

# PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE (HEMI)CELULASES DE *Aspergillus niger* OBTIDAS POR DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO

V. M. VASCONCELLOS<sup>1,2</sup>, R. L. C. GIORDANO<sup>1</sup>, P. W. TARDIOLI<sup>1</sup> e C. S. FARINAS<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química

<sup>2</sup> Embrapa Instrumentação, Laboratório de Agroenergia, São Carlos

E-mail para contato: vanessamolina\_10@yahoo.com.br

**RESUMO** – As celulases e xilanases, enzimas capazes de hidrolisar a biomassa vegetal, podem ser obtidas através de diferentes técnicas de cultivo, microrganismos e substrato indutor, diferenciando assim as características dos extratos enzimáticos produzidos. O presente trabalho avaliou a produção enzimática pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger* utilizando diferentes métodos de cultivo (em estado sólido, submerso e combinado) e diferentes substratos indutores (bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor lavado e não lavado e com pré-tratamento hidrotérmico). A melhor condição foi o cultivo em estado sólido com o bagaço hidrotérmico, com atividades de  $116,7 \pm 14,3$ ,  $92,7 \pm 26,5$  e  $975,4 \pm 105,8$  UI/mg de proteína para endoglucanase,  $\beta$ -glicosidase e xilanase, respectivamente. Além disso, os extratos apresentam termoestabilidades distintas, indicando diferenças não só quantitativas, mas também qualitativas para as diferentes condições de cultivo.

## 1. INTRODUÇÃO

Os resíduos agrícolas e agroindustriais, devido à variedade, disponibilidade e baixo custo, destacam-se como matéria-prima para a produção de etanol celulósico, também chamado de etanol de segunda geração (2G). No Brasil, aproximadamente 350 milhões de toneladas de resíduos são produzidos anualmente, originados principalmente da cana-de-açúcar e da soja (Pereira Jr. *et al.*, 2008). O bagaço de cana-de-açúcar apresenta como principais componentes a celulose (32-44%), a hemicelulose (27-32%) e a lignina (19-24%) (Soccol *et al.*, 2010).

Três classes principais de enzimas compõem o complexo enzimático celulolítico: as endoglucanases (1-4- $\beta$ -D-glucanglucanohidrolases), exoglucanases (exo 1,4- $\beta$ -D-glucancelobihidrolase) e  $\beta$ -glicosidases ou celobiasas. Essas enzimas atuam em regiões distintas da cadeia celulósica, porém, de forma sinérgica (Zhang *et al.*, 2006). A atuação de enzimas acessórias como as xilanases também é de grande importância para a desestruturação e o relaxamento da hemicelulose presente na parede celular vegetal, facilitando o acesso à celulose (Dodd e Cann, 2009).

O desenvolvimento de bioprocessos eficientes para a produção das celulases e xilanases faz necessário para tornar economicamente viável a conversão do material

lignocelulósico (Farinas *et al.*, 2010). Nesse sentido, diversas linhas de pesquisa estão sendo estudadas, tais como: avaliação de diferentes linhagens de microrganismos capazes de produzir celulasas, condições operacionais para produção dessas enzimas (Delabona *et al.*, 2012), técnicas de cultivo (Cunha, 2012), tipo de biomassa lignocelulósica e tecnologia de pré-tratamento escolhido (Farinas, *et al.*, 2010).

O fungo filamentosso *Aspergillus niger* destaca-se com a produção de um complexo enzimático contendo celulasas, xilanasas e outras enzimas acessórias (Farinas *et al.*, 2010; Sohail *et al.*, 2009). A expressão celulolítica deste microrganismo é influenciada pelo substrato indutor e suas enzimas são consideradas termoestáveis (Farinas *et al.*, 2010; Castro, *et al.*, 1997).

As celulasas podem ser produzidas por diferentes bioprocessos. Os processos convencionais mais conhecidos são a fermentação em estado sólido (FES), caracterizada pelo cultivo em substrato sólido e umidade controlada, e a fermentação submersa (FSm), realizada na presença de água. O processo não convencional chamado de fermentação combinada (FC) foi desenvolvido por Cunha *et al.* (2012). Esse novo processo é caracterizado pela elaboração de um pré-cultivo com etapa inicial no estado sólido e posterior transição para cultivo submerso, ou seja, é uma combinação dos dois processos convencionais.

Devido a recalcitrância do material lignocelulósico, para uma eficiente produção e hidrólise enzimática, é necessário primeiramente submeter o material a um pré-tratamento, tornando a celulose mais acessível para o microrganismo ou para o ataque enzimático (Kim, 2009). Os processos de pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação dentre eles. A escolha do pré-tratamento dependerá do grau de separação requerido e do processo fermentativo que será utilizado.

Frente a isso, o presente estudo avaliou a influência na produção e a estabilidade térmica dos extratos enzimáticos produzidos por *A. niger* em diferentes técnicas de cultivo (fermentação em estado sólido, submersa e combinada) utilizando diferentes tipos de bagaço de cana-de-açúcar como substrato indutor (bagaço pré-tratado por explosão a vapor lavado (BEx-lav) e não lavado (BEx), e bagaço pré-tratado hidro termicamente (BHt).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Microrganismo

Como agente fermentador foi utilizado o *A. niger* (3T5B8) pertencente à coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos (Couri e Farias, 1995). Os conídios, mantidos sob congelamento a -18°C, foram ativados em meio batata dextrose ágar (BDA) a 32°C por 5 dias.

### 2.2. Matéria-Prima Lignocelulósica

Foi utilizado como substrato lignocelulósico indutor o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor não lavado (BEx), o BEx lavado com água morna (50-60°C) até

atingir o pH neutro (BEx-lav), e o bagaço in natura pré-tratado hidro termicamente (BHt) no Departamento de Engenharia Química da UFSCar, em reator Parr, 195°C por 10 minutos. O material seco foi selecionado por peneiramento na faixa granulométrica  $0,50 \leq X \leq 2,00$  mm.

### 2.3. Condições de Pré-Cultivo Submerso e Combinado

Os procedimentos descritos envolvendo as condições de pré-cultivo e a produção enzimática foram realizados para cada substrato e foram realizadas repetições em triplicata.

Meio de cultivo: O meio de cultivo utilizado foi o meio descrito por Mandels e Sternberg (1976), adaptado por Cunha et al. (2012).

Procedimento de pré-cultivo submerso (FSm): os esporos ativados em BDA foram ressuspensos e inoculados diretamente no meio líquido. Foram inoculados  $10^7$  esporos/mL de meio de cultivo, descrito na seção 2.3, enriquecido por 30 g/L de glicose e pH inicial 4,5. A incubação foi mantida em mesa incubadora rotativa a 200 rpm, 32°C por 48h.

Procedimento de pré-cultivo combinado (FC): A primeira etapa foi realizada em estado sólido, no qual  $10^7$  esporos/g de substrato sólido foram inoculados diretamente sobre a matéria prima lignocelulósica. Posteriormente a homogeneização, a umidade do substrato indutor foi ajustada com a adição do meio de cultivo descrito na seção 2.3, sem a suplementação de glicose, na proporção de 12mL por 5g de substrato sólido, os frascos permaneceram incubados em estufa à 32°C por 24h. Após esse período iniciou-se a segunda etapa, que consistiu na transição dos pré-cultivos para a fermentação submersa através da adição de meio líquido descrito na seção 2.3 enriquecido com 30 g/L de glicose com pH inicial 6,0. Os frascos foram mantidos em mesa incubadora rotativa a 200rpm e 32°C (Cunha *et al.*, 2012).

### 2.4. Produção Enzimática

Fermentação em estado sólido: a produção enzimática por essa metodologia dispensa a etapa de pré-cultivo e assemelha-se com a primeira etapa do pré-cultivo combinado, porém os frascos permanecem incubados por um período de 72h. Para a obtenção dos extratos enzimáticos foi realizada a extração com a adição de tampão acetato de sódio 0,2 M e pH 5,0, na proporção 1:10 (sólido/líquido). Os frascos foram mantidos em mesa incubadora rotativa a 120 rpm, 32°C por 40 min. A suspensão foi filtrada e o extrato enzimático obtido foi centrifugado a 11.000 rpm por 15 min e mantido a -80°C para posteriores análises enzimáticas.

Fermentação submersa e combinada: a produção de celulases e xilanases foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de volume útil, composto pelo meio de cultivo descrito na seção 2.3 enriquecido com 10g/L de glicose, 1% (m/v) da matéria prima lignocelulósica e inoculados com 10% (v/v) do caldo do pré-cultivo. Os frascos foram incubados em mesa incubadora rotativa a 200 rpm por 72h à 32°C. No final das 72h as amostras foram filtradas, centrifugadas e armazenadas para análise nas mesmas condições da FES.

## 2.4. Procedimento Analítico

Atividade de endoglucanase: a atividade de endoglucanase foi determinada a 50°C, tendo como substrato uma solução de carboximetilcelulose 0,4% em tampão citrato de sódio 0,2M, pH 4,8, por 10 minutos de acordo com adaptações na metodologia de Ghose (1987).

Atividade de xilanase: a atividade de xilanase foi determinada utilizando-se como substrato uma solução de xilana 1% em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0, por 5 minutos à 50°C segundo Bailey e Poutanen (1989).

Para as atividades descritas acima uma unidade de atividade enzimática (UI) corresponde a 1 μmol de grupos redutores liberados por minuto de reação. Os açúcares liberados foram determinados pelo método de DNS segundo Miller (1959).

Atividade de β-glicosidase: a atividade de β-glicosidase foi determinada utilizando como substrato uma solução de celobiose 0,015M, preparada em tampão citrato de sódio 0,05M, pH 4,8, incubando-se um volume de enzima apropriado em um 1mL de substrato, durante 30 min à 50°C. A reação é interrompida por submersão em água fervente por 5 min. A quantificação da glicose liberada foi determinada por um kit enzimático (Doles, Brasil).

Análise de Bradford: as proteínas presentes no extrato foram quantificadas a partir do micro-ensaio metodologia de Bradford (1976), os resultados foram expressos em mg de proteína/mL equivalente a albumina do soro bovino (BSA).

Estabilidade Térmica: para os ensaios de estabilidade térmica o complexo enzimático permaneceu incubado em condições estáticas, em banho termostático à 50°C, pH 4,8 por 24 horas, as alíquotas foram retiradas após 10, 60, 120, 240, 360, 480, 720 e 1440 minutos, e imediatamente resfriadas em banho de gelo para interromper a reação de inativação e analisadas de acordo com os procedimentos de atividades descrito na seção 2.4. Os resultados foram ajustados utilizando um método exponencial não-linear de Sadana e Henley (1987) A partir da Equação (1) foi possível calcular a constante de inativação térmica, na qual  $A_r$  é a atividade relativa (adimensional),  $\alpha$  é a relação entre a atividade específica no estado final e inicial,  $k_d$  é a constante de inativação térmica de primeira ordem ( $\text{min}^{-1}$ ) e  $t$  é o tempo de incubação da solução enzimática (min). O tempo de meia vida foi definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial.

$$A_r = (1 - \alpha) * \exp(-k_d * t) + \alpha \quad (1)$$

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao todo, foram avaliados 9 extratos enzimáticos para se determinar a influência da matéria-prima lignocelulósica e da técnica de cultivo na indução da síntese enzimática por *A. niger*, empregando-se separadamente o bagaço de cana-de-açúcar explodido e lavado (BEx-

lav), explodido e não lavado (BEx), e hidrotérmico (BHt), nas técnicas de fermentação em estado sólido (FES), submersa (FSm) e combinada (FC) (Tabela 1).

A Tabela 1 apresenta os resultados das atividades enzimáticas (UI.mL<sup>-1</sup>) para os extratos enzimáticos obtidos. Utilizando o BEX nos cultivos em FES o fungo não foi capaz de produzir enzimas, mas aFSm e a FC apresentaram atividades maiores em relação aos outros substratos indutores. A FES destacou-se por fornecer condições mais favoráveis para a produção de endoglucanase e xilanases pelo *A. niger* 3T5B8, enquanto que a FSm e a FC resultaram maiores atividades para as β-glicosidases.

Tabela 1 – Atividades enzimáticas (UI/mL) das (hemi)celulases avaliadas.

Tipos de Cultivo	Substrato	Endoglucanase	β-glicosidase	Xilanase
		UI.mL <sup>-1</sup>		
FES	BEx-lav	3,04 ± 0,03	2,2 ± 0,4	23,5 ± 0,8
	BHd	2,43 ± 0,12	1,9 ± 0,6	20,5 ± 1,4
	BEX	-	-	-
FSm	BEx-lav	0,57 ± 0,04	5,0 ± 0,4	4,9 ± 0,3
	BHd	0,63 ± 0,03	6,0 ± 0,6	3,5 ± 1,1
	BEX	0,91 ± 0,02	7,4 ± 0,1	4,4 ± 0,2
FC	BEx-lav	0,53 ± 0,01	5,0 ± 0,1	2,9 ± 0,2
	BHd	0,50 ± 0,01	5,4 ± 0,2	1,0 ± 0,1
	BEX	0,75 ± 0,01	6,8 ± 0,3	5,0 ± 0,4

A Figura 1 ilustra as atividades específicas (UI/mg de proteína) encontradas para endoglucanase, β-glicosidase e xilanase. O extrato enzimático produzido em FES utilizando-se BHt destaca-se como a melhor condição para a produção das (hemi)celulases, apresentando os melhores resultados com atividades de 116,7±14,3, 92,7±26,5 e 975,4±105,8 UI/mg de proteína para endoglucanase, β-glicosidase e xilanase, respectivamente.

Para a linhagem de *A.niger* utilizada, a FES destaca-se como melhor metodologia de cultivo para a produção de endoglucanases e xilanases, enquanto a FSm e FC não apresentam diferenças significativas entre si. A síntese de β-glicosidase apresenta-se pouco susceptível não somente à metodologia utilizada para a produção da enzima como ao substrato indutor utilizado.

Durante os pré-tratamentos térmicos e químicos uma série de compostos são gerados, devido às condições operacionais empregadas, sendo que esses compostos podem atuar como inibidores. Os principais produtos da degradação se agrupam em três categorias: derivados furânicos, ácidos orgânicos fracos e derivados fenólicos (Kim, 2013).

Nesse estudo a lavagem do bagaço de cana-de-açúcar explodido pode ter influenciado diretamente para o processo de síntese enzimática. Para a FES a lavagem é uma operação crucial para o crescimento e desenvolvimento do *A. niger*, pois ao se utilizar o BEx sem o procedimento de lavagem não foi possível detectar o crescimento do fungo filamentosos, assim como nenhuma atividade enzimática. Para a FSm e FC a lavagem não aumenta significativamente a atividade

enzimática. Segundo Kim (2013) a lavagem do material pré-tratado a vapor com água quente (90°C) remove compostos como oligossacarídeos e fenólicos que atuam como inibidores na hidrólise enzimática e na fermentação com leveduras.

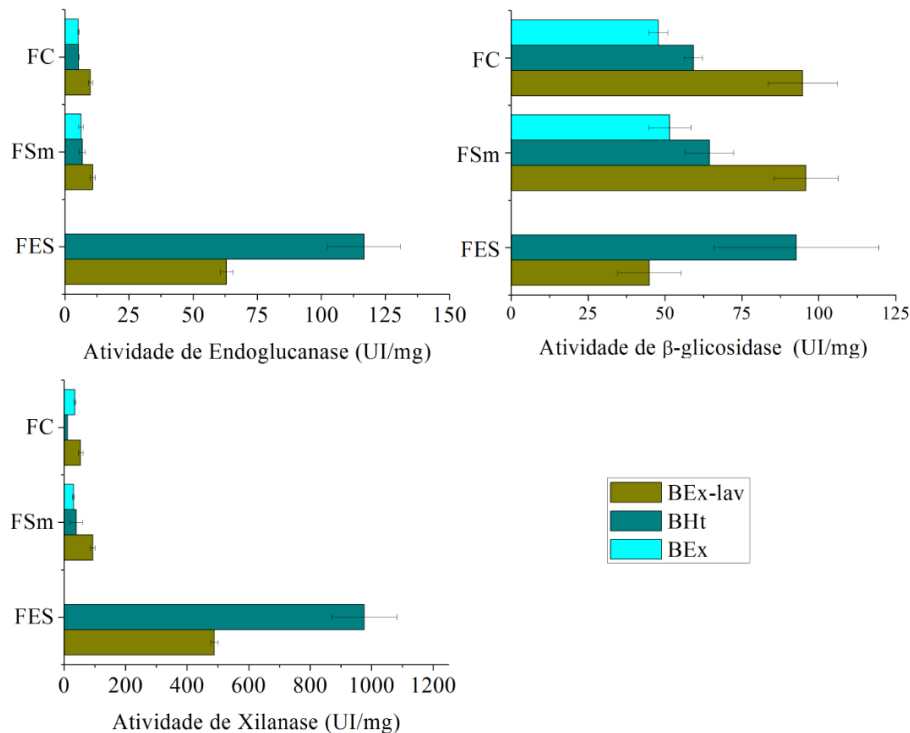


Figura 1 – Atividade enzimática específica (UI/mg) de endoglucanase,  $\beta$ -glicosidase e xilanase.

A Tabela 2 lista os resultados de estabilidade térmica para as três classes enzimáticas estudadas. Algumas condições avaliadas não se ajustaram ao modelo de Sadana e Henley (1987), pois não atingiram valores iguais ou inferiores a 50% de atividade residual retida (A.R.) após 1440 minutos de incubação a 50°C e pH 4,8 e, portanto, não foi possível determinar os tempos de meia vida para estes coquetéis celulolíticos. A condição operacional utilizada assemelha-se a utilizada em processos de hidrólise do material lignocelulósico.

As enzimas produzidas por FES apresentaram resultados melhores em termos de termoestabilidade. Para o parâmetro estabilidade térmica a lavagem da matéria prima também se apresenta como uma etapa vantajosa para todas as técnicas de cultivo estudadas.

A forma de cultivo e o material lignocelulósico indutor influenciaram severamente na estabilidade térmica dos coquetéis enzimáticos produzidos. As xilanases são as enzimas que apresentaram menor estabilidade a 50°C. Para essa classe enzimática as melhores condições foram a combinação BEx-lav na FSm e na FC, apresentando 50% de atividade depois de 1440 minutos de incubação. Castro *et al.* (1997) avaliaram a termoestabilidade das xilanases produzidas por um linhagem de *Aspergillus* termotolerante em FSm na ausência de substrato e os resultados mostraram que as enzimas mantinham 50% e 30% da sua atividade depois

de 30 minutos incubadas. Assim a combinação BEx-lav na FSm destaca-se, em termos de termoestabilidade, para processos no qual o interesse são as xilanases.

Tabela 2 – Resultados dos ensaios de termoestabilidade para as (hemi)celulases, atividade retida (A.R.) após 1440 minutos de incubação a 50°C, pH 4,5 e tempo de meia vida.

Tipo de cultivo	Substrato Indutor	Endoglucanase		β-glicosidase		Xilanase	
		A.R. (%)	t <sub>1/2</sub> (min)	A.R. (%)	t <sub>1/2</sub> (min)	A.R. (%)	t <sub>1/2</sub> (min)
FES	BEx-lav	80	-	100	-	11	59
	BHt	90	-	100	-	26	76
	BEX	-	-	-	-	-	-
FSm	BEx-lav	90	-	75	-	50	-
	BHt	75	-	8	533	34	908
	BEX	0	156	2	249	0	57
FC	BEx-lav	95	-	90	-	50	-
	BHt	24	92	0,5	144	0	450
	BEX	19	113	3	321	0	56

**NOTA.** Não foi possível estimar o tempo de meia vida para os coquetéis enzimáticos que apresentaram A.R. ≥ 50%.

De modo geral, observou-se que a escolha do substrato lignocelulósico indutor, o tipo de pré-tratamento utilizado e a forma de cultivo podem influenciartanto na atividade comona termoestabilidade enzimáticas das enzimas endoglucanase, β-glicosidase e xilanase. Para a utilização desses extratos nos processos de sacarificação e fermentação alcóolica, as condições operacionais devem ser atentamente analisadas para uma melhor adequação quantitativa e qualitativa dos extratos enzimáticos.

## 4. CONCLUSÃO

A medida de atividade enzimática e a estabilidade térmica dos extratos enzimáticos produzidos pela linhagem *A. niger* foi diretamente influenciada tanto pelo material lignocelulósico quanto pela técnica de cultivo. A melhor condição estudada foi através da FES com BHt, para as três enzimas avaliadas (endoglucanase, β-glicosidase e xilanase). Os extratos enzimáticos apresentaram termoestabilidades distintas, sendo que os melhores valores de estabilidade foram para os extratos produzidos por FES usando BHt e FES com BEx-lav para endoglucanase e β-glicosidase. Para as xilanases o processo de FSm usando BEx-lav e FC com BEx-lav apresentaram os extratos enzimáticos com melhores valores para termoestabilidade.

## 5. REFERÊNCIAS

BAILEY, M.J.; POUTANEN, K.; Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, n.30, p.5-10, 1989.

- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-254, 1976
- CASTRO, L. P. M.; TREJO-AGUILAR, B. A.; OSORIO, G. A. Thermostable xylanases produced at 37°C and 45°C by a thermotolerant *Aspergillus* strain. *Fems Microbiol. Lett.* 146, 97-102, 1997
- COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. *Revista De Microbiologia*, v. 26, n. 4, p. 314-317, Oct-Dec 1995.
- CUNHA, F.M.; BACCHIN, A.L.G.; HORTA, A.C.L.; ZANGIROLAMI, T.C.; BADINO, A.C.; FARINAS, C.S. Indirect method for quantification of cellular biomass in a solids containing medium used as pre-culture for cellulase production. *Biotechnol Bioproc Eng.* N. 17, p. 100-108, 2012.
- DELABONA, P.; PIROTA, R.D.P.; CODIMA, C.A.; TREMACOLDI, C.R.; RODRIGUES, A.; DODD, D.; CANN, I. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *Glob. Change Biol. Bioenergy*, 1, 2-17. 2009.
- FARINAS, C. S.; LOYO, M. M.; BERALDO Jr. A.; TARDIOLI, P. W.; NETO, V. B.; COURI, S. Finding stable cellulase and xylanase evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. *New Biotechnol*, v. 27, n. 6, p. 810-815, Dec 2010.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl Chem*, Oxford, v.59, n.2, p. 257-268, 1987.
- KIM, Y.; KREKE, T.; HENDRICKSON, R.; PARENTI, J.; LADISCH, M. R. Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood. *Biores Technol*, v. 135, p. 30-38, 2013.
- KIM, Y.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. Enzymatic digestion of liquid hot water pretreated hybrid poplar. *Biotechnol Prog.* Vol. 25, N. 2, p. 340-348, 2009
- MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulase technology. *Fermentation Technol.* n.54, p.256-286, 1976.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Biochem.*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- PEREIRA JR, N., COUTO, M. A. P. G., SANTA ANNA L. M. M. Biomass of Lignocelulosic Composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. *Series on biotechnology*. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, v.2, 2008.
- SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. *Biotechnol Bioeng*, v. 30, p. 717-723, 1987.
- SOCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MEDEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.S.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A.; BON, E.P.S.; MORAES, L.M.P.; ARAÚJO, J.A.; TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Bioresour Technol*, n.101, p.4820-4825, 2010.
- SOHAIL, M.; SIDDIQI, R.; AHMAD, A.; KHAN, S. A. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. *New Biotechnol*, v. 25, n. 6, p. 437-441, 2009.
- ZHANG, Y.-H.P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol. adv.* v.24, p.452-481, 2006.