

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Produção de Xilooligossacarídeos por Xilanase Fúngica a partir de Casca de Arroz

Bruna da Silva Menezes<sup>1</sup>, Roberta Lima Panozzo<sup>1</sup>, Daniele Misturini Rossi<sup>2</sup> e Marco Antônio Záchia Ayub<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Caixa Postal 15090 – 91501-970 Porto Alegre – RS - E-mail: brunamenezes.br@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Depto. de Engenharia Química  
Caixa Postal 15057 – 90040-040 Porto Alegre – RS

#### RESUMO

*Fungos têm a capacidade de produzir enzimas a partir de fontes de carbono e nitrogênio e secretá-las no meio. Os resíduos agroindustriais são interessantes fontes pelo aproveitamento de rejeitos e pelo baixo custo da matéria prima. A enzima xilanase, além de possuir aplicações industriais, pode ser utilizada para produzir xilooligossacarídeos (XOS), conhecidos como prebióticos, com grande potencial de aplicação na indústria de alimentos. O fungo *Aspergillus brasiliensis* 157f, coletado na biodiversidade brasileira foi utilizado neste estudo para produção de xilanase e XOS a partir de cultivo em estado sólido com casca de arroz. Foi realizado um planejamento experimental fracionário  $2^{(5-1)}$  para produção de xilanase, variando os parâmetros umidade, granulometria, pH, tamanho do inóculo e presença do meio basal. Obteve-se atividade enzimática máxima de 183 U/g, essa produção aconteceu no quinto dia após a inoculação, e foi analisada por cromatografia. Verificou-se a presença de XOS, produzidos simultaneamente à produção da enzima xilanase.*

**Palavras-chave:** Cultivo em estado sólido, resíduo agroindustrial, *Aspergillus brasiliensis* 157f, xilanase, xilooligossacarídeos.

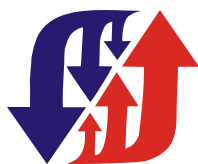
#### INTRODUÇÃO

Diversos estudos mostram uma grande variedade de microorganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos que tem produzido xilanase, a partir de uma perspectiva industrial, os fungos são interessantes devido à liberação extracelular de xilanasas mais elevada (Sridevi e Charya, 2011).

A enzima xilanase pode ser utilizada industrialmente e também é capaz de produzir xilooligossacarídeos (XOS), que são oligômeros de xibose reconhecidos como prebióticos, tendo grande potencial de aplicação na indústria de alimentos. A produção enzimática a partir de resíduos agroindustriais é interessante pelo aproveitamento de rejeitos e pelo baixo custo da matéria prima (Menezes e Durrant, 2008).

#### MATERIAL E MÉTODOS

O fungo *Aspergillus brasiliensis* 157f utilizado faz parte da cultura do laboratório BiotecLab (ICTA/UFRGS). O substrato, casca de arroz, foi obtido de uma indústria local, situada no estado do Rio Grande do Sul.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

O cultivo foi realizado em estado sólido, em frascos Erlenmeyers contendo 5 g do substrato lignocelulósico (casca de arroz), variando os parâmetros granulometria (1 e 2 mm de diâmetro), umidade (60 e 80%), pH (4,5 e 7,5), tamanho do inóculo ( $10^5$  e  $10^7$  células/g), e meio basal descrito por Reginatto (1992) (apresenta a seguinte composição: 1,4 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 2,0 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,3 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,3 g/L de  $\text{CaCl}_2$ ; 5,0 mg/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,56 mg/L de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 2,0 mg/L de  $\text{CoCl}_2$  e 1,4 mg/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a pH 5,5) (presença e ausência) em um planejamento fracionário  $2^{(5-1)}$ . Os frascos com a casca de arroz foram pesados, seguidos da adição de meio basal e tampão fosfato e citrato de sódio 50 mM, para controle de umidade e pH, fechados e esterilizados a 121 °C por 15 min e então inoculados com  $10^5$  e  $10^7$  células/g de amostra, previamente avaliadas em Câmara de Neubauer. Os frascos foram então incubados à temperatura de 28 °C.

A análise da atividade enzimática foi realizada nos dias 2, 5, 7 e 9 após a inoculação, a fim de obter a cinética da atividade enzimática. Porém, avaliou-se o planejamento no dia em que se obteve a maior atividade de xilanase. Em cada análise, foi realizada a extração com 40 mL de tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0), a 180 rpm e 28 °C, por 30 min. O conteúdo foi centrifugado a 4.500 g, a 4 °C por 15 min. Os sobrenadantes foram considerados extrato enzimático bruto. A atividade enzimática da xilanase foi obtida conforme Miller, (1959) por incubação durante 30 min a 50 °C de 500 µl de extrato enzimático com 500 µl de solução xilana a 1% (Birchwood, Sigma-Aldrich) em tampão de acetato de sódio (50 mM, pH 5,0). A concentração de açúcar redutor foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) usando xilose como padrão. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima a qual libera 1 µmol de xilose por minuto sob as condições do método.

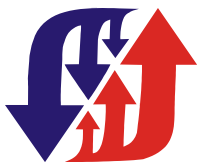
A determinação de xiloligossacarídeos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) conforme Bian *et al* (2013) em equipamento Shimadzu, empregando coluna Aminex HPX 42 A (dimensões da coluna, Bio-Rad, EUA) a 30 °C e fluxo 0,4 mL/min, utilizando água miliq como eluente. A concentração de oligossacarídeos foi quantificada usando as áreas dos picos comparados com os respectivos padrões de xiloligossacarídeos (Megazyme): xilobiose (X2), xilotriose (X3), xiltetraose (X4), xilopentose (X5) e xilohexose (X6). As análises de XOS foram quantificadas no quinto dia de cultivo, onde se obteve maior atividade enzimática.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir da análise de efeitos do planejamento experimental apresentada na Tabela 1, com 95% de confiança se observou que as variáveis que tiveram efeito significativo para produção de xilanase foram granulometria, pH e meio basal, e que um incremento da granulometria, ou seja, variação de 1 mm para 2 mm de diâmetro conduziu a um decréscimo da atividade, enquanto que o incremento do meio basal, ou seja, a presença do meio levou a maior produção enzimática.

Tabela 1. Análise dos efeitos ( $p < 0,5$ )

	Efeito	Erro	p
Granulometria	- 26,0307	10,80807	0,036781
Umidade	2,1942	10,80807	0,843198
pH	-57,0148	10,80807	0,000360
Tamanho do inóculo	2,2274	10,80807	0,840858
Meio basal	50,4989	10,80807	0,000878



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

A partir dos resultados obtidos na tabela 1, foram obtidas as superfícies de respostas, apresentadas na Figura 1. Pode-se observar, de acordo com a figura 1a, que a granulometria não tem influência sobre a produção da enzima, porém aumentando o meio basal ocorre uma maior atividade enzimática. Na interação entre unidade e pH (Figura 1b), pode-se observar que a unidade só influencia na produção em baixo pH; entre pH e inóculo (Figura 1c), o inóculo só influencia com cultivo em baixo pH; e na interação de pH com meio basal (Figura 1d), na presença de meio basal o pH influencia muito pouco na produção da enzima xilanase. Portanto, a presença de meio basal é importante para produção, associada a um tamanho de inóculo maior, maior unidade, menor granulometria, sendo necessário ainda avaliar o pH ideal através de um planejamento simples.

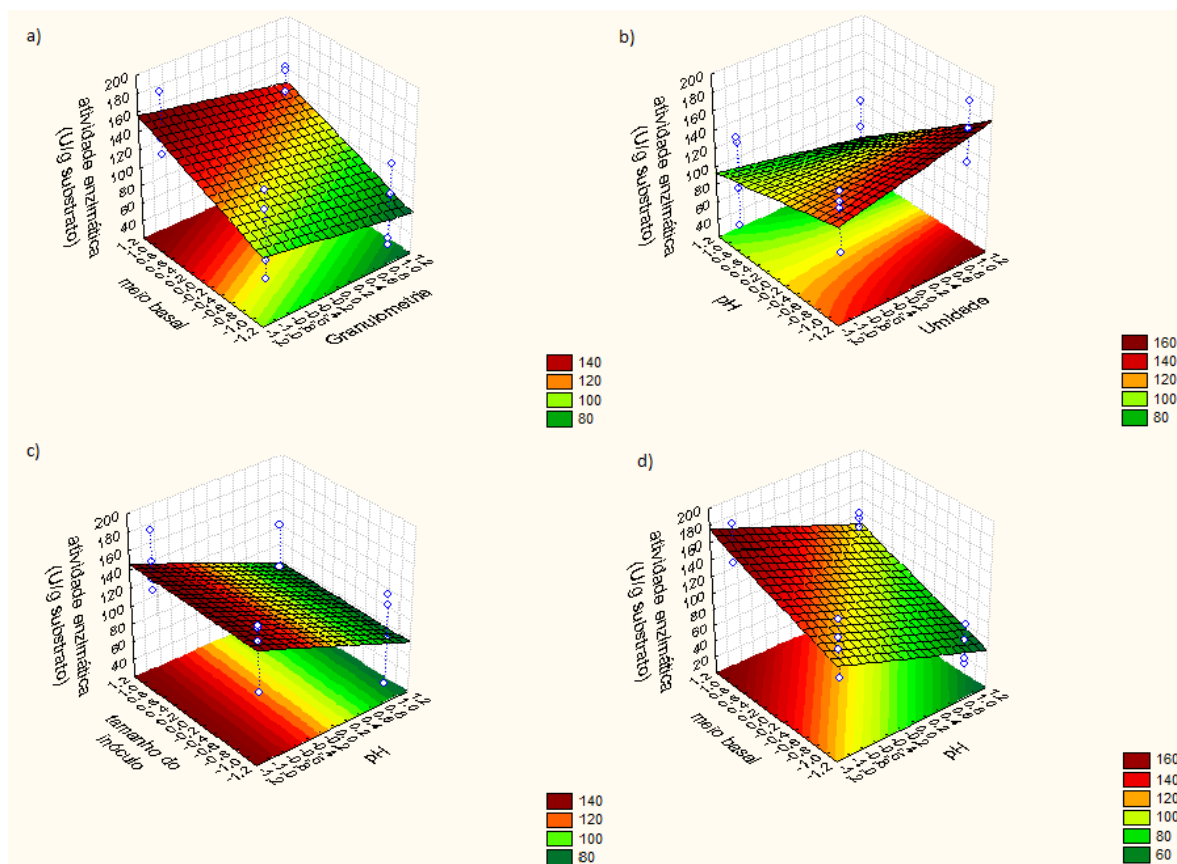
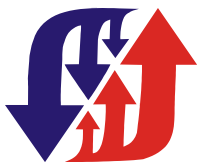


Figura 1. Superfícies de resposta da produção de xilanase com interação entre a) Granulometria e meio basal b) unidade e pH c) pH e tamanho do inóculo d) pH e meio basal

A análise de cromatografia para determinação de xiloligossacarídeos foi realizada com as amostras do quinto dia de cultivo e com o experimento que teve maior produção enzimática de xilanase (183 U/g substrato), sendo este com presença de meio basal, inóculo de  $10^7$  células/g de amostra, menor granulometria, 80% de unidade e pH 5,5. A amostra controle foi considerada sem a adição de microorganismo. Ao comparar as duas figuras, é possível visualizar o surgimento de picos que indicam a presença dos xiloligossacarídeos, sendo estes xilobiose (X2), xiltreose (X4) e xilopentose (X5). É importante lembrar que o pico de atividade enzimática de xilanase não seria necessariamente o pico de produção de XOS, devido aos parâmetros de produção destes serem diferentes, porém neste estudo a maior atividade de xilanase foi o que obteve os picos de XOS.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

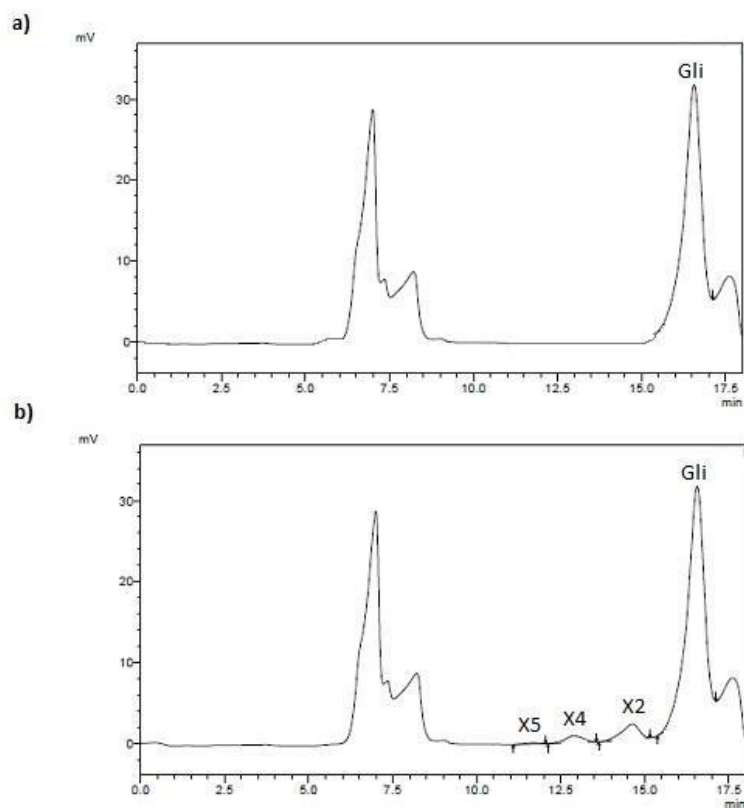


Figura 2. Cromatogramas da produção de XOS a) Amostra controle b) Amostra com atividade máxima de xilanase após o planejamento experimental

### CONCLUSÕES

O cultivo em estado sólido do fungo *Aspergillus brasiliensis* 157f e com casca de arroz como substrato lignocelulósico, apresentou atividade de xilanase máxima de 183 U/g. Os valores de atividade enzimática foram maiores nas seguintes condições: presença de meio basal, inoculo de  $10^7$  células/g de amostra, menor granulometria (1 mm), 80% de umidade e pH 5,5.

A análise em CLAE comprovou a produção de xilooligosacarídeos paralelamente à produção da enzima, podendo esta produção ser ainda quantificada e aplicada para produção de probióticos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bian J, Peng F, Peng X-P, Peng P, Xu P, Sun R-C.2013.Structural features and antioxidant activity of xylooligosaccharides enzymatically produced from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* 127: 236-241.
- Menezes CR, Durrant LR.2008. Xilooligosacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. *J Ciência Rural* 38: 587-592.
- Reginato V.1992. Estudo das enzimas produzidas por *Trichoderma longibrachiatum* responsáveis pela degradação de material lignocelulósico. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 147p.
- Sridevi B, Charya MAS.2011. Isolation, identification and screening of potential cellulase-free xylanase producing fungi. *African Journal of Biotechnology* 10:4624-4630.