

Avaliação de estratégias de alimentação para produção de celulases por *Penicillium rolfsii* BRM052264 em biorreator

*Daiana Wischral*¹, *Helder Andrey Rocha Gomes*², *Thályta Fraga Pacheco*³, *Thais Demarchi Mendes*⁴,
*Thais Fabiana Chan Salum*⁵, *Mônica Caraméz Triches Damaso*⁶, *Sílvia Belem Gonçalves*⁷

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes estratégias de inoculação e de alimentação para a produção de enzimas celulolíticas por *Penicillium rolfsii* BRM052264 em biorreator, utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor. Inicialmente, o fungo foi repicado em placas contendo ágar batata dextrose e incubado a 28 °C por 10 dias. A produção de enzimas foi avaliada em biorreator de 1 L em batelada alimentada e batelada alimentada com carga extra. Em batelada alimentada, investigou-se o efeito da utilização de pré-inóculo; e em batelada alimentada com carga extra, a adição de sais, bagaço, farelo de trigo e esporos. Os extratos enzimáticos obtidos foram quantificados por métodos colorimétricos quanto à concentração de celulases totais (FPase) e de proteínas. Em batelada alimentada, os cultivos atingiram 1,75 UI/mL de FPase e 2,59 mg/mL de proteínas. A utilização de pré-inóculo não levou a uma diferença estatisticamente significativa na produção de celulases, de acordo com teste-t ($p < 0,05$). Por outro lado, a alimentação de 50% de sais, bagaço e farelo, e o aumento do tempo de cultivo para 168 h, aumentaram a produção de FPase em 28% e a concentração de proteínas em 46%, quando comparados aos resultados de 120 horas de cultivo. Assim, a maior produção de FPase foi de 2,34 UI/mL, e a concentração de proteína foi de 4,51 mg/mL, ambas no biorreator em batelada alimentada com carga extra.

Palavras-chave: celulase, *Penicillium rolfsii* BRM052264, bagaço de cana-de-açúcar, batelada alimentada.

Introdução

O aumento da emissão dos gases de efeito estufa e a alta volatilidade do preço do petróleo têm impulsionado a busca por biocombustíveis e produtos químicos a partir de fontes renováveis (Haldar; Purkait, 2020). A biomassa vegetal, incluindo resíduos e coprodutos agroindustriais, é um recurso alternativo aos fósseis e totalmente renovável. Entretanto, não será economicamente viável se o custo do bioproduto ao

¹ Engenheira de alimentos, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, consultora da Embrapa Agroenergia, daianawischral@gmail.com

² Biólogo, doutor em Biologia Molecular, consultor da Embrapa Agroenergia, helderargomes@gmail.com

³ Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

⁴ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁵ Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

⁶ Engenheira química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

⁷ Engenheira química, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

utilizar biomassa for muito alto e/ou se a disponibilidade desse recurso for limitada (De Bhowmick et al., 2018).

No Brasil, foram produzidas aproximadamente 642 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2019/2020, o que gerou em torno de 160,5 milhões de toneladas de bagaço (Unica, 2020). Por essa disponibilidade, o bagaço de cana destaca-se entre as opções de resíduos lignocelulósicos para aplicações em biorrefinaria. A celulose presente no bagaço de cana pode ser hidrolisada para a liberação de glicose, a ser convertida em etanol e/ou químicos renováveis. Alguns fungos filamentosos vêm sendo largamente investigados e têm se mostrado promissores para a obtenção de enzimas. No entanto, o principal desafio para a viabilização da conversão de biomassa em açúcares fermentescíveis ainda é o alto custo das enzimas (Gmoser et al., 2019).

As celulasas ocupam o terceiro lugar entre as enzimas industriais mais importantes no mercado global, com 15% de participação, atrás apenas das amilases (25%) e das proteases (18%) (Sajith et al., 2016). De acordo com dados do *The Atlas of Economic Complexity* (2020), em 2018 o Brasil importou mais de 155 milhões de dólares em celulasas, evidenciando uma dependência de importações para suprir a demanda nacional. Uma alternativa a essa situação é estimular a produção dessas enzimas *on site*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes estratégias de produção de extrato enzimático por *Penicillium rolsii* BRM052264 em biorreator, utilizando como fontes de carbono o bagaço de cana-de-açúcar (resíduos agroindustriais) pré-tratado por explosão a vapor.

Material e Métodos

Microrganismo e meios de cultivo

A cepa de *Penicillium rolsii* BRM052264 foi repicada a partir do estoque preservado a -80 °C e cultivada em placas de Petri contendo ágar batata dextrose (BDA) da Sigma-Aldrich, a 32 °C por 10 dias. O meio de cultivo utilizado para obtenção do pré-inóculo foi constituído de sais (uréia 0,75 g/L, sulfato de amônio 1,6 g/L, fosfato de potássio monobásico 3,5 g/L, sulfato de magnésio 0,25 g/L, sulfato de cobre 2,0 mg/L e PEG 6000 1,125 g/L), 12 g/L farelo de trigo e 29,2 g/L de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor e lavado, além da adição de 4 g/L de glicose. O bagaço foi lavado a exaustão para remoção de açúcares solúveis. O pH inicial do meio foi corrigido para 6,0, antes da autoclavagem.

Com a parte posterior da ponteira de 200 µL, foram feitos discos nas placas de *Penicillium rolsii* BRM052264 crescido em meio BDA. Oito discos foram adicionados em cada 100 mL de meio de cultivo. Após 24 horas, a 32 °C e 180 rpm, o pré-inóculo foi adicionado ao biorreator na proporção de 10% (v/v). A composição do meio de cultivo utilizado para produção de celulasas foi a mesma do meio de pré-inóculo, exceto pela adição de glicose.

O bagaço de cana utilizado foi pré-tratado por explosão a vapor e lavado pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). Posteriormente, o bagaço foi seco em estufa de circulação de ar a 50 °C e moído (425 µm), para utilização como fonte de carbono. Todos os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave durante 20 minutos, a 121 °C e 1 atm.

Produção de celulases

A produção de enzimas foi avaliada em biorreator instrumentado (STR) de 1 L e volume reacional de 400 mL, em batelada alimentada e em batelada alimentada com carga extra. Devido à alta carga de sólidos nos cultivos, todas as bateladas se iniciaram com o meio composto por sais, 20 g/L de bagaço e 5 g/L de farelo. O restante da carga de bagaço e farelo foi fracionado em 2 adições, contendo 4,6 g/L de bagaço e 3,5 g/L de farelo cada, alimentadas após 48 e 72 horas de cultivo, atingindo assim a concentração do meio otimizado (29,2 g/L de bagaço e 12 g/L de farelo). As condições empregadas em todos os cultivos foram: 220 rpm com agitador Rushton, 32 °C, aeração de 40 L/h e sistema de refrigeração dos condensadores (para minimizar perda de meio por arraste).

A utilização de pré-inóculo foi avaliada em batelada alimentada. As bateladas alimentadas com carga extra foram conduzidas com pré-inóculo, e foram investigadas três condições diferentes de alimentação: 50% extra de sais (Reator 1), 50% extra de sais, bagaço e farelo (Reator 2), e 50% extra de sais e esporos (um quarto de placa de *P. rofsii* BRM052264, previamente cultivado em BDA durante 10 dias) (Reator 3). Essas alimentações foram realizadas após 120 horas de cultivo.

Ao final do cultivo, os meios foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos e a 4 °C, para obtenção dos extratos brutos. A esses extratos clarificados, foi adicionada azida sódica (0,01% p/v), e eles foram armazenados a 4 °C para análises posteriores. A atividade celulolítica total dos extratos brutos foi determinada por meio de microensaio de FPase em triplicata (Xiao et al., 2004). A quantificação de proteínas solúveis foi realizada pelo método de BCA (ácido bicinconínico) em triplicata, de acordo com Smith et al. (1985).

Resultados e Discussão

Os cultivos por batelada alimentada de *Penicillium rofsii* BRM052264 com bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor apresentaram atividade FPase de $1,64 \pm 0,08$ UI/mL sem pré-inóculo, e de $1,75 \pm 0,09$ UI/mL com pré-inóculo (Figura 1). De acordo com o teste-t ($p < 0,05$), não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados de FPase obtidos nesses cultivos. O maior incremento de produção de FPase foi observado até 120 horas de cultivo. A concentração de proteínas atingiu $2,45 \pm 0,04$ mg/mL para o cultivo sem pré-inóculo e $2,59 \pm 0,06$ mg/mL para o cultivo com pré-inóculo.

O sistema de batelada alimentada com carga extra foi avaliado com o objetivo de aumentar a produção de celulases. Para avaliação do modo de alimentação foram realizados experimentos conforme descrito em Material e Métodos para os reatores 1, 2 e 3. Ao final de 168 horas de cultivo, a produção de FPase em biorreator variou de $2,00 \pm 0,21$ UI/mL a $2,34 \pm 0,07$ UI/mL entre as três diferentes estratégias de alimentação (Figura 2). A concentração de proteína variou de $4,07 \pm 0,05$ mg/mL, no cultivo alimentado com sais e esporos (Reator 3), até $4,51 \pm 0,09$ mg/mL, no cultivo alimentado com sais, bagaço e farelo (Reator 2) (Figura 3).

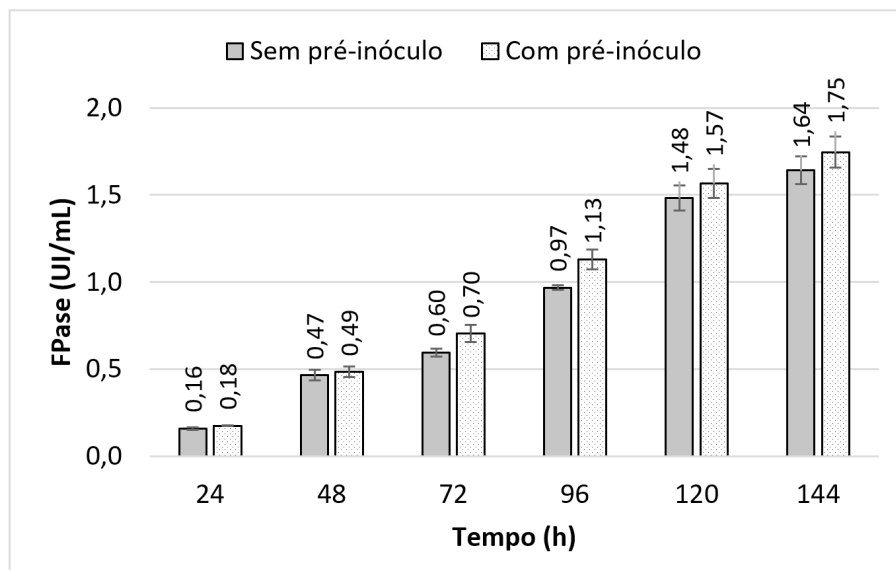


Figura 1. Cinética de produção de FPase por *Penicillium rolsii* BRM052264 em biorreator, a partir de bagaço de cana explodido a vapor. Avaliação de emprego de pré-inóculo de 24 horas em batelada alimentada, com vazão de ar de 40 L/h, a 220 rpm e 32 °C.

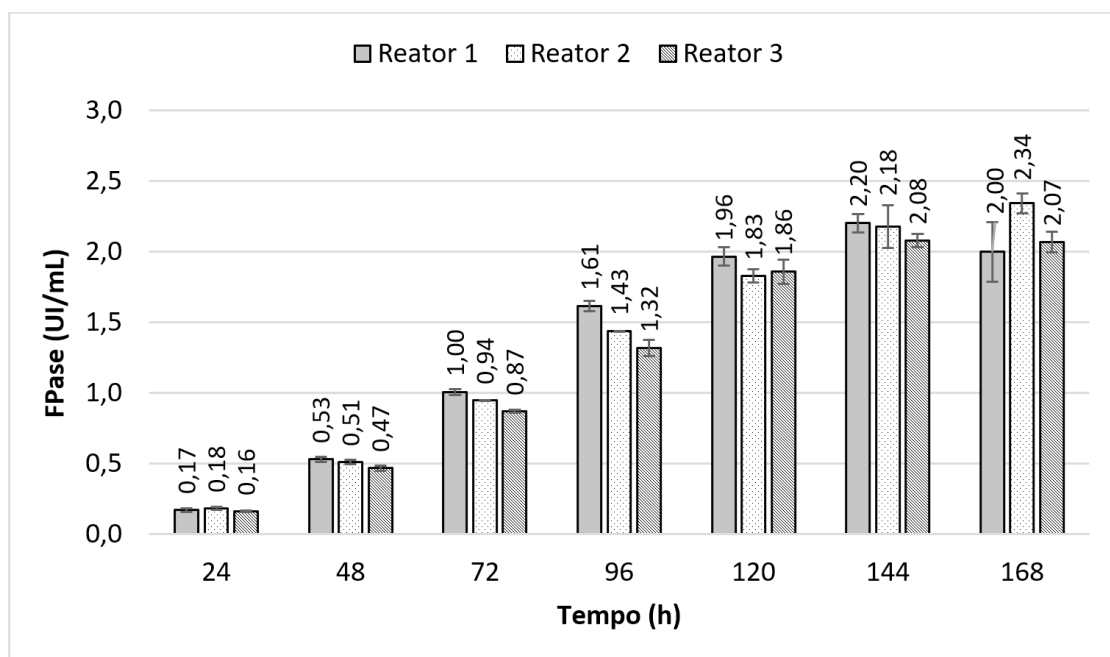


Figura 2. Cinética de produção de FPase por *Penicillium rolsii* BRM052264 em biorreator, a partir de bagaço de cana explodido a vapor, com pré-inóculo de 24 horas, vazão de ar de 40 L/h, a 220 rpm, 32 °C e batelada alimentada com carga extra. As alimentações foram feitas em 120 horas de cultivo: 50% extra de sais (Reator 1), 50% extras de sais, de bagaço e de farelo (Reator 2), e 50% extra de sais e esporos (um quarto de placa de Petri do fungo previamente cultivado em BDA durante 10 dias) (Reator 3).

O Reator 2, alimentado com sais, bagaço e farelo, foi o que apresentou os melhores resultados deste estudo, atingindo 2,34 UI/mL (ou 0,52 FPU/mg) de FPase e 4,51 mg/mL em concentração de proteínas (Figuras 2 e 3). Ao analisar os resultados, foi possível propor as seguintes condições de produção de extrato celulolítico em biorreator: 10% (v/v) de pré-inóculo de 24 horas, vazão de ar de 40 L/h, 32 °C, 220 rpm, pH inicial 6,0, alimentação de 50% extra de sais, de bagaço e de farelo (em 120 horas) e total de 168 horas de cultivo. Comparando-se as produções de 120 horas e 168 horas (Figuras 2 e 3), verificou-se que a alimentação extra em 120 horas proporcionou incrementos de 28% na produção de FPase e de 46% na concentração de proteínas.

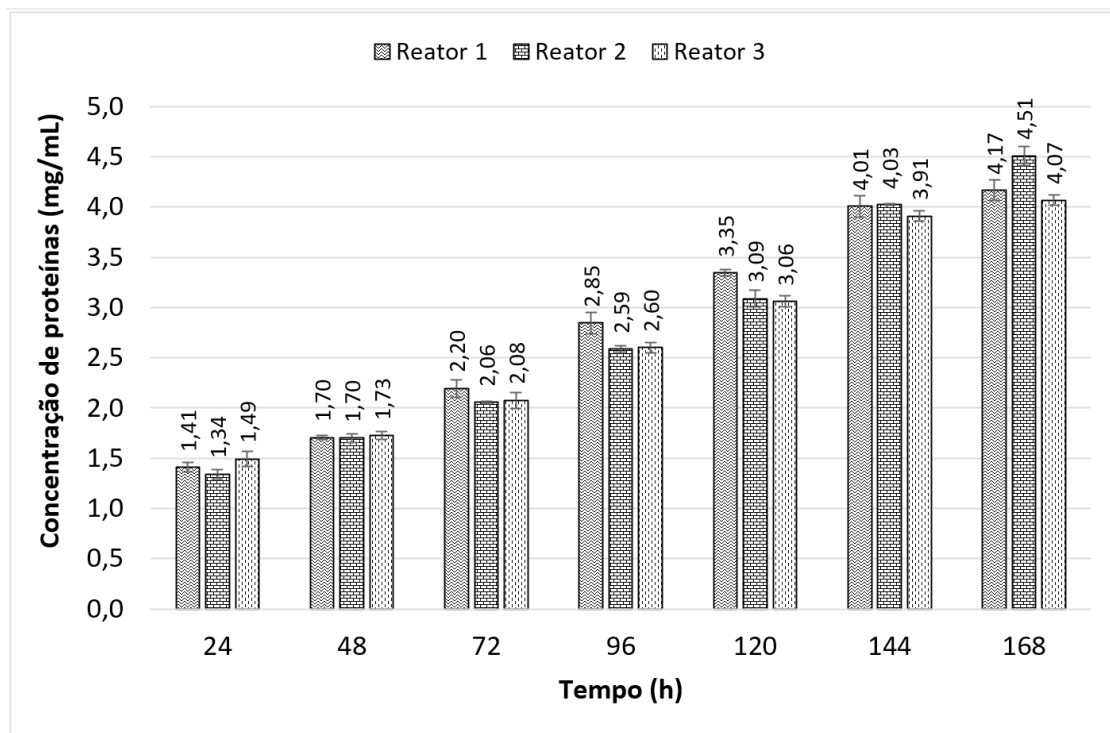


Figura 3. Perfil da concentração de proteínas dos cultivos de *Penicillium rolsii* BRM052264 em biorreator, a partir de bagaço de cana explodido a vapor, com pré-inóculo de 24 horas, vazão de ar de 40 L/h, a 220 rpm, 32 °C e batelada alimentada com carga extra. As alimentações foram feitas em 120 horas de cultivo: 50% extra de sais (Reator 1), 50% extras de sais, de bagaço e de farelo (Reator 2), e 50% extra de sais e esporos (um quarto de placa de Petri do fungo previamente cultivado em BDA durante 10 dias) (Reator 3).

Esses resultados de produção de FPase, com linhagem naturalmente ocorrente e apenas bagaço de cana como fonte de carbono, são melhores que os encontrados na literatura. Da Silva Delabona et al. (2012) produziram 0,69 U/mL de FPase com *Trichoderma harzianum* em bagaço de cana pré-tratado em frascos. Maeda et al. (2013) obtiveram atividade de 1,14 U/mL de FPase em cultivos em biorreator com *Penicillium funiculosum*, utilizando bagaço de cana pré-tratado em batelada alimentada.

Alguns estudos conseguiram melhores resultados empregando estratégias de: concentração dos extratos para formulação de coquetéis, modificação genética da cepa e/ou utilização de outras fontes de carbono (além do bagaço de cana).

Arias et al. (2016) estudaram o sinergismo entre extratos enzimáticos de *Trichoderma harzianum*, *Penicillium funiculosum* e *Aspergillus niger* obtidos em biorreator a partir de bagaço de cana pré-tratado. Os extratos foram concentrados em sistema de filtração tangencial (Hollow Fiber®) e foi obtido um coquetel celulolítico otimizado constituído de *P. funiculosum* 50%, *T. harzianum* 15% e *A. niger* 35%, com 12,9 U/mL (1,3 U/mg) de FPase. Fonseca et al. (2020) modificaram geneticamente *Trichoderma reesei* RUT-C30 para obtenção de uma cepa hiperprodutora de celulasas, atingindo 14,31 U/mL (0,41 FPU/mg) de FPase operando um biorreator em batelada alimentada e utilizando bagaço de cana, glicose e lactose como fontes de carbono.

Conclusão

Os resultados sinalizam a capacidade de aplicação industrial da linhagem para produção de celulasas a partir de bagaço de cana. A utilização de pré-inóculo não proporcionou diferença estatisticamente significativa na produção de FPase, em batelada alimentada no biorreator. A melhor estratégia de batelada alimentada com carga extra foi a alimentação extra de sais, bagaço e farelo. Por fim, neste estudo verificou-se a maior produção de celulasas em biorreator por *Penicillium rolsii* BRM052264 a partir de bagaço de cana explodido a vapor, nas seguintes condições: 10% (v/v) de pré-inóculo de 24 horas, vazão de ar de 40 L/h, 32 °C, 220 rpm, pH inicial 6,0, alimentação de 50% extra de sais, bagaço e farelo, após 120 horas de cultivo.

Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto Yeastzyme, financiado pelo Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) e pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

Referências

- ARIAS, J. M.; MODESTO, L. F. A.; POLIKARPOV, I.; PEREIRA JR, N. Design of an enzyme cocktail consisting of different fungal platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse: optimization and synergism studies. **Biotechnology Progress**, v. 32(5), p. 1222-1229, 2016.
- DA SILVA DELABONA, P.; FARINAS, C. S.; DA SILVA, M. R.; AZZONI, S. F.; DA CRUZ PRADELLA, J. G. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 517-521, 2012.
- DE BHOWMICK, G.; SARMAH, A. K.; AND SEN, R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products, **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1144 – 1154, 2018.
- FONSECA, L. M.; PARREIRAS, L. S.; MURAKAMI, M. T. Rational engineering of the *Trichoderma reesei* RUT-C30 strain into an industrially relevant platform for cellulase production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, p. 1-15, 2020.
- GMOSER, R.; SINTCA, C.; TAHERZADEH, M. J.; LENNARTSSON, P.R. Combining submerged and solid state fermentation to convert waste bread into protein and pigment using the edible filamentous fungus *N. intermedia*. **Waste Management**, v. 97, p. 63-70, 2019.
- HALDAR, D.; PURKAIT, M. K. Lignocellulosic conversion into value-added products: A review. **Process Biochemistry**, v. 89, p. 110-133, 2020.

MAEDA, R. N.; BARCELOS, C. A.; SANTA ANNA, L. M. M.; PEREIRA JR, N. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, v. 163(1), p. 38-44, 2013.

SAJITH, S.; PRIJI, P.; SREEDEVI, S.; BENJAMIN, S. An overview on fungal celulasas with na industrial perspective. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 6, p. 461, 2016.

SMITH, P. E.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150(1), p. 76-85, 1985.

THE GROWTH LAB AT HARVARD UNIVERSITY. **The Atlas of Economic Complexity**. Disponível em: <<http://www.atlas.cid.harvard.edu>>. Acesso em: 27 de agosto de 2020.

UNICA. **União da Indústria de Cana-de-Açúcar**. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br>> Acesso em: 27 ago. 2020.

XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 832-837, 2004.