

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Filtração Durante Cultivo Submerso Incrementando a Produção de Celulases e Xilanases

Carla Eliana Todero Ritter, Kaliane Regalin Aver, Aldo José Pinheiro Dillon

Universidade de Caxias do Sul- Laboratório de Enzimas e Biomassa

Caixa Postal 1352 – 95070-560 Caxias do Sul – RS - E-mail: cetodero@gmail.com

RESUMO

A etapa de produção da enzima e a etapa de hidrólise da celulose sofrem interferência da concentração de açúcares, respectivamente por repressão catabólica e inibição enzimática pelos produtos. A remoção destes açúcares, realizada por filtração com membranas planas, aumenta a produtividade enzimática. Neste trabalho foram realizados ensaios em frascos sob agitação em meio contendo celulose e açúcares como fonte de carbono para a produção de celulases e xilanases, do qual foram removidos os produtos solúveis da hidrólise. Os meios contendo celulose (indutor) e açúcares redutores (inibidores) indicaram que as enzimas apresentaram maior atividade quando a filtração removeu parte do permeado após 18 h de cultivo (xilanase e FPA). O processo de filtração demonstrou-se satisfatório, pois permitiu a remoção de açúcares que possivelmente tiveram um efeito positivo na atividade enzimática.

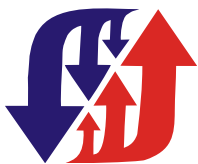
Palavras-chave: repressão catabólica, celulases, açúcares, inibição.

INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica tem sido reconhecida como uma matéria-prima para a produção de inúmeros produtos de alto valor agregado, como álcoois e biocombustíveis. A produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas é influenciada negativamente pela concentração de glicose, mecanismo conhecido como repressão pela glicose, cujo controle principal se dá em nível de transcrição (Foreman *et al.*, 2003). Somente após o consumo da glicose, os fungos começaram a produzir β -glicosidase e endoglicanases (Jørgensen *et al.*, 2003). Antes da glicose ser completamente consumida (2 a 4 g.L⁻¹), baixa atividade de β -glicosidase foi detectada em cultivos de três espécies de *Penicillium* (Jørgensen *et al.*, 2005; Jørgensen *et al.*, 2003).

Estratégias para minimizar os efeitos de repressão pela glicose estão na obtenção de mutantes parcialmente desreprimidos à glicose (Dillon *et al.*, 2006; Dillon *et al.*, 2011) e alterações ao nível do processo fermentativo (Reis *et al.*, 2013). A remoção de açúcares de rápido metabolismo durante a obtenção de celulases e xilanases pode aumentar a atividade enzimática no meio e reduzir o efeito da repressão catabólica. O referido processo pode ser realizado com o uso de membranas seletivas para retirada de inibidores, na produção de complexos enzimáticos, visando à tecnologia do bioetanol (He *et al.*, 2012; Andric *et al.*, 2010).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência da remoção de produtos solúveis da hidrólise e de açúcares repressores na atividade celulolítica e xilanolítica de



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Penicillium echinulatum durante cultivo submerso, utilizando filtração com membranas poliméricas, como uma possível estratégia de modular a repressão catabólica.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

A linhagem *P. echinulatum* S1M29, da coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassa do Instituto de Biotecnologia foi empregada para a produção de celulases e xilanases.

Análise enzimática

A atividade enzimática sobre papel-filtro (FPA) foi realizada como descrito por Camassola e Dillon (2012). Endoglicanase e β -glicosidase foram determinadas de acordo com Ghose (1987) e Daroit *et al.*, (2008), respectivamente. As atividades de xilanase foram determinadas de acordo com Bailey *et al.* (1992) e concentrações de açúcares redutores foram estimadas de acordo com Miller (1959).

Cultivo submerso

O meio de cultivo padrão foi composto de 1% (m/v) de celulose cristalina, 0,2% (m/v) de farelo de soja, 0,5% (m/v) de farelo de trigo, 5% de solução de sais (Mandels & Reese, 1957), 0,02% (v/v) de Tween 80[®], 0,02% (v/v) de antiespumante Fluent Cane[®] e água destilada para completar o volume de 100 mL.

Os ensaios com a presença de indutor e inibidor iniciou-se com o inóculo do meio em frascos Duran[®] contendo 50 mL de meio contendo 0,5 g de açúcar solúvel (glicose, sacarose, frutose, celobiose e lactose), 0,2g de celulose, 0,02g de Prodex[®] e 0,04g de peptona. Após 24 h e 48 h, o meio foi filtrado e o retido foi transferido para Erlenmeyer contendo 100 mL de meio (0,8 g de celulose, 0,16 g de peptona, 0,08 g de Prodex[®] e 4 mL de solução de sais).

Foram retiradas amostras (10 mL cada) para dosagem enzimática no 3^o, 4^o e 5^o dias de cultivo, com complementação do volume de água evaporado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As amostras para análise da atividade enzimática foram centrifugadas a 400 rpm por 15 min.

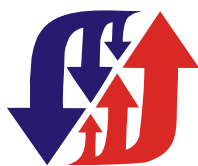
Membranas utilizadas para a filtração

Foram utilizadas para filtração membranas poliméricas planas de PVDF (polifluoreto de vinilideno), em sistema de filtração perpendicular com pressão reduzida. As membranas foram construídas a partir de solução de PVDF a 10% (m/v) pelo método de inversão de fases, tendo com solvente orgânico dimetilformamida e como não solvente, água a 20°C. As membranas foram esterilizadas com solução de hidróxido de sódio a 1% (m/v) por 30 s, lavadas com água destilada e deixadas expostas em câmara de luz ultravioleta, por 5 min.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados dos cultivos submersos contendo inicialmente indutores e inibidores estão apresentados na Figura 1.

Para a atividade de β -glicosidase, a produção enzimática no 4^o dia foi igual ou superior ao meio padrão. Já no 5^o dia, todos os ensaios (exceto celobiose) demonstraram aumento na atividade da enzima quando a filtração ocorreu em 24 h e 48 h.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Na atividade de endoglicanase, aparentemente, a remoção da fração solúvel do meio de cultivo não influenciou positivamente na produção enzimática. Nos ensaios com celobiose e lactose os valores de atividade foram menores, quando a filtração ocorreu em 24 e 48 h, como visto nos períodos de tempo correspondente aos 3^o, 4^o e 5^o dias de cultivo.

Em relação à atividade sobre papel-filtro (Figura 1 C), como visto no terceiro dia de cultivo, a presença dos açúcares no início do cultivo aparentemente aumentou o tempo para a secreção, tanto se a filtração ocorreu em 24 h ou 48 h. Porém os cultivos com glicose, sacarose, frutose mostraram maiores atividades em relação ao controle, no 4^o dia de cultivo, quando a filtração ocorreu às 24 h. Quando a filtração ocorreu em 48 h, os cultivos com sacarose e frutose apresentaram as maiores atividades para FPA, como verificado no 4^o e 5^o dias de cultivo, com o cultivo com a frutose apresentando a maior atividade no 5^o de cultivo.

Em relação ao efeito na secreção de xilanases (Figura 1D) no terceiro dia, com exceção do cultivo com lactose, todos tiveram atividade enzimática reduzida em relação ao padrão.

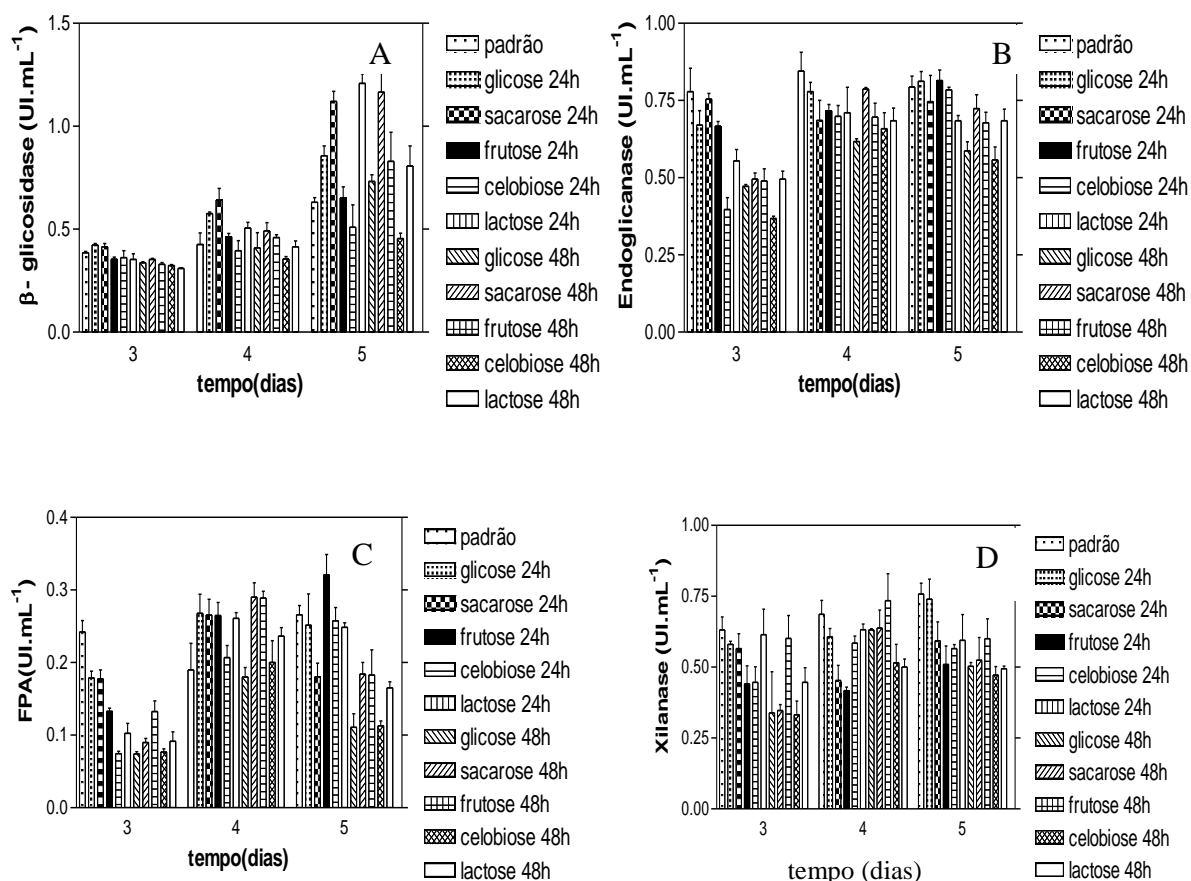
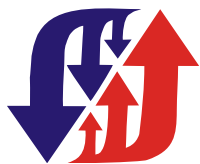


Figura 1. Atividade enzimática de meios contendo fontes de carbono solúveis e celulose durante cultivo submerso após filtração de fase líquida em 24 e 48 h com membranas planas.

O efeito inibitório e repressor dos subprodutos da hidrólise e da produção de enzimas também foi investigado por Murphy *et al.* (2013). Os autores investigaram as cinco principais



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

celulases de *T. reesei*, Cel7A (anteriormente cbh1), Cel6A (cbh2), Cel7B (GE1), Cel5A (GE2) e Cel12A (EG3), por sua sensibilidade à glicose e produtos celobiose. A inibição mais forte foi encontrada para Cel7A, que apresentou perda de atividade de 50% em 19 mmol.L⁻¹ celobiose (IC₅₀ = 19 mmol.L⁻¹). A outra exoglicanase, Cel6A, foi muito menos inibida por celobiose, mas mostrou a sensibilidade mais elevada à glicose entre todas as enzimas investigadas. As enzimas endoglicanases Cel12A e Cel7B foram moderadamente inibidas por celobiose (IC₅₀ = 60-80 mmol.L⁻¹), e fracamente inibidas por glicose.

CONCLUSÕES

Os dados apresentados permitiram avaliar o efeito da remoção de açúcares durante o cultivo sobre a secreção de enzimas, além de avaliar que a produção de enzimas da linhagem S1M 29 de *P. echinulatum* pode ser aumentada com a aplicação de processos de filtração.

A remoção do permeado influencia positivamente na produtividade de β-glicosidase com aumento de 80% e negativamente para xilanase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrić P, Meyer, AS, Jensen, P A, Johansen KD .2010. Effect and Modeling of Glucose Inhibition and In Situ Glucose Removal During Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Wheat Straw. *Applied Biochem Biotechnology* 160:280–297 DOI 10.1007/s12010-008-8512-9
- Bailey MJ, Biely P, Poutanen K.1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnology* 23, 257-270.
- Daroit, DJ, Simonetti A, Hertz PF, Brandelli, A. 2008. Purification and characterization of extracellular β-glucosidase from *Monascus purpureus*. *Journal Microbiol. Biotechnology* 18, 933-941.
- Dillon, AJP, Pozza, F, Andrighetti T, Bettio M, Camassola M. 2011. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. *Journal Applied. Microbiol.*,v. 111(1), p. 48-53.
- Foreman, PK, Brown D, Dankmeyer L, Dean, R, Diener S, Dunn-Coleman, NS, Goedegebuur, F, Houfek, T.D., England G.J, Kelley, A, Meerman, H.J., Mitchell, T., Mitchinson, C., Olivares H.A, Teunissen, P.J, Yao, J,Ward, M. 2003. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Journal Biol Chem*, 278:31988-31997.
- Ghose TK. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Applied. Chem.* 59, 257-268.
- He, Y., Bagley, D.M., Leung, K.T., Liss, S.N., Liao, B.Q. Recent advances in membrane technologies in biorefining and bioenergy production. *Biotechnology Adv.* 30, 817-858., 2012.
- Jørgensen H, Morkeberg A; Krogh KBR; Olsson, L .2005. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: Effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme and Microbial Technology*, v.36, p. 42-48, 2005.
- Jørgensen H, Eriksson T, Börjesson J, Tjerneld F, Olsson L. (2003). Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. *Enzyme Microbial. Technology* 32: 851-861.
- Mandels M, Reese, ET. 1957. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. *Journal Bacteriology* 73, 269-278.
- Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428
- de Vries, R.P., Visser, J., de Graaff, L.H., (1999). CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Res. Microbiol.* 150, 281–285.
- Murphy L, Bohlin C, Baumann, MJ, Olsen S, Sørensen TH, Anderson L, Borch K, Westh P.2013 Product inhibition of five *Hypocrea jecorina* cellulases, Enzyme and Microbial Technology, Volume 52, Issue 3, 5, Pages 163-169, ISSN 0141-0229, <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.01.002>.
- Reis L, Fontana R C , Delabona PS, Lima DJS, Camassola M, Pradella JGC, Dillon AJP. 2013. Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. *Bioresource Technology* 146, 597-603.