

## Produção de celulases e xilanases de *Penicillium echinulatum* S1M29 por cultivo em estado sólido empregando diferentes resíduos agroindustriais

Eduardo Echer dos Reis, Johnatan Vilasboa, Roselei Claudete Fontana, Aldo José Pinheiro Dillon, Marli Camassola

### Introdução

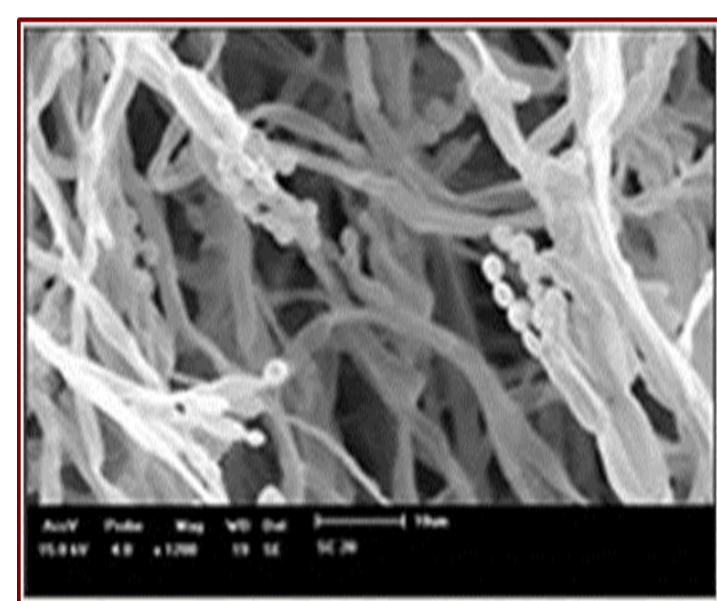
Na busca de fontes renováveis de energia, destacam-se os materiais lignocelulósicos pelo seu potencial biotecnológico e por sua abundância. Visando tornar o processo de produção de etanol economicamente viável, necessita-se reduzir o custo dos preparados enzimáticos. Assim, o cultivo em estado sólido se apresenta como alternativa na redução de custo de produção, pois possibilita a obtenção de títulos enzimáticos superiores aos atuais, além de diminuir os riscos de contaminação e repressão catabólica.

### Objetivo

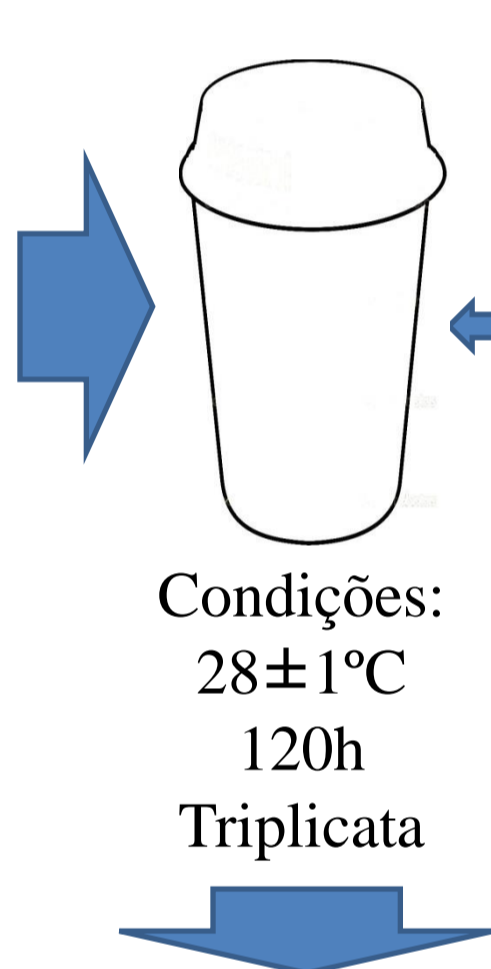
Este estudo teve como objetivo avaliar a produção de celulases de *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo em estado sólido empregando polpa de eucalipto (PE), suplementada com farelo de arroz (FA), farelo de trigo (FT) ou farelo de soja (FS), empregando diferentes concentrações de solução mineral (SM), a fim de testar o efeito da mesma na atividade enzimática.

### Materiais e métodos

#### Determinação do meio de cultivo



1.10<sup>6</sup> esporos de *Penicillium echinulatum* S1M29/g substrato



Condições:  
28±1°C  
120h  
Triplicata

- ✓ polpa de eucalipto, 1,5 g;
- ✓ farelo (de arroz, trigo ou soja), 0,5 g;
- ✓ Solução mineral 1 mL/g de substrato (20 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 14 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 3 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 3 g/L CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>; 3 g/L CaCl<sub>2</sub>; 0,05 g/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,0156 g/L MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 0,014 g/L ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 0,02 g/L CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O).

Amostras coletadas a partir de 48h;  
Suspensão em 10 mL de H<sub>2</sub>O destilada e determinação do pH;  
Extração enzimática com 17 mL de tampão citrato de sódio (50 mmol/L, pH 4,8);  
Filtração e centrifugação (4000 rpm, 20 min);  
Sobrenadante utilizado para análises posteriores.

#### Determinação da concentração de sais

- ✓ polpa de eucalipto, 1,5 g;
- ✓ farelo de arroz, 0,5 g;
- ✓ Solução mineral 0,25;0,5 e 1 ml/g substrato;
- ✓ 28±1°C, 120h, triplicata.

#### Análises enzimáticas

Atividade sobre papel filtro – FPA (Mandels et al., 1976);  
Atividade de endoglicanases (Ghose, 1976);  
Atividade de exoglicanases (Deshpande; Eriksson; Petersson, 1984);  
Atividade de β-glicosidases (Daroit et al., 2008);  
Atividade de xilanases (Bailey et al., 1992).

Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a capacidade de catalisar a liberação de 1 μmol de substrato por min nas condições de cada análise.

#### Análise estatística

- Software GraphPad Prism® 5
- One-way ANOVA com pós-teste de Tukey para p<0,05

### Resultados e Discussão

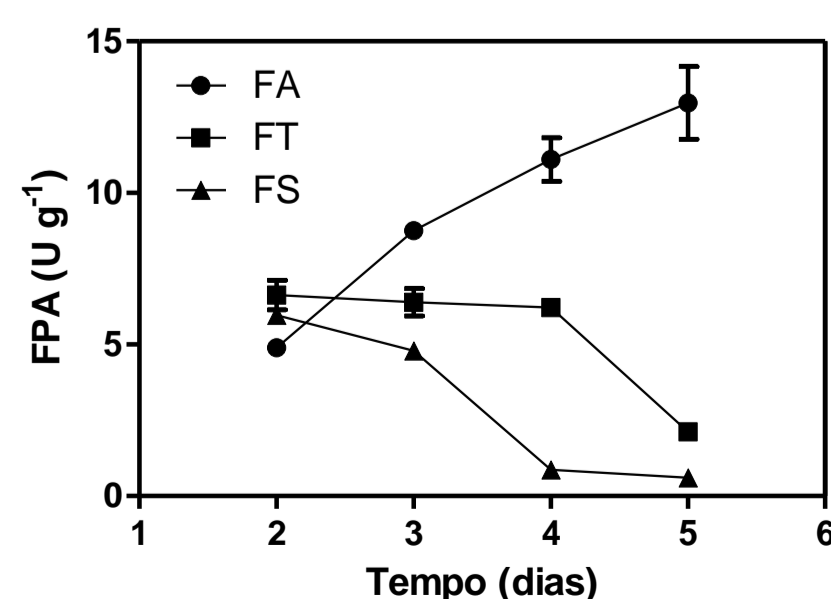
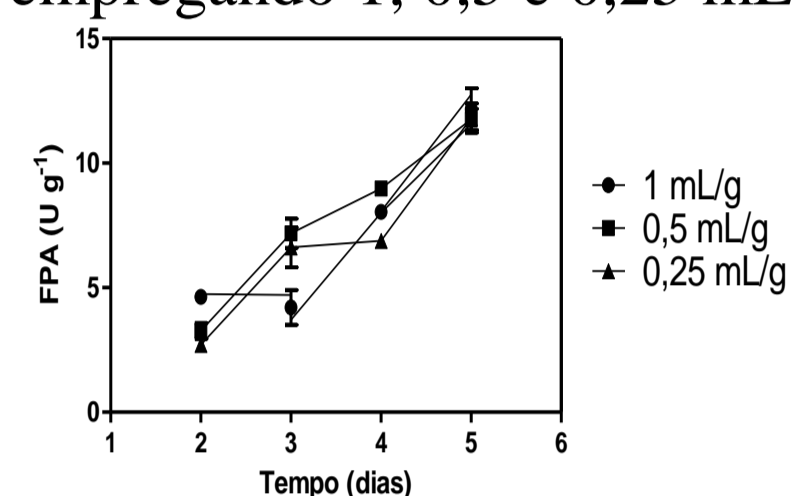


Fig. 1. Atividade sobre papel filtro (FPA) (U g<sup>-1</sup>) proveniente do CES de *P. echinulatum* em meio com PE complementado por FA, FT ou FS.

Ao comparar os resultados de FPA (Fig. 1), que representam a atividade sinérgica do complexo celulolítico, obtidos com os diferentes farelos, observou-se que FA (12,96±1,2 U/g) apresentou títulos significativamente (p<0,05) superiores a FS (6,215±0,183 U/g) e FT (5,963±0,216 U/g), que não apresentaram diferença entre si. Sendo assim, a condição 75%PE+25%FA foi testada quanto à concentração da solução mineral, empregando 1, 0,5 e 0,25 mL/g de substrato.



Não houve diferença significativa para nenhuma das enzimas testadas entre as concentrações de solução mineral avaliadas, o que é interessante no sentido de diminuir custos de produção de enzimas, alcançando, com apenas um quarto da concentração, FPA de 11,81±0,592 U/g, endoglicanases de 80,64±4,5 U/g, exoglicanases de 100,7±8,83 U/g, β-glicosidases de 589,3±19,56 U/g e xilanases de 2304±6,507 U/g.

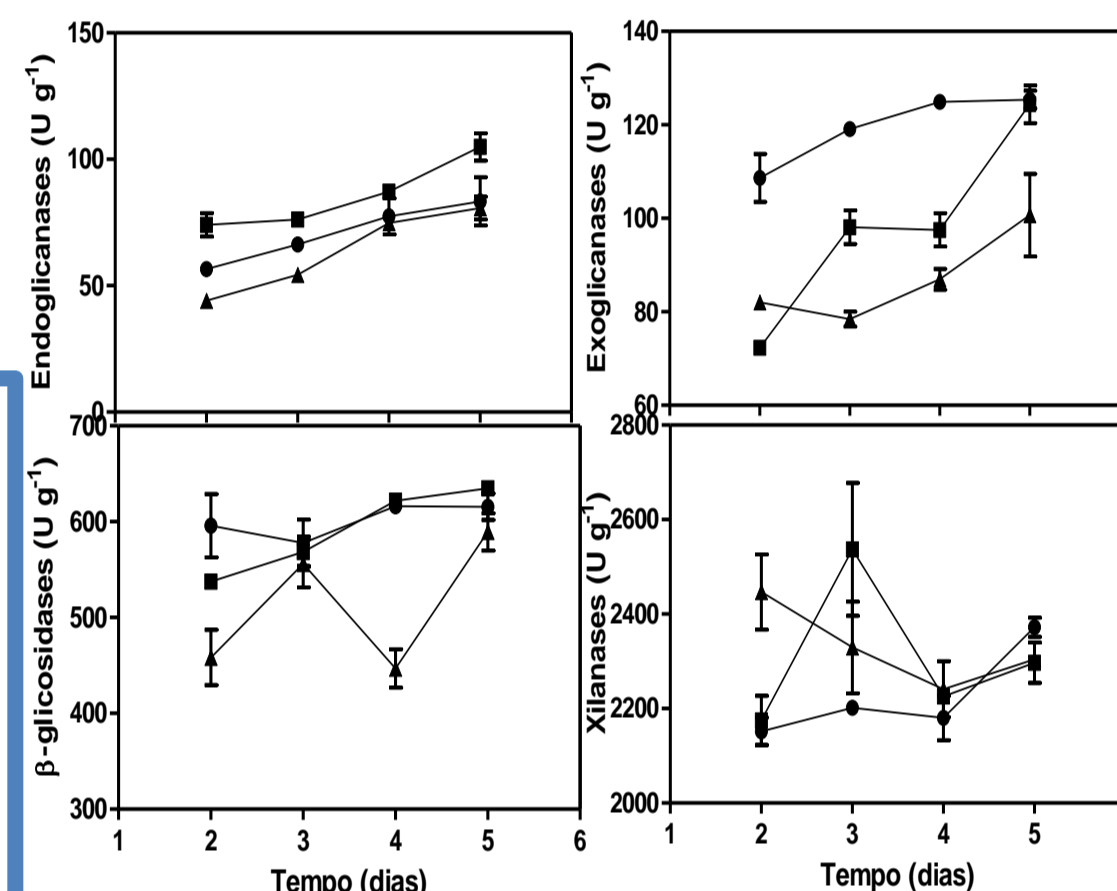


Fig. 2. Atividades enzimáticas (U g<sup>-1</sup>) provenientes do CES de *P. echinulatum* em meio contendo 1, 0,5 ou 0,25 mL solução mineral g<sup>-1</sup> substrato.

O máximo de atividade celulolítica foi observado no quinto dia de cultivo, provavelmente devido à alta liberação de β-glicosidase intracelular via lise celular no final do crescimento.

### Conclusão

Os resultados indicam a possibilidade do desenvolvimento de uma tecnologia de produção de complexos celulolíticos de *P. echinulatum*, fazendo uso de resíduos agroindustriais, viabilizando a produção de etanol de segunda geração e demais subprodutos de alto valor agregado.

### Referências bibliográficas

- Bailey et al. (1992). *J Biotechnol* 23:257-270
- Daroit et al. (2008). *J Microbiol Biotechnol* 18:933-941
- Deshpande; Eriksson; Petersson (1984). *Anal Biochem* 138:481-487
- Ghose, T.K. (1987). *Pure & App Chem* 59(2):257-268
- Mandels; Reese (1957) *J Bacteriol* 73(2):269-78.
- Mandels et al. (1976). *Biotechnol Bioeng Symp* 21-33
- Pandey, A. (2003). *Anal Biochem Eng J* 13(2):81-84.
- Singhania et al. (2009). *Biochem Eng J* 44:13-18

### Agradecimentos

