

PROJETO DE PESQUISA DO BOLSISTA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA.

TÍTULO DO PROJETO: Otimização da produção de pectinase e β -glicosidase por *Annuhypoxylon stygium* DR47 para a desconstrução de bagaço de cana de açúcar

NOME DO ORIENTADOR: Dr. JOSÉ GERALDO DA CRUZ PRADELLA

NOME DO CO-ORIENTADOR: DOUTORANDO DIOGO ROBL

1. INTRODUÇÃO E ESTADO DA ARTE

As recentes preocupações em relação à mudança climática global, levaram a uma grande ênfase no uso de combustíveis líquidos renováveis, como etanol celulósico (DODD & CANN, 2009). O uso de materiais lignocelulósicos, podem reduzir significativamente o custo das matérias-primas para a produção de etanol. Além disso, estima-se que esse tipo de material seja responsável por cerca de 50% da biomassa no mundo (LIN & TANAKA, 2006). Os materiais lignocelulósicos são compostos de celulose, hemiceluloses, lignina e minerais em uma estrutura desfavorável à desconstrução. Na natureza, eles são degradados por um consórcio de microorganismos que sintetizam várias enzimas hidrolíticas capazes de degradá-los totalmente.

Na indústria, para minimizar os custos relacionados à produção das enzimas, a identificação das principais enzimas e otimização de suas proporções podem permitir a viabilização da sacarificação da biomassa (GAO *et al.*, 2010). A suplementação de um coquetel enzimático de *Trichoderma reesei* com uma β -glicosidase de outro fungo pode ser empregada para evitar a inibição da celobiose sobre celobiohidrolases e endoglucanases (XIAO, *et al.* 2004). Além disso, BERLIN *et al.* (2007) verificaram um aumento significativo na hidrólise da palha de milho por Celluclast 1.5L suplementada com pectinases e β -glicosidases comerciais.

No reino Fungi, várias espécies são potenciais produtores de enzimas lignocelulíticas, como espécies do gênero *Trichoderma* (DELABONA *et al.* 2012), *Penicillium* (DILTON *et al.* 2006) e *Aspergillus* (de VRIES *et al.* 1999). Contudo a busca por novas linhagens oriundas de ambientes não usuais, capazes de produzir enzimas com maior estabilidade e com maior produtividade, se faz necessário para melhoria do processo. O fungo *Annuhypoxylon stygium* é uma espécie encontrada geralmente na forma endofítica e teve sua produção de glicohidrolases pouco explorada. Existem somente alguns relatos de atividade de β -glicosidase (WEI *et al.* 1992). Entretanto, ROBL *et al.* (dados não publicados) verificou a presença de atividades como pectinase, β -glicosidase, xilanase e β -glucanase.

Além disso, a produção de enzimas acessórias em resíduos agro-industriais é outra alternativa para se alcançar preços satisfatórios que efetivem o processo de produção de etanol de segunda geração. Desta forma, a otimização do cultivo de *A. stygium* para a produção de β -glicosidase e pectinase, e o estudo da hidrólise do bagaço de cana de açúcar por esses extratos podem auxiliar na formulação de uma coquetel enzimático efetivo na degradação dessa biomassa.

2. OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo a produção de pectinase e β -glicosidase por *A. stygium* para a desconstrução de bagaço de cana de açúcar .

Como objetivos específicos:

- a. Otimizar o cultivo de *A. stygium* para o produção de pectinase e β -glicosidase em frascos agitados através de planejamento experimental; efetuar ensaios em biorreator no ponto ótimo de operação
- b. Estudo da suplementação desses extratos a preparações celulolíticas comerciais para formulação de um coquetel enzimático.
- c. Otimização da hidrólise enzimática do coquetel formulado através de ferramentas estatísticas.

3. MATERIAIS E METODOS

3.1 Meios de cultivo básicos

A composição do meio de cultura dos experimentos será a seguinte: Fonte de carbono (variará de acordo com os experimentos), 1 g/L de proteose peptona, 0,1% (v/v) de Tween 80 e 10% (v/v) de solução salina. A solução salina empregada será a solução concentrada descrita por MANDELS e REESE (1957). O pH do meio será corrigido para 5,0 e então autoclavado a 121°C por 20 minutos.

3.2 Microrganismo

O fungo *A. stygium* DR47 é uma linhagem endofítica de *Eucalyptus benthamii* que pertence a coleção de cultura mantida pelo laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (LabMicro/UFPR). ROBL *et al.* (dados não publicados) verificaram que a linhagem é uma boa produtora de β -glicosidase e pectinase. A cultura é mantida em estoque de glicerol a 20% a -80°C.

3.3 Inóculo Fúngico

A linhagem fúngica será inoculada em placas de Petri com batata dextrose ágar (BDA) e mantido a 29°C por 7 dias, até abundante crescimento. Uma suspensão da biomassa será obtida pela adição de 20 mL de Tween 80 (0,01%) e raspagem das placas. Essa suspensão será utilizada para inocular os meios de inóculo (carga de 10% v/v) e incubada por 2 dias a 28°C sob agitação.

3.4 Cultivos em frascos agitados

Cultivos em frascos agitados serão realizados para verificar a melhor fonte de carbono, nitrogênio e de suplementos para a produção de pectinase e β -glicosidase. Como fonte de carbono serão testados diferentes bagaços pré-tratados e diferentes resíduos agroindustriais como farelo de soja, farelo de trigo, bagaço cítrico bagaço de maçã e polpa cítrica. As fontes de nitrogênio serão inorgânicas (sais de NO₂, NO₃ e NH₄) e orgânicas (peptonas e extratos de leveduras). Suplementos como lactose, frutooligossacarídeos, sacarose e glicerol também serão testados. A composição do meio de cultura, o efeito de cada componente e a otimização serão estudados através de planejamentos de experimentos fracionados e completos pelo programa estatístico Minitab (Release 14).

3.5 Ensaio em biorreator

Cultivos no ponto ótimo de composição de meio obtidos no item 3.4 serão efetuados em, biorreator de bancada (3L de volume total) visando acessar o desempenho do fungo em escala ampliada. Serão efetuados

experimentos em condições de pH = 5,0; temperatura = 29°C e concentração de oxigênio dissolvido no meio em fermentação de 30% da saturação com ar e comparados com os resultados atingidos em frascos agitados.

3.6 Amostragem

Amostras serão retiradas periodicamente durante os cultivos, centrifugadas a 10000 x g por 20 minutos a 10°C e os sobrenadantes serão dosados para as atividades enzimáticas, proteínas totais e medidas de pH.

3.7 Dosagem das atividades enzimáticas

A quantificação das atividades enzimáticas serão expressas em unidades internacionais (IU), utilizando diferentes substratos. Todos os polissacarídeos (Sigma Aldrich e Megazyme) serão utilizados a 0,5% (p/v). A atividade enzimática será determinada pelo açúcar redutor liberado através do método do DNS (MILLER, 1959). A atividade de β-glicosidase, pelo método do p-nitrofenol (ZHANG *et al.*, 2009). As reações serão conduzidas em tampão citrato de sódio pH 5,0 (50mM) por 10 minutos.

3.8 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais será determinada empregando o método recomendado para o reagente preparado da Bio-Rad (Protein Assay Reagent Concentrate) para placas de 96 poços, baseado no método de BRADFORD (1976).

3.9 Hidrólise enzimática

O bagaço de cana de açúcar hidrotérmico será hidrolisado através da combinação dos extratos enzimáticos obtidos nos cultivos de frascos agitados com preparações celulolíticas comerciais e produzidas pelo próprio CTBE. Diferentes cargas de sólidos, atividade celulolíticas, pH e temperatura serão estudadas a fim de verificar melhores condições de hidrólise. Posteriormente a composição do coquetel enzimático será realizado através de experimentos de design de misturas, para isso será utilizado o programa estatístico Minitab (Release 14). As amostras serão centrifugadas a 10,000 x g por 15 minutos, filtradas e a composição dos carboidratos será determinados por HPLC como descrito ROCHA *et al.* (2012).

4. CRONOGRAMA

1º Ano												
Atividade	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pesquisa bibliográfica	X	X	X	X								
Otimização da fonte de carbono	X	X										
Otimização da fonte de nitrogênio			X	X								
Otimização dos suplementos					X	X						
Ensaio em biorreator							X	X				
Suplementação da hidrólise									X	X	X	X
Formulação do coquetel enzimático									X	X	X	X
Relatório												X

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERLIN, A.; MAXIMENKO, V.; GILKES, N.; SADDLER J.. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p. 287–296, 2007.
- DODD, D.; CANN, I. K. O.. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Glob Change Biol Bioenergy**, v. 1, p. 2–17, 2009.
- GAO, D.; CHUNDAWAT, S.P.S.; KRISHNAN, C.; BALAN, V.; DALE, B.E. Mixture optimization of six core glycosyl hydrolases for maximizing saccharification of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v.101, p. 2770–2781, 2010.
- LIN, Y; TANAKA, S..Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbial Biotechnology**, v.69, p. 627-642, 2006.
- XIAO, Z.Z.; ZHANG, X.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N.. Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 113, n. 16, p. 1115-1126, 2004.
- DELABONA PS, FARINAS CS, RIBEIRO MS, FREITAS SA, PRADELLA JGC (2012) Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresour Technol** 107:517–521.
- de VRIES, R.; VISSER, J.; de GRAAFF, L.H.. CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. **Res. Microbiol.** 150, 281–285, 1999.
- Wei, D.L.; Chang, S.C.; Wei, Y.H.; Lin, Y.W; Chuang, C.L.; Jong, S.C.. Production of cellulolytic enzymes from the *Xylaria* and *Hypoxyton* species of xylariaceae. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 8: 2,141-146, 1992.
- MILLER, G.L.. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Anal. Chem.**, 31:3, 426–428, 1959.
- MANDELS, M.; REESE, E.T.Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **J. Bacteriology**. 73:816- 826, 2001.
- ZHANG, Y.; LU, X.; DAN, H.; SUN, Y.. Screening and Enzymatic Study of a Composite Microbial System FH3Braz. **Arch. Biol. Technol.** 52:1, 35-43, 2009.
- ROCHA, G.J.M.; GONÇALVES, A.R.; OLIVEIRA, B.R.; OLIVARES, E.G.; ROSSELL, C.E.V.. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**. 35, 274-279, 2012.