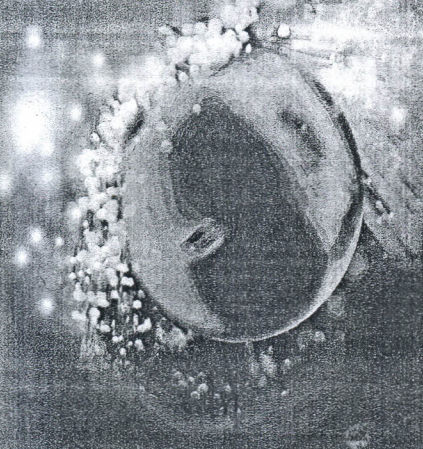


4º CONGRESSO
internacional de
BIOENERGIA
4th International Bioenergy Congress



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

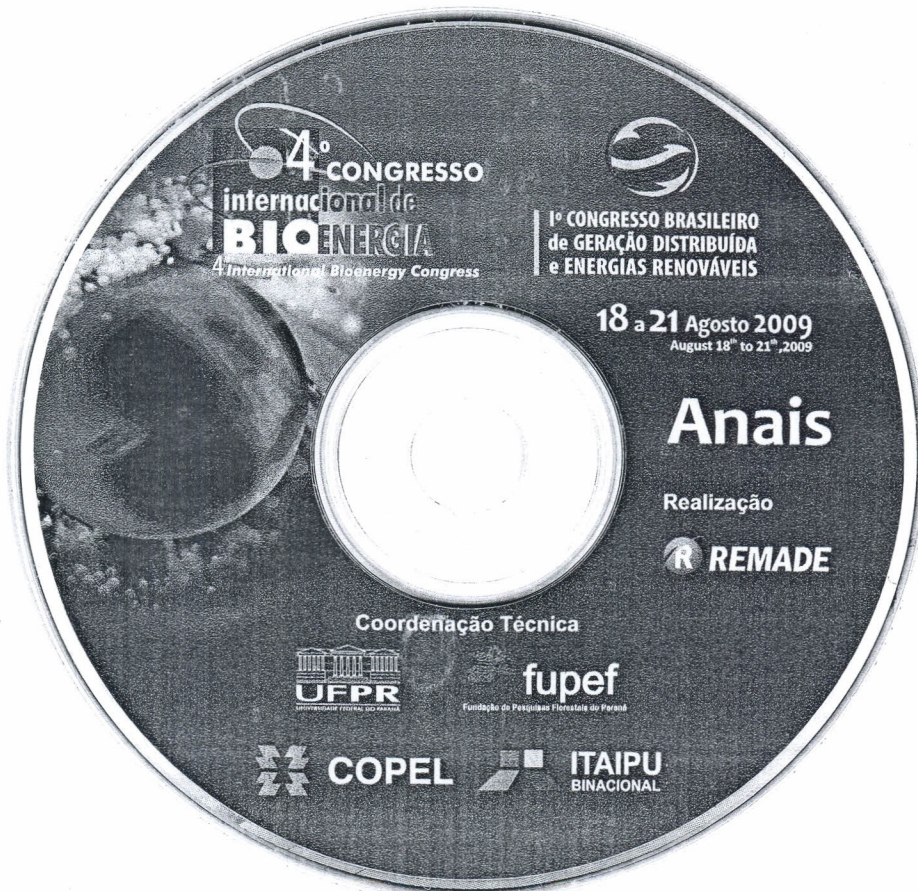
Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná



18 a 21 Agosto 2009

August 18th to 21th, 2009

EXPO UNIMED CURITIBA
CURITIBA-PARANÁ-BRASIL



INFLUÊNCIA DO MEIO DE SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS UTILIZANDO DIFERENTES RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Viviane Antunes Lemo¹, Ursula Fabiola Rodríguez Zúñiga², Victor Bertucci Neto³, Sonia Couri⁴, Cristiane Sanchez Farinas⁵

¹Estudante de graduação do Curso de Farmácia – UNICEP, São Carlos, SP, vivilemo@hotmail.com ; ²engenheira química, doutoranda no Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, ursula@cnpdia.embrapa.br; ³engenheiro eletrônico, doutor em engenharia eletrônica, Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos-SP, victor@cnpdia.embrapa.br, ⁴Bióloga, doutora em engenharia química, scoury@ctaa.embrapa.br, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro-RJ; ⁵engenheira química, doutora em engenharia química, Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos-SP, cristiane@cnpdia.embrapa.br.

Resumo

O aproveitamento de resíduos agroindustriais mediante a conversão bioquímica visando à produção de etanol celulósico é uma oportunidade promissora em contextos de crescente demanda energética. Um dos desafios dessa rota é o alto custo das enzimas celulolíticas. Uma alternativa para a redução de custos é a produção dessas enzimas através do processo de fermentação semi-sólida (FSS) utilizando como substratos resíduos agroindustriais. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação nutricional no cultivo em FSS do fungo *Aspergillus niger* em diferentes substratos (farelo de trigo, farelo de soja, bagaço de laranja, bagaço de cana) e com dois meios de suplementação (Mandels & Weber e Czapeck Dox) visando a potencialização da biossíntese enzimática. As melhores produtividades apresentaram valores de 18,8UI/g de CMCase, 31,9UI/g de xilanase (ambos utilizando farelo de trigo) e 57,3UI/g para β -glicosidase utilizando farelo de soja. Esses resultados representaram aumentos significativos devido à suplementação de fontes de carbono e nitrogênio no meio de Mandels, demonstrando que sua adequada formulação é essencial para viabilizar a produção de celulasas a partir de resíduos agroindustriais. As menores produtividades resultantes no bagaço de laranja e de cana referem-se ao baixo teor nutricional apresentado por esses substratos, demonstrando necessidades de suplementação ainda maiores que as concentrações avaliadas no trabalho.

Abstract

Influence of the supplement nutritional medium in the cellulolytic enzymes production by using different agroindustrial residues

The uptake of the agroindustrial and byproducts by means of the biochemical conversion to produce lignocellulosic ethanol is a promissory opportunity in the context of the growing energetic demand. Even so, one of the challenges of this technology is the high costs of the cellulolytic enzymes. One alternative for these costs reduction is the use of the semi-solid fermentation (SSF) in the production of cellulases, due to the possibility of the utilization of agro industrial residues. Thus, the aim of this study was to evaluate the nutritional supplementation effect in the culture by SSF of the fungi *Aspergillus niger* in different substrates (wheat bran, soy bran, orange bagasse and sugarcane bagasse) and in two supplementation medium (Mandels & Weber e Czapeck Dox) in order to improve the enzymatic production. Activities of 18,8UI/g in CMCCase and 31,9UI/g in xylanase were registered in when wheat bran and values of 57,3UI/g in β -glicosidase were reached using soy bran. The results represented increasing in enzymatic production due to carbon and nitrogen sources addition, supplied in Mandels medium, showing that its suitable formulation is essential for the viability of the cellulases production from agroindustrial residues. The lower productivities resulted in orange and sugarcane bagasses can be explained by its low nutritional composition with higher nutritional necessities than the evaluated in the present study.

INTRODUÇÃO

A celulose é a fonte natural renovável mais abundante do planeta e a produção de energia baseada na matriz lignocelulósica é uma importante rota alternativa que vem sendo mundialmente estudada e debatida. E entre as fontes de biomassa celulósica que podem ser utilizadas para a produção de energia, especialmente na forma de biocombustíveis, destacam-se os resíduos agroindustriais (TENGERDY e SZAKACS, 2003).

Assim, também existem diferentes configurações tecnológicas para a produção de etanol celulósico, mas na atualidade a que tem apresentado maiores vantagens do ponto de vista socioeconômico e ambiental é a rota baseada na hidrólise enzimática da biomassa (TENGERDY e SZAKACS, 2003). No entanto, sua implementação em escala industrial e comercial depende fortemente da redução no custo das enzimas. As celulasas, enzimas que atuam na hidrólise do material celulósico em açúcares fermentescíveis, representam em torno do 25-40% dos custos totais na produção de etanol (ZHANG et al., 2006).

O processo de produção de celulasas em substratos sólidos, chamada fermentação em estado sólido (FSS), tem se mostrado vantajoso para o crescimento de fungos filamentosos, pois simula o habitat natural destes microrganismos. Além do mais, a produção de enzimas tem mostrado maiores eficiências e maior estabilidade quando comparada ao processo de fermentação submersa (HOLKER et al., 2004). Outra vantagem da FSS é a possibilidade de conversão de resíduos agroindustriais em produtos de elevado valor agregado.

O Brasil por ser um país com reconhecida tradição agroindustrial, gera aproximadamente 350 milhões de toneladas de resíduos agrícolas anuais, sendo os resíduos provenientes da cana-de-açúcar os mais expressivos em termos de volume (PEREIRA 2006). Portanto, a utilização dos mesmos como substratos para a produção de celulasas por FSS representa uma importante alternativa para redução dos custos das celulasas.

Como todo processo biotecnológico, a FSS é influenciado pelas condições de cultivo, como pH, temperatura, umidade, tipo e concentração da fonte de carbono, nitrogênio e nutrientes, entre outras (BRAVO et al., 2000). Neste sentido, diversos meios de suplementação nutricional são usados na literatura a fim de suprir os requerimentos dos microrganismos em termos de carbono, nitrogênio, fósforo, minerais e vitaminas (AGUIAR & MENEZES, 2000).

A escolha do meio de cultura é tão essencial para o sucesso do processo fermentativo quanto à escolha do microorganismo. Nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento do microorganismo favorece a formação das enzimas. A produção ótima e os parâmetros que afetam a síntese enzimática devem ser investigados sempre, pois as condições ótimas variam para os diferentes microrganismos, assim como para diferentes enzimas (SANTOS et al., 2005).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação nutricional no cultivo em FSS do fungo *Aspergillus niger* em diferentes substratos sólidos (farelo de trigo, farelo de soja, bagaço de laranja, bagaço de cana) com a finalidade de potencializar a biossíntese enzimática, tendo em vista contribuir para o desenvolvimento de tecnologias que permitam a redução dos custos na produção das enzimas vista a sua importância estratégica na viabilização da rota enzimática para a produção de biocombustíveis sustentáveis a custos competitivos.

MATERIAL E MÉTODOS

Substrato

Os substratos utilizados (farelo de trigo, farelo de soja, bagaço de cana e bagaço de laranja) foram adquiridos de empresas da região de São Paulo, Brasil.

Eles foram submetidos à moagem para a homogeneização do tamanho de partículas, tendo suas granulometrias padronizadas em peneira de 4 mm, com exceção do bagaço de cana que foi peneirado na granulometria de 1mm.

Microorganismo de Fermentação

O microrganismo utilizado foi uma linhagem do fungo filamentosso *Aspergillus niger* (F12), pertencentes à coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos (RJ). A cultura foi mantida em solo a -18°C e ativada em Agar básico, e após crescimento os esporos foram re-ativados em meio de sabugo de milho (COURI, 1993). A suspensão de esporos para inoculação foi preparada a partir do crescimento em sabugo de milho e a sua quantificação obtida através de contagem dos esporos em Câmara de Neubauer.

Produção enzimática

No estudo para produção das enzimas celulolíticas por FSS verificou-se a influencia de dois meios de suplementação nutricional, Czapeck Dox (CHANDRA et al., 2007) e Mandels (MANDELS & WEBER, 1969), acrescidos de carboximetilcelulose (CMC) como fontes de carbono indutoras. Os componentes do meio e as concentrações utilizadas estão especificados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição dos meios de suplementação usados para a produção de celulases por *A. niger*.
Table 1. Supplementation medium composition used for the cellulases production by *A. niger*.

Meio	Componente	Concentração (g/L)
Mandels & Weber	Carboximetilcelulose	5,00
	Uréia	0,30
	Peptona	0,75
	Extrato de levedura	0,25
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,40
	Minerais ¹	2,70
Czapeck	Carboximetilcelulose	5,00
	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30,00
	NaNO ₃	2,00
	Minerais ³	2,00

¹. KH₂PO₄=2,00 g/l; MgSO₄.7H₂O=0,30 g/l; CaCl₂.2H₂O= 0,40 g/l; ZnSO₄=1,40 mg/l; FeSO₄.7H₂O=5,00 mg/l; CoCl₂.6H₂O=2,00 mg/l; MnSO₄.5H₂O=1,60 mg/l.

³. KH₂PO₄=1,00 g/l; MgSO₄.7H₂O=0,50 g/l; KCl=0,50 g/l; FeSO₄.7H₂O=0,01mg/l

As fermentações foram realizadas em frascos contendo 10 g do substrato sólido, com exceção do bagaço de cana que se utilizou 5 g. A umidade foi ajustada em 50% adicionando os meios de suplementação. Os frascos, contendo o meio de fermentação foram autoclavados a 1 atm por 15 min. O volume de suspensão de esporos adicionado foi ajustado de modo a ter-se uma concentração de 10⁷ esporos por g de substrato sólido, posteriormente o meio de FSS foi incubado segundo Rodríguez-Zúñiga et al. (2008); para posterior extração do complexo enzimático. A extração do complexo enzimático foi realizada adicionando-se tampão acetato 0,2 M pH 4,5 (COURI, 1993). Após homogeneização, as amostras foram incubadas em banho termostático “shaker” e depois filtradas e centrifugadas. Os extratos assim obtidos foram submetidos a análises enzimáticas para determinar a sua concentração em relação à CMCCase, xilanase e β- glicosidase. Todos os experimentos de FSS assim como os ensaios de atividades enzimáticas foram feitos em duplicatas.

Determinação da Atividade Enzimática

As atividades enzimáticas CMCCase, xilanase e B-glicosidase dos extratos obtidos dos diferentes substratos foram quantificados e os resultados foram expressos como unidades de atividades por massa de substrato inicial seco. A atividade endoglucanase total foi avaliada segundo metodologia proposta por MANDELS (1974), utilizando-se como substrato carboximetil celulose. A atividade de xilanase foi avaliada segundo BAILEY et al. (1992), usando se xilana como substrato. As quantidades de açúcares redutores produzidas, expressas em glicose, foram determinadas pelo método do ácido dinitrossalicílico, DNS (MILLER, 1959). Finalmente, a atividade β-glicosidásica foi realizada utilizando como substrato a celobiose (Sigma, EUA) e quantificando os açúcares liberados com a utilização de um reativo enzimático para dosagem de glicose (Laborlab, Brasil).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os complexos enzimático resultantes da FSS de cada um dos substratos nos dois meios de suplementação utilizados foram caracterizados com relação à suas atividades de endoglucanase (CMCase), xilanase e β glicosidade.

Os resultados nas atividades de CMCCase com os substratos são demonstrados na Figura 1. As melhores produtividades em termos de CMCCase foram obtidas utilizando o farelo de trigo como substrato sólido (18,8 UI/g), seguida do farelo de soja (13,1 UI/g), ambos no meio de Mandels. Foi observado também que o bagaço de laranja teve melhor desempenho quando complementado com o meio de Czapeck Dox, com atividades comparáveis às obtidas com o farelo de soja (12,8 UI/g). No entanto, o bagaço de cana não atingiu atividades expressivas quando comparadas com os outros substratos avaliados.

Estes resultados são superiores aos descritos por Chandra et al (2007) que relatam valores máximos de CMCCase de 3,24 UI/g na FSS de farelo de trigo com meio de Czapeck Dox.

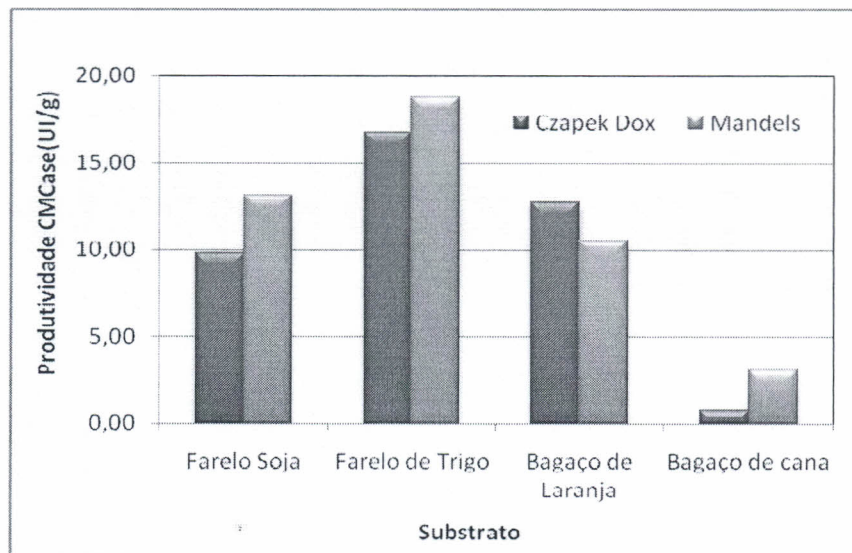


Figura 1: Atividade de CMCase nos complexos enzimáticos obtidos com os diferentes substratos utilizando Meio de Mandels e Czapeck Dox modificados.

Figure 1: CMCase activity in the enzymatic complex obtained with the substrates using modified Mandels and Czapeck Dox mediums.

Em relação às produtividades em termos da enzima xilanase, os melhores substratos sólidos foram também o farelo de trigo (31,90 UI/g) e o farelo de soja (14,1 UI/g), com o meio de Mandels (Figura 2). E de maneira similar que com a atividade endoglucanase, o bagaço de laranja, forneceu os melhores resultados (13,1 UI/g) no meio Czapeck Dox.

O efeito da composição do meio de suplementação na produtividade é demonstrada por vários trabalhos. Assim, Park et al. (2002) conseguiram acréscimos nas atividades enzimáticas de 100 vezes após planejamento experimental dos componentes nutricionais na FSS em palha de arroz com *Aspergillus niger*.

Pode-se observar também que a adição dos meios de suplementação no bagaço de cana não forneceu diferenças significativas na produtividade xilanolítica, se mantendo em geral em torno de 2 UI/g.

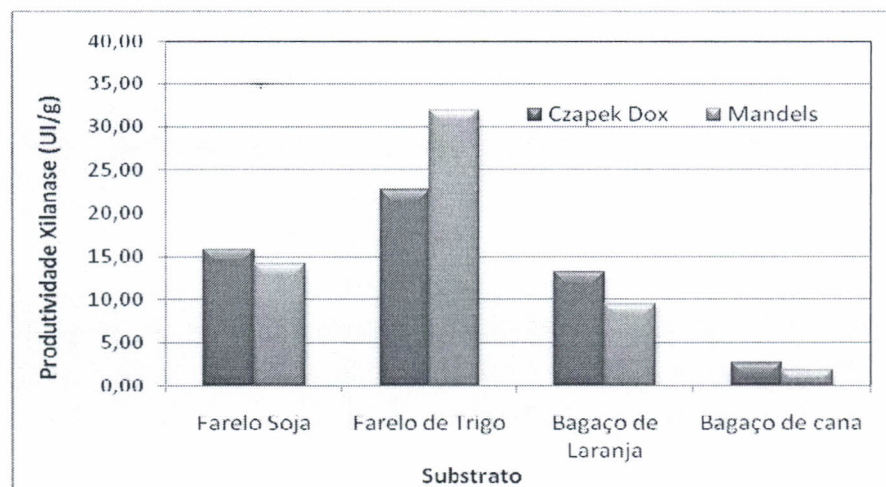


Figura 2: Atividade de xilanase nos complexos enzimáticos obtidos com os diferentes substratos utilizando Meio de Mandels e Czapeck Dox modificados.

Figure 2: Xylanase activity in the enzymatic complex obtained with the substrates using modified Mandels and Czapeck Dox mediums.

Em relação à produtividade em termos da enzima β -glicosidase, o efeito indutivo do meio de Mandels mostrou sua máxima expressividade quando comparado ao meio Czapeck Dox (Figura 3) cujos valores foram incrementados entre 10 e 15 vezes no farelo de soja (57,3 UI/g), no farelo de trigo (37,3 UI/g) e no bagaço de cana (16,7 UI/g) em relação aos resultados obtidos com o meio Czapeck.

Os resultados obtidos em relação à β -glicosidase corroboram a vantagem do uso de *Aspergillus niger* em relação aos outros microrganismos descritos na literatura como bons produtores de celulases, como por exemplo os fungos do gênero *Trichoderma*.

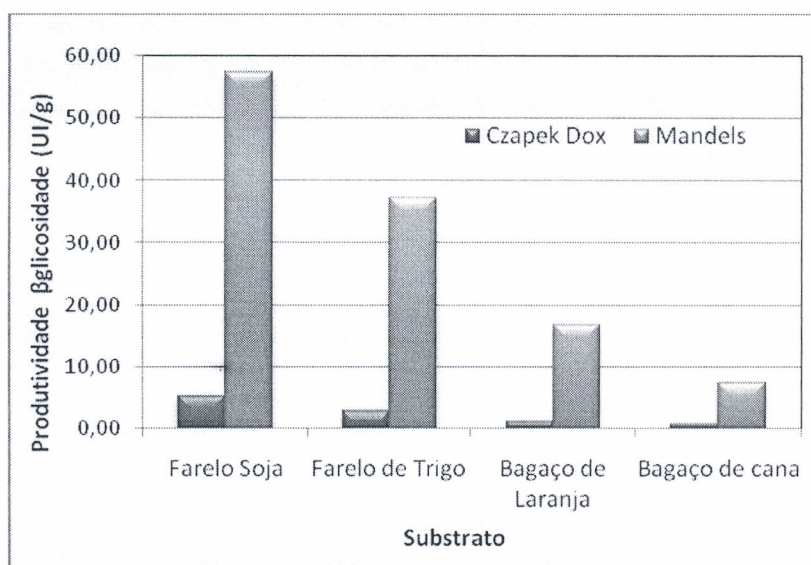


Figura 3: Atividades de β -glicosidase nos complexos enzimáticos obtidos com os diferentes substratos utilizando Meio de Mandels e Czapeck_Dox modificados.

Figure 3: β -glicosidase activity in the enzymatic complex obtained with the different substrates using modified Mandels and Czapeck Dox mediums.

Uma comparação geral entre os substratos sólidos avaliados permite concluir que enquanto o farelo de trigo mostrou as melhores atividades em endoglucanase e xilanase, o farelo de soja destacou-se pelas elevadas atividades obtidas na enzima β glicosidase.

Cabe mencionar que ambos os substratos são amplamente utilizados como fonte de carbono na produção de celulases por fungos filamentosos, devido à elevada presença de nutrientes e proteínas na sua composição e características físicas como textura adequada para retenção de umidade e ampla área superficial (SINGHANIA et al, 2009).

Por outro lado, apesar do bagaço de laranja apresentar diferenças composicionais e estruturais quando comparado com os farelos de trigo e de soja, ele mostrou resultados promissores com o meio de Czapeck Dox, em relação à produção de endoglucanase e xilanase, os quais podem ser aprimorados depois de uma apropriada formulação do meio nutricional.

Neste trabalho, as baixas produtividades mostradas pelo *Aspergillus niger* no bagaço de cana-de-açúcar devem-se principalmente à reconhecida recalcitrância na matriz lignocelulósica, o que dificulta seu aproveitamento como substrato para o microorganismo. No entanto à adição de fontes indutoras de carbono, nitrogênio e fósforo no meio de suplementação para a FSS do bagaço, como, oligossacarídeos, substâncias nitrogenadas orgânicas e inorgânicas poderão reverter às carências nutricionais próprias do substrato.

Assim, verificou-se que o uso do meio de Mandels & Weber forneceu os melhores resultados de atividade enzimática na maioria dos substratos utilizados, evidenciando mais uma vez a relevância da utilização de uma fonte de carbono indutora, como a carboximetilcelulose para conseguir melhores condições para a biossíntese enzimática. Além disso, o maior teor de fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas no meio de Mandels (uréia, peptona, extrato de levedura e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) permitiram potencializar também o mencionado efeito.

Contudo, Kowala & Sengupta (1992) demonstraram a importância do nitrogênio no metabolismo celular do *Aspergillus niger*, testando diversas fontes suplementares em função do crescimento microbiano, Os

resultados em função da síntese de celulasas seguiu a seguinte ordem crescente: Uréia > peptona > NaNO₃ > extrato de levedura.

Por outro lado, as baixas produtividades enzimáticas observadas no meio de Czapeck Dox, que contém sacarose na sua composição, podem ser atribuídas à repressão da síntese de enzimas celulolíticas envolvidas na utilização de fontes de carbono de fácil metabolização (SUTO E TOMITA, 2001; VITTI, 1988).

Finalmente, o conhecimento de uma adequada formulação do meio de suplementação nutricional com substâncias indutoras do metabolismo e expressão enzimática, permitirá fornecer bases científicas para um completo aproveitamento microbiano dos diferentes substratos, viabilizando dessa forma, o aproveitamento de resíduos agroindustriais na produção de enzimas celulolíticas e contribuindo para a redução de seu custo de produção.

CONCLUSÕES

Ao se analisar a atividade enzimática nos diferentes ensaios realizados, pode se concluir que entre diferentes resíduos agroindustriais avaliados (farelo de trigo, farelo de soja, bagaço de cana e, bagaço de laranja) como substratos para a produção das enzimas celulasas, o farelo de trigo e o farelo de soja se mostraram como os substratos mais eficientes em termos de produtividade enzimática. No entanto, a sua produtividade varia também de acordo com o meio de suplementação utilizado no processo de fermentação semi-sólida. Desta forma, criteriosa formulação do mesmo poderá contribuir para aumentar a sua produtividade enzimática e assim viabilizar a sua utilização em processos que contribuam na agregação de valor econômico a subprodutos da agroindústria para a produção de enzimas. Por outro lado, é importante mencionar o especial desafio na suplementação do meio do bagaço de cana-de-açúcar, para produção de celulasas com elevada especificidade na hidrólise de resíduos da cadeia de etanol. O aprimoramento da produção desse complexo enzimático específico contribuirá por sua vez na comercialização da cadeia de combustíveis de segunda geração a partir de derivados.

REFERENCIAS

AGUIAR, C. L. E MENEZES, T. J. Produção de celulasas e xilanase por *Aspergillus niger* iz9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar, **CEPPA**, Curitiba, v. 25, p 61-76, 2000.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270, 1992.

BHAT, M. K. & BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 3/4, p. 583-620, 1997.

BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciênc. Agrotec.**, v. 24, p. 137-152, 2000.

CHANDRA, M. S.; VISWANATH, B., E REDDY, B. R. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. **Indian Journal of Microbiology**, v.47, p. 323-328, 1993.

COURI, S. Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 1993.

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 celulasas por fermentação semi-sólida. **Boletim Técnico Embrapa, Instrumentação Agropecuária**, 2008.

HOLKER, U. ET AL. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p. 175-186, 2004.

MANDELS, M. E WEBER, J., The production of cellulases. *Advances in Chemistry Series*, v. 95, p. 391-414, 1969.

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

PEREIRA, R. E. Avaliação do Potencial Nacional de Geração de Resíduos Agrícolas para a Produção de Etanol. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2006.

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. In: VII Encontro da SBPMat (Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais), Guarujá, 2008.

SANTOS, S.F.M.; NÓBREGA, J.E.; PINTO, G.A.S.; MACEDO, G.R.; SILVA, F.L.H; Caracterização do resíduo seco do pedúnculo de caju para obtenção de pectinases por fermentação semi-sólida. IN: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 15, Recife, 2005, 1CD ROM.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. (2009), Recent advances in solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, p.13-18.

TENGERDY, R.P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 169-179, 2003.

ZHANG, Y.H.P., HIMMEL, M.E., MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, v. 24, p. 452–481, 2006.