



OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE XILANASES POR CEPAS DE *Trichoderma* SELVAGENS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

M. V. da F. S. AMORIM^{1,2}, G. S. FAHEINA JR.^{1,3}, C. M. MARTINS⁴, M. A. de JESUS⁵, G. A. S. PINTO¹.

¹ Embrapa Agroindústria Tropical

² Rede Nordeste de Biotecnologia - Universidade Estadual do Ceará

³ Departamento de Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Ceará

⁴ Departamento de Biologia - Universidade Federal do Ceará

⁵ Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia.

RESUMO – O interesse na pesquisa de enzimas lignocelulolíticas fundamenta-se na utilização em reciclagem de resíduos da agricultura, rejeitos urbanos, tratamento de solos, efluentes diversos e aplicações industriais. O uso desses processos possibilita a produção de um grande número de metabólitos (enzimas), as quais podem ser obtidas a partir do reaproveitamento de recursos naturais e de resíduos da agroindústria que podem ser encontrados em abundância no Brasil. O trabalho teve como objetivo analisar a influência da adição de sacarose e diferentes fontes de nitrogênio na composição do meio de cultivo em fermentação submersa para produção de xilanases. Foram utilizadas cepas de *Trichoderma* da região amazônica. A maior atividade enzimática apresentada foi 2,59 U/ml em meio contendo sacarose e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, essas presenças contribuíram para uma maior produção da enzima mesmo quando esses componentes não estavam combinados no meio. A otimização dos processos de fermentação torna-se de fundamental importância para uma eficiente produção enzimática.

PALAVRAS-CHAVES: Enzimas xilanolíticas, xilana, fermentação submersa.

1. INTRODUÇÃO

Xilana é uma fração integral da estrutura lignocelulósica e representa a segunda mais abundante biomassa disponível e renovável do planeta. Compreende a maior parte da fração de hemiceluloses encontrados no ambiente constituindo aproximadamente 25% do total de biomassa (Kuhad e Singh, 1993). Para uma eficiente utilização da biomassa, faz-se necessária a hidrólise da xilana por enzimas denominadas

endo-xilanases que convertem xilana em xilooligosacarídeos. Assim como participam as d-xilosidades, que auxiliam na conversão de xilooligosacarídeos em xilose (Kulkarni, 1999).

Muitas pesquisas relatam a obtenção de xilanases de fungos (Gawande, 1999), bactérias (Gilbert, 1993), acetomicetos (Beg, 2000) e leveduras (Wenlu, 1999), destes poucos estudos utilizam fungos como fonte de xilanases. Existem razões pelas quais



devemos nos aprofundar nesta pesquisa, a principal delas é o fato de que os fungos são capazes de produzir grandes quantidades de enzimas extra-celulares de substratos lignocelulósicos (Baldrian, 2003). Como por exemplo os *Trichodermas* e *Aspergillus*, que secretam grandes quantidades de xilanases (Fukudda, 2009).

Geralmente, os materiais lignocelulósicos são hidrolisados através de tratamento ácido e o seu hidrolisado obtido é utilizado para fermentação de etanol. Isto se deve ao fato de que este material hidrolisado não contém somente glicose na sua composição final, mas também outros monossacarídeos como xilose, manose e galactose. Portanto, é grande o interesse na produção microbiana de xilanase, tendo em vista a variedade de aplicações na indústria de oligossacarídeos, na indústria de alimentos, na indústria de celulose e papel, produção de etanol e xilitol, combustíveis líquidos e outras substâncias químicas (Romanowska, 2006; Beg, 2001; Tauk-Tornisielo, 2009).

Existem muitos fatores que afetam a produção das xilanases como a fonte de carbono que pode induzir ou reprimir a atividade catabólica, assim como a temperatura, tempo de cultivo e os substratos usados (Lenartovicz et al.; 2003).

Em muitos casos, açúcares facilmente metabolizáveis, tais como glicose e/ou xilose são supressores da síntese de xilanase. Por outro lado, a regulação da secreção de xilanase pelos microrganismos ainda não é completamente entendida. Desde que a xilana não é capaz de entrar na célula microbiana, a indução de xilanase é

estimulada pelos fragmentos de xilana de baixa massa molar, que são produzidos no meio pela quantidade de enzimas constitutivas produzidas (Beg et al, 2001).

Assim, para uma produção comercial, a otimização da composição do meio é um dos passos essenciais para minimizar a quantidade de componentes não utilizáveis em uma produção rentável. Nenhuma composição de meio ainda foi estabelecida como ideal para uma melhor produção de metabólitos, uma vez que a diversidade genética presente em diferentes fontes microbianas faz com que cada organismo ou linhagem deste tenha suas condições especiais de produção máxima. (Rao, 2008)

Este trabalho teve como objetivo fazer uma avaliação preliminar da influência da adição de sacarose e diferentes fontes de nitrogênio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NaNO_3) na composição de meios de cultivo a serem utilizados em fermentação submersa para produção de xilanases.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Foram utilizados 3 cepas de *Trichoderma* cedidas pelo Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, sendo elas T 393, T 881 e T 930.

2.2 Fermentação submersa: composição do meio, condições de cultivo e tempo de fermentação

O meio de cultivo utilizado na fermentação líquida consiste de 2,0 g/l KH_2PO_4 , 0,3 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,4 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,005 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0016 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,0014 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,0037 g/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Ahamed, 2008), utilizando como fonte principal de carbono 10 g/l de xilana oalt-spelt (Fluka), sendo avaliada a influencia da adição de sacarose (10g/l) e a fonte de nitrogênio nas quantidades 1,4 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou 2,0 g/l NaNO_3 .

O meio foi autoclavado a 121°C por 15 min. Um inóculo contendo cerca de 10^5 esporos foi incubado em erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura, incubados em shaker orbital a 30C a 150 RPM por 48 hs.

O valor inicial de pH foi ajustado em 6,0, com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio em concentrações adequadas. As amostras foram filtradas em papel Whatman N°1, identificadas e congeladas em frascos de vidro a -10°C.

2.3 Atividade de xilanase

Para todas as fermentações, foi realizada a análise enzimática de xilanase, descrita por GOMES et al (1992), com modificações. Foi determinada a produção de açúcares redutores no tempo de 10 minutos a partir de uma mistura de 0,5ml de xilana *bird-wood* (Fluka) e 0,5 ml de solução enzimática diluída a 60°C.

Uma unidade internacional de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzimas necessária para liberar 1 μmol de xilose por minuto. A xilose equivalente (açúcar redutor) gerada durante a análise foi estimada

usando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, utilizando a xilose como padrão (Miller, 1959), efetuando-se leitura em espectrofotômetro a λ 540nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As linhagens T 393, T 881 e T 930 foram selecionadas, por apresentarem em ensaios prévios em placa de Petri a capacidade de crescer em meio agarizado contendo xilana como única fonte de carbono.

Todos os fungos analisados apresentaram atividade xilanólica, quando cultivados em meio líquido (Figura 1).

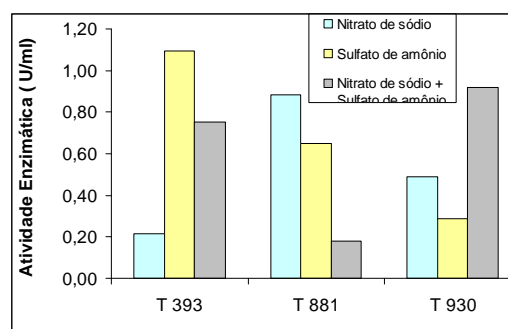


Figura 1. Atividade de xilanase das cepas de *Trichoderma* com diferentes fontes de nitrogênio.

As células necessitam de suplemento de nitrogênio, que pode ser íons de amônia, nitrato ou nitrito, ou nitrogênio orgânico produzido por outras células. A incorporação do nitrogênio inorgânico nas moléculas orgânicas se faz necessária devido a síntese de aminoácidos, que contém pelo menos um átomo de nitrogênio. Os

aminoácidos podem se combinar para formar proteínas ou podem ser utilizados na síntese de ácido nucléico. (Atlas, 1997).

Qinnghe *et al* (2004) compararam a atividade xilanolítica de fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas, onde as fontes orgânicas apresentaram atividade maior que as fontes inorgânicas. Verificou-se que não houve um padrão apontando que uma fonte de nitrogênio apresentou uma maior atividade xilanolítica nas cepas analisadas (Figura 1). A cepa T 393 apresentou uma atividade enzimática bem maior contendo sulfato de amônio do que com o nitrato de sódio e a combinação dos dois. O que já não ocorre com as outras duas outras cepas, T 881 e T 930, que apresentaram um melhor resultado de atividade enzimática no meio de cultivo contendo nitrato de sódio. Diferentemente de Qinnghe *et al* (2004) que relataram que não houve diferença significativa na produção de atividade xilanolítica em *Pleurotus ostreatus* SYJ042 tendo como fonte de nitrogênio o nitrato de sódio e o sulfato de amônio. Assim, devido o sulfato de amônio ter apresentado uma maior atividade enzimática xilanolítica, esta fonte de nitrogênio foi selecionada para a composição do meio de cultivo.

Apesar do pH não ser ter sido um fator a ser controlado durante o processo fermentativo, observou-se que houve acidificação do meio pelas três cepas analisadas nos meios de cultura adicionados de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{NaNO}_3$. Em meio contendo somente NaNO_3 , o pH manteve-se em torno do valor de pH inicial (Figura 2).

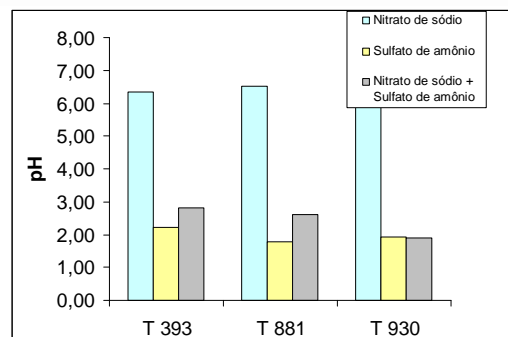


Figura 2. pH do meio fermentado pelas cepas de *Trichoderma* com diferentes fontes de nitrogênio.

Segundo Seyis e Aksoz (2005), a xilana como única fonte de carbono atinge a produção enzimática máxima após um longo período, cerca de 10 dias. Quando adicionado 0,2% de glicose ao mesmo meio de cultivo contendo xilana, a mesma produção enzimática foi atingida num período de 7 dias.

O estudo realizado apresentou nas cepas utilizadas uma atividade xilanolítica bem maior com a presença de sacarose do que na ausência. As três cepas analisadas apresentaram um aumento expressivo da atividade xilanolítica. Na cepa T 393, a atividade enzimática variou de 1,09 para 2,59 U/ml, enquanto que a cepa T 881 apresentou variação de 0,65 para 1,17 U/ml. Ou seja, estas duas cepas apresentaram um aumento de cerca de 200% na atividade enzimática. Enquanto que na terceira cepa T 930, este incremento atingiu valores bem maiores, aumentando mais que 600% na atividade enzimática da xilanase (Figura 3), onde variou de 0,29 a 1,82 U/ml.

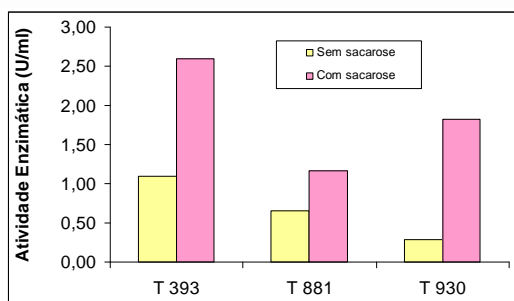


Figura 3 – Atividade de xilanase das cepas de *Trichoderma* com sulfato de amônia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sem e com adição de sacarose.

Este aumento na atividade enzimática se deve pelo fato da segunda fonte de carbono ser facilmente hidrolizado e utilizado pelo microrganismo para o crescimento ou produção de biomassa para sintetizar a enzima rapidamente (Seyis e Aksoz, 2005).

Apesar da adição de sacarose ser um incremento no custo do meio de cultura para a obtenção de xilanase, o aumento considerável da produtividade faz com que este fator seja extremamente relevante. Outro fator que pode ser analisado é o fato de que dentre as cepas fermentadas que obtiveram uma atividade enzimática maior apresentaram uma menor biomassa (Figura 3 e 4).

Assim podemos concluir que com a adição de sulfato de amônio houve uma maior conversão de substrato em enzimas do que em biomassa, aumentando a produtividade de xilanases por parte desta cepa de *Trichoderma*.

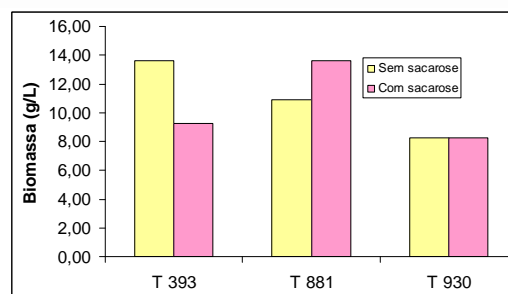


Figura 4– Biomassa produzida nas cepas de *Trichoderma* com sulfato de amônia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sem e com adição de sacarose.

4. CONCLUSÃO

A composição do meio de cultura que apresentaram melhores resultados na produção de xilanases foi a contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e sacarose, apresentando um incremento de cerca de 600% na atividade enzimática da xilanase, atingindo um resultado de 2,59 U/ml.

5. REFERÊNCIAS

- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*. V. 40, P. 399–407, 2008.
- ATLAS, R. M. Principles of Microbiology. 2a ed., Boston, WCB/MacGrall-Hill, 1997, 1298p.



- BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. *FEMS Microbiol Lett*, v. 220, p. :235–40, 2003.
- BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; KAPOOR, M.; HOONDAL, G. S. Effect of amino acids on production of xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. *World J Microbiol Biotechnol*, V.16(2), P. 211–3, 2000.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 56, P. 326–338, 2001.
- FUKUDDA, H.; KONDOB, A.; TAMALAMPUDIA, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, p. 2–12, 2009.
- GAWANDE, P. V.; KAMAT, M. Y. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. *J Appl Microbiol*, v. 87, p. 511–519, 1999.
- GILBERT, H. J.; HAZLEWOOD, G. P. Bacterial cellulases and xylanases. *J Gen Microbiol* V. 139, P. 187–94, 1993.
- GOMES, I., GOMES, J., STEINER, W. & ESTERBAUER, H. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 36, P. 701-707, 1992.
- KUHAD, R. C.; SING, A. A. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects *Crit. Rev. Biotechnol.* v.13, p.151–172, 1993.
- KULKARNI, N.; SHEDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnology aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 23, p. 411–456, 1999.
- LENARTOVICZ, V.; DE SOUZA, C. G. M.; MOREIRA, R. M. P. Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable bxylosidase by *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochemistry*, v.38, p.1775-1780, 2003.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid (DNS) for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. v.31, p.426-428, 1959.
- QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N.; CHENG, J. QIUGANG, M. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry*, V. 39, P. 1561–1566, 2004.
- RAO, C. H. S.; SATHISH, T., MAHA, M. L.; SUVARNA L. G.; RAO S. R.; PRAKASHAM, R.S. Modeling and optimization of fermentation factors for enhancement of alkaline protease production by isolated *Bacillus circulans* using feed-forward neural network and genetic algorithm, *J. Appl. Microbiol.* V. 104,P. 889–898, 2008.
- ROMANOWSKA I.; POLAK J.; BIELECKI S. Isolation and properties of *Aspergillus niger* IBT 90 xylanase for bakery. *Appl Microbiol Biotechnol.* V. 69, P. 665–71, 2006.



SEYIS, I.; AKSOZ, N. Effect of carbon and nitrogen sources on xylanase production by *Trichoderma harzianum* 1073 D3. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.55, p. 115-119, 2005.

TAUK-TORNISIELO, S. M.; VALLEJO, M. C.; GOVONE, J.S. Biomasses and xylanase production by strains of *Penicillium* isolated from brazilian atlantic forest. *Arq. Inst. Biol.*, v.76, n.3, p.359-364, 2009

WENLU, L.; YANLING, M.; GUIRONG Induction and glucose repression of endo-xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum*. *Process Biochem* 1999;34(1):67-72.