

Relatório final de Iniciação à Pesquisa

Discente: 201210015200 - Brenda Leite Moutinho

Orientador: ROBERTA PEREIRA MIRANDA FERNANDES

Título do Plano de Trabalho: Uso da fermentação em estado sólido com resíduos agroindustriais para produção de xilanases.

Projeto: PVA4064-2016 - Uso da fermentação submersa e em estado sólido com resíduos agroindustriais para produção de xilanases extracelulares por *Bacillus sp.*

RESUMO

As xilanases possuem importância industrial devido a suas diversas aplicações, como nas indústrias de alimento, de papel e farmacêutica, contudo a produção dessas enzimas atualmente utiliza substratos de custo elevado, uma vez que foi estimado que mais de 30% do custo de produção de enzimas industriais é contabilizado pelo custo do substrato (Joo & Chang, 2005). O presente estudo teve como objetivo otimizar a produção de xilanases extracelulares pelo isolado *Bacillus* TC13 utilizando a fermentação sólida com trigo acrescido de fontes de carbono e nitrogênio, visando a redução do custo de produção da enzima. Em outro plano de trabalho, o trigo foi selecionado como resíduo agro industrial com maior indução na produção de xilanases. Nesse projeto, a utilização do trigo como substrato único na proporção de 1:4 de umidade, no tempo de 192 horas resultou em maior produção das xilanases sem necessidade de acréscimo de outras fontes de carbono e nitrogênio, uma vez que essas não provocaram aumento na produção enzimática. Dessa forma o custo para a fermentação e produção de xilanase pode ser reduzido uma vez que esse resíduo é de menor valor que a xilana pura.

PALAVRAS-CHAVE: produção enzimática, xilanase, açúcar redutor.

INTRODUÇÃO

A xilana é o principal componente da hemicelulose que, junto com a celulose, compõem a parede celular nas plantas terrestres (Thomas et al., 2013). Esses açúcares podem ser encontrados entrelaçados à lignina através de ligações covalentes (Pérez, 2002).

Diversos microorganismos, como os fungos, bactérias, leveduras, podem produzir enzimas que realizam a hidrólise completa da xilana, tais como as endo- β -1,4-D-xilanase (Juturu et al 2012). Determinadas espécies de *Bacillus* possuem acentuado potencial para a produção de xilanase, os quais são *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*,

Bacillus licheniformis, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* (Roy N & Rowshanul Habib M 2009; Reitinger et al., 2010 Bajaj et al, 2012; Tarayere et al., 2013; Banka et al., 2014).

As xilanases possuem importância industrial devido a suas diversas aplicações, como nas indústrias de alimento, de papel e farmacêutica, contudo a produção dessas enzimas atualmente utiliza substratos de custo elevado, uma vez que foi estimado que mais de 30% do custo de produção de enzimas industriais é contabilizado pelo custo do substrato (Joo & Chang, 2005).

Por isso, é necessário explorar substratos de menor custo para a produção, assim melhorando o custo benefício. Os resíduos agrícolas podem ser uma alternativa, pois, os mesmos apresentam matéria-prima de baixo custo para a produção de enzimas em escala industrial, e estes podem não somente servir como substratos econômicos, mas também podem oferecer vantagens estratégicas e ambientais (Geetha & Gunasekaran, 2010; Bajaj and Wani, 2011). Entretanto, a utilização efetiva destes materiais na produção de enzimas, biocombustíveis e outros metabólitos necessitam de mais estudos (Poorna & Prema, 2006).

Vários estudos reportam a produção de xilanases através da fermentação submersa utilizando bactérias, porém há poucos estudos com a produção eficaz desta enzima utilizando bactérias através da fermentação sólida (Hashemi et al 2010; Singh et al 2010; UR REHMAN et al 2012; Panwar et al 2014; El-Shishtawy et al 2014). O uso da fermentação sólida na produção de enzimas tem várias vantagens, incluindo a facilidade de recuperação dos produtos formados, a ausência de formação de espuma e pequenas reações, como também permite a utilização de resíduos agroindustriais como substratos (Lonsane & Ramesh, 1990; Pandey, 1992).

Portanto, o objetivo desse estudo foi e otimizar a produção de xilanases extracelulares pelo *Bacillus sp.* TC-DT13 em fermentação sólida utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono, para a diminuição do custo da produção desta enzima.

OBJETIVOS

➤ Geral

* Otimizar a produção de xilanases extracelulares pelo isolado *Bacillus* TC13 utilizando a fermentação submersa e sólida com resíduos agroindustriais

➤ Específicos

* Avaliar a produção de xilanases extracelulares pelo isolado *Bacillus* TC13 na fermentação em estado sólido com resíduos agroindustriais como substrato;

* Otimizar a produção de xilanases com o resíduo que resultar na maior produção dessas enzimas pela variação na umidade do substrato e adição de diferentes fontes de nitrogênio e carbono no meio de cultura.

METODOLOGIA

➤ Produção Enzimática

O isolado bacteriano TC-DT13, pertencente ao gênero *Bacillus* foi inoculado em meio basal líquido (MLB) composto por 0,3% de extrato de carne, 0,5% de NaCl, 0,2% de KNO₃, 0,1% de K₂HPO₄, E 0,05% de MgSO₄.7H₂O e xilana 1% como única fonte de carbono. A bactéria foi inicialmente pré-inoculada em Erlenmeyers de 50 ml contendo 10 ml de meio MLB com 1,0% de xilana e incubado a 32 °C/150 rpm até a observação do início da turvação do meio, com 0,5 de densidade ótica. Após turvação, 200 µL do pré-inóculo foi inoculado em Erlenmeyers de 50 ml contendo 20 ml de MLB com 1,0% de xilana e incubados a 32 °C/150 rpm por 48 horas. Durante o período de incubação foram realizadas coletas periódicas de 6, 12, 24, e 48 horas. Após esse período as culturas foram centrifugadas, para separação das células, 14000 g/10 min/ 4° C e mantidas em temperatura de -20 °C até o momento da análise das xilanases.

➤ Ensaio enzimático e determinação da concentração de proteínas totais

A atividade enzimática foi determinada de acordo o método do ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS). Nesta metodologia os açúcares redutores formados durante a incubação dos extratos na presença de xilana foram dosados. Utilizando-se uma alíquota de 10µL do extrato em 90µL de tampão acetato 100 mM com xilana (pH 6,0), incubados à 50 °C por 15 min. Após período de incubação a reação foi parada com adição do DNS e aquecida à 100 °C por 5 min. A formação de açúcares redutores foi quantificada colorimetricamente (em espectrofotômetro $\lambda=540$ nm) utilizando-se placas de 96 poços. Uma unidade (U) da atividade da xilanase foi definida como a quantidade de enzimas necessárias para liberar 1 µmol de xilose por minuto sob as condições mencionadas acima. Para a curva padrão foi utilizada a glicose. Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

➤ Produção de xilanase utilizando resíduos Agroindustriais

O extrato bruto proteico foi obtido conforme descrito anteriormente substituindo-se a xilana do meio de cultura pelos resíduos agroindustriais (fibra de trigo, farelo de arroz, farelo de aveia e extrato de soja). A atividade de xilanase nesses extratos foi determinada pelo método descrito anteriormente (utilizando DNS).

➤ Fermentação sólida

Para a fermentação sólida, foi utilizado o resíduo agrícola selecionado por induzir a maior produção xilanolítica em fermentação submersa. O resíduo foi previamente

esterelizados em autoclave por 20 minutos a 121° C. O *Bacillus* sp TC-DT13 foi inoculado em Erlenmeyers de 50 ml contendo 5 g do respectivo resíduo previamente esterilizado e ajustado a umidade com a quantidade de água apropriada, para se obter 10 % de umidade. Foi realizado o pré-inóculo com *Bacillus* sp TC-DT13 em Erlenmeyers de 50 ml contendo 10 ml MLB com 1% do respectivo resíduos, o qual será incubado a 32 °C/150 rpm até a observação do início da turvação do meio, com 0,5 de densidade ótica. Após turvação, 500 µL do pré-inóculo será inoculado em Erlenmeyers de 125 ml contendo 5 g do respectivo resíduo, incubado a 32 °C em estufa bacteriológica por 144h. Durante o período de incubação foram realizadas coletas periódicas de 48, 72, 96, 120 e 144 horas.

➤ Extração enzimática

A extração foi obtida através da mistura do substrato fermentado com 50 mL de água destilada previamente esterilizada e homogeneização. A suspensão foi centrifugada a 12000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi designado como o extrato bruto, o qual foi o utilizado para avaliação da atividade enzimática.

➤ Otimização da fermentação sólida

O resíduo selecionado como o maior indutor de produção de xilanase foi utilizado e testado otimizando-se a fermentação sólida, onde foi realizada fermentação em estado sólido com diferentes umidades em proporções de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5. Utilização de uma solução de sais (0,04g/L de $MgSO_4(H_2O)_7$ e 0,2g/L de K_2PO_4) para umedecer o resíduo. O procedimento será realizado como descrito anteriormente

➤ Influência da suplementação aditiva de fonte de carbono e nitrogênio, e tempo de fermentação

Foi avaliado e investigado o efeito da suplementação de determinadas fontes de nitrogênio no meio de cultura, como o extrato de levedura, ureia, nitrato de sódio, sulfato de amônia e cloreto de amônia a 1% como também várias fontes de carbono, como glicose, sacarose, maltose e lactose.

A produção de xilanases será avaliada após combinação da fonte de carbono e de nitrogênio, que resultarem em maior produção de xilanases, ao resíduo agroindustrial por 240h com coletas da cada 48h.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O trigo foi selecionado como resíduo agro-industrial responsável por induzir a maior produção xilanolítica em fermentação submersa (resultado encontrado em outro plano de trabalho). Dessa forma todos os experimentos em fermentação sólida foram realizados com esse resíduo.

Após ajustes na metodologia da fermentação sólida e extração das enzimas após a fermentação, o efeito de diferentes proporções de umidade do farelo de trigo foi avaliado. Foi possível observar melhora crescente na produção de xilanases com as proporções de 1:1 a 1:4, seguida por um decréscimo na produção observada na proporção 1:5. Sendo assim a proporção 1:4, ou seja, 5 gramas de substrato para 20 mililitros, foi determinada como a mais eficiente para a produção de xilanases, (Figura 1). Também pode-se observar a diferença entre a produção de xilanases quando o trigo foi umedecido o meio com água ou solução de sais. As três primeiras proporções de umidade (1:1, 1:2 e 1:3) utilizando água tiveram melhor resultado que a solução de sais, entretanto, nas duas últimas proporções (1:4 e 1:5), a solução de sais obteve melhor resultado que a água, principalmente em 1:5 (figura 1).

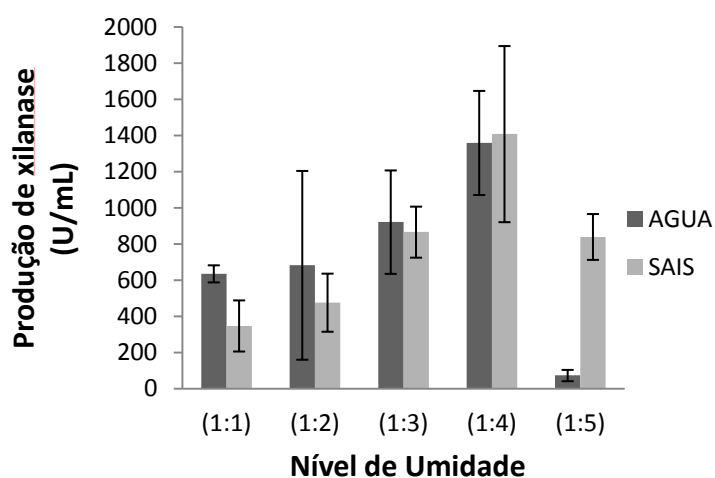


Figura 1: Produção de xilanases em U/mL por fermentação sólida utilizando água e solução de sais em diferentes proporções.

Também foi possível observar que a produção de xilanases aumenta com o tempo de incubação (Figura 2), contradizendo Bajaj (2012) que encontrou um pico de produção em 72 horas utilizando o microrganismo *Bacillus licheniformis* P11(C).

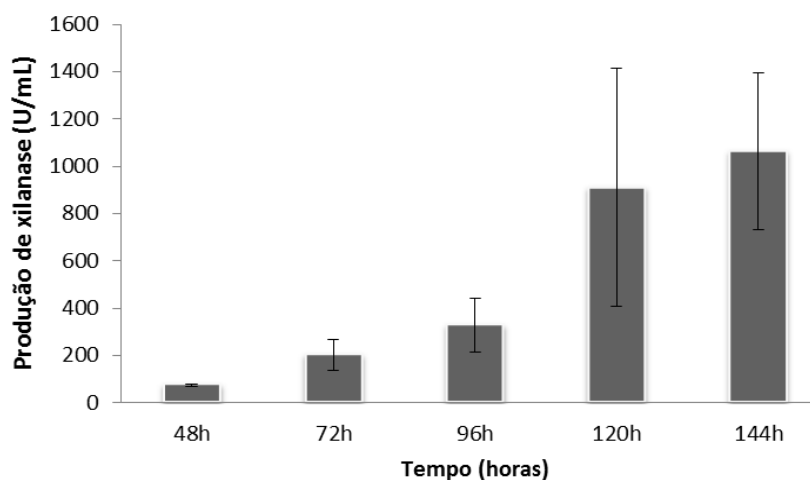


Figura 2: Produção de xilanases (U/mL) em fermentação sólida com trigo e solução de sais (1:4) em função do tempo.

A adição de diferentes fontes de nitrogênio adicionada ao trigo foi avaliada. Dentre as fontes de nitrogênio testadas, pode-se observar que a ureia obteve o melhor resultado, enquanto que com adição de nitrato de sódio a produção de xilanases foi inibida (Figura 3).

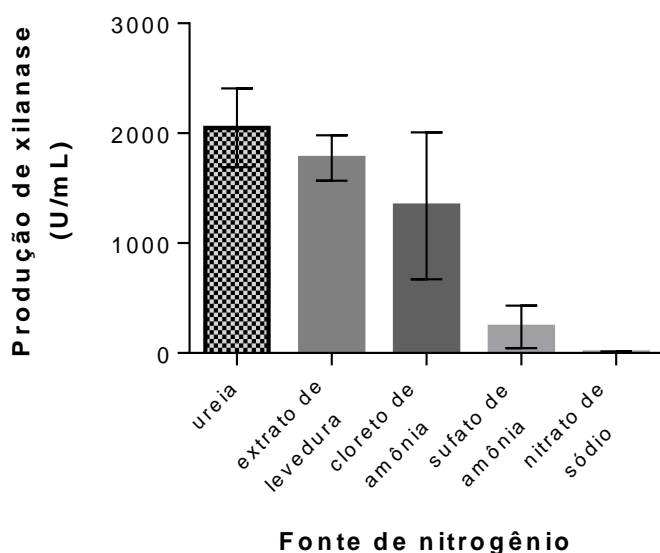


Figura 3: Gráfico da produção de xilanases (U/mL) por fermentação sólida com trigo e solução (1:4) adicionada de em diferentes fontes de nitrogênio.

Com relação à adição de outras fontes de carbono a fermentação, observou-se que a maltose obteve o melhor resultado, por apresentar produção de xilanases (Figura 4).

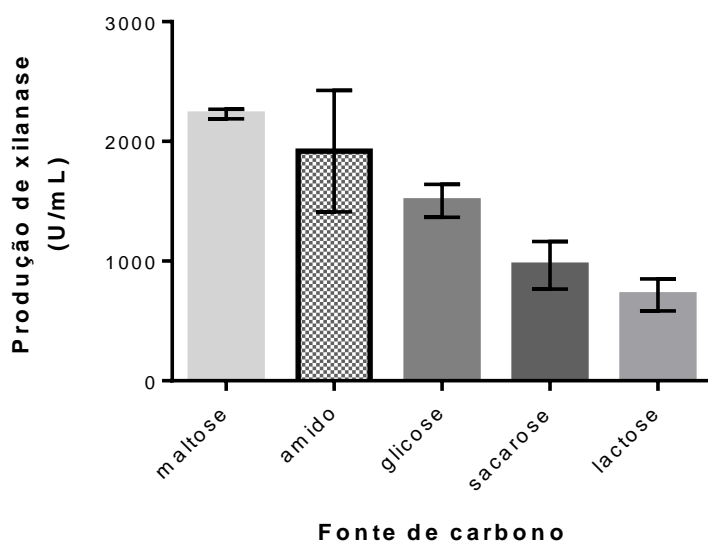


Figura 4: Produção de xilanases (U/mL) por fermentação sólida com trigo e solução (1:4) adicionada de diferentes fontes de carbono.

Foram selecionadas as duas melhores fontes, uma de carbono e outra de nitrogênio, para realização de experimentos com as fontes combinadas. O próximo gráfico apresenta os dados comparativos da produção de xilanases por tempo em diferentes combinações de substratos (Figura 5).

Pode-se observar que a produção de xilanases aumenta até o tempo 192 horas ($1548,3 \pm 342,0$ U/mL), em seguida decai, como mostra o gráfico a seguir (Figura 5), diferentemente de Bajaj (2012), que encontrou um pico de produção a 72 horas (29.7 IU/mL), não diferindo estatisticamente da produção em 48 e 96 horas, encontrando o decaimento na produção a partir das 120 horas.

Também pode-se perceber que a maltose não aumentou a produção de xilanases, quando comparadas com somente o trigo, isso ocorre devido a inibição na produção de xilanases pela glicose, uma vez que a maltose pode ser degradada em glicose.

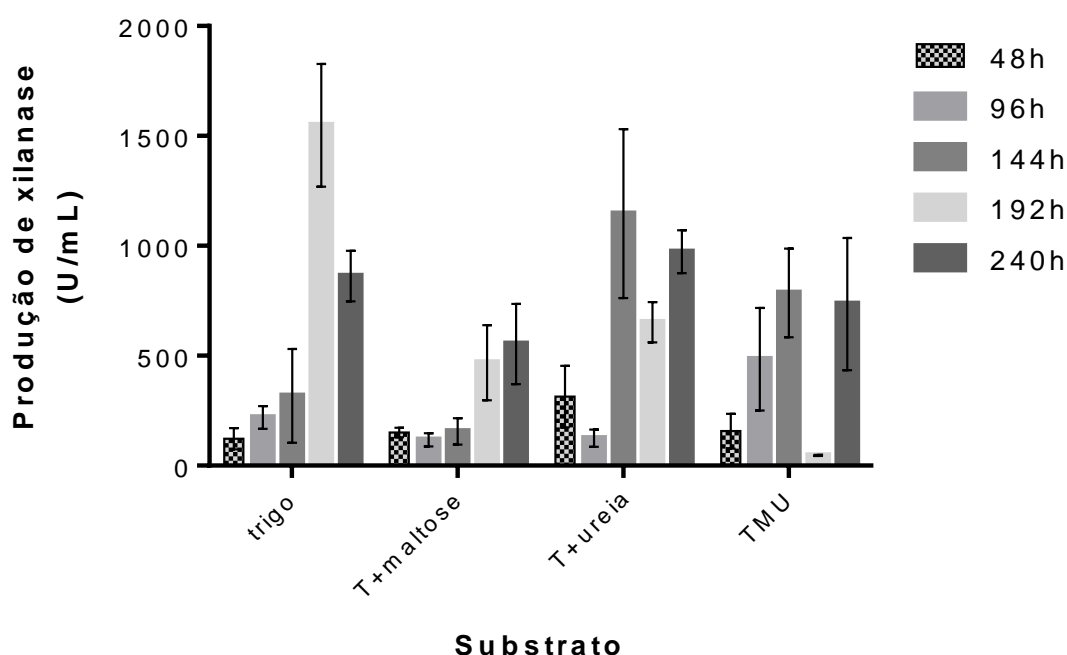


Figura 5: Produção de xilanase (U/mL) em diferentes substratos: trigo(5g); T+maltose = 5g de trigo e 1% de maltose; T+ureia = 5g de trigo e 1% de ureia; TMU = 5g de trigo, 1% de maltose e 1% de ureia; em função do tempo.

CONCLUSÕES

De acordo com o que foi exposto, conclui-se que a utilização do trigo como único substrato umedecido com solução de sais, na proporção de 1:4, e no tempo de

fermentação de 192 horas, aumenta a produção da enzima e reduz o custo para essa fermentação. Pode-se também observar que o acréscimo de fontes de carbono diminuiu a produção de xilanases, enquanto que o acréscimo de fontes de nitrogênio não aumentou a produção.

PESPECTIVAS

Para melhorar a comparação dos dados e comprovação dos resultados, serão realizadas análises estatística.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAJAJ, K.B.; MANHAS, K. Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry. **Biocatalysis and Agricultura Biotechnology**. V. 1, 330-337, 2012.

BAJAJ, K. B.; WANI, M. A.; Enhanced production of a phytase with potentially suitable attributes for animal feed application from *Nocardia* sp. MB 36 by employing agro-residues as substrates. **Engin Life Sci**. 2011, 11: 620–628.

BANKA, A.L.; GURALP, S.A.; GULARI, E. Secretory Expression and Characterization of Two Hemicellulases, Xylanase, and β -Xylosidase, Isolated from *Bacillus Subtilis* M015. **Applied Biochemistry Biotechnology**. V. 174, 2702–2710, 2014.

EL-SHISHTAWY, M. R.; MOHAMED, A. S.; ASIRI, M. A.; GOMAA, M. A.; IBRAHIM HI, AL-TALHI HA. Solid fermentation of wheat bran for hydrolytic enzymes production and saccharification content by a local isolate *Bacillus megatherium*. **BMC Biotechnol**. 2014, 14:29.

GEETHA, K.; GUNASEKARAN, P.; Optimisation of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Bacillus pumilus* B20. **Biotechnol Bioprocess Eng**. 2010, 15: 882–889.

HASHEMI, M.; RAZAVI, S. H.; SHOJAOSADATI, S. A.; MOUSAVI, S. M.; KHAJEH, K.; SAFARI, M.; Development of a solid-state fermentation process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties. **J Biosci Bioeng**. 2010, 110: 333–337.

JOO, H. S.; CHANG, C. S.; Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp.I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochem**. 2005, 40:1263–1270.

JUTURU, V.; WU, C. J.; Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnol Advanc**. 2012, 30: 1220-1221.

LONSANE, B. K.; RAMESH, M. V.; Production of bacterial thermostable α -amylase by solid-state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. **Adv in Appl Microbiol.** 1990, 35: 1–56.

PANDEY, A.; Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochem** 1992,27: 109–117.

PANWAR, D.; SRIVASTAVA, P. K.; KAPOOR, M.; Production, extraction and characterization of alkaline xylanase from *Bacillus* sp. PKD-9 with potential for poultry feed. **Biocatal and Agricul Biotechnol.** 2014, 3: 118–125.

PEREZ, J.; MUNOZ-DOURADO, J.; DE LA RUBIA, T. E MARTINEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology.** V. 5, 53-63, 2002.

POORNA, A.C.; PREMA, P.; Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. **Biochem Eng. J** 2006, 32: 106-112.

REITINGER, S.; YU, Y.; WICKI, J.; LUDWICZEK, M.; D'ANGELO, I.; BATURIN, S.; OKON, M.; STRYNADKA, N.C.J.; LUTZ, S.; WITHERS, G.S; MCINTOSH, P.L. Circular Permutation of *Bacillus circulans* Xylanase: A Kinetic and Structural Study. **Biochemistry.** V. 49, 2464–2474, 2010.

ROY, N.; M. ROWSHANUL HABIB. Isolation and characterization of Xylanase producing strain *Bacillus cereus* from soil. **Iranian Journal of Microbiology.** V. 1(2), 48-53, 2009.

SINGH, R. K.; MISHRA, S. K.; KUMAR, N.; Optimization of α -amylase production on agriculture byproduct by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid state fermentation. **The Resear J of Pharmaceut, Biolog and Chem Scien.** 2010, 1: 867–876.

TARAYRE, C.; BROGNAUX, A.; BRASSEUR, C.; BAUWENS, J.; MILLET, C.; MATTÉOTTI, C.; DESTAIN, J.; VANDENBOL, M.; PORTELLE, D; PAUW, E.; HAUBRUGE, E.; FRANCIS, F.; THONART, P. Isolation and cultivation of xylanolytic *Bacillus subtilis* extracted from the gut of the termite *Reticulitermes santonensis*. **Applied Biochemistry Biotechnology.** V. 171, 225-245, 2013.

THOMAS, L.; JOSEPH, A.; ARUMUGAM, M.; PANDEY, A. Production, purification, characterization and over-expression of xylanases form actinomycetes. **Indian Journal of Experimental Biology.** V. 51, 875-884, 2013.

UR REHMAN, H.; QADER, S. A. U.; AMAN, A.; Polygalacturonase: production of pectin depolymerising enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21. **Carbohydr Polym** 2012, 90: 387–391.

OUTRAS ATIVIDADES

A aluna está participando ativamente de outro projeto de pesquisa visando avaliar atividade leishmanicida do óleo essencial da erva-baleira (*Varronia curassavica*) sobre promastigotas de *Leishmania amazonensis*.