

USO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

Brígida Maria Villar da GAMA⁽¹⁾; Karla de Moraes Sampaio MELO⁽²⁾; Ana Karla de Souza ABUD⁽³⁾

(1) Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, BR 104 – Norte – km 97 – 57072-970 Maceió – AL, e-mail: brigida.villar@hotmail.com

(2) Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, BR 104 – Norte – km 97 – 57072-970 Maceió – AL, e-mail: karla_msampaio@hotmail.com

(3) Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, BR 104 – Norte – km 97 – 57072-970 Maceió – AL, e-mail: ana.abud@gmail.com

RESUMO

Buscando o aproveitamento de resíduos agroindustriais na geração de produtos de interesse comercial ao explorar o meio ambiente de forma responsável, sem agredi-lo, promovendo o desenvolvimento econômico e a conservação ambiental, o presente trabalho avalia o emprego de casca de coco verde e de bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de enzimas hidrolíticas por *Aspergillus niger* através do processo de fermentação semi-sólida. Os resíduos foram sanitizados em água clorada, desidratados a 45°C até peso constante, moídos e armazenados a temperatura ambiente em recipientes plásticos. Para a fermentação, o resíduo foi suplementado com meio mineral, de forma a se ter um conteúdo de umidade em torno de 60%, e as cinéticas enzimáticas foram realizadas ao longo de 216 h. Comparada aos substratos isolados, as fermentações com mistura de bagaço e casca de coco mostraram os melhores resultados na produção de xilanase (3,7 U/g) e carboximetilcelulase (0,5 U/g). A casca de coco se mostrou bom produtor das enzimas avicelase (0,9 U/g) e poligalacturonase (2,1 U/g) e baixo consumo de substrato parece indicar a necessidade de um etapa anterior de pré-tratamento para remoção de lignina.

Palavras-chave: enzima, resíduo, fermentação semi-sólida, aproveitamento.

1 INTRODUÇÃO

Com a crescente necessidade de se obter regiões e populações cada vez mais desenvolvidas por conta da exigência da competitividade de mercado global, a indústria passou a utilizar toda e qualquer matéria-prima para o beneficiamento de bens de consumo que traga a curto prazo produtos que venham acoplados com sinônimo de desenvolvimento. Como consequência, essa produção acelerada traz consigo a geração de resíduos agroindustriais, cujo acúmulo gera a deterioração do meio ambiente e perda de recursos, com contribuição significativa para o problema da reciclagem e conservação da biomassa (PELIZER *et al.*, 2007). Na região Nordeste, alguns resíduos agroindustriais merecem destaque, como a casca de coco verde, resíduos de frutas e o bagaço e a palha de cana-de-açúcar.

O crescente consumo da água-de-coco verde (in natura ou industrializada) vem aumentando a geração de resíduo (casca de coco verde), o que representa um sério problema de descarte do mesmo, principalmente nos grandes centros urbanos, onde é enviado para lixões e aterros sanitários. As cascas do coco verde correspondem a cerca de 85% do peso bruto do fruto, levando aproximadamente 8 anos para se degradar. E, ao contrário das cascas de coco seco, que são utilizadas tradicionalmente para a produção de pó e fibra, o resíduo do coco verde é descartado (ROSA *et al.*, 2001).

O bagaço de cana-de-açúcar é o maior resíduo da agroindústria brasileira. Ainda que as usinas utilizem de 60 a 90% deste bagaço como fonte energética, substituindo o óleo combustível no processo de aquecimento das caldeiras e para a geração de energia elétrica, o mesmo ainda é um resíduo, especialmente no período de safras, onde a grande quantidade de cana colhida gera grandes volumes de bagaço.

Ao contrário do que acontecia no passado, quando resíduos eram dispostos em aterros sanitários ou empregados sem tratamento para ração animal ou adubo, atualmente, conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agroindustriais (LAUFENBERG *et al.*, 2003). Farelos, cascas, bagaços e outros são materiais considerados viáveis para a biotransformação, pois têm como seus principais componentes celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas, o que os caracteriza como materiais extremamente heterogêneos, e que servem tanto como fonte de carbono e energia quanto de suporte para o crescimento microbiano (PANDEY, 2003).

Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação semi-sólida (FSS) desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos agroindustriais, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industrial, além de elevado valor agregado, como enzimas e diferentes metabólitos (RAIMBAULT, 1998; PANDEY, 2003).

Desta forma, a utilização dos resíduos agroindustriais para produção enzimática, é uma alternativa para as indústrias de biotecnologia obter enzimas hidrolíticas e oxidativas com um custo mais barato em relação às enzimas que estão no mercado, uma vez que, em 2008, as celulasas, enzimas especialmente focadas para a aplicação na obtenção de etanol combustível (CASTRO & PEREIRA JR., 2010), movimentaram um montante de USD 1,35 milhão. Além destas vantagens mencionadas, a produção destas enzimas utilizando resíduo dispõe-se, também, como uma maneira viável de agregar valor aos mesmos, diminuindo o impacto ao meio ambiente (VALASKOVÁ & BALDRIAN, 2006).

O presente trabalho valida o uso do pó da casca de coco verde e de bagaço de cana-de-açúcar como substratos potenciais na produção das enzimas avicelase, xilanase, poligalacturonase e carboximetilcelulase por fermentação semi-sólida para uma possível rota na busca pela sustentabilidade energética, motivando o desenvolvimento de alternativas tecnológicas de aproveitamento integral da energia da biomassa.

2 METODOLOGIA

A casca e o mesocarpo fibroso foram utilizados para a obtenção do pó da casca de coco verde. Após a seleção dos cocos, as etapas do processo foram a dilaceração do material com facão, lavagem, secagem, moagem, classificação e armazenamento. O bagaço de cana de açúcar foi sanitizado antes da secagem. A desidratação de ambos os resíduos, casca de coco e bagaço de cana, foi realizada em bandejas em secador tipo cabine com circulação de ar forçada a 45°C, até se obter o peso constante, e moído em triturador, sendo em seguida classificados em peneira de 1 mm e posteriormente armazenados em recipientes plásticos herméticos.

O micro-organismo utilizado nos experimentos de fermentação foi uma linhagem de *Aspergillus niger* isolada do solo, gentilmente cedida pelo Departamento de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e mantida em meio agar batata dextrose em geladeira (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; FeSO₄.7H₂O, 0,005 g/L; KH₂PO₄, 3 g/L; ZnSO₄, 0,005 g/L e CaCl₂, 0,5 g/L] adicionado a cada frasco foi previamente definido, de forma a se ter um conteúdo final de umidade em torno de 70%. Os frascos foram inoculados com uma suspensão de 2,9.10⁷ esporos por grama de resíduo, preparada em Tween-80 0,1% v/v.

Ao longo do tempo, retiraram-se amostras para avaliar a cinética fermentativa a partir do extrato, de onde eram medidos o teor de açúcares, o pH e as atividades enzimáticas. Para extração, adicionou-se 25 mL de tampão acetato de sódio 0,05M e pH 5,0 e agitou por 30 min. A amostra foi filtrada em algodão, centrifugada a 3000 rpm por 10 min, filtrada em papel de filtro qualitativo e armazenada em geladeira até o instante da análise. As atividades enzimáticas, expressa em unidades de atividade por grama de resíduo seco (U/g), foram realizadas conforme metodologia descrita por MARTIN *et al.* (2004), que consiste na adição de 1mL do extrato enzimático bruto a 1mL de solução do substrato, em tampão acetato 0,05M e pH 5,0 e incubado à temperatura de ação da enzima por 30 minutos. Periodicamente, o sistema sustrato-enzima foi agitado, com a finalidade de manter o substrato em suspensão. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido-3,5- dinitrosalicílico (DNS), de acordo com MILLER (1959).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O coco verde foi obtido em quiosque dentro da própria Universidade, enquanto o bagaço da cana de açúcar foi gentilmente cedido pela Usina Cachoeira. Após chegarem ao laboratório, os resíduos passaram por processos de lavagem e sanitização para, então, ser realizada a secagem até peso constante, sendo, então, moídos e acondicionados em recipiente plástico hermético e mantido à temperatura ambiente.

Os dados cinéticos dos substratos isolados e da mistura dos mesmos são apresentados na Tabela 1 e nas Figuras 1 e 2.

Tabela 1 – Dados cinéticos da fermentação frente a diferentes substratos.

Resíduo	Tempo	pH	ART (g/L)	Atividade enzimática (U/g)			
				Avicelase	Xilanase	Poligalacturonase	Carboximetilcelulase
Casca de coco	0	5,58	32,99	2,43	1,87	0,46	0,60
	24	5,21	31,32	0,98	1,56	2,13	0,00
	72	5,41	32,94	0,44	1,36	1,02	0,28
	96	5,53	30,56	0,46	1,07	1,43	0,26
	192	5,53	30,76	0,29	1,11	0,17	0,07
	216	5,47	28,10	0,39	0,97	1,03	0,09
Bagaço da Cana	0	5,79	70,38	0,00	4,52	0,36	0,15
	24	5,65	68,45	0,00	2,98	0,97	0,00
	72	5,57	70,97	0,00	2,25	3,23	0,05
	96	5,6	64,12	0,72	5,18	0,48	0,32
	192	5,62	65,11	3,00	5,03	0,84	0,02
	216	5,55	67,40	0,58	1,52	1,28	0,02
Casca de coco (0,3 g) + Bagaço de cana (0,7 g)	0	5,66	84,17	0,00	2,42	0,00	0,22
	24	5,38	84,07	0,19	1,85	0,03	0,13
	72	4,54	85,91	0,00	2,93	0,27	0,22
	96	4,84	81,13	0,09	1,94	0,55	0,53
	192	5,00	84,78	0,12	2,15	0,18	0,10
	216	5,15	77,62	0,19	2,03	0,62	0,09
Casca de coco (0,7 g) + Bagaço de cana (0,3 g)	0	5,61	53,99	4,66	2,66	0,86	0,12
	24	5,4	47,07	0,93	1,10	0,19	0,54
	72	5,46	46,46	0,03	2,17	0,56	0,09
	96	5,56	49,56	0,97	3,76	1,58	0,25
	192	5,56	44,62	0,00	3,69	0,23	0,01
	216	5,51	43,88	0,09	3,24	1,64	0,04

Observou-se um baixo consumo do substrato pelos resíduos, em especial o bagaço de cana (7,5%) e a mistura com maior teor de bagaço (7,8%). A mistura dos resíduos com maior quantidade de casca de coco levou a um consumo em torno de 20% dos açúcares, enquanto que apenas na casca de coco o seu consumo foi de 15%. Isto indica, especialmente para o bagaço, a necessidade de um pré-tratamento para a remoção, pelo menos parcial, da lignina presente na fibra vegetal, possibilitando maior consumo do substrato e indução às sínteses enzimáticas, como verificado por AGUIAR & MENEZES (2000) .

No acompanhamento cinético também foi verificado que a mistura casca de coco (0,3g) + bagaço de cana (0,7g), após 24 horas de cultivo, teve uma queda do pH, voltando a crescer após 72 horas, diferenciando das demais condições estudadas, que apresentaram um perfil de pH com pouca variação.

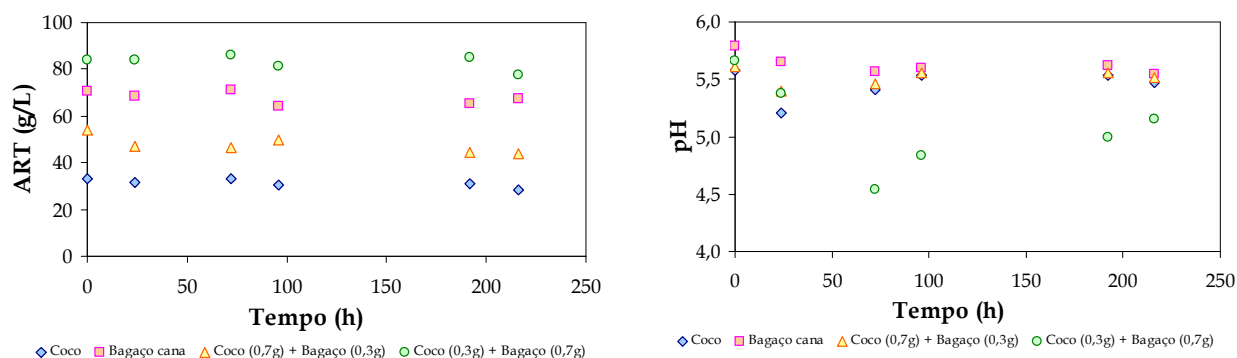


Figura 1 – Cinética da fermentação semi-sólida dos diferentes resíduos.

Quanto às produções enzimáticas, pode-se notar que a enzima avicelase tem como maior indutor a casca de coco verde, gerando em torno de 1,0 U/g de enzima quando este substrato está em maior quantidade. A baixa atividade de avicelase também foi observada por MENEZES & HENNIES (1991), que obtiveram valores próximos a 0,25 U/mL de celulase quando utilizaram bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com solução de hidróxido de sódio 4% como total de fonte de carbono, na presença do fungo *Aspergillus niger*.

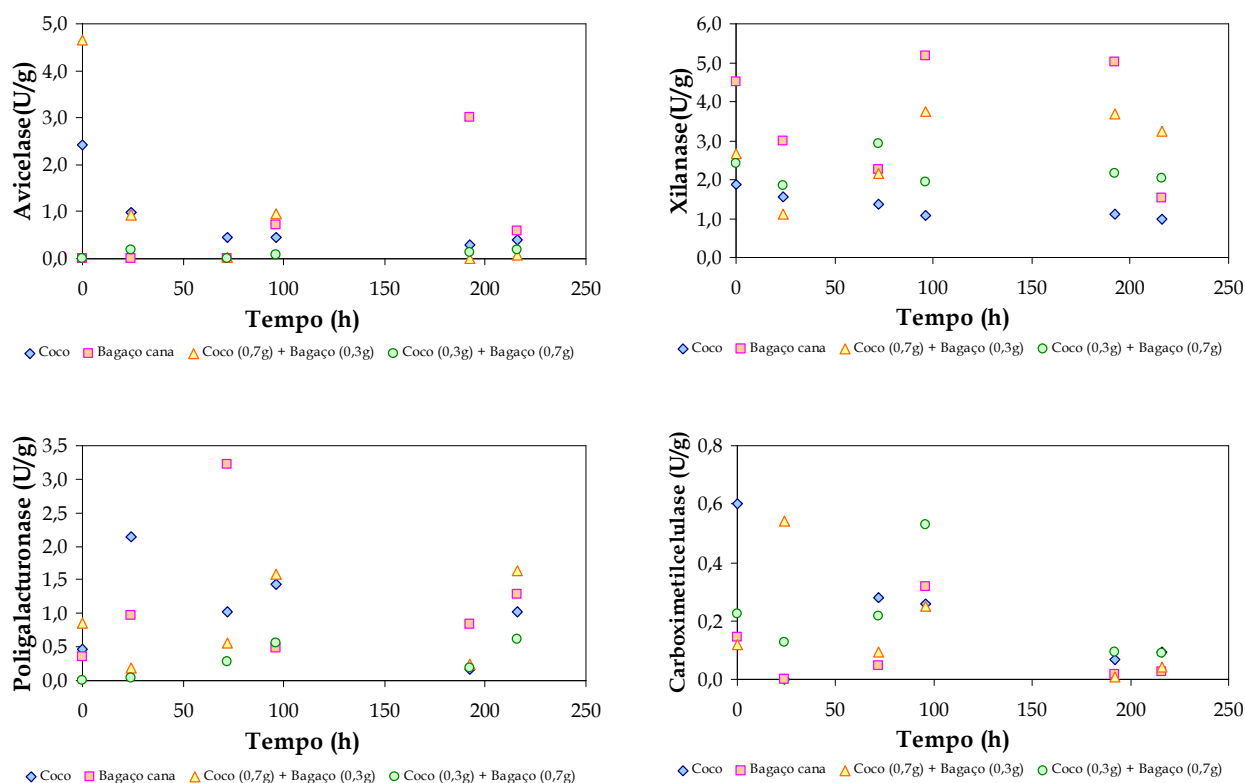


Figura 2- Atividades enzimáticas dos diferentes resíduos.

As maiores produções de xilanase foram com o bagaço de cana (5,2 U/g) e a mistura de 0,7 g de casca de coco e 0,3 g de bagaço (3,8 U/g).

Por não conterem pectina, indutor da atividade de poligalacturonase, os resíduos estudados apresentaram baixa atividade desta enzima, sobressaindo-se os substratos isolados.

Para a enzima carboximetilcelulase, as misturas de casca de coco e bagaço renderam as melhores atividades (0,5 U/g). O bagaço mostrou um perfil crescente nas primeiras 98h e, depois, não apresentou atividade enzimática.

Outro fato observado foi que, na maioria dos casos, a maior atividade enzimática esteve na menor condição de pH. Por sua vez, os dados da literatura mostram que após o processo de deslignificação a partir de um tratamento alcalino o substrato tende a apresentar um maior teor de celulose, uma vez que a lignina confere uma limitação para a assimilação da fonte de carbono pelo microorganismo agente da fermentação. SILVA (2008), que testou seis fungos na presença de casca da acácia tratada e não tratada, observou que, quando não ocorreu o tratamento alcalino da casca, a atividade celulolítica foi baixa.

4 CONCLUSÕES

Os resultados mostraram a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas pelos resíduos de casca de coco verde e bagaço de cana-de-açúcar a partir do fungo *Aspergillus niger* e, da mesma forma que observado em literatura, a etapa de pré-tratamento para liberar a celulose presente no meio pode ser uma alternativa para permitir maior indução e aumento da produtividade enzimática.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Usina Cachoeira pelo fornecimento do bagaço, ao BIOSE da Escola de Química da UFRJ pelo micro-organismo utilizado e ao programa PIBIC-UFAL pelo desenvolvimento da pesquisa.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR C. L.; MENEZES, T. J. B., **Produção de celulasas e xilanase por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar**, Boletim do CEPPA, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. **Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais**, Química Nova, v. 33, n. 1, p. S1-S5, 2010.

LAUFENBERG G.; KUNZ B.; NYSTROEM, M. **Transformation of vegetable waste into value added products: (a) the upgrading concept; (b) practical implementations**. Bioresource Technology, v. 87, p.167-198, 2003.

MARTIN, N.; SOUZA, S. R.; SILVA, R.; GOMES, E. **Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agroindustrial bioproduct**, Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 47, n. 5, p. 813-819, 2004.

MENEZES, T. J. B.; HENNIES, P. T. **Influência do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com peróxido alcalino e hidróxido de sódio no sistema celulolítico de *Aspergillus Níger***, Coletânea do ITAL, v. 21, n. 2, p. 213-219, 1991.

MILLER, G. L. **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of Reducing Sugar**, Analytical Chemistry, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

PANDEY, A. **Solid-state fermentation**. Biochemical Engineering Journal, v. 3636, p. 1-4, 2003.

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, n. 1, p. 118-127, 2007.

RAIMBAULT, M. **General and microbiological aspects of solid substrate fermentation.** Eletronic Journal of Biotechnology, v.1, n.3, 1998.

ROSA, M.F; SANTOS, F.J.S.; MONTENEGRO, A.A.T.; ABREU, F.A.P.; CORREIA, D; ARAUJO, F.B.S.; NORÕES, E.R.V. Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 6 p. (Comunicado Técnico, 54).

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

VALASKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. **Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Pictoporus betulinus*.** Research in Microbiology, v. 157, n. 2, p. 119-124, 2006.