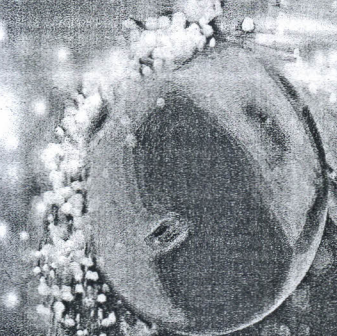


4º CONGRESSO
internacional de
BIOENERGIA
4th International Bioenergy Congress



1º CONGRESSO BRASILEIRO
de GERAÇÃO DISTRIBUÍDA
e ENERGIAS RENOVÁVEIS



Toda tecnologia em Bioenergia e Biocombustíveis,
juntas no mesmo evento
*Comprehensive Bioenergy and Biofuels technology,
gathered in the same event*

Editora

fupef

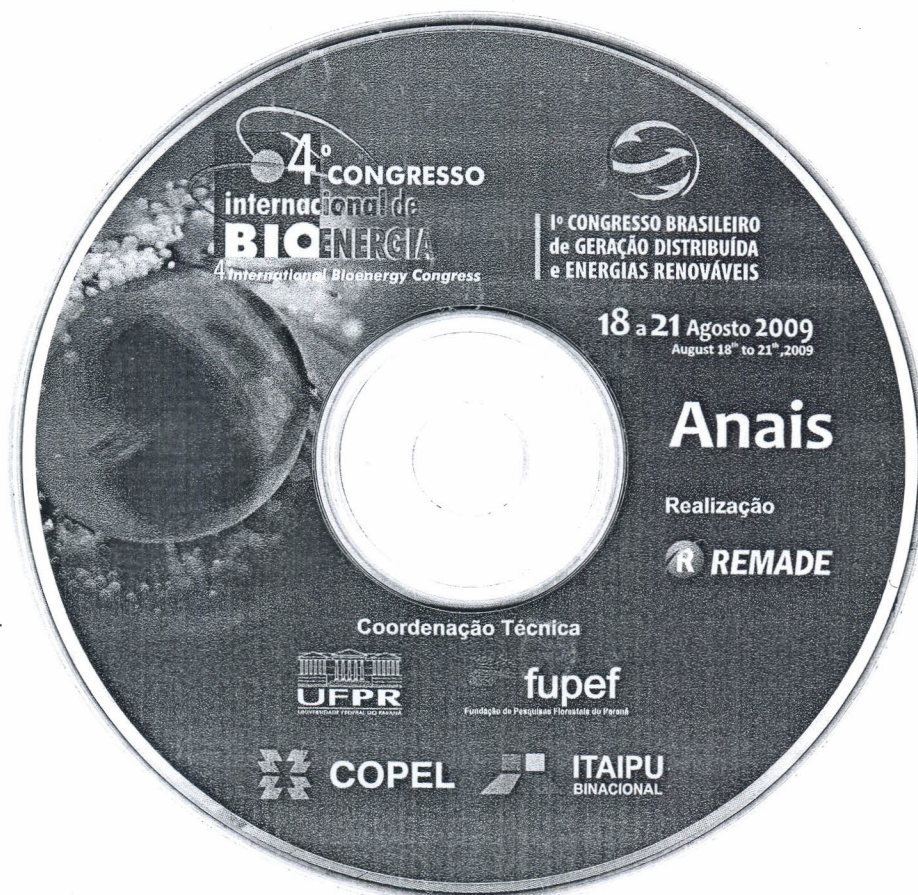
Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná



18 a 21 Agosto 2009

August 18th to 21th, 2009

EXPO UNIMED CURITIBA
CURITIBA-PARANÁ-BRASIL



PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR DUAS LINHAGENS DE TRICHODERMA VISANDO A APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO

Priscila da Silva Delabona*, Rosângela Donizete P. B. Pirola**, Gustavo Adolfo Saavedra Pinto, *** Cristiane Sanchez Farinas****

* Bacharel em Ciências Biológicas; Universidade Federal de São Carlos; e-mail pridelabona@yahoo.com.br ** Doutoranda em Biotecnologia; Universidade Federal de São Carlos; e-mail rosa_angelaapirola@hotmail.com *** Pesquisador; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Agroindústria Tropical (Forquilha – CE); e –mail gustavo@cnpq.embrapa.br **** Pesquisadora; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Instrumentação Agropecuária (São Carlos – SP); e –mail cristiane@cnpdia.embrapa.br

RESUMO

Produção de Celulasas e Xilanases por Duas Linhagens de *Trichoderma* Visando a Aplicação na Produção de Etanol Celulósico

A celulose presente em resíduos agrícolas e agro-industriais pode ser hidrolisada enzimaticamente pela ação de microrganismos para a geração de açúcares fermentescíveis utilizados na produção de etanol celulósico. Porém um dos gargalos desse processo é o custo das enzimas. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de enzimas hemicelulolíticas em resíduos agrícolas para subsequente aplicação das mesmas na hidrólise enzimática da biomassa para produção de etanol celulósico. Duas linhagens do fungo filamentoso *Trichoderma* (*Trichoderma harzianum* LCB50 e *Trichoderma polysporum* LCB47) foram avaliadas para produção enzimática. Os resíduos utilizados como substrato para produção enzimática foram S₁ (bagaço de cana e farelo de trigo na proporção 1:1); S₂ (bagaço de cana) e S₃ (farelo de trigo). Para extração das enzimas foi utilizada água destilada sob agitação. A curva de crescimento das linhagens fúngicas foi avaliada durante 192 h e a maior atividade celulásica foi do *T. polysporum* (75 U/g) no substrato S₁ obtida em 192 h de cultivo. A atividade xilanásica foi maior pela linhagem *T. harzianum* (358,9 U/g) no substrato S₁ obtida em 144 h de cultivo. Esses resultados demonstram o potencial desses microrganismos na produção de enzimas e aplicação na produção de etanol celulósico.

ABSTRACT

Cellulase and Xylanase Production by Two Trichoderma Strains Using Solid State Fermentation (SSF) for Cellulosic Ethanol Production

The cellulose present in agricultural and agro-industrial residues can be enzymatically hydrolyzed by the microorganisms action for the generation of fermentable sugars. One major drawback of this process is the high enzymes cost. In this work agricultural wastes were used as a substrate in solid state fermentation (SSF) to produce cellulases and xylanases for subsequent application in the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for cellulosic ethanol production. Two fungal strains (*Trichoderma harzianum* LCB50 and *Trichoderma polysporum* LCB47) were used for enzymes production. The agricultural wastes evaluated were: S₁ (sugarcane bagasse and wheat bran 1:1); S₂ (sugarcane bagasse) and S₃ (wheat bran). Distilled water was used for enzyme extraction. The growth of both fungal strains were evaluated during 192 h and the best results in terms of activity of cellulase was obtained after 192 h of cultivation of *T. polysporum* (75 U / g) on the substrate S₁. The xylanase activity was higher for strain *T. harzianum* (358,9 U/g) on the substrate S₁ after 192 h of cultivation. These results demonstrate the potential of these microorganisms for enzymes production and the feasibility of applying these enzymes in the production of cellulosic ethanol.

INTRODUÇÃO

O etanol, um dos mais promissores biocombustíveis, em princípio pode ser obtido a partir de qualquer material que contenha açúcares simples ou complexos (PRASAD *et al.*, 2007), e apresenta boas perspectivas no mercado internacional, como alternativa de energia renovável e menos poluidora que os combustíveis fósseis. Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de etanol produzido a partir de cana-de-açúcar, os números indicam a produção de 27,09 bilhões de litros de etanol na safra 2008-2009 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2008).

Porém, a ampliação excessiva dos canaviais pode comprometer outras culturas agrícolas, além do impacto ambiental que poderá causar (CONÇALVES *et al.*, 2008). Assim, a exploração de materiais celulósicos amplamente disponíveis, como resíduos agroindustriais representa uma alternativa bastante vantajosa (SÁNCHEZ, 2009). Em um país como o Brasil onde a agricultura é a principal atividade econômica, os resíduos e subprodutos agrícolas e agroindustriais são abundantes (GRAMINHA *et al.*, 2008). Estes materiais são pouco aproveitados sendo que uma parte é usada para geração de energia elétrica, enquanto outra grande parte é queimada ou simplesmente fica disponível no campo tornando-se, muitas vezes, um passivo ambiental. A conversão desses resíduos em biomassa aproveitável ou em produtos de valor comercial poderá, além de contribuir para a remoção de poluentes ambientais, trazer grandes dividendos à economia (SUKUMARAN *et al.*, 2009). Dessa forma, uma das possibilidades promissoras de utilização dos resíduos que vem sendo muito pesquisada nos últimos anos é a conversão de materiais lignocelulósicos em etanol (LAWFORD, ROUSSEAU, 2003; HAMELINCK *et al.*, 2005; CONÇALVES *et al.*, 2008; HERNÁNDEZ-SALAS *et al.*, 2009; SAKUMARAN *et al.*, 2009).

É neste ponto que muitos microrganismos desempenham um importante papel na produção de etanol celulósico, pois estes possuem sistemas enzimáticos capazes de degradar os componentes dos resíduos celulósicos em açúcares fermentescíveis. Enzimas como celulasas, que convertem celulose em glicose, tem um custo muito alto podendo ser um fator limitante no processo de obtenção do etanol a partir de resíduos (em média é gasto US\$ 0.15 por galão de bioetanol produzido – custo estimado para 50 milhões de galões por ano) (BALAT *et al.*, 2008).

Portanto, a busca por microrganismos produtores de enzimas celulásicas é de suma importância para contribuir com a viabilização da rota biológica de produção de etanol celulósico. Dentre os fungos filamentosos, os do gênero *Trichoderma spp* se destacam pela alta produtividade enzimática exibida. Dentre todos os organismos considerados celulolíticos, alguns dos mais utilizados industrialmente na produção de celulasas, são os fungos filamentosos da subdivisão Deuteromycetes, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola* e *Penicillium* (SÁNCHEZ, 2009).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de celulasas e xilanases por duas linhagens de *Trichoderma* através de fermentação em estado sólido (FES) visando a sua aplicação na produção de etanol celulósico

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos

As linhagens de *Trichoderma* (*T. polysporum* LCB50 e *T. harzianum* LCB47) foram obtidas da Coleção de Cultura do Laboratório de Controle Biológico da Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias – Embrapa Semi-árido em Petrolina (PE) e foram previamente selecionadas pelo método de vermelho de congo (RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO, 2004) como potenciais linhagens produtoras de celulasas.

Cultivo

Os fungos foram repicados em placas de Petri contendo 30 ml de meio Agar Batata Dextrose (PDA). O meio foi esterilizado a 121°C durante 30 minutos. As placas com os fungos repicados foram incubados a 30°C na BOD até completa esporulação. A suspensão micelial foi feita adicionando meio de Mandels, Sternberg (1976) e fazendo o esfregaço dos esporos com a alça de platina. O inóculo usado para a produção enzimática foi feito utilizando-se uma suspensão de esporos na concentração de 10⁷ esporos / ml.

Fermentação em estado sólido (FES)

A FES foi conduzida em frascos Erlenmayer utilizando como substrato S_1 (5g de bagaço de cana e farelo de trigo na proporção 1:1 em 60% de umidade); S_2 (2,5g de bagaço de cana em 60% de umidade) e S_3 (2,5g de farelo de trigo em 40% de umidade). O bagaço de cana e o farelo de trigo utilizados no trabalho foram submetidos a sucessivas lavagens em água corrente para a retirada de açúcares, embalado em saco plástico e estocado em freezer. Para fermentação o substrato foi umedecido com meio de Mandels. Para as fermentações em bagaço de cana foi adicionado no meio de mandels 0,5% de carboximetilcelulose (CMC). Após as primeiras 48 horas foi retirado um Erlenmayer com o material fermentado de cada linhagem de *Trichoderma* até que se completasse o tempo de 192 horas. Para realizar a extração das enzimas foi adicionado água destilada ao material fermentado. Ambos os substratos foram homogeneizados e posteriormente agitados por 60 minutos a 100 rpm. O material foi então filtrado a vácuo utilizando papel Whatman nº 1 e centrifugado. O sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta. A atividade celulásica foi medida em mistura de reação contendo 0,1 ml do extrato enzimático bruto e 0,9 ml de uma solução de 0,5% carboximetilcelulose (CMC) em tampão acetato 0,1 M e pH 5,0. Após a incubação, feita em temperatura de 60 °C por 10 minutos, os açúcares redutores foram quantificados pelo método DNS (MILLER, 1959). O mesmo procedimento foi utilizado para a detecção da atividade de xilanase, exceto que o substrato utilizado foi 0,5% de xilana. Os açúcares redutores foram quantificados a partir da curva padrão de glicose.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os dados das atividades enzimáticas pelo fungo *T. polysporum* utilizando S_1 como substrato revelaram a atividade considerável de CMCase em 192 h de cultura (75,0 U/g) (Figura 1), já a atividade de CMCase pelo fungo *T. harzianum* em substrato S_1 foi de 72,2 U/g (192 h) (Figura 2). No substrato S_3 as atividades enzimáticas de CMCase também foram consideráveis, sendo 62,5 U/g de CMC (192 h) pelo *T. polysporum* (Figura 1) e 65,8 U/g (192 h) pelo *T. harzianum* (Figura 2).

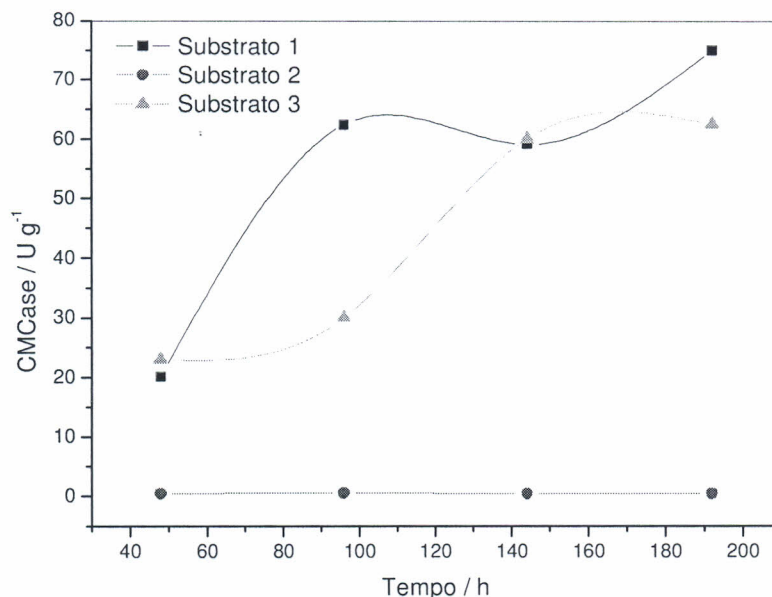


Figura 1: Produção de celulases em FES pela linhagem de *T. polysporum* utilizando substrato 1 (bagaço de cana e farelo de trigo 1:1), substrato 2 (bagaço de cana) e substrato 3 (farelo de trigo)

Figure 1: Cellulases production in SSF by strain of *T. polysporum* using substrate 1 (sugarcane bagasse and wheat bran 1:1), substrate 2 (sugarcane bagasse) and substrate 3 (wheat bran)

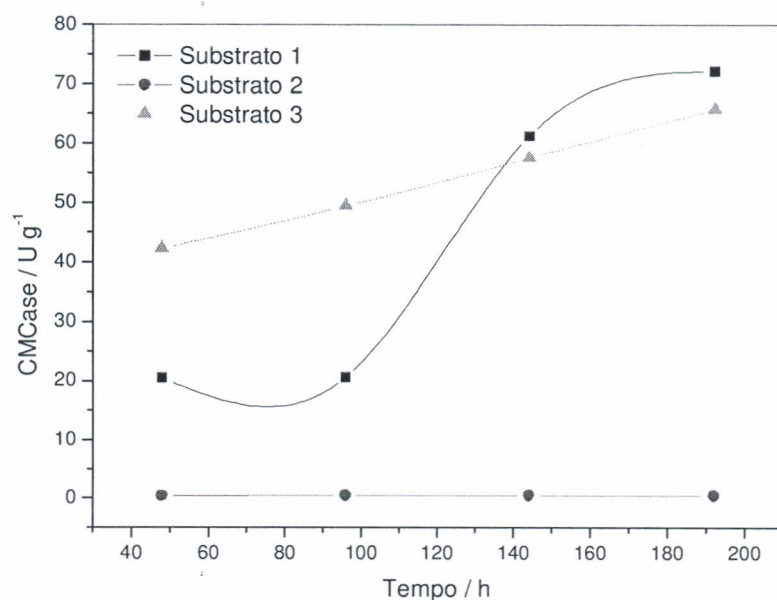


Figura 2: Produção de celulasas em FES pela linhagem de *T. harzianum* utilizando substrato 1 (bagaço de cana e farelo de trigo 1:1), substrato 2 (bagaço de cana) e substrato 3 (farelo de trigo)

Figure 2: Cellulases production in SSF by strain of *T. harzianum* using substrate 1 (sugarcane bagasse and wheat bran 1:1), substrate 2 (sugarcane bagasse) and substrate 3 (wheat bran)

Os fungos não produziram atividade considerável no substrato S₂, fato que pode ser explicado pela composição pobre em nutrientes quando comparado com o farelo de trigo (Tabela 1) e também falta de umidade, pois ambas as linhagens não tiveram crescimento. Esse resultado mostra que o substrato utilizando farelo de trigo (S₁) apresenta maior potencial para a produção de CMCase que os substratos utilizando bagaço de cana e farelo de trigo (S₃).

Tabela 1: Comparação entre a composição do BC utilizado e o farelo de trigo

	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina	% Proteína
Material lignocelulósico				
Bagaço de cana-de-açúcar ¹	50,04	32,76	9,91	1,52
Farelo de Trigo ²	10,86	28,88	4,89	17,61

¹. Farinas et al., (2008); ². Rodríguez-Zúñiga et al., (2008).

Xia e Cen (1999) obtiveram 128 U/g de CMCase (148 h) em condições otimizadas de umidade e meio suplementar utilizando FES no substrato farelo de trigo com 70% de umidade pelo fungo *T. reesei*, considerado um dos melhores fungos celulolíticos. A produção de CMCase pelas linhagens *T. polysporum* e *T. harzianum* foi um primeiro teste de produção, sendo que as condições ainda serão otimizadas, portanto espera-se uma maior atividade enzimática.

As atividades de xilanases também foram consideráveis. A maior produção de xilanase foi de 358,9 U/g (144 h) pelo fungo *T. harzianum* no substrato (S_1) (Figura 3). Já a maior produção de xilanase pelo fungo *T. polysporum* foi 339 U/g (144 h) no substrato (S_1) (Figura 4). A atividade de xilanase no substrato (S_3) foi menor quando comparado com (S_1), o fungo *T. harzianum* teve a produção de 319 U/g de xilanase em 144 horas de cultivo (Figura 3), já o fungo *T. polysporum* teve a produção de 226,2 U/g de xilanase também em 144 horas de cultivo (Figura 4).

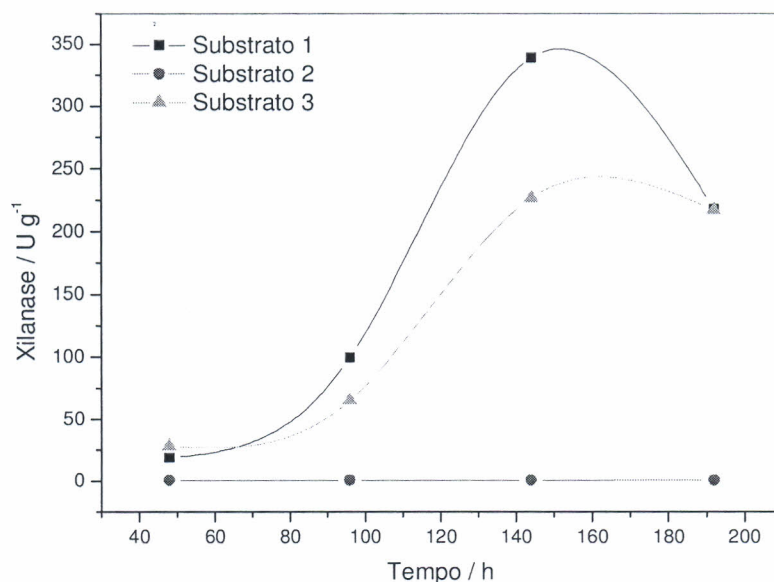


Figura 3: Produção de xilanases em FES pela linhagem de *T. polysporum* utilizando substrato 1 (bagaço de cana e farelo de trigo 1:1), substrato 2 (bagaço de cana) e substrato 3 (farelo de trigo)

Figure 3: Xylanases production in SSF by strain of *T. polysporum* using substrate 1 (sugarcane bagasse and wheat bran 1:1), substrate 2 (sugarcane bagasse) and substrate 3 (wheat bran)

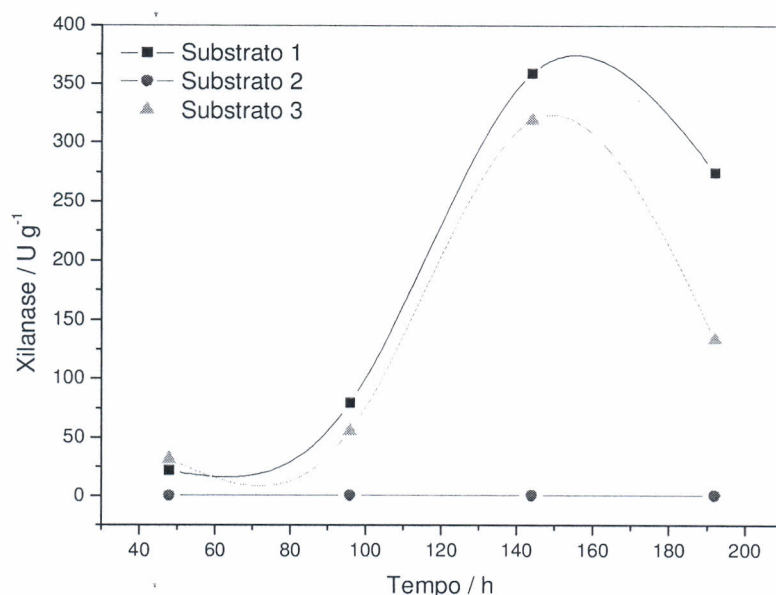


Figura 4: Produção de xilanases em FES pela linhagem de *T. harzianum* utilizando substrato 1 (bagaço de cana e farelo de trigo 1:1), substrato 2 (bagaço de cana) e substrato 3 (farelo de trigo)

Figure 4: Xylanases production in SSF by strain of *T. harzianum* using substrate 1 (sugarcane bagasse and wheat bran 1:1), substrate 2 (sugarcane bagasse) and substrate 3 (wheat bran)

A produção de xilanase no substrato S_2 foi prejudicada, pois ambas as linhagens não tiveram crescimento. Tal fato pode ser explicado provavelmente, pela composição do bagaço de cana, pois este possui menor quantidade de nutrientes que o farelo de trigo, como mostra a Tabela 1acima, e também pela falta de umidade do meio.

Os resultados mostraram também, que a produtividade enzimática de CMCase não variou muito entre as linhagens de *T. polysporum* e *T. harzianum* estudadas.

Ruegger e Tornisielo (2004) obtiveram atividade de xilanase de até 232,8 U/g por linhagens de *T. harzianum* em FES utilizando farelo de trigo como substrato sem nenhuma suplementação. Gutierrez-Correa e Tengerdy (1998) utilizaram bagaço de cana-de-açúcar como substrato, mostrando bons resultados, em termos de atividade de xilanase (2600 U/g) em um cultivo misto de *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus phoenicis*. Observou-se, ainda, neste trabalho, que a utilização de farelo de soja nos meios, como suplemento em termos de fonte de nitrogênio, favoreceu a produção de xilanase.

A produção de celulasas e xilanases por FES vêm sendo investigada visando avaliar o efeito de diversos fatores sobre a produção enzimática, bem como buscar estratégias para a otimização da produção. A escolha do melhor substrato indutor de celulase e xilanase e do microrganismo, o efeito da fonte de nitrogênio sobre a produção da enzima, os efeitos da umidade do meio, pH e temperatura do cultivo e a influência da aeração nos sistemas são as principais variáveis que influenciam na produção de enzimas por FES.

De acordo com os resultados pode-se inferir que a produção de celulasas e xilanases pelas linhagens de *T. polysporum* e *T. harzianum* em meio aos substratos S_1 e S_3 como fonte de carbono pode ser promissora, sendo futuramente aplicadas ao bagaço de cana-de-açúcar para promover a hidrólise enzimática do mesmo. No entanto, nos trabalhos futuros devemos otimizar a extração das enzimas, podendo considerar outras metodologias, afim de aumentar o rendimento, e testar a combinação de outros substratos de forma a induzir uma maior produção.

AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA - Instrumentação Agropecuária em São Carlos (SP) pela bolsa concedida e ao Laboratório de Controle Biológico da EMBRAPA - Semi-árido em Petrolina (PE)/EMBRAPA – Agroindústria Tropical em Fortaleza (CE).

REFERÊNCIAS

- BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 551–573, 2008.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2008. <http://conab.gov.br/conabweb>. Acessado em janeiro 2009.
- CONÇALVES, A. R.; MORIYA, R.Y.; OLIVEIRA, L.R.M.; SAAD, M.B.W. Xylanase recycling for the economical biobleaching of sugarcane bagasse and straw pulps. **Enzyme and Microbial technology**, v. 43, p. 157-163, 2008.
- FARINAS, C. S. ; LEMOS, V. ; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F ; BERTUCCI NETO, V. ; COURI, S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida. *Boletim Técnico Embrapa*, 2008.
- GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE M.A.A.; DA SILVA, R.; GOMES.E. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Animal feed science and technology**, v.144, p. 1-22, 2008.
- GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R. P. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 45 – 47, 1998.
- HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-middle and long-term. **Biomass Bioenergy**, v. 28, p. 384-410, 2005.
- HERNÁNDEZ-SALAS, J.M.; VILLA-RAMÍREZ, M.S.; VELOZ-RENDO, J.S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, N.K.N.; GONZÁLEZ-CE´SAR, R.A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A.; TREJO-ESTRADA, S.R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1238–1245, 2009.
- LAWFORD, H.G.; ROUSSEAU, J.D. Cellulosic fuel ethanol – alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis*. **Appl. Biochemistry Biotechnology**, v. 105, p. 457-469, 2003
- MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulases technology. **J. Ferment Technol.**, v. 54, p. 267-286, 1976.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analyt. Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- PRASAD, S.; SINGH, A., JOSHI, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural industrial and urban residues. **Resour Conserv Recycl.**, v. 50, p. 1-39, 2007.
- RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U.F.; LEMO, V.; FARINAS, C.S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Evaluation of agroindustrial residues as substrates for cellulolytic enzymes production under solid state fermentation. *VII Encontro da SBPMat (Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais)*, Guarujá, v. 1. p. 134, 2008.
- RUEGGER, M. J. S.; TORNISIELO, S. M. T. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, v. 27, p. 205-211, 2004.

SAKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, p. 421-424, 2009.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.

XIA, L.; CEN, P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 909-912, 1999.