PRODUÇÃO DE XILANASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO, DE FARELO DE TRIGO UTILIZANDO CONSÓRCIOS FÚNGICOS.

Christiane Maria Christina Nóbrega Bakker ✉
Everaldo Silvino dos Santos
Gorete Ribeiro de Macedo
Programa de Pós–Graduação em Engenharia Química – Universidade Federal do Rio Grande
Campus Universitário Lagoa Nova. Natal, RN
✉ bakker.christiane@gmail.com

RESUMO

A fim de se agregar valor ao resíduo farelo de trigo gerado em indústrias do setor alimentício avaliou-se, no presente trabalho, o potencial deste subproduto como substrato para produção de enzima xilanase no cultivo em estado sólido, utilizando consórcios fúngicos bem como os fungos *Aspergillus oryzae* CCT nº 0975 (ATCC9362) e *Trichoderma reesei* CCT nº 2768 - QM 9414. Para tanto utilizou-se o farelo de trigo, não lavado e não autoclavado, como fonte de carbono e energia na fermentação em estado sólido pelo fungo *Aspergillus oryzae* que apresentou maior produção do percentual de proteína nas 72 horas de cultivo. Depois de realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - planejamento fatorial 2^3, com três repetições no ponto central e seis pontos axiais - partiu-se para otimização dos fatores que foram considerados significativos no processo: umidade, pH e granulometria. Os fatores foram considerados significativos pela ANOVA com o nível de 95% de confiança e com o resultado otimizado de atividade enzimática de (1.84 ± 0.01) UI/mL utilizando pH 3,3, granulometria de 900,0 µm e umidade de 40%. O caldo enzimático obtido foi considerado eficiente na modificação de tipificação de farinhas de trigo pelo estudo dos parâmetros reológicos do *falling number* e alveografia sendo estável por cerca de 3 meses.

Palavras-chave: *Enzima. Farinha de trigo. Aspergillus orizae e Trichoderma reesei.*

ABSTRACT

This study aimed to find alternatives for wheat bran disposal destination generated in food industry sector, thus contributing to the reduction of the resultant impact of residue deposition in the environment. The potential of the wheat bran as a substrate for xylanase production by solid-state fermentation using fungal consortiums as well as Aspergillus oryzae (ATCC9362) and Trichoderma reesei (2768) was valued . The use of non-washed and non-autoclaved wheat bran as carbon and energy source in solid-state fermentation by A. oryzae fungus showed greater percentage of produced protein after 72 h of cultivation. The use of a central composite rotatable design (CCRD), 2^3 factorial planning with three repetitions at the central point as well as six axial points, coupled with Surface Response Methodology (SRM) allowed to assay the influence of humidity, pH, and grain size (independent variables or factors) on the xylanase activity (dependent variable or response) as well as to optimize the best conditions for the enzyme production. The results showed that all factors and their combinations were significant at 95% confidence level. The optimized xylanase activity was (1.84 ± 0.01) UI/mL, obtained at 40% humidity and pH 3.3 with a grain size of 900.0 µm. The produced broth was stable for 3 months and approximately had 50% of the initial xylanase activity at 4°C. SDS-PAGE assay showed that xylanase has 30

kDa molar mass. The obtained enzymatic broth was efficient to modify wheat flours as shown by the falling number rheologic parameters and alveography assay.

Keywords: *Enzyme. Wheat flour. Aspergillus oryza and Trichoderma reesei.*

INTRODUÇÃO

Com base em dados do Ministério do Meio Ambiente, a ONU estima o mercado brasileiro em dois bilhões de dólares. Já o Instituto de pesquisa econômica aplicada (Ipea), estima que o Brasil perde oito bilhões de reais por ano com falta de reciclagem. Quanto à destinação dos resíduos sólidos do Brasil em 2010, publicado pela Abrelpe, seguiram somente para aterros sanitários cerca de 58% dos resíduos e 24% para aterros controlados. Dentro das pesquisas em resíduos 59% das empresas entrevistadas em 2011 declaram promover o reuso contra apenas 47% declarados em 2007 e 57% declaram possuir metas de redução de geração. O certo é que o país deve avançar com a nova política Nacional de resíduos sólidos - PNRS, vigorando desde agosto de 2010. A grande esperança desta política é que devido à obrigatoriedade de envolvimento da iniciativa privada, o Brasil iniciará mudanças permanentes na cultura ambiental. Dentre as ações mais populares têm-se a coleta seletiva de lixo 91%, monitoramento de indicadores 77%, ações de redução de impacto 68% e tecnologias para reduzir a geração 51%. Os principais pontos da nova lei são considerados sete medidas que irão impactar na forma pela qual o Brasil trata o seu resíduo: Logística reversa, fim dos lixões, planos municipais, responsabilidade compartilhada, cooperativas de catadores, financiamentos para consórcios e novas tecnologias.

O resíduo da fabricação de farinha de trigo, farelo de trigo, apresenta várias características que possibilitam o seu uso como meio de cultura: é barato, atende às necessidades nutricionais dos micro-organismos, possui características que facilitam o controle do processo, não provoca dificuldades na recuperação do produto e apresenta estabilidade para armazenagem (SCHMIDELL, 2001). Sendo assim, é um potencial substrato para obter produtos comercialmente viáveis por fermentação. As fermentações fúngicas que podem ocorrer em estado sólido, semi-sólido e submersa foram estudadas e, por redução na utilização de recursos naturais, a opção que utiliza menor percentual de água foi priorizada.

As xilanases são enzimas que degradam a xilana, principal componente da hemicelulose vegetal, podendo contribuir para o branqueamento de polpas de celulose, reduzindo a utilização de produtos altamente poluentes como cloro, na clarificação de sucos e vinhos e na liberação de xilo-oligossacarídeos que podem ser então convertidos em outros produtos de interesse na área de alimentos. As aplicações comerciais incluem o aumento da digestibilidade para alimentação animal, na mucilagem de café, indústria farmacêutica, melhoramentos na panificação, produção de bebidas alcoólicas e álcool. Produtos da hidrólise de xilano, como a xilose, podem ser convertidos em combustíveis líquidos (etanol), xilitol, solventes e adoçantes artificiais de baixa caloria (MACIEL, 2006). A produção das xilanases com características bioquímicas adequadas à aplicação industrial representa objeto de estudo relevante, cujo enfoque no desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias visa aumento de produtividade, de escala e redução de custos tornando-se portanto de extrema importância.

O objetivo do presente estudo foi utilizar o farelo de trigo (resíduo agroindustrial) como substrato para a fermentação em estado sólido (FES) para produção de xilanases, usando-se os fungos *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma reesei*. Após caracterização do substrato, um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com a metodologia de superfície de resposta que permitiu otimizar a produção da enzima, foi utilizado avaliando-se a viabilidade de uso das xilanases como aditivo na indústria alimentícia.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização dos resíduos

A coleta de amostras para caracterização dos substratos foi realizada na unidade do Grande Moinho Potiguar denominada GMP instalada em Natal-RN. Foram coletados 5 kg de amostra de granulometrias 600 e 1200 μm de farelo de trigo já comercializados como subproduto da fabricação de farinha de trigo. As análises realizadas no farelo de trigo seguiram metodologia IAL (2005): umidade, granulometria, cinzas, proteína total pelo método Kjeldahl e determinação do pH. Determinação dos percentuais de celulose, hemicelulose e lignina (LAP, 2011).

Micro-organismos, obtenção de esporos e processo de fermentação em estado sólido (FES)

Foram selecionados dois fungos filamentosos, conhecidos como bons produtores de enzimas a partir de materiais lignocelulósicos, *Aspergillus oryzae* CCT nº0975 - ATCC 9362 e *Trichoderma reesei* CCT nº2768 - QM 9414. As cepas dos micro-organismos *Aspergillus* e *Trichoderma* foram adquiridas na coleção de culturas tropicais da Fundação André Tosello em Campinas-SP. Com o substrato farelo de trigo foi

realizado ensaio em FES. O processo de fermentação em estado sólido foi conduzido utilizando 12 g do substrato (farelo de trigo) nas diferentes condições de pré-tratamento. Nos ensaios, 12 g dos resíduos foram adicionados de 1,0 mL de cada pré-inóculo e foram incubados a 32°C por 168 h (SANTOS, 2007).

Análises para avaliação da obtenção da enzima, extração da enzima e determinação de proteínas

Na extração da enzima utilizou-se 5 g da amostra dos cultivos que foram lavados com 40 mL de solução tampão acetato de sódio 100 mM em pH 5,0. A extração ocorreu em banho-maria a 30°C por 30 min. Em seguida, centrifugou-se por 10 min a 30°C, filtrou-se e a solução filtrada foi armazenada a temperatura de 4°C. Na determinação de proteínas existentes no sobrenadante após extração utilizou-se o Método de Bradford (1976). Para determinação dos açúcares redutores utilizou-se uma modificação do método de DNS proposto inicialmente por Miller (1959). A leitura foi realizada em espectofotômetro (Thermospectronic Genesys 10 UV) a 540 nm.

Atividade enzimática e otimização das condições de cultivo

A metodologia utilizada foi a mesma descrita por Ghose (1987). Determinou-se concentração de açúcares redutores liberados, spectrofotometro/ Spectrophotometer (Termospectromic, Gensys 10 UV) durante a hidrólise da xilana 1% (*xylan from birch wood* - X0502), pré-incubada 10 min a 50°C em banho-maria (Nova instruments, NI1232). Definiu-se a atividade como a quantidade de enzima necessária para produzir 1,0 µmol de xilose/min, nas condições do ensaio. Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi realizado e permitiu avaliar a influência dos três fatores (variáveis independentes): pH do meio, granulometria e percentual de umidade na produção de xilanases por fermentação em estado sólido de farelo de trigo usando *A.oryzae*. Nesse caso, utilizou-se como resposta (variável dependente) a atividade xilanásica (UI/mL). Nesse delineamento a parte fatorial consistiu de 8 ensaios, com três repetições no ponto central e 6 pontos axiais, totalizando 17 ensaios (BARROS NETO, 2007) que, juntamente com a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), permitiu localizar o ponto ótimo de atividade. Os resultados do planejamento foram avaliados usando-se o *software Statistica* (v. 7.0 – Stasoft/ USA) que permitiu obter os modelos estatísticos. A Tabela 1 apresenta os fatores utilizados, sua codificação e os níveis estudados, no DCCR.

Identificação da enzima xilanase, ensaios de aplicação e eletroforese em gel de poliacrilamida (sds-page)

Preparado gel de poliacrilamida 30% (v/v); Tris-HCl 1,5M, em p H 8,8; Tris-HCl 0,5M, em p H 6,8; Duodecil Sulfato de Sódio 10% -SDS; Persulfato de Amônio 10%- APS) e armazenados sob refrigeração. As amostras foram diluídas em tampão de amostra1:1 perfazendo 100µL de solução, desnaturadas a 90ºC por 5 minutos em banho Maria (SMITHIES, 1955).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do resíduo de farelo de trigo e cultivos em estado sólido do farelo de trigo com variados micro-organismos e métodos de preparação do resíduo

Na análise dos valores referentes à umidade e granulometria do resíduo da produção de farinha de trigo, obteve-se umidade de 12,5%, e três granulometrias 600 µm, 1200 µm e uma granulometria mista de 900 µm como subprodutos já comercializados. O pH em média apresentou valores entre 6,0 e 7,0 indicando ser o farelo de trigo bom substrato para síntese de xilanases, pois o mesmo possui elevado teor de hemicelulose, com valor maior que 40% de hemicelulose. Observado que a partir das 96 horas de fermentação (4º dia) o pH começa a aumentar, tendendo à neutralização.

Delineamento composto central rotacional (DCCR)

A Figura 2 ilustra o DCCR. O fato de todos os efeitos principais dos fatores bem como as interações de segunda ordem mostrar valores significativos ratifica a complexidade da regulação da expressão gênica no cultivo em estado sólido.

Um modelo matemático foi proposto, conforme Equação (1), que

Tabela 1 – Delineamento Composto Central Rotacional: fatores e níveis do planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central e seis ensaios axiais com rotabilidade.

	Níveis Codificados				
Fatores/Codificação	(- = -1,682)	(-1)	0	(+1)	(+ = +1,682)
pH/X_1	3,32	4	5	6	6,68
Granulometria(µm)/X_2	395,46	600	900	1200	1404,54
Umidade (%)/X_3	23,18	30	40	50	56,81

$$AE = 0,049 - 0,3697X_1 + 0,0399X_2 + 0,0562X_3 + 0,3941X^2_1 + 0,0813X^2_2 - 0,0178X^2_3 - 0,1603\ X_1X_2 - 0,2843\ X_1X_3 + 0,1768\ X_2X_3. \quad \text{(Equação 1)}$$

Figura 2 - Superfície de resposta do DCCR da fermentação em estado sólido do farelo de trigo por *Aspergillus oryzae* à 32 ºC e granulometria 900µm - ponto central

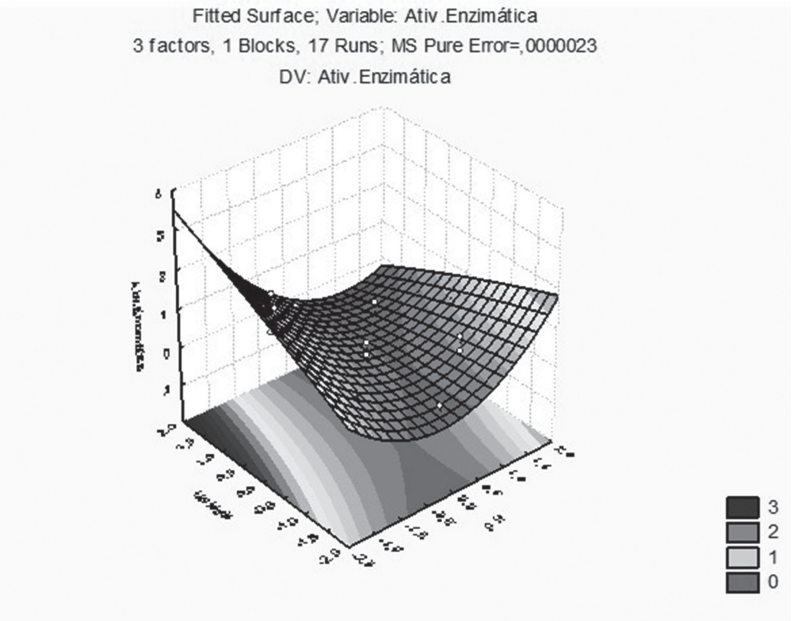
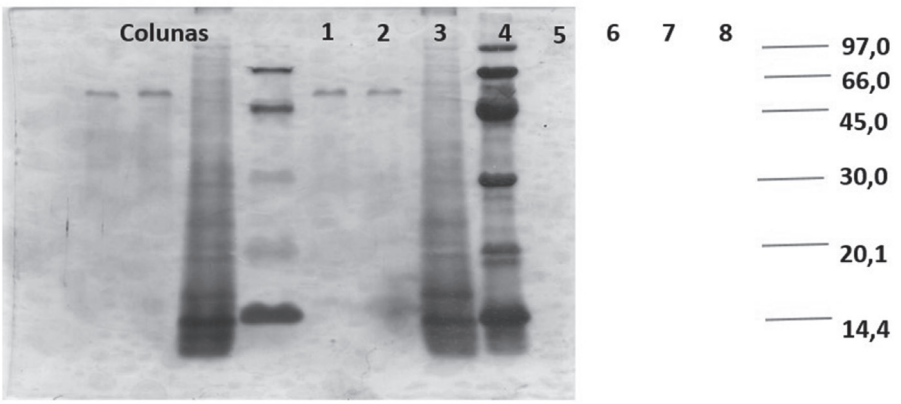


Figura 3 –Caracterização de proteínas no ensaio de FES do farelo de trigo por *Aspergillus oryzae.* O extrato da proteína é apresentado nas colunas 3 e 7, enzima comercial denominada Germix colunas 1,2,5 e 6. Traçadores indicam os padrões de massas moleculares: 97,0 KDa - Fosforilase; 66,0 KDa - Albumina; 45,0KDa – Ovalbumina carbônica; 30,0KDa – Anidrase; 20,1KDa – Inibidor de tripsina e 14,4KDa – - Lactalbumina.



permite predizer a atividade xilanásica obtida ao se utilizar como substrato farelo de trigo inoculado com *A. oryzae* CCT nº0975 - ATCC 9362 por FES nas condições otimizadas descritas neste experimento.

O modelo consegue explicar 86,7 % de toda variação em torno da média. A Figura 4 ilustra os valores preditos e os valores observados ao se utilizar esse modelo. Observa-se que, considerando a complexidade da FES, foi obtido um bom ajuste.

Eletroforese (SDS-PAGE)

Na Figura 3 apresenta-se a identificação das proteínas por eletroforese revelada em gel de poliacrilamida 30% e desnaturadas em SDS. O caldo obtido nesta pesquisa apresentou imagens em várias bandas protéicas, logo não purificado. Sendo mais intensa na região do extrato de massas molecular 14,4KDa que se refere à representação do padrão da α-Lactalbumina (TITANI et al., 1977).

CONCLUSÃO

O DCCR utilizado para otimizar a produção de xilanases usando farelo de trigo como substrato e *A. oryzae* CCT nº 0975 (ATCC9362) cultivado em fermentação em estado sólido, mostrou que todos os parâmetros estudados: pH, umidade e granulometria, foram considerados significativos com 95% de confiança. O pH do cultivo foi o parâmetro que mais influenciou a atividade da enzima e sua redução favorece o processo. A atividade enzimática da xilanase de 4,54 UI/mL foi obtida em condição otimizada de pH 3,3, granulometria de 900,0 μm e umidade de 40%.

O caldo produzido apresentou-se estável por 3 meses, mantendo-se aproximadamente 50% da atividade da xilanase inicial após 6 meses de armazenagem. O extrato enzimático adicionado a farinha padrão realizou alterações de parâmetros reológicos da farinha *falling number* e alveografia ao ponto de reclassificá-la na tipificação da área de alimentos de farinha para massas para farinha adequada à panificação.

REFERÊNCIAS

BARROS NETO, B. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**.3º edição, Campinas, SP: Editora da Unicamp, p.480. 2007

BRADFORD, MM. A Rapide and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, **Anal. Biochem**. n.72, p.248-255. 1976.

CARVALHO, W; SILVA, JB. Caracterização do hidrolisado de palha de trigo visando extração da xilose para bioconversão em xilitol. VII encontro Latino Americano de Iniciação Científica. Faculdade de Eng. Química de Lorena, Departamento de biotecnologia. São Paulo. p.1221-1224. 2002.

GHOSE, TK. Measurement of cellulose activities. 1987. Pure Appl Chem, n.59, p.257-268.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físicos-químicos para análise de alimentos, Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**.14. ed. Brasília: Ed. MS. 2005.

LAP, Laboratory Analytical procedure. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, and D. Crocker. Version 07/08/2011.

MACIEL, GM. **Desenvolvimento de bioprocessos para produção de xilanases por fermentação n estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. Dissertação de mestrado na área de processos biotecnológicos Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006.

MILLER, GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem**. n.31, p.426-428. 1959.

SANTOS, SFM. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Tese doutorado. Programa de pós graduação em engenharia Química – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN. 2007.

SCHMIDELL, W; BORZANI, W; LIMA, U. de A. e AQUARONE, E. Biotecnologia industrial – Engenharia bioquímica. São Paulo: Editora Blucher, p.541. 2001.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels. Biochem.J. v.61, p.629-641. 1955.

XIONG, H. **Production and characterization of Trichoderma reesei and Thermomyces lanuginosus xylanases.** Espoo, Helsinki University of Technology. 2004.