

INFLUÊNCIA DO CONTROLE DO PH NA MODULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE GLICOHIDROLASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS

P. S. COSTA^{1,3} D. ROBL^{2,3} D. LIMA³, J. G. C. PRADELLA³

¹Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Engenharia Química

²Universidade de São Paulo, Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia

³Centro de Pesquisa em Energia e Materiais/ Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE

E-mail para contato: patríciacosta.ufv@gmail.com

RESUMO – O melhoramento de meio de cultura por metodologias estatísticas é de grande interesse para a confecção de meios ótimos de produção das glicohidrolases, por fungos filamentosos. A execução de tais metodologias em reatores de bancadas com pH controlado é de elevada dificuldade, pois necessita de uma grande quantidade de reatores operando em conjunto, o que dificulta a realização de tais metodologias. O objetivo deste trabalho foi verificar a utilização do tampão phitalato de potássio para o controle do pH, objetivando a possibilidade de realização do melhoramento do meio de cultura, em pequena escala, para os fungos filamentosos *Penicillium echinulatum* PS1M29 e *Trichoderma harzianum* linhagem P49P11. Os resultados demonstraram que a utilização do tamponamento do meio permite um considerável controle do pH diminuindo o desvio padrão dentro das triplicatas dos experimentos permitindo maior confiabilidade dos resultados de atividade enzimática das glicohidrolases. Este trabalho pode contribuir para auxiliar outros trabalhos de melhoramentos de meios de cultura para fungos filamentosos.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as diversas etapas do processo de produção do etanol de segunda geração o maior gargalo está na etapa de hidrólise enzimática, que devido a baixa produção das glicohidrolases pelos microrganismos torna o processo inviável atualmente. Assim, estratégias para aumentar a produção/atividades dessas enzimas, necessárias para o processo de hidrólise da biomassa, são de grande interesse na comunidade científica e industrial.

Como os componentes do meio de cultura influenciam drasticamente no pH, e o pH pode influenciar na síntese e na atividade enzimática das glicohidrolases, a exemplo do que ocorre com *T. reesei* (Tangnu et al. 1981, Sternberg et al. 1979). Em trabalhos de estudos de diferentes tipos de tampões realizados por Domingues et al (2000), foi demonstrado que o tampão bitalato de potássio era adequado para o cultivo de *T. reesei*.

O uso de planejamentos estatísticos para a otimização de meios de cultura para a produção das glicohidrólases é uma estratégia promissora para incrementar a indução de tais enzimas, entretanto a necessidade de um rigoroso controle do pH ao longo do cultivo torna a utilização eficiente desta metodologia limitada pela necessidade de um grande numero de biorreatores em um mesmo bloco de experimentos.

Com base no estudo de Domingues et al (2000) e na necessidade de acessar um tampão eficiente para o controle do pH de cultivos de meios a serem otimizados foi escolhido o tampão ftalato de potássio 0,1M em pH 5 para o presente estudo de modo a determinar a influencia do controle do pH pelo tampão ftalato de potássio no cultivo dos fungos filamentosos *Penicillium echinulatum* PS1M29 e *Trichoderma harzianum* P49P11 para aplicação da utilização do mesmo como controlador do pH em experimentos de otimização e modulação de meio de cultura.

A utilização de um tampão eficiente no controle do pH em meios de culturas que variam grandemente o pH ao longo do cultivo é de grande relevância pois permite que sejam realizados estudos de grandes quantidades de variáveis em planejamentos estatísticos utilizando apenas um bloco e dispensando o uso de biorreatores, com controle de pH, nas etapas iniciais de screening, estudo e otimizações dos processos.

. 2. Materiais e Métodos

2.1 Efeito do tampão sobre a variação do pH ao longo do cultivo e na atividade das glicohidrolases para fungos filamentosos

Os experimentos de fermentação submersas foram conduzidos em shaker utilizando frascos de 500 mL contendo 200 mL dos diferentes meios de culturas testados por esse trabalho em uma temperatura de 29°C a 200 rpm em pH 5,0 controlado com tampão biftalato de potássio. Alíquotas de 5 mL foram coletados em diferentes tempos, centrifugadas (10000 rpm, 10°C, 15 minutos) e o sobrenadante foi reservado para aferição do pH e posteriores análises das atividades enzimáticas contra o substrato papel de filtro.

- **Para o fungo filamentoso *Penicillium echinulatum* PS1M29**

Para o fungo filamentoso *Penicillium echinulatum* PS1M29 foi verificado a influência do tampão na atividade Fpase em cultivos de fermentação submersa contendo bagaços de cana-de-açúcar submetidos a diferentes pré-tratamentos (explosão a vapor (BEX), explosão a vapor seguido de deslignificação (BED), tratamento hidrotérmico (BH), tratamento hidrotérmico e moído (BHM)) e com celulose comercial cellufloc (CEL). Esses experimentos foram realizados na presença e na ausência do tampão.

- **Para o fungo Filamentoso *Trichoderma harzianum* linhagem P49P11**

Para o fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* linhagem P49P11 foi verificado a influência do tampão na atividade Fpase em cultivos de fermentação submersa contendo o meio otimizado por

Delabona et al 2013 na presença e ausência do tampão.

2.2 Aplicação do controle do pH pelo tampão ftalato de potássio em experimentos de otimização/modulação de meio de cultura

- Para o fungo filamentososo *Penicillium echinulatum* PS1M29 → modulação do meio

A aplicação do tampão para controle do pH em experimentos de planejamentos estatísticos foi utilizado para a avaliação da influencia de 5 fatores no meio de cultura, aplicando a metodologia de planejamentos de experimento fracionado sendo as variações e os componentes demonstrado na Tabela 1. Amostras foram retiradas nos tempos de 96 e 144 horas e o pH foi aferido.

Tabela 1: Variáveis codificadas para PFF 2⁵⁻¹ visando verificação da influência de componentes do meio de cultura na atividade de glicohidrolases para *P. echinulatum*

Variáveis	-1	0	+1
Farelo de Soja (g/L)	0	2,5	5
Farelo de Trigo (g/L)	0	5	10
Sacarose (g/L)	0	5	10
Extrato de Leveduras (g/L)	0	1	2
Sol. sais (mL/L)	50	175	300

- Para o fungo Filamentoso *Trichoderma harzianum* linhagem P49P11 → otimização do meio

Foi validado também, a aplicação do controle do pH para a otimização de meios de cultura em dois planejamentos completos do tipo composto central rotacional para o fungo filamentosso *T. harzianum* cujos componentes avaliados estão apresentados na Tabela 2. Amostras foram retiradas nos tempos de 72 e 96 horas de cultivo e o pH foi aferido.

Tabela 2. Variáveis utilizadas no DCCR visando otimização da atividade de FPase para *T. harzianum*.

Variáveis	Pontos Axiais

	-1,68 (-2 ^{3/4})	+1,68(+2 ^{3/4})
Sacarose (g/L)	0	10
Celulose (g/L)	0	20
Farelo de Soja (g/L)	0	15
Farelo de trigo (g/L)		

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito do tampão sobre a variação do pH ao longo do cultivo e na atividade das glicohidrolases

- Para o fungo filamentoso *Penicillium echinulatum* PS1M29

A Figura 1 mostra a atividade de Fpase em diferentes tempos de cultivo nos diferentes meios na presença e na ausência do controle de pH pelo tampão ftalato de potássio. Como pode ser observado o controle de pH para a atividade de Fpase nos diferentes meios de cultivos contribuiu para a diminuição do desvio padrão entre as triplicatas e padronizou a atividade de Fpase para os diferentes meios, mostrando que as diferenças nas atividades de Fpase não são devido a fonte de celulose ou ao pre-tratamento imposto no bagaço e sim pelas variações dos pHs ao longo do cultivo nos diferentes materiais. Com isso pode-se afirmar que para um cultivo utilizando 10g/L das fontes de celuloses utilizadas nesse trabalho para *Penicillium echinulatum* PS1M29 a indução de Fpase é a mesma e que o tampão biftalato de potássio não influencia negativamente na indução.

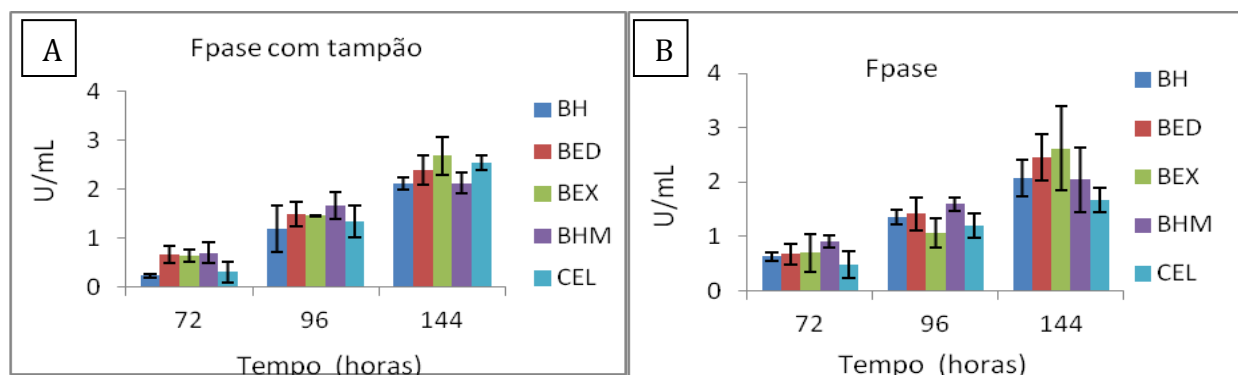


Figura 1: Cinética da produção de Fpase pelo fungo *P. echinulatum* S01M29 em fermentação submersa com as diferentes fontes de carbonos. Média das triplicatas com seu respectivo desvio

padrão. **A)** Com pH 5,9 controlado pelo tampão biftalato de potássio 0,1M. **B)** pH livre, sem nem um controle.

A Figura 2 mostra a eficiência de tamponamento do tampão biftalato de potássio em pH 5,9 nos diferentes meios de cultura ao longo de todo o tempo do cultivo. Este resultado valida o uso desse tampão para o controle do pH ao longo do cultivo de *Penicillium echinulatum* PS1M29 visando estudos de meios de cultura que ocorre grande variação no pH para otimização das atividades das glicohidrolases.

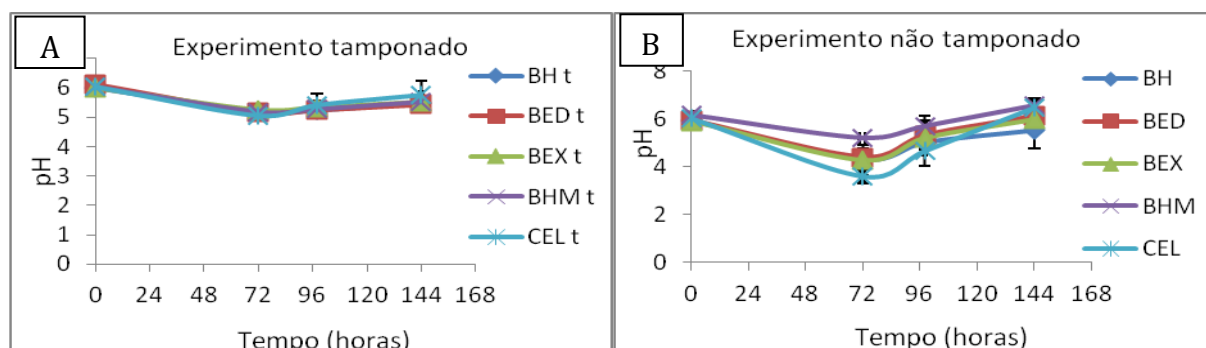


Figura 2: Variação do pH ao longo do cultivo do fungo *P. echinulatum* S01M29 em fermentação submersa com as diferentes fontes de carbonos. Média das triplicatas com seu respectivo desvio padrão. **A)** Com pH 5,9 controlado pelo tampão biftalato de potássio 0,1M. **B)** pH livre, sem nem um controle.

- **Para o fungo Filamentoso *Trichoderma harzianum* linhagem P49P11**

A Figura 3 mostra a atividade de Fpase e a variação do pH ao longo tempo do cultivo na presença e na ausência do controle do pH pelo tampão ftalato de potássio 0,1M pH 5. Como pode ser observado o controle de pH para a atividade de Fpase nos diferentes meios de cultivos contribuiu para a diminuição do desvio padrão entre as triplicatas e padronizou a atividade de Fpase, sendo observado o mesmo para o *Penicillium echinulatum* PS1M29.

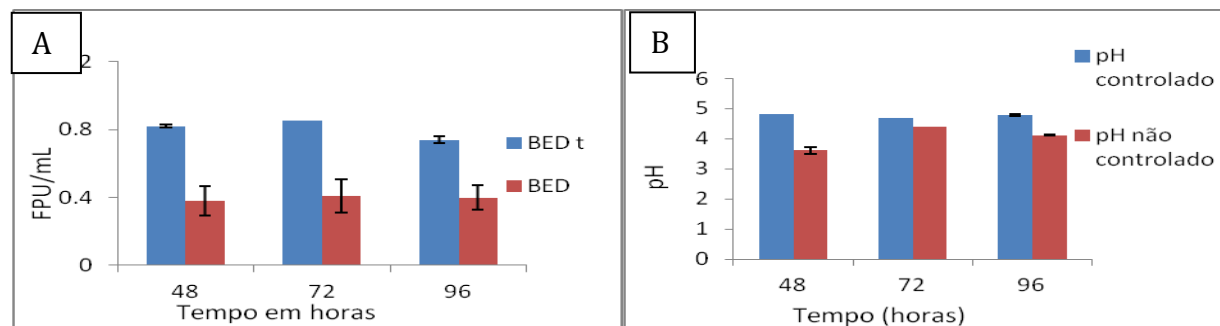


Figura 3: **A)** Cinética da produção de Fpase pelo fungo *Trichoderma harzianum* em fermentação submersa com as diferentes fontes de carbonos com pH 5,5 controlado pelo tampão biftalato de potássio 0,1M e pH livre, sem nem um controle. Média das triplicatas com seu respectivo desvio

padrão. **B)** Variação do pH ao longo do cultivo do fungo *Trichoderma harzianum* em fermentação submersa com as diferentes fontes de carbonos com pH 5,5 controlado pelo tampão biftalato de potássio 0,1M e pH livre, sem nem um controle. Média das triplicatas dos ensaios com seu respectivo desvio padrão.

3.2 Aplicação do controle do pH pelo ftalato de potássio 0,1M em planejamentos estatísticos de otimização/modulação de meios de cultura em frascos agitados

- Para o fungo filamentososo *Penicillium echinulatum* PS1M29

Observa-se que o tampão biftalato de potássio estabilizou o pH para todos os ensaios do planejamento nos diferentes tempos de cultivo (Figura 4). Costa (2012a), através desse planejamento, modulou e otimizou meios de cultura para as atividades das glicohidrolases. A eficiência do método abre um grande leque de possibilidade de estudos sobre os indutores que atuam em conjunto ou individualmente na expressão de glicohidrolases em cultivos submersos.

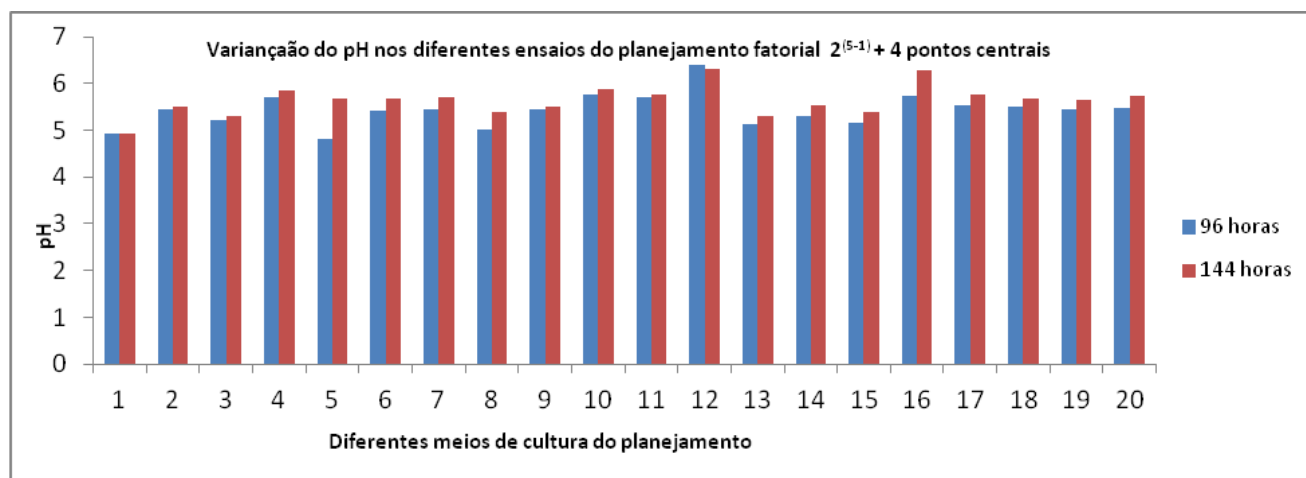


Figura 4: Variação do pH ao longo dos ensaios de cultivo do fungo *P. echinulatum* S01M29 em planejamento estatístico fracionado para verificação da influência de cinco componentes do meio de cultura.

- Para o fungo Filamentoso *Trichoderma harzianum* linhagem P49P11

Observa-se que o tampão biftalato de potássio estabilizou o pH para todos os ensaios do planejamento nos diferentes tempos de cultivo (Figura 5). Percebe-se um eficiente controle do pH para todos os ensaios do planejamento, mostrando a potencialidade do uso desse tipo de controle de pH para otimizações de meios de cultura em menor escala. O uso desta técnica para otimizações iniciais de meio de cultura permite um amplo estudo de indutores das glicohidrolases.

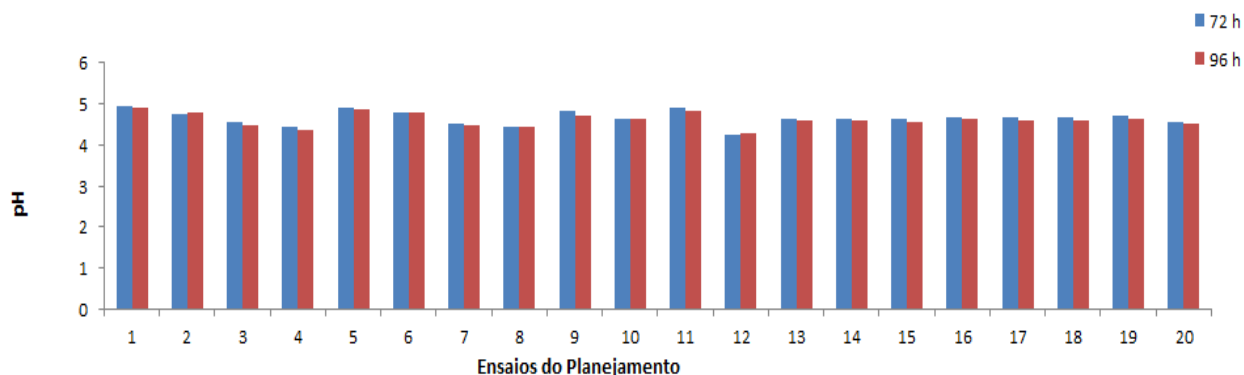


Figura 5: Variação do pH ao longo dos ensaios de cultivo do fungo *Trichoderma harzianum* para planejamentos estatísticos do tipo completo rotacional (DCCR) para verificação da influência de tres componentes do meio de cultura.

4. CONCLUSÃO

Com base nesse trabalho pode-se afirmar que o controle do pH pelo tampão ftalato de potássio para os fungos filamentosos *P. echinulatum* S01M29 e *Trichoderma harzianum* foi eficiente no decorrer dos cultivos.

A presença do tampão no meio de fermentação obteve uma influência positiva para a atividade de Ffase para os dois fungos em estudo.

A aplicação do controle do pH pelo tampão biftalato de potássio foi eficiente em experimentos de modulação e otimização de meios de culturas para os fungos filamentosos *P. echinulatum* S01M29 e *Trichoderma harzianum* respectivamente. Essa técnica pode se expandir para demais fungos filamentosos no intuito de incrementar a produção de glicohidrolases por componentes do meio de cultura em uma escala menor de trabalho e com maiores possibilidades de estudar uma grande quantidade de indutores em conjunto.

5. REFERÊNCIAS

COSTA PS, DELABONA PS, ROLB D, DILLON AJP, PRADELLA JGC. Modulação da produção de celulases em *Penicillium echinulatum* PS1M29 pela variação dos componentes do meio de cultura. *X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática*. 7 a 10 de Outubro, Blumenau, Santa Catarina, Brasil. 2012b

DELABONA PS, FARINAS CS, SILVA MR, AZZONI SF, PRADELLA, JGC. 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, 2012a.

DOMINGUES, F.C.; QUEIROZ, J.A.; CABRAL, J.M.S.; FONSECA, L.P. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulose production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 394-401, 2000.

MANDELS, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *The Journal of Bacteriology*, v. 73(2), p. 269-278, 1957.

STERNBERG, D.; DORVAL, S. Cellulase production and ammonia metabolism *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* 21, 181-191, 1979.

TANGNU, S.K.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. Enhanced production of cellulase, hemicellulase and β -glucosidase by *Trichoderma reesei* (RUT C-30). *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 1837-1849, 1981.