



USO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAL PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANOLÍTICAS

G. O. MARINHO¹, T. M. F. S. OLIVEIRA²; E. A. NOGUEIRA², A. G. MIRANDA¹, e V. M. BENASSI²

¹Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri *campus JK*, Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis.

²Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri *campus JK*, Instituto de Ciência e Tecnologia.

E-mail para contato: gessicaomarinho@gmail.com

RESUMO – As biotecnologias relacionadas com as energias renováveis, tais como os biocombustíveis obtidos de fontes residuais, de baixo custo, e que representem tecnologias limpas, tornaram uma solução para os problemas ambientais. Diante disso, objetivou-se analisar a produção de xilanases pelo fungo EA 1.3.1 utilizando resíduos agroindustriais. O fungo em estudo foi inoculado em meio de cultura submerso Khanna, enriquecido com solução de sais CP, extrato de levedura como fonte de nitrogênio, e resíduos agroindustriais como fonte de carbono, sendo mantido à 30°C, em estado estacionário, durante quatro dias. A atividade xilanásica foi determinada pela formação dos açúcares redutores pela hidrólise do substrato xilana beechwood 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5, à 55°C, utilizando-se o ácido 3',5'dinitrosalicílico como agente colorimétrico. Observou-se que o fungo EA 1.3.1 produziu xilanases com maiores níveis de atividade quando o micro-organismo foi cultivado em meio contendo farelo de trigo com 25,63 U.mL⁻¹, quando comparada com as outras fontes testadas. Vale citar que, a palha de cana-de-açúcar (17,12 U.mL⁻¹) e semente de abóbora (12,63 U.mL⁻¹) também favoreceram a síntese enzimática e, portanto, podem ser utilizadas como fontes alternativas para a produção de xilanases pelo fungo EA1.3.1. Conclui-se que a produção de xilanases foi favoravelmente induzida por farelo trigo, bem como resíduos industriais, sendo essa uma importante alternativa para agregar valor a esses resíduos.

1. INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos vêm conquistando um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, mostrando características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos convencionais, bem como a preocupação com as questões ambientais, que impulsionam pesquisas em busca de biotecnologias que não degradam e conservem o meio ambiente.

As biotecnologias relacionadas com as energias renováveis, tais como os combustíveis obtidos a partir de fontes amplamente disponíveis, de baixo custo, e que representem tecnologias limpas, tornaram uma necessidade mundial, devido à alta demanda energética, o

risco de redução das reservas fósseis, e, principalmente, a degradação ambiental que os combustíveis tradicionais provocam.

Nesse sentido, além de uma necessidade econômica, houve um interesse crescente no uso de resíduos agroindustriais como substratos para bioprocessos que contribuem para minimizar os problemas ambientais decorrentes do seu descarte na natureza. Como exemplos têm-se o etanol de segunda geração, ou seja, aquele obtido a partir da degradação de materiais lignocelulósicos (DE VRIES *et al.*, 2000).

Vale citar que, os resíduos lignocelulósicos são ricos em compostos potenciais para a produção de etanol, assim como outros produtos de alto valor agregado (LAMED *et al.*, 2012). Tornou-se uma prioridade mundial dentro do contexto de energia renovável o uso desses materiais para a produção de álcool etílico combustível (DELCHEVA *et al.*, 2008). Entretanto, a hidrólise desses materiais a açúcares fermentescíveis exige métodos eficientes, específicos e de baixo custo de modo a viabilizar economicamente o processo.

Uma das alternativas para a hidrólise desses materiais lignocelulósicos são as celulases, hemicelulases e as ligninas, estando dentre as hemicelulases, as xilanases que atuam sobre o substrato xilana para formação de xilose. Esses catalisadores podem ser sintetizados a partir de vários organismos vivo, como bactérias, células animais e vegetais, além de fungos filamentosos e leveduras.

Os extratos enzimáticos obtidos de fungos possuem, geralmente, maior atividade do que aqueles provenientes do cultivo de bactérias. Além disto, esses micro-organismos possuem a capacidade de produzir diferentes complexos de enzimas lignocelulósicas, permitindo hidrolisar não somente as cadeias principais que formam esses resíduos, mas também, as suas ramificações.

Contudo, a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, mesmo apresentando alta eficiência e especificidade, possuem um custo muito alto para a proposta de produção de biocombustíveis, exigindo um sistema de produção que permita um baixo custo do preparado enzimático final. Portanto, cepas de micro-organismos e sistemas de fermentação que atendam a essa necessidade biotecnológica precisa ser estudada. Diante disso, o seguinte estudo objetivou-se analisar o potencial xilanolítico do fungo EA 1.3.1 utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono para cultivo do micro-organismo.

2. METODOLOGIA

A influência da fonte de carbono sobre o crescimento do micro-organismo e a atividade xilanólica foi investigada utilizando resíduos agroindustriais para enriquecer o meio de cultura. Usaram-se as seguintes fontes de carbono: casca de laranja, casca de tangerina, casca de abacate, casca de abóbora, casca de abacaxi, casca de banana, semente de abóbora, palha de cana-de-açúcar e farelo de trigo. O fungo EA 1.3.1 foi inoculado em meio Khanna (KHANNA *et al.*, 1995) enriquecido com solução de sais CP (PEIXOTO *et al.*, 2003) e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, sendo mantidos à 30°C, durante quatro dias, de forma estacionária em estufa bacteriológica.

Após o tempo de incubação, realizou-se a filtração à vácuo para separação da massa micelial do extrato bruto enzimático contendo a xilanase, sendo esse quantificado a atividade

enzimática utilizando xilana beechwood Sigma® como substrato na concentração de 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5. A determinação ocorreu por meio da formação dos açúcares redutores durante a incubação da enzima com o seu substrato, utilizando-se o reagente DNS (ácido 3',5'dinitrosalicílico) (MILLER, 1959), à 55°C. A leitura foi realizada em espectrofotômetro à 540 nm, e o sistema foi padronizado por uma curva de xilose de 0,1 a 1,0 mg/mL. A unidade da atividade enzimática foi determinada em U/mL, sendo $U = \mu\text{mols}$ de açúcares redutores formados por minuto por mL.

3. RESULTADOS

As enzimas hidrolíticas se destacam nos processos industriais e são aplicadas na hidrólise de diversas substâncias naturais para a obtenção de produtos biotecnológicos. Entre eles, destaca-se a produção de bioetanol, que visa utilizar resíduos agroindustriais, transformando-os em produtos de alto valor comercial. Esse processo de transformação necessita de catalisadores eficientes para a transformação de açúcares complexos em açúcares simples e fermentescíveis.

Desse modo, a busca e a adequação de enzimas lignocelulósicas, entre elas as xilanases, para o uso em indústrias tem sido destaque nas pesquisas científicas. Existe fontes microbianas para a produção eficiente dessa enzima, contudo, apenas algumas estirpes de fungos atendem aos critérios de produção comercial (CAZETTA *et al.*, 2007).

De acordo com Underklofer *et al.* (1958), as quantidades absolutas e relativas de cada enzima produzida podem variar consideravelmente entre espécies e mesmo entre linhagens da mesma espécie. As características físico-químicas das enzimas produzidas também podem diferir, visto que diferentes micro-organismos e linhagens se comportam de maneira variada frente a uma mesma condição de incubação, podendo produzir enzimas com propriedades diversas. Dessa forma, é de extrema importância realizar estudos em buscar de bons produtores, visando um processo produtivo eficiente e menos oneroso.

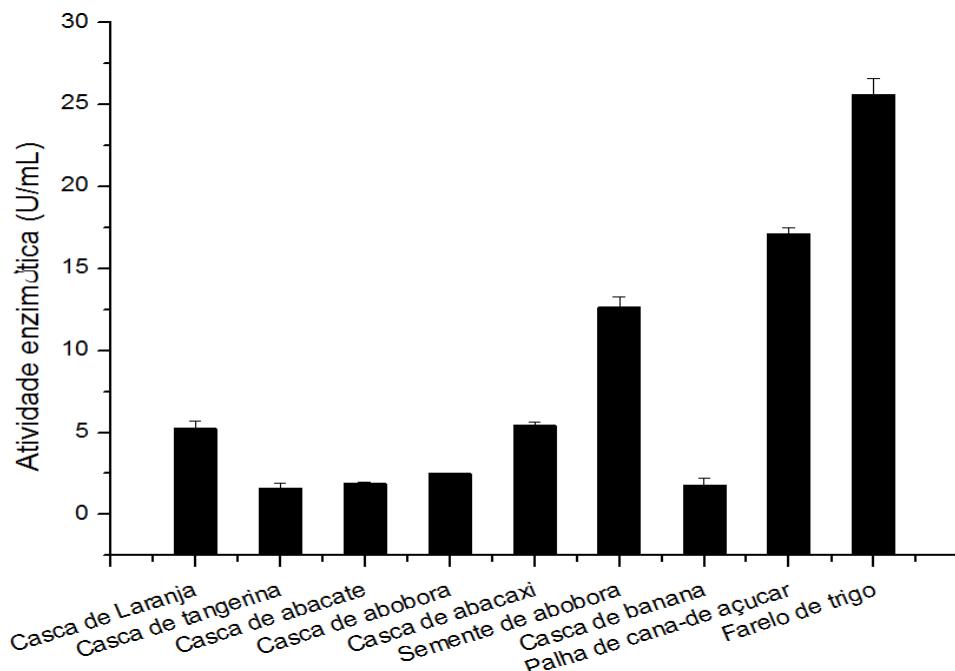
Impulsionando, assim, a busca de novos micro-organismos e técnicas que podem ser utilizados para a produção de xilanases para o desenvolvimento desse setor industrial. Empregando, assim, os resíduos agroindustriais com o intuito de reduzir o custo de produção e obter uma mercadoria menos onerosa. Levando em consideração, também, que estudos afirmam que a produção de enzimas xilanolítica precisam ser induzidas e que açúcares facilmente metabolizados, como glicose, são repressores da produção de hemicelulases, mesmo embora os monossacarídeos promovam o crescimento de fungos (LOANNESA *et al.*, 2000).

Observou-se que o fungo EA 1.3.1 produziu mais xilanases quando induzidas com farelo de trigo (25,63 U.mL⁻¹) quando comparada com as outras fontes testadas. Palha de cana de açúcar (17,12 U.mL⁻¹) e semente de abóbora (12,63 U.mL⁻¹) também favoreceram a síntese enzimática e, portanto, podem ser utilizadas como fonte alternativa para a produção dessas enzimas, além de apresentarem vantagens econômicas e ambientais (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 2: Análise da melhor fonte de carbono para produção de xilanases pelo fungo EA1.3.1.

Fontes de carbono	Atividade (U.mL^{-1})
Casca de laranja	$5,25 \pm 0,44$
Casca de tangerina	$1,63 \pm 0,30$
Casca de abacate	$1,91 \pm 0,07$
Casca de abóbora	$2,50 \pm 0,00$
Casca de abacaxi	$5,45 \pm 0,17$
Semente de abóbora	$12,63 \pm 0,65$
Casca de banana	$1,80 \pm 0,44$
Palha de cana-de-açúcar	$17,13 \pm 0,37$
Farelo de Trigo	$25,63 \pm 0,97$

Figura 1: Análise do potencial de resíduos agroindustriais para produção xilanolítica pelo fungo EA 1.3.1.



Resultados semelhantes foram relatados por e Badhan *et al.* (2007), onde determinaram o farelo de trigo como o melhor indutor da produção de xilanases, provavelmente devido ao seu alto conteúdo de hemiceluloses (SAHA, 2003). Li *et al.* (2007), observaram que o farelo de trigo e a polpa de madeira foram mais eficazes para a produção de xilanases por *Penicillium* sp. ZH-30 e *Trichoderma longibrachiatum*, respectivamente, quando comparado com xilana pura.

Para Terrasan *et al.* (2010) resíduos de cervejaria e farelo de trigo são bons indutores de xilanases. Contudo, observaram que a xilana pura foi mais adequado para induzir a produção de xilanases por *Penicillium janczewskii* do que outros resíduos agrícolas. No

entanto, o uso de xilanases comerciais como uma fonte de carbono não foi viável economicamente para a produção em grande escala de xilanases (DWIVEDI *et al.*, 2009).

Vale ressaltar que os resíduos analisados são compostos complexos e, quando utilizados como fonte de carbono, podem induzir diferentes tipos de proteínas, entre elas celulases, o que facilitaria a aplicação deste extrato na degradação de matéria lignocelulósico para a geração de combustíveis biológicos, como o etanol (BEG *et al.*, 2001).

4. CONCLUSÕES

De acordo com os estudos realizados, pode-se concluir que a produção de xilanases pelo fungo EA 1.3.1 apresentou potencial utilizando farelo de trigo como fonte indutora. Além de possibilitar um importante alternativa para a reciclagem de resíduos agroindustriais, o desenvolvimento destas tecnologias de produção poderá não somente reduzir os custos de produção destas enzimas, como também amenizar os problemas ambientais decorrentes do acúmulo destes resíduos natureza.

5. REFERÊNCIAS

- BADHAN, A., CHADHA, B., KAUR, J., SAINI, H., BHAT, M. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Bioresour. Technol.* 98 (3), 504–510, 2007.
- BEG, Q., KAPOOR, M., MAHAJAN, L., HOONDAL, G., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56 (3), 326–338.
- CAZETTA, M.L. et al. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresour. Technol.* 98, 2824–2828, 2007.
- DE VRIES, R.P.; KESTER, H.C.; POULSEN, C.H.; BENEN, J.A. & VISSER, J. Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, 327(4):401-410, 2000.
- DELCHEVA, G.; DOBREV, G. & PISHTIYSKI, I.G. Performance of *Aspergillus niger* B03 β -xylosidase immobilized on polyamide membrane support. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 54:109-115, 2008.
- Dwivedi, P., Vivekanand, V., Ganguly, R., Singh, R.P., 2009. *Parthenium* sp. as a plant biomass for the production of alkalitolerant xylanase from mutant *Penicillium oxalicum* SAUE-3.510 in submerged fermentation. *Biomass Bioenergy* 33 (4), 581–588.
- KHANNA, P.; SUNDARI, S.S; KUMAR, N.J. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.11, p 242-243, 1995.
- LAMED, R.; SHOHAM, Y.; & BAYER, E.A. Functional association of catalytic and ancillary modules dictates enzymatic activity in glycoside hydrolase family 43 β -xylosidase. *J. Biol. Chem.*, 287(12):9213–9221, 2012.
- LI, Y., LIU, Z., CUI, F., XU, Y., ZHAO, H. Production of xylanase from a newly isolated *Penicillium* sp. ZH-30. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23 (6), 837–843, 2007



- LOANNESA, P.D., PEIRANO A., STEINERB, J., EYZAGUIRRE, J. An α-Larabinofuranosidase from *Penicillium purpurogenum*: production, purification and properties. *J. Biotechnol.* 76 (2–3), 2000.
- MILLER, G. L.. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- PEIXOTO, S. C., et al. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. *Int. Microbiol.*, v. 6, p. 269-273, 2003.
- PRÜCKLER, M.; SIEBENHANDL-EHN, S.; APPRICH, S.; HÖLTINGER, S.; HAAS, C.; SCHMID, E.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. *LWT - Food Science and Technology*, v. 56, n. 2, p. 211-221, 2014.
- SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30 (5), 279–291, 2003.
- TERRASAN, C.R., TEMER, B., DUARTE, M.C., CARMONA, E.C. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. *Bioresour. Technol.* 101 (11), 4139–4143, 2010.
- UNDERKLOFER, L. A.; BARTON, R. R.; RENNERT, S. S. Production of microbial enzymes and their applications. *Applied Microbiology*, New York, v. 6, n.3, p. 212-221, 1958.