

Influência de diferentes fontes de carbono sobre a produção de celulases por cepas de *Penicillium* e *Talaromyces*

Helder Andrey Rocha Gomes¹, Daiana Wischral², Thaís Demarchi Mendes³, Thályta Fraga Pacheco⁴, Mônica Carames Triches Damaso⁵, Thaís Fabiana Chan Salum⁶

Resumo

Os isolados fúngicos *Penicillium rolsii* F1880 e *Talaromyces pinophilus* AR155 foram avaliados em cultivo submerso utilizando o meio de Mandels e Weber e um conjunto de 15 fontes de carbono: Avicel, celulose Solka Floc, bagaço de malte, sorgo in natura, sorgo submetido a tratamento hidrotérmico, palha de cana-de-açúcar in natura, palha de cana-de-açúcar submetida a tratamento hidrotérmico, bagaço de cana-de-açúcar in natura, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor lavado e não lavado, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por tratamento do tipo organosolv, bagaço de cana-de-açúcar delignificado, casca do grão de soja in natura, casca do grão de soja pré-tratada por tratamento hidrotérmico e farelo de trigo in natura. O isolado F1880 produziu os maiores níveis de celulases totais (FPAse) quando cultivado em palha de cana-de-açúcar pré-tratada por tratamento hidrotérmico, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (lavado e não lavado), casca do grão de soja pré-tratado por tratamento hidrotérmico e palha de cana-de-açúcar pré-tratada por tratamento hidrotérmico. Entre esses extratos brutos, as maiores concentrações de glicose após sacarificação do bagaço de cana foram observadas utilizando os extratos brutos obtidos após cultivo em palha de cana e bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor lavado. Já o isolado AR155 produziu os maiores níveis de celulases totais, bem como de liberação de glicose, quando cultivado em meio contendo palha de cana-de-açúcar e bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor e lavado. Os resultados reforçam o potencial dos isolados como fontes de enzimas, com vistas à hidrólise de materiais lignocelulolíticos.

Palavras-chave: *Penicillium rolsii* F1880, *Talaromyces pinophilus* AR155, FPAse, sacarificação, bagaço de cana-de-açúcar.

Introdução

A necessidade urgente de busca por fontes renováveis e que provoquem menor impacto ambiental, em substituição aos combustíveis fósseis, tem colocado a biomassa lignocelulósica em destaque. A grande disponibilidade da biomassa lignocelulósica gera um grande potencial para a produção de combustíveis renováveis, como o etanol de segunda geração (Su et al., 2020). Apesar de todo esse potencial, as tecnologias

¹ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, consultor da Embrapa Agroenergia, helderargomes@gmail.com

² Engenheira de alimentos, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, consultora da Embrapa Agroenergia, daianawischral@gmail.com

³ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁴ Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

⁵ Engenheira química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

⁶ Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

relacionadas ao uso da biomassa lignocelulósica em escala industrial ainda não estão bem estabelecidas, em parte devido à natureza recalcitrante do material, que exige etapas de pré-tratamento, bem como dos custos relacionados ao coquetel de enzimas necessário para a sacarificação dos polissacarídeos (Bhatia et al., 2020; Binod et al., 2019).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos por uma rede complexa de polissacarídeos e outros polímeros, formando uma rede bem estruturada, responsável pela proteção das células vegetais. A celulose, um polímero composto por unidades de glicose, é o polissacarídeo responsável pela resistência mecânica da parede celular. Hemiceluloses e pectinas representam classes diversificadas de polissacarídeos, responsáveis por características dinâmicas da parede celular. A lignina, um complexo fenólico, é responsável pela hidrofobicidade e baixa reatividade da lignocelulose (Anderson; Kieber, 2020). A complexidade estrutural da lignocelulose a torna um excelente indutor para a produção de coquetéis multienzimáticos por bactérias e fungos. A utilização de fontes lignocelulósicas para a produção de coquetéis enzimáticos tem sido abordada, e apresenta potencial para redução dos custos associados à etapa de sacarificação, uma vez que os coquetéis poderiam ser produzidos no mesmo local onde a sacarificação seria processada (on-site production) (Siqueira et al., 2020).

Os fungos apresentam potencial como produtores de coquetéis enzimáticos para sacarificação de biomassa lignocelulósica, uma vez que apresentam hábitos saprofíticos, e são capazes de secretar as proteínas no meio de cultura (Payne et al., 2015). As espécies do gênero *Trichoderma* têm sido empregadas com mais frequência para a produção dessas enzimas, mas as espécies do gênero *Penicillium* também têm demonstrado ser boas fontes de enzimas lignocelulolíticas e, portanto, precisam ser exploradas quanto a esse potencial, em especial espécies pouco estudadas (Gusakov e Sinitsyn, 2012).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de celulasas totais (medidas em termos de atividade total sobre papel de filtro – FPAse), bem como a performance de sacarificação de bagaço-de-cana pelos extratos produzidos por *Penicillium rolfsii* F1880 e *Talaromyces pinophilus* AR155.

Material e Métodos

Microrganismos

Os isolados *Penicillium rolfsii* F1880 e *Talaromyces pinophilus* AR155 foram conservados a -80°C, em solução de glicerol. Periodicamente, alíquotas desse estoque foram repicadas nos meios ágar batata dextrose (Sigma-Aldrich, Índia) para crescimento de *P. rolfsii* F1880, e ágar *corn meal* (HiMedia, Índia) para crescimento de *T. pinophilus* AR155. As placas foram incubadas a 28°C, durante 10 dias, em incubadora do tipo B.O.D.

Os dois isolados fúngicos pertencem à Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias, registrados com os códigos BRM 052263 (AR155) e BRM 052264 (F1880).

Fermentação submersa

Para avaliar a produção de celulases totais pelos isolados fúngicos, foi utilizado o meio de Mandels e Weber (1969): ureia (0,3 g/L), peptona bacteriológica (0,75 g/L), sulfato de amônio (1,4 g/L), fosfato de potássio dibásico (2,0 g/L), sulfato de magnésio hepta-hidratado (0,3 g/L), cloreto de cálcio di-hidratado (0,4 g/L), sulfato de zinco hepta-hidratado (1,4 mg/L), sulfato de ferro II hepta-hidratado (5,0 mg/L), cloreto de cobalto hepta-hidratado (2,0 mg/L), sulfato de manganês II hidratado (1,04 mg/L). Ao meio de Mandels e Weber, foi acrescentado polietilenoglicol (PEG) 6000 na concentração de 1,0 g/L.

As fontes de carbono utilizadas nos cultivos foram: Avicel, celulose Solka Floc, bagaço de malte, sorgo in natura, sorgo submetido a tratamento hidrotérmico, palha de cana-de-açúcar in natura, palha de cana-de-açúcar submetida a tratamento hidrotérmico, bagaço de cana-de-açúcar in natura, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor lavado e o não lavado, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por tratamento do tipo organosolv, bagaço de cana-de-açúcar deslignificado, casca do grão de soja in natura, casca do grão de soja pré-tratada por tratamento hidrotérmico, e farelo de trigo in natura. Todas as fontes de carbono foram utilizadas na concentração de 20 g/L, e em todos os meios foram acrescentados de farelo de trigo na concentração de 5 g/L (o meio contendo apenas farelo apresentava, portanto, 25 g/L dessa fonte de carbono).

Os cultivos foram realizados em frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultura. A inoculação dos meios foi realizada por meio de dois discos retirados a partir das bordas da colônia obtida após crescimento em meio sólido, com o auxílio de ponteiras de 200 µL. Os frascos foram incubados a 28°C (para cultivos de *T. pinophilus* AR155) ou 32°C (para cultivos de *P. rolfsii* F1880) em incubadora com mesa agitadora a 180 rpm, durante 5 dias.

Após o período de incubação, os meios de cultura foram coletados e clarificados por centrifugação (10000 rpm/10 minutos/4°C). Os extratos brutos clarificados foram preservados pela adição de azida sódica (0,01% p/v), e armazenados a 4°C, para análises posteriores.

Ensaio enzimático e sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar

os níveis de FPAse foram determinados em microensaio, segundo método descrito por Xiao et al. (2004). Para avaliar a performance de alguns dos extratos brutos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e não lavado, foram realizados ensaios de hidrólise em placas do tipo *deep well*. Os ensaios utilizaram 2,5 mL do respectivo extrato bruto, e teor de sólidos totais de 5% (o volume necessário para se alcançar o teor de sólidos totais foi completado com tampão citrato de sódio 100 mM, pH 5,0). A hidrólise foi realizada a 50°C e 200 rpm durante 24 horas. A glicose liberada foi quantificada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando glicose e celobiose como padrões.

Resultados e Discussão

Os níveis de celulases totais produzidos pelos isolados F1880 e AR155 nas diferentes fontes de carbono avaliadas são apresentados na Figura 1. O isolado *P. rolfsii* F1880 produziu maiores níveis de atividade de FPase quando cultivado em meio contendo palha de cana-de-açúcar pré-tratada por tratamento hidrotérmico (PCH), bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, lavado (BCEVL) e não lavado (BCEVNL), bagaço de cana-de-açúcar delignificado (BCD), e casca do grão de soja pré-tratada por tratamento hidrotérmico (CSH) (Figura 1).

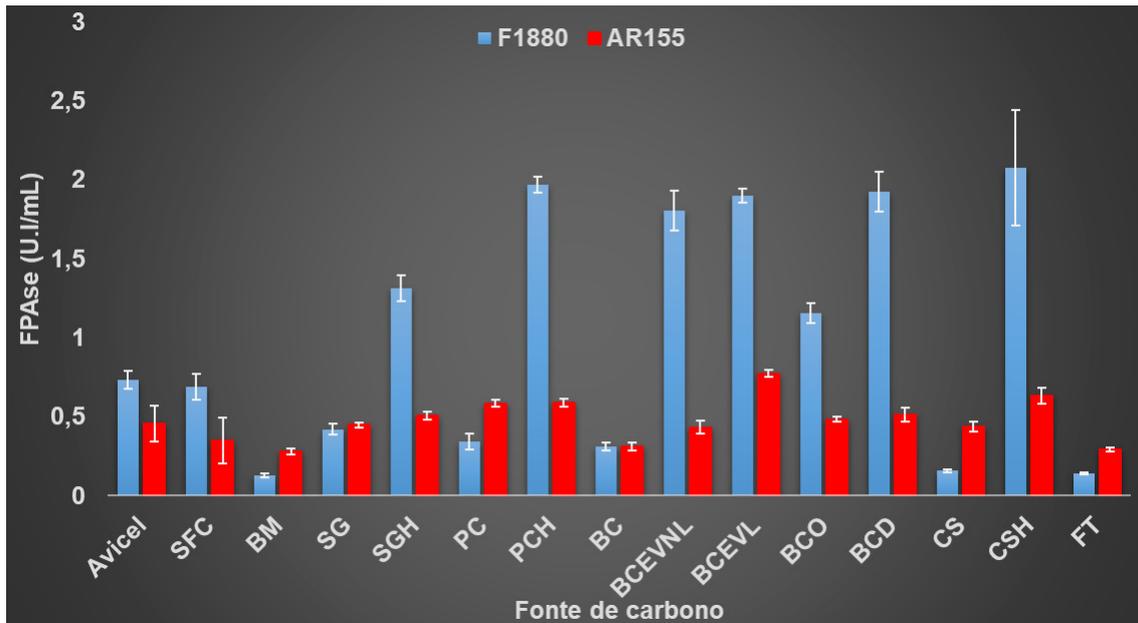


Figura 1. Níveis de celulases totais (FPase) produzidos por *Penicillium rolfsii* F1880 e *Talaromyces pinophilus* em diversas fontes de carbono. As barras representam os desvios-padrão. SFC: Solka Floc Celulose; BM: bagaço de malte; SG: sorgo; SGH: sorgo pré-tratado por tratamento hidrotérmico; PC: palha de cana-de-açúcar; PCH: palha de cana-de-açúcar pré-tratada por tratamento hidrotérmico; BC: bagaço de cana-de-açúcar; BCEVNL: bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor não lavado; BCEVL: bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor lavado; BCO: bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por método Organosolv; BCD: bagaço de cana-de-açúcar delignificado; CS: casca do grão de soja; CSH: casca do grão de soja pré-tratado por tratamento hidrotérmico; FT: farelo de trigo.

Os índices de atividade celulolítica total foram consideravelmente superiores nos cultivos do isolado F1880 em comparação aos cultivos do isolado AR155 (Figura 1). Para o isolado *T. pinophilus* AR155, os maiores níveis de FPase foram observados em cultivos contendo bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor lavado (BCEVL) (Figura 1). Os maiores valores de FPase foram encontrados em cultivos contendo biomassas pré-tratadas como fonte de carbono (Figura 1), o que indica que os respectivos pré-tratamentos transformaram as biomassas utilizadas em materiais mais acessíveis ao fungo, seja pela remoção da fração hemicelulósica, e aumento da exposição da celulose (como nos tratamentos hidrotérmicos e no tratamento por explosão a vapor), ou seja pela remoção ou modificação da lignina (deslignificação) (Hendriks e Zeeman, 2009; Mosier et al., 2005).

Os extratos brutos produzidos pelos dois isolados com os maiores índices de atividade de FPAse foram avaliados quanto à performance para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e não lavado. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração de glicose (g/L) observada após hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e não lavado, utilizando os extratos brutos obtidos após o cultivo de *Penicillium rolfsii* F1880 e *Talaromyces pinophilus* em diferentes fontes de carbono. Os valores são acompanhados dos respectivos desvios-padrão.

Linhagem	Fonte de carbono do cultivo	Glicose (g/L)
<i>Penicillium rolfsii</i> F1880	Palha de cana-de-açúcar pré-tratada por tratamento hidrotérmico	10,23 ± 0,72
	Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e lavado	10,06 ± 0,4
	Casca do grão de soja pré-tratada por tratamento hidrotérmico	7,91 ± 0,78
	Bagaço de cana-de-açúcar delignificado	7,33 ± 0,6
<i>Talaromyces pinophilus</i> AR155	Palha de cana-de-açúcar in natura	8,03 ± 0,27
	Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e lavado	7,92 ± 0,05
	Palha de cana-de-açúcar pré-tratada por tratamento hidrotérmico	6,10 ± 0,30

Os extratos brutos obtidos após o cultivo do isolado F1880 em bagaço pré-tratado por explosão a vapor e palha de cana-de-açúcar pré-tratada por tratamento hidrotérmico apresentaram o melhor desempenho para a sacarificação do bagaço de cana (Tabela 1). Já os extratos brutos obtidos após o cultivo do isolado AR155 em palha de cana-de-açúcar in natura e bagaço pré-tratado por explosão a vapor e lavado apresentaram o melhor desempenho na sacarificação do substrato (Tabela 1). Surpreendentemente, o isolado AR155 promoveu uma sacarificação da celulose do bagaço de cana em níveis consideráveis, mesmo que os valores de FPAse tenham sido consideravelmente inferiores aos observados nos cultivos do isolado F1880 (Figura 1). Tal fato reforça a necessidade de melhor compreensão do conjunto de enzimas presentes nos extratos brutos do isolado AR155. É possível que o conjunto de enzimas produzido por esse isolado seja mais diverso em termos de enzimas acessórias em comparação ao do isolado F1880.

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo revelam o potencial dos isolados *P. rolfsii* F1880 e *T. pinophilus* AR155 como produtores de enzimas celulolíticas úteis para os processos de desconstrução enzimática da biomassa lignocelulósica. Os resíduos/coprodutos de cana-de-açúcar mostraram-se os melhores indutores da produção de celulasas totais, o que favorece o uso futuro de coquetéis melhorados que possam ser utilizados para produção *on site*, ou seja, nas mesmas instalações onde será realizada a sacarificação de resíduos lignocelulósicos.

Agradecimento

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

- ANDERSON, C. T.; KIEBER, J. J. Dynamic Construction, Perception, and Remodeling of Plant Cell Walls. **Annual Review of Plant Biology**, v. 71, p. 39–69, 2020.
- BHATIA, S. K. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. **Bioresource Technology**, v. 300, n. January, p. 122724, 2020.
- BINOD, P. Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, n. April 2018, p. 317–325, 2019.
- GUSAKOV, A. V.; SINITSYN, A. P. Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass. **Biofuels**, v. 3, n. 4, p. 463–477, 2012.
- HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10–18, 2009.
- MANDELS, M.; WEBER, J. The Production of Cellulases. In: HAJNY, G. J.; REESE, E. T. (Org.). **Advances in Chemistry Series: Cellulases and Their Applications**. Washington D.C: American Chemical Society, 1969. v. 95. p. 391–414.
- MOSIER, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.
- PAYNE, C. M. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308–1448, 2015.
- SIQUEIRA, J. G. W. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 132, n. October 2019, p. 105419, 2020.
- SU, T.. Lignocellulosic biomass for bioethanol: Recent advances, technology trends, and barriers to industrial development. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 24, p. 56–60, 2020.
- XIAO, Z. Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 832–837, 2004.