

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Produção de Enzimas Celulolíticas e Hemicelulolíticas em um Leito Fixo de Fermentação em Cultivo Sólido

CAROLINE LOPES PEREZ¹, PRISCILA APARECIDA CASCIATORI², FERNANDA PERPÉTTUA CASCIATORI³ e JOÃO CLÁUDIO THOMÉO¹

¹Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos

²Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Química e Ciências Ambientais

São José do Rio Preto - SP

³Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências da Natureza
Caixa Postal 676 Buri - SP

RESUMO

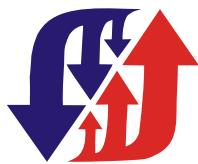
Enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas são essenciais para viabilizar a produção de etanol de segunda geração pela rota enzimática, sendo o maior limitante desse processo o custo das enzimas. Neste contexto, a fermentação em estado sólido é uma alternativa atraente por possibilitar o uso de resíduos sólidos agro-industriais de baixo custo para tal finalidade. O objetivo deste trabalho foi analisar uma fermentação em estado sólido em biorreator de bancada de 0,6m de comprimento, utilizando o fungo termofílico Myceliophthora thermophila I-1D3b cultivado em bagaço de cana e farelo de trigo (7:3 m/m), na umidade de 75% e temperatura de 45°C. Foram avaliados o crescimento do fungo e a produção de enzimas em função da posição longitudinal do leito, além das temperaturas durante a fermentação e vazão de CO₂ na corrente de saída de ar. Os módulos inferiores apresentaram rendimento em atividades enzimáticas mais elevado, bem como crescimento fúngico.

Palavras-chave: fermentação em estado sólido, biorreatores, enzimas.

INTRODUÇÃO

Fermentação em estado Sólido (FES) é uma alternativa sustentável para processos nos quais resíduos agroindustriais podem ser utilizados como meio de cultura ou substrato para a produção de bioprodutos, como diversos tipos de enzimas, que são bastante utilizadas em indústrias químicas. A FES é um processo biotecnológico no qual ocorre o crescimento de microrganismos sobre partículas sólidas úmidas, em situações nas quais o espaço entre as partículas contém uma fase gasosa contínua e água está impregnada nas partículas ou forma um fino filme sobre elas (MITCHELL *et al.*, 2006).

Dentre os resíduos agroindustriais gerados em grande quantidade no Brasil, destaca-se o bagaço de cana de açúcar, que pode ser utilizado no processo de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração. A hidrólise consiste na conversão dos carboidratos das cadeias de celulose e hemicelulose da biomassa vegetal a açúcares fermentescíveis, sendo uma das principais barreiras, encontrar processos eficientes e viáveis economicamente para produção de enzimas (MISHIMA *et al.*, 2006).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Celulose e hemicelulose são, respectivamente, o primeiro e o segundo polissacarídeos mais abundantes na natureza. Celulases são uma classe de enzimas constituídas por endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidase (NELSON; COX, 2003). Xilanases são enzimas que catalisam a hidrólise das xilanas (principal componente da hemicelulose) e são produzidas principalmente por microrganismos. Portanto, celulase e xilanase são enzimas que atuam na sacarificação de materiais lignocelulósicos, resultando em hexoses e pentoses que industrialmente podem ser convertidas a etanol.

Para otimizar a produção de celulases e xilanases, a FES tem sido usada por diversos autores para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, sendo o bagaço de cana utilizado como substrato ou como suporte de matrizes juntamente com farelo de trigo e outros rejeitos agroindustriais (ZANELATO *et al.*, 2012; CASCIATORI, 2015). O farelo de trigo tem sido largamente empregado em processos de FES por ser considerado um substrato ideal, fonte balanceada de carbono, nitrogênio e fósforo (PANDEY, 2003).

Segundo Mitchell, Krieger e Berovic (2006), a importância da realização de testes em escala piloto é a capacidade de representação de uma seção em larga escala, que possibilita o estudo de fenômenos que dependem da altura do leito, como formação de biomassa e produção de enzimas, bem como temperatura e velocidade do ar percolante. Testes são importantes para prever limitações de desempenho não previstas por modelos matemáticos.

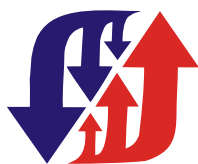
Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o crescimento do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b cultivado em meio composto por bagaço de cana (BC) e farelo de trigo (FT) (7:3 m/m), com umidade de 75 % (em base úmida, b.u.) sob temperatura de 45 °C (ZANELATO *et al.*, 2012) em biorreator de bancada, relacionando-o às suas atividades metabólicas ao longo da fermentação, além de avaliar a produção de enzimas em função da posição longitudinal ao longo do leito. O fungo *M. thermophila* I-1D3b é associado na literatura com atividades celulolíticas e hemicelulolíticas promissoras em estudos de FES (ZANELATO *et al.*, 2012; CASCIATORI, 2015).

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Engenharia de Processos e Biorreatores do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do IBILCE/UNESP. Como agente fermentativo para obtenção do extrato celulolítico a ser estudado, foi empregado o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, sendo os esporos suspensos de acordo com a metodologia empregada por Casciatori, 2015.

Como substratos, foram empregados BC e FT na proporção 7:3 (m/m). O bagaço foi triturado e peneirado utilizando peneira da série Tyler com abertura de 0,84 mm, e foram utilizadas apenas as fibras menores que 0,84 mm. O substrato foi preparado de acordo com a metodologia empregada por Casciatori (2015). O biorreator foi montado com 6 módulos de 7,62 cm de diâmetro interno, sendo os 4 centrais fermentativos e o inferior e o superior compostos por BC grosso úmido e seco, respectivamente. A massa de substrato empacotada em cada um dos quatro módulos do biorreator foi de 75 g. Os ensaios fermentativos foram realizados no mesmo sistema empregado por Casciatori (2015), sendo a vazão de ar 240 L/h.

As atividades enzimáticas de CMCase e xilanase foram determinadas seguindo-se os métodos de Ghose (1987) e Ghose e Bisaria (1987) com modificações. A biomassa fúngica foi estimada pela quantificação do teor de glicosamina no material fermentado, o que foi feito seguindo-se o método descrito por Aidoo, Hendry e Wood (1981) e Dalsenter (2005).



RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nas Figuras 1a e 1b, são apresentados, respectivamente, as atividades CMCase e xilanase dos extratos enzimáticos obtidos a partir de cada um dos módulos fermentativos e os perfis de temperatura em diferentes posições axiais e radiais do biorreator. Na legenda, T 1/2 indica o termopar localizado axialmente entre os módulos 1 e 2 no centro radial do leito e assim sucessivamente. A posição radial indicada como “intermediário” indica o termopar localizado entre o centro e a parede do leito ao longo da fermentação utilizando os módulos de 2 a 5 como fermentativos. Na figura 1a, as linhas horizontais referem-se às atividades médias no biorreator, dadas a partir da média das atividades obtidas em cada um dos 4 módulos fermentativos. As atividades estão expressas em unidades de atividade enzimática por grama de substrato sólido seco inicial (U/gss).

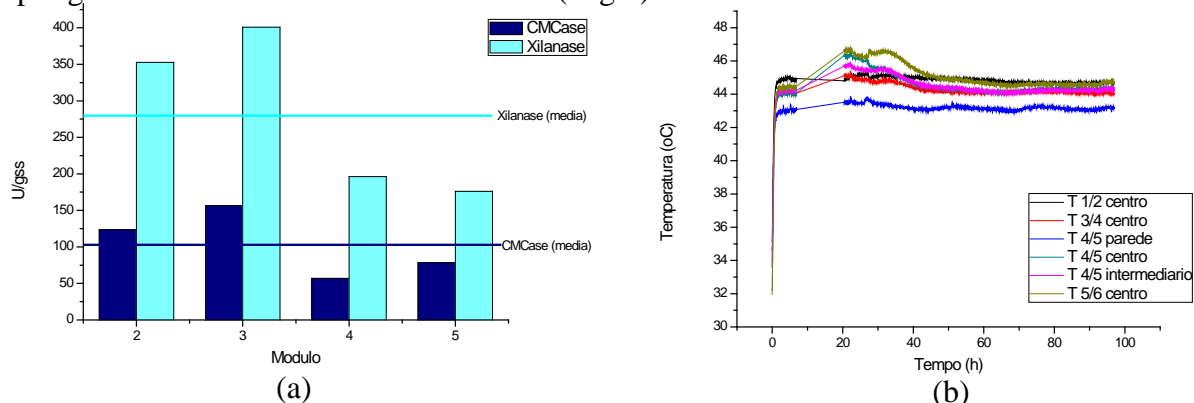


Figura 1: (a) Atividades enzimáticas de CMCase e xilanase dos extratos obtidos a partir dos módulos de 2 a 5 do biorreator empregando o fungo *M. thermophila* I-1D3b (b) Temperaturas ao longo da fermentação em diferentes pontos do biorreator.

Nota-se que os dois primeiros módulos fermentativos apresentaram rendimento em atividades enzimáticas mais elevado em relação aos dois últimos módulos. É visível ainda que na parede, entre módulos 4 e 5, a temperatura atingiu 43°C, indicando que, nos últimos módulos, a temperatura da camisa não atingiu 45°C, o que revela a dificuldade experimental de controle térmico nos módulos superiores, justificando as menores atividades enzimáticas encontradas para os extratos obtidos a partir desses módulos.

A determinação do teor de glicosamina, empregada por diversos autores para quantificar o crescimento fúngico em FES (BABITHA; SOCCOL; PANDEY, 2007; CASCIATORI, 2015) foi realizada utilizando amostras de 1 grama de substrato fermentado localizado no centro de cada módulo. Os resultados foram compatíveis com as atividades obtidas no experimento e indicaram a máxima proporção de biomassa por grama de material fermentado no módulo 3, onde houve o maior rendimento em atividades enzimáticas, seguida pelos módulos fermentativos 2, 4 e 5.

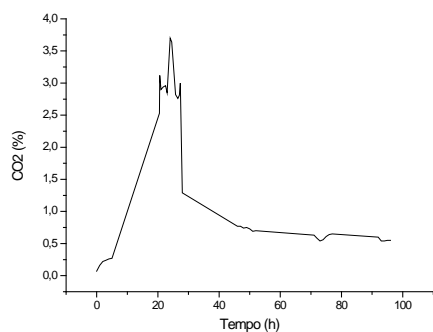
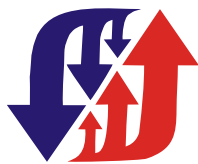


Figura 2: Vazão de CO₂ na corrente de saída do biorreator.

Na Figura 2 é fornecido o perfil de vazão de gás carbônico na corrente de saída de ar do biorreator



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

com 0,6 m de comprimento total. A máxima temperatura (47°C) foi registrada com cerca de 25 horas de fermentação, principalmente no centro do leito, entre os módulos 4 e 5 e 5 e 6 do fermentador. Além disso, é visível que a máxima da vazão de CO₂ na corrente de saída do biorreator foi simultâneo ao aumento das temperaturas. Tal resultado denota que o aquecimento do leito deu-se durante a fase de crescimento acelerado do fungo, durante a qual tanto a taxa de respiração quanto a de geração de calor metabólico foram mais intensas.

CONCLUSÕES

Nas condições estudadas, a FES é promissora para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, sendo que não ocorre sobreaquecimento do leito e o crescimento fúngico é elevado nos módulos onde há maior produção de enzimas. Para aumento de escala do biorreator, é necessário garantir que a temperatura das camisas superiores seja constante e ótima para o crescimento do fungo, uma vez que a maior perda de carga nos módulos mais elevados pode dificultar o alcance da água na camisa dos mesmos, prejudicando o crescimento fúngico e a consequente secreção de enzimas. Como esperado, a máxima geração de calor metabólico pelo fungo, que levou ao pico de temperatura no sistema, se deu durante sua fase de crescimento acelerado, na qual a taxa de respiração foi máxima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 12, p. 6-9, 1981.

BABITHA, S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 8, p. 1554-1560, 2007.

CASCIATORI, F. P. Produção de celulasas fúngicas por fermentação em estado sólido: ampliação de escala de biorreatores de leito fixo. 190f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). IBILCE, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2015.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987a.

GHOSE, T. K.; BISARIA, V. S. Measurement of hemicellulase activities – Part I: Xylanases. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, n. 12, p. 1739-1751, 1987b.

MISHIMA, D.; TATEDA, M.; IKE, M.; FUJITA, M. Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes. *Biores. Technol.*, v. 97, p. 2166-2172, 2006.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Solid-state fermentation bioreactors: fundamentals, design and operation. Berlin: Springer-Verlag, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. Carbohydrates and Glycobiology. In: *Lehninger Principles of Biochemistry*. Basingstoke: Palgrave Macmillan, 2003.

PANDEY, A. Solid-State Fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 81-84, 2003.

ZANELATO, A. I.; SHIOTA, V. M.; GOMES, E.; THOMÉO, J. C. Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora* sp. I-1D3b in a packed bed solid state fermentor. *Brazilian Journal Microbiology*, v. 43, n. 4, p. 1536-1544, 2012.