



Influência das condições de cultivo na Produção de Endoglucanase por *Trichoderma* spp em Fermentação em Estado Sólido com bagaço de cana-de-açúcar.

Camila Florencio^{1,2}, Gustavo Adolfo Saavedra Pinto³, Cristiane Sanchez Farinas^{1,2}

¹Embrapa Instrumentação – Laboratório de Agroenergia – 13560-970 São Carlos – SP – E-mail: camila.florencio@gmail.com

²Universidade Federal de São Carlos – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – 13565 – 905 São Carlos – SP

³ Embrapa Agroindústria Tropical – Laboratório de Bioprocessos - 60511-110 – Fortaleza - CE

RESUMO

Os fungos filamentosos da espécie Trichoderma são os microrganismos mais utilizados industrialmente para a produção das enzimas do complexo celulolítico, utilizadas no processo de conversão da biomassa vegetal em biocombustíveis. Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência das condições de cultivo da fermentação em estado sólido (FES) na produção de celulases, utilizando linhagens de Trichoderma e bagaço de cana-de-açúcar (BC) como substrato, suplementado com farelo de trigo (FT). O estudo cinético determinou o tempo máximo de produção de endoglucanase (EGase) em 192h de FES com as linhagens de Trichoderma estudadas, a metodologia do planejamento experimental apresentou como variável significativa a proporção de BC e a produção de EGase foi de 4,75 UI.g⁻¹. A seleção das condições da FES teve como resultado volume do inóculo a 10⁷ esporos.g⁻¹, proporção BC:FT de 1:1 e umidade inicial do substrato 75%, resultando em um aumento de 2,3 vezes na produção de EGase.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido, Bagaço de cana, Planejamento experimental, *Trichoderma*, Celulases, Microrganismos.

INTRODUÇÃO

O Brasil, além de ser um dos maiores produtores agrícolas mundiais, vem tornando-se nos últimos anos, uma grande potência no beneficiamento de sua produção. Esse avanço do setor agroindustrial acarretou no aumento da geração de resíduos ou subprodutos. Estima-se que somente a indústria de açúcar e álcool gera cerca de 168,8 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar por ano, parte do qual é queimado de forma ineficiente em usinas para cogeração de energia. Apesar disso, existe um excedente de 12-50% disponível para conversão em etanol celulósico (CONAB, 2010). A rota enzimática tem se apresentado como uma tecnologia vantajosa para a conversão da celulose em açúcares fermentescíveis, posteriormente utilizados na produção de etanol e outros bioprodutos. Entre os desafios para que o etanol celulósico seja comercializado, pode-se citar o alto custo das enzimas celulases. O desenvolvimento de processos eficientes e otimizados para a produção de enzimas em escala industrial é fundamental para garantir a viabilidade econômica e a concretização da produção de etanol de segunda geração (FARINAS et al., 2010).

Na produção de celulases microbianas, podem ser usados processos de fermentação submersa (FSm) ou a fermentação em estado sólido (FES). Grande parte

dos avanços na produção de enzimas microbianas foi desenvolvida para FSm, no entanto, o crescimento de fungos filamentosos ocorre naturalmente em condições similares à FES (SINGHANIA et al., 2009). A escolha das melhores condições de cultivo é tão essencial para o processo fermentativo quanto à escolha do microrganismo. A produção otimizada e os parâmetros que afetam a síntese enzimática devem ser investigados, pois as condições ótimas variam entre os diferentes microrganismos, assim como para diferentes enzimas (BRAVO et al., 2000).

O fungo filamentoso *Trichoderma reesei* está entre os microrganismos com maiores potenciais para a produção de celulasas, além de ser o mais detalhadamente estudado. Existem vários trabalhos relacionados à produção de celulasas utilizando diversos resíduos agroindustriais por *Trichoderma*, especialmente o mutante *T. reesei* Rut C30 (SUN et al., 2010). Porém, são poucos os trabalhos que estudam esse gênero de fungo filamentoso com o substrato bagaço de cana-de-açúcar (BC). A utilização desse resíduo se torna interessante, pois além das vantagens ambiental e econômica, seu uso permite a produção de enzimas específicas para a degradação do BC.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência das condições de cultivo da FES na produção de celulasas, utilizando fungos do gênero *Trichoderma* e bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Para isto, foi utilizada a metodologia de planejamento experimental e análise da superfície de resposta. Foram utilizados delineamentos experimentais do tipo fatorial completo, em que as variáveis estudadas foram: volume do inóculo, proporção entre BC e farelo de trigo (FT) e umidade inicial do substrato, e delineamento composto central rotacional (DCCR), que estudou a proporção entre BC e FT e umidade inicial do substrato.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos

Os testes foram realizados com as linhagens *Trichoderma* sp LCB 46 e *Trichoderma* sp LCB 79 doadas pela Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, CE). As duas linhagens foram pré-selecionadas pelo teste do halo de hidrólise com o substrato carboximetilcelulose (CMC) (TEATHER e WOOD, 1982). Para manutenção dos fungos utilizou-se o meio PDA (Potato Dextrose Agar) a 30°C por 10 dias.

Cinética de Produção em FES

Os ensaios deste experimento foram realizados para a determinação do tempo de cultivo, nas condições do ponto central dos delineamentos experimentais. Os experimentos iniciais de cinética foram realizados utilizando 5 g de substrato sólido, composto por 50% de BC e 50% de farelo de trigo (FT). Foi utilizado o meio nutriente descrito por Mandels e Weber (1969). A umidade inicial utilizada foi de 60% em base úmida. Utilizou-se uma concentração de 10^7 esporos.g⁻¹ e a incubação feita sob condições estáticas a 30°C em estufa. O teste cinético foi realizado durante 10 dias, com análises realizadas a cada dois dias de fermentação. Todos os experimentos deste trabalho foram realizados em duplicata.

Avaliação dos Parâmetros da FES

O delineamento fatorial 2³ completo foi utilizado para determinar o efeito das variáveis: volume do inóculo, umidade do inicial do meio e proporção de BC na produção enzimática. As variáveis e níveis são apresentados na Tabela 1. A seleção dos valores foi baseada em dados da literatura (Maciel, 2006; Mekala et al., 2008) e em

experimentos preliminares. As análises estatísticas foram conduzidas no software Statistica 7.1 (StatSoft, Tulsa, EUA).

Tabela 1. Variáveis e níveis do planejamento fatorial 2^3 completo.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Inóculo (esporos.g ⁻¹) – x1	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
Umidade (%) – x2	50	60	70
BC (%) – x3	35	50	65

Seleção das condições da FES

Um delineamento composto central rotacional de 2^2 ensaios foi realizado para se determinar a condição ótima das variáveis umidade e proporção BC:FT. Os valores experimentais foram selecionados a partir dos resultados obtidos no planejamento anterior, fixando o volume do inóculo (10⁷ esporos.g⁻¹). Os dois delineamentos foram realizados em dois experimentos independentes e em cada condição foram feitas duplicatas.

Atividade Endoglucanase (EGase)

A atividade celulolítica da EGase foi determinada de acordo com a metodologia de Ghose (1987) modificada. Adicionou-se, 0,5 mL do substrato de CMC (4%) e 0,5 mL de extrato enzimático aos tubos e incubou-se a 50 °C por 10 min. A determinação dos açúcares redutores foi realizada pelo método de DNS descrito por Miller, 1959. As atividades foram expressas em unidades internacionais por grama de substrato seco (UI.g⁻¹). Todas as quantificações enzimáticas foram realizadas em duplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinética de Produção em FES

O estudo da cinética de produção de celulasas foi realizado a fim de determinar o tempo de cultivo a ser utilizado nos experimentos de avaliação dos parâmetros da FES e no DCCR. A avaliação do tempo para a produção das EGase para as duas linhagens testadas obteve o pico de produção da enzima em 192h (8 dias), com maior produção da EGase pelo fungo filamentososo *Trichoderma* sp LCB 46 de 5,95 UI.g⁻¹ (Figura 1).

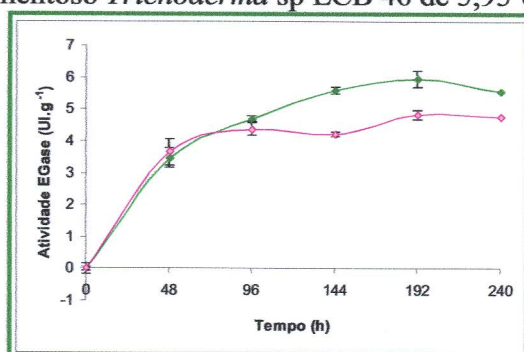


Figura 1. Cinética de Produção de EGase. (—◆—) *Trichoderma* sp LCB 46. (—◆—) *Trichoderma* sp LCB 79;

Resultados recentes, utilizando FES com BC e *Trichoderma* como microrganismo produtor, apresentaram valores para atividade enzimática de EGase muito próximos. Segundo estudos realizados por Basso et al. (2010), a produção de EGase atingiu valores iguais a 5,4 UI.g⁻¹ em 216 h.

Avaliação dos Parâmetros da FES

Os experimentos de avaliação dos parâmetros foram realizados com a linhagem *Trichoderma* sp LCB 46, selecionada no teste cinético realizado anteriormente. As variáveis estudadas foram volume do inóculo, proporção entre BC e FT e umidade inicial do substrato.

As variáveis consideradas significativas para o processo podem ser vistas na Figura 2. A proporção entre BC:FT foi a única variável considerada significativa a um nível de confiança de 95%, porém com efeito negativo quando aumentada a proporção de BC no processo. Esse fato, provavelmente se deve a menor quantidade de nitrogênio presente no BC quando comparada ao FT e ao fato de ser um resíduo com alta recalcitrância (MACIEL, 2006).

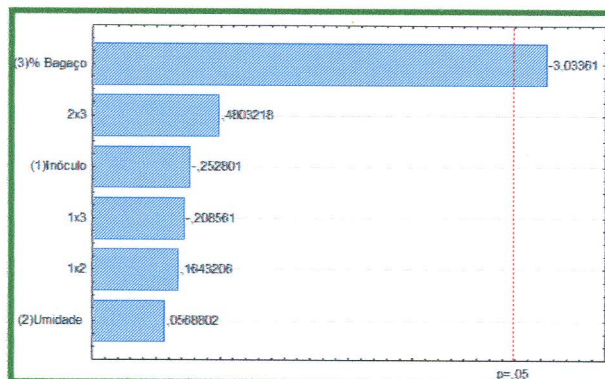


Figura 2. Diagrama de Pareto mostrando as variáveis significativas com $p \leq 0,05$.

Estudos realizados por Mekala et al., (2008), indicam que o volume usado na maioria dos trabalhos realizados com fungos *Trichoderma* é de 10^7 esporos.g⁻¹, portanto para o próximo experimento, a concentração do inóculo foi mantida constante, além de ser o valor já utilizado nos pontos centrais.

Seleção das Condições da FES

O DCCR foi realizado a partir das condições selecionadas pelo planejamento experimental realizado anteriormente. A linhagem *Trichoderma* sp LCB 46 foi utilizada e o volume do inóculo foi fixado a 10^7 esporos.g⁻¹. Na Tabela 2 são apresentados os ensaios realizados e os resultados obtidos neste delineamento. A proporção BC foi mantida a 50%, pois apesar do seu efeito negativo a produção de EGase apresentou melhor resultado nesta condição.

Tabela 2. Resultados obtidos no DCCR para a Produção de EGase (UI.g⁻¹).

Ensaio	BC (%) - x1	Umidade (%) - x2	Produção EGase (UI.g ⁻¹)
1	35 (-1)	50 (-1)	5,878
2	65 (1)	50 (-1)	7,797
3	35 (-1)	70 (1)	8,816
4	65 (1)	70 (1)	9,172
5	28 (-1,41)	60 (0)	2,702
6	72 (1,41)	60 (0)	6,660
7	50 (0)	45 (-1,41)	11,092
8	50 (0)	75 (1,41)	11,163
9	50 (0)	60 (0)	10,215
10	50 (0)	60 (0)	9,504

11 50 (0) 60 (0) 10,215

A análise de variância foi realizada para avaliar o ajuste dos dados experimentais ao modelo quadrático proposto. O teste F mostrou que o modelo utilizado se ajustou adequadamente aos dados experimentais, sendo 20,98 vezes maior que o F_{tabelado} . O coeficiente de determinação (R^2) obtido para o modelo foi 0,90. Os valores dos coeficientes de regressão mostraram, assim como o p-valor, a variável proporção BC linear e quadrático, como sendo significativa a um $p \leq 0,1$ (Tabela 3). Para este planejamento o parâmetro fermentativo, umidade, apesar de apresentar o p-valor próximo de 0,1, não se mostrou significativo.

Tabela 3. Apresentação das variáveis consideradas significativas para otimização das condições da FES, com a exclusão dos termos não significativos.

	Efeitos Estimados	Desvio Padrão	t(7)	p-valor
Média	10,521	0,403	26,129	0,000
(1) BC(L)	1,96	0,678	2,904	0,023
BC(Q)	-5,63	0,771	-7,303	0,000
(2)Umidade (L)	1,10	0,678	1,628	0,148

O modelo para atividade de EGase após a exclusão dos termos não significativos está descrito na equação quadrática abaixo.

$$\text{Atividade EGase (U.g}^{-1}\text{)} = 10,52 + 0,98(\text{BC}) - 2,81(\text{BC})^2 + 0,55(\text{Umidade})$$

A superfície de resposta foi plotada para entender a interação dos efeitos das variáveis e para identificar os níveis ótimos de cada parâmetro e assim, alcançar o rendimento máximo de EGase (Figura 3). Estudos realizados por Souza et al., (1999) e confirmados por Maciel (2006), indicam que o planejamento realizado para otimizar condições da FES, mostrou as variáveis umidade inicial e proporção BC como as mais importantes na produção de enzimas do complexo celulásico.

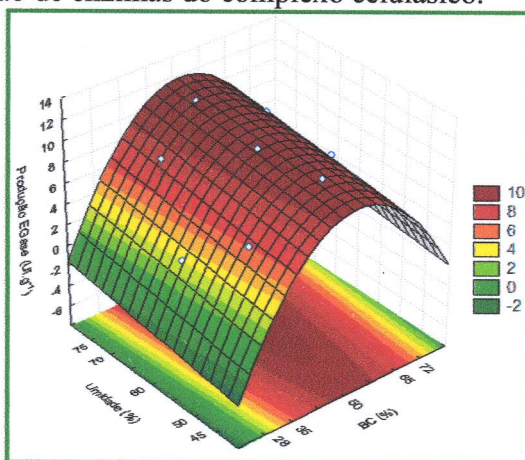


Figura 3. Superfície de Resposta para Produção EGase em relação a umidade inicial do substrato e proporção BC.

Neste experimento as condições escolhidas foram proporção BC:FT de 1:1 e umidade inicial de 75%. Os ensaios apresentaram valores para atividade da enzima EGase muito próximos aos valores exibidos pela triplicata realizada no ponto central. Sendo, o maior valor de atividade de EGase igual a $11,16 \text{ UI.g}^{-1}$, 2,3 vezes maior do que



o encontrado no primeiro planejamento realizado, em que se obteve valor igual a $4,74 \text{ UI.g}^{-1}$.

CONCLUSÕES

Os experimentos realizados para avaliar a influência dos parâmetros fermentativos na FES apresentaram resultados relevantes se comparados com a literatura. O tempo de 192h foi determinado pelo teste cinético, a avaliação dos parâmetros resultou na proporção BC como única variável considerada significativa. Para o DCCR as condições selecionadas foram volume do inóculo a 10^7 esporos. g^{-1} , proporção BC:FT de 1:1 e umidade inicial do substrato a 75%, resultando em um aumento de 2,3 vezes na produção de EGase, que passou de 4,75 para $11,16 \text{ UI.g}^{-1}$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Basso, T.P.; Gallo, CR.; Basso LC. (2010), Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. *Revista Agropecuária Brasileira*, v. 45, n.11, p. 1282-1289.
- Bravo, C.E.C.; Carvalho, E.P.; Schwan, R.F.; Gómez, R.J.H.C.; Pilon, L. (2000), Determinações de condições ideais para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. *Ciência Agrotecnológica*, v. 24, p. 137-152.
- Companhia Nacional de Abastecimento Avaliação da Safra Agrícola de cana-de-açúcar - CONAB 2010. Disponível em: <http://www.conab.gov>. Acesso: mar/2010.
- Farinas, C.S.; Martin-Neto, L.; Giordano, R.C. (2010). Instrumentação e Automação na Agroindústria da Cadeia Cana-Etanol. In: Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. Editora Blucher, São Paulo.
- Ghose, T.K. (1987), Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 257-268.
- Maciel, G.M. (2006), Desenvolvimento de Bioprocesso para Produção de Xilanases por Fermentação no Estado Sólido Utilizando Bagaço de Cana de Açúcar e Farelo De Soja. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Mandels, M., Weber, J. (1969), The production of cellulases. *Advances in Chemistry Series*, v. 95, p. 391-414.
- Mekala, N.K.; Singhanian R.R.; Sukumaran, R.K.; Pandey. A. (2008), Cellulase Production Under Solid-State Fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical Optimization of Process Parameters. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.151, p.122-131.
- Miller, G.L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. v. 31, n. 3, p. 426-428.
- Singhanian, R.R.; Patel, A.K.; Soccol, C.R.; Pandey, A. (2009), Recent advances in solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*. v. 44, n. 1, p. 13-18.
- Souza, M.C.O.; Roberto, I.C.; Milagres, A.M.F. (1999), Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.52, p.768-772.
- Sun, H.; Ge, X.; Hao, Z.; Peng, M. (2010), Cellulase production by *Trichoderma* sp. On apple pomace under solid state fermentation. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 2, p. 163-166, 2010.
- Teather, R.M.; Wood, P.J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 43, n. 4, p. 777-789, 1982.