

COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASES POR *Thermoascus aurantiacus* UTILIZANDO DIFERENTES SOLUÇÕES NUTRIENTE. Rodolfo Travaini, Roberto da Silva, Eleni Gomes, Lílían Andrade Rodrigues, Luiz Gustavo Covizzi. – Inter-áreas - Química Ambiental - Departamento de Química e Ciências Ambientais – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Campus de São José do Rio Preto.

Com a crescente demanda de energia e a necessidade de fontes de carbono prontamente assimiláveis, novas alternativas para o aproveitamento da celulose passam a serem requeridas, uma vez que fontes as celulósicas são fontes de carboidratos abundantes e altamente renováveis no planeta. O processo de conversão da celulose à açúcares solúveis pode ser via catálise ácida ou enzimática, contudo os processos via catálise ácida apresentam algumas desvantagens, como por exemplo: necessidade adicional de calor, equipamentos resistentes à corrosão, a necessidade de neutralizar o produto de hidrólise e a separação de subprodutos indesejáveis. Já o método enzimático, tem se mostrado uma alternativa para tais processos visto que, não apresenta a formação de subprodutos e não há a necessidade de gasto elevado em energia. Contudo a hidrólise enzimática apresenta como desvantagem a sua baixa eficiência em degradar a estrutura recalcitrante da lignina que se encontra intimamente associada à celulose e hemicelulose, tornando as fibras celulósicas inacessíveis ao ataque enzimático. O processo de hidrólise enzimática apresenta um elevado interesse industrial, devido à possibilidade de obtenção de produtos de valor comercial a partir de substratos de baixo custo, como por exemplo, resíduos agrícolas. No Brasil, país onde a principal atividade econômica é a agricultura, os resíduos e subprodutos agrícolas e agroindustriais são abundantes e estima-se que este montante seja da ordem de 1000 toneladas/ano. Boa parte deste material é queimado em caldeiras para gerar energia termoeletrica em usinas sucroalcooleiras, contudo na maior parte das vezes ele é simplesmente queimado abertamente, ou fica disponível no campo, tornando-se poluente ambiental. A produção de enzimas por meio de processos fermentativos é um ramo da biotecnologia ainda não completamente explorado, dentre os diferentes processos de fermentação conhecidos a fermentação em estado sólido (FES), tem se destacado nas últimas décadas para a produção de algumas enzimas, em particular aquelas envolvidas na degradação de polímeros vegetais complexos. Ela é definida como o processo fermentativo que ocorre na ausência de água livre entre as partículas do substrato. Este método que pode ser destacado pelas seguintes vantagens: sua simplicidade, baixo custo, alta produtividade, alta concentração de produtos, menor requerimento de espaço e energia; apresentando também certas desvantagens, tais como: dificuldade no controle de certos parâmetros durante o processo fermentativo (pH, temperatura, umidade e crescimento celular) e a necessidade relativa de grandes volumes de inóculo, o principal fator limitante no entanto refere-se ao fato de vários grupos microbianos terem dificuldade em crescerem em condições de pouca umidade, o que acaba restringindo o processo ao uso de fungos filamentosos, que se adaptam a tal condição. Desse modo a FES tem se apresentado como uma alternativa para a produção de enzimas por fungos filamentosos, visto a possibilidade de se reproduzir as condições de crescimento deste tipo de microorganismo. Enzimas que possuem capacidade de catálise a altas temperaturas são denominadas termozimas ou enzimas termofílicas, pesquisas indicam que poucas enzimas produzidas por microorganismos mesófilos são estáveis a altas temperaturas, enquanto que aquelas produzidas por termofílicos são na maioria das vezes estáveis. Além da estabilidade que é desejável em processos industriais, essas enzimas apresentam uma série de propriedades também desejáveis em processos industriais, tais como: são mais resistentes a desnaturantes químicos e altas concentrações de sais, por ocorrer a alta temperatura a viscosidade dos substratos fluídos é menor e assim é facilitado o bombeamento, a filtração e centrifugação, além de permitir o uso de menor quantidade de água, o que por consequência reduziria custos de produção.

As Xilanas são hemiceluloses e o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. Sua cadeia principal é constituída de resíduos de D-xilose ligados por ligações β -1,4, contendo ramificações, como pentoses e hexoses. A xilana encontra-se complexada com celulose e pectina, e ligada com a lignina. É imprescindível a utilização eficiente da xilana se deseja-se utilizar a biomassa lignocelulósica para processos de bioconversão visando-se a produzir substratos para fermentação alcoólica, ou mesmo para a

indústria de alimentos na produção do adoçante não carcinogênico como o xilitol. Para tal se faz necessário a hidrólise, ou então o uso de xilanases. As xilanases são largamente encontradas entre os microorganismos decompositores de materiais lignocelulósicos. Na indústria de alimentos as xilanases podem ser utilizadas como aditivos de sucos de frutas para facilitar sua clarificação e extração. Na indústria de papel pode ser utilizada em processos de branqueamento, que tradicionalmente são realizados a base de cloro, que é responsável por grande parte da poluição dos efluentes destas indústrias. Em termos de produção e uso de enzimas o Brasil encontra-se privilegiado devido à grande quantidade e variedade de biomassa disponível, porém, não se encontra em uma boa posição quanto ao uso de enzimas, estimando-se que o mercado brasileiro seja bem restrito em relação ao mercado mundial, dados sobre o comércio brasileiro de enzimas fornecido pela Secretaria de Comércio do Banco do Brasil (RABALHO, 2002) indicam que a quantidade produzida no país está longe daquela necessária para suprir suas necessidades.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes soluções salinas na produção de xilanases por fermentação em estado sólido (FES) utilizando farelo de trigo como substrato.

A seguinte metodologia foi empregada. O fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756 foi isolado na Amazônia (DA SILVA, 1992) a partir de madeira em decomposição, e foi utilizado como microorganismo produtor da enzima. Este microorganismo tem se destacado pela produção de enzimas termofílicas de interesse industrial, como as celulasas, xilanases, pectinases, amilases etc (Da Silva et al., 2005; Martin, 2004). O microorganismo foi mantido em tubos de ensaio com ágar Sabouraud inclinado, submerso em óleo mineral. A produção do inóculo ocorreu em frascos de 250 mL contendo 50 mL de ágar Sabouraud inclinado e incubados a 50°C durante 48 horas. A composição das soluções salinas testadas foi: 1) 1g/L de NH_4NO_3 ; 1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1g/L de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, descrita por Sabouraud (1892); e 2) 10g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3 g/L de KH_2PO_4 ; 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g/L de CaCl_2 , descrita por Toyama (1978). A fermentação se deu em frascos de erlenmeyer de 250 mL com 5 g de farelo de trigo e 10 mL de suspensão micelial, obtida pela raspagem suave da superfície do meio inclinado com 100 mL da solução nutriente a ser analisada. A cada 24 horas retirou-se um frasco, até completar 144 horas, contendo o material fermentado, onde foram adicionados 40 mL de água destilada e em seguida, procedeu-se agitação por uma hora em shaker a 100 rpm, para completa extração enzimática. O material foi filtrado e centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos a 2°C, obtendo assim o extrato enzimático bruto. A determinação enzimática foi realizada utilizando-se xilana como substrato em tampão acetato 0,1M (pH 5,0), pela quantificação de substância redutoras, segundo método proposto por Miller 1956, utilizando-se ácido 3,5-dinitrosalicílico.

Os resultados obtidos foram compilados e apresentados na forma gráfica, conforme figuras 1 e 2, abaixo. Observou-se que o pico de produção de xilanases ocorreu em 96 horas para as duas soluções avaliadas. A maior produção de xilanase no meio de Sabouraud foi de 744U/g e no meio Toyama foi de 1115U/g. Conclui-se, portanto que a solução de Toyama aumentou em 33% a produção de xilanase comparada com a solução salina de Sabouraud.

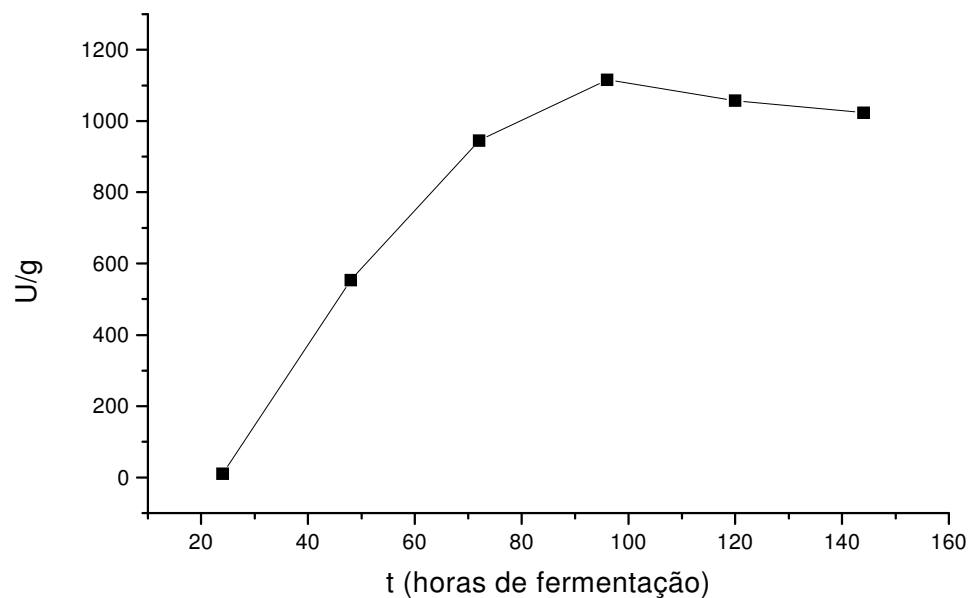


Fig. 1: Atividade de xilanase, fermentação com solução nutriente modificada de Sabouraud.

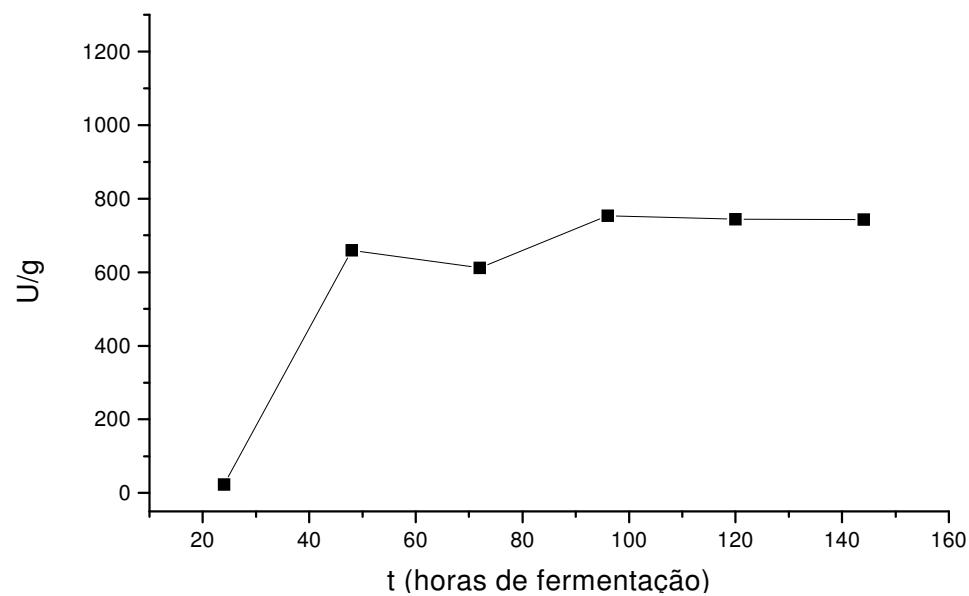


Fig. 2: Atividade de xilanase, fermentação com solução nutriente proposta por Toyama.

Referências Bibliográficas:

1. DA-SILVA, R. Produção, purificação e caracterização de enzimas celulolíticas termoestáveis de *Humicola* sp. 179-5 e aplicação destas enzimas 1992. **Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos)**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

2. DA SILVA, R.; LAGO, E.S.; MERHEB, C.W.; MACCHIONE, M.M.; PARK, Y.K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Mische. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.235-241, 2005.
3. GOMES, E.; GUEZ, M.U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Microrganismos termófilos, enzimas termoestáveis e produção de enzimas termoestáveis para aplicação industrial - Revisão. **Química Nova**, *in press*, 2006.
4. MARTIN, N.; SOUZA, S.R.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial byproduct. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, p.813-819, 2004.
5. MARTINS E.S.; Silva D.; DA SILVA, R.; GOMES E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochem.**, v.37, p.949-954, 2002.
6. MARTINS, E.S.; SILVA, R.; SILVA, D.; LEITE, R.S.R.; GOMES, E. Purification and characterization of polygalacturonase produced by *Thermoascus aurantiacus* 179-5 in submerged. **Antonie van Leeuwenhoek**, *in press*, 2006.
7. MILLER, G. L. Use of dinitrossalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.**, v.31, p.426-428, 1956.
8. RABALHO, A.A. Isolamento de linhagens microbianas termofílicas amilolíticas, produção, caracterização e aplicação das amilases na hidrólise do amido de mandioca 2002. **Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos)**. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.
9. Sabouraud, R. **Ann. Dermatol. Syphilol.** v.3, p.1061, 1892.
10. Toyama, N., Ogawa, K., 1978. Cellulase production by *Trichoderma viride* in solid and submerged culture methods. In: Ghose, T.K. (Ed.), **Bioconversions of Cellulosic Substances into Energy, Chemicals and Microbial protein. Symp. Proc. 1977**, Indian Institute of Technology, New Delhi, p. 305-327.

Bolsa: Bolsa de Apoio Acadêmico e Extensão I

Agradecimentos: FAPESP; CNPq; IBILCE-UNESP, pela bolsa de Apoio Acadêmico e Extensão I.