

SACARIFICAÇÃO DE DIFERENTES RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PELO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO PRODUZIDO POR *Trichoderma reesei* NRRL 3652 EM CASCA DE SOJA

V. ASTOLFI¹, A. L. ASTOLFI¹, C. E. V. BUSTAMANTE¹, L. H. CULAU¹, J. A. do NASCIMENTO¹, E. RIGO², M. DI LUCCIO³, H. TREICHEL⁴

¹ Universidade Regional Integrada - Campus de Erechim

² Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Engenharia de Alimentos - Campus de Pinhalzinho

³ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

⁴ Universidade Federal Fronteira Sul - Campus de Erechim

E-mail para contato: 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, palha de arroz, palha de trigo, 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. Neste estudo, o objetivo foi investigar a sacarificação de casca de soja, bagaço de cana e casca de arroz, utilizando-se o extrato enzimático bruto obtido da fermentação em estado sólido de *T. reesei* NRRL 3652 em casca de soja, com finalidade da obtenção de açúcares fermentescíveis. Obteve-se maior rendimento de glicose com casca de arroz, no entanto é importante destacar que para que a sacarificação da biomassa lignocelulósica apresente elevados rendimentos, faz-se necessário a realização de processos de pré-tratamento, isto porque a lignina e hemicelulose presente na parede da célula vegetal formam uma barreira para ação enzimática.

1. INTRODUÇÃO

As celulasas e hemicelulasas são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais lignocelulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares fermentescíveis, despertando interesse industrial para produção em larga escala de bioetanol de segunda geração (JURUTU e WU, 2014).

Para bioconversão de biomassa lignocelulósica em açúcares, eficazes e econômicos pré-tratamentos devem ser desenvolvidos de tal forma que um alto rendimento de açúcares fermentáveis possa ser obtido na subsequente etapa de hidrólise enzimática; condições de pré-

tratamento também devem ser balanceados para evitar a formação de inibidores da hidrólise e processos de fermentação da biomassa (SANCHEZ e CARDONA, 2008). Além disso, o baixo custo, a estabilidade e a eficiência das enzimas também são de suma importância, isto porque o alto custo de enzimas restringe seu uso em aplicações de larga escala para a conversão de materiais lignocelulósicos.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a potencialidade de sacarificação de casca de soja, bagaço de cana e casca de arroz, utilizando-se o extrato enzimático bruto obtido da fermentação em estado sólido de *T. reesei* NRRL 3652 em casca de soja.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O extrato enzimático bruto obtido da condição experimental ótima da fermentação em estado sólido de *T. reesei* NRRL 3652 em casca de soja foi filtrado em bomba de vácuo com o auxílio de papel filtro e continha atividade de 6,35 U. g⁻¹; 4,30 U. g⁻¹; 1228,52 U. g⁻¹ para FPase, CMCase e xilanase, respectivamente. A sacarificação enzimática da casca de soja, bagaço de cana e casca de arroz (autoclavados por 15 minutos a 121 °C) sem nenhum tratamento foi realizada conforme Liu *et al.* (2011) com algumas modificações. Os ensaios foram realizados em frascos erlenmeyers no qual, 2 g do respectivo resíduo lignocelulósico foi adicionado em 100 mL da mistura reacional, contendo: 94 mL de tampão citrato de sódio 0,05M pH 5,3; 1 mL de tetraciclina (40µ. mL⁻¹), com o intuito de inibir a contaminação microbiana e 5 mL do extrato enzimático bruto. As reações foram realizadas em agitador orbital a 150 rpm e 50 °C por um período de 7 dias, do qual, amostras foram retiradas da mistura reacional em intervalos de 24 horas e a liberação de açúcares redutores (AR) e glicose na hidrólise foram estimados usando o método do DNS e GOD-POD, conforme item 2.1 e 2.2, respectivamente.

Ensaio sem substrato lignocelulósico e extrato enzimático bruto (enzima) foram realizados como controle. A % de sacarificação foi quantificada conforme a Equação 1:

$$\text{Sacarifiação (\%)} = \frac{A_L \times 0,9}{P} \times 100 \quad (1)$$

Sendo que:

A_L = açúcar liberado (g)

0,9 = fator de correção para compensar adição de uma molécula de água durante a hidrólise

P = polissacarídeos no substrato lignocelulósico (g).

2.1. Quantificação dos açúcares redutores (AR)

Para a quantificação dos AR, adicionou-se 0,5 mL das amostras a serem quantificadas em 0,5 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Os tubos foram mantidos em um banho a 95 °C por 5 minutos para desenvolvimento da coloração avermelhada. Após este tempo reacional, as amostras foram resfriadas imediatamente pela imersão dos tubos em um banho de gelo fundente, adicionando-se em seguida 8 mL da solução estabilizante de tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado. Os tubos foram agitados para homogeneizar a solução e as leituras da absorbância, efetuadas no espectrofotômetro a 540 nm. Para zerar o espectrofotômetro, preparou-se um tubo onde o volume da amostra foi substituído por água

destilada. Para determinar a concentração dos AR em cada uma das amostras analisadas utilizou-se a curva-padrão de glicose.

2.2. Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose foi determinada de acordo com o método enzimático Glicose Oxidase/Peroxidase (GOD-POD), proposto por Keston (1956). Trata-se de um kit enzimático contendo um reativo monoreagente pronto para uso, além de uma solução padrão de glicose com a concentração de 100 mg. dL⁻¹. O método baseia-se na oxidação enzimática da glicose através da enzima glicose oxidase (GOD) resultando em peróxido de hidrogênio, o qual é subsequentemente usado na geração da coloração rosada pela peroxidase (POD).

Para a quantificação da glicose, adicionou-se 30 µL de cada uma das amostras em estudo em 1,0 mL do monoreagente. Os tubos foram mantidos em um banho termostático a 37 °C por 10 minutos para que houvesse o desenvolvimento da coloração rosada e em seguida, efetuou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 505 nm.

Os tubos do branco da reação e do padrão de glicose foram feitos juntamente com os tubos das amostras. Para o branco adicionou-se 30 µL de água destilada em 1,0 mL do reagente enzimático e para o tubo padrão adicionou-se 30 µL da solução padrão de glicose (100 mg. dL⁻¹) em 1,0 mL do monoreagente enzimático. Outra observação relevante do fabricante é que, quando a leitura do branco apresenta absorbância acima de 0,300, o monoreagente deve ser descartado, já que isso indica uma deterioração do reativo de trabalho. A cor final da reação deverá ser estável por 60 minutos. Para determinar a concentração de glicose utilizou-se a solução padrão como calibrador e os cálculos foram realizados através da Equação 2.

$$\text{Glicose (mg.dL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100 \quad (2)$$

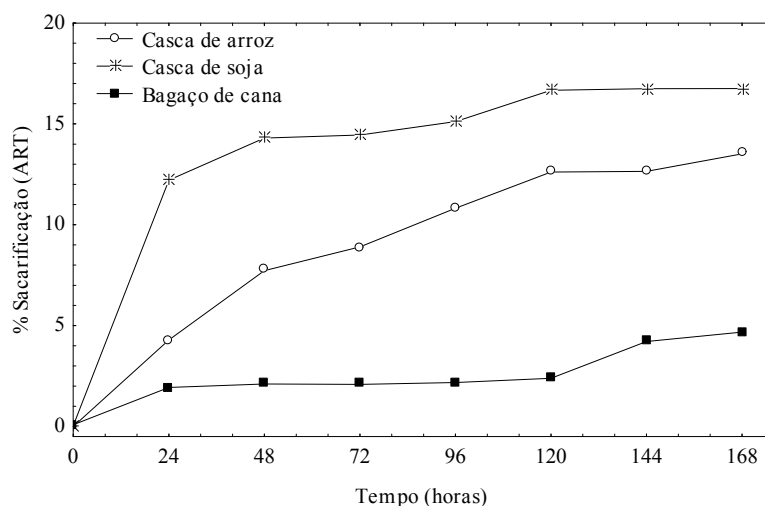
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sacarificação enzimática é dependente tanto, das características da biomassa quanto da eficácia das enzimas. Para tanto, a eficácia do extrato enzimático bruto produzido por *T. reesei* NRRL 3652 foi testada na sacarificação de casca de arroz, casca de soja e bagaço de cana sem tratamentos, com a finalidade da obtenção de açúcares redutores (AR) e glicose.

Sukumaran *et al.* (2009) demonstraram que a concentração de enzima pode ter um efeito menor sobre a hidrólise da celulose em comparação com o efeito do tempo de reação. Assim de acordo com Liu *et al.* (2011) um período de sete dias foi definido no ensaio de sacarificação de biomassa, a fim de se obter açúcares fermentescíveis. As Figuras 1 e 2 apresentam os rendimentos de AR e glicose, respectivamente, liberados experimentalmente por um período de 170 h de reação. Como pode ser visto na Figura 1, a liberação de AR aumentou rapidamente na fase inicial (0 e 24 h), principalmente, para casca de arroz e casca de soja, e a porcentagem mais elevada (16,8%) foi obtida depois de 120 horas de reação utilizando-se casca de soja. Assim sendo, a quantidade total de AR liberados a partir de 1 g de

casca de soja catalisado pelas enzimas presentes no extrato enzimático bruto foi de $0,16 \text{ g. g}^{-1}$ de substrato seco.

Figura1- Perfil da produção de açúcares redutores na sacarificação de resíduos agroindustriais usando extrato bruto enzimático produzido por *T. reesei* NRRL 3652 em casca de soja.



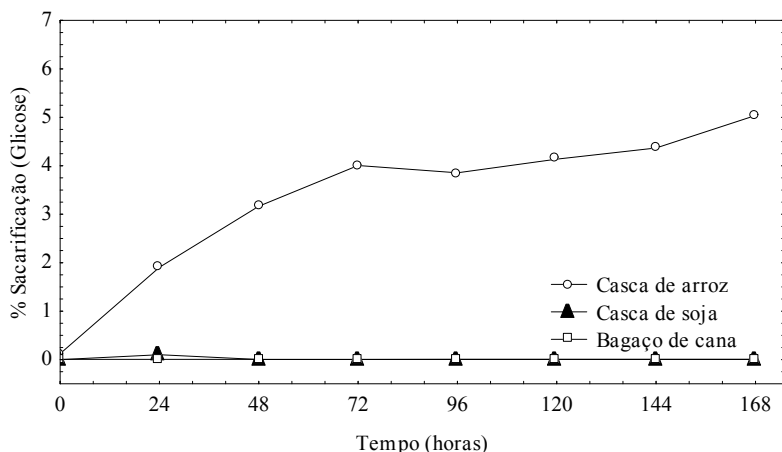
Raghuwanshi *et al.* (2014) utilizaram o extrato enzimático bruto produzido a partir da cepa selvagem *Trichoderma asperellum* RCK2011 e a cepa mutante, *Trichoderma asperellum* SR1-7 para sacarificação de sabugo de milho, bagaço de cana e palha de trigo pré-tratados e não tratados. Os rendimentos de AR foram de $0,53 \text{ g. g}^{-1}$, $0,33 \text{ g. g}^{-1}$ e $0,29 \text{ g. g}^{-1}$ de substrato seco, respectivamente, do qual, isto foi 1,6 vezes mais elevado do que a estirpe do tipo selvagem.

Deswal *et al.* (2011) utilizaram o extrato enzimático bruto de *Fomitopsis* sp. RCK2010 para sacarificação em palha de trigo e palha de arroz pré-tratada alcalinamente. Os rendimentos de AR para palha de trigo e palha de arroz foram de $0,214 \text{ g. g}^{-1}$ e $0,157 \text{ g. g}^{-1}$ de substrato seco, respectivamente, porém rendimentos abaixo de $0,10 \text{ g. g}^{-1}$ de substrato seco foram obtidos quando os substratos não foram tratados.

Liu *et al.* (2011) obtiveram rendimentos de AR de $0,45 \text{ g. g}^{-1}$ de substrato seco a partir da hidrólise de palha de milho utilizando o extrato enzimático bruto produzido por *A. fumigatus* Z5.

Como pode ser observado na Figura 2, a casca de arroz apresentou o melhor rendimento em glicose liberada principalmente, nas primeiras 72 horas (4%) depois disso, o aumento observado foi muito baixo (cerca de 1%). Por outro lado, não se obteve rendimento de glicose para casca de soja e bagaço de cana.

Figura 2 - Perfil da produção de glicose na sacarificação de resíduos agroindustriais usando extrato bruto enzimático produzido por *T. reesei* NRRL 3652 em casca de soja.



Considerando que a casca de arroz não passou por nenhum tipo de pré-tratamento, esse maior rendimento de glicose pode ser atribuído possivelmente ao pó de arroz que está junto com a casca de arroz e que por sua vez pode conter açúcares que podem ter sido hidrolisados pelas enzimas presentes no extrato enzimático. Segundo Falkoski *et al.* (2013) a biomassa lignocelulósica não pode ser sacarificada por enzimas com rendimentos elevados sem um processo de pré-tratamento, isso porque, a lignina e a hemicelulose presentes na parede da célula vegetal formam um obstáculo para a ação de enzimas.

A remoção eficiente da lignina é um dos requisitos mais importantes para uma eficaz sacarificação enzimática. A lignina limita a taxa de hidrólise, atuando como um escudo, evitando que as partes hidrolisáveis do substrato sejam hidrolisadas. Além disso, a lignina condensada pode absorver proteínas a partir de soluções aquosas e a remoção de lignina deve melhorar o desempenho da hidrólise pela redução de adsorção não específica das celulasas (YANG e WYMAN, 2004).

Yoo *et al.* (2011) utilizaram a combinação de três celulasas comerciais (Celluclast 1,5L, Novozyme 188 e Viscozyme®L) para a sacarificação enzimática de casca de soja submetida a diferentes pré-tratamentos, e obtiveram um rendimento de glicose de 0,16 g. g⁻¹ em casca de soja sem tratamento.

Ortega *et al.* (2001) estudaram a cinética da sacarificação de celulasas de *Trichoderma reesei*, tal como a concentração de substrato, diversas enzimas, temperatura e pH, e obtendo assim as melhores condições experimentais para degradar celulose padrão (CMC, celulose microgranular e Sigmacell 100).

4. CONCLUSÃO

O maior rendimento de açúcares redutores catalisado pelas enzimas presentes no extrato enzimático bruto foi obtido em casca de soja. No entanto, este valor poderá ser melhorado com o estudo de diferentes tipos de pré-tratamentos em diferentes resíduos lignocelulósicos. O processo de produção de etanol de segunda geração a partir de diferentes tipos de resíduos

agrícolas é uma estratégia que diminuiria os impactos ambientais. Assim, novos avanços para este processo devem ser alcançados para torná-lo mais eficaz e uma realidade sustentável.

5. AGRADECIMENTOS

À URI – Campus de Erechim pela infraestrutura e a CAPES pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C., Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresour. Technol.*, v. 102, p. 6065-6072, 2011.
- FALKOSKI, D. F.; GUIMARÃES, V. M.; ALMEIDA, M. N.; ALFENAS, A. C.; COLODETTE, J. L.; REZENDE, S. T., *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. *Bioresour. Technol.*, v. 130, p. 296-305, 2013.
- JUTURU, V.; WU, J. C., Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, v. 33, p. 188-203, 2014.
- KESTON, A. Paper 31C, 129th Meeting of the American Chemical Society, April, 1956.
- LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; WU, H.; XU, D.; TANG, Z.; SHEN, Q., Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, v. 65, p. 717-725, 2011.
- MILLER, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v.31, p. 426 - 428, 1959.
- ORTEGA, N.; BUSTO, M. D.; PEREZ-MATEOS, M., Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, v. 47, p. 7-14, 2001.
- RAGHUWANSHI, S.; DESWAL, D.; KARP, M.; KUHAD, R. C., Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. *Fuel*, v. 124, p. 183-189, 2014.
- SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A., Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.*, v. 99, p. 5270-5295, 2008.
- SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY A., Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bioethanol production. *Renew. Energ.*, v. 34, p.421-428. 2009.
- YANG, B.; WYMAN, C. E., Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, v. 86, 88-95, 2004.
- YOO, J.; SAJID ALAVI, S.; PRAVEEN VADLANI, P.; AMANOR-BOAD, V., Thermo-mechanical extrusion pretreatment for conversion of soybean hulls to fermentable sugars, *Bioresour. Technol.*, v. 102, p. 7583- 7590, 2011.