

MODELAGEM MATEMÁTICA DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS UTILIZANDO *Trichoderma harzianum* EM MEIO SUBMERSO E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO FONTE DE CARBONO

L.GELAIN¹, A. C da COSTA¹ e J. G. C. PRADELLA²

¹ Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

² Centro de Pesquisa em Energia e Materiais, Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol - CTBE

E-mail para contato: lucas26gelain@hotmail.com

RESUMO – A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é uma etapa importante na produção de etanol de segunda geração. As enzimas responsáveis pela hidrólise podem ser obtidas a partir de cultivos submersos utilizando fungos filamentosos como o *Trichoderma harzianum*. Modelos matemáticos são necessários para desenvolvimento de processos, pois permitem o entendimento dos fenômenos envolvidos e podem ser usados para scale-up e otimização das condições de operação. Neste trabalho avaliou-se a cinética em batelada da produção de enzimas em três concentrações iniciais de bagaço de cana-de-açúcar (10, 15 e 20 g L⁻¹). Em seguida modelos matemáticos foram propostos para descrever o processo. De acordo com os resultados os modelos descrevem bem a cinética nas condições analisadas e os valores dos parâmetros resultantes foram semelhantes com os valores que puderam ser estimados a partir dos dados experimentais.

1. INTRODUÇÃO

A constante preocupação com os efeitos causados pela emissão e acúmulo na atmosfera de gases gerados a partir do uso de combustíveis fósseis, desperta o interesse de pesquisadores na busca por novas fontes de energia e rotas alternativas para a geração de combustíveis menos nocivos ao meio ambiente.

O etanol proveniente da fermentação vem sendo utilizado como combustível para veículos automotores substituindo a gasolina, que é derivada do petróleo. A grande vantagem do etanol em relação à gasolina está no fato de que o etanol é considerado renovável e, em princípio, sustentável (Wheals et al., 1999).

Em processos fermentativos, a produção de etanol vem de cultivos utilizando leveduras em condições específicas. Para o crescimento destes microrganismos é necessário, entre outros nutrientes, fontes de carbono como açúcares de baixa massa molecular. Esses açúcares podem vir da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.

Fungos filamentosos têm sido tradicionalmente utilizados para produção de complexos enzimáticos para hidrólise dos principais componentes de materiais lignocelulósicos (Merino e Cherry, 2007) devido a sua capacidade de produção de complexos enzimáticos com altas atividades.

Uma etapa importante no desenvolvimento de um processo é a modelagem matemática e as simulações, pois são importantes ferramentas para avaliar determinadas condições de um processo sem recorrer à construção de equipamentos em escalas maiores que as utilizadas em laboratórios. Devido a sua importância, a elaboração de modelos que descrevam fenômenos naturais torna-se indispensável para evitar gastos desnecessários e perda de tempo de produção dentro de uma empresa.

Neste trabalho, o foco estará direcionado na modelagem matemática da produção de enzimas geradas pelo *Trichoderma harzianum* utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi empregado o fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* armazenado em geladeira em PDA (Potato Dextrose Agar).

Os meios de cultura base para preparação de inóculo e para experimentos em biorreator estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição dos meios de cultura (base 1L) (Pereira e Pradella, 2010)

Composição	Meio de inóculo	Meio de cultivo
Bagaço pré-tratado (BED)	-	10, 15 e 20 g
Glicose	10 g	-
Celulose	10 g	-
Peptona	1 g	1 g
Solução salina	50 mL	50 mL
Tween 80	1 mL	1 mL

A solução salina empregada foi a solução de Mandels concentrada (Mandels, 1957), em g/L: KH_2PO_4 20; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 14; uréia 3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3; CaCl_2 3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,014; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,016; CoCl_2 0,02.

O bagaço pré-tratado utilizado como fonte de carbono foi o bagaço de cana-de-açúcar tratado por explosão a vapor, deslignificado e moído em moinho de facas (BED). Os ensaios foram realizados em reator de 3L (New Brunswick) com um impelidor *pitched blade* e um volume de inóculo de 10 % (v/v). As condições operacionais estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Condições operacionais para os ensaios em reatores de 3L

Condições operacionais	Valores
Frequência de agitação	200 – 350 rpm
pH	5
O ₂ dissolvido	30 %
Temperatura	29°C
Fluxo de ar	0,3 – 4,8 vvm
Volume	1,5 L

A concentração de celulose residual foi estimada segundo Ahamed e Vermette (2009). A concentração de células foi estimada pela diferença entre a massa seca total e a massa de celulose. As atividades enzimáticas do caldo fermentativo FPase, xilanase, e beta-glicosidase foram determinadas segundo Ghose (1987). A concentração de proteína total foi efetuada pelo método de Bradford (1976). Apenas as enzimas na fase líquida foram consideradas na modelagem matemática. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima requerida para liberar um μ mol de açúcar redutor por minuto, nas condições do ensaio.

A estimativa dos parâmetros e a simulação do modelo foram realizadas utilizando o software Matlab R2013b. O conjunto de equações diferenciais foi resolvido através da função *ode45*, a função objetivo (Equação 1) foi minimizada pela função *fmicon*, e para a interpolação foi usada a função *interp1*. Todos os ensaios foram empregados na estimativa dos parâmetros.

$$f = \sum_{n=1}^{np} \left[\frac{(X_n - Xe_n)^2}{Xe_m^2} + \frac{(P_{1n} - Pe_{1n})^2}{Pe_{1m}^2} + \frac{(P_{2n} - Pe_{2n})^2}{Pe_{2m}^2} + \frac{(P_{3n} - Pe_{3n})^2}{Pe_{3m}^2} + \frac{(S_n - Se_n)^2}{Se_m^2} \right] \quad (1)$$

X , P e S são as concentrações de células, produtos e substrato obtidos pelo modelo. Xe , Pe e Se são as concentrações de células, produtos e substrato experimentais. Xe_m , Pe_m e Se_m são as maiores concentrações de células, produtos e substrato obtidos experimentalmente, n corresponde ao ponto que está sendo analisado e np é o número total de pontos a serem analisados (Andrade, 2009).

3. RESULTADOS

3.1. Modelos Matemáticos

O balanço de massa para a produção de células foi representado pela Equação 2 onde o velocidade específica de crescimento (Equação 3) foi descrita pelo modelo de Monod ($\frac{\mu_m S}{K_S + S}$). Adicionou-se um termo de repressão do crescimento celular análogo ao termo de inibição por

produto descrito em Levenspiel (1999) $\left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^r$. A perda de massa celular foi representada por uma equação de primeira ordem (Xk_{dX}).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^r X - Xk_{dX} \quad (2)$$

$$\mu_x = \mu_m \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^r \quad (3)$$

Nas primeiras horas não foi observado grandes variações no consumo de substrato e produção de enzimas. Para representar esse atraso foi adicionada a expressão proposta por Bergter e Knorre (1972) (Bader et al., 1993) (Equação 4).

$$(fL) = \left(1 - e^{\left(\frac{-t}{T_L}\right)}\right) \quad (4)$$

Os balanços de massa para FPase, beta-glicosidase e xilanase estão representados pelas Equações 5, 6 e 7, respectivamente. A velocidade de aumento da concentração de enzimas na fase líquida foi considerada proporcional a velocidade de consumo de substrato. Adicionou-se um termo de repressão da produção de enzimas análogo ao termo de inibição por produto descrito em Levenspiel (1999) e a perda de atividade enzimática foi representada por uma equação de primeira ordem.

$$\frac{dF}{dt} = (fL)X\beta_F \left(1 - \frac{F}{F_m}\right)^n \left(-K_{FS} \frac{dS}{dt}\right) - FK_{Fd} \quad (5)$$

$$\frac{dB}{dt} = (fL)X\beta_B \left(1 - \frac{B}{B_m}\right)^o \left(-K_{BS} \frac{dS}{dt}\right) - BK_{Bd} \quad (6)$$

$$\frac{dXy}{dt} = (fL)X\beta_{Xy} \left(1 - \frac{Xy}{Xy_m}\right)^p \left(-K_{Xys} \frac{dS}{dt}\right) - XyK_{Xyd} \quad (7)$$

O consumo de substrato foi descrito apenas para a produção de células desconsiderando a perda de massa celular, consumo para a produção de enzimas e manutenção das células para simplificar o modelo (Equação 8).

$$\frac{dS}{dt} = -(fL) \frac{\mu_x}{Y_{XS}} X \quad (8)$$

3.2. Resultados dos Modelos

As Figuras 1 e 2 apresentam a variação dos dados experimentais observados e o ajuste dos modelos propostos em função do tempo. De forma geral os modelos conseguem descrever bem a

cinética de crescimento celular, consumo de substrato e variação da concentração de enzimas na fase líquida para os ensaios realizados.

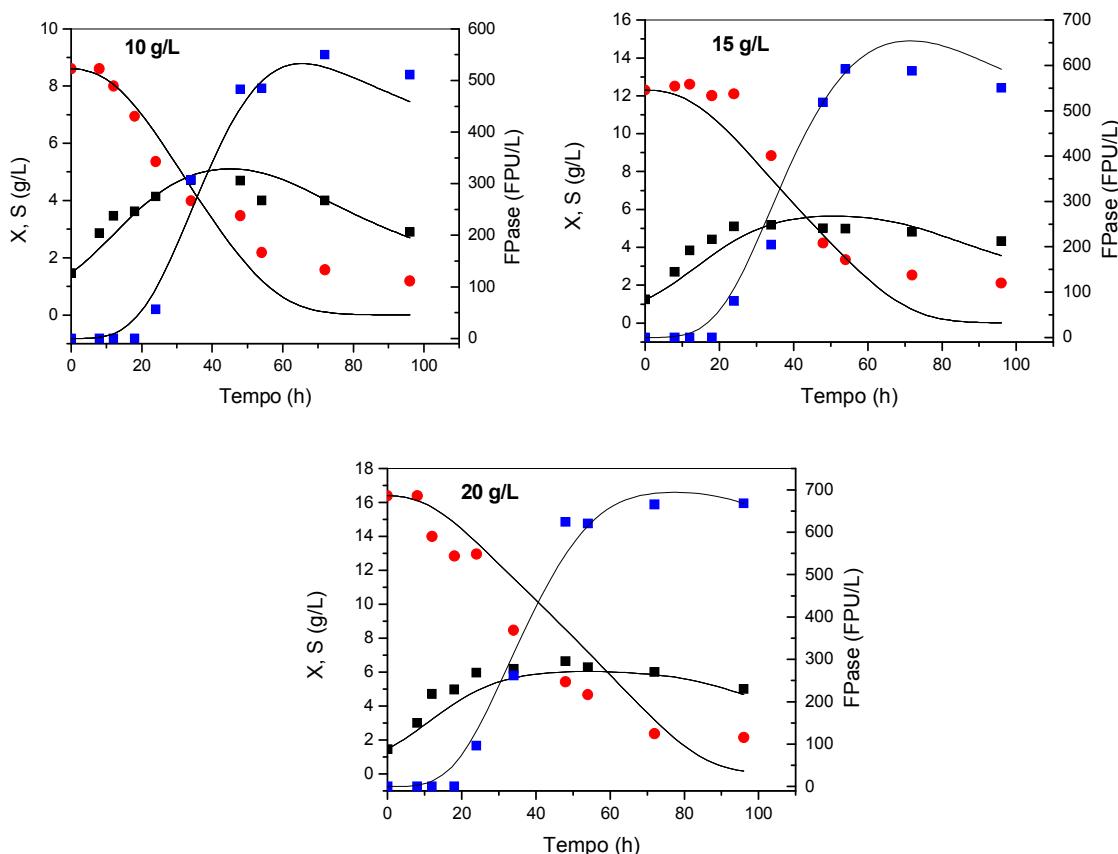


Figura 1 – Perfis das concentrações experimentais de células - X (■), celulose - S (●), FPase (■) e o resultado da simulação (—) para os ensaios utilizando 10, 15 e 20 g/L de bagaço de cana-de-açúcar

Os parâmetros dos modelos estão apresentados na Tabela 3. Os valores ficaram semelhantes aos valores estimados a partir dos dados experimentais resultando em um ajuste razoável.

O modelo de consumo de substrato superestima o consumo no final dos cultivos utilizando 10 e 15 g/L de bagaço de cana-de-açúcar (Figura 1). Isso pode ter ocorrido devido à simplicidade desse modelo. O modelo de *Monod* mais o termo de repressão do crescimento (Equação 3) conseguiram descrever bem a velocidade específica de crescimento celular.

As variações nos perfis das concentrações de enzimas e substrato foram semelhantes (apenas com sinais opostos) indicando proporcionalidade entre a velocidade de consumo e a velocidade de variação da concentração de enzimas na fase líquida. Isso sugere que essa consideração na construção dos modelos de enzimas é plausível.

A falta de ajuste em algumas curvas mostra a complexidade na estimação de parâmetros empregando diversos ensaios com vários componentes simultaneamente.

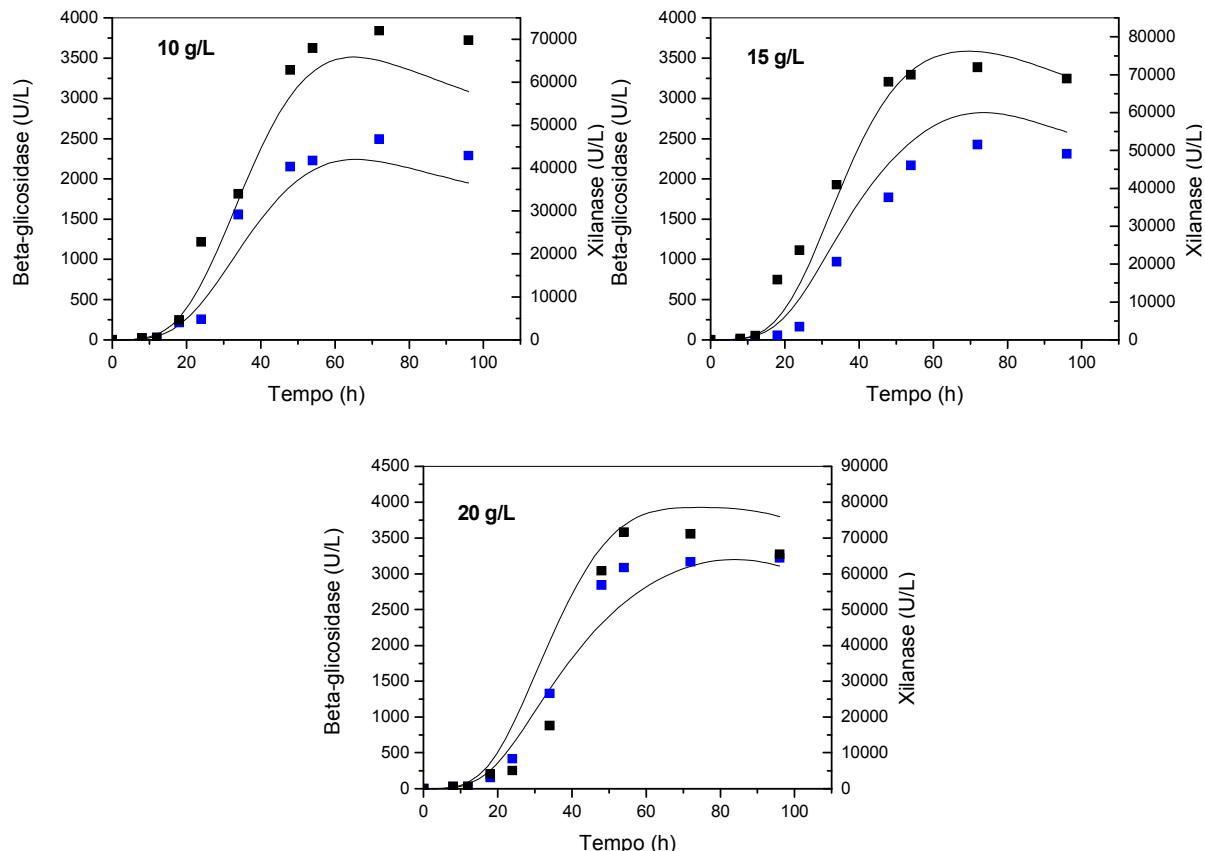


Figura 2 – Perfis das concentrações experimentais de Beta-glicosidase (■), Xilanase (■) e o resultado da simulação (–) para os ensaios utilizando 10, 15 e 20 g/L de bagaço de cana-de-açúcar

Tabela 3 – Descrição dos parâmetros

Parâmetro	Valor estimado	Valor modelo	Descrição
μ_m	0,10-0,15 ¹	0,15	Velocidade específica máxima de crescimento celular (h ⁻¹)
K_S	3,6 ² -11,27 ³	4,26	Constante modelo de Monod (g L ⁻¹)
X_m	> 7	7,29	Crescimento máximo (g L ⁻¹)
r	-	0,97	Expoente de repressão do crescimento (-)
k_{dX}	< 1	0,017	Constante de perda de massa celular (h ⁻¹)
T_L	-	121,60	Constante da Equação 4 (h ⁻¹)
Y_{XS}	0,4 ⁴	0,17	Fator de conversão de células em relação ao substrato (g g ⁻¹)
β_F	3-7 ¹	6,37	Velocidade específica máxima de produção de FPase (FPU g ⁻¹ h ⁻¹)
F_m	> 668	714,49	Concentração máxima de FPase (FPU L ⁻¹)
n	-	0,70	Expoente de repressão da produção de FPase (-)
K_{FS}	-	16,85	Constante de proporcionalidade de FPase (h L g ⁻¹)
K_{Fd}	< 1	0,0063	Constante de perda da atividade de FPase (h ⁻¹)
β_B	13-25 ¹	23,82	V. específica máxima de produção de β-Glicosidase (U g ⁻¹ h ⁻¹)
B_m	> 3200	4000	Concentração máxima de β-Glicosidase (U L ⁻¹)
o	-	1,42	Expoente de repressão da produção de β-Glicosidase (-)
K_{BS}	-	22,11	Constante de proporcionalidade de β-Glicosidase (h L g ⁻¹)
K_{Bd}	< 1	0,0060	Constante de perda da atividade de β-Glicosidase (h ⁻¹)
β_{Xy}	370-510 ¹	351,21	Velocidade específica máxima de produção de Xilanase (U g ⁻¹ h ⁻¹)
Xy_m	> 72000	80033	Concentração máxima de Xilanase (U L ⁻¹)
p	-	0,72	Expoente de repressão da produção de Xilanase (-)
K_{XyS}	-	41,82	Constante de proporcionalidade de Xilanase (h L g ⁻¹)
K_{Xyd}	< 1	0,0054	Constante de perda da atividade de Xilanase (h ⁻¹)
X	-	-	Concentração de células (g L ⁻¹)
S	-	-	Concentração de celulose (g L ⁻¹)
F	-	-	Concentração de FPase (FPU L ⁻¹)
B	-	-	Concentração de Beta-Glicosidase (U L ⁻¹)
Xy	-	-	Concentração de Xilanase (U L ⁻¹)

¹ Parâmetros estimados utilizando o software OriginPro 8.0.

² Velkovska et al., 1997.

³ Ma et al., 2013.

⁴ Parâmetro estimado utilizando a equação $\Delta X / \Delta S$ entre 0 e 48 h (fator de conversão observado).

4. CONCLUSÃO

Os modelos propostos conseguem descrever satisfatoriamente a cinética do processo para os ensaios analisados. A repetição desses ensaios assim como ensaios ampliando o intervalo de concentrações iniciais de substrato devem ser realizados para aumentar a confiabilidade dos modelos. Alterações nos modelos, como a consideração da perda de massa celular no modelo de consumo de substrato, podem ser efetuadas para melhorar o ajuste e descrever melhor o processo.

6. REFERÊNCIAS

- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. *Bioresour. Technol.*, v. 100, n. 23, p. 5979 – 5987, 2009.
- ANDRADE, R. R. *Modelagem cinética do processo de produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar concentrado com melaço considerando reciclo de células*. 2012. 284 f. Tese de doutorado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- BADER, J., KLINGSPOHN, U., BELLGARDT, K.H.; SCHUGERL, K. Modeling and simulation of the growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C30. *J. Biotechnol.*, v. 29, n. 1-2, p. 121–135, 1993.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, n. 1-2, p. 248 – 54, 1976.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.*, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.
- LEVENSPIEL, O. *Chemical reaction engineering*. 3. ed. New York, NY: John Wiley, 1999, p. 623 – 629.
- MA, L.; LI, C.; YANG, Z.; JIA, W.; ZHANG, D.; CHEN, S. Kinetic studies on batch cultivation of *Trichoderma reesei* and application to enhance cellulase production by fed-batch fermentation. *J. Biotechnol.*, v. 166, n. 4, p. 192 – 197, 2013.
- MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.*, v. 73, n. 2, p. 269 – 278, 1957.
- MERINO, S.T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization In: Olssen, L. Ed. Biofuels. *Springer-Verlag*, v. 108, p. 95 – 120, 2007.
- PEREIRA, B. M. P.; PRADELLA, J. G. C. Produção de enzimas por *Penicillium echinulatum* para hidrólise de material lignocelulósico. In: V CongressoInternacional de Bioenergia, 2010, Curitiba. *Anais...* Curitiba, 2010.
- VELKOVSKA, S.; MARTEN, Mark R.; Ollis, David F. Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30. *J. Biotechnol.*, v. 54, n. 2, p. 83 – 94, 1997.
- WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M.G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol.*, v. 17, n. 4, p. 482 – 487, 1999.