



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Efeito da Variação da Fonte de Nitrogênio Sobre as Atividades de Celulases, Xilanase e Amilase Produzidas pelo Fungo *Myceliophthora Thermophila* I-1D3b a Partir de Fermentação Semi-sólida com Farelo de Trigo

G.F.A. da SILVA<sup>1</sup> e J. C. THOMEIO<sup>1</sup>

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP IBILCE, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos  
E-mail para contato: giferalves@hotmail.com

#### RESUMO

*O objetivo deste trabalho foi avaliar a influencia de diferentes fontes de nitrogênio na atividade enzimática de endoglucanase (CMCase), xilanase e amilase utilizando o fungo Myceliophthora thermophila I-1D3b por fermentação semi-sólida. O cultivo ocorreu variando as fontes de nitrogênio (peptona, sulfato de amônia e peptona+sulfato (1:1)) a 45°C. A primeira amostra foi retirada em 12h e as seguintes a cada 24 horas até completar 120 horas e submetidas a análise de atividade enzimática. Amilase apresentou atividade máxima (1,32 U/mL) em 24 horas no cultivo com peptona. Sendo que a produção máxima de CMCase (5,5 U/mL) ocorreu em 48h de cultivo e Xilanase (26,08U/mL) ocorreu em 72h de cultivo, ambas cultivadas com a mistura P+S (1:1), esta mistura foi a mais favorável para a secreção de enzimas. Os resultados obtidos darão subsídios à prospecção de substratos para cultivo em estado sólido.*

Palavras-chave: atividade enzimática, *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, fonte de nitrogênio.

#### 1. INTRODUÇÃO

A produção de enzimas possui enorme importância no cenário industrial. Em virtude das grandes quantidades de biomassa vegetal que são produzidas pela agroindústria, diversos são os estudos que analisam a viabilidade de se utilizar resíduos agrícolas, florestais e agroindustriais na produção de enzimas que podem ser empregadas em importantes bioprocessos industriais (ROMERO et al., 1999). O farelo de trigo esta entre os vários resíduos, podendo ser explorados por meio de fermentação para produção de enzimas, uma vez que contém, além de fonte de carbono, diversos nutrientes essenciais para o crescimento microbiano como fósforo, nitrogênio e potássio (DOGARIS et al., 2009; ÖGEL et al., 2001).

As enzimas obtidas de plantas e microrganismos são as mais utilizadas, por possuírem faixas mais amplas de pH, temperatura, especificidades de substrato e o menor custo de obtenção. Dentre os microrganismos, os fungos são reconhecidos como agentes da decomposição de matéria orgânica em geral e celulose, em particular, que produzem uma variedade de enzimas hidrolíticas essenciais para suportar o seu crescimento (ARCHER e WOOD 1994). Os fungos filamentosos são um dos grupos mais ativos e eficientes entre esses microrganismos, pois apresenta diversas vantagens em função do grande potencial de secreção de enzimas (ÖGEL et al., 2001).

Esse trabalho visa identificar a influencia de diferentes fontes de nitrogênio na atividade enzimática de endoglucanase (CMCase), xilanase e amilase, obtidas através do



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

fungo *Myceliophthora thermophila I-1D3b* por fermentação semi-sólida, cultivada com farelo de trigo.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1 Microrganismos e Pré-inóculos

Foi utilizado o fungo filamentosso termofílico *Myceliophthora thermophila I-1D3b* pertencente ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE/UNESP. Para utilização, a cultura do fungo foi repicada em erlenmeyers contendo Agar-Sabouraud-Dextrose e mantidos por 96 horas a 45 °C. As condições do ensaio fermentativo foram as otimizadas por Zanelato (2011). Após este período, o micélio foi suspenso em 250 mL de solução nutriente (descrita no item 2.2), sendo 2 mL da suspensão utilizada como inóculo.

#### 2.2 Meios de cultivo

O fungo *Myceliophthora thermophila I-1D3b* foi cultivado por fermentação submersa com os seguintes substratos (p/p): farelo de trigo para todos tratamentos, variando o composto peptona (PEP), sulfato de amônia (SULF) e peptona/sulfato de amônia (P+S) (1:1) totalizando 3 tratamentos. Para as fermentações submersas, foi utilizado o meio nutriente composto por (g/L): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,0), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,4), uréia (0,3), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,3), CaCl<sub>2</sub> (0,1), peptona (1,0), tween 80 (2,0), glicose (0,04), solução de sais (1,0) carboximetilcelulose de baixa viscosidade (Sigma, USA). O pH do meio foi ajustado para 5,0 com solução de NaOH ou HCl.

#### 2.3 Processos fermentativos

As fermentações submersas foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL do meio nutriente descrito no item 2.2 e uma alíquota de 2,0 mL da solução do pré-inóculo (descrito no item 2.1) e meio de cultivo correspondente às misturas citadas no (item 2.2), O cultivo ocorreu a 45°C, durante 5 dias. A primeira amostra foi retirada em 12h e as seguintes a cada 24 horas. Para obtenção da solução enzimática bruta, o meio fermentado foi filtrado a vácuo, em filtro de papel. O filtrado foi centrifugado a 12000 xg por 30 minutos a 10°C, o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

#### 2.4 Determinação da atividade enzimática

##### 2.4.1 Endoglucanase (CMCase)

A atividade de endoglucanase foi determinada pelo método proposto por Ghose (1987), sendo as amostras constituídas por 0,1 mL de solução enzimática e 0,9 mL de suspensão a 4% de carboximetilcelulose (CMC – Sigma C5768) como substratos em tampão acetato (0,1 M, pH 5,0). A reação foi mantida a 60°C por 10 minutos e, então, interrompida pela adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido 1-3- dinitrosalicílico) para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por MILLER (1959). Em seguida, essa solução foi mantida em água em ebulição por 10 minutos, sendo a reação interrompida com o abaixamento súbito da temperatura em banho de gelo. Posteriormente, foram adicionados 8,0 mL de água destilada à solução e, em seguida, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm, a atividade foi calculada com base na curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de glicose por minuto de reação por mL de extrato enzimático.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### 2.4.2 Xilanase

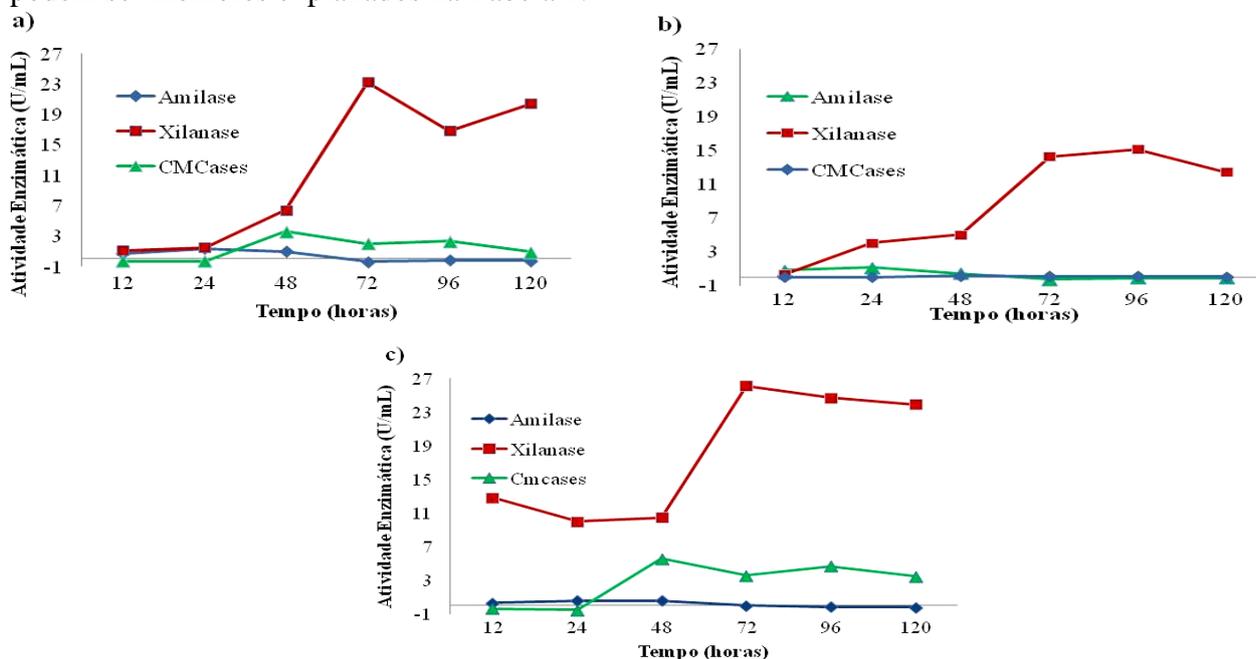
A atividade de xilanase foi realizada por procedimento idêntico ao descrito no tópico 2.4.1, exceto o substrato que foi substituído pela xilana a 1% (Xylan Birchwood, Sigma).

### 2.4.3 Amilase

A atividade de amilase foi realizada por procedimento idêntico ao descrito no tópico 2.4.1, exceto o substrato que foi substituído pelo amido a 1% (soluble starch, Sigma) e as amostras foram incubadas em banho fervente por 6 minutos, após resfriamento, foi adicionado 10 mL de água destilada nos tubos.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 1 demonstra que a atividade microbiana pode ser inferida pela análise dos metabólitos primários secretados, porém que há grande dificuldade em correlacioná-la diretamente com o crescimento fúngico, uma vez que não há um metabólito específico que permaneça no meio reacional sem ser degradado ao longo do processo. Nota-se que a amilase apresentou atividade máxima (1,32 U/mL) em 24 horas no cultivo com peptona (Figura 1a). Sendo que a produção máxima de CMCases (5,5 U/mL) ocorreu em 48h de cultivo e Xilanase (26,08U/mL) ocorreu em 72h de cultivo, ambas no tratamento contendo a mistura P+S (1:1), esta mistura (Figura 1c) foi a mais favorável para a secreção de enzimas, esses resultados podem ser melhores explanados na Tabela 1.



**Figura 1.** Atividade enzimática de CMCases, xilanase e amilase produzida pelo fungo *Myceliophthora thermophila* em cultivo com a) peptona, b) sulfato de amônia e c) P+S (1:1)

Com exceção da xilanase, as demais enzimas têm queda de atividade após atingirem o máximo. Segundo Whitaker (1994), enzimas geralmente apresentam mecanismos de controle de expressão que podem ser estimulados ou inibidos por produtos do meio. Os produtos finais



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

de cada via metabólica são frequentemente inibidores das enzimas que catalisam os primeiros passos da via. Esse mecanismo é conhecido como *Feedback negativo* ou auto-alimentação.

Tabela 1: Resumo dos tempos de melhor produção e respectivas atividades de cada enzima do fungo *Myceliophthora thermophila I-1D3b*

Fonte de Nitrogênio	Tempo (horas)	CMCase (U/mL)	Tempo (horas)	Xilanase (U/mL)	Tempo (horas)	Amilase (U/mL)
Peptona (P)	48	3,57	72	23,2	24	1,32
Sulfato (S)	48	0,18	96	15,13	24	1,13
P+S (1:1)	48	5,56	72	26,08	24	0,56

Dentre as fontes de nitrogênio utilizada destacou-se a combinação P+S (1:1) como o melhor meio para secreção de xilanase e CMCases. Entretanto para secreção de amilase, observou-se um comportamento diferente, onde as melhores atividades foram obtidas quando utilizado peptona.

### CONCLUSÕES

O fungo *Myceliophthora thermophila I-1D3b* apresentou as maiores produções de Xilanase em combinações com todas as fontes de nitrogênio, comparado a produção de amilase e Cmcase. . Entretanto destacou-se a combinação P+S (1:1) tanto para a secreção de xilanase quanto para CMCases. Permitindo assim, inferir que, a secreção de enzimas são fortemente influenciada pela fonte de nitrogênio utilizada. Logo esse estudo estimula a investigação de melhores combinações da proporção Peptona + sulfato de amônia. Tendo em vista que os resultados obtidos darão subsídios à prospecção de substratos para cultivo deste microrganismo em estado sólido.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Archer D. B.; Wood D. A. Fungal exoenzymes. En: Gow NAR, Gadd GM, editores. *The growing fungus*. London: Chapman & Hall. p. 473, 1994.
- Dogaris, I.; Vakontios, G.; Kalogeris, E.; Mamma, D.; Kekos, D. Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. *Industrial Crops and Products*, v. 29, p. 404-411, 2009.
- Ghose, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure & App. Chem.*, v. 59, p. 257—268, 1987.
- Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p.426 – 428, 1959.
- Ögel, Z. B.; Yarangümel, K.; Dündar, H.; Ifrij, I. Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanases production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, p. 689-695, 2001.
- Romero, M. D.; aguado, J.; González, L.; Ladero, M. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 25, p. 244-250, 1999.
- Whitaker, J. R. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. 2th ed. Dekker, 1994.
- Zanelato, A. I. Produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido em bioreator de leito fixo / Alex Izuka Zanelato. - São José do Rio Preto : [s.n.], 116 f, 2011.