

# **Produção de etanol celulósico a partir de biomassa florestal com utilização de enzimas lignocelulolíticas**

Cristiane Vieira Helm<sup>1</sup>, Vanessa Bachmann<sup>2</sup>, Edson Alves de Lima<sup>1</sup>, Washington Luis Esteves Magalhães<sup>1</sup>, Lorena Benathar Ballood Tavares<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Engenharia Bioquímica, Universidade Regional de Blumenau - FURB, Blumenau (SC).

<sup>2</sup> Embrapa Florestas, Colombo, PR

E-mail: lorena@furb.br

## **Introdução**

Os materiais lignocelulósicos apresentam grande potencial de uso como matéria prima em processos industriais para produção de bens de consumo diversos como combustíveis, insumos químicos e alimentos (Taylor, 2008). Esta biomassa é constituída de celulose, hemicelulose e lignina, principalmente e apresentam-se como um compósito que deve ser estudado considerando-se suas propriedades químicas e morfológicas (Ferreira, 2009). Destes compostos, a celulose é o componente mais abundante (cerca de 50%), sendo um polímero linear formado exclusivamente por moléculas de glicose. As hemiceluloses são compostas essencialmente pelos anidro-carboidratos da glicose, manose e galactose (hexoses) e xilose e arabinose (pentoses) e representam cerca de 40% da parede vegetal, estando intimamente associadas à celulose e lignina. A macromolécula da lignina é composta basicamente de unidades de fenilpropano, representando de 20 a 30% do total dos lignocelulósicos. Todos estes constituintes estão intimamente associados e/ou ligados quimicamente, construindo uma estrutura celular vegetal muito complexa (Ferreira, 2009).

A produção de etanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos ocorre através das seguintes etapas: (1) degradação da estrutura lignocelulósica de matérias-primas para a liberação de substratos fermentescíveis, (2) fermentação e (3) destilação do mosto fermentado (Olsson & Hahn-hägerdal, 1996). A primeira etapa pode ser considerada um pré-tratamento e há diferentes métodos que tem sido desenvolvidos, mas que visam a extração dos açúcares fermentescíveis (Gírio et al., 2010). O tratamento biológico possui as vantagens de requerer baixa energia e condições ambientais brandas. Entretanto, a taxa de hidrólise é ainda considerada baixa, por isso não é comumente utilizado isoladamente (Binod et al., 2010). O tratamento biológico se dá por processo de hidrólise enzimática e é conduzido por enzimas altamente específicas, liberando açúcares redutores incluindo a glicose. As enzimas são exemplos de substâncias aplicadas nos processos de biorremediação e basicamente, são encontrados dois grupos de enzimas responsáveis pela degradação da lignocelulose, as enzimas oxidativas e as hidrolíticas. As oxidativas, como lacase, manganês-peroxidase (MnP) e lignina-peroxidase (LiP), atuam na degradação da lignina e detoxificam o meio de crescimento dos metabólitos gerados durante a degradação. A degradação e/ou biotransformação da lignina permite que as enzimas hidrolíticas como as xilanases e celulasas atuem nas fontes de carbono (Alexandrino et al., 2007).

Os organismos mais promissores de utilização são os fungos da podridão branca, pertencentes a classe basidiomicetos, pois produzem uma maior quantidade de enzimas em condições de fácil cultivo e manutenção. Estes são os mais efetivos biodegradadores de material lignocelulósico na natureza (Baldrian & Valaskova, 2008). A maioria

produz lacase, uma fenoloxidase extracelular com importante papel na degradação da lignina. Além dessa, a MnP e LiP também são utilizadas na indústria de biopolpação da madeira e no aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para ração animal, degradação de xenobióticos e biorremediação (Díaz et al. 2011; Machado et al., 2005; Regina et al., 2009). A xilanase produzida pelos basidiomicetos, leva à remoção seletiva da hemicelulose e também à obtenção de produtos como xilose e xilo-oligômeros que apresentam potencialidade de aplicação direta na maior produtividade de etanol e em outros ramos, como na indústria de alimentos, como espessantes, substituintes de gordura e aditivos anti-congelantes. As demais enzimas são as celulases, e basicamente, há três tipos, a endoglucanase (endo-1,4-D-glucanohidrolase), e exoglucanase (celobiohidrolase ou 1,4-β-D-glucanocelobiohidrolase) e a β-glicosidase (Baldrian & Valaskova, 2008).

**Palavras-chave:** basidiomicetos, fungos, enzimas, biomassa

### **Objetivo**

O objetivo deste trabalho foi realizar um screening através de análises enzimáticas qualitativas de 33 isolados de macrofungos buscando encontrar os com melhor atividade enzimática para utilização em pré-tratamentos visando a produção de etanol.

### **Metodologia**

Os fungos foram conservados conforme o método Castellani (1967), e mantidos sob refrigeração até início das atividades. Para produção do inóculo, as cepas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio Potato Dextrose Ágar (PDA) por alguns dias em estufa BOD a 25°C ± 1° C até o preenchimento da placa pela colônia.

Para determinação de xilanases, realizaram-se ensaios em placas contendo o meio descrito por Pointing (1999), que consiste de PDA acrescido de 4% de xilana. Cada placa recebeu um disco de micélio de aproximadamente sete mm de diâmetro, também em três repetições. As placas foram incubadas em estufa BOD a 25 ± 1° C, e quando o diâmetro da colônia atingiu 30 mm, seguiu-se o teste de revelação do halo de degradação da xilana, descrito por Tavares et al. (2002). A positividade é indicada pelo aparecimento do halo amarelo opaco em volta das colônias (Pointing, 1999).

Para determinação de celulases, os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo o meio Socarean, um meio sintético com carboximetilcelulose (CMC) e Avicel como únicas fontes de carbono (NaNO<sub>3</sub> : 3,0 g.L<sup>-1</sup> ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 1,0 g.L<sup>-1</sup> ; MgSO<sub>4</sub> : 0,5 g.L<sup>-1</sup> ; KCl: 0,5 g.L<sup>-1</sup> ; FeSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O: 10,0 mg.L<sup>-1</sup> ; CMC: 7.0 g.L<sup>-1</sup> pH: 5,0; ágar: 30,0 g.L<sup>-1</sup> ; Avicel: 7.0 g.L<sup>-1</sup> pH: 5,0). Após preparo dos meios, foi realizada a inoculação de um disco de sete mm de diâmetro de micélio e o cultivo foi mantido em estufa BOD a 25 ± 1° C até obter um crescimento mínimo de 50 mm de diâmetro. Após o crescimento, foram adicionados 5 ml de solução do indicador vermelho congo 0,2% e em seguida, 5 ml de NaCl 0,1 M. O teste é positivo quando há visualização de halo de coloração alaranjada a fracamente amarelada ao redor da colônia.

Todos os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA). Quando a análise de variância demonstrou efeito sobre o resultado (p<0,05) foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância de 5% para comparação entre médias.

## Resultados e Discussão

O diâmetro (em milímetros) obtido nas reações de xilanases e celulases são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultado dos testes para os 33 isolados de fungos nos meios com xilana (Xilanases) e com CMC e Avicel (Celulases). (XIL) Xilanases, (CEL) Celulases, (+) resultado positivo para enzimas, (-) resultado negativo para enzimas, (-----) Não houve crescimento.

Nº de registro	Espécie	XIL	Halo (mm)	CEL	Halo (mm)
1	<i>Amylosporus campbellii</i> (Berk.) Ryvarden	-	0,00 ± 0,00 d	-	0,00 ± 0,00 d
2	<i>Auriscalpium villipes</i> (Lloyd) Snell & E.Dick	-----	-----	+	26,66 ± 2,08 a
3	<i>Flaviporus venustus</i> A.David & Rajchenb.	-	0,00 ± 0,00 d	-	0,00 ± 0,00 d
4	<i>Fomitella supina</i> (Sw.) Murrill	+	12,00 ± 0,20 a	-	0,00 ± 0,00 d
5	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P.Karst.	+	5,00 ± 0,50 c	+	10,00 ± 0,00 c
6	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P.Karst.	-	0,00 ± 0,00 d	+	3,00 ± 0,50 d
7	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P.Karst.	-	0,00 ± 0,00 d	+	5,33 ± 0,28 cd
8	<i>Hydnopolyporus fimbriatus</i> (Fr.) D.A.Reid	-	0,00 ± 0,00 d	-	0,00 ± 0,00 d
9	<i>Hydnopolyporus fimbriatus</i> (Fr.) D.A.Reid	-----	-----	+	1,66 ± 1,52 d
10	<i>Inonotus splitgerberi</i> (Mont.) Ryvarden	+	5,17 ± 1,75 c	+	24,33 ± 4,50 a
11	<i>Lentinula boryana</i> (Berk. & Mont.) Pegler	+	11,00 ± 2,00 ab	+	11,8 ± 0,72 bc
12	<i>Lentinula boryana</i> (Berk. & Mont.) Pegler	-	0,00 ± 0,00 d	+	12,33 ± 1,52 bc
13	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	+	10,00 ± 0,52 ab	-	0,00 ± 0,00 d
14	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	+	5,00 ± 0,86 c	+	4,16 ± 1,75 cd
15	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	+	9,00 ± 0,20 b	+	4,00 ± 2,50 cd
16	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	+	10,00 ± 0,20 ab	-	0,00 ± 0,00 d
17	<i>Lentinus strigellus</i> Berk.	-	0,00 ± 0,00 d	+	3,33 ± 0,57 d
18	<i>Lentinus strigellus</i> Berk.	+	5,00 ± 0,43 c	-	0,00 ± 0,00 d
19	<i>Lentinus crinitus</i> (L.) Fr.	-----	-----	-	0,00 ± 0,00 d

20	<i>Perenniporia</i> sp. Murrill	-	0,00 ± 0,00 d	-----	-----
21	<i>Perenniporia</i> sp. Murrill	-	0,00 ± 0,00 d	+	10,66 ± 1,15 bc
22	<i>Perenniporia</i> sp. Murrill	-	0,00 ± 0,00 d	+	11,33 ± 2,08 bc
23	<i>Phellinus linteus</i> (Berk. & M.A.Curtis) Teng	-	0,00 ± 0,00 d	-	0,00 ± 0,00 d
24	<i>Pleurotus albidus</i> (Berk.) Pegler	-----	-----	-	0,00 ± 0,00 d
25	<i>Pleurotus djamor</i>	-	0,00 ± 0,00 d	+	2,00 ± 0,00 d
26	<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.) Quel.	+	0,33 ± 0,57 d	+	5,00 ± 0,00 cd
27	<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.) Quel.	-	0,00 ± 0,00 d	+	1,33 ± 0,57 d
28	<i>Pleurotus sajor-caju</i> (Fr.) Singer	-	0,00 ± 0,00 d	+	21,66 ± 3,78 ab
29	<i>Oudemansiella canarii</i> (Jungh.) Höhn	-----	-----	-	0,00 ± 0,00 d
30	<i>Oudemansiella canarii</i> (Jungh.) Höhn	-----	-----	-----	-----
31	<i>Tyromyces pulcherrimus</i> (Rodway) G.Cunn.	-----	-----	+	3,93 ± 4,82 cd
32	<i>Xylaria globosa</i> (Spreng. ex Fr.) Mont.	+	9,00 ± 1,00 b	+	17,00 ± 1,00 b
33	<i>Xylaria cubensis</i> (Mont.) Fr.	-	0,00 ± 0,00 d	+	11,00 ± 1,00 bc

Médias ± desvio padrão acompanhadas de letras minúsculas iguais na coluna não diferem pelo Teste de Médias de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

No teste com xilana, constatou-se que os fungos tiveram tempos diferentes para a colônia atingir 30mm de diâmetro e, também, algumas espécies não se adaptaram neste meio de 4% de xilana, ao ponto de não desenvolverem nenhuma hifa. Das 33 espécies testadas, onze (33,3%) apresentaram reação positiva através do aparecimento de um halo amarelo opaco, indicando a degradação da xilana, quinze (45,5%) não produziram esta enzima e sete (21,2%) não se desenvolveram neste meio.

Dos produtores, destacou-se o fungo *Fomitella supina*, de halo com 12mm de raio. O fungo *Lentinula edodes* é o segundo melhor produtor de xilanase neste estudo, com halo de 10mm.

A celulase é um complexo enzimático, cujas enzimas atuam sinergicamente e estão subdivididas em três classes: endo-1,4-β-D-glucanases ou endoglucanases, que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais; exo-1,4-β-D-glucanases ou celobio-hidrolases, responsáveis pela ação nos terminais levando à celobiose; e 1,4-β-D-glucosidades que hidrolisam a celobiose à glicose (Baldrian & Valásková, 2008).

No teste com o Vermelho do Congo constatou-se que vinte isolados (60,6%) se mostraram produtores de celulases, destacando-se os fungos *A. vilipes*, *I. splitgerberi* e

*P. sajor-caju*, onze isolados (33,3%) não se mostraram produtores e dois isolados (6,1%) não se desenvolveram neste meio.

Duas das quatro linhagens de *Lentinula edodes* deste estudo se mostraram produtoras, enquanto as outras não. Esta espécie foi estudada por Pereira Júnior et al. (2003) e seus resultados mostram que *L. edodes* é produtor de celulases. O fato de algumas linhagens não apresentarem produção pode estar relacionado à fragilidade do indivíduo e a dificuldade de se adaptar ao meio de cultivo, enquanto que as outras linhagens possam ser mais resistentes ou agressivas. Além disso, este fungo é capaz de desenvolver hifas e crescer rapidamente e talvez este tempo seja curto para que ocorra produção de celulases. É possível que o mesmo se utilize nos nutrientes já disponíveis e a produção de enzimas seja retardada.

Após os testes, selecionou-se dez isolados, que pela análise estatística mostraram ser os melhores produtores dentro destas condições de seleção. Em ordem de preferência então, *I. splitgerber* foi o melhor produtor de celulases, produzindo xilanases também. Em seguida, estão os fungos *A. vilipes* e *P. sajor-caju*, que embora produzam apenas celulases, se mostraram excelentes produtores, equiparando-se a *I. splitgerber*, mas ficando abaixo na classificação por não produzirem xilanase. Os próximos são 5 *G. lucidum*, 11 *L. boryana* e *X. globosa*. Estes fungos produzem os três tipos enzimáticos, porém em quantidades inferiores aos demais. Por último, foram selecionados 12 *L. boryana*, 21 *Perenniporia* sp., 22 *Perenniporia* sp. e *X. cubensis*, que possuem ainda, bons níveis de produção de celulases, mesmo sem produção de xilanase.

É importante destacar que embora não tenha sido detectada atividade enzimática de alguns fungos, não se pode descartar completamente a sua ausência, pois são vários os fatores que contribuem para a ativação do sistema lignocelulolítico como condições nutricionais e culturais, substrato metabolizável, altos níveis de oxigênio, limite de nitrogênio e várias outras condições de cultivo (Regina et al., 2009). Percebeu-se que muitos trabalhos obtiveram resultados com grande diferença quando o mesmo fungo foi cultivado em meio líquido e sólido. Além disso, os tipos e quantidades de enzimas são também definidos pelo genótipo específico do fungo associado à adaptação a um determinado substrato de crescimento (Shearer, 1995).

## Conclusão

Este estudo contribuiu para o conhecimento de espécies pouco estudadas dentro do contexto de produção enzimática por macrofungos. Os dados indicaram que *Innonotus splitgerber*, *Auriscalpium vilipes* e *Pleurotus sajor-caju* mostraram indicativo de possuir potencial biotecnológico para uso em hidrólise de biomassa florestal pré-tratada, comparativamente aos demais fungos testados. Também se pode constatar que os testes qualitativos em *cup-plate* com meios contendo xilana, CMC e avicel são bons indicadores para seleção de linhagens.

## Agradecimentos

Os autores agradecem as bolsas concedidas pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Florestas (Colombo/PR).

## Referências

ALEXANDRINO, A.M.; FARIA, H.G.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack: Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 364-

368, 2007.

BALDRIAN, P.; VALASKOVA, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 501–521, 2008.

BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R. R.; VIKRAM, S.; DEVI, L.; NAGALAKSHMI, S.; KURIEN, N.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4767-4774, 2010.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 70, p. 181-184, 1967.

DÍAZ, R.; ALONSO, S.; SÁNCHEZ, C.; TOMASINI, A.; BÍBBINS-MARTÍNEZ, M.; DÍAZ-GODÍNEZ, G. Characterization of the growth and laccase activity on strains of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. **Bioresources**, v. 6, n. 1, p.282-290, 2011.

FERREIRA, L. F. R. **Biodegradação de vinhaça proveniente de processo industrial de cana-de-açúcar por fungos**. 2009. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and remazol brilliant blue r decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p.246-252, 2005.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 5, p. 312-331, 1996.

PEREIRA JÚNIOR, J. A. DE S.; CORREIA, M. J.; OLIVEIRA, N. T. Cellulase activity of a *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. Strain growth in media containing carboximetilcellulose or Microcristalline cellulose. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 3, p. 333-337, 2003.

POINTING, S.B. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. **Fungal Diversity**, v. 2, p. 17-33, 1999.

REGINA, M.; BROETTO, F.; GIOVANNOZZI-SERMANNI, G.; MARABOTINI, R.; PERANNI, C.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Atividade de enzimas oxidativas do *Lentinula edodes* em substratos agroindustriais. **Ciências Agrárias**, v. 30, n. 4, p.881-888, 2009.

SHEARER, C.A. Fungal competition. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 1259-1264, 1995.

TAVARES, L. B. B.; SCHMIDELL NETTO, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Proposta de modelo para cálculo de velocidades específicas em sistema com células imobilizadas em gel. **Vetor**, v. 12, p. 19-33, 2002.

TAYLOR, G. Biofuels and the biorefinery concept. **Energy Policy**, v. 36, n. 12, p. 4406-4409, 2008.