

**Aproveitamento do Caroço do
Açaí como Substrato para a
Produção de Enzimas por
Fermentação em Estado Sólido**



ISSN 1678-0434

Novembro, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 30

Aproveitamento do Caroço do Açaí como Substrato para a Produção de Enzimas por Fermentação em Estado Sólido

Cristiane Sanchez Farinas
Rodrigo Rafael Mendonça dos Santos
Victor Bertucci Neto
José Dalton Cruz Pessoa

São Carlos, SP
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
<http://www.cnpdia.embrapa.br>
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento de ilustrações: Valentim Monzane
Capa foto: Gisele Vieira Ribeiro
Editoração eletrônica: Manoela Campos

1ª edição

1ª impressão (2009): tiragem 300

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.

Embrapa Instrumentação Agropecuária

-
- F225a Farinas, Cristiane Sanchez
Aproveitamento do caroço do açaí como substrato para a produção de
enzimas por fermentação em estado sólido / Cristiane Sanchez Farinas,
Rodrigo Rafael Mendonça dos Santos, Victor Bertucci Neto, José Dalton
Cruz Pessoa. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2009.
15 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de Pesquisa e
Desenvolvimento, ISSN 1678-0434; 30).

1. Engenharia Bioquímica. 2. Enzimas. 3. Açaí. 4. Resíduos
agroindustriais. 5. Fermentação. 6. Biomassa vegetal. I. Santos, Rodrigo
Rafael Mendonça dos. II. Bertucci Neto, Victor. III. Pessoa, José Dalton
Cruz. IV. Título. V. Série.

CDD 21 ED 660.63

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
1. Introdução	7
2. Material e Métodos	9
3. Resultados e Discussões	10
Conclusões	14
Referências	15

Aproveitamento do Caroço do Açaí como Substrato para a Produção de Enzimas por Fermentação em Estado Sólido

Cristiane Sanchez Farinas¹

Rodrigo Rafael Mendonça dos Santos²

Victor Bertucci Neto³

José Dalton Cruz Pessoa⁴

Resumo

O estado do Pará é o principal responsável pela produção nacional de açaí, fruto do qual é extraído um suco de alto teor energético e nutricional. No entanto, cerca de 80% do total de açaí processado transforma-se em resíduo, ainda sem destinação econômica adequada, sendo jogados sem nenhum tratamento nos rios e lixões. Portanto, existe uma demanda para o desenvolvimento de processos visando o seu aproveitamento. Neste trabalho foi avaliada a viabilidade da utilização do caroço de açaí como substrato da fermentação em estado sólido (FES) para a produção de enzimas de interesse industrial. Através da aplicação da metodologia de planejamento fatorial estatístico avaliou-se diferentes composições de meio nutricional para a produção de CMCase e xilanase no cultivo de *Aspergillus niger* em caroço do açaí. As variáveis estudadas foram as concentrações de peptona, de extrato de levedura, de carboximetilcelulose (CMC) e a umidade do meio. A maior atividade enzimática de CMCase atingiu 3,60 U.g⁻¹, ao final de 72 horas de cultivo a 32 °C. Os melhores resultados para xilanase atingiram 3,89 U.g⁻¹ nas mesmas condições utilizadas para CMCase. Esses resultados representaram uma melhor produtividade em função do acréscimo de fontes indutoras de carbono e nitrogênio, demonstrando que com uma adequada formulação das mesmas é possível viabilizar a utilização do caroço de açaí como substrato para a produção de enzimas.

Palavras chave: açaí, resíduos agroindustriais, fermentação, enzimas, biomassa vegetal.

¹Engenharia Química, Dra., Pesquisadora, Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos/SP. cristiane@cnpdia.embrapa.br

²Biologia, Mestrando do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Estagiário na Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos/SP. rrmsantos@yahoo.com.br

³Engenharia Elétrica, Dr., Pesquisador, Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos/SP. victor@cnpdia.embrapa.br

⁴Física, Dr., Pesquisador, Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos/SP. dalton@cnpdia.embrapa.br

Evaluation of açai residues as substrate for enzyme production by solid state fermentation.

Cristiane Sanchez Farinas
Rodrigo Rafael Mendonça dos Santos
Victor Bertucci Neto
José Dalton Cruz Pessoa

Abstract

The state of Pará is the major producer of açai, a fruit from which is extracted a highly energetic and nutritional juice. However, about 80% of the total processed açai becomes a waste with no adequate destination, being thrown into rivers and landfills. Therefore, there is strong need for the development of alternative processes that could make use of this residue. Here, we evaluated the feasibility of using açai residues as a substrate of solid state fermentation for the production of enzymes of industrial interest. By applying the methodology of factorial design, we evaluated different combinations of nutritional medium for the production of CMCase and xylanase in the cultivation of *Aspergillus niger* in açai residues. The variables studied were the concentrations of peptone, yeast extract, carboxymethylcellulose (CMC) and the humidity of the medium. CMCase activities up to 3.60 U.g⁻¹ and xylanase activities up to 3.89 U.g⁻¹ were obtained at the end of 72 hours of cultivation at 32 °C. These results represented an improvement in terms of enzymatic productivity by the addition of sources of carbon and nitrogen, showing that with a proper medium formulation it is possible to use açai residues as a substrate for enzyme production.

Key words: açai, agroindustrial residue, fermentation, enzymes, biomass.

1. Introdução

A agroindústria do açaí é uma das cadeias produtivas mais importantes para o estado do Pará. Somente na cidade de Belém existem cerca de 3 mil estabelecimentos que comercializam o açaí já processado, atendendo a um consumo diário de 440 mil quilos do fruto (IBGE, 2007) e gerando um excedente de 365 toneladas por dia de lixo orgânico, constituído principalmente de caroços, descartados em aterros sanitários e cursos d'água. O desenvolvimento desta cadeia produtiva depende da correta destinação de todos os subprodutos gerados. Neste sentido, os subprodutos geralmente classificados como resíduos podem ser encarados como passíveis de valoração econômica, ganhando novos usos para a sociedade.

Fornecedor do principal produto do extrativismo vegetal da Região Norte, o açazeiro (*Euterpe oleracea*) é uma palmeira de origem amazônica que cresce em touceiras de até 25 estipes. Seu fruto é uma importante fonte de nutrientes para grande parte da população, principalmente a ribeirinha.

Segundo dados do IBGE (2007), o Estado do Pará é responsável por 86,8% da produção nacional de açaí com 93.772 t/ano do fruto. Deste total 77.830 t/ano é de resíduo (caroço), ou seja, cerca de 80% do total produzido, ainda sem destinação econômica adequada, sendo jogados nos rios e lixões sem nenhum tratamento. Portanto, existe uma demanda para o desenvolvimento de processos visando ao aproveitamento de tais resíduos.

Principal subproduto da indústria de processamento do açaí, o caroço é uma semente oleaginosa, formada por um pequeno endosperma sólido ligado a um tegumento que na maturidade é rico em celulose (53,20%), hemicelulose (12,26%) e lignina (22,30%) (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2008). Essas características fazem do caroço do açaí uma importante fonte de biomassa lignocelulósica, podendo ser uma potencial alternativa de substrato sólido para a obtenção de enzimas de interesse comercial pelo processo de fermentação em estado sólido (FES).

A fermentação em estado sólido é definida como o processo de crescimento microbiano na superfície de materiais sólidos que apresentam a propriedade de absorver ou de conter água, com umidade suficiente apenas para manter o crescimento e o metabolismo do microrganismo, isto é, isento de água livre (RAHARDJO et al., 2006). Por ser um processo com baixos níveis de água residual, apresenta-se como um processo industrial limpo.

Atualmente, as enzimas são utilizadas em várias aplicações industriais e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas tem crescido rapidamente. Cerca de 60% das indústrias que vendem enzimas encontram-se na Europa, os outros 40% estão nos Estados Unidos e no Japão (BHAT, 2000).

De acordo com os dados do Ministério do desenvolvimento e comércio exterior do governo federal, sobre o mercado de enzimas do Brasil, no ano de 2005, o total de importações brasileiras foi de US\$ 95,7 milhões, enquanto as exportações foram de US\$ 5,4 milhões, mostrando que o mercado brasileiro é essencialmente importador, indicando uma desvantagem tecnológica e estratégica em termos de produção e uso das enzimas no país.

Desta forma, a utilização do caroço do açaí como substrato para produção enzimática poderá tornar-se uma alternativa competitiva no mercado. Além destas vantagens, a produção destas enzimas utilizando o caroço dispõe-se também como uma maneira viável de agregar valor a estes resíduos, diminuindo assim o impacto ao meio ambiente.

No entanto, no processo de FES, um grande número de variáveis afeta o crescimento microbiano e a conseqüente produção de metabólitos de interesse, dentre elas destaca-se a composição nutricional do meio de cultivo utilizado. Quando o fungo é cultivado, uma suplementação deve ser realizada em termos das fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais. Entre as fontes de nitrogênio as exigências variam, sendo que vários microrganismos utilizam compostos inorgânicos, como os sais de amônio e nitratos. Outros, entretanto, exigem fontes de nitrogênio orgânico, como os hidrolisados de proteína, como a peptona e o extrato de levedura. A peptona é um produto da digestão enzimática da carne, formada por polipeptídeos e oligossacarídeos. O extrato de levedura contém todo o material solúvel do autolisado das células de levedura, incluindo proteínas, peptídios, aminoácidos livres, nucleotídeos, vitaminas, oligossacarídeos e minerais (KOLLAR et al., 1992).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade da utilização do resíduo da agroindústria do açaí como substrato para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido através do cultivo de uma linhagem selecionada do fungo filamentososo *Aspergillus niger*. As enzimas selecionadas foram as celulases e hemicelulases, que possuem uma importante aplicação nos processos de conversão da biomassa para a produção de biocombustíveis, entre outras aplicações nas industriais. No entanto, um dos obstáculos para o uso dessas enzimas de forma mais ampla é o seu custo elevado. A utilização do caroço de açaí como um substrato de baixo custo poderá ser uma alternativa para sobrepor essa barreira.

A influência da composição do meio de cultivo na produtividade enzimática foi avaliada através da aplicação da metodologia de planejamento experimental estatístico na seleção das variáveis concentração de Carboximetilcelulose (CMC), concentração de extrato de levedura, concentração de peptona e umidade inicial do meio.

2 Material e Métodos

Microorganismo

O agente de fermentação foi uma linhagem do fungo filamentosso *Aspergillus niger* da coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos, RJ. Conídios do microrganismo armazenados em solo estéril e sob condições de congelamento foram reativados em gelose inclinada com meio básico e incubados por 7 dias a 32°C (COURI e FARIAS, 1995). Os conídios da etapa de ativação foram utilizados para a inoculação em meio de sabugo de milho, utilizado para produção do inóculo da fermentação.

Preparação do Inóculo

Utilizou-se 1 mL da suspensão de conídios em Tween 80 para a inoculação do meio de sabugo de milho. Os meios de sabugo de milho inoculados foram incubados por 5 dias a 32°C, segundo Couri e Farias (1995). A concentração de conídios necessária para a inoculação foi determinada em câmara de Neubauer após a devida diluição da suspensão obtida. O volume de inóculo para fermentação foi calculado visando uma concentração final de 10^7 conídios/g de substrato.

Condições da Fermentação

O caroço do açaí foi moído, tendo suas granulometrias padronizadas em peneira de Mesh 20. Pesaram-se dez gramas do substrato em frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL. Os frascos foram esterilizados e então inoculados. Após 72 horas de fermentação a 32°C, procedeu-se à etapa de extração do complexo enzimático. As amostras foram extraídas com tampão acetato de sódio 0,2 mol/L, pH 4,5, incubando os frascos em shaker a 120 rpm e 32°C por 1 hora. Os extratos enzimáticos recuperados foram armazenados a -18 °C para posterior análise da atividade enzimática. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Planejamento experimental

Os experimentos de fermentação foram realizados segundo um planejamento fatorial completo envolvendo quatro variáveis independentes: concentrações de peptona, extrato de levedura e carboximetilcelulose (CMC) e a umidade inicial do substrato. Assim, foram realizados 19 ensaios, incluindo as 3 repetições do ponto central. Os valores utilizados na preparação dos diferentes meios de complemento são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores utilizados de concentração de peptona, extrato de levedura, CMC e umidade do meio.

Variáveis	-1	0	1
Peptona (g/L)	2	8	14
Extrato de levedura (g/L)	1	5	9
Carboximetilcelulose (CMC) (%)	0,5	1,5	2,5
Umidade (%)	40	60	80

Atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas de CMCase e xilanase dos extratos obtidos foram quantificadas e os resultados das análises foram expressos como unidades de atividade por massa de substrato inicial seco. A atividade endoglucanásica CMCase, tem como substrato a CMC (Sigma, EUA). Uma unidade de atividade CMCase corresponde a 1 mol de grupos redutores liberados por minuto de reação em pH 4,2 a 50°C. A atividade da xilanase foi medida em termos de produção de açúcares redutores a partir de xilana comercial (Sigma, EUA). Uma unidade de atividade xilanase corresponde a 1 mol de xilose liberado por minuto em pH 4,2 a 50°C. A quantificação de grupos redutores foi realizada pelo método DNS (MILLER, 1959) e as atividades expressas em unidade internacional por grama de fermentado seco (U/g).

3 Resultados e Discussões

Uma das principais barreiras para o desenvolvimento de processos de conversão da biomassa em biocombustíveis pela rota enzimática é o alto custo das enzimas. Portanto, é de grande interesse o estudo de alternativas que possam reduzir tal custo. A FES é uma tecnologia já bastante estabelecida para a produção de enzimas e possui como vantagens um menor custo de operação e a possibilidade da utilização de resíduos agroindustriais como substrato. No entanto, para o desenvolvimento de processos de produção de enzimas por FES necessita-se realizar a definição das condições operacionais e nutricionais de forma a favorecer a produção dos metabólitos de interesse. Desta forma, utilizou-se a metodologia de planejamento experimental para avaliar a influência das variáveis concentração de peptona, de extrato de levedura, de CMC e da umidade do meio na produtividade enzimática. O objetivo desse estudo foi determinar a viabilidade da utilização do caroço de açaí como substrato da FES.

O processo foi analisado com base nas atividades de CMCase e xilanase obtidas ao final de 72 horas de fermentação, sendo que esse período foi selecionado a partir de resultados anteriores (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2008). Os valores utilizados no planejamento e os resultados obtidos das respostas estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Diferentes composições do meio com os valores codificados e os resultados das atividades enzimáticas.

Ensaio	Peptona	Levedura	CMC (%)	Umidade (%)	CMCase (U/g)	Xilanase (U/g)
1	-1	-1	-1	-1	0,51	0,85
2	1	-1	-1	-1	1,11	1,85
3	-1	1	-1	-1	1,56	1,87
4	1	1	-1	-1	3,38	4,75
5	-1	-1	1	-1	0,75	0,92
6	1	-1	1	-1	1,70	2,02
7	-1	1	1	-1	2,57	2,30
8	1	1	1	-1	3,60	4,67
9	-1	-1	-1	1	1,46	1,75
10	1	-1	-1	1	1,61	2,03
11	-1	1	-1	1	1,13	1,11
12	1	1	-1	1	2,68	2,53
13	-1	-1	1	1	1,09	0,75
14	1	-1	1	1	1,24	1,54
15	-1	1	1	1	1,54	1,18
16	1	1	1	1	1,79	3,06
17 (C)	0	0	0	0	2,24	1,50
18 (C)	0	0	0	0	2,14	1,89
19 (C)	0	0	0	0	2,60	1,77

Os efeitos das variáveis independentes foram avaliados inicialmente em termos da atividade de CMCase. Somente as concentrações de peptona e levedura se mostraram estatisticamente significativas a 95% de confiança (Tabela 3). O coeficiente de correlação (0,8879) e o teste F (1,9 vezes o valor do F tabelado) se mostraram satisfatórios.

Tabela 3. Estimativa dos efeitos para a atividade de CMCase.

	Efeito (U/g)	Erro padrão	t(8)	p-valor
Média	1,826	0,097	18,782	0,000
(1) Peptona	0,812	0,212	3,834	0,005
(2) Levedura	1,099	0,212	5,185	0,001
(3) CMC (%)	0,104	0,212	0,491	0,636
(4) Umidade (%)	-0,330	0,212	-1,555	0,158

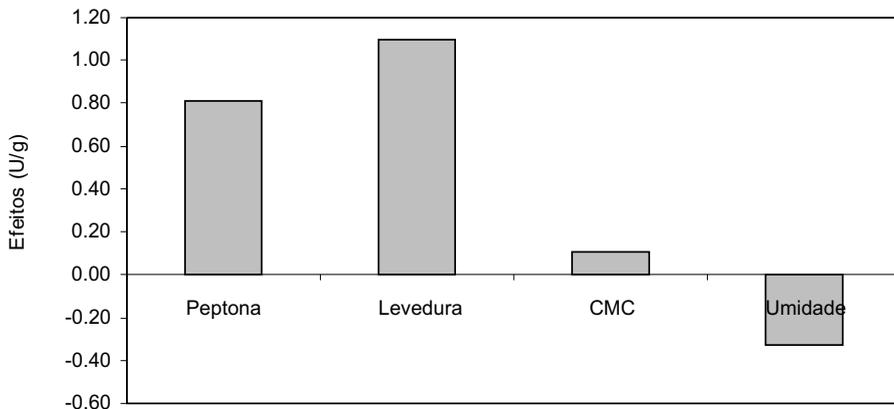


Fig. 1. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes sobre a produtividade de CMCCase em caroço de açai.

A maior produção da enzima CMCCase (3,60 U/g) foi obtida em condições de maior concentração de peptona e extrato de levedura no meio. No entanto, a análise da superfície de resposta (Fig. 2) indica que maiores produtividades podem ser atingidas com o aumento dos valores dessas variáveis.

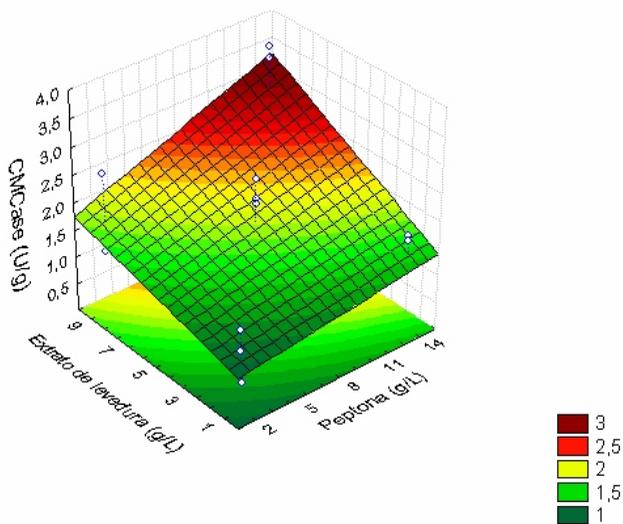


Fig. 2. Superfícies de respostas para a atividade de CMCCase em caroço de açai.

Ensaio comparativos realizados nas mesmas condições do ponto central e utilizando o farelo de trigo como substrato levaram a uma produção de CMCCase de 11,62 U/g. Apesar desse valor ser superior aos valores obtidos usando o

caroço do açaí como substrato, o fato de termos a disponibilidade do caroço a baixo custo pode ser uma vantagem.

Em relação à enzima xilanase, as concentrações de peptona e levedura e a umidade do meio se mostraram estatisticamente significativas a 95% de confiança (Tabela 4). O coeficiente de correlação (0,9613) e o teste F (5,93 vezes o valor do F tabelado) se mostraram satisfatórios.

Tabela 4. Estimativa dos efeitos para a atividade de xilanase.

	Efeito (U/g)	Erro padrão	t(8)	pvalor
Média	2,017	0,075	26,740	0,000
(1) Peptona	1,466	0,164	8,916	0,000
(2) Levedura	1,221	0,164	7,427	0,000
(3) CMC (%)	-0,038	0,164	-0,229	0,825
(4) Umidade (%)	-0,660	0,164	-4,015	0,004

A Figura 3 apresenta os efeitos principais das variáveis estudadas sobre a atividade de xilanase. Tanto as concentrações de peptona, quanto de levedura apresentaram efeitos positivos, indicando que um incremento nessas variáveis levou a maiores produções da enzima xilanase. A variável umidade apresentou um efeito negativo, indicando que incrementos nessa variável levou a um decréscimo na produtividade e a variável CMC não se mostrou significativa dentro da faixa estudada. Os maiores níveis de xilanase foram de 4,75 U/g.

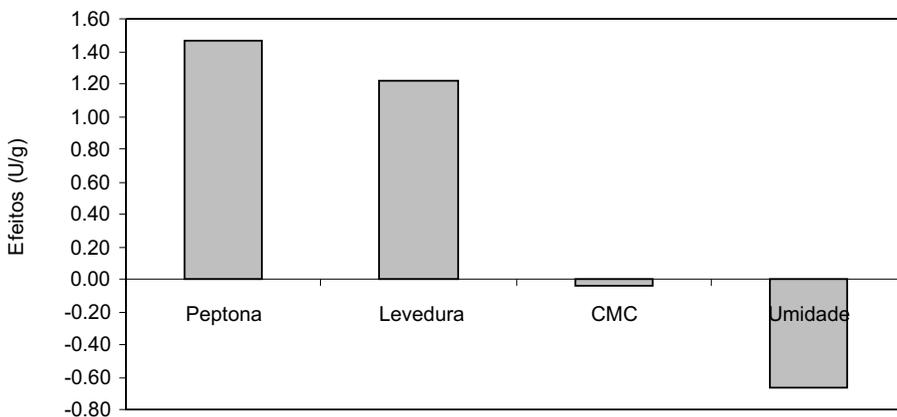


Fig. 3. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes sobre a produtividade de xilanase em caroço de açaí.

Da mesma forma que para a enzima CMCase, foram realizados ensaios comparativos utilizando o farelo de trigo como substrato para produção de xilanase, resultando em valores de 14,56 U/g na condição do ponto central. A análise da superfície de resposta para a xilanase (Fig. 4) indica que maiores produtividades podem ser atingidas com o aumento dos valores dessas variáveis.

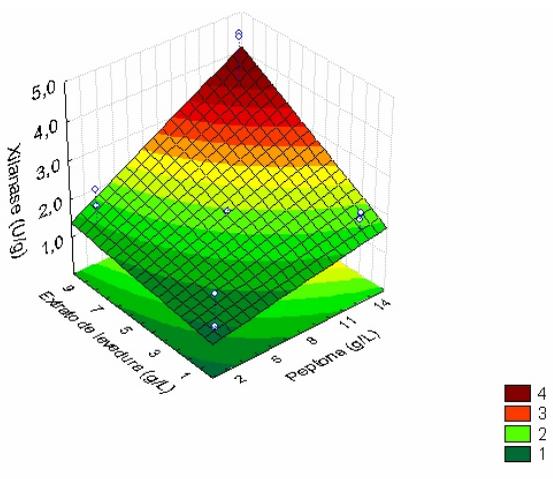


Fig. 4. Superfícies de respostas para a atividade de xilanase em caroço de açaf.

Por ser um ser um resíduo agroindustrial com oferta crescente e pelos resultados obtidos, o caroço do açaf mostrou-se promissor como fonte de biomassa lignocelulósica para a produção de enzimas de interesse para a cadeia produtiva de biocombustíveis. Novos estudos complementares direcionados à suplementação do meio com o incremento das concentrações de peptona e levedura devem ser realizados buscando-se a otimização e o escalonamento industrial do processo.

Conclusões

Neste trabalho avaliou-se a viabilidade da utilização do caroço de açaf como substrato para a produção das enzimas por FES. Nos testes realizados, o caroço do açaf apresentou-se promissor quanto a sua utilização como fonte de biomassa para produção de enzimas celulasas e hemicelulasas. No entanto, estudos complementares para um ajuste dos parâmetros operacionais do processo fermentativo estão sendo realizados visando a otimização da produção destas enzimas, de forma a contribuir para a cadeia produtiva de biocombustíveis e valoração da cadeia do açaf.

Referências

BHAT, M. K. Cellulase and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, p. 355-383, 2000.

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 314-317, 1995.

IBGE. **Produção da extração vegetal e da silvicultura**: Belem - PA, Brasil, 2007.

Disponível em:

[http://www.ibge.gov.br/servidor_arquivos_est/default.php?caminho=../pub/Producao_Agricola/Producao_da_Extracao_Vegetal_e_da_Silvicultura_\[anual\]/2007](http://www.ibge.gov.br/servidor_arquivos_est/default.php?caminho=../pub/Producao_Agricola/Producao_da_Extracao_Vegetal_e_da_Silvicultura_[anual]/2007) >.

Acesso em: 05 ago. 2009.

KOLLAR, R.; STURDUK, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, New York, v. 6, n. 3, 225-237, 1992.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, p. 426-428, 1959.

RAHARDJO, Y. S. P. et al. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, p. 161-179, 2006.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V. ; LEMO, V. Produção de Complexos Lignocelulíticos em Substratos Derivados de Resíduos Agroindustriais por Fermentação Semi-sólida. In: WORKSHOP DE BIOCATALISE E BIOTRANSFORMAÇÃO, 4., 2008, São Carlos. **Livro de resumos...** São Carlos, SP: Instituto de Química de São Carlos, 2008. p. 107. resumo expandido. Anais.



Embrapa Instrumentação Agropecuária

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

