

# **OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE ENDOGLUCANASE**

L. A. G. ONOFRE<sup>1</sup>, G. T. LUCAS<sup>1</sup>, J. C. THOME<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos

E-mail para contato: Leonardo\_aredio@hotmail.com

**Resumo** – O presente trabalho buscou otimizar a produção de enzimas celulolíticas, especificamente as endoglucanases a partir de fermentação em estado sólido variando a proporção de substrato empregado (bagaço de cana e farelo de trigo), variando também o pH da solução nutriente utilizada com o objetivo de encontrar a melhor condição de cultivo. Observou-se que nos ensaios onde o pH da solução nutriente estava em valores mais ácidos e nas formulações de proporção entre os substratos o farelo de trigo apresentava o menor índice os resultados de atividade enzimáticas foram maiores, chegando a valores de 145/Ugss em 96 horas de fermentação.

## **1. INTRODUÇÃO**

Devido a geração de subprodutos ser inerente ao setor agroindustrial e o crescente interesse de consciência ecológica, fica nítido a necessidade de se descobrir um equilíbrio entre a produção, a expansão econômica e social e a sustentabilidade ambiental. No Brasil a indústria que mais produz tais subprodutos é a indústria de alimentos, e um desafio está em como destiná-los corretamente, uma alternativa é a utilização de tais subprodutos ou resíduos em Bioprocessos, tendo em vista sua viabilidade por conta de seu baixo valor agregado e seu grande potencial de produção. Mediante isso muitas pesquisas estão se desenvolvendo com o propósito de gerar produtos de alto valor agregado atrelado a utilização de técnicas de Bioprocessos, onde são utilizados como substrato (Couto; Sanroman, 2006; Soccol; Vandenberghe, 2003; Pelizer et al., 2007). Devido à grande demanda mundial de combustível fóssil e conseqüentemente a escassez do mesmo a busca de alternativas para suprir essa demanda originou-se o etanol como fonte de energia. Porém sabe-se que a produção do mesmo a demanda de cana de açúcar é alta e com isso resultando em uma enorme quantidade de resíduos agroindustrial. Seu destino atualmente é dividido entre queima, para a geração de energia elétrica destinada para consumo da própria indústria de das cidades vizinhas, e a utilização como ração em animais ruminantes, porém a produção de bagaço resultante é superior ao seu destino conseqüentemente havendo ainda seu acúmulo. Como alternativa para o destino deste resíduo, há a sua utilização como substrato na fabricação de etanol de segunda geração (Etanol 2G). No entanto para que ocorra a fermentação é necessário a hidrólise das fibras do bagaço e com isso ocorra a liberação dos açúcares fermentescíveis que pode ser feita de duas formas, por meio químico, que tem alta eficiência, porém resulta em uma grande quantidade de resíduos tóxicos que requerem maiores esforços na hora do descarte, ou a

hidrólise enzimática, que é proveniente de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas obtidas a partir de fungos filamentosos (Kamm & Kamm, 2004).

O processo de produção de enzimas por fungos filamentosos tem sua eficácia devido a suas necessidades para o cultivo serem compatíveis com as condições oferecidas pelas técnicas de fermentação em estado sólido (FES), já que a mesma consiste em crescimento de micro-organismos sobre partículas porosas e úmidas, uma vez que o líquido contido na matriz sólida assegure o crescimento e metabolismo celular (Couto; Sanroman, 2006; Soccol; Vandenberg, 2003; Palma, *et al*, 2000).

Neste contexto o presente trabalho tem como objetivo otimizar as condições de fermentação em estado sólido utilizando o fungo filamentoso *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em diferentes proporções de substrato (bagaço de cana e farelo de trigo) e com diferentes valores de pH da solução nutriente adicionada, com o objetivo de obter-se maiores atividades enzimáticas de endoglucanases (CMCase).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento experimental foi utilizado o Laboratório de Engenharia de Processos e Biorreatores do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – IBILCE / UNESP.

### 2.2. Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, pertencente à coleção do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica Aplicada do IBILCE-Unesp. Para a realização dos ensaios foram feitos inóculos da cultura em suspensão de esporos obtida após a replicação da cepa em erlenmeyers com meio de cultura de Agar Sabouraud Dextrose (ASD), adicionado solução nutriente conforme Zanelato (2011) até obter-se uma concentração de  $10^7$  esporos/gss.

### 2.3. Substratos e Atividade enzimática

Os substratos empregados foram o bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farelo de trigo (FT). O bagaço foi doado pela Usina Virgolino de Oliveira da cidade de José Bonifácio-SP, seco em estufa de circulação forçada a 60°C até atingir peso constante, para a padronização do tamanho das fibras o bagaço foi peneirado em peneiras de 4 e 3 mm. O farelo de trigo obtido no comércio local, seco na estufa de circulação forçada a 40°C até peso constante.

Para realização dos ensaios de fermentação em estado sólido os substratos foram acondicionados em embalagem plástica de polipropileno com dimensões de 15 cm x 20 cm, em diferentes proporções BC e FT como mostra a Tabela 1, totalizando 5 g, na abertura das embalagens foi acoplado fragmentos de cano de PVC com 4 cm de diâmetro e 5 cm de comprimento sendo tampados com tampões de algodão e gaze e esterilizado em autoclave a 121°C, 1,1 ATM por 20 min.

Tabela 1 – Planejamento Experimental (DCCR) variando a proporção de bagaço de cana (BC) e farelo de trigo (FT) e o pH da solução nutriente

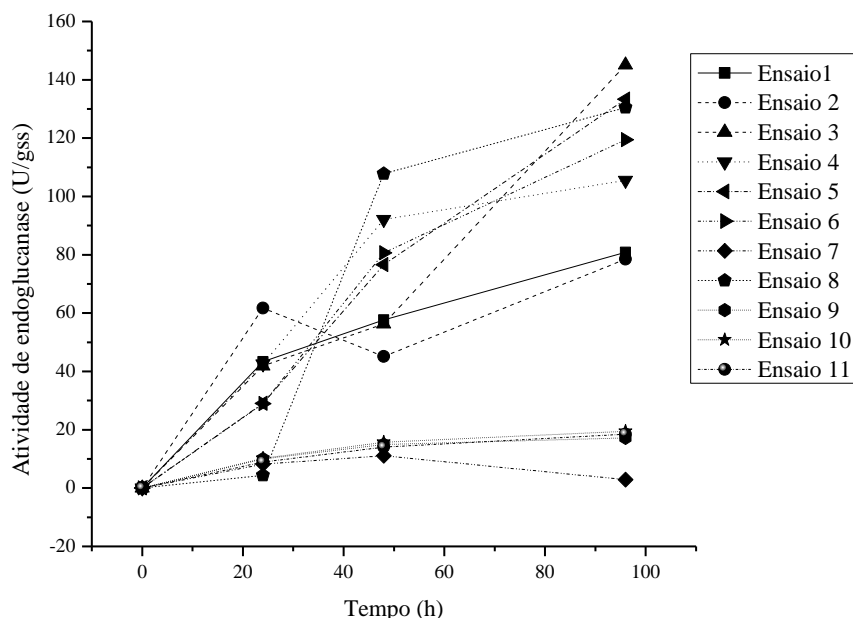
| Ensaio | Ph  | Formulação<br>(BC:FT) |
|--------|-----|-----------------------|
| 1      | 4   | 06:04                 |
| 2      | 6   | 6:4                   |
| 3      | 4   | 8:2                   |
| 4      | 6   | 8:2                   |
| 5      | 6,4 | 7:3                   |
| 6      | 3,6 | 7:3                   |
| 7      | 5   | 5,6:4,4               |
| 8      | 5   | 8,4:1,6               |
| 9      | 5   | 7:3                   |
| 10     | 5   | 7:3                   |
| 11     | 5   | 7:3                   |

Após a esterilização, a unidade de cada amostra foi ajustada para 70% (b.u) com a adição de solução nutriente, respeitando em cada ensaio o pH pré-determinando no planejamento experimental, somado ao inóculo e acondicionada em BOD a 45°C por 96 horas. Foram feitas retiradas de amostras nos tempos de 0 horas, 24 horas, 48 horas e 96 horas, realizado a extração do extrato enzimático para que posteriormente fosse realizado a análise de atividade enzimática. Para a realização da extração foi adicionado 20 mL de água destilada para cada grama de substrato sólido seco, agitado por 30 minutos, filtrado e centrifugado a 10.000 rpm por 15 min. As atividades enzimáticas foram realizadas a partir do sobrenadante conforme a metodologia de Ghose (1987), que resultou em liberação de açúcares redutores que foram quantificados segundo Miller (1959), a quantificação da atividade enzimática foi expressa em unidade por grama de substrato seco (U/gss) onde uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0  $\mu$ mol de glicose por minuto de reação por mL de enzima.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante todo o período de fermentação, que totalizou 96 horas, foram coletadas amostras de extrato enzimático e avaliado a atividade enzimática de endoglucanase. A Figura 1 mostra que no ensaio 3 onde em sua formulação foi constituía em 20% de FT um pH em faixa mais ácida, obteve os maiores resultados de atividade enzimática quando comparados com os demais ensaios.

Figura 1 – Atividade enzimática de endoglucanase (U/gss) ao longo de 96 horas de fermentação nos 11 ensaios.



Após ser realizado tratamento dos dados através do método estatístico ANOVA, pode-se observar que houve diferença significantes no fator pH, com valores de  $p=0,0308$  para nível de significância de 5%.

#### 4. CONCLUSÃO

De ante os resultados obtidos pode-se concluir que em ensaios onde o pH estava ajustado em valores mais ácidos a atividade enzimática obtida foi maior, atribui-se estes resultados devido a desenvolvimento do microrganismo empregado ser melhor em faixa de pH ácidos do que em básicos.

Outro ponto observado foi de que nos ensaios onde a proporção de farelo de trigo foi maior os resultados obtidos não foram satisfatórios, acredita-se que isso ocorra devido a formulação não fornecer condições propicias que estimulassem o fungo a secretar enzimas.

#### 5. REFERÊNCIAS

- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A Review. *Journal of Food Engineering*, Califórnia, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure & App. Chem.*, v. 59, p. 257—268, 1987.

- KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.64, n.2, p.137-145, 2004. ISSN 0175-7598.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p.426 – 428, 1959.
- PALMA, M.B., PINTO, A.L., GOMBERT, A.K., SEITZ, K.H., KIVATINITZ, S.C., CASTILHO, L.R., FREIRE, D.M.G. 2000. Lipase production by *Penicillium strictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Appl Biochem Biotech*, 84, 1137- 1145.
- PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *Journal of Technology Management & Innovation*, Santiago, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.
- SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 13, n. 2/3, p. 205-218, 2003.
- ZANELATO, A. I. Produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido em bioreator de leito fixo. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2011.