

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO: APLICAÇÕES DO MATERIAL HIDROLISADO

C. A. Senna¹, A. F. V. Comunuello¹, M. V. Cruz¹, M. R. Chaves¹, L. Kupski¹, E. Badiale-Furlong¹

1- Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil,
Telefone: 55 (53) 99179-0502 – e-mail: (carolalmeidasenna@gmail.com)

RESUMO: Materiais lignocelulósicos, como o farelo de arroz desengordurado (FAD) possuem celulose, hemicelulose e lignina, dificultando a biodisponibilidade de nutrientes, tais como proteínas, carboidratos e compostos bioativos que apresentam potencial para aplicações na indústria de alimentos. A hidrólise enzimática com celulasas é uma estratégia que pode contribuir para liberação de açúcares fermentescíveis e proteínas solúveis. Neste estudo, foram testados diferentes parâmetros de temperatura, tempo e relação enzima:substrato para otimizar a hidrólise do FAD, indicada pela liberação de açúcares redutores e recuperação de proteínas solúveis. A melhor combinação de parâmetros para liberação de açúcares aplicáveis em bebidas fermentadas foi: 58,4 °C, E:S de 1:10 (mL g) e 93,6 min. Os melhores parâmetros para maior recuperação proteica foram 41,6 °C, E:S de 1:10 e 60 min. Esses resultados confirmam que a hidrólise enzimática da matriz lignocelulósica é uma alternativa para agregar valor ao FAD, ampliando seu uso na indústria alimentícia.

ABSTRACT: Lignocellulosic materials, such as defatted rice bran (DRB), contain cellulose, hemicellulose, and lignin, which hinder the bioavailability of nutrients such as proteins, carbohydrates, and bioactive compounds with potential applications in the food industry. Enzymatic hydrolysis with cellulases is a strategy that can contribute to the release of fermentable sugars and soluble proteins. In this study, different parameters of temperature, time, and enzyme-to-substrate ratio were tested to optimize DRB hydrolysis, as indicated by the release of reducing sugars and the recovery of soluble proteins. The best combination of parameters for the release of sugars applicable in fermented beverages was 58.4 °C, an E:S ratio of 1:10 (mL g), and 93.6 min. The optimal parameters for higher protein recovery were 41.6 °C, an E:S ratio of 1:10, and 60 min. These results confirm that the enzymatic hydrolysis of the lignocellulosic matrix is a viable alternative to adding value to DRB, expanding its use in the food industry.

PALAVRAS-CHAVE: açúcares redutores; bebidas fermentadas; celulase; farelo de arroz desengordurado; proteína solúvel.

KEYWORDS: reducing sugars; fermented beverages; cellulase; defatted rice bran; soluble protein.

1. INTRODUÇÃO

Materiais lignocelulósicos são constituídos por três componentes: celulose, hemicelulose e lignina, que formam a parede celular dos vegetais e dificultam a biodisponibilidade de alguns macros e micronutrientes da matriz (Brethauer *et al.* 2020). Em geral, estes componentes são abundantes nos tecidos de proteção de vegetais, onde atuam como barreira física. A associação do material



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

lignocelulósico com proteínas, carboidratos, lipídios e outros, dificulta a absorção de água, a formação de gel, a digestibilidade de nutrientes, a atividade antioxidante por reduzir a interação das matrizes alimentares com água, solventes e enzimas digestivas (Reyes *et al.* 1998) limitando sua aplicação. Dentre os materiais lignocelulósicos que desafiam a indústria alimentícia esta o farelo de arroz que em sua composição possui cerca de 50% de carboidratos, 20% de lipídios, 15% de proteínas, além de vitaminas, minerais e compostos funcionais (Sharma *et al.* 2015).

Os compostos bioativos auxiliam na redução do risco de doenças cardíacas, colesterol e melhoram a sensibilidade à insulina (Truswell 2002). No entanto, seu potencial nutricional e aplicações tecnológicas são limitadas para emprego na alimentação humana, em função dos teores de lignocelulose que dificultam a recuperação destes compostos para aplicação industrial e reduzem a acessibilidade no processo digestivo.

A hidrólise enzimática com celulasas é um processo no qual essas enzimas hidrolíticas quebram a celulose em açúcares menores, principalmente oligossacarídeos, celobiose e glicose. A celobiose pode ser convertida em glicose livre, facilitando sua utilização em processos fermentativos (Lynd *et al.* 2002), além disso, a degradação da parede celular vegetal permite melhor acesso às proteínas livres nas células ou associadas à matriz fibrosa (Gomes e Santana, 2019).

Neste estudo buscou-se determinar parâmetros para a hidrólise lignocelulósica do farelo de arroz desengordurado que tornassem mais disponíveis açúcares fermentecíveis e proteína, visando contribuir com mais uma alternativa para consolidar a sustentabilidade da cadeia produtiva de arroz.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

O farelo de arroz desengordurado (FAD) com partículas menores que 0,149 mm foi cedido por uma empresa da região sul do Brasil. O mix de enzimas do complexo celulolítico comercial Cellic[®] CTec2 foi obtido da Novozymes[®]. O complexo possui uma blenda de celulasas, β -glicosidases e hemicelulase, com atividade específica de 0,3 U/mL. O padrão de albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*) foi obtido da Sigma-Aldrich[®]. Todos os reagentes utilizados para as análises e determinações foram de grau analítico.

2.2 Métodos

2.2.1 Atividade enzimática do complexo celulolítico

A avaliação da atividade específica da celulase foi conduzida conforme método proposto por Ghose (1987), pela quantificação dos açúcares redutores liberados em mistura reacional do extrato

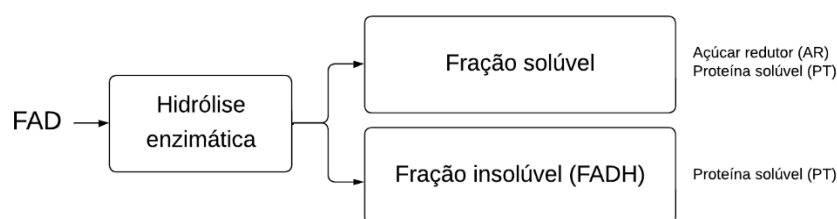


enzimático bruto e 50 mg de papel filtro Whatman® em condições de temperatura, pH e tempo otimizadas anteriormente. Os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método do 3,5-DNS proposto por Miller (1959), estimando por curva padrão de glicose. Para uso no planejamento da hidrólise enzimática, foi padronizada atividade enzimática de 1 U/mL.

2.2.2 Hidrólise enzimática

Na Figura 1 está apresentando o diagrama do desenvolvimento experimental do estudo.

Figura 1 – Diagrama experimental do estudo de hidrólise celulolítica do FAD



A hidrólise enzimática avaliou diferentes condições de temperatura, relação enzima:substrato (E:S) e tempo utilizadas, a partir de um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³ com 17 ensaios (3 pontos centrais e com pontos axiais), tendo o FAD como substrato (Tabela 1).

Tabela 1 – Níveis codificados e reais das variáveis independentes

Variável	Código	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	x1	41,6	45	50	55	58,4
E:S (mL g)	x2	1:30	1:15	1:10	1:6,5	1:5
Tempo (min)	x3	26,3	40	60	80	93,6

x1: temperatura (°C); x2: relação enzima:substrato e x3 tempo (min).

Nos tubos reatores eram adicionados 5 g de FAD, 30 mL de tampão citrato de sódio (pH 3,8) e as proporções de enzima conforme descrito na Tabela 1. Os reatores foram homogeneizados em agitador orbital a 200 rpm em temperatura e tempo conforme Tabela 1. Os hidrolisados foram centrifugados a 1452 ×g rpm a 4 °C por 10 min. Na fração solúvel foram determinadas os açúcares redutores e as proteínas solúveis e a fração insolúvel foi seca em estufa a 50 °C para obtenção do farelo de arroz desengordurado hidrolisado (FADH). As respostas do planejamento foram teores de açúcares redutores (Miller, 1959) estimados em curva padrão de glicose (0,01 a 0,08 mg por mL) e de proteína solúvel na fração solúvel do hidrolisado e no FADH (Lowry *et al.* 1951) estimado em curva padrão albumina (0,015 a 0,2 mg de albumina por mL).



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Hidrólise enzimática

No Quadro 1 estão os efeitos dos parâmetros reacionais (açúcares redutores e proteína solúvel no material solúvel) durante a hidrólise celulolítica.

Quadro 1 – Efeito dos parâmetros reacionais durante a hidrólise celulolítica de FAD

Ensaio	Temperatura (°C)	E:S (mL g)	Tempo (min)	AR (mg glic/g FAD)	PT (mg PT/g FAD)
1	45 (-1)	1:15 (-1)	40 (-1)	27,8	34,3
2	55 (1)	1:15 (-1)	40 (-1)	33,3	19,5
3	45 (-1)	1:6,5 (1)	40 (-1)	22,8	37,4
4	55 (1)	1:6,5 (1)	40 (-1)	33,1	19,6
5	45 (-1)	1:15 (-1)	80 (+1)	29,7	35,7
6	55 (1)	1:15 (-1)	80 (+1)	37,2	20,8
7	45 (-1)	1:6,5 (1)	80 (+1)	26,1	35,0
8	55 (1)	1:6,5 (1)	80 (+1)	37,0	15,0
9	41,6 (-1,68)	1:10 (0)	60 (0)	22,3	1,7
10	58,4 (+1,68)	1:10 (0)	60 (0)	39,5	36,8
11	50 (0)	1:30 (-1,68)	60 (0)	32,3	36,9
12	50 (0)	1:5 (+1,68)	60 (0)	32,2	31,0
13	50 (0)	1:10 (0)	26,3 (-1,68)	28,1	31,2
14	50 (0)	1:10 (0)	93,6 (+1,68)	39,9	18,9
15	50 (0)	1:10 (0)	60 (0)	32,5	17,0
16	50 (0)	1:10 (0)	60 (0)	32,3	17,6
17	50 (0)	1:10 (0)	60 (0)	32,1	17,3

AR: açúcares redutores; PT: proteína solúvel.

O valor de mg de glicose liberada por g de FAD variou de 22,3 a 39,9. As variáveis temperatura (°C) (Q e L), relação E:S (L e Q), tempo (L) e relação E:S (Q e L) foram significativas a um nível de 10%. O coeficiente de determinação para a resposta foi igual a 85,9% e o p-valor = 0,00014. O teste F foi significativo, sendo o modelo adequado para descrever os resultados. A liberação de glicose comportou-se segundo um modelo de segunda ordem. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados aos resíduos. A equação preditiva, sendo y a resposta em mg de glicose por g de FAD, x_1 = temperatura e x_2 = E:S e x_3 = tempo, pode ser descrita conforme Equação 1:

$$y = 32,7 + 4,6x_1 - 0,9x_1^2 - 0,6x_2 - 0,4x_2^2 + 2,4x_3 + 1,0x_1x_2 + 0,3x_1x_3$$

Os valores dos parâmetros ótimos para a hidrólise celulolítica estimados a partir da superfície de resposta foram: temperatura 58,4°C; E:S 1:10 (mL g) e tempo 93,6 min. O conteúdo de glicose obtido nestas condições torna o hidrolisado um insumo interessante para obtenção de bebidas



fermentadas. O valor de mg de proteína solúvel por g de FAD variou de 1,7 a 37,4, no entanto, o modelo não era significativo ($R^2 = 0,3020$). As respostas apresentadas dos produtos quantificados no quadro 1 mostram que existem dois extremos quando se avalia a quantidade de proteína solúvel, reforçando que as variáveis independentes (temperatura, E:S e tempo) influenciam diretamente a quantidade de proteína solúvel e na possível aplicação do material hidrolisado.

3.2 Potencial proteico no FADH

Considerando que o FADH pode ser uma fonte importante de proteína vegetal hipoalergênica (Leal *et al.* 2021) os precipitados dos experimentos 3 e 9 (maior e menor teor proteico no hidrolisado) foram avaliados quanto ao seu conteúdo de proteína solúvel que permaneceu junto do material lignocelulósico (Tabela 2), visando inferir sobre seu potencial para obtenção de concentrado proteico por solubilização alcalina e precipitação isoelétrica.

Tabela 2 – Quantificação de proteína solúvel no FADH

Ensaio	Temperatura (°C)	E:S (mL g)	Tempo (min)	PT (mg PT solúvel/g farelo)
FAD				1,4
3	45 (-1)	1:6,5 (1)	40 (-1)	10,7 ^b
9	41,6 (-1,68)	1:10 (0)	60 (0)	16,0 ^a

FAD: amostra sem tratamento; PT: proteína solúvel; letras subscritas na mesma coluna indicam diferenças entre as amostras ($p < 0,05$).

Fica demonstrado que no caso do experimento 9 o potencial proteico para obtenção de concentrado é maior, cabendo destacar que nesta condição, embora o conteúdo de açúcares redutores na porção solúvel do hidrolisado tenha sido menor, ainda assim fração solúvel é interessante como substrato para processos fermentativos.

4. CONCLUSÃO

O uso de enzima celulolítica contribui para melhor aproveitamento do potencial nutricional e tecnológico do farelo de arroz desengordurado, que pode ser adequado para aumentar a disponibilidade de açúcares redutores para bebidas fermentadas e com teor interessante de proteínas. A combinação dos parâmetros 58,4 °C, 1:10 (mL g) e 93,6 min, favorece a liberação de açúcares no hidrolisado. A combinação de parâmetros 41,6 °C, 1:10 (mL g) e 60 min, resulta num maior teor de proteína solúvel no resíduo lignocelulósico do hidrolisado, aplicável a obtenção de concentrado proteico.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BRETHAUER, S., SHAHAB, R. L., STUDER, M. H. Impacts of biofilms on the conversion of cellulose. **Applied Microbiology Biotechnology**, n. 104, p. 5201–5212, 2020.

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

GOMES, D. J. V., SANTANA, M. H. A. Production, properties, and application of cellulases in the hydrolysis of agro-industrial residues. **Química Nova**, v. 42, n. 5, p.476-488, 2019.

HATAMI, S., TAJABADI, N., MASSOUD, R., SHARIFAN, A. Chemical and sensorial properties of probiotic beverage based on rice bran extract and honey. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2021.

LEAL, F. H. P. N., SENNA, C.A., KUPSKI, L., MENDES, G. R. L., BADIALE-FURLONG, E. Enzymatic and extrusion pretreatments of defatted rice bran to improve functional properties of protein concentrates. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 11, p. 5445–5451, 2021.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 265-275, 1951.

MILLER, G. L. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

REYES, J., PERALTA-ZAMORA, P., DURAN, N. Enzymatic hydrolysis of rice hull using cellulases: Effect of chemical and photochemical treatments. **Química Nova**, v. 2, n.1, p. 140-143, 1998.

SHARMA, R., SRIVASTAVA, T., SAXENA, D. C. Studies on Rice Bran and its benefits - A Review. **Journal of Engineering Research and Applications**, v. 5, n. 52, p. 107–112, 2015.

TRUSWELL, A. S. Cereal grains and coronary heart disease. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 1-14, 2002.