

## COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS XILANASE E FERULOIL ESTERASE EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSA PELA CEPA MUTANTE *Aspergillus niger* 3T5B8

L.M.F. GOTTSCHALK, E.F. SOUZA, L.A.N. VIANA, S.C. TERZI

Embrapa Agroindústria de Alimentos, 23020-470, Rio de Janeiro, Brasil  
E-mail para contato: [leda.fortes@embrapa.br](mailto:leda.fortes@embrapa.br)

**RESUMO** – As enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e acessórias desempenham papel fundamental na degradação da estrutura da biomassa vegetal. O presente trabalho teve como objetivo comparar a produção das enzimas xilanase e feruloil esterase pela cepa mutante *Aspergillus niger* 3T5B8 por fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS). O microorganismo foi cultivado a 30°C e 200 rpm utilizando farelo de trigo ou okara como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio com uma relação C/N fixa de 14 em ambos os processos (FES e FS). Os resultados obtidos mostraram níveis máximos de xilanase (36.900 UI/L ou 99 UI/g) e de feruloil esterase (800 UI/L ou 2 UI/g) no meio contendo farelo de trigo como fonte de carbono e com o processo de FES. No entanto, o rendimento de produto por substrato foi superior na FS com farelo de trigo como substrato atingindo valores de 350 UI/g para xilanase e 6,67 UI/g de feruloil esterase.

### 1. INTRODUÇÃO

A adaptação de tecnologias e processos para aproveitamento econômico de coprodutos das atividades da agroindústria vem ganhando importância para o Brasil e o mundo. A biomassa lignocelulósica é a maior fonte de energia renovável disponível na Terra e é formada por uma rede altamente complexa de polissacarídeos (celulose, hemicelulose e pectina) e de macromoléculas aromáticas (lignina). A completa degradação da parede celular vegetal requer uma matriz de enzimas com diferentes atividades, tais como celulases, hemicelulases, xilanases, pectinases e esterases (Beg *et al.*, 2001).

Dentre os fungos filamentosos, os do gênero *Aspergillus* são os mais estudados para a produção de enzimas. Este gênero apresenta uma grande diversidade de espécies com características vantajosas, como o fácil crescimento em meios sólidos e a produção de enzimas extracelulares. A espécie *A. niger* tem recebido bastante atenção, devido a sua grande capacidade de fermentação e altos níveis de produção de enzimas, principalmente aquelas utilizadas na hidrólise de polissacarídeos da parede celular das plantas e na indústria de alimentos (De Vries e Visser, 2001; Gottschalk *et al.*, 2010).

As xilanases atuam na quebra das ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da cadeia principal da xilana, originando oligômeros. Elas podem atuar de forma randômica sobre a cadeia principal da xilana ou em posições específicas dependendo do substituinte da cadeia lateral (De Vries e Visser, 2001). Já as feruloil esterases ou esterase de ácido ferúlico (FAE) é uma hidrolase que

atua em ésteres carboxílicos liberando ácido ferúlico e outros ácidos cinâmicos presentes nos polissacarídeos da parede celular vegetal e, por isso, possui um grande potencial de aplicação industrial na modificação da estrutura da biomassa lignocelulósica (Faulds *et al.*, 2002). As FAEs desempenham um papel fisiológico fundamental na degradação da estrutura complexa da parede celular vegetal por hidrólise dos grupos ésteres do ácido ferúlico envolvidos na interligação entre a hemicelulose e entre a hemicelulose e a lignina. Por isso as FAEs são conhecidas como enzimas acessórias, pois ajudam as xilanases, celulasas e pectinases na hidrólise da biomassa lignocelulósica (Gottschalk *et al.*, 2010)

A xilanase e a FAE podem ser produzidas utilizando tanto por FS quanto FES sendo que as condições do processo fermentativo e a escolha do substrato adequado são importantes para o sucesso da produção das enzimas. Fontes de carbono como farelo de trigo, farelo de milho e outros coprodutos da agroindústria, como o okara (resíduo insolúvel da fabricação do leite de soja) podem ser utilizados de forma eficiente na produção de enzimas. O presente trabalho teve como objetivo comparar a produção da xilanase e da FAE pela cepa mutante *Aspergillus niger* 3T5B8 por FES e FS.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Produção das enzimas

A cepa mutante *A. niger* 3T5B8 da coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos foi utilizada para produção das enzimas xilanase e FAE. Os experimentos para produção por FES foram conduzidos em colunas aeradas, sendo estas incubadas em banho-maria a 32°C com entrada controlada de ar (0,5 vvm). Para extração da enzima foram adicionados 2,5 ml de tampão fosfato de sódio pH 7,0 por grama de meio fermentado, resultando numa concentração final de substrato de 300 g/L. Já na FS, os experimentos foram conduzidos em frascos agitados a 200 rpm, 32°C e com uma concentração final de substrato de 30 g/L. O farelo de trigo ou okara foram utilizados como fonte de carbono e o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio com uma relação C/N fixa em 14 em ambos os processos.

### 2.2. Determinação das atividades enzimáticas

A determinação da atividade da xilanase no extrato bruto foi realizada conforme metodologia de Cardoso e Filho, 2003. Já a atividade da FAE foi realizada de acordo com Gottschalk *et al.*, 2010.

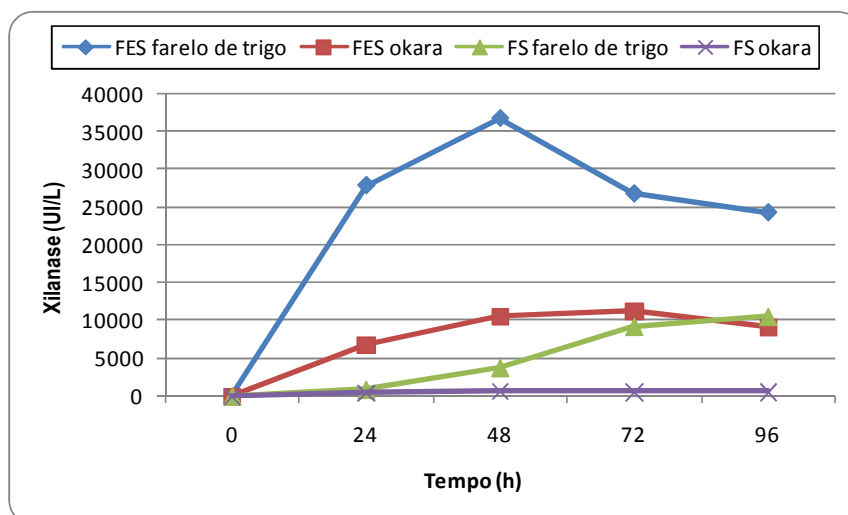
### 2.3. Determinação da proteína extracelular total

O teor de proteína será determinado segundo Lowry *et al.* (1951).

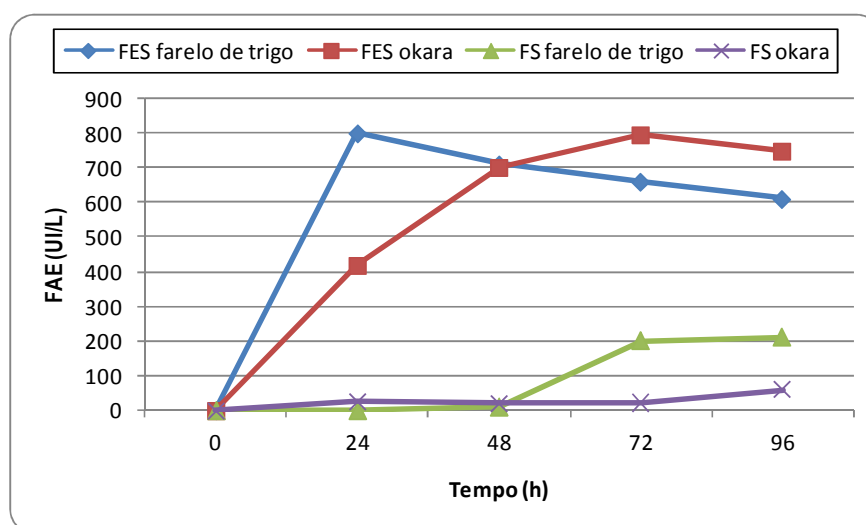
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da produção da xilanase e da FAE estão apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. Para comparar os processos FES e FS, as atividades foram expressas em UI/L. Em relação à xilanase, os níveis máximos foram de 36.900 UI/L e 10.500 UI/L para

FES e FS, nesta ordem, com farelo de trigo como substrato, e de 11.200 e 600 UI/L para FES e FS com okara. Já para a FAE, os níveis máximos foram de 800 UI/L e 200 UI/L para FES e FS com farelo de trigo e 795 e 60 UI/L para FES e FS com okara.



**Figura 1 – Evolução da produção de xilanase ao longo da fermentação FS e FES, utilizando farelo de trigo ou okara como fonte de carbono.**



**Figura 2– Evolução da produção de feruloilesterase ao longo da fermentação FS e FES, utilizando farelo de trigo ou okara como fonte de carbono.**

Os resultados da produção, da produtividade e do rendimento do produto por substrato estão apresentados na Tabela 1. Os melhores resultados foram obtidos quando o farelo de trigo foi utilizado como fonte de carbono, com produção de 99 UI/g na FES e 350 UI/g na FS para xilanase e 2,0 UI/g na FES e 6,7 UI/g na FS para a FAE. A produção (UI/L) e consequentemente a produtividade (UI/L.h) foi maior quando a FES foi utilizada, pois a enzima se encontra mais concentrada, verificado pelo maior teor de proteína. No entanto, ao avaliarmos o rendimento de produto por substrato, a FS com farelo de trigo foi aproximadamente 3 vezes superior comparada a FES.

Os resultados obtidos estão em acordo com os obtidos por Asther *et al.* (2002) onde a produção da FAE foi superior com a FES quando comparada a FS.

**Tabela 1 – Comparação dos resultados com FES e FS com farelo de trigo e okara.**

	FES farelo de trigo	FES okara	FS farelo de trigo	FS okara
Concentração de carbono (g/L)	300	300	30	30
Proteína (g/L)	7,90	<b>8,40</b>	2,30	4,10
Atividade xilanase máxima (U/L)	<b>36900 (48h)</b>	11200 (72 h)	10500 (96h)	600 (48 h)
Atividade xilanase máxima (U/g)	99	28	<b>350</b>	20
Produtividade xilanase (U/L.h)	<b>769</b>	156	109	13
Rendimento xilanase $Y_{P/S}$ (U/g)	123	37	<b>350</b>	20
Atividade FAE máxima (U/L)	<b>800 (24 h)</b>	795 (72 h)	200 (72h)	60 (96h)
Atividade FAE máxima (U/g)	2,0	1,9	<b>6,7</b>	2,0
Produtividade FAE (U/L.h)	<b>33</b>	11	3	1
Rendimento FAE $Y_{P/S}$ (U/g)	2,7	2,7	<b>6,7</b>	2,0

#### 4. CONCLUSÕES

O farelo de trigo demonstrou ser uma fonte de carbono melhor do que o okara para a produção das enzimas. A produção e a produtividade tanto para xilanase quanto para FAE foi superior na FES em relação à FS. No entanto, o rendimento de produto por substrato foi superior na FS em relação à FES, especialmente quando o farelo de trigo foi utilizado.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ASTHER, M.; HAON, M.; ROUSSOS, S.; RECORD, E.; DELATTRE, M.; LESAGE-MEESSEN, L.; LABAT, M.; ASTHER, M. Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. *Process Biochem.*, v. 38, p. 685-691, 2002.
- BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, v. 56, p. 326-338, 2001.
- CARDOSO, O.A.V.; FILHO, E.X.F. Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *Microbiol.Letters*, v. 223 (2), p. 309-314, 2003.
- DE VRIES, R.P.; VISSER, J. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiol.Mol. Biol. Rev.*, v. 65, p. 497-522, 2001.
- FAULDS, C.B.; SANCHO, A.I.; BARTOLOMÉ, B. Mono- and dimeric ferulic acid release from brewers' spent grain by fungal feruloyl esterases. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, v. 60,p. 489-493.2002.
- GOTTSCHALK, L.M.F.; OLIVEIRA, R.A.; BON, E.P.S. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochem. Eng. J.*, v. 51, p. 72-78, 2010.
- LOWRY, O.H.; ROSEMBROUH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265, 1951.