

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE POR *Aspergillus tubingensis* AN1257 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA COM USO DE TORTA DE CAROÇO DE ALGODÃO COMO FONTE DE CARBONO

R. S. SANTOS^{1,2}, F.K.P. ALVES³, A. P. F. C. VANZELA^{1,2}, L. A. PANTOJA^{2,4}, A. S. SANTOS^{2,3}

¹ Departamento de Farmácia - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

² Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis - UFVJM,

³ Departamento de Ciências Básicas – UFVJM

⁴ Instituto de Ciências e Tecnologia – UFVJM

e-mail para contato: ricardo.santos@ufvjm.edu.br

RESUMO – Endoglucanase é uma enzima com ampla aplicação industrial em setores que exploram sua ação hidrolítica sobre celulosas. Por conta disso é alvo constante de pesquisas por novas fontes e processos. O presente estudo teve por objetivo otimizar a produção de endoglucanase por *Aspergillus tubingensis* utilizando torta de caroço de algodão como fonte de carbono em processo de fermentação submersa. A otimização da produção da enzima supracitada foi realizada com emprego de planejamento fatorial seguido de um delineamento composto central ortogonal. O extrato enzimático obtido em condições otimizadas foi submetido à caracterização bioquímica e avaliado seu potencial na sacarificação de biomassas lignocelulósicas. Na condição ideal, com 1,25% de torta de algodão em meio líquido contendo 0,9g/L de ureia, após 101 horas de fermentação, foi observado valores de 2,92 U/ml para a atividade endoglucanásica. No que diz respeito à caracterização bioquímica da atividade endoglucanásica foi possível observar uma temperatura ótima de 60° C e pH ótimo entre 4,0 e 5,0 condição a qual a atividade xilanolítica observada foi de 3,12 U/mL.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos as tendências sinalizam a crescente necessidade do desenvolvimento tecnológico de hidrólise de biomassas lignocelulósicas. A busca por processos de baixo custo com a utilização de resíduos lignocelulósicos como matérias-primas para a produção de produtos de alto valor agregado, como o bioetanol, tem despertado cada vez mais o interesse e oportunidades para pesquisas e desenvolvimento na área acadêmica e industrial (Maeda *et al.* 2013, Zimbardi *et al.*, 2013). No âmbito de aproveitamento de resíduos através de bioprocessos, a sacarificação enzimática é considerada como método mais promissor para uma hidrólise eficiente de resíduos lignocelulósicos (Shimokawa *et al.*, 2013). No entanto, o elevado custo das enzimas celulolíticas continua sendo um dos grandes gargalos para a produção de etanol celulósico (Fachinni *et al.*, 2011)

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo otimizar as condições de cultivo em fermentação submersa (FSb) para produção de endoglucanase a partir da linhagem fúngica *Aspergillus tubingensis* AN1257, utilizando torta de caroço de algodão como fonte de carbono e caracterizar o extrato enzimático bruto produzido quanto à temperatura e pH ótimos.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção do material de estudo: torta de algodão e linhagem *Aspergillus tubingensis*

A torta de algodão utilizada neste estudo foi doada pela Indústria de Óleo, Rações e Plásticos Montes Claros LTDA – Montes Claros - MG. Esta biomassa foi inicialmente triturada em moinho manual e em seguida submetida a um processo de extração lipídica, por extração com éter etílico, para eliminação de óleo residual, posteriormente, seca a 60 °C, por período de 48 horas. O micro-organismo avaliado neste trabalho, *Aspergillus tubingensis* AN1257, é uma linhagem de ocorrência natural, isolado a partir de estudos de triagem.

2.2. Otimização do processo de fermentação submersa

A condição ótima para a produção de endoglucanase pela linhagem *Aspergillus tubingensis* AN1257 foi avaliada pelo emprego de um planejamento fatorial fracionado e posteriormente aplicado um delineamento composto central do tipo ortogonal. O software *STATISTICA Versão 7.0* foi utilizado para geração e análise destes planejamentos experimentais. A qualidade do ajuste da equação de cada modelo foi expressa pelo coeficiente de determinação (R^2) e sua significância estatística condicionada pelo teste-*F*. A significância de cada parâmetro foi exposta através do diagrama de Pareto e suas correlações. Os resultados do processo de otimização foram expostos em gráficos de superfície resposta.

Os ensaios fermentativos para ambos os planejamentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL, em triplicata, contendo 25 mL meio líquido de fermentação composto de NaCl (0,1 g.L⁻¹), MgSO₄·7H₂O (0,2 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (0,4 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (0,1 g.L⁻¹). O preparo do inóculo utilizado nos planejamentos foi realizado a partir do repique da cultura estoque de *Aspergillus tubingensis* AN1257 em meio sólido Vogel (Vogel, 1964) contido em placas de Petri e incubadas a 30°C por 7 dias. Os conídios foram coletados assepticamente em 10 mL de água destilada estéril, filtrados através de gaze e contados em Câmara de Neubauer para determinação da concentração do inóculo. Os processos fermentativos foram conduzidos a 30°C em estufa incubadora, sob agitação a 150 rpm. A obtenção dos extratos enzimáticos foi realizada por meio de filtração em funil de Büchner à vácuo utilizando papel de filtro com retenção de partículas de 7 a 12µm. O filtrado foi mantido em gelo até a determinação da atividade endoglucanásica. A atividade endoglucanásica foi realizada por quantificação de açúcares redutores (Miller, 1959) liberados após 30 minutos em um meio reacional contendo 1:1 de extrato enzimático e carboximetilcelulose 1%, a 50°C e pH 5 (Ghose, 1987). Uma unidade de endoglucanase foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de açúcares redutores, por minuto, por volume (litros) de extrato enzimático (U/L).

O planejamento fatorial utilizado objetivou determinar a influência do uso de diferentes fontes de nitrogênio, da concentração da torta de algodão utilizada como fonte de carbono, a quantidade de inóculo e o pH do meio líquido fermentativo no processo de produção de endoglucanase. As influências das variáveis supracitadas foram analisadas por um planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} (Tabela 1), onde a cada 24 horas, em um período de 216 horas, foi determinada a atividade de endoglucanase.

Tabela 1 - Fatores e níveis utilizados no Planejamento Fatorial Fracionado 2^{8-4} para produção de endoglucanase

FATORES	N (-1)	PC (0)	N (+1)
Torta (%)	1,0	2,0	3,0
pH	4,0	5,5	7,0
Inóculo (Conídios/mL)	1×10^4	$5,05 \times 10^5$	1×10^6
Ext. de Levedura	0,0	0,2	0,4
NaNO ₃ (g/L)	0,0	0,2	0,4
NH ₄ NO ₃ (g/L)	0,0	0,2	0,4
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	0,0	0,2	0,4
Uréia (g/L)	0,0	0,2	0,4

PC: Ponto central, N: Nível

A condição ótima para produção de endoglucanase foi avaliada por um modelo estatístico de superfície resposta, delineamento composto central (DCC), do tipo ortogonal, em um bloco, com dois níveis e três fatores, seis pontos axiais e quatro centrais (Tabela 2). Os fatores analisados foram o tempo de fermentação, a concentração da torta de algodão e concentração de NH₄NO₃. A suspensão de conídios utilizada em todos os pontos experimentais foi inoculada de forma a obter uma concentração final de $1,0 \times 10^5$ conídios/mL de meio de fermentação (meio base).

Tabela 2 - Planejamento experimental delineamento composto central (DCC), com dois níveis e três fatores (tempo, concentração da torta de algodão e concentração da fonte de nitrogênio)

FATORES	$-\alpha$ (-1,68)	N (-1)	PC (0)	N (+1)	$+\alpha$ (+1,68)
X - Tempo (horas)	11,15	48,0	96,0	168,0	180,85
Y - Algodão (%)	0,189	0,5	1,25	2	2,311
Z - Nitrogênio (g/L)	0,193	0,4	0,9	1,4	1,607

PC: Ponto central, N: Nível, α : ponto axial

2.3. Caracterização bioquímica

A temperatura ótima de ensaio enzimático foi definida através da dosagem da atividade da enzima endoglucanase, a partir do extrato enzimático produzido em condições ótimas, sob diferentes temperaturas, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90°C. A influência do pH na atividade endoglucanásica foi determinada por meio da quantificação da atividade desta enzima, utilizando como substrato a Xilana de Birchwood dissolvida em tampão McIlvane, em diferentes pHs (3, 4, 5, 6, 7 e 8), sob temperatura ótima previamente definida.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Otimização do processo de fermentação submersa

O perfil de produção de endoglucanase avaliado no período de 216 horas de fermentação demonstrou um pico de maior produção de atividade endoglucanase após 96 horas de processo, e outro pico após 144 horas. Os resultados experimentais do planejamento experimental fracionado para estes dois períodos estão expressos na Tabela 3. Com base nestes resultados, foram avaliados os efeitos dos fatores estudados nestes dois períodos (96 e 144 horas), os quais podem ser observados nos gráficos de Pareto expostos na Figura 2. Estes resultados forneceram dados importantes sobre a relevância estatística dos fatores avaliados. O ajuste feito pelo programa estatístico, representado por R^2 ($R\text{-sqr} = 0,88669$) foi satisfatório.

Tabela 3 - Resultados experimentais do planejamento fatorial fracionado utilizando como fator de resposta a atividade de endoglucanase (U/L) após 96 e 144 horas de fermentação

Torta (%)	pH	Inóculo (conídios/mL)	Ext. Lev. (g/L)	NaNO ₃ (g/L)	NH ₄ NO ₃ (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Uréia (g/L)	Endoglucanase (U/L) 96h	Endoglucanase (U/L) 144h
1	4	1x10 ⁴	0,0	0	0	0	0	916	564
3	4	1x10 ⁴	0,0	0	0,4	0,4	0,4	356	607
1	7	1x10 ⁴	0,0	0,4	0	0,4	0,4	1770	767
3	7	1x10 ⁴	0,0	0,4	0,4	0	0	324	649
1	4	1x10 ⁶	0,0	0,4	0,4	0,4	0	1152	725
3	4	1x10 ⁶	0,0	0,4	0	0	0,4	334	361
1	7	1x10 ⁶	0,0	0	0,4	0	0,4	1125	587
3	7	1x10 ⁶	0,4	0	0	0,4	0	311	502
1	4	1x10 ⁴	0,4	0,4	0,4	0	0,4	2333	854
3	4	1x10 ⁴	0,4	0,4	0	0,4	0	169	201
1	7	1x10 ⁴	0,4	0	0,4	0,4	0	1430	840
3	7	1x10 ⁴	0,4	0	0	0	0,4	213	222
1	4	1x10 ⁶	0,4	0	0	0,4	0,4	1260	705
3	4	1x10 ⁶	0,4	0	0,4	0	0	119	555
1	7	1x10 ⁶	0,4	0,4	0	0	0	144	56
3	7	1x10 ⁶	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	205	368
2	5,5	5,05x10 ⁵	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	438	1333
2	5,5	5,05x10 ⁵	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	448	1312
2	5,5	5,05x10 ⁵	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	454	1368
2	5,5	5,05x10 ⁵	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	455	1392

Foi possível observar que a variação da concentração de torta de algodão foi significativa e com efeito negativo (Figura 1), uma vez que quanto menor a concentração, maior atividade enzimática

obtida. Nestes gráficos também foi possível visualizar a influência do uso de NH_4NO_3 como fonte de nitrogênio na produção de enzima com atividade endoglucanásica. Diante destes resultados, as concentrações de torta de algodão e de nitrato de amônia foram utilizadas como variáveis no planejamento de otimização por metodologia de superfície respoa.

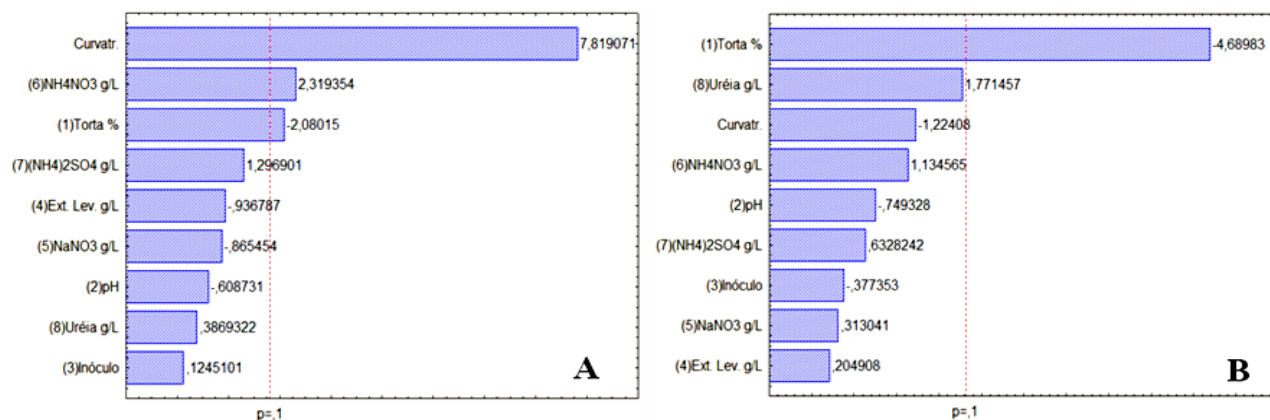


Figura 1 - Gráficos de Pareto apresentando os efeitos padronizados para as fontes de nitrogênio, % torta, inóculo e pH para a resultante endoglucanase após 144 (A) e 96 (B) horas de fermentação.

Os resultados experimentais para o planejamento composto central estão expressos na Tabela 4. Após análise do modelo matemático de otimização, com base nos resultados expressos na Tabela 4, observou-se que ajuste feito pelo programa estatístico, representado por R^2 (0,91728) foi satisfatório. Utilizando a análise de variância (ANOVA; Tabela 5) pode-se observar efeitos significativos ($p \leq 0,05$), do tipo quadrático negativo, para todas as variáveis (torta, tempo e nitrogênio). Além disso, interações significativas entre quaisquer variáveis não foram verificadas. Ao considerar que a falta de ajuste não foi significativa ($p > 0,05$), o que, combinado com os valores de F e os valores dos coeficientes de determinação (R^2), pode-se inferir que o modelo se ajusta adequadamente aos pontos experimentais, representando a confiabilidade dos resultados.

Tabela 4 - Resultados experimentais do planejamento composto utilizando como fator de resposta a atividade de endoglucanase (U/L)

	Tempo (h)	Algodão (%)	NH_4NO_3 (g/L)	Endoglucanase (U/L)		Tempo (h)	Algodão (%)	NH_4NO_3 (g/L)	Endoglucanase (U/L)
1	48,0	0,5	0,4	72	10	180,9	1,3	0,9	632
2	48,0	0,5	1,4	105	11	96,0	0,2	0,9	236
3	48,0	2,0	0,4	269	12	96,0	2,3	0,9	2645
4	48,0	2,0	1,4	296	13	96,0	1,3	0,2	1645
5	168,0	0,5	0,4	200	14	96,0	1,3	1,6	2333
6	168,0	0,5	1,4	135	15	96,0	1,3	0,9	2749
7	168,0	2,0	0,4	606	16	96,0	1,3	0,9	2860
8	168,0	2,0	1,4	344	17	96,0	1,3	0,9	2930
9	11,1	1,3	0,9	27	18	96,0	1,3	0,9	2721

Os gráficos de superfície de resposta representados na Figuras 2 ilustram os perfis dos efeitos quadráticos negativos e a condição onde uma maior atividade endoglucanásica foi obtida, ou seja, uma condição ótima. Além disso, ao analisar os gráficos em duas dimensões das figuras supracitadas, observou-se uma ampla faixa cuja atividade máxima é obtida. Este perfil demonstra que a produção enzimática apresenta uma elevada robustez, ou seja, pequenas variações não alteram o resultado final do processo, uma característica valorosa para processos de produção a nível industrial.

Tabela 3. Valores da análise de variância (ANOVA) para os modelos polinomiais de segunda ordem, e coeficientes

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	<i>F</i>	<i>p</i>	Efeitos	Coeficiente
				Intercept	2877,45
Tempo (horas)(L)	48793	0,24752	0,628621	X	-63,86
Tempo (horas)(Q)	13626754	69,12698	0,000005	X ²	-1278,77
Torta %(L)	1620132	8,21875	0,015328	Y	367,44
Torta %(Q)	4765724	24,17598	0,000459	Y ²	-772,98
NH ₄ NO ₃ g/L(L)	41418	0,21011	0,655605	Z	58,75
NH ₄ NO ₃ g/L(Q)	1983903	10,06412	0,008881	Z ²	-498,70

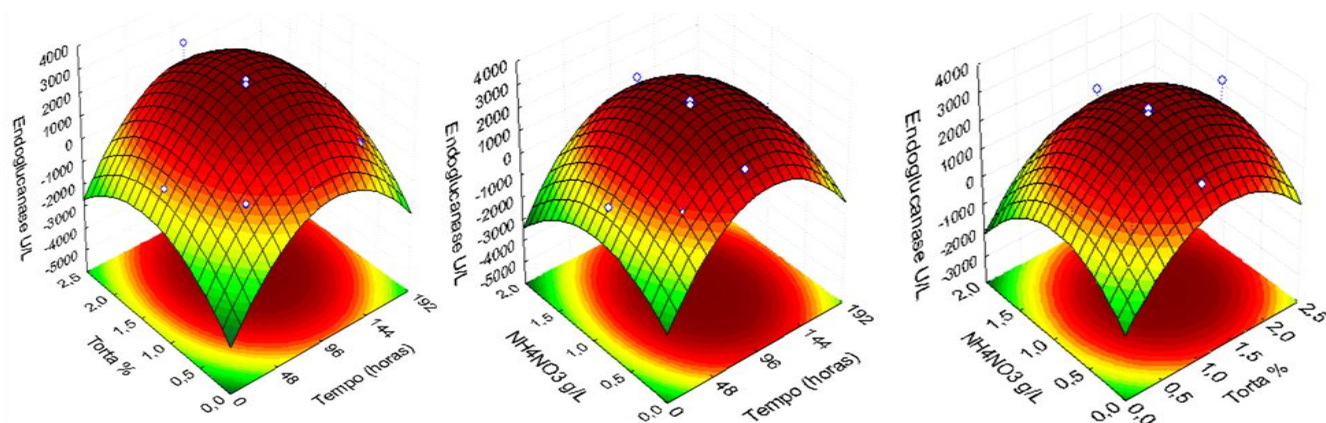


Figura 2 – Gráficos de superfície resposta dos efeitos combinados Torta (%), Fonte de Nitrogênio (NH₄NO₃ – g/L) e Tempo (horas) sob atividade de endoglucanase (U/L).

O extrato enzimático produzido pela linhagem *Aspergillus tubingensis* AN1257, utilizando 1,25% de torta de algodão e 0,9 g/L de nitrato de amônio no período de 100 horas de fermentação submersa, apresentou valores de 2,92 U/mL de atividade endoglucanásica. Observou-se nestas mesmas condições 1,89 U/mL de β-glicosidase e 0,43 U/mL de FPase. . Com base nos valores dos coeficientes expostos na Tabela 2, o modelo matemático de produção de xilanase pode ser representado pela equação: Endoglucanase (U/L) = 2877,45 - 63,86X + 367,44Y + 58,75Z - 1278,77X² - 772,98Y² - 498,70Z².

3.2. Caracterização bioquímica

Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática: Os resultados, expressos graficamente na Figura 3, demonstram que a temperatura ótima de atuação da enzima endoglucanase foi de 60°C, atingindo valores de atividade de 2,89 U/mL. Esta faixa de temperatura foi similar à encontrada por Bakri *et al.* (2010). Tais resultados denotam uma boa aplicabilidade industrial destas enzimas sob temperaturas relativamente altas.

Efeito do pH sobre a atividade enzimática: Os resultados relacionados ao efeito do pH na atividade da enzima endoglucanase encontram dispostos na Figura 3. Estes resultados evidenciaram que o pH ótimo de atividade endoglucanásica é entre 4,0 e 5,0, dados estes, condizentes a alguns estudos reportados na literatura, que geralmente, preconizam pH em torno de 5,0 para enzimas produzidas por *Aspergillus* sp. (Bakri *et al.*, 2010; Fachinni *et al.*, 2011). O valor máximo de atividade xilanásica, determinada em pH 4,0 (condição ótima de atuação) foi de 3,12 U/mL.

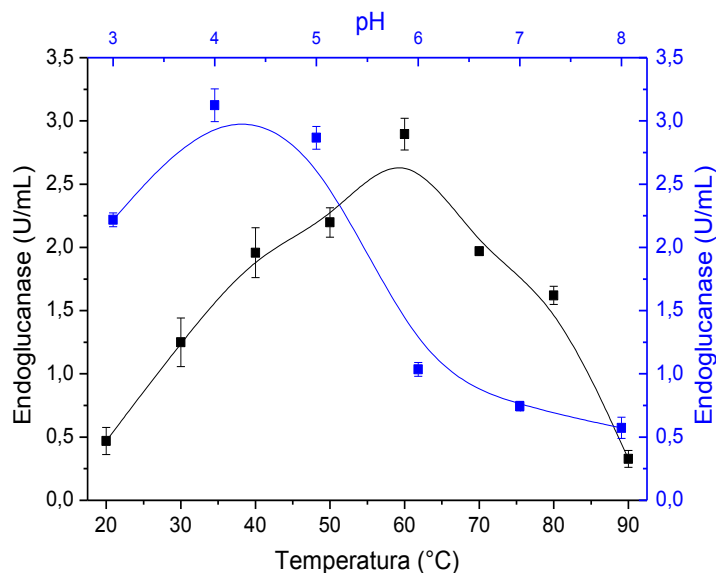


Figura 3 - Efeito da temperatura (linha preta) e pH (linha azul) sobre a atividade da enzima endoglucanase produzida por *A. tubingensis* AN1257, utilizando torta de algodão como fonte de carbono.

4. CONCLUSÕES

O estudo realizado e seus dados obtidos permitiram concluir que apesar das enzimas celulases e xilanases serem comumente comercializadas, há necessidade de estudos voltados para sua produção a fim de torná-las mais acessíveis e com baixo custo. Sendo assim, este trabalho contribuiu de forma positiva na obtenção de dados científicos relevantes para o crescimento deste cenário. A utilização de resíduos provenientes da extração lipídica de oleaginosas, oriundos da cadeia de produção do

biodiesel, como fonte de carbono em processos de fermentação por fungos filamentosos se mostrou relevante para produção de endoglucanase, por agregar valor a co-produtos subutilizados, bem como pela sua eficiência quando utilizado como substratos em processos fermentativos. A utilização de modelos estatísticos aplicadas a estudos de produção de enzimas celulolíticas se mostrou eficiente por possibilitar a obtenção de resultados otimizados em processos fermentativos de forma confiável e rápida. A pesquisa realizada gerou perspectivas de novos estudos relacionados ao aproveitamento de resíduos da cadeia do biodiesel para a produção de bioetanol e hidrolases lignocelulolíticas por processos de baixo custo.

5. REFERÊNCIAS

- BAKRI Y.; MASSON M.; THONART P. Isolation and Identification of Two New Fungal Strains for Xylanase Production. *Appl Biochem Biotechnol* 162:1626–1634, 2010.
- FACCHINI, F. D. A. VICI, A. C. BENASSI, V. M. FREITAS, L. A. P. REIS, R. A. JORGE, J. A. TERENCE, H. F. POLIZELI M. L. T. M. Optimization of fibrolytic enzyme production by *Aspergillus japonicus* C03 with potential application in ruminant feed and their effects on tropical forages hydrolysis. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2011.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. *Pure and Ap. Chem.*, v. 59, p. 257–268, 1987.
- MAEDA, R.N.; BARCELOS, C.A.; SANTAANNA L.M.M.; PEREIRA JR, N. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. *J. of Biotech.* 163 (2013) 38–44
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v.31, p.426-428, 1959.
- SHIMOKAWA, T.; SHIBUYA, H.; ISHIHARA, M.; YAMAGUCHI, M.; OTA, Y.; Kazuhiro MIYAZAKI, K.; IKEDA, T.; MAGARA, K.; NOJIRI, M. Screening of lignocellulolytic enzyme producers: enzyme system from *Aspergillus tubingensis* for hydrolysis of sugi pulp. *Bulletin of FFPRI*, Vol.11 No.2 (No.423), 57 – 63, 2012.
- VISSE E.M., OLIVEIRA FILHO, D., MARTINS, M.A.; STEWARD, B. L.. Bioethanol production potential from Brazilian biodiesel co-products. *Biomass and Bioenergy* 35, 489-494, 2011.
- VOGEL, H. F. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *AmerNaturalist*, 98:435-446, 1964.
- ZIMBARDI, A. L. R. L.; SEHN, C.; MELEIRO L.P.; SOUZA, F. H. M.; MASUI D. C.; NOZAWA M. S. F.; GUIMARÃES L. H. S.; JORGE J. A.; FURRIEL R. P. M. Optimization of β -Glucosidase, β -Xylosidase and Xylanase Production by *Colletotrichum graminicola* under Solid-State Fermentation and Application in Raw Sugarcane Trash Saccharification. *Inter J Molec Sci*, 14, 2875-2902, 2013.