

Produção de celulases por *Trichoderma harzianum* a partir de distintas fontes de celulose

Fernando Kahrin Cardoso da Costa¹, Dasciana de Sousa Rodrigues², Thaís Demarchi Mendes³, Rossano Gambetta⁴

Resumo

A biomassa da cana-de-açúcar foi utilizada para a produção de celulases por *Trichoderma harzianum* como estratégia para reduzir os custos do processo, bem como diminuir a incidência das alterações climáticas ocorridas pelo uso de combustíveis fósseis. O fungo foi cultivado em meio Mandels modificado contendo Avicel (AVI), biomassa de cana-de-açúcar pré-tratada por organosolv modificado (Bio-OS), biomassa pré-tratada por auto-hidrólise (Bio-AH) e biomassa não tratada (Bio-NT). As atividades FPase, CMCase, Celobiase e Avicelase foram avaliadas em microplacas de 96 poços. Os resultados mostraram que o substrato melhor indutor para a produção de celulases foi Avicel, com 0,28 FPU/mL. Entretanto, a Bio-OS apresentou atividade de 0,2 FPU/mL, resultado próximo ao obtido por Avicel. Utilizar Bio-OS como indutor da produção de enzimas pode ser uma estratégia interessante para reduzir os custos de produção.

Termos para indexação: atividades enzimáticas, pré-tratamento, bagaço de cana-de-açúcar.

Introdução

O uso de combustíveis fósseis é um dos principais contribuintes para o acúmulo de gases na atmosfera e para as consequentes alterações climáticas. Esse problema tem incentivado a comunidade científica a buscar fontes alternativas com o objetivo de minimizar os efeitos nocivos ao meio ambiente (Gelain, et al., 2015). A produção de biocombustíveis a partir da biomassa residual do processo de bioetanol apresenta vantagem econômica por causa da geração significativa de bagaço de cana-de-açúcar (material lignocelulósico) no processo (Robak; Balcerek, 2018). O material lignocelulósico é complexo e requer degradação para a produção de bioetanol de segunda geração, a partir de pré-tratamentos físicos, químicos ou biológicos, visando melhorar a digestibilidade enzimática da celulose e a liberação de açúcares (Tse et al., 2021). Entretanto, a conversão em larga escala ainda é desafiadora, pelo alto custo do processo e pela dependência de coquetéis de enzimas celulolíticas de alto valor comercial (Balan, 2014). Portanto, a produção de celulases a partir de biomassa lignocelulósica tem sido estudada para aprimorar a economia do processo de etanol de segunda geração (Libardi et al., 2017; Souza et al., 2018).

Enzimas celulolíticas industriais incluem endoglicanases, celobiohidrolases (exoglicanases) e β -glicosidases, predominantemente sintetizadas por fungos filamentosos (Delabona et al., 2016). *Trichoderma reesei* é amplamente usado como produtor de celulases. Por outro lado, estudos com *Trichoderma harzianum* revelaram sua capacidade de produzir um complexo celulolítico com alta atividade de β -glicosidases e endoglicanase em comparação ao *T. reesei* (Benoliel et al., 2013). Contudo, a produção das demais celulases é crucial para a conversão da celulose em glicose.

¹ Engenheiro de alimentos, doutor em Engenharia de Alimentos, Embrapa Agroenergia, fernando.costa@colaborador.embrapa.br

² Química industrial, doutora em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

³ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁴ Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, rossano.gambetta@embrapa.br

A fonte de celulose desempenha papel importante na indução de enzimas. Estudos recentes destacaram que biomassas pré-tratadas têm potencial de indutor na secreção de enzimas com boa eficiência na etapa de hidrólise da biomassa (Liu et al., 2021; Novy et al., 2021; Xiang et al., 2021). Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a produção de celulases por *T. harzianum* em fontes de celulose oriundas de biomassa de cana-de-açúcar pré-tratada pelos métodos organossolv modificado e auto-hidrólise, alternativamente à celulose pura, cujo alto valor comercial limita sua utilização industrial.

Materiais e métodos

Microrganismo e preparação do inóculo

A cepa de *Trichoderma harzianum* CFAM 422 (Coleção de Fungos da Amazônia) utilizada neste estudo foi cultivada em ágar extrato de malte 2% a 30 °C por 7 dias. Cinco discos de 5 mm da mesma região da placa de Petri foram utilizados para inocular frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL meio de cultivo.

Pré-tratamento da biomassa

A biomassa de cana-de-açúcar foi submetida aos pré-tratamentos por organossolv modificado e auto-hidrólise em um reator de alta pressão (Parr modelo 4555) com controle de agitação, temperatura e rotação. No método de organossolv modificado, 3 L de solvente (etanol: - 1:1 (v/v)) foram adicionados ao reator e 500 g de bagaço foram adicionados em um cesto perfurado para separar a biomassa do solvente. A reação ocorreu a 180 °C por 4 horas a 4 rpm. O processo de auto-hidrólise foi realizado a 192 °C por 38 minutos a 4 rpm, com proporção de bagaço:água de 1:10 (Nogueira et al., 2023). Após os pré-tratamentos, o bagaço foi lavado com água destilada, seco, triturado e empregado como fonte de carbono e indutor para a produção de enzimas celulolíticas.

Meio de cultivo e Produção de celulases

O cultivo foi realizado em meio Mandels e Weber (1969) modificado que consistia em (g/L): 2,0 de KH_2PO_4 ; 0,3 de CaCl_2 ; 0,3 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,005 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,0016 de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,0014 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,0 de peptona; 12,143 de NaH_2PO_4 ; 3,218 de Na_2HPO_4 e 10 para as fontes de celulose: Avicel (AVI), biomassa pré-tratada por organossolv (Bio-OS), biomassa pré-tratada por auto-hidrólise (Bio-AH) ou biomassa não tratada (Bio-NT). A massa de Avicel foi ultra-homogeneizada a 20.000 rpm/120 min (IKA Ultraturrax T 25) com seis intervalos de 20 min. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 30 °C por 7 dias sob agitação de 180 rpm (Souza et al., 2018). Amostras coletadas no 5º e no 7º dias foram centrifugadas a 14.000 rpm/10 min (Centrifuge 5418-Eppendorf), e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios de atividades enzimáticas.

Ensaio de atividade das celulases

Os ensaios de atividade foram conduzidos em microplacas de 96 poços, seguindo o método descrito pela IUPAC (Ghose, 1987). Os ensaios de FPase, CMCase, Avicelase e β -Glicosidase foram realizados usando papel de filtro de 7 mm, CMC 2%, Avicel 5% e 15 mmol/L de Celobiose, respectivamente, como substratos. O extrato enzimático foi diluído em tampão citrato/ácido cítrico 0,1 mol/L em todos os ensaios (Tabela 1). As reações ocorreram em placas PCR, incubadas em termociclador (Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler) a 50 °C/60 min para FPase e Avicelase, e a 50 °C/30 min para CMCase e β -glicosidase. Em seguida, foram adicionados 120 μL de DNS, seguindo nova incubação a 95 °C/10 min, exceto para o ensaio de β -glicosidase, no qual utilizou-se o reagente glicose Bioclin, cuja reação ocorreu a 37 °C/10 min. Após a reação, 10 μL de cada poço foram

transferidos para placa Elisa contendo 250 μL de glicose monorreagente e foi realizada a leitura a 505 nm (SpectraMax® 190 microplate reader). Após as reações com DNS, uma alíquota de 36 μL de cada poço foi transferida para placas Elisa de fundo chato contendo 160 μL de água deionizada para leitura da absorbância a 540 nm (SpectraMax® 190 microplate reader) para FPase e Avicelase. Para a leitura da atividade de CMCase, foram transferidos 100 μL de cada poço para placa Elisa contendo 100 μL de água deionizada. Uma curva padrão de glicose foi utilizada para calcular a glicose gerada nos ensaios. As atividades foram expressas conforme a Equação 1. Subtraiu-se a glicose gerada pela glicose obtida nos brancos.

$$UI = \frac{\mu\text{mol de glicose gerada}}{\text{min} \cdot \text{enzima (mL)}} \quad (1)$$

Tabela 1. Volumes para o preparo dos ensaios enzimáticos.

FPase				
	Zero espectro	Branco substrato	Branco enzima	Ensaio enzimático
Enzima (μL)			20	20
Tampão (μL)	60	60	40	40
Substrato		Disco de papel		Disco de papel
CMCase				
	Zero espectro	Branco substrato	Branco enzima	Ensaio enzimático
Enzima (μL)			20	20
Tampão (μL)	40	20	20	
CMC 2% (μL)		20		20
Celobiase				
	Zero espectro	Branco substrato	Branco enzima	Ensaio enzimático
Enzima (μL)			30	30
Tampão (μL)	60	30	30	
Celobiose (μL)		30		30
Avicelase				
	Zero espectro	Branco substrato	Branco enzima	Ensaio enzimático
Enzima (μL)			20	20
Tampão (μL)	60	20	40	
Avicel 4% (μL)		40		40

Resultados e discussão

Os dados das atividades estão expostos na Figura 1. O maior nível de FPase foi obtido com a produção de enzimas induzida por Avicel (0,28 FPU/mL). De acordo com a Anova, os níveis de FPase entre as biomassas diferem significativamente ($p < 0,05$) no 5º e no 7º dia de cultivo. Porém, de acordo com o teste-t ($p < 0,05$) não houve diferença significativa da atividade de FPase induzida por cada biomassa entre o 5º e o 7º dia, indicando que o cultivo pode ser encerrado no 5º dia.

A máxima atividade de FPase observada foi de 0,28 UI/mL, utilizando Avicel como fonte de celulose. Essa atividade está abaixo do valor documentado por Souza et al. (2018), que apresentaram uma atividade de 1,63 UI/mL. No estudo de Delabona et al. (2016), os autores confirmaram alta atividade de β -glicosidase (26,1 UI/mL) quando o fungo foi cultivado em bagaço de cana

pré-tratado por explosão de vapor. No presente estudo, o maior nível de atividade da Celobiase (β -glicosidases) foi de 0,05 UI/mL utilizando Avicel como fonte de celulose. Para CMCase (endoglicanase) o melhor nível de atividade obtido foi 0,18 UI/mL, tanto no cultivo do fungo em Avicel (5º dia) quanto em Bio-NT (7º dia) (Figura 1). Os dados de atividades discordam do que foi relatado na literatura. Uma hipótese plausível para a baixa atividade observada neste estudo pode ser atribuída à esporulação do fungo após o 5º dia de cultivo. Isso indica o esgotamento de uma fonte específica de nutrientes no meio, resultando em um declínio na produção enzimática.

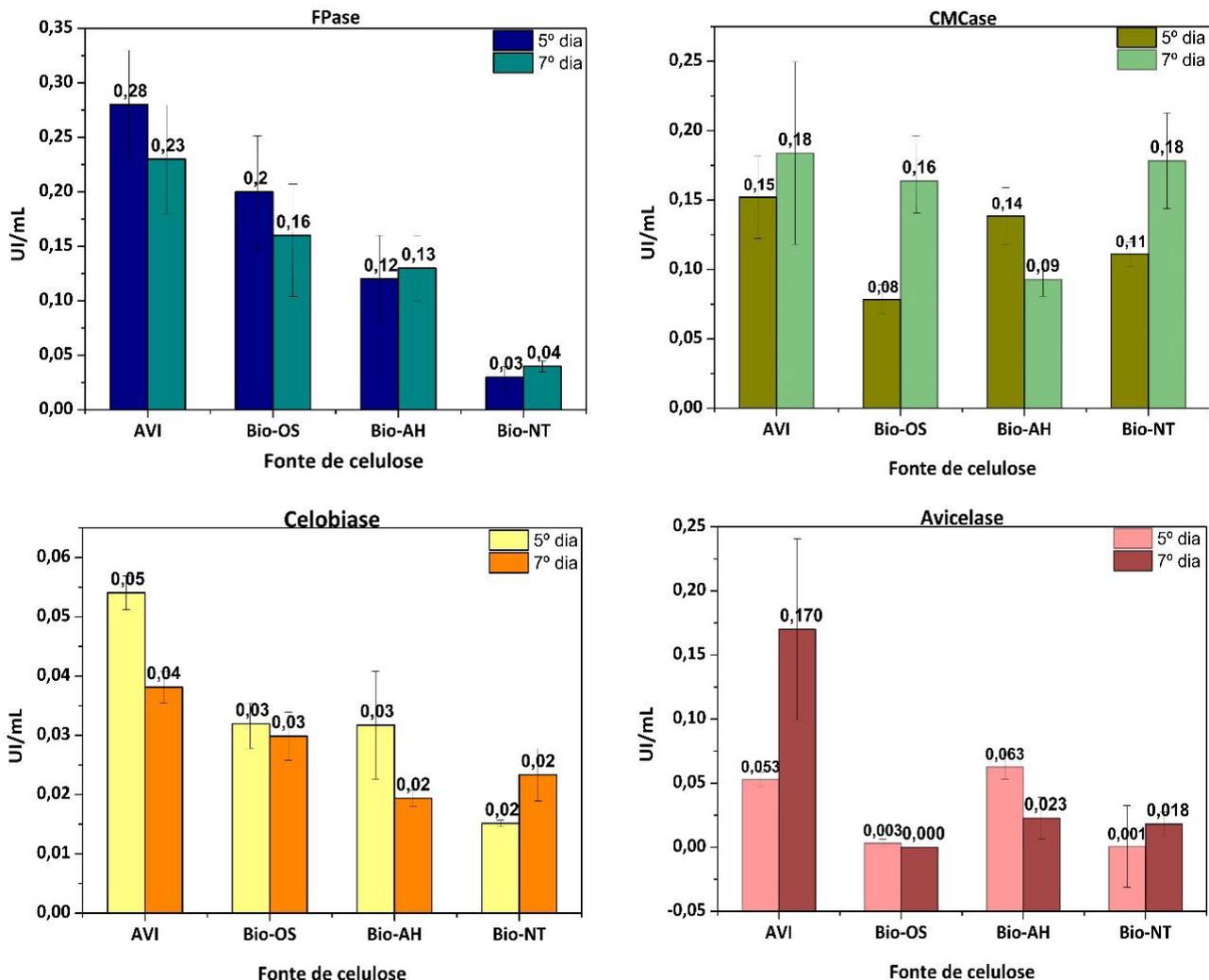


Figura 1. Atividades de celulases produzidas em meios de cultivo utilizando diferentes fontes de celulose no 5º e no 7º dias de cultivo.

Apesar da baixa atividade observada neste estudo, a síntese de celulases pelo fungo *T. harzianum*, estimulada pela aplicação de Bio-OS, desperta interesse. Esse interesse surge da observação de que a Bio-OS possui cerca de 70% de celulose em sua composição (Nogueira et al., 2023). A celulose desempenha o papel de indutor na produção de celulases, motivando a exploração da produção enzimática utilizando Bio-OS. No entanto, otimizar nutrientes do meio e concentração do inóculo é crucial, dada a proliferação fúngica intensa, sinal de limitação nutricional.

Conclusão

A cepa de *Trichoderma harzianum* CFAM 422 mostrou consumir bem os nutrientes do meio de cultivo, assim como a biomassa insolúvel indutora da produção de enzimas. Observou-se que o fungo foi capaz de produzir um coquetel enzimático de celulases necessárias para a despolimerização da celulose em glicose utilizando as diferentes fontes de celulose. A maior produção de celulases foi obtida no meio de cultivo contendo Avicel. No entanto, a biomassa pré-tratada por organossolv modificado pode ser considerada promissora para futuros estudos de produção de celulases com otimização das condições operacionais.

Referências bibliográficas

- BALAN, V. Current challenges in commercially producing biofuels from lignocellulosic biomass. **ISRN Biotechnology**, v. 2014, maio 2014.
- BENOLIEL, B.; TORRES, F. A. G.; DE MORAES, L. M. P. A novel promising *Trichoderma harzianum* strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse in natura. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, 2013.
- DELABONA, P. da S.; LIMA, D. J.; ROBL, D.; RABELO, S. C.; FARINAS, C. S.; PRADELLA, J. G. da C. Enhanced cellulase production by *Trichoderma harzianum* by cultivation on glycerol followed by induction on cellulosic substrates. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 5, p. 617-626, 2016.
- GELAIN, L.; DA CRUZ PRADELLA, J. G.; DA COSTA, A. C. Mathematical modeling of enzyme production using *Trichoderma harzianum* P49P11 and sugarcane bagasse as carbon source. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 101-107, 2015.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- LIBARDI, N.; SOCCOL, C. R.; GÓES-NETO, A.; OLIVEIRA, J. de; VANDENBERGHE, L. P. de S. Domestic wastewater as substrate for cellulase production by *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**, v. 57, p. 190-199, 2017.
- LIU, P.; LI, A.; WANG, Y.; CAI, Q.; YU, H.; LI, Y.; PENG, H.; LI, Q.; WANG, Y.; WEI, X.; ZHANG, R.; TU, Y.; XIA, T.; PENG, L. Distinct *Miscanthus lignocellulose* improves fungus secreting cellulases and xylanases for consistently enhanced biomass saccharification of diverse bioenergy crops. **Renewable Energy**, v. 174, p. 799-809, 2021.
- MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. In: HAJNY, G. J.; REESE, E. T. **Cellulases and their applications**. [S.l.]: American Chemical Society, 1969. p. 391-414.
- NOGUEIRA, B. L.; SECCHI, A. R.; MACHADO, F.; RODRIGUES, C. V. S.; GAMBETTA, R.; RODRIGUES, D. S. Improvement of enzymatic saccharification by simultaneous pulping of sugarcane bagasse and washing of its cellulose fibers in a batch reactor. **Biotechnology Journal**, v. 18, n. 8, 2023.
- NOVY, V.; NIELSEN, F.; CULLEN, D.; SABAT, G.; HOUTMAN, C. J.; HUNT, C. G. The characteristics of insoluble softwood substrates affect fungal morphology, secretome composition, and hydrolytic efficiency of enzymes produced by *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 105, 2021.
- ROBAK, K.; BALCEREK, M. Review of second-generation bioethanol production from residual biomass. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 174-187, 2018.
- SOUZA, M. F. de; SILVA, A. S. da; BON, E. P. S. A novel *Trichoderma harzianum* strain from the Amazon forest with high cellulolytic capacity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 183-188, 2018.
- TSE, T. J.; WIENS, D. J.; REANEY, M. J. T. Production of bioethanol: a review of factors affecting ethanol yield. **Fermentation**, v. 7, n. 4, 2021. 268.
- XIANG, J.; WANG, X.; SANG, T. Cellulase production from *Trichoderma reesei* RUT C30 induced by continuous feeding of steam-exploded *Miscanthus lutarioriparius*. **Industrial Crops and Products**, v. 160, 2021.