



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Produção de Celulases e Xilanases por *Penicillium echinulatum* em diferentes formulações de meio

Brandalise, E. B.<sup>1</sup>, Hartmann, C.<sup>1</sup>, Morsoletto, M. P.<sup>1</sup>, Camassola, M.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade de Caxias do Sul – Centro de Ciências Exatas e Tecnologias  
Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 – 95070-560 Caxias do Sul – RS - E-mail: mcamasso@ucs.br

#### RESUMO

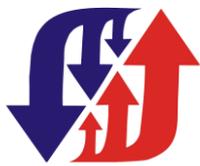
*Celulases e hemicelulases são complexos enzimáticos produzidos pelo fungo filamentoso Penicillium echinulatum. Diversos fatores podem influenciar a produção de enzimas em processos biotecnológicos, entre estes a formulação do meio. Neste trabalho, foi avaliada a produção de enzimas por Penicillium echinulatum SIM29, em meios com diferentes fontes de carbono - celulose Celuflok® e Avicel® - diluídos em água de torneira, água destilada ou água ultra pura. Para a produção de celulases, a melhor condição foi àquela contendo Avicel® e água da torneira. Já a produção de xilanases foi favorecida em meio composto por celulose Celuflok® e água destilada. Assim, pode-se verificar a influência do meio na produção destas enzimas.*

**Palavras-chave:** *Penicillium echinulatum*, meio de cultivo, celulases, xilanases.

#### INTRODUÇÃO

As enzimas do complexo celulolítico são capazes de hidrolisar a celulose em moléculas de glicose (Rolle, 1998). As principais aplicações das celulases destinam-se à indústria têxtil, de detergentes e alimentícia e de alimentação animal (Dillon, 2004). As xilanases fúngicas são produzidas associadas às celulases e atuam na biodegradação da xilana (Dekker & Richards, 1976; Beg *et al.*, 2001). Há um crescente interesse industrial pelas hemicelulases nas últimas décadas, principalmente nas indústrias químicas e farmacêuticas (Sun *et al.*, 2004). O fungo filamentoso *Penicillium echinulatum* é um importante microrganismo na produção destas enzimas (Zampieri *et al.*, 2014).

Vários fatores influenciam a produção de enzimas microbianas, entre estes o meio de cultivo (Dillon, 2004). Para a produção de uma determinada enzima microbiana, é de grande importância a formulação de um meio efetivo, de baixo custo e que permita a manutenção e o crescimento do microrganismo (Smits *et al.*, 1996). Para a produção de celulases e xilanases, a escolha da fonte de carbono é uma importante variável. A celulose é uma importante fonte de carbono para produção de celulases (Jørgensen *et al.*, 2003), e pode não somente induzir a produção de celulases, mas também a de xilanases (Aro *et al.*, 2001). Segundo Esterbauer *et al.* (1991), fontes de carbono solúveis, como lactose e celobiose, levam a uma baixa atividade de celulases quando comparadas com substratos celulósicos insolúveis, como Avicel® e Solka Floc®. Adicionalmente, a água por ser utilizada em grandes quantidades também acaba impactando no valor das enzimas, especialmente se esta precisa ser destilada ou ultrapurificada. Neste contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a produção de enzimas por *Penicillium echinulatum* SIM29, em meios com diferentes fontes de carbono - celulose Celuflok® e Avicel® - diluídos em água de torneira, água destilada ou água ultrapura.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Microrganismo

Foi utilizada a linhagem S1M29 obtida a partir da linhagem 9A02S1 de *Penicillium echinulatum* (microrganismo depositado no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSM 18942). A linhagem utilizada pertence à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassa do IB/UCS.

#### Produção de celulasas e xilanases

Para cada 100 mL de meio de produção de celulasas e xilanases foram utilizados: 10mL da solução mineral concentrada 10X, baseada na formulação de Mandels & Reese (1957), 0,5g de farelo de trigo, 0,2g de peptona, 50 $\mu$ L de Tween 80<sup>®</sup>, 1g de fonte de carbono (celulose Celuflok<sup>®</sup> (Cotia, São Paulo, Brasil) e Avicel<sup>®</sup> PH101 Fluka (Buchs, Ireland)), diluídos em água (ultrapura, destilada ou de torneira). Após, os meios foram autoclavados a 1 atm, por 15 minutos. Frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio, foram inoculados com uma suspensão de conídios para obter a concentração final de  $1 \times 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>. Os frascos foram mantidos sob agitação recíproca de 180 rpm, a 28°C, sendo realizadas coletas de amostras a cada 24 h. As amostras foram centrifugadas e foram determinadas as atividades enzimáticas. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

#### Determinação das atividades enzimáticas

Para a dosagem de celulasas, foi utilizada a análise de atividade enzimática sobre papel filtro (FPA), conforme Ghose (1987), de acordo com as modificações propostas por Camassola & Dillon (2012), tendo como substrato papel-filtro Whatman n°1. A determinação da atividade de endoglicanases foi realizada de acordo com metodologia proposta por Ghose (1987) com modificações, onde carboximetilcelulose atua como substrato da reação. A atividade de  $\beta$ -glicosidases foi determinada segundo a metodologia adaptada de Daroit *et al.* (2008), tendo como substrato *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (*p*NPG). A determinação das atividades de xilanases foi realizada segundo Bailey *et al.* (1992), tendo xilose como substrato. Uma unidade de atividade de endoglicanase, bem como de FPA, foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu$ mol/L de açúcar redutor por minuto (Miller, 1959). Uma unidade de atividade de  $\beta$ -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima requerida para a hidrólise de 1 $\mu$ mol/L de *p*NPG por minuto. Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu$ mol/L de xilose por minuto.

#### Análise Estatística

Os resultados de hidrólise enzimática foram analisados estatisticamente por análise de variância e pós-teste de Tukey para um  $p < 0,05$ , utilizando-se o software *PrismGraphPad*<sup>®</sup>.

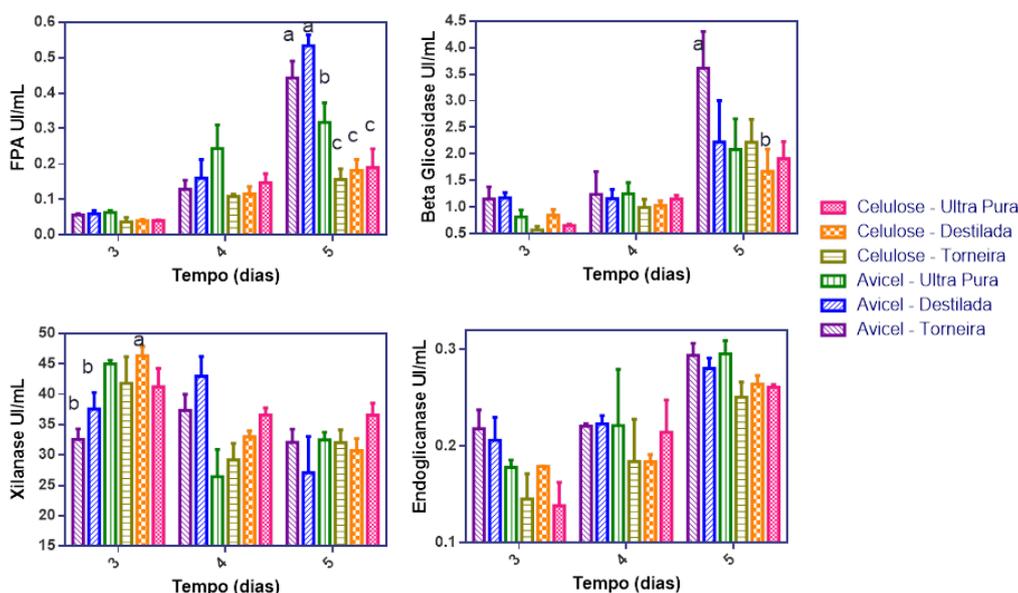
### RESULTADOS E DISCUSSÕES

A produção das enzimas ao longo do tempo de cultivo é mostrada na Figura 1. Observa-se que as maiores atividades de FPA,  $\beta$ -glicosidases e endoglicanases ocorreram no quinto dia de cultivo, enquanto que as xilanases apresentaram pico de atividade no terceiro dia de processo. A partir da análise estatística, constatou-se que os resultados mais promissores para FPA foram obtidos em meios contendo Avicel<sup>®</sup> e água de torneira (0,433 U/mL) ou



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Avicel<sup>®</sup> e água destilada (0,534 U/mL), seguidos por meio composto por Avicel<sup>®</sup> e água ultra pura (0,317 U/mL). Já os resultados obtidos em meio contendo celulose Celuflok<sup>®</sup> não apresentaram diferenças significativas. Em relação às  $\beta$ -glicosidasas, maiores atividades foram alcançadas em meio elaborado com Avicel<sup>®</sup> e água de torneira (3,615 U/mL) e as menores atividades, em meio com celulose Celuflok<sup>®</sup> e água destilada (1,671 U/mL). Os demais resultados de atividades de  $\beta$ -glicosidasas em diferentes meios não apresentaram diferença significativa. Para as endoglicanases, não houve diferença significativa entre os resultados (entre 0,251 U/mL e 0,295 U/mL).



**Figura 1.** Resultados das atividades enzimáticas

Para a produção das enzimas do complexo celulolítico, entre os meios avaliados o que mais favoreceu foi aquele contendo Avicel<sup>®</sup> como fonte de carbono e água de torneira. Isto provavelmente deve-se à presença de alguns íons metálicos ou cofatores dissolvidos, favoráveis ao metabolismo do microrganismo. Conforme estudo de Smiths *et al.* (1996), para a produção enzimática ser eficiente há a necessidade da presença de elementos como carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, magnésio, cálcio, ferro, cobalto, zinco, manganês e molibdênio. Possivelmente alguns desses componentes estão presentes na água de torneira. Vale ressaltar que o uso de água de torneira seria interessante para o processo, pois é uma alternativa na tentativa de reduzir os custos e etapas de produção. Já o uso de Avicel<sup>®</sup> favoreceu a produção destas enzimas, visto que este substrato tem maior cristalinidade do que a celulose Celuflok<sup>®</sup>, sendo degradado mais lentamente pelo microrganismo. De acordo com Esterbauer *et al.* (1991), substratos celulósicos facilmente degradáveis são fontes de carbono menos adequadas, uma vez que são consumidos rapidamente, podendo levar à repressão na síntese de celulases.

Quanto à produção de xilanases, as maiores atividades foram obtidas em meio contendo celulose Celuflok<sup>®</sup> e água destilada (46,323 U/mL), seguido por meio composto por Avicel<sup>®</sup> e água destilada (37,556 U/mL) e por Avicel<sup>®</sup> e água de torneira (32,551 U/mL). Os resultados obtidos nos outros meios testados não apresentaram diferença significativa. A indução de xilanases no meio contendo celulose Celuflok<sup>®</sup> pode ser devido à presença de xilana na composição deste material, conforme verificado por Zampieri (2014).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### CONCLUSÕES

Com os resultados aqui apresentados, verifica-se a possibilidade de criar uma condição ótima de acordo com a enzima desejada. Para celulases, beta glicosidasas e endoglicanasas, o uso de Avicel<sup>®</sup> no meio de cultivo e da água de torneira, num período de cinco dias apresenta melhores resultados. Por outro lado, se o interesse for em xilanases, com as condições de Celuflok<sup>®</sup> no meio e água destilada no período de três dias há maior atividade enzimática.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aro, N.; Saloheimo, A.; Ilmén, M.; Penttilä, M. 2001. ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. J. Biol. Chem. 276: 24309-24314.
- Bailey, M.J.; Biely, P.; Poutanen, K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J. Biotechnol. 23:257-270.
- Beg, Q. K.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G. S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 326-338.
- Bisaria, V.S.; Ghose, T.K. 1981. Biodegradation of cellulosic materials: Substrates, microorganisms, enzyme and products. Enzyme Microb. Technol. 3: 90-104.
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. 2012. Cellulase Determination: Modifications to Make the Filter Paper Assay Easy, Fast, Practical and Efficient. J. Anal. Bioanal. Techniq. 1: 125. doi:10.4172.
- Daroit, D.J.; Simonetti, A.; Hertz, P.F.; Brandelli, A. 2008. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Monascus purpureus*. J. Microbiol. Biotechnol. 18(5):933-941.
- Dekker, R.F.H.; Richards, G.N. 1976. Hemicellulases: Their occurrence purification properties and mode of action. Adv. Carb. Chem. Biochem. 32: 277-352.
- Dillon, A.J.P. (2004). Cellulases. In.: Enzimas como agentes biotecnológicos. Editado por Said, S.; Pietro, R.C.L.R. Editora Legis Summa, 243-269.
- Dillon, A.J.P. 2004. Cellulases. In.: Enzimas como agentes biotecnológicos. Editado por Said, S.; Pietro, R.C.L.R. Editora Legis Summa, 243-269.
- Esterbauer, H.; Steiner, W.; Labudova, I.; Hermann, A.; Hayn, M. 1991. Production of *Trichoderma* Cellulase in Laboratory and Pilot Scale. Bioresour. Technol. 36: 51-65.
- Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. Pure & Appl. Chem. 59: 257-268.
- Jørgensen, H.; Eriksson, T.; Börjesson, J.; Tjerneld, F.; Olsson, L. 2003. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. Enzyme Microb. Technol. 32: 851-861.
- Mandels, M.; Reese, E.T. 1957. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. J. Bacteriol. 73: 269-278.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chemis. 31: 426-428.
- Rolle, R.S. 1998. Review: Enzyme applications for agroprocessing in developing countries: an inventory of current and potential applications. World J. Microbiol. Biotechnol. 14: 611-619.
- Smits, J.P.; Rinzema, A.; Tramper, J.; Van Sonsbeek, H.M.; Knol, W. 1996. Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM 9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 489-496.
- Sun, J.X.; Sun, X.F.; Sun, R.C.; Su, Y.Q. 2004. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. Carb. Polyme. 56: 195-204.
- Zampieri, D., Nora, L. C., Basso, V., Camassola, M., & Dillon, A. J. 2014. Validation of reference genes in *Penicillium echinulatum* to enable gene expression study using real-time quantitative RT-PCR. Current genetics, 60(3), 231-236.
- Zeilinger, S.; Haller, M.; Mach, R.; Kubicek, C.P. 2000. Molecular characterization of a cellulase-negative mutant of *Hypocrea jeconina*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 277: 581-588.
- Zamperi, D. 2014. Expressão Gênica e atividades de celulases, glicosidasas, xilanases e swoleninas de *Penicillium echinulatum* SIM29. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.