

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Comparação da produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por linhagens mutantes e parental do *Aspergillus niger* 3T5B8

Leda Maria Fortes Gottschalk<sup>1</sup>, Selma da Costa Terzi<sup>1</sup>, Erika Fraga de Souza<sup>1</sup>,  
Edna Maria Moraes Oliveira<sup>1</sup>, Léia Cecília de Lima Fávaro<sup>2</sup>, Edmar das Mercês Penha<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas 29501, 23020-470, Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: [leda.fortes@embrapa.br](mailto:leda.fortes@embrapa.br)

<sup>2</sup>Embrapa Agroenergia, Brasília, Distrito Federal

#### RESUMO

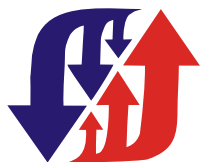
*Diversos trabalhos têm procurado aumentar a eficiência da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica. Nesse contexto, o melhoramento de cepas produtoras de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas pode resultar em misturas enzimáticas mais eficientes. A linhagem parental de *Aspergillus niger* 3T5B8, referenciada como produtora de poligalacturonase, foi utilizada para o melhoramento genético visando aumentar a produção de celulasas e hemicelulasas. A produção das enzimas CMCase, xilanase, beta-glicosidase e poligalacturonase por fermentação submersa usando duas linhagens mutantes P49 e P83 foi avaliada e comparada com a linhagem parental. Os resultados mostraram um destaque para a cepa P83 com um aumento na produção de 56% de CMCase, 76% de beta-glicosidase, 23% de xilanase e 216% na poligalacturonase.*

Palavras-chave: celulasas, xilanasas, beta-glicosidase, *Aspergillus niger*

#### INTRODUÇÃO

A biomassa vegetal é a fonte mais abundante de energia renovável em todo o mundo. Devido à complexidade de sua estrutura, apresenta diferenças em relação ao grau de digestibilidade que resultam principalmente das variações de composição da celulose, hemicelulose e da lignina e das proporções e interações entre os componentes da biomassa. Os fungos desempenham um papel vital na hidrólise da biomassa através da síntese de enzimas hidrolíticas, como as celulasas e hemicelulasas. Estas enzimas hidrolíticas são cruciais para a bioconversão da fração de celulose e hemicelulose em açúcares simples para posterior fermentação a moléculas de biocombustíveis. No entanto, a eficiência e o custo do processo de hidrólise enzimática são os grandes obstáculos na produção de biocombustíveis (Peplow, 2014).

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 fácil crescimento e produção de enzimas extracelulares. O fungo *A. niger* tem recebido atenção especial devido à sua grande capacidade de fermentação e altos níveis de produção de enzimas, principalmente enzimas utilizadas na hidrólise de polissacarídeos da parede celular das plantas e na indústria de alimentos (De Vries & Visser, 2001).



## **XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016**

A linhagem de *A. niger* foi previamente selecionada em um programa de melhoramento visando aumento da produção de poligalacturonase (Couri & Farias, 1995). Em continuação ao programa de melhoramento desta linhagem por mutagênese, visando aumentar a produção de celulases e hemicelulases, duas linhagens se destacaram, a P49 e P83 (Fávaro & Polleto, 2013). O objetivo deste trabalho foi comparar a produção das enzimas CMCase, xilanase, beta-glicosidase e poligalacturonase pelas linhagens mutantes e seu parental por fermentação submersa usando farelo de trigo como fonte de carbono.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

#### **Produção das enzimas**

A cepa parental (?) *A. niger* 3T5B8 da coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos e as cepas mutantes P49 e P83 foram utilizadas para produção das enzimas CMCase, xilanase, beta-glicosidase e poligalacturonase por fermentação submersa. Os mutantes selecionados foram obtidos a partir de dois ciclos de mutagênese (primeiro com ultravioleta e o segundo com etilmetanossulfonato). Os experimentos foram conduzidos em frascos agitados a 200 rpm e 32°C. O farelo de trigo foi utilizado como fonte de carbono e o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio com uma relação C/N de 14.

#### **Determinação das atividades enzimáticas**

A determinação da atividade da beta-glicosidase foi realizada utilizando como substrato celobiose 2% diluída em 15 mM em tampão citrato de sódio/ ácido cítrico 0,1M, pH 5,0. A reação ocorreu à 50°C por 30 minutos. Após o período de incubação, a quantidade de glicose liberada foi quantificada utilizando um kit comercial (GOD-POD da marca Doles®).

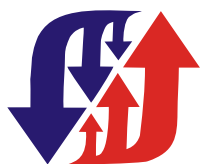
A determinação das atividades xilanase, CMCase e poligalacturonase no extrato bruto foi realizada utilizando como substratos: solução de xilana 1% (tampão acetato 0,1 M, pH 5), de carboximetilcelulose CMC 4% (tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8) e de ácido poligalacturônico 0,25% (tampão acetato 0,2 M, pH 4,5). As reações foram conduzidas a 50°C por 10 minutos para a xilanase e 30 minutos para a CMCase e interrompida pela adição de DNS. Já para a poligalacturonase a reação foi conduzida por 30 minutos a 35°C e também interrompida pela adição do DNS. Os açúcares redutores resultantes foram determinados pelo método do DNS (Muller, 1959). A atividade foi calculada em UI/mL pela determinação da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação dos respectivos substratos.

#### **Determinação da proteína extracelular total**

A concentração da proteína foi determinada segundo Lowry *et al.* (1951).

### **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

As linhagens foram cultivadas em meio submerso com farelo de trigo como principal fonte de carbono. O farelo de trigo foi escolhido por ser conhecido como uma excelente fonte



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

para crescimento e produção de enzimas além de ter uma composição rica em fibras (Nandini & Salimath, 2001).

Os valores de proteína extracelular (g/L) encontrados foram bem próximos para as três cepas avaliadas:  $0,917 \pm 0,02$ ;  $0,913 \pm 0,03$  e  $0,842 \pm 0,03$  para a cepa parental 3T5B8 e para as mutantes P49 e P83, respectivamente. Os resultados obtidos para a produção das enzimas CMCase, Xilanase,  $\beta$ -glicosidase e poligalacturonase são apresentados na Figura 1.

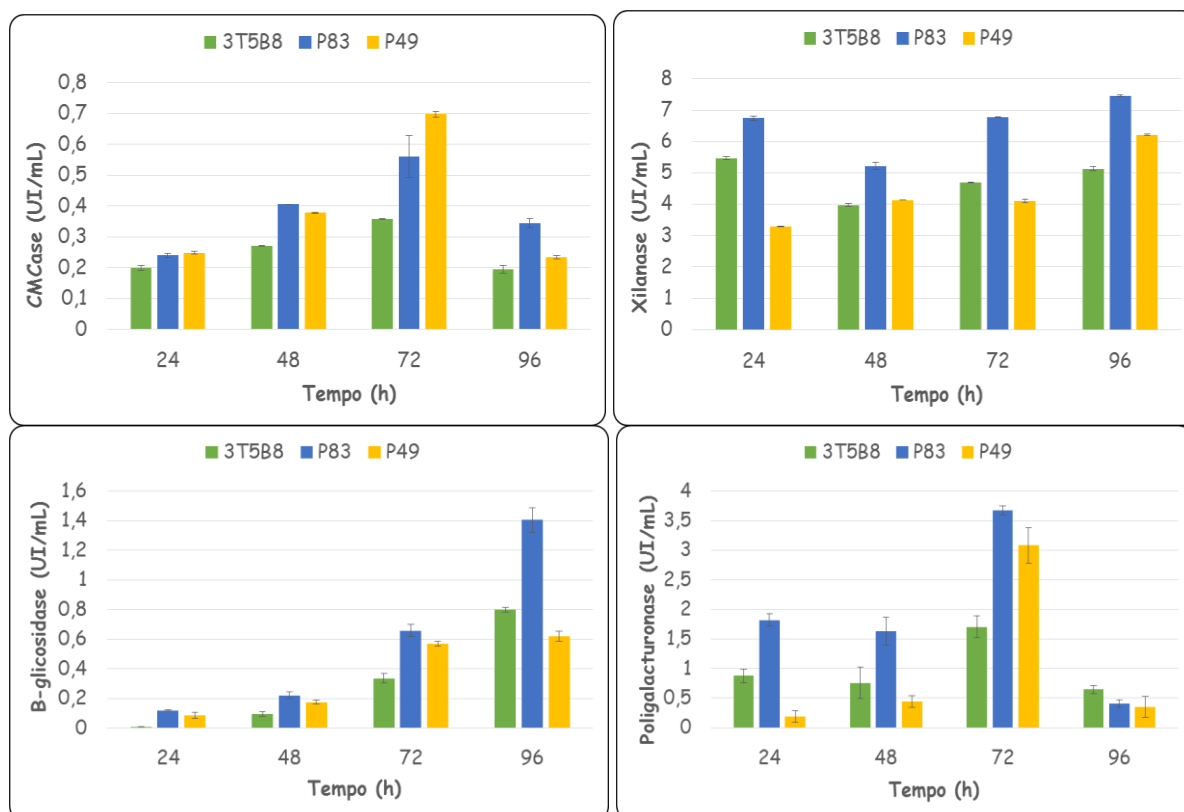
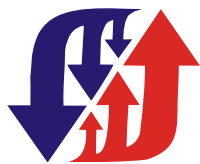


Figura 1: Perfil de produção das enzimas CMCase, Xilanase, B-glicosidase e poligalacturonase para as cepas de *Aspergillus niger* parental 3T5B8 e mutantes P83 e P49.

Os valores encontrados para a CMCase são baixos, pois o fungo *Aspergillus* não é um bom produtor dessa enzima (Wen et al., 2005, Gottschalk et al, 2010). O máximo de produção para a CMCase foi de 0,7 UI/mL para a cepa P49, seguido de 0,56 UI/mL para a cepa P83. A produção máxima ocorreu em 72 horas para todas as cepas avaliadas. A concentração da CMCase utilizando as cepas mutantes foi 56% maior para a cepa P83 e 95% maior para a cepa P49 quando comparada com a cepa parental (0,36 UI/mL).

O fungo *Aspergillus spp.* é conhecido como um excelente produtor de  $\beta$ -glicosidase, xilanase e poligalacturonase e suas enzimas podem suplementar o extrato enzimático celulolítico do *Trichoderma spp.* para ser empregado na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica (Gottschalk et al, 2013).

Em relação à produção de xilanase, a cepa mutante P83 proporcionou a maior produção com níveis de atividade de 7,5 UI/mL, 45% superior em relação à cepa 3T5B8. Esta



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

cepa também apresentou os melhores resultados de produção em relação à  $\beta$ -glicosidase com níveis máximos de 1,4 UI/mL, 76% superior comparado ao resultado obtido com a parental (0,9UI/mL).

Como a linhagem parental *A. niger* 3T5B8 foi selecionada visando o aumento da produção de poligalacturonase (Couri & Farias, 1995), os resultados mostraram que os níveis máximos de poligalacturonase obtidos também com a cepa mutante P83 (3,7 UI/mL) foi mais que o dobro do obtido pela cepa parental (1,7 UI/mL).

### CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho indicam que foi possível obter mutantes com maior capacidade de produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Esse novo complexo enzimático poderá ser mais eficiente na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica. A Embrapa Agroenergia pretende obter novos mutantes utilizando engenharia genética.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Couri S, Farias AX. 1995. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. *J. Microbiol* 26(4): 314-317.
- De Vries RP, Visser J. 2001. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 497-522.
- Fávaro LCL, Poletto CM. Bioprospecção e melhoramento genético de fungos para produção de enzimas aplicadas em biocombustíveis. In MACHADO CMM (Ed.). *Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos*. Brasília, DF, Embrapa Agroenergia, p 35-79.
- Gottschalk LMF, Oliveira RA, Bon EPS. 2010. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochem. Eng. J.* 51: 72-78.
- Gottschalk LMF, Paredes RS, Teixeira RSS, Silva AS, Bon EPS. 2013. Efficient production of lignocellulolytic enzymes xylanase,  $\beta$ -xylosidase, ferulic acid esterase and  $\beta$ -glucosidase by the mutant strain *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1. *Brazilian J. Microbiol* 44: 569 – 576.
- Lowry OH, Rosebrouh NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193: 265.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 31, p. 426-428.
- Nandini CD, Salimath PV. 2001. Carbohydrate composition of wheat bran, sorghum and bajra with good chapatti/roti (Indian flat bread) making quality. *Food Chem* 73: 197-203.
- Peplow M. 2014. Cellulosic ethanol fights for life. *Nature* 507:152
- Wen Z, Liao W, Chen S. 2005. Production of cellulase/ $\beta$ -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Process Biochem* 40: 3087-3094.