

## UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA PRODUÇÃO DE CELULASES PELO FUNGO *Trichoderma reesei* EM CULTIVO SEMISSÓLIDO

Felipe Augusto Santos<sup>1</sup>, Andressa Laís Maria de Melo<sup>1</sup>, Karina Soares do Bonfim<sup>1</sup>, Thaiane Vasconcelos Fenelon de Barros<sup>1</sup>, Sharline Florentino de Melo Santos<sup>2\*</sup>

1. Discente do curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

2. Professora Adjunto. \*Correspondência: Departamento de Engenharia Química (DEQ), Centro de Tecnologia (CT), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Cidade Universitária, CEP: 58059-900, João Pessoa-PB. email: sharlinefm@hotmail.com

### RESUMO

Os fungos do gênero *Trichoderma* têm sido amplamente estudados devido à grande versatilidade metabólica em produzir diferentes compostos bioativos de importância biotecnológica, com destaque para produção de enzimas. Resíduos agrícolas, como diferentes tipos de bagaço, palhas e folhas podem ser utilizados como matéria-prima de baixo custo para a confecção de diferentes meios fermentativos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de resíduos agroindustriais como substrato para produção de celulasas por *Trichoderma reesei*. Foram usados folha e pseudocaule de bananeira, casca e coroa do abacaxi e farelo de trigo. Os ensaios foram realizados em erlenmeyer de 1000 mL com 100 g de meio, em que se inoculavam os esporos e se ajustava a umidade. A temperatura de incubação foi de 27°C, e o tempo total de fermentação de 5 dias. Retiraram-se amostras a cada 24h, inclusive a 0h, para análise da atividade CMCase, por dosagem de açúcares redutores liberados da reação do extrato enzimático com soluções de CMC 4%. A atividade CMCase (endoglucanase) nas folhas de bananeira variou de 0,47 a 2,86 U/g, sendo que a máxima atividade foi obtida com tempo de fermentação de 96 horas. Para os cultivos realizados com o pseudocaule de bananeira, observou-se que não houve crescimento do microrganismo durante os dias de cultivo. Nos resíduos de abacaxi, observou-se que não houve produção de CMCase e isso pode ser justificado pelos valores do teor de sólidos solúveis, que foram altos, o que leva a acreditar na presença de glicose nestes resíduos.

**Descritores:** resíduos agroindustriais, *Trichoderma reesei*, celulasas.

## UTILIZATION OF AGROINDUSTRIAL RESIDUES IN CELLULASE PRODUCTION BY *Trichoderma reesei* FUNGI ON SOLID-STATE CULTIVATION

### ABSTRACT

The fungi of the genus *Trichoderma* have been widely studied because of their high metabolic versatility in producing various bioactive compounds of biotechnological importance, especially for the production of enzymes. Agricultural waste, such as different types of mulch, straw and leaves can be used as raw material cost for making different fermentation media. The aim of this study was to evaluate the use of agroindustrial waste as substrate for cellulase production by *Trichoderma reesei*. Leaf and pseudostem of banana, peel and pineapple crown and wheat bran were used. The tests were performed in 1000mL Erlenmeyer flask with 100 g of medium in which the spores were inoculated and the humidity was adjusted. The incubation temperature was ambient temperature, 27°C, and the total time of fermentation was 5 days. Samples were taken every 24 hours, including 0h, for analysis of CMCase activity by measurement of reducing sugars released from the reaction of the enzyme extract with 4% CMC solutions. The CMCase activity (endoglucanase) in banana leaves ranged from 0.47 to 2.86 U/g, and the maximum activity was achieved with fermentation time of 96 hours. For the cultivations performed with the banana pseudostem, it was observed no growth of the microorganism during the days of cultivation. On the pineapple waste, it was observed that there was no production of CMCase and this can be

justified by the values of soluble solids, which were high, and leads to believe in the presence of glucose in these residues.

**Keywords:** agroindustrial waste, *Trichoderma reesei*, cellulases.

## INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos microbianos atualmente são responsáveis por uma generosa parcela da economia mundial (1), mas apesar da potencialidade do desenvolvimento dos processos enzimáticos, vários estudos apontam os altos custos da produção como um fator limitante, assim, uma das alternativas para minimizar este problema é o emprego de resíduos agroindustriais como substrato fermentescível (2).

Tal prática reduz os custos para aquisição de bioprodutos de origem microbiana e também colaboram com práticas biotecnológicas mais sustentáveis (3-4). Vários bioprocessos já têm sido desenvolvidos com sucesso a partir desses substratos, inclusive a produção de enzimas microbianas (5).

Historicamente, o aproveitamento de recursos genéticos e biológicos ocorre em inúmeras áreas, em especial na alimentação, a agricultura e a medicina (6). Dentre os recursos biológicos mais utilizados para a aquisição de bioprodutos estão os microrganismos que produzem substâncias capazes de contribuir com a saúde humana e o meio ambiente (7).

Das substâncias produzidas por microrganismos as enzimas merecem destaque, pois a produção enzimática movimentava aproximadamente 2,34 bilhões de dólares anuais no mercado internacional (1).

Com o avanço no conhecimento das enzimas, os fungos vêm adquirindo um status de destaque para vários tipos de indústrias uma vez que existe a possibilidade de utilizá-las para melhorar vários aspectos do produto final (8). Os fungos filamentosos se destacam devido à sua facilidade de cultivo, por secretarem suas enzimas diretamente no meio em que se encontram, não necessitando de ruptura celular para sua liberação. Adicionalmente, apresentam elevados níveis de produção enzimática, com grande potencial para diversas aplicações industriais (9).

Os fungos atuam na decomposição de polímeros estruturais de plantas, como celulose, hemicelulose e lignina, através da liberação de enzimas específicas, as celulases, xilanases e lignases, as quais também são de grande interesse biotecnológico devido ao potencial comercial (7). Os principais produtores de celulases e xilanase incluem: *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriense*, *Aspergillus sp*, *Schizophyllum sp*,



*Chaetomium sp* e *Humicola sp* (10). Assim os fungos produtores de enzimas são facilmente encontrados em ambientes naturais, sendo passíveis de isolamento e testes para produção de uma grande quantidade de enzimas.

As celulases e hemicelulases apresentam destaque no mercado de enzimas já que podem ser utilizadas em diversos ramos industriais, tais como: indústrias farmacêuticas, têxteis, alimentícias, papelreira, produção de biocombustíveis, ração animal e de detergentes (11).

As celulases atuam na degradação da celulose, que é um polissacarídeo constituído por unidades monoméricas de  $\beta$ -D-glucose e representam a estrutura mais abundante nos vegetais (12). As celulases fazem parte da família das glicosil-hidrolases, que hidrolisam oligossacarídeos e polissacarídeos e reconhecem as ligações  $\beta$ -1,4 entre as moléculas de glicose (13).

As celulases secretadas por fungos filamentosos são formadas por três componentes principais: as exoglucanases ou celobiohidrolases, as endoglucanases ou celodextrinases, e as celobiasas ou  $\beta$ -glicosidases, essas últimas não são consideradas como celulases legítimas, mas desempenham um importante papel na hidrólise da celulose (14).

Atualmente toma-se como técnicas para produção de enzimas de valor agregado, o cultivo submerso e o cultivo em estado sólido, destas o cultivo submerso é mais citada, mas desde meados da década de 90, o cultivo em estado sólido vem tomando espaço entre os pesquisadores para a produção de algumas enzimas, especialmente daquelas envolvidas na degradação de polímeros vegetais complexos (15).

O cultivo em estado sólido é tido como um processo de fermentação na ausência de água livre entre as partículas, na qual se emprega um material natural ou sintético como substrato sólido (15-16). Assim, a macromolécula estrutural serve de matriz sólida e fornece o carbono e as fontes de energia como açúcares, lipídios, proteínas e ácidos orgânicos aos microrganismos (17).

Como substratos naturais podem ser utilizados materiais orgânicos como resíduos agrícolas, florestais e da indústria alimentícia (18). A aplicação de resíduos é uma forma de utilizar substratos alternativos que contribui com a solução de problemas de poluição para as indústrias, já que permite a destinação destes resíduos evitando acúmulo na natureza, além de reduzir os custos na produção de enzimas (3-4).

A bananeira é uma das principais frutíferas em exploração no Brasil; entretanto, a quantidade de bananas produzidas anualmente no País só é superada pela de

laranjas. A bananeira é cultivada, sem exceção, em todos os estados da Federação, para cada tonelada de banana industrializada aproximadamente 3 toneladas de pseudocaule, 160 kg de engaços, 480 kg de folhas e 440 kg de cascas são gerados (19).

O Nordeste destaca-se como a principal região produtora de banana do país, tendo no ano agrícola de 2006 uma área cultivada de 210.374 hectares, com uma produção de 2.706.207 toneladas e um rendimento de R\$ 1.056.020, contribuindo com 41,15% da área cultivada, 39% da produção e 39% do rendimento. O Estado da Paraíba é o quarto produtor de banana da região Nordeste, contribuindo com 9,8% da produção regional e, 3,8% da produção nacional. As cultivares mais difundidas são as do tipo Pacovan e Prata (comum e anã) que juntas ocupam 95% da área cultivada, embora também se cultive os tipos Cavendish (grande naine, nanica e nanicão), “Terra” e “Maçã” (20).

A Paraíba é o maior produtor de abacaxi no Nordeste, região que responde por cerca de 38% da produção nacional. Em 2011, foram cultivados no Estado 9.216 hectares e obtidos 276 milhões de frutos, correspondendo a 40,2% da área e 45,2% da produção regional. As regiões da Mata e do Agreste Paraibano respondem por cerca de 76% da área cultivada e 23% da produção do Estado (21).

O abacaxi é um fruto comercialmente importante no mercado brasileiro, com grande potencial de exploração, não só in natura, mas também na forma de processados. Porém, para disponibilizá-lo dessa forma, técnicas de conservação devem ser estudadas (22). A composição química dos resíduos de abacaxi ainda não é muito bem caracterizada. Porém seus subprodutos e resíduos agroindustriais apresentam potencial importância como fonte de compostos fenólicos.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de celulases, pelo fungo *Trichoderma reesei*, através do cultivo semissólido, usando os resíduos de folha e pseudocaule de bananeira, farelo de trigo e a casca e coroa de abacaxi como substratos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o *Trichoderma reesei*, cedido pela Fundação André Tosello e pertence à Coleção de Culturas Tropical (CCT), com número CCT 2768. O microrganismo foi conservado sob refrigeração, em meio de aveia.



### **Inóculo**

Foi feito o repique do fungo do estoque para placas de Petri contendo meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e clorafenicol 0,1%. As placas contendo o meio BDA foram inoculadas com o *Trichoderma reesei* e incubadas em temperatura ambiente por cinco dias, para o crescimento do mesmo. Após o crescimento, foi feita a suspensão dos esporos, usando água destilada estéril para raspagem das placas. A suspensão de esporos foi acondicionada em tubo estéril.

A quantificação da suspensão assim obtida foi feita através de contagem dos esporos em câmara de Neubauer espelhada, com auxílio do microscópio. Todo o processo foi feito próximo ao bico de Bunsen, a fim de evitar qualquer tipo de contaminação.

### **Meio de cultivo**

Como meio de cultivo foram utilizados pseudocaule e as folhas de bananeira, casca e coroa de abacaxi e farelo de trigo.

O pseudocaule e as folhas de bananeira foram obtidos na cidade de Bananeiras-PB. Os abacaxis e o farelo de trigo foram adquiridos no comércio local da cidade de João Pessoa-PB.

Os resíduos de banana e abacaxi foram lavados em água corrente e depois cortados em pequenos pedaços. Após isso, foram dispostos em bandejas e encaminhados para secagem em estufa a 60°C, por um período de aproximadamente 48 horas. Os resíduos secos foram triturados e depois armazenados em recipientes fechados à temperatura ambiente.

### **Caracterização físico-química**

A caracterização físico-química dos resíduos quanto ao pH, umidade, densidade aparente e teor de sólidos solúveis (°Brix) foi realizada conforme procedimentos descritos a seguir.

Para o pH, preparou-se uma suspensão com 10mL de água destilada e 1,0 g de resíduo. Após homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por um período de aproximadamente 20 minutos. Após isso, o pH foi mensurado em pHmetro digital, que foi previamente calibrado com as soluções padrões (pH = 4,0 e pH = 7,0). As análises foram feitas em duplicata, para cada resíduo.

Para a análise da umidade, foi determinado o peso seco de quatro placas de Petri e nelas foram pesados cerca de 2 gramas de cada resíduo, em duplicata. Após 24 horas, em estufa a 105°C, foi determinada a umidade dos resíduos.

Para a densidade aparente, pesou-se 100 gramas dos resíduos, que foram colocados em proveta de 250mL para determinar o volume ocupado, sem que houvesse compactação dos mesmos.

### Ensaio fermentativos

Os cultivos foram feitos utilizando 50% de cada resíduo (folhas e pseudocaule de bananeira, casca e coroa de abacaxi) com 50% de farelo de trigo, para um total de 100 gramas de massa. Os substratos foram umedecidos com uma solução do meio líquido proposto por Mandels e Weber (23): Ureia 0,30g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,4g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0g/L; CaCl<sub>2</sub> 0,30g/L; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,3g/L; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 5,0 mg/L; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 20 mg/L; MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,6 mg/L; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,4 mg/L; Peptona 0,75 g/L. Para o preparo dessa solução, é necessário calcular a quantidade de água que será utilizada e esse cálculo é feito de acordo com a umidade de cada resíduo. A Equação 1 foi utilizada para o cálculo da quantidade de água. O preparo da solução de Mandels e Weber foi feito com a soma das quantidades de água de cada resíduo, fazendo a devida proporção para um litro.

$$m_{H_2O} = \frac{\text{massa do resíduo} * (\text{umidade ideal} - \text{umidade do resíduo})}{1 - \text{umidade ideal}} \quad (1)$$

Após o preparo do meio de Mandels, os resíduos foram umedecidos com a quantidade de água calculada através da Equação 1. Os resíduos já umedecidos foram dispostos em Erlenmeyer de 1000mL e esterilizados em autoclave por 15 minutos e temperatura de 120°C. Após a autoclave, os Erlenmeyer com os meios de cultivo foram deixados em temperatura ambiente para resfriar.

Com os meios de cultivo já resfriados, foi feita a inoculação com os esporos previamente suspensos. O volume de suspensão de esporos adicionado aos meios de fermentação foi ajustado de modo a ter-se uma concentração de 10<sup>6</sup> esporos por grama de substrato sólido. Foi necessário homogeneizá-los bem para um crescimento uniforme do fungo. A umidade inicial utilizada nos cultivos foi de 50% e a temperatura ambiente, em torno de 27°C. Todos os cultivos foram realizados em duplicata.

A cada 24h de cultivo, inclusive a 0h, foi retirada uma amostra de aproximadamente 3 gramas de cada cultivo, para análise do pH, umidade e atividade enzimática. A extração do complexo enzimático foi realizada adicionando-se 11



mL/grama de solução salina 0,9% (pH 4,5) em temperatura ambiente. Após adição do tampão as amostras foram homogeneizadas e deixadas em repouso por 30 minutos. Depois foram filtradas, usando papel de filtro qualitativo. O filtrado foi estocado em microtubos e congeladas para posterior análise de atividade de CMCase.

### **Atividade enzimática**

Para a análise da atividade enzimática CMCase, que representa a dosagem de endoglucanases, seguiu-se o protocolo da reação enzimática utilizando carboximetilcelulose (CMC) como substrato. Foi preciso, primeiramente preparar solução de DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) e da sua curva padrão de glicose.

Para o preparo da solução DNS, foi necessário adicionar 50mL de NaOH 2N a 2,5g de DNS e aproximadamente 125mL de água destilada e agitar até a total dissolução. Depois, foram adicionados 75 g do sal de Rochelle e o volume foi completado para 250mL. Esse reagente foi guardado ao abrigo da luz..

Para elaboração da curva padrão de glicose, o seguinte procedimento foi utilizado: pesou-se 0,36g de glicose e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água destilada, homogeneizando vigorosamente. Em seguida, transferiu-se 0,5; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5 e 9,0 mL da solução-mãe para tubos de ensaio e completou-se o volume de cada tubo para 10mL, com água destilada. Após isso, 0,5 mL de cada tubo foram transferidos para novos tubos de ensaio, que já continham 0,5 mL de solução DNS (em duplicata). Esses novos tubos foram aquecidos em banho-maria a 100°C por 5 minutos e depois esfriados em banho de gelo até a temperatura ambiente. Finalmente, 6,5mL de água destilada foram adicionados a cada tubo de ensaio e eles foram homogeneizados (Figura 3). A leitura foi realizada a 540nm, em espectrofotômetro. O branco foi feito com 0,5 mL de água destilada e 0,5 mL de solução DNS.

A atividade carboximetilcelulase (CMCase) foi determinada de acordo com a metodologia padrão descrita por Ghose (24). O método se baseia na dosagem da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação do substrato carboximetilcelulose (CMC).

O meio reacional foi formado por 0,25 mL de uma solução de CMC 4 % g/L em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e 0,25 mL do sobrenadante das culturas (extrato enzimático). A mistura reacional foi incubada a 50 °C, durante 10 minutos. A reação enzimática foi interrompida pela adição imediata de 0,5 mL de DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico). O reagente DNS, além de interromper a reação enzimática, possibilita a

realização da dosagem da concentração de açúcares redutores produzidos pela ação enzimática, obtida após fervura por 5 minutos a 100 °C. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540nm, após diluição com 6,5mL de água destilada.

O valor da atividade enzimática CMC<sub>Case</sub> pôde então, ser calculado através da Equação 2:

$$\text{CMCase (U/mL)} = \frac{(A-B)*f*d*0,5}{0,18*10*0,25} (2)$$

Onde:

A = Absorbância da amostra;

B = Absorbância do controle da amostra;

f = Fator de conversão da curva de calibração (mg/mL);

d = Diluição da amostra (mL/g)

0,5 = Volume total do meio de reação (mL);

0,18 = Fator de conversão de mg para µmol de glicose;

10 = Tempo de reação (min);

0,25 = Volume da enzima no meio de reação (mL).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

A caracterização físico-química dos resíduos secos e triturados (folhas e pseudocaule de bananeira, casca e coroa de abacaxi), utilizados como meio na produção de enzimas por cultivo semissólido está apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1** – Valores dos parâmetros para os diferentes resíduos

PARÂMETROS ANALISADOS	UNIDADE	FOLHAS	PSEUDOCAULE	CASCA	COROA
Umidade	%	7,30	6,86	11,01	8,42
pH	-	7,04	8,02	4,29	4,93
Densidade aparente	g/mL	0,044	0,064	0,100	0,059
Teor de sólidos solúveis	°Brix	0,78	1,98	5,5	3,25

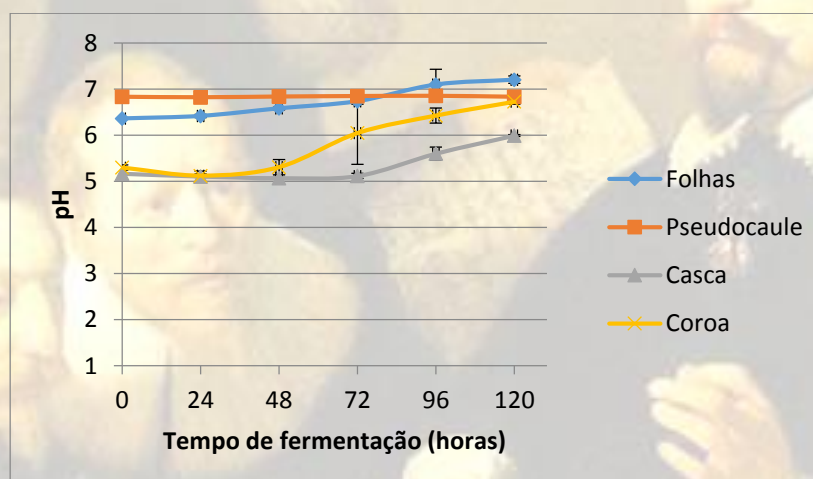
Os teores de umidade encontrados para os resíduos, após a secagem, mostram que eles podem ser armazenados na temperatura ambiente. Assim, todos os experimentos puderam ser realizados com o mesmo resíduo, evitando variações de composição inerentes as diferentes safras.



O pH das folhas de bananeira é próximo a neutralidade e o pseudocaule tem um pH básico, o que para o crescimento de fungos não é favorável. Mas, por outro lado, o pH dos resíduos de abacaxi é ácido, o que favorece o desenvolvimento de fungos no meio de cultivo.

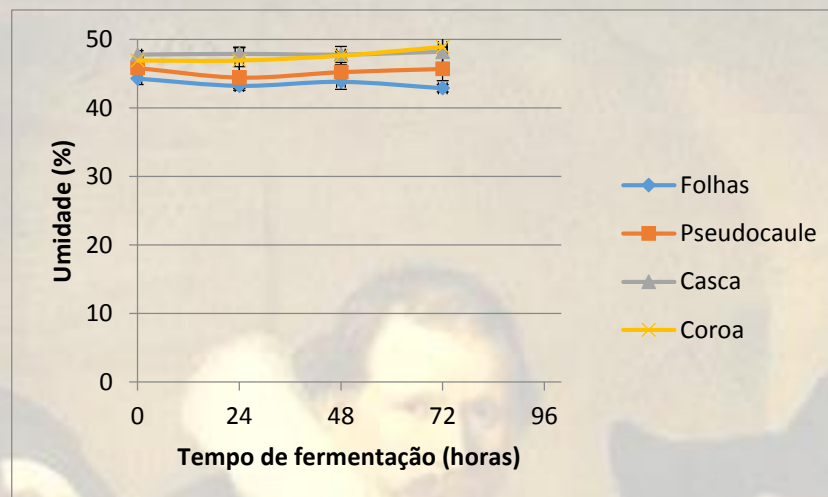
A densidade aparente de todos os resíduos é bem pequena, o que implica na utilização de uma massa de meio menor, para um volume de 1000 mL. Já o teor de sólidos solúveis mostra que a casca e a coroa de abacaxi possuem uma maior quantidade de açúcares que as folhas e o pseudocaule de bananeira.

Uma comparação entre os oito cultivos e seus diferentes valores de pH e umidade estão relacionados nas Figuras 1 e 2. Os gráficos estão representados pelas médias de pH e umidade para cada resíduo, já que os ensaios foram realizados em duplicata.



**Figura 1** – Comparação entre os valores de pH para os diferentes cultivos.

A partir deste gráfico é possível perceber que os valores de pH para o cultivo utilizando o pseudocaule de bananeira permaneceram praticamente constantes, entre 6,7 e 6,9, evidenciando que não houve crescimento do fungo. No cultivo utilizando as folhas de bananeira, o pH variou de 6,4 até 7,3. Para os dois resíduos de abacaxi, observa-se que houve uma variação do pH de 5 até 6 para a casca e de 5,1 até 6,7 para a coroa. Isso comprova que houve crescimento do microrganismo nesses ensaios fermentativos.



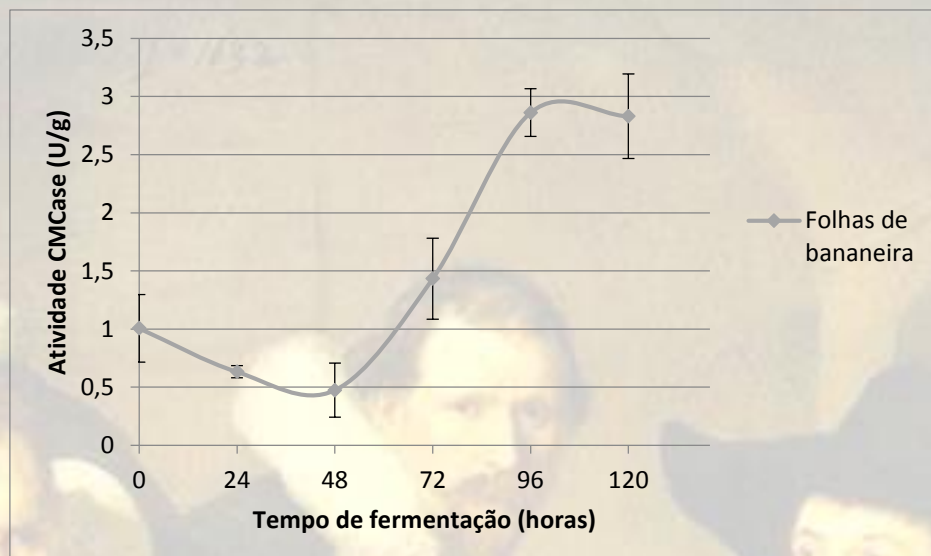
**Figura 2** – Comparação entre os valores de umidade para os diferentes cultivos.

A previsão era que os cultivos fossem realizados com 50%. Todos os cultivos estiveram na faixa 42-49%, próximo aos valores previstos, mas com valores menores. Isto pode ter ocorrido devido à perda de umidades dos meios durante o processo de esterilização. Não houve variação da umidade dos meios durante os cinco dias de cultivo.

A umidade é um fator crítico para o crescimento de fungos em substrato sólido. Como a quantidade de água é sempre limitada, o controle do nível de umidade é essencial para a otimização do processo em estado sólido. O teor de água adequada para o substrato deve permitir a formação de um filme de água na superfície, para facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e oxigênio. Entretanto, os espaços entre as partículas devem permanecer livres para permitir a difusão de oxigênio e a dissipação de calor.

Na Figura 3, é apresentado o resultado de atividade celulolítica CMCcase em função do tempo de fermentação, para o cultivo realizado com a folha de bananeira (50%) e farelo de trigo (50%). As atividades estão expressas em unidade de atividade enzimática (U) por grama de substrato (g). Os pontos representam a média das repetições (os experimentos foram realizados em duplicata).





**Figura 3** – Atividade CMCCase produzida pelo fungo *T. reesei* em função do tempo.

Na Figura 3, se observa que a máxima atividade (2,86 U/g) foi obtida após 96 horas de fermentação na temperatura de 27°C. Ainda assim, esses resultados encontrados sugerem que a proporção de resíduos e as condições do meio utilizados não foram as ideais, pois os valores de atividade CMCCase encontrados foram baixos em relação aos valores citados na literatura.

Delabona *et al.* (23) avaliaram a produção de celulases por *Trichoderma polysporum* em diversos substratos e obtiveram valores de atividade CMCCase de 75,0 U/g ao final de 192 horas de fermentação, para cultivo realizado com bagaço de cana e farelo de milho a 60% de umidade, e 62,5 U/g utilizando apenas farelo de trigo a 40% de umidade. Quando avaliaram a produção de celulases por *Trichoderma harzianum*, obtiveram valores de 72,2 U/g e 65,8 U/g para cultivos realizados com bagaço de cana e farelo de milho e apenas farelo de milho, respectivamente, a 192 horas de fermentação.

Xia e Cen (24) obtiveram 128 U/g de CMCCase a 148 horas de fermentação em condições otimizadas de umidade e meio suplementar utilizando fermentação em estado sólido no substrato farelo de trigo com 70% de umidade pelo fungo *Trichoderma reesei*, considerado um dos melhores fungos celulolíticos. Os resultados demonstram a influência da utilização das diferentes fontes de carbono e nitrogênio, bem como o comportamento dos microrganismos frente às diferentes condições oferecidas.

Para os cultivos realizados com o pseudocaule de bananeira e farelo de trigo, observou-se que não houve crescimento do microrganismo após 96h de cultivo.

Para os cultivos realizados com resíduos de abacaxi, que compreendem a coroa (50%) + farelo de trigo (50%) e a casca (50%)+ farelo de trigo (50%), observou-se que o *Trichoderma reesei* cresceu bem durante as 120 horas de cultivo, no entanto não houve atividade de CMC<sub>ase</sub>. Um dos prováveis motivos da não produção da atividade de CMC<sub>ase</sub> pode ser justificado pelos valores do teor de sólidos solúveis (°Brix) que foram de 3 para coroa e 5 para casca, o que leva a acreditar na presença de glicose nestes resíduos. A produção de CMC<sub>ase</sub> sofre repressão catabólica quando a glicose está presente no meio. Assim, o microrganismo cresce, usando a glicose presente no meio, mas não produz a enzima de interesse. Logo, os resíduos de abacaxi não são, desta forma, bons indutores da atividade de CMC<sub>ase</sub>.

Os resultados deste estudo evidenciaram que a produção de celulases depende do tipo de substrato e que o uso de um método distinto torna difícil a comparação com os resultados obtidos por diferentes autores.

### CONCLUSÕES

Os resultados apresentados mostram o potencial do cultivo semissólido para produção das enzimas celulolíticas utilizando os resíduos de banana e farelo de trigo como substratos indutores.

Para o cultivo utilizando folhas de bananeira e farelo de trigo como substrato, o maior valor de atividade enzimática CMC<sub>ase</sub> foi alcançado a 96h, com 2,86 U/g. Para aumentar estes valores de produção de atividade de CMC<sub>ase</sub> é necessária avaliar combinação dos resíduos em diferentes condições de umidade, temperatura e concentração de inóculo.

Para os cultivos realizados com os resíduos de abacaxi não houve produção das enzimas de interesse. Para evitar o problema de repressão catabólica, possível motivo da não produção de atividade de CMC<sub>ase</sub>, uma alternativa seria a lavagem dos resíduos até °Brix zero.

A fermentação em estado semissólido é uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para a reutilização dos resíduos gerados, diminuindo passivos ambientais, bem como a valorização econômica desses rejeitos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mussatto SI, Fernandes M, Milagres AMM. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. *Ciência Hoje*. São Paulo. 2007; 41(242): 28-33. Disponível em:



- <<http://cienciahoje.uol.com.br/revista-ch/revista-ch-2007/242/enzimas-poderosa-ferramenta-na-industria>>.
2. Murugan S, Arnold D, Pongiya UD, Narayanan PM. Production of Xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 Using Saw Dust As Substrate under Solid State Fermentation. *Enzyme Research*. 2011. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/er/2011/696942/cta/>.
  3. Alvira P, Tomás-Pejó M, Ballesteros M. & Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*. 2007; 101: 4851-61. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409015983>>.
  4. Costa JAV, Colla E, Magagnin G, Santos L, Bertolin T. Simultaneous amyloglucosidase and exo-polygalacturonase production by *Aspergillus niger* using Solid-state Fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2008; 50(5) 759-66. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132007000500003>>.
  5. Sanchés C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 2009; 27: 185-194. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975008001092>>.
  6. Albagli S. Da biodiversidade à biotecnologia: a nova fronteira da informação. *Ciência da Informação, Brasília*. 1998; 27(1). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-19651998000100002>>.
  7. Carvalho VG. Comunidades de fungos em solo do cerrado sob vegetação nativa e sob cultivo de soja e algodão. [Dissertação]. Programa de Pós-graduação em Microbiologia agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras; 2008.
  8. Soares IA, Flores AC, Zanettin L, Pin HK, Mendonça MM, BARCELOS RP, et al. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2010; 30(3): 700-705. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000300021>>.
  9. Stroparo EC, Beitel SM, Resende JTV de, Knob A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciências Agrárias*. 2012; 33(6): 2267-2278. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n6p2267>>.
  10. Almeida M. Indução de celulases e xilanase por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variable* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos. [Dissertação]. Universidade Federal de Santa Catarina; 2012.
  11. Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 2000; 18: 355-383. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975000000410>>.
  12. Sjöström E. Wood chemistry: fundamentals and application. 2ª edição. Londres: Academic Press; 1993.
  13. Haichar FZ, Achouak W, Christen R, Heulin T, Marol C, Marais MF, et al. Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing. *Environmental Microbiology*. 2007; 9(3): 625-634. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17298363>>.
  14. De Castro AM, Júnior NP. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*. 2010; 33(1): 181-188. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000100031>>.
  15. Couto SR, Sanromán MA. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*. 2005; 22: 211-219. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X04002530>>.

16. Hölker U, Lenz J. Solid – state fermentation – are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*. 2005; 8: 301-306. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527405000457>>.
17. Dos Santos G. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori*. [Dissertação]. Ponta Grossa: Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2006.
18. Kalogeris E, Christakopoulos P, Katapodis P, Alexiou A, Vlachou S, Kekis D, et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural waste. *Process Biochemistry*. 2003; 38: 1099-1104. Disponível em; <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003295920200242X>.
19. CEPA – Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola, Epagri, Governo do Estado de Santa Catarina. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina; 2005-2006.
20. Leite GA, Erika VM, Mendonça V, Moraes PLD, Lima LM, Xavier IF. Qualidade pós-colheita da banana ‘pacovan’ comercializada em diferentes estabelecimentos no município de Mossoró-RN. *Revista Brasileira de Ciências*. 2010; 5(3): 322-27. Disponível em: <[http://www.agraria.pro.br/sistema/index.php?journal=agraria&page=article&op=viewArticle&path%5B%5D=agraria\\_v5i3a614](http://www.agraria.pro.br/sistema/index.php?journal=agraria&page=article&op=viewArticle&path%5B%5D=agraria_v5i3a614)>.
21. Governo da Paraíba, Produtores da Paraíba investem na produção de abacaxi mesmo no período de estiagem. Disponível em: <<http://www.paraiba.pb.gov.br/91509/produtores-da-paraiba-investem-na-producao-de-abacaxi-mesmo-no-periodo-de-estiagem.html>>. Acesso em: 24 de outubro de 2014.
22. Franco APB, Paz FHC, Vieites RL, Evangelista RM. Conservação do abacaxi minimamente processado e irradiado. *Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*. 2001; 26(2). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5380/cep.v26i2.13281>>.
23. Mandels M. & Weber J. Production of cellulases. *Advances in Chemistry Series*, 95: 391-414, 1969.
24. Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem*. 1987; 59(2): 257-268. Disponível em: <<http://pac.iupac.org/publications/pac/pdf/1987/pdf/5902x0257.pdf>>.
25. Delabona PS, Pirota RDPB, Pinto GAS, Farinas CS. Produção de celulasas e xilanases pro duas linhagens de *Trichoderma* visando a aplicação na produção de etanol celulósico. *Congresso Internacional de Bioenergia, Congresso Brasileiro de Geração distribuída e Energias renováveis*, 2009. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/428142>>.
26. Xia L, Cen P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochemistry*. 1989; 34(9): 909-912. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959299000151>>.