



SELEÇÃO DE LINHAGENS FÚNGICAS E EFEITO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE XILANASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

G. S. FAHEINA JR.^{1,2}, M. V. da F. S. AMORIM³, C. M. MARTINS⁴, M. A. de JESUS⁵,
G. A. S. PINTO¹

¹Embrapa Agroindústria Tropical
e-mail: gustavo@cnpat.embrapa.br

²Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química
e-mail: genilton@gmail.com

³Rede Nordeste de Biotecnologia
e-mail: marizavfsa@gmail.com

⁴Universidade Federal do Ceará, Departamento de Biologia
e-mail: claudiamartins@ufc.br

⁵Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
e-mail: ranna@inpa.gov.br

RESUMO – Objetivou-se analisar o potencial xilanolítico de fungos em fermentação submersa e a influência do tempo de fermentação. Analisou-se 33 cepas: *Aspergillus niger* (6), *Trichoderma sp.* (21), *Colletotrichum sp.* (2), *Fusarium sp.* (2) e *Lasiodiplodia theobromae* (2). A fermentação foi realizada sob agitação a 30°C, nos tempos 24, 48, 72, 96, 120 horas. A atividade enzimática foi realizada pelo método do DNS. Em uma primeira etapa determinou-se o tempo, utilizando uma cepa de cada gênero. Após 72 horas houve os maiores valores de atividade para *A. niger* (7.5 U/mL), analisado com NRRL 4222, e *Trichoderma sp.* INPA777 (0.13 U/mL). *A. niger* apresentaram-se mais promissores, obtendo os maiores valores de atividade xilanolítica, com destaque para NRRL2001 (12.6 U/mL). Os valores de atividade de *Trichoderma sp.*, variaram de 0,05 U/mL (INPA1065) a 2.82 U/mL (INPA1218). *Colletotrichum sp.* e *Lasiodiplodia theobromae* obtiveram, respectivamente, atividades com valores iguais a 0.76 U/mL e 0.26 U/mL.

PALAVRAS-CHAVE: fungos, potencial xilanolítico

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, 1995; Jacques et al, 2000). É formada por

heteropolissacarídeos de cadeias β -1,4 ligadas a unidades de d-xilanopirose em substituição a resíduos de acetil, arabinose, glucopiranoose (Izydorczyk e Biliaderis, 1995).

A hidrólise completa da xilana requer a ação de várias enzimas, como endo- β -1,4-d-xilanases que são cruciais na depolimerização da xilana. Essas enzimas atuam na desestruturação da hemicelulose, permitindo um maior acesso das celulasas à molécula de



celulose, aumentando o rendimento do processo (Ahamed e Vermette, 2008).

As xilanases (1,4- β -D-xilanhidrolase EC 3.2.1.8) vem despertando cada vez mais o interesse pela comunidade científica devido ao seu potencial de aplicação na hidrólise e na bioconversão de açúcares, possuindo um potencial de aplicação em indústrias envolvendo a clarificação de sucos, extração de óleos vegetais, na digestão de rações animais, indústria alimentícia, e como agente de branqueamento na indústria de papel (Chandra et al, 2009; Virupakshi et al, 2005).

Uma variedade de microrganismos incluindo fungos filamentosos (Gawande e Kamat, 1999), bactérias (Virupakshi et al, 2005) e leveduras (Shah e Madamwar, 2005) são potenciais produtores de enzimas xilanolíticas. No entanto, fungos filamentosos possuem maior capacidade de produzir tal enzima frente a bactérias e leveduras, devido à alta capacidade e à versatilidade bioquímica (Singh et al, 2003; Lima et al, 2005).

É de grande interesse estratégico a identificação de microrganismos potenciais produtores de enzimas, pois garante o suprimento destas aos variados processos industriais, desenvolvendo sistemas enzimáticos ímpares (Alves et al., 2002). Assim como se torna crucial a otimização dos parâmetros que envolvem uma fermentação, como o tempo de incubação do substrato inoculado, para que haja uma eficiente produção enzimática.

Face ao exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de produção de enzimas xilanolíticas, por fermentação submersa, de fungos prospectados de coleções de cultura, avaliando também o melhor tempo de fermentação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Foram analisadas 33 cepas de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia* e *Trichoderma*. As linhagens foram prospectadas das coleções de culturas fúngicas National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Instituto Osvaldo Cruz (IOF), assim como fungos cedidos pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT).

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

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, cada um contendo 50 mL meio mineral de Mandels (Mandels e Sternberg, 2000) de acordo com a composição: NaNO_3 3.0 g.L⁻¹, KH_2PO_4 3.0 g.L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g.L⁻¹, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g.L⁻¹, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.5×10^{-3} g.L⁻¹, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.5×10^{-3} g.L⁻¹, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0×10^{-3} g.L⁻¹, xilana oat-spel (SIGMA) 1.0 g.L⁻¹. Foi utilizado um inóculo inicial de 1.0 mL, correspondente a 10^7 células/mL. A fermentação foi realizada em *shaker* orbital a 150 RPM, a 35 °C.

Com a finalidade de se determinar o tempo de fermentação adequado, avaliou-se o perfil de produção enzimática nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Para tal, foram escolhidos três fungos de espécies distintas: *Aspergillus niger* NRRL4222, *Lasiodiplodia theobromae* CNPAT038 e *Trichoderma sp.* INPA777.

2.3 Atividade de xilanase

A atividade de xilanase foi determinada de acordo com Gomes et al (1992) na qual uma mistura de reação contendo 0.1 mL da solução enzimática bruta e 0.9 mL de xilana *Birchwood* (SIGMA) a 0,5% em tampão acetato 0,1 M em pH 5,0, foi incubada por 10 minutos a 55 °C. O



açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método do DNS (Miller, 1959), adicionando-se 1.0 mL do reagente DNS à mistura de reação. Tal mistura foi incubada em banho-maria a 100°C por 5 minutos e em seguida adicionada 10 mL água destilada. Após homogeneização, determinou-se a leitura em espectrofotômetro a λ 540nm. Uma unidade de atividade xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de xilose por minuto, nas condições de reação, utilizando curva padrão de xilose.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Potencial de fungos xilanolíticos

Todos os fungos analisados apresentaram atividade de xilanase, cujos valores variaram de 0.05 U/mL a 12.6 U/mL. As variações de acordo com as espécies e quanto as diferentes linhagens dentro de uma mesma espécie estão mostrados na Figura 1, com os valores das quinze primeiras cepas.

Dentre as 33 cepas fungicas analisadas, os resultados apontaram que as cepas de *A. niger* apresentaram os maiores valores de atividade xilanolítica, com destaque para o fungo *A. niger* IOC 2001, com atividade 12.6 U/mL. Apenas *A. niger* NCCLS 2270 apresentou atividade xilanolítica abaixo de 2.0 U/mL, com valor 1.9 U/mL.

Fungos do gênero *Aspergillus* são geralmente usados como cepas padrão para produção de enzimas industriais uma vez que podem sintetizar eficientemente celuloses e hemiceluloses. Assim como segregá-las para o meio extracelular, onde podem ser purificadas com eficiência (Squina et al., 2009).

A. niger e *Trichoderma* sp. são os mais utilizados para produzir xilanases em processos industriais. Dentre as razões para tal, incluem-se: não são patogênicos, são capazes de produzir níveis elevados de enzimas extracelulares e são facilmente cultiváveis (Kar et al, 2006).

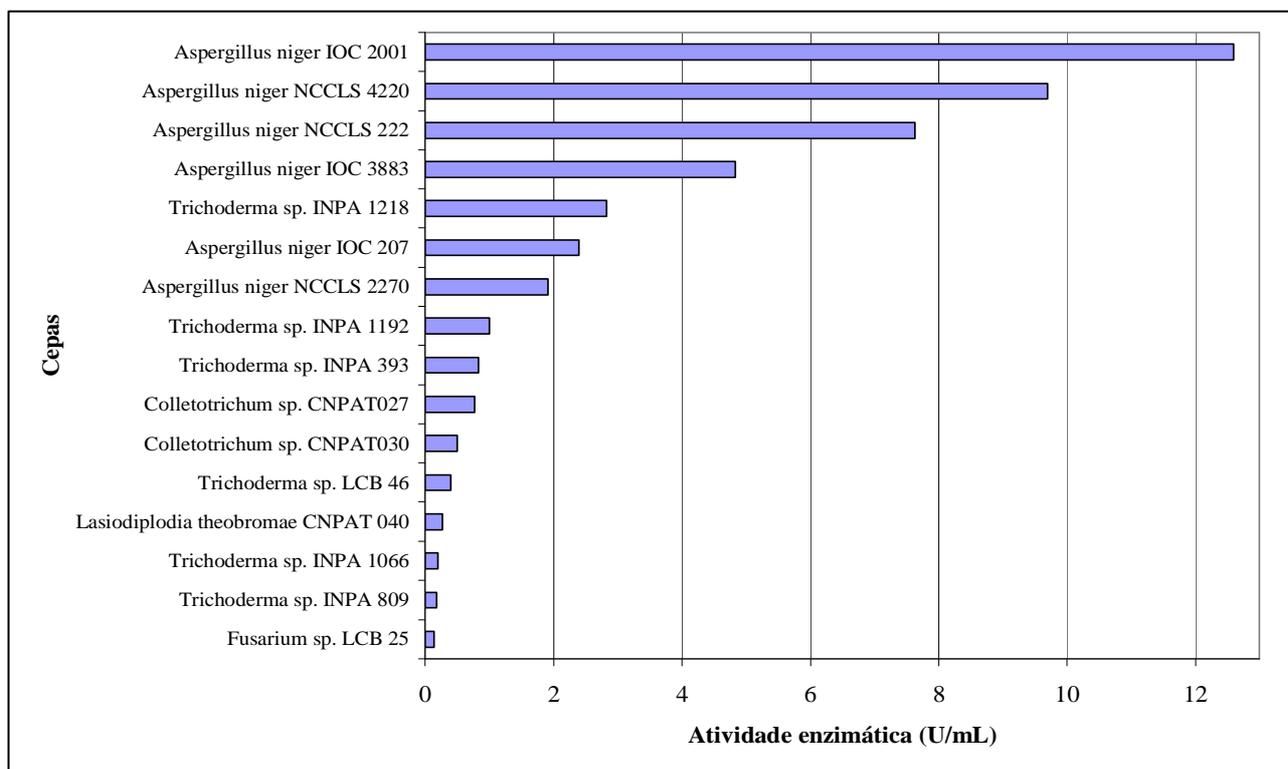


Figura 1 – Perfil de atividade xilanolítica após 72 horas de fermentação



Conforme apresentado na Tabela 1, *Trichoderma sp.* INPA 1218 apresentou a maior atividade de xilanase do gênero (2.8 U/mL) acima do valor de duas linhagens de *Aspergillus*. O menor valor apresentado foi 0.005 U/mL por *Trichoderma sp.* INPA 1065.

Tabela 1 – Atividade de xilanase de cepas de *Trichoderma sp.*

Cepas	Atividade (U/mL)
<i>Trichoderma sp.</i> INPA 1218	2.86
<i>Trichoderma sp.</i> INPA 393	0.83
<i>Trichoderma sp.</i> LCB 46	0.4
<i>Trichoderma sp.</i> INPA 1066	0.25
<i>Trichoderma sp.</i> INPA 809	0.21
<i>Trichoderma sp.</i> INPA 777	0.13
<i>Trichoderma sp.</i> INPA 1166	0.12
<i>Trichoderma sp.</i> INPA 947	0.1
<i>Trichoderma sp.</i> INPA 1192	0.1
<i>Trichoderma sp.</i> INPA IV	0.05
<i>Trichoderma sp.</i> INPA 350	0.04
<i>Trichoderma sp.</i> INPA 1135	0.03
<i>Trichoderma sp.</i> INPA 754N	0.03
<i>Trichoderma sp.</i> INPA 768	0.03
<i>Trichoderma sp.</i> INPA 873	0.03
<i>Trichoderma sp.</i> INPA II	0.02
<i>Trichoderma sp.</i> INPA 976	0.02
<i>Trichoderma sp.</i> INPA 1069	0.02
<i>Trichoderma sp.</i> INPA III	0.02
<i>Trichoderma sp.</i> INPA 748	0.01
<i>Trichoderma sp.</i> INPA 1065	0.005

Pesquisas indicam que a produção de xilanases é regulada pelas características fisiológicas, nutricionais e bioquímicas de cada microrganismo assim como difere entre diferentes linhagens de microrganismos (Uma, 2000). Kulkarni et al. (1999) enfatizam que, apesar da produção comercial das xilanases se concentrar principalmente nos fungos *Aspergillus sp.* e *Trichoderma sp.*,

novas cepas devem ser identificadas devido à demanda por cepas produtoras de xilanases com maior rendimento, alta estabilidade em condições extremas de temperatura e pH.

Para produção de enzimas em larga escala, faz-se necessário introduzir variedades de microrganismo mais potentes secretando altos níveis de xilanases. Diante disso, além do potencial enzimático das cepas de *Aspergillus* e *Trichoderma*, foram analisadas linhagens fúngicas dos gêneros *Colletotrichum sp.*, *Fusarium sp.* e *Lasiodiplodia sp.* isoladas de diferentes biomas brasileiros. Tais cepas foram submetidas a uma triagem inicial em estudos anteriores, que permitiu avaliar o potencial xilanolítico através de técnica mais simples em placas (Faheina et al., 2009).

Os dados da Tabela 2 mostram os resultados de atividade xilanolítica dessas linhagens. A maior atividade de xilanase apresentada por cepa não pertencente aos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* foi 0.76 U/mL por *Colletotrichum sp.* CNPAT 027, isolada de cultura de banana.

Tabela 2 – Valores de atividade xilanolítica de *Colletotrichum sp.*, *Fusarium sp.* e *Lasiodiplodia theobromae*

Cepas	Atividade (U/mL)
<i>Colletotrichum sp.</i> CNPAT027	0.76
<i>Colletotrichum sp.</i> CNPAT030	0.49
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> CNPAT 040	0.26
<i>Fusarium sp.</i> LCB 25	0.14
<i>Fusarium sp.</i> LCB 33	0.11
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> CNPAT 038	0.006



Ruegger e Tauk-Tornisielo (2002) avaliaram o potencial de produção de xilanases de fungos isolados de solo e encontraram valores de atividade para *Colletrichum sp.* igual a 3.8 U/mL.

As cepas de *Fusarium sp.*, ambas isoladas de culturas de maracujá, apresentaram atividades 0.14 U/mL (CNPAT 25) e 0.11 U/mL (CNPAT 33). Singh et al (1995), em estudos com cepa mutagênica de *F. oxysporum*, relatam atividade de 16.7 U/mL em fermentação submersa. Já Baha (2002), em estudo com produção de xilanase por *F. proliferatum* mutagênico após 72 horas de fermentação, apresentaram atividade 0.78 U/mL.

3.2 Tempo de fermentação

Dentre os fatores que influenciam no metabolismo da fermentação incluem-se, dentre outros, o pH, temperatura, aeração, agitação, fontes de carbono e nitrogênio, inóculo inicial e o tempo de incubação. Para que um processo biotecnológico seja viável economicamente, este último fator deve ser estudado (Rao et al, 2008).

A Figura 2 mostra o perfil de produção de xilanases pela cepa *A. niger* NRRL 4222. Em 72 horas de fermentação foi apresentado o melhor valor de atividade com 7.6 U/mL.

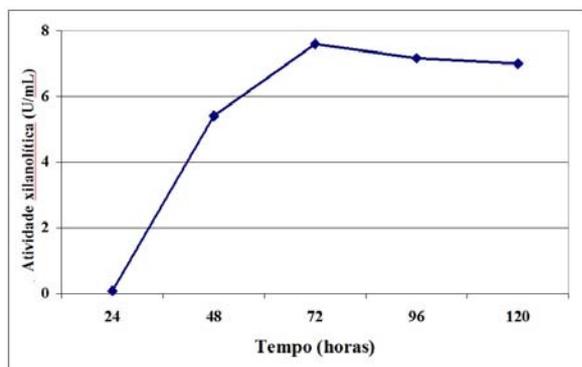


Figura 2 – Perfil do tempo de fermentação em cepas de *A. niger*.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com os dados apresentados por Shar e Madamwar (2005) que, trabalhando com *A. foetidus*, concluíram que a produção máxima de xilanase foi 72 horas sob condições de fermentação submersa. O resultado também está de acordo com Aguiar e Menezes (2000) que, em fermentação submersa com bagaço de cana não tratado utilizando *A. niger*, apresentaram melhor produção em 72 horas.

Já Gawande e Kamat (2000) encontraram melhores valores de atividade xilanolítica para *A. terreus* (28.9 U/mL) e *A. niger* (23 U/mL) em 48 horas de fermentação utilizando farelo de trigo como única fonte de carbono. Para Vlaev et al (1997) a máxima produção de xilanase foi percebida com 96 horas de fermentação.

A Figura 3 mostra o perfil de produção de xilanases em relação ao tempo dos fungos *Trichoderma sp.* INPA 777 e *Lasiodiplodia theobromae* CNPAT 038, que também apresentaram melhor atividade em 72 horas de fermentação, com valores 0.13 U/mL e 0.17 U/mL.

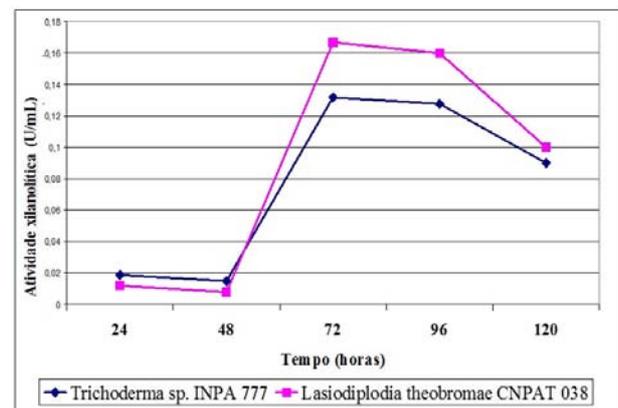


Figura 3 - Perfil do tempo de fermentação em cepas de *Trichoderma sp.* e *Lasiodiplodia theobromae*.

Como as fontes microbianas possuem uma ampla diversidade genética, cada organismo ou linhagem tem suas condições especiais de produção máxima. Logo, se faz



necessário a otimização de todos os parâmetros, incluindo o tempo de incubação, que facilita a retenção de custos no aumento de escala do sistema de produção a partir de novas cepas microbianas isoladas (Kar et al, 2006).

A seleção de organismos com características singulares de sobrevivência e habilidade enzimática atende uma necessidade biotecnológica cada vez mais crescente sob o ponto de vista industrial e ambiental.

Tornam-se necessários estudos mais específicos acerca das características da enzima xilanólítica produzida por cada gênero e espécie. Endo-xilanases de *A. niger* e *Cryptococcus adeliae*, por exemplo, produzem enzimas que realizam a hidrólise completa da xilana produzindo xilotriose, xilobiose e xilose. Por outro lado, há microrganismos que realizam uma degradação incompleta, produzindo metabólitos diferentes daqueles produzidos pela completa degradação (Nerinx, 2004; Liu et al., 2006).

Estudos mais acurados serão realizados com estas e outras cepas fungicas, inclusive com linhagens coletadas de diferentes biomas brasileiros, a fim de se obter informações acerca do potencial xilanolítico.

4. CONCLUSÃO

As cepas de *A. niger* apresentaram-se mais promissoras para a produção de xilanases, com destaque para *A. niger* IOC 2001 com atividade 12.6 U/mL.

No tempo de 72 horas de fermentação houveram os maiores valores de atividade xilanólítica para três linhas fungicas de diferentes gêneros.

5. REFERÊNCIAS

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Enhanced enzyme production from mixed cultures of

Trichoderma reesei RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. v. 42, p. 41–46, 2008.

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulasas e xilanases por *Aspergillus niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. *B. CEPPA*, v. 18, n. 1, p. 5770, 2000.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAGAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor spp.* for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Braz. J. Microbiol.*, v. 33, n. 4, p. 225-230, 2002.

BAHA, S. C. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Process Biochemistry*, v.37, p. 1279–1284, 2002.

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SANGWAN, N.; GAURAV, S.; DAROKAR, M. P.; SANGWAN, R. S. Development of a mutant of *Trichoderma citrinoviride* for enhanced production of cellulases. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1659–1662, 2009.

FAHEINA Jr., G. S. F.; BRAGA, R. M.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M.; PINTO, G. A. S. Análise da atividade xilanólítica e celulolítica de fungos prospectados de coleções nacionais de cultura. In: Encontro de Iniciação Científica e Tecnológica do IFCE, 4., 2009, Fortaleza. **Anais...** IX Encontro de Iniciação Científica e Tecnológica do IFCE, Fortaleza: IFET-CE. CD-ROM.

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.



GOMES, I.; GOMES, J., STEINER, W.; ESTAUNAUER, H. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 36, p.701-707, 1992.

IZYDORCZYK, M.S.; BILIADERIS, C.G. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydr Polym.* v. 28, p.33–48, 1995.

JACQUES, G.; FABRIZIO, G.; ERIC DE, B.; BENOIT, G. Purification and properties of three endo-1,4- β -D xylanase produced by *Streptomyces sp.* strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. *Enzyme Microb Technol.* v. 26, p.178–86, 2000.

KAR, S.; MANDAL, A.; MOHAPATRA, P. K.; MONDAL, K. C.; PAITI, B. R. Production of cellulose-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. *Brazilian Journal of Microbiology* v. 37, p. 462-464, 2006.

KUHAD, R. C.; SINGH, 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.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMDELL, W. Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos. Ed. Edgard Blucher, v. 3, São Paulo, 2005. 535p.

LIU, M. Q.; WENG, X. Y.; SUN, J. Y. Expression of recombinant *Aspergillus niger* xylanase A in *Pichia pastoris* and its action on xylan, *Protein Expr. Purif.* v. 48, p. 292–29, 2006.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advance in cellulase technology. *J Ferment Technol.* v. 54, p. 267–86, 2000.

NERINCKX, W.; BROBERG, A.; DUUS, J.O.; NTARIMA, P.; PAROLIS, L. A.; PAROLIS, H.; CLAEYSSSENS, M.; Hydrolysis of *Nothogenia erinacea* xylan by xylanases from families 10 and 11, *Carbohydr. Res.* v. 339, p.1047–1060, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid (DNS) for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry.* v.31, p.426-428, 1959.

RAO, C. S.; SATHISH, T.; LAXMI, M. M.; LAXMI, G. S.; RAO, R. S.; 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.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Produção de xilanase por fungos filamentosos isolados do solo da estação ecológica de Juréia-Itatins, SP, Brasil. *Holos Enviroment*,v. 2, p. 185-194, 2002.

SHAR, A. R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization, *Process Biochem.* v. 40, p. 1763–1771, 2005.

SINGH, S.; PILLAY, B.; PRIOR, B. A. Thermal stability of β -xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 26, p. 502-508, 2003.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; KUMAR, M. Xylanase production by a hyperxylanolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p.551-553, 1995.



SQUINA, F. M.; MORT, A. J.; DECKER, S. R.; PRADE, R. A. Xylan decomposition by *Aspergillus clavatus* endo-xylanase. *Protein Expression and Purification*. v. 68, p. 65–71, 2009.

UMA MAHESWARI, M.; CHANDRA, T. S.; Production and potential applications of a xylanase from a new strain, *World J. Microbiol. Biotechnol.* v.16, p.257–263, 2000.

VIRUPAKSHI, S.; GIREESH BABU, K.; GAIKWAD, S. R.; NAIK, G. R. Production of a xylanolytic enzyme by a thermoalkaliphilic *Bacillus sp.* JB-99 in solid state fermentation, *Process Biochem.* v.40, p.431–435, 2005.

VLAEV, S. D.; DJEJEVA, G.; RAYKOVSKA, V.; SCHÜGERL, L. Cellulase production by *Trichoderma sp* grown on corn fibre substrate. *Process Biochemistry*, v. 32, n. 7, p. 561-565, 1997.