



PIBIC - CNPq

Produção de xilanases por *Penicillium ucsense* em cultivo submerso com suplementação de licores de pré-tratamento de capim-elefante

PRONEM 2

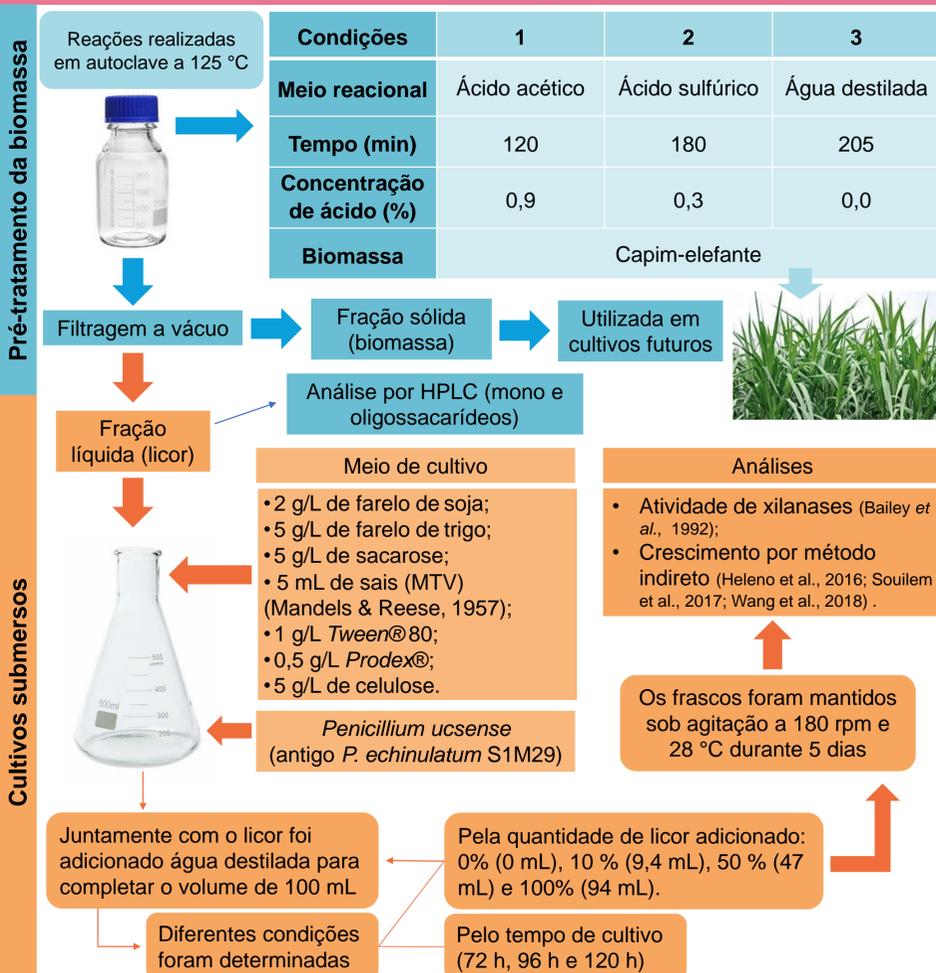
Amanda Poletto Santi, Andréia Toscan, Roselei C. Fontana, Aldo J. P. Dillon.



Introdução / Objetivo

Os resíduos agroindustriais brasileiros incluem uma elevada quantidade de materiais lignocelulósicos, que apresentam potencial para substituir matérias-primas de origem fóssil. As biomassas lignocelulósicas, dentre as quais se destaca o capim-elefante, são formadas principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Esses constituintes podem empregados na produção de combustíveis, como etanol de segunda geração, além de outras aplicações. Devido à rigidez estrutural desses materiais, faz-se necessário a realização de um pré-tratamento de modo a fracionar seus constituintes e facilitar o acesso das enzimas para a hidrólise dos polímeros de carboidratos, possibilitando um melhor aproveitamento dos materiais na obtenção dos produtos de interesse. Após o pré-tratamento é obtida uma fração sólida, formada principalmente por lignina e celulose, e um licor aquoso com alta concentração de mono e oligossacarídeos provenientes da hemicelulose. Diante disso, esse trabalho objetiva determinar as melhores condições para realização de pré-tratamento do capim-elefante, com enfoque em xilooligossacarídeos, bem como avaliar o potencial de utilização da fração líquida desse processo (licor) para a indução da produção de complexos xilanólicos em cultivo de *Penicillium ucsense* (S1M29).

Metodologia



Resultados e Discussão

Licores de pré-tratamento do capim-elefante

O pré-tratamento (PT) 1 foi realizado com ácido acético; PT 2 com ácido sulfúrico; e PT 3 apenas com água.

| Composto | PT 1 120 min 0,9 % ácido | PT 2 180 min 0,3 % ácido | PT 3 205 min 0 % ácido |
|-----------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Celobiose | 0,099 | 0,287 | 0,236 |
| Glicose | 1,001 | 1,085 | 0,931 |
| Xilose | 0,479 | 1,686 | 1,322 |

Tabela 1. Monossacarídeos: celobiose, glicose e xilose (g/L) em cada condição de pré-tratamento.

| Composto | PT 1 120 min 0,9 % ácido | PT 2 180 min 0,3 % ácido | PT 3 205 min 0 % ácido |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Xilobiose | 0,654 | 1,758 | 0,241 |
| Xilotriose | 0,049 | 0,638 | 0,000 |
| Xilotetraose | 0,019 | 0,308 | 0,000 |

Tabela 2. Principais oligossacarídeos das condições de pré-tratamento testadas.

- O pré-tratamento realizado com ácido sulfúrico demonstrou maiores quantidades de monossacarídeos na composição do licor (Tabela 1).
- Tendo em vista a produção de xilanases utilizando estes licores em cultivos fúngicos, a presença de oligossacarídeos possui maior relevância para o trabalho (Tabela 2). Nesse aspecto, a utilização de ácidos (principalmente sulfúrico) apresenta melhores resultados.

Resultados e Discussão

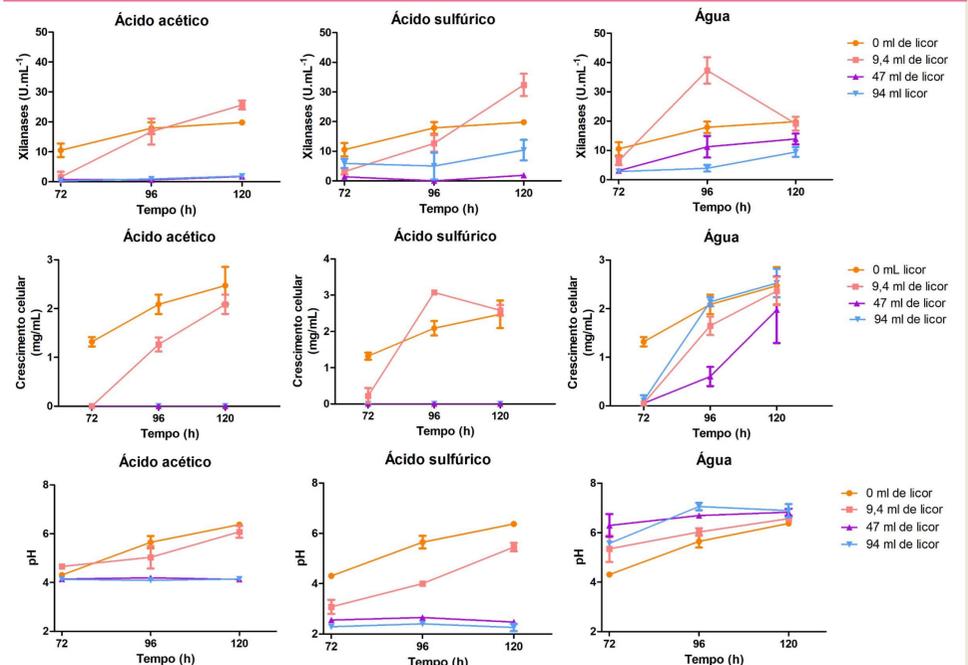


Figura 1. Variação da atividade de xilanases (U.mL⁻¹), crescimento celular (mg/mL) e pH em cultivo de *Penicillium ucsense* em meios formulados com licor proveniente de pré-tratamento.

- A melhor condição para a produção de xilanases foi aquela contendo 9,4 mL de licor de pré-tratamento do capim-elefante utilizando apenas água, no tempo de 96 h. Essa quantidade (9,4 mL) também se destacou nos meios de cultivo utilizando o licor contendo ácido acético e ácido sulfúrico, porém, nesses casos, no tempo de 120 h. Ao analisar a utilização de cada um dos três diferentes licores empregados nos cultivos de forma individual, aquele contendo apenas água possibilitou uma melhor atividade enzimática.
- O crescimento celular (mg/mL) representa o desenvolvimento do *Penicillium ucsense* ao longo do tempo. As condições com 0 e 9,4 mL de licor foram as únicas em que o fungo apresentou crescimento na presença de ácido acético e sulfúrico. Apesar de os valores serem baixos de modo geral (< 4 mg/mL), no licor contendo apenas água todas as condições demonstraram algum crescimento celular, principalmente no quarto e quinto dia de cultivo (96 e 120 h), sendo esse um dos fatores que explica a maior produção enzimática nessas condições.
- O pH de um ácido, mesmo quando em uma solução aquosa submetida a elevadas pressões e temperaturas (no processo de pré-tratamento), muitas vezes continua baixo. Portanto, ele possui influência no crescimento fúngico e, consequentemente, na produção enzimática. Os gráficos demonstram que, nos licores contendo algum ácido, quanto maior a concentração deste mais baixo é o pH que, ainda, tende a diminuir proporcionalmente ao tempo. Já nos cultivos contendo licor apenas com água, o pH foi mais elevado em relação ao meio padrão (0 mL de licor).

Considerações Finais

Com a realização deste trabalho, fica evidente que a utilização dos licores pode corroborar no aumento da atividade enzimática de xilanases em cultivos fúngicos. Porém, os licores melhor avaliados (com ácido acético e sulfúrico) interferiram no crescimento do *P. ucsense* devido a presença de algum composto inibitório liberado no processo de pré-tratamento e/ou o baixo pH.

Referências Bibliográficas

- Adsul, M., et al. (2005). Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 62(1): p. 6-10.
- 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.
- Dillon, A. J. P.; Zorgi, C.; Camassola, M.; Henriques, J. A. P. (2006). Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 740-746.
- Ghose, T.K. (1987). Measurement of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2): p. 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.
- Reis, L. D. (2017). Estratégias para incremento das atividades de celulasas e xilanases por *Penicillium echinulatum* SIM29 em cultivo submerso. Tese de Doutorado. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS). Repositório Institucional.
- Helena, S.A., Diz, P., Prieto, M.A., Barros, L., Rodrigues, A., Barreiro, M.F., Ferreira, I.C.F.R., 2016. Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. *Food Chem.* 197, 1054-1063.
- Souilem, F., Fernandes, A., Calheira, R.C., Barreira, J.C.M., Barros, L., Skhiri, F., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R., 2017. Wild mushrooms and their mycelia as sources of bioactive compounds: Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties. *Food Chem.* 230, 40-48.
- Wang, Q., Cheng, J., Wang, L., Yan, S., Wang, R., Zhang, H., Shao, H., Yang, X., 2018. Valorization of spent shiitake substrate for recovery of antitumor fungal sterols by ultrasound-assisted extraction. *J. Food Biochem.* 42, e12602.
- Sluiter, A., et al. (2006). Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples - Laboratory Analytical Procedure (LAP). *National Renewable Energy Laboratory - NREL*: Colorado 80401-3393.
- Toscan, A. (2014). Efeito do pré-tratamento hidrotérmico no rendimento da hidrólise enzimática do capim-elefante. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.
- Toscan, A., Fontana, R. C., Andraus, J., Camassola, M., Lukasiak, R. M., & Dillon, A. J. P. (2019). New two-stage pretreatment for the fractionation of lignocellulosic components using hydrothermal pretreatment followed by imidazole delignification: Focus on the polysaccharide valorization. *Bioresource technology*, 285, 121346.

Apoio:

