido, o emprego do fungo *Aspergillus niger* vem sendo apontado como alternativa para superar esta desvantagem, podendo ser avaliado em fermentações com culturas simples ou em coculturas (Silva, 2008).

A casca de coco verde se destaca entre os resíduos agroindustriais gerados no litoral dos grandes centros urbanos do Brasil em função da umidade, tornando-se foco para proliferação de doenças, lenta degradação, levando mais de oito anos para degradar completamente, grande volume, constituindo-se em aproximadamente 75 a 80% do peso bruto do fruto, e não possuir muitas alternativas de tratamento, tornando sua disposição um sério problema ambiental (SNA, 2012). O sabugo, resíduo gerado após ser debulhado o milho, representa 18% das espigas de milho, sendo considerado, juntamente com a palha, uma alternativa interessante em pesquisas para geração de novas fontes de energia (Ziglio *et al.*, 2007).

Dada à grande disponibilidade dos resíduos, este trabalho avalia o uso do pó da casca de coco verde e do sabugo de milho como substrato na produção de enzimas celulolíticas (xilanase e avicelase) pelo fungo *Aspergillus niger*, através de fermentação semi-sólida. Utilizou-se um planejamento experimental completo, com a finalidade de determinar as melhores condições de umidade e de proporção destes resíduos para as atividades enzimáticas avaliadas, após 24 horas de cultivo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os resíduos empregados foram a casca de coco verde e o sabugo de milho, previamente sanitizados, secos à 50°C e triturados em moinho de facas tipo Wyllie. O microrganismo utilizado nos experimentos de fermentação foi uma linhagem de *Aspergillus niger* isolada do solo, gentilmente cedida pelo BIOSE da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e mantida em tubo inclinado contendo meio ágar batata dextrose, armazenado a 4°C.

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, cobertos com tampão de algodão. O volume de solução mineral [(NH₄)₂SO₄, 10 g/L; MnSO₄, 0,005 g/L; MgSO₄.7H₂O, 1 g/L;

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005 g/L; KH_2PO_4 , 3 g/L; ZnSO_4 , 0,005 g/L e CaCl_2 , 0,5 g/L] foi adicionado de acordo com a umidade desejada ao processo. Utilizaram-se 2 g de biomassa, cuja proporção foi definida pelo planejamento experimental. Os frascos foram esterilizados a 121°C por 15 min e, em seguida, inoculados com $2 \cdot 10^7$ esporos/g. As atividades enzimáticas de avicelase (EC 3.2.1.91) e xilanase (endo-1,4- β -xilanase, EC 3.2.1.8) foram determinadas conforme metodologia descrita por Araújo *et al.* (2012). As análises das atividades enzimáticas foram realizadas após 24 h de fermentação em função de estudos prévios realizados por Araújo *et al.* (2012).

O planejamento fatorial completo com pontos centrais para duas variáveis independentes, detalhado na Tabela 1, foi realizado para que os principais efeitos da umidade e proporção dos resíduos casca de coco e sabugo de milho pudessem ser avaliados estatisticamente. Foram feitas 3 repetições no ponto central, em um total de 21 experimentos, incluindo as réplicas. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA, verificando-se o coeficiente de determinação (R^2) e teste F, utilizando o software Statistica® 11.0.

Tabela 1 – Condições experimentais para o planejamento experimental.

Condição do experimento	1	2	3	4	5	6	7
Umidade (%)	-1 (60)	-1 (60)	+1 (90)	+1 (90)	0 (75)	0 (75)	0 (75)
Proporção (g casca coco:g sabugo milho)	-1 (0,5:1,5)	+1 (1,5:0,5)	-1 (0,5:1,5)	+1 (1,5:0,5)	0 (1:1)	0 (1:1)	0 (1:1)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comportamento das atividades enzimáticas nas diferentes condições do planejamento é apresentado na Figura 1. Observa-se que a melhor condição de atividade das enzimas foi obtida no experimento 3, com atividade média de 2,06 U/g de avicelase e 2,01 U/g de xilanase. Nesta condição se tem maior umidade e proporção de sabugo de milho. De acordo com Lucarini *et al.* (2012), o baixo teor de lignina presente no sabugo de milho pode justificar os maiores valores de produção da celulase alcançados pelo fungo em presença deste substrato.

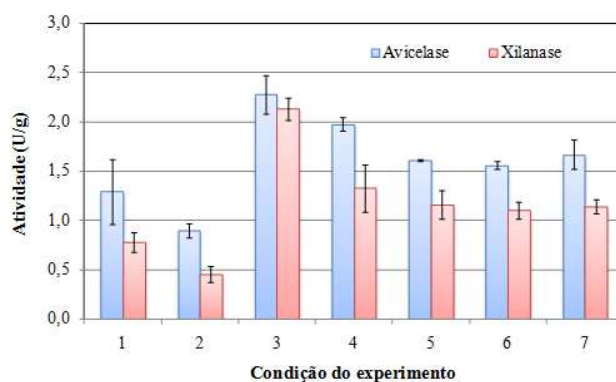


Figura 1 – Atividade enzimática das enzimas avicelase e xilanase.

Com o planejamento realizado, foi possível descrever um modelo matemático apropriado para a síntese enzimática, utilizando uma quantidade pequena de experimentos. A validação estatística das equações polinomiais, apresentadas nas Tabelas 2 e 3, foi realizada com análise de variância (ANOVA) (Deming e Morgan, 1987).

Tabela 2 – Análise de variância para atividade de avicelase (U/g) em 24h de fermentação.

	Soma dos quadrados	R ²	Efeito	F	p-valor	t(17)
(1) Umidade*	3,191915		1,031490	142,6898	0,000000	11,94529
(2) Proporção*	0,359784	0,90344	-0,346306	16,0836	0,000906	-4,01044
(1) x (2)	0,006519		0,046616	0,2914	0,596306	0,53984

* fatores estatisticamente significativos (95% confiança)

Tabela 3 – Análise de variância para atividade de xilanase (U/g) em 24h de fermentação.

	Soma dos quadrados	R ²	Efeito	F	p-valor	t(17)
(1) Umidade*	3,705277		1,111347	251,2183	0,000000	15,84987
(2) Proporção*	0,963629	0,95073	-0,566754	65,3342	0,000000	-8,08296
(1) x (2)*	0,169756		-0,237877	11,5095	0,003463	-3,39256

* fatores estatisticamente significativos (95% confiança)

O coeficiente de determinação obtido mostra que o modelo de regressão da atividade da enzima xilanase em relação à variação das respostas foi melhor que o da atividade da enzima avicelase, bem como o teste F, onde se sabe que valores maiores que 1 representam regressão estatisticamente significativa, causando uma relação entre as variáveis dependentes e independentes. Com relação à enzima avicelase, a interação das variáveis é tida como não estatisticamente significativa, mas útil para fins preditivos (Barros Neto *et al*, 1996).

A Figura 2 ilustra os gráficos de Pareto em função dos efeitos das variáveis umidade e proporção para as atividades enzimáticas de avicelase e xilanase, respectivamente, em 24h de fermentação.

Verifica-se que, para ambas atividades enzimáticas, a variável umidade é estatisticamente significativa para o nível de 95% de confiança e com efeito positivo no processo de síntese das enzimas, enquanto que a variável proporção é estatisticamente significativa, mas com efeito negativo, indicando que a menor proporção de casca de coco é melhor condição. Em relação à interação das variáveis, para a enzima avicelase não houve significância, ao passo que para a enzima xilanase a mesma influencia de uma forma negativa o processo.

A superfície de resposta foi analisada pela função resposta (Y), representada na Equação 1, utilizando um modelo linear com interação entre as variáveis.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (1)$$

onde Y é a variável de resposta, β_0 é uma constante, β_i , β_j e β_{ij} são os coeficientes lineares e de interação, respectivamente.

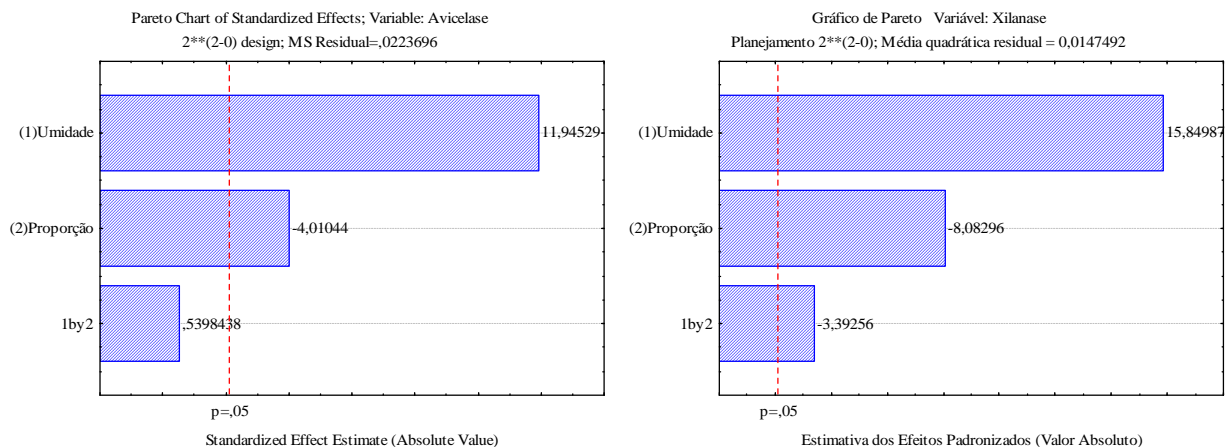


Figura 2 – Análise de Pareto para as enzimas avicelase e xilanase.

A Figura 3 ilustra as superfícies de resposta com base no modelo estatístico definido para a avaliação estatística. As respostas estudadas neste planejamento foram o teor de umidade (X_1) e a proporção dos resíduos casca de coco e sabugo de milho (X_2). Os modelos obtidos para as atividades de avicelase e xilanase são mostrados nas Equações 2 e 3, respectivamente.

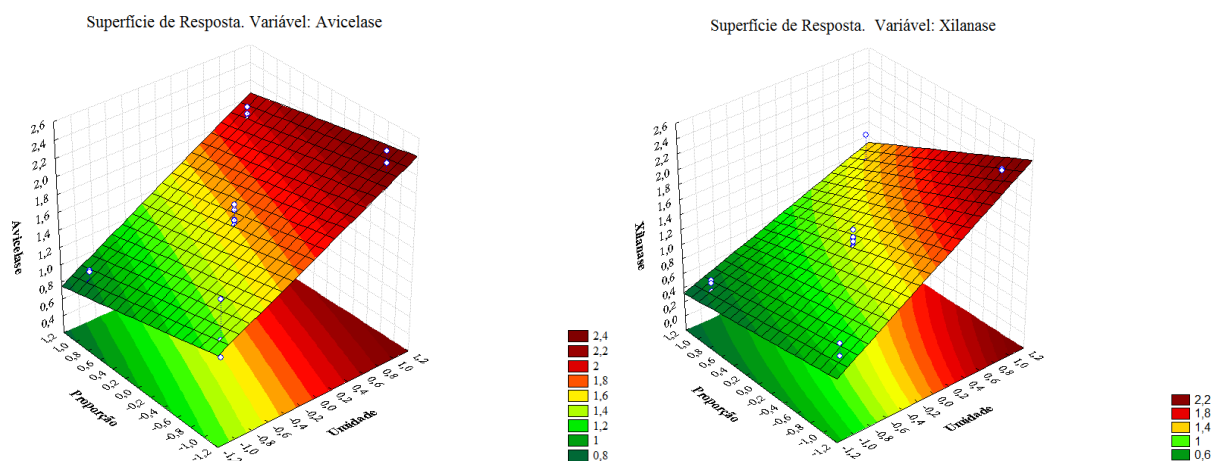


Figura 3 – Superfície de resposta para as enzimas avicelase e xilanase.

$$Y_{Avicelase} = 1,612 + 0,516X_1 - 0,173X_2 + 0,023X_1X_2 \quad (2)$$

$$Y_{Xilanase} = 1,159 + 0,556X_1 - 0,283X_2 - 0,119X_1X_2 \quad (3)$$

A superfície de resposta indica a variação da umidade e da proporção dos resíduos com base no modelo previsto. Pode-se observar que o teor de umidade para a avicelase, frente à xilanase, é mais significativo na síntese desta enzima, bem como a proporção dos resíduos, confirmando que, além da umidade, a proporção também influencia a atividade destas enzimas.

4. CONCLUSÕES

Os resíduos de coco verde e o sabugo de milho se mostraram como substratos adequados para o cultivo de *Aspergillus niger* na produção das enzimas avicelase e xilanase, com capacidade de uso em diferentes processos industriais. Com base no planejamento experimental, foi possível observar que o modelo de ajuste das enzimas produzidas foi eficaz na análise das variáveis manipuladas, refletindo em um modelo linear adequado para as atividades enzimáticas avaliadas.

4. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M. L.; ALMEIDA, R. M. R. G.; ABUD, A. K. S. Produção de Enzimas por Fermentação Semi-Sólida a partir de resíduos da casca de coco verde. In: *XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, 2012, Búzios. Anais... CD.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R. *Planejamento e otimização de experimentos*. Editora da UNICAMP, Campinas, 1996.
- DAMASO, M. C. T.; FARINAS, C. S.; SALUM, T. F. C. Produção e imobilização de enzimas aplicadas à produção de etanol e biodiesel. In: MACHADO, C. M. M., *Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos*. Editora Técnica, Embrapa Agroenergia, Brasília, p. 101-125, 2013.
- DEMING, S. N.; MORGAN, S. L. *Experimental design: a chemometric approach*. Elsevier. 1987.
- KIM, S. W.; KANG, S. W.; LEE, J. S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. *Bioresource Technology*, v. 59, p. 63-67, 1997.
- LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (a) the upgrading concept; (b) practical implementations. *Bioresource Technology*, Essex, v.87, p.167-198, 2003.
- LUCARINI, A.C.; MARIN, M.P.A.; ARAUJO, F.D.C.; MACIEL, M.; RUAS, C.V. Avaliação da produção de celulase por fermentação semi-sólida do fungo filamentoso *Aspergillus niger* em diferentes resíduos lignocelulósicos. In: *XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, 874, 2012, Búzios. Anais... CD.
- MACHADO, C. M. M., *Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos*. Editora Técnica, Embrapa Agroenergia, Brasília, 2013.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *Journal of Technology Management & Innovation*, v. 2, p. 118-127, 2007.

RAGHAVARAO, K.S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 127-135, 2003.

SILVA, L. A. D. *Produção e caracterização de enzimas celulásicas por Aspergillus phoenicis*. 105p. 2008. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. Aproveitamento de resíduos. In: *A Lavoura*, ano 115, n. 690, 2012.

ZIGLIO, B. R.; BEZERRA, J. R. M. V.; BRANCO, I. G.; BASTOS, R.; RIGO, M. Elaboração de Pães com Adição de Farinha de Sabugo de Milho. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v. 9 n. 1, 2007