



INAFERM 2011

XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos

Realização:



Associação Brasileira
de Engenharia Química

ISSN 2236-5184

Universidade de Caxias do Sul
Cidade Universitária - Bloco M - UCS Teatro
Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil
24 a 27 de julho de 2011

Todos os direitos reservados - Desenvolvido por Adaltech - Soluções para Eventos



Caracterização de Fungos Isolados da Floresta Amazônica quanto à Produção de Xilanases pelos Processos de Fermentação em Estado Sólido e Fermentação Submersa

Rosângela D. P. Buzon Pirota¹, Mariana Tonelotto¹, Priscila da Silva Delabona¹, Igor Polikarpov², Cristiane Sanchez Farinas³

¹Universidade Federal de São Carlos (UFSCar); Rod. Washington Luís, Km 235, 13565-905, São Carlos/SP, Brasil. E-mail: rosa_angelapirota@hotmail.com

²Universidade do Estado de São Paulo (USP); Av. Trabalhador São-carlense, 400, Arnold Schimidt, 13566-590, São Carlos/SP, Brasil. E-mail: ipolikarpov@ifsc.usp.br

³Embrapa Instrumentação; Laboratório de Agroenergia, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos/SP, Brasil. E-mail: cristiane@cnpdia.embrapa.br

RESUMO

O interesse pelas xilanases vem crescendo nas últimas décadas devido à sua aplicação na hidrólise da biomassa a fim de viabilizar a produção de etanol de segunda geração. Neste trabalho foi avaliada a produção de xilanases no cultivo de isolados de fungos do bioma Amazônico por fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm). Inicialmente, realizaram-se as cinéticas de produção de xilanases de 40 fungos cultivados em FES durante 10 dias, a 35°C, utilizando farelo de trigo com de 60% umidade. A atividade máxima de xilanase foi de 107,7 U/mL após 72 h de cultivo da linhagem P6B2. A partir desses resultados realizou-se o cultivo em FSm da linhagem selecionada utilizando o meio de Mandels suplementado com 1% de farelo de trigo, obtendo-se uma atividade máxima de 14,5 U/mL em 72 h. Os resultados obtidos demonstram o potencial dos fungos isolados da Floresta Amazônica como produtores de xilanases.

Palavras-chave: xilanases, fermentação em estado sólido, fermentação submersa, etanol celulósico, Bioma Amazônico, enzimas.

INTRODUÇÃO

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos formados por vários resíduos de açúcares pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetila. Esses açúcares estão ligados entre si, principalmente por ligações glicosídicas β -1,4, formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros compostos. A hemicelulose chega a representar em torno de 30% do peso seco da parede celular vegetal. As xilanases



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

INAFERM 2011

representam o tipo mais abundante de hemicelulose e, portanto, a sua conversão em açúcares, principalmente a xilose, para a subsequente produção de etanol ou outros bioprodutos, é essencial para se obter elevadas eficiências no processo de conversão de biomassa em energia renovável (Dodd e Cann, 2009). A diversidade e complexidade da estrutura da hemicelulose requerem uma diversidade equivalente de enzimas para a sua degradação, incluindo endo-1,4- β -xilanasas, β -D-xilosidasas, α -arabinofuranosidasas, α -glucuronidasas, acetil-xilana-esterase e feruloil-esterases (Dodd e Cann, 2009). As xilanasas vêm sendo avaliadas também como aditivos para aumentar a eficiência das celulasas na hidrólise da biomassa vegetal a fim de viabilizar a produção de etanol de segunda geração.

Muitos microrganismos decompositores de materiais lignocelulósicos vêm sendo selecionados para serem utilizados como produtores de enzimas. O Brasil se destaca em biodiversidade e, assim, há um vasto campo a ser explorado na busca de microrganismos que apresentem as características desejadas para tal aplicação. A região Amazônica, por sua vez é um reservatório de espécies com grande potencial de utilização devido, principalmente, as suas condições edafoclimáticas que propiciam a existência de microrganismos decompositores e degradantes da biomassa rasteira da floresta (Delabona, 2011).

Aliada a busca de microrganismos promissores, existe a necessidade do desenvolvimento do processo de produção do complexo enzimático, de modo a proporcionar os requerimentos nutricionais e ambientais adequados ao cultivo microbiano. As enzimas podem ser produzidas por cultivo submerso (fermentação submersa – FSm) ou pelo cultivo em estado sólido (fermentação em estado sólido – FES) usando resíduos agrícolas. Cada um desses processos possui vantagens e desvantagens conhecidas (Raimbault, 1998). Como os microrganismos em FES crescem em condições mais próximas de seus habitats naturais, a FES tem se destacado como um processo promissor em relação à produção de enzimas (Holker e Lenz, 2005).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de xilanasas a partir do cultivo de isolados de fungos do bioma Amazônico pelos processos de fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm).

MATERIAL E MÉTODOS

Microorganismos

Os fungos foram isolados da região Amazônica (Delabona, 2011) e pertencem à coleção do laboratório de Agroenergia da Embrapa Instrumentação – São Carlos/SP. Os fungos são mantidos em tubos em meio PDA a temperatura ambiente, sob fina camada de óleo mineral.

Fermentação em estado sólido (FES)

A FES foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de farelo de trigo lavado. Após a inoculação dos esporos (10^7 esporos/g) foi adicionado aos frascos solução nutriente (Meio de Mandels e Weber, 1969) até a obtenção de uma umidade de 60%. A incubação foi feita a 35°C, durante 10 dias, e a 1ª e a última amostra foram retiradas em 24h e todas as outras a cada 48 h. Após o período correspondente a cada amostra, foram adicionados ao material fermentado 50 mL de tampão citrato de sódio 50mM, pH 4,8, sendo homogeneizado e posteriormente agitado por 30 min, a 100 rpm. O material foi então filtrado

e centrifugado a 10000 rpm durante 20 min, a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

Fermentação Submersa (FSm)

A FSm foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 1L contendo 400 mL de meio de Mandels e Weber (1969) e 4 g de farelo de trigo lavado. O material foi inoculado com 10^7 esporos/mL. A incubação foi feita a 35°C, 200 rpm de agitação, durante 5 dias. As amostras foram retiradas a cada 24h. O material foi então filtrado e centrifugado a 10000 rpm durante 30 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

Atividade Enzimática

A atividade da xilanase foi medida em mistura de reação contendo 0,1 mL do extrato enzimático bruto e 0,9 ml de uma solução de 1% de xilana em tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0. Após incubação a 50 °C por 10 minutos, os açúcares redutores foram quantificados pelo método DNS (Miller, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de substância redutora por minuto nas condições de ensaio, utilizando curva padrão de xilose.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o objetivo de selecionar fungos filamentosos produtores de xilanases visando à aplicação na conversão da biomassa vegetal, 40 linhagens de fungos isolados da Floresta Amazônica foram inicialmente cultivadas por FES durante 240 h utilizando o farelo de trigo como substrato (Figura 1).

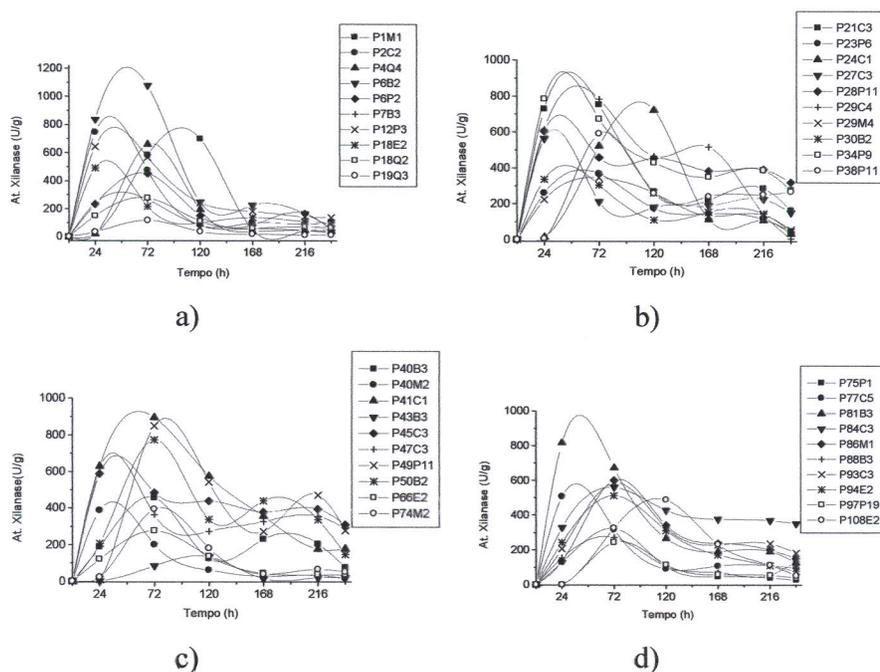


Figura 1. Produção de xilanase pelas 40 linhagens fúngicas por FES (a, b, c e d), utilizando como substrato farelo de trigo.

Como pode ser observado na Figura 1, a maioria dos isolados foi capaz de produzir xilanase em quantidades significativas, com picos de produção inferiores a 120 h de cultivo. A fim de simplificar a comparação entre os isolados, são apresentados os dados de atividade de xilanase em termos do valor máximo de atividade produzido (Figura 2a) e valor máximo de produtividade por dia de cultivo (Figura 2b).

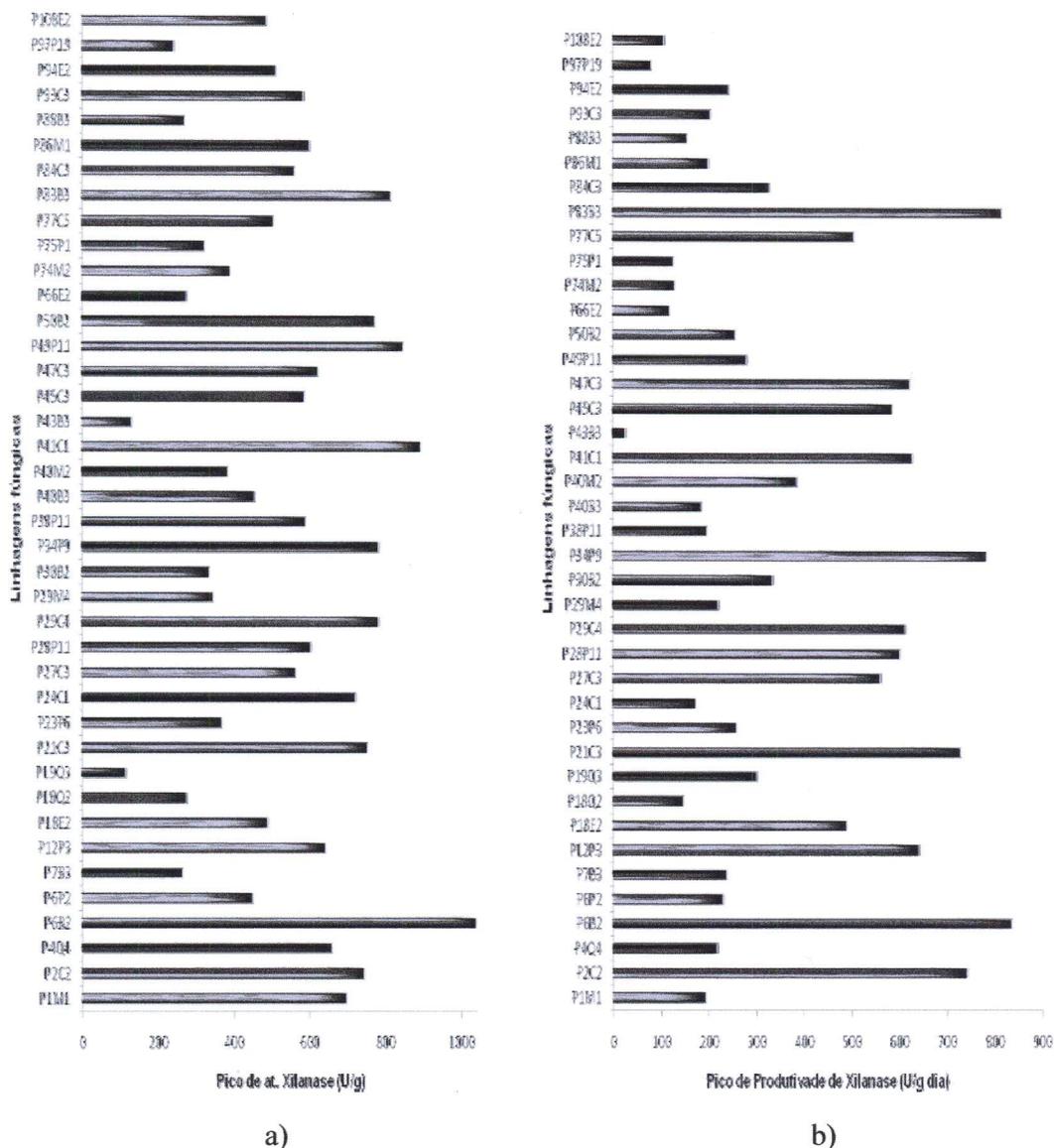


Figura 2. Valores máximos de atividade de xilanase produzidos pelo cultivo de 40 linhagens fúngicas por FES, utilizando como substrato farelo de trigo. a) Pico de atividade de xilanase (U/g); b) Pico de produtividade (U/g.dia).

Analisando os dados da Figura 2 pode-se observar que a linhagem P6B2 foi a que mais se destacou na FES, tanto em relação aos valores máximos de atividade (1076,4 U/g após 72 h de cultivo), quanto à produtividade (836,6 U/g.dia após 24 h de cultivo).

Comparando os valores obtidos com os dados da literatura (Tabela 1), pode-se inferir que os isolados utilizados no presente estudo proporcionaram, de maneira geral, expressiva produção de xilanases. Embora a comparação dos resultados de pesquisas com diferentes autores seja importante para a avaliação dos dados obtidos, deve-se considerar as diferenças de metodologia de fermentação (substrato, umidade, aeração, pH e temperatura), bem como dos microrganismos.

Tabela 1. Comparação da produção de xilanase por FES com dados da literatura.

Microrganismo	Substrato	Xilanase (U/g)	Referência
<i>Aspergillus fischeri</i>	Farelo de trigo	1024,0	Senthilkumar et al., 2005
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo ao bagaço de cana (2:1)	1286,0	Maciel et al., 2008
<i>Aspergillus carneus</i> M34	coba husk	1721,0	Fang et al., 2010
P6B2	Farelo de trigo	1076,4	Presente trabalho

Visando avaliar o desempenho da linhagem P6B2 em relação à produção de xilanases pelo processo de FSm, realizou-se o cultivo em meio líquido durante o período de 120 h. A comparação das atividades de xilanase obtida nos dois tipos de cultivo é apresentada na Figura 3.

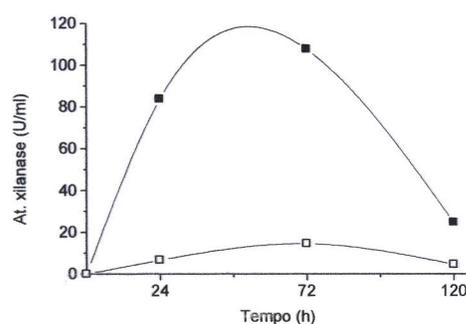


Figura 3. Produção de xilanase (U/mL) pela linhagem P6B2 pelos processos de FES -■- e FSm -□-.

Apesar da expressiva diferença em termos dos valores máximos observados nos dois tipos de cultivo, 14,5 U/mL em FSm e 107,7 U/mL em FES, essa diferença já era esperada, uma vez que o extrato enzimático obtido em FES é mais concentrado. No entanto, dada as vantagens da FSm em relação à ampliação de escala, pode-se considerar que os valores obtidos neste trabalho são bastante promissores, haja vista que as condições de cultivo não foram otimizadas.