

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Hidrólise Enzimática de Capim-elefante pelo Complexo Enzimático de *Penicillium echinulatum* Produzido em Cultivo em Estado Sólido e em Cultivo Submerso

Daiane Menegol¹, Laísa dos Reis¹, Roselei Claudete Fontana¹, Aldo José Pinheiro Dillon¹, Marli Camassola¹

¹Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia
Caixa Postal 1352 – 95070-560 Caxias do Sul – RS - e-mail: dmenegol@ucs.br

RESUMO

A conversão de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis, como o etanol, é uma alternativa ao uso de combustíveis fósseis, por ser menos poluente, pela sua disponibilidade e baixo custo. A biomassa de capim-elefante, com produções entre 40-45 t/ha/ano (massa seca), apresenta-se como uma opção para a produção de etanol. Um dos processos estudados para o aproveitamento da biomassa é a hidrólise enzimática, todavia, é necessário um complexo enzimático eficiente e a realização de um pré-tratamento adequado. Este trabalho avaliou a hidrólise enzimática de *Pennisetum purpureum* pelo complexo enzimático de *Penicillium echinulatum* SIM29 produzido em cultivos submerso (CS) e em estado sólido (CES). A biomassa foi hidrolisada em um reator de hidrólise, utilizando-se 16% (m/v) de substrato e uma concentração de enzima de 30 FPU/g de biomassa. Verificou-se que as enzimas de *P. echinulatum* podem ser utilizadas na hidrólise de lignocelulósicos, como o capim-elefante.

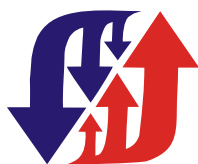
Palavras-chave: capim-elefante, *Penicillium echinulatum*, hidrólise enzimática

INTRODUÇÃO

O processo de biotransformação de lignocelulósicos está centrado na hidrólise enzimática da fração de celulose em glicose, seguida de fermentação a etanol (Gan *et al.*, 2002). Para a produção de complexos enzimáticos capazes de hidrolisar a biomassa, linhagens mutantes de *Penicillium echinulatum* que produzem simultaneamente celulasas e xilanases, encontram-se disponíveis com produções de 35 FPU/g de substrato em cultivo em estado sólido e 8,3 FPU/mL em cultivo submerso (Camassola & Dillon, 2010; Dillon *et al.*, 2011; dos Reis *et al.*, 2013). Além disso, o potencial do *Penicillium echinulatum* para a hidrólise enzimática já foi observado anteriormente (Menegol *et al.*, 2014a; Menegol *et al.*, 2014b).

P. purpureum, com produtividade de 40-45 toneladas de matéria seca por ha/ano, tem sido considerada como uma alternativa às culturas energéticas e espera-se que esta espécie forneça recursos abundantes e sustentáveis de biomassa lignocelulósica para a produção de biocombustíveis (Woodard & Prine, 1993; Xie *et al.*, 2011).

Neste trabalho, foram comparadas enzimas de *P. echinulatum* produzidas em cultivo em estado sólido e em cultivo submerso utilizando-se um reator que permite, concomitantemente, o tratamento físico e a hidrólise enzimática de altas concentrações de biomassa.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAL E MÉTODOS

Crescimento e manutenção da linhagem

Para a produção de enzimas foi utilizada a linhagem S1M29 de *P. echinulatum*, pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassas do IB/UCS. As culturas foram crescidas em tubos de ensaio contendo o meio de crescimento, incubadas por 7 dias a 28 °C até a formação de conídios e os tubos foram estocados a 4 °C.

Produção de enzimas

Os meios de produção enzimática em cultivo em estado sólido (CES) foram constituídos de 50% farelo de trigo, 25% capim-elefante e 25% bagaço de cana-de-açúcar, embebidos em solução mineral (20×) (Mandels & Reese, 1957). Esses foram conduzidos em bandejas contendo cerca de 100 g de substrato e 100 mL de solução mineral, sendo inicialmente autoclavados (121 °C por 30 min). Após, inoculados com 1×10^6 conídios/g de massa seca e mantidos em câmara com umidade relativa em torno de 95% e temperatura de 28-30 °C, por 4 dias. Para a extração enzimática utilizou-se água destilada e tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8. Os sólidos foram removidos por filtração e os filtrados centrifugados a $3000 \times g$, durante 20 min e o sobrenadante foi utilizado nos experimentos de hidrólise enzimática.

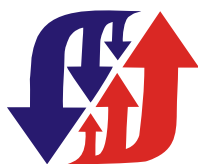
A produção de enzimas em cultivo submerso (CS) foi conduzida em biorreator, sendo o meio constituído de 60 g/L de celulose Celuflok E[®]; 5 g/L de sacarose; 2 g/L de farelo de soja; 5 g/L de farelo de trigo; 0,5 g/L de Prodex[®]; 1 mL/L de Tween 80[®]; 0,02 g/L do antibiótico ciprofloxacino, 500 mL da solução mineral e água destilada para completar o volume de trabalho do biorreator de 5 L. O ensaio no biorreator foi conduzido em regime descontínuo alimentado e os parâmetros físicos e químicos mantidos automaticamente. A temperatura foi mantida a 28 °C e o pH fixo em $6,00 \pm 0,1$. A agitação variou entre 150 e 270 rpm e aeração entre 0,5 e 0,8 vvm para a manutenção da saturação mínima de oxigênio em torno de 30%. A formação de espuma no meio foi controlada pela adição do antiespumante Fluent Cane 114 Polyglycol[®] (Dow Química S.A.). O cultivo iniciou com 5 g/L de celulose e 55 g/L foi adicionado parceladamente a cada hora de cultivo, no intervalo de 0 a 192 h. Após a obtenção da atividade máxima de FPA (236 h) o cultivo foi interrompido. O caldo enzimático foi obtido por filtração e utilizado nos experimentos de hidrólise enzimática.

Dosagens enzimáticas

Para a dosagem de celulases, foi utilizada a análise de atividade enzimática sobre papel filtro (FPA) conforme Ghose (1987), com modificações. Para endoglicanases utilizou-se como substrato carboximetilcelulose 2%, conforme Ghose (1987), com modificações. As β -glicosidases foram dosadas de acordo com Daroit *et al.* (2008), com modificações, empregando *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*NPG) como substrato e as xilanases foram dosadas utilizando-se xilana 1%, segundo Bailey *et al.* (1992), com modificações.

Hidrólise enzimática de capim-elefante

Foi realizada em reator de hidrólise de 2,5 L (Patente No. BR 102015016795-4), com 30 FPU/g de biomassa. A concentração de substrato foi de 16% (m/v) e o volume final foi de 1 L, completado com tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8. O processo de hidrólise foi mantido a 50 °C, sob agitação rotacional de 150 rpm. Volumes de 5 mL foram coletados em 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h, para análise de açúcares (celobiose, glicose, xilose, arabinose) por HPLC em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 60 °C, precedida por pré-coluna Cation-H e eluída com fase móvel H₂SO₄ 5 mmol.L⁻¹ a uma vazão de 0,6 mL/min.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

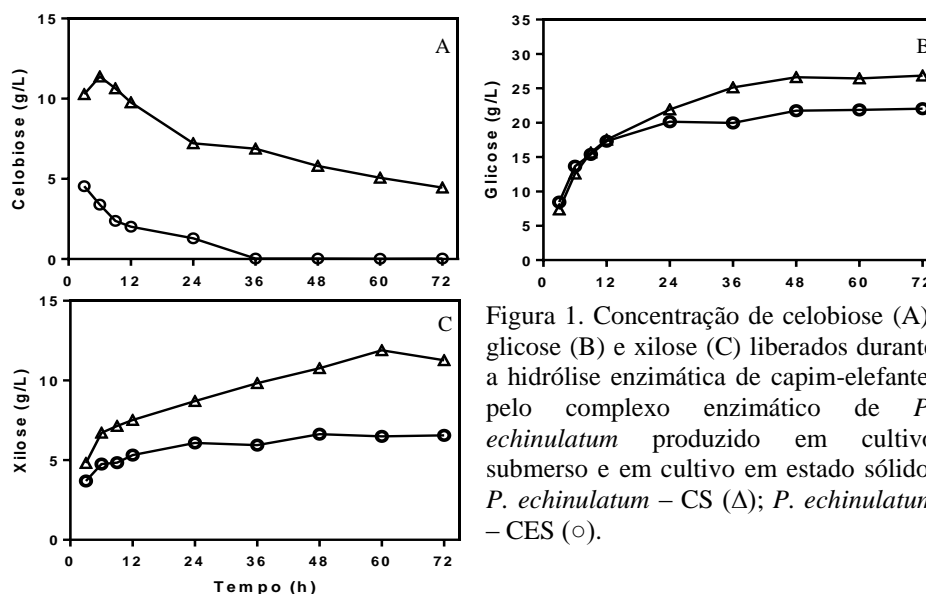
RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 1 são apresentadas as atividades do caldo enzimático de *P. echinulatum* produzido em CS e em CES, onde verifica-se que o caldo proveniente de CES apresentou maiores atividades para a maioria das enzimas analisadas. De acordo com Olsson *et al.* (2003), para *Trichoderma reesei*, maiores níveis de atividade enzimática foram encontrados quando utilizou-se mistura de substratos em cultivos em estado sólido.

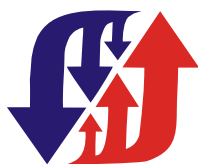
Tabela 1. Atividade sobre papel filtro, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases de enzimas de *P. echinulatum* produzidas em cultivo submerso e em cultivo em estado sólido.

	Atividades Enzimáticas UI/mL			
	FPA	Endoglinacanases	β -glicosidases	Xilanases
CES	22	13,55	272,73	1847
CS	15,35	14,85	18,59	1432

Na Figura 1 pode-se verificar os resultados da hidrólise enzimática de capim-elefante pelo complexo enzimático de *P. echinulatum*. Quanto à concentração de celobiose, maiores concentrações desse açúcar foram mensuradas quando se utilizou as enzimas de *P. echinulatum* produzidas em cultivo submerso (Figura 1A). Esse fato pode ser devido à baixa atividade de β -glicosidases (Tabela 1) das enzimas produzidas em cultivo submerso quando comparada com as enzimas produzidas em cultivo em estado sólido, onde não se observou o acúmulo desse dissacarídeo. Sugere-se que as maiores atividades de β -glicosidases obtidas em CES se devem ao fato do meio conter uma mistura de diferentes substratos indutores. Além disso, o emprego de uma maior quantidade de farelo de trigo também pode ter contribuído para a obtenção maiores atividades dessa enzima, pois conforme Camassola & Dillon (2010), quanto maior a concentração de farelo de trigo empregada, maior a atividade de β -glicosidases. Sørensen *et al.* (2014) demonstraram que a presença de farelo de trigo induz maiores atividades de β -glicosidases para *Aspergillus saccharolyticus*, quando comparado com palha de milho.



Com relação à glicose, até 24 h de hidrólise a liberação desse açúcar foi semelhante para ambas às enzimas. Após esse período, as enzimas produzidas em CS apresentaram os



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

maiores valores, chegando a níveis máximos de liberação de glicose em 72h de hidrólise, com valores de 26,862 g/L para enzimas produzidas em CS e 22,038 g/L para enzimas produzidas em CES (Figura 1B).

Quanto à xilose, as enzimas de *P. echinulatum* produzidas em CS apresentaram valores superiores às produzidas em CES, mesmo que a atividade de xilanases tenha sido maior para as enzimas de CES (Figura 1C e Tabela 1).

Em resumo, mesmo com menores atividades enzimáticas (Tabela 1), o caldo produzido em CS apresentou melhores resultados na liberação de açúcares. Possivelmente, em CS há produção de diferentes tipos de enzimas, as quais não foram analisadas neste trabalho.

CONCLUSÕES

O complexo enzimático de *P. echinulatum* pode ser utilizado para a hidrólise de substratos lignocelulósicos, obtendo-se concentrações de glicose semelhantes para enzimas produzidas em cultivos em estado sólido e em cultivos submersos. Mais estudos devem ser realizados para indicar a viabilidade econômica dos caldos enzimáticos e selecionar qual a condução de cultivo mais adequada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bailey M.J, Biely P, Poutanen K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* 23:257-270.
- Camassola M, Dillon A.J.P. 2010. Cellulases e xilanases production by *Penicillium echinulatum* grown sugar cane bagasse in solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162: 1889-1900.
- Daroit DJ, Simonetti A, Hertz P.F, Brandelli A. 2008. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 933-941.
- Dillon A.J.P, Bettio M, Pozzan F.G, Andrighetti T, Camassola M. 2011. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. *J. Appl. Microbiol.* 111: 48-53.
- dos Reis L, Fontana R.C, Delabona P.da S, Lima D.J. da S, Camassola M, Pradella J.G, Dillon A.J. 2013. Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* SIM29 in batch and fed-batch culture. *Bioresour. Technol.* 146: 597-603.
- Gan Q, Allen S.J, Taylor G. 2002. Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. *Biochem. Eng. J.* 12: 223-229.
- Ghose T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59: 257-268.
- Mandels M, Reese E.T. 1957. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. *J. Bacteriol.* 73: 269-278.
- Menegol D, Luisi Scholl A, Fontana R.C, Dillon A.J.P, Camassola M. 2014a. Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass. *Fuel.* 133(0): 232-240.
- Menegol D, Scholl A.L, Fontana R.C, Dillon A.J.P, Camassola M. 2014b. Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. *Energ. Convers. Manage.* 88(0): 1252-1256.
- Olsson L, Christensen T.M.I.E, Hansen K.P, Palmqvist E.A. 2003. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 612-619.
- Sørensen A, Andersen J.J, Ahring B.K, Teller P.J, Lübeck M. 2014. Screening of carbon sources for beta-glucosidase production by *Aspergillus saccharolyticus*. *Int Biodeterior. Biodegrad.* 93: 78-83.
- Woodard K.R, Prine G.M. 1993. Dry matter accumulation of elephant grass, energy cane and elephant millet in a subtropical climate. *Crop Science.* 33: 818-824.
- Xie X.M, Zhang X.Q, Dong Z.X, Guo H.R. 2011. Dynamic changes of lignin contents of MT-1 elephant grass and its closely related cultivars. *Biomass Bioenerg.* 35: 1732-1738.