

## PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DA PALMA DOCE (*NOPALEA COCCINELLIFERA*) UTILIZANDO MODELOS ESTATÍSTICOS SIGNIFICATIVOS

**Tamires Carvalho<sup>1</sup>, George Abreu Filho<sup>2</sup>, Clissiane Soares Viana Pacheco<sup>3</sup>,  
Alexsandra Nascimento Ferreira<sup>4</sup>, Thiago José Onório Rocha<sup>5</sup> e Marcelo  
Franco<sup>6</sup>**

**Resumo:** As enzimas microbianas são um dos produtos biotecnológicos mais utilizados nas últimas décadas, sendo produzidas por uma grande variedade de micro-organismos e substratos de diversas origens. Foram realizados estudos para a produção de enzimas lignocelulósicas por fermentação da palma doce (*Nopalea coccinellifera*) em estado sólido através do fungo filamentoso *Aspergillus niger*. As fermentações sólidas foram realizadas em Erlenmeyers contendo 10 g de farelo de palma, ao qual foi adicionada uma suspensão contendo  $10^8$  esporos por grama de substrato. Foram adicionados volumes de água estéril até o valor de teor de água atingir 85% m/m o que equivale a uma atividade de água aproximada de 0,985. Os cultivos foram conduzidos a 30°C em estufa bacteriológica. A maximização da produção das enzimas CMCase, FPase, Xilanase, Lacase, Peroxidase e Mn Peroxidase segundo o ajuste estatístico matemático, foram 4,66 U/mL, 7,03U/mL, 19,71 U/mL, 1,25  $\times 10^{13}$  UI/L, 2,71  $\times 10^{13}$  UI/L, 9,78  $\times 10^{12}$  UI/L respectivamente. Durante os processos fermentativos o fungo sintetizou e excretou a enzima sem a necessidade de qualquer outro indutor além da palma doce e água, demonstrando a viabilidade de utilização da palma doce como matéria-prima para o bioprocesso.

**Palavras-chave:** Fungo. *Aspergillus Níger*. Enzimas. *Nopalea Coccinellifera*. Biotransformação.

### 1 Introdução

A palma doce ou forrageira (*Nopalea coccinellifera*) é uma cactácea de origem mexicana, rústica, resistente e adaptada a regiões secas. No semiárido brasileiro, essa forrageira é aplicada nos diversos sistemas de produção pecuário, no entanto, é uma planta de enorme potencial produtivo e de múltiplas utilidades, podendo ser usada na alimentação humana, na produção de medicamentos, cosméticos e corantes, na conservação e recuperação de solos, como cercas vivas e paisagismo. Sua composição química relativa possui alto valor de nutrientes digestíveis totais. Os níveis de carboidratos solúveis também são elevados, bem como os teores de cinza, vitaminas e ferro, devendo serem destacados os teores

de cálcio (3%); potássio (2,5%) e fósforo (0,15%) (CHIACCHIO; MESQUITA; SANTOS, 2006), além de baixos teores de matéria seca ( $11,69 \pm 2,56\%$ ), proteína bruta ( $4,81 \pm 1,16\%$ ), fibra em detergente neutro ( $26,79 \pm 5,07\%$ ) e fibra em detergente ácido ( $18,85 \pm 3,17\%$ ) (SANTOS et al., 2011a).

Essa planta é resistente à seca, sobrevivendo com pluviosidade mínima, e é amplamente difundida na região semiárida da Bahia, onde residem 48% da população estadual. O semiárido é caracterizado por solos rasos, pedregosos ou arenosos e com pouca matéria orgânica. As precipitações pluviométricas são irregulares.

A cobertura vegetal é constituída por plantas que suportam longos períodos de estiagem (CHIACCHIO; MESQUITA; SANTOS, 2006). Devido à sua composição

<sup>1</sup> E-mail: tamicarvalhods@gmail.com

<sup>2</sup> E-mail: georgeabreu16@hotmail.com

<sup>3</sup> E-mail: clissianesoares@hotmail.com

<sup>4</sup> E-mail: alexandraquimica@hotmail.com

<sup>5</sup> E-mail: tfor. maf@gmail.com

<sup>6</sup> E-mail: marcelofranco@pq.cnpq.br

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB Campus de Itapetinga: BR 415, KM 03, S/Nº - Laboratório de Resíduos Agroindustriais (LABRA/CDETEC). CEP.: 45700-000 - Itapetinga, BA - Brasil.

essa biomassa vegetal apresenta potencial biotecnológico para a produção de compostos de interesse industrial como bioetanol, glicose, proteínas, enzimas e compostos de aroma, entre outros (SOCCOL; VANDENBERGHE; MEDEIROS, 2010).

Dentre esses biocompostos, as enzimas são aplicadas em diversos processos industriais. Esse setor apresenta muitas iniciativas de pesquisa e desenvolvimento, resultando na produção de diversos produtos, além de melhoramento dos processos e do desempenho já existentes no mercado. No entanto, o custo dessas enzimas é o que limita sua aplicação em grande escala. Reduzir os custos de produção é fundamental para ampliar essa aplicação (PARK; KAWAGUCHI; SUMITANI, 2005). Nesse sentido estudar a aplicação da palma forrageira como matéria-prima para bioprocessos, pode viabilizar essa aplicação (PANDEY et al., 2005; ARAÚJO et al., 2008; GHORAI; BANIK; VERMA, 2009).

O mercado global de enzimas movimentou aproximadamente US\$ 5,1 bilhões em 2008 e a projeção estimada para 2013 é de US\$ 7 bilhões. As pesquisas envolvem a otimização do processo e a produção de enzimas com potencial industrial visando à diversificação do comércio mundial (MENDES et al. 2011).

O objetivo deste trabalho foi investigar a utilização da palma doce (*Nopalea cochenillifera*) como matéria prima para a produção de enzimas ligninocelulolíticas através do processo de fermentação em estado sólido com *Aspergillus niger*.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Material

A amostra foi coletada no campo agrostológico da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus de Itapetinga. Após a higienização e corte, amostras de palma foram secas em estufa a 70 °C por 24 horas e trituradas em moinho tipo Willey para se obter uma granulometria de aproximadamente 2 mm.

O micro-organismo utilizado para produção enzimática foi *Aspergillus niger*, proveniente do Laboratório de Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais (LABRA-UESB). A espécie fúngica foi inoculada em Batata Dextrose Ágar (pH

5,02). Foi preparada uma suspensão de esporos em solução de Tween 80 a 0,01%, na qual a contagem do número de esporos em suspensão foi efetuada utilizando câmara de Neubauer com auxílio do microscópio binocular (BIOVAL L1000) de acordo com a metodologia descrita por Santos et al. (2011a).

### 2.2 Fermentação em estado sólido

As fermentações sólidas foram realizadas em Erlenmeyers contendo 10 g de farelo de palma, ao qual foi adicionada uma suspensão contendo  $10^8$  esporos por grama de substrato. Foram adicionados volumes de água estéril até o valor de teor de água atingir 85% m/m o que equivale a uma atividade de água aproximada de 0,985. A umidade inicial do resíduo depois de seco foi quantificada a 2% m/m em determinador de umidade infravermelho (MARTE ID200). Os cultivos foram conduzidos a 30 °C em estufa bacteriológica (SL 101 SOLAB) Após o processo fermentativo foi feita a extração mecânica do extrato enzimático por meio de filtração com solução tampão de citrato de sódio 50 mM (pH 4,8). O extrato enzimático proveniente da fermentação foi recolhido e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos em centrifuga (CETRIBIO 80-2B).

A otimização da produção de enzimas foi realizada analisando a variação do tempo de fermentação (24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h), com três repetições amostrais. A análise de variância (ANOVA) para os modelos foi realizada e a importância do modelo foi examinada pelo teste estatístico de Fisher (teste F) e  $P < 0,01$ . O software estatístico utilizado foi o Statistical Analysis System® (SAS) versão 8.0, para elaboração dos gráficos foi utilizado o software Sigma Plot® versão 11.0.

### 2.3 Determinação da CMCase (endoglucanase - EC 3.2.1.4)

A atividade da enzima CMCase, foi quantificada por meio da dosagem dos açúcares redutores produzidos pela degradação de carboximetilcelulose (CMC) a 2 % p/v, diluída em citrato de sódio, No controle da reação foram adicionados 0,5 mL da solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático. O branco da análise continha 0,5 mL de solução de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) solução de 0,5 mL de

solução tampão. Todas as amostras foram incubadas em estufa bacteriológica a 50 °C por 10 minutos. A seguir, as reações foram interrompidas com a adição de 0,5 mL da solução de DNS. Os tubos foram submersos em água fervente por 5 minutos, logo após foram adicionados 6,5 mL de água destilada para posterior medição de absorbância na faixa de 540 nm realizada em espectrofotômetro (GHOSE, 1987).

#### **2.4 Determinação da FPase (complexo endoglucanase - EC 3.2.1.4 e exoglucanase EC 3.2.1.91)**

A atividade FPase foi determinada por meio da dosagem dos açúcares redutores liberados durante a degradação, em uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 medindo 1,0 x 6,0 cm. Foram adicionados 1,0 mL de solução tampão de citrato de sódio com pH 4,8 (50 mM), 0,5 mL de extrato enzimático e uma tira de papel filtro. No controle da reação foram adicionados 1,0 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático, enquanto que no controle do substrato foram adicionados 1,5 mL de solução tampão e uma tira de papel filtro. Após 1 hora de incubação em estufa foram adicionados 3 mL de solução de DNS aos tubos reações e controles, com posterior fervura em banho-maria (GHOSE, 1987).

#### **2.5 Determinação da Xilanase (endoxylanase; EC 3.2.1.8)**

A atividade da enzima xilanase foi determinada segundo Miller (1959), através da reação de uma mistura contendo 1,0 mL de sobrenadante da cultura (extrato enzimático), 1,0 mL de solução de 1% de xilana em 0,05 mL de tampão acetato pH 5,0, e 2 mL da solução de DNS. A mistura foi incubada à 50°C por 30 minutos, e o sistema enzima-substrato foi agitado periodicamente para manter a xilana em suspensão. As leituras das absorbâncias de cada ensaio foram realizadas a 550 nm (GOKHALE, 1986).

#### **2.6 Determinação de CMCase, FPase e Xilanase**

A curva padrão para a CMCase e a FPase foi construída a partir da

determinação de glicose nas concentrações de 0,1 a 2,0 g/L pelo método do DNS (MILLER, 1959). Para a Xilanase a curva foi construída a partir da determinação de 0,1 a 2 g/L de xilose produzida por minuto. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores por minuto a 50 °C, sendo a atividade enzimática expressa em U/mL. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm para a CMCase e FPase e em 550 nm para a Xilanase.

#### **2.7 Determinação da Lacase (E.C. 1.10.3.2)**

A atividade de lacases foi determinada utilizando-se como substrato 0,1 mL de uma solução etanólica de siringaldazina (4-hidroxi-3,5-azino-metoxibenzoídeo) (SZKLARZ; ANTIBUS; SINSABAUGH, 1989) em concentração de 1 mM. A reação de oxidação foi conduzida em 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 50 mM e pH 5,0, 0,1 mL de água e 0,5 mL de extrato. A reação foi quantificada após 10 minutos através da leitura da absorbância em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV) no comprimento de onda de 525 nm. A atividade enzimática foi calculada com base na absorvidade molar dos substratos oxidados ( $\epsilon_{525} = 65.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### **2.8 Determinação da Peroxidase (E.C. 1.11.1.7)**

A atividade da peroxidase foi realizada segundo a metodologia descrita por Archibald (1992). Foram utilizados dois tubos de ensaios, um para a amostra não fervida e outro para a amostra fervida. Foi adicionado em cada tubo 0,6 mL da amostra a ser analisada e 0,2 mL do tampão citrato-fosfato, 0,1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Um tubo foi fervido durante 10 minutos (controle) e depois retirado e resfriado. O tempo inicial (zero) foi determinado como a medição da absorbância no momento em que se adiciona 0,1 mL de siringadalzina. Depois foi feita outra medição no tempo final após 10 minutos. De cada tubo, contendo as amostras fervidas e não fervidas, foram retiradas alíquotas de 1,0 mL que foram medidas no comprimento de onda 460 nm ( $\epsilon_{460} = 29400 \text{ L. M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### 2.9 Determinação da Manganês Peroxidase (MnP; E.C. 1.11.1.13)

A atividade da MnP foi realizada segundo Anastasi, Coppola e Prigione (2009). A manganês peroxidase foi determinada através da oxidação de 0,5 mL de vermelho de fenol 0,1 % em 1,25 mL de tampão succinato de sódio 20 mM (pH 4,5), 1,5 mL de lactato de sódio 50 mM, 0,5 mL de albumina 1%, 0,5 mL de MnSO<sub>4</sub> 1 mM, 0,5 mL de extrato e 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM. Após 10 minutos de reação, 1 mL da mistura contida no tubo de ensaio foi removida e a esse volume foi feita a adição de 30 µL de hidróxido de sódio 6,5 M para interromper a reação e realizar a leitura no espectrofotômetro. A cinética da reação foi avaliada medindo-se a absorbância do produto de reação em 610 nm. A atividade de MnP foi calculada com base na absorvidade molar do vermelho de fenol oxidado ( $\epsilon_{610} = 65000 \text{ L. M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### 2.10 Determinação da atividade enzimática para Lacase, Peroxidase e Mn Peroxidase

A atividade de produção das enzimas Lacase, Peroxidase, Mn Peroxidase, foi calculada seguindo a equação 1 descrita por Aguiar Filho (2008).

$$\text{UI/L} = \frac{\Delta \text{Abs}}{\epsilon \text{Rt}} \cdot 10^6 \quad (1)$$

Sendo:

$\Delta \text{Abs}$  = absorbância (Abs final – Abs inicial)  
 $\epsilon$  = coeficiente de absorção molar  
 $R$  = quantidade de solução da amostra  
 $t$  = tempo de reação em minutos  
 $\text{UI/L}$  = Atividade enzimática quantificada em Unidade Internacional

### 3 Resultados e discussão

O *Aspergillus niger* demonstrou capacidade para produzir as frações lignolíticas conforme afirmam Santos et al. (2011b). Na Tabela 1 estão descritos os valores experimentais obtidos para as enzimas CMCase, FPase, Xilanase, Lacase, Peroxidase e Mn Peroxidase.

A partir dos valores experimentais foram elaborados os ajustes estatísticos com a finalidade de gerar modelos significativos,

com base no teste de Fisher e no  $R^2$ . Na Tabela 2 são apresentadas as equações ajustadas e validações estatísticas, para cada atividade enzimática.

De acordo com Granato, Ribeiro e Castro (2010), para validar o modelo ajustado os valores otimizados das variáveis independentes devem ser usados no procedimento inicial a fim de verificar o poder de previsão dos modelos desenvolvidos por meio da comparação de dados teóricos previsto para o modelo experimental. Nas figuras 1 e 2 são representadas as atividades enzimáticas obtidas experimentalmente.

De acordo com Arantes e Saddler (2010), a hidrólise enzimática da celulose é catalisada por enzimas altamente específicas que são chamadas de celulases; na realidade, trata-se de um complexo enzimático composto por pelo menos três grandes grupos de celulases: endoglucanases, que clivam randomicamente as ligações internas da região amorfada, liberando oligossacarídeos com terminações redutoras e não redutoras livres; exoglucanases, subdivididas em celobiohidrolases, que são responsáveis pela hidrólise dos terminais redutores e não redutores e as xilanases que são as enzimas responsáveis pela hidrólise da xilana, o principal polissacarídeo constituinte das hemiceluloses.

A presença de xilanases no complexo enzimático é de grande importância para desestruturar o entrelaçamento da hemicelulose presente na parede celular vegetal, já que este grupo de polissacarídeos ramificados se liga firmemente entre si e à superfície das microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo ligações cruzadas dificultando a ação das celulases durante o processo de sacarificação (YANG Y.Z; YANG, S.Q.; YAN, Q.J., 2006). A maximização das enzimas CMCase, FPase e Xilanase, segundo o ajuste estatístico matemático, foram 4,66 U/mL, 7,03U/mL e 19,71 U/mL respectivamente. Em relação ao tempo de fermentação foi possível estabelecer os seguintes valores: 92,54 horas de fermentação para a CMCase, 95,76 horas para FPase e 96,43 para a Xilanase.

Para a hidrólise da celulose a monômeros de carboidrato, é necessária uma ação conjunta de todas as enzimas do complexo celulolítico (MAWADZA; HATTIKAUL; ZVAUYA, 2000), o que leva a investigar, entre os ensaios com uma única linhagem, aquele no qual foram produzidas

maiores quantidades de celulases simultaneamente. As endoglucanases atuam randomicamente ao longo da molécula de celulose, gerando um decréscimo significativo de seu grau de polimerização. Por sua vez, as celobiohidrolases, cuja ação catalítica é capaz de hidrolisar preparações celulósicas microcristalinas, atuam nas regiões terminais das moléculas de celulose, promovendo a sua despolimerização gradativa através da remoção de unidades de celobiose terminais (WOOD; MCCRAE; BHAT, 1989).

A Peroxidase ou Lignina Peroxidase (LiP) é uma glicoproteína que contém ferroprotoporfirina IX (heme) como grupo prostético e requer peróxido de hidrogênio para sua ação catalítica. A LiP oxida a lignina e outros compostos derivados da mesma, além de compostos não fenólicos por retirada de elétron de um núcleo aromático, criando radical instável que passa por numerosas transformações levando à

decomposição do substrato (DURÁN; ESPÓSITO, 2000). A ação dessa enzima resulta em oxidação de álcoois benzílicos, quebra de cadeias aromáticas, desmetilação, rearranjos intramoleculares e quebra de anéis em compostos não fenólicos relacionados à lignina (GOLD; WARIISH; VALLI, 2003).

O álcool veratrílico é o redutor preferido pela LiP, sendo produzido pelo fungo de degradação branca após lignólise e, aparentemente, protege a enzima contra inativação pelo excesso de peróxido de hidrogênio. Na presença de peróxido de hidrogênio, a LiP oxida o álcool a veratraldeído, reação esta comum em ensaios de atividade da LiP (DURÁN; ESPÓSITO, 2000). A Manganês Peroxidase (Mn-P) é muito semelhante à LiP, entretanto, além do peróxido de hidrogênio requer íons  $Mn^{+2}$  e oxida  $Mn(II)$  a  $Mn(III)$  (CRAWFORD; POMETTO, 1988).

**Tabela 1 - Valores experimentais para as atividades de produção das enzimas, CMCase, FPase e Xilanase, Lacase, Peroxidase, Mn Peroxidase.**

Tempo (h)	Atividade Enzimática					
	CMCase*	FPase*	Xilanase*	Lacase**	Peroxidase**	Mn Peroxidase**
24	1,90	3,81	7,29	$6,58 \times 10^{12}$	$9,95 \times 10^{12}$	$7,67 \times 10^{12}$
48	2,40	4,95	8,32	$7,88 \times 10^{12}$	$1,38 \times 10^{13}$	$9,01 \times 10^{12}$
72	2,73	5,29	9,03	$1,25 \times 10^{13}$	$1,68 \times 10^{13}$	$9,78 \times 10^{12}$
96	4,64	7,09	19,57	$1,12 \times 10^{13}$	$2,71 \times 10^{13}$	$7,84 \times 10^{12}$
120	3,79	6,12	13,91	$1,01 \times 10^{13}$	$1,86 \times 10^{13}$	$6,92 \times 10^{12}$

\*Atividade Enzimática quantificada a U/mL; valores obtidos a partir da media de três repetições experimentais.

\*\*Atividade Enzimática quantificada a UI/L; valores obtidos a partir da media de três repetições experimentais.

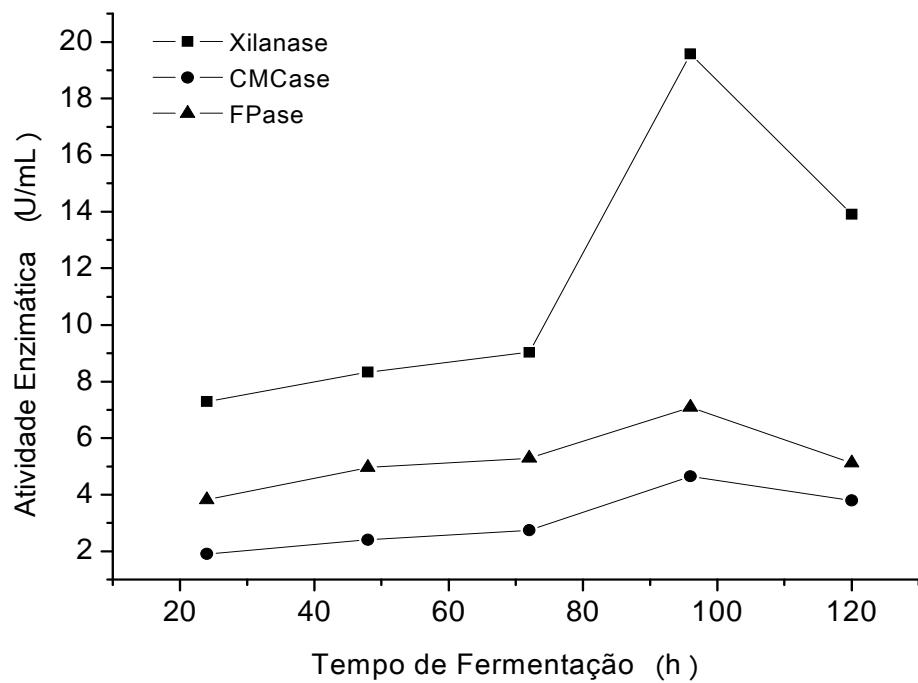
**Tabela 2 - Modelos de ajuste de dados**

	Equação	R <sup>2</sup>	P*	F
E1**	$-2 \times 10^{-5}X^3 + 0,003X^2 - 0,167X + 4,352$	0,892	0,002	1,23
E2**	$-1 \times 10^{-5}X^3 + 0,002X^2 - 0,084X + 4,802$	0,901	0,003	4,82
E3**	$-1 \times 10^{-4}X^3 + 0,020X^2 - 1,135X + 24,73$	0,821	0,008	4,87
E4**	$-2 \times 10^7X^3 + 3 \times 10^9X^2 - 2 \times 10^{10}X + 6 \times 10^{12}$	0,855	<0,001	3,21
E5**	$-1 \times 10^8X^3 + 2 \times 10^{10}X^2 - 1 \times 10^{12}X + 2 \times 10^{13}$	0,899	0,002	3,71
E6**	$1 \times 10^7X^3 - 3 \times 10^9X^2 + 2 \times 10^{11}X + 3 \times 10^{12}$	0,904	<0,001	3,18

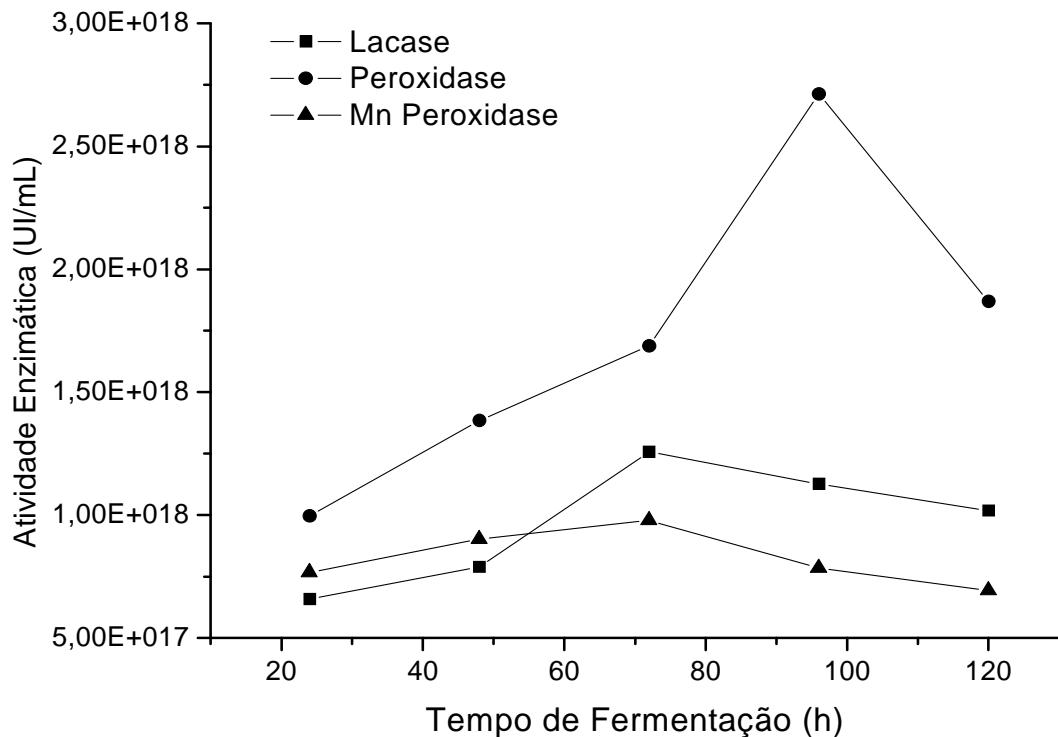
\*P <0,01

\*\* E1, E2, E3, E4, E5 e E6 correspondem aos ativos da CMCase, FPase, Xilanase, Lacase, Peroxidase e Mn Peroxidase, respectivamente.

**Figura 1 - Atividades das enzimas CMCase, FPase e Xilanase ao longo do processo de produção**



**Figura 2 - Atividade das enzimas Lacase, Peroxidase e Mn Peroxidase em função do tempo de fermentação.**



Lacases são fenoloxidases pertencentes ao grupo das oxidases, produzidas por fungos e plantas. Possuem um íon Cu<sup>+2</sup> em seu sítio ativo, que por processo oxidativo remove fenil-propano mais externo à cadeia, gerando radicais fenoxila. Esses radicais atuam em reações não catalíticas, como acoplamento radical-radical, desprotonação a ataques nucleofílicos pela água, levando a reações de polimerização, quebras alquiarílicas e oxidações nos centros ativos e desmetilações. Alguns intermediários aromáticos de baixo peso molecular acabam também liberados resultando na despolimerização da lignina (TIEN; KIRK, 1988). Durante a quantificação das atividades enzimáticas do extrato enzimático proveniente da fermentação da palma doce foi possível compor os tempos de fermentação ótimos com base nos ajustes matemáticos, assim para Lacase a atividade máxima foi quantificada em  $1,25 \times 10^{13}$  UI/L em 73,42 horas de fermentação, Peroxidase  $2,71 \times 10^{13}$  UI/L em 95,91 horas e Mn Peroxidase os valores encontrados foram  $9,78 \times 10^{12}$  UI/L em 75,78 horas em período fermentativo.

Há grande variação nos valores das cargas de enzimas utilizadas, bem como das concentrações máximas de produto obtidas durante as hidrólises, o que se justifica, principalmente, por três motivos: as distintas metodologias de quantificação de celulases utilizadas pelos autores, que ora se baseiam nas definições de atividade fornecidas pelos fornecedores das enzimas, ou ainda lançam mão de suas próprias metodologias; pelas diferentes técnicas analíticas utilizadas na determinação da concentração dos açúcares liberados; e pela concentração de substrato no sistema, fator diretamente relacionado à taxa de diluição dos hidrolisados e à carga enzimática (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).

Face à complexidade orientada tanto à natureza recalcitrante do substrato quanto à natureza do complexo enzimático responsável pela sua biodegradação, pode-se facilmente perceber que a hidrólise enzimática da celulose, da hemicelulose e da lignina não é um processo bioquimicamente simples. Vários dos fatores que têm sido relacionados como limitantes à hidrólise enzimática da celulose podem ser grosseiramente divididos em dois grandes grupos: aqueles associados às mudanças na estrutura do substrato e aqueles relativos ao comportamento das enzimas durante o

processo hidrolítico. Os fatores associados ao substrato dizem respeito ao aumento gradativo da resistência da celulose à ação enzimática, particularmente decorrente do ataque preferencial das enzimas às regiões mais acessíveis da estrutura supramolecular da celulose. Porém, descrever tal processo com base nas propriedades estruturais da celulose tem se mostrado uma tarefa complexa. Assim, são citados como relevantes os efeitos da ação hidrolítica sobre a porosidade e área superficial disponível do substrato (efeitos macroscópicos ou topográficos) e sobre o grau de polimerização e cristalinidade da celulose (efeitos moleculares) (STONE; SCALLAN, 1968).

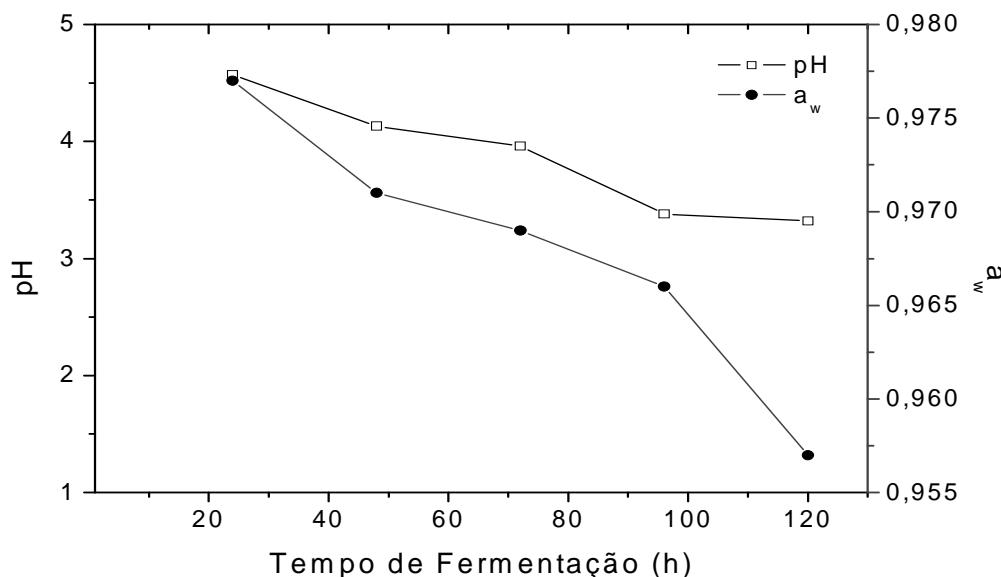
A literatura mostra a produção de endoglucanases por actinomicetos, em especial *Streptomyces*, em diferentes substratos. Uma estirpe de *Streptomyces*, a T3-1, produziu 40,3 U/mL em 1,5% de CMC e sulfato de amônio, ureia e peptona (JANG; CHEN, 2003). Jorgensen e Olsson (2006) obtiveram para *Penicillium brasiliense* IBT 20888, quando cultivado em biorreator em meio contendo extrato de levedura e madeira de um tipo de pinheiro submetido a explosão a vapor, valores de 0,59 U/mL de FPase. Os resultados encontrados para xilanase ficaram abaixo aos obtidos por Qinnghe, Xiaoyu e Tiangui (2004) que obtiveram 24,98 U/mL de atividade de xilanase, utilizando como substrato sabugo de milho e aveia utilizando fungo *Pleurotus ostreatus*- CY012 em fermentação líquida. Santos et al. (2011b) com a utilização do farelo de cacau e *Aspergillus niger* encontraram os valores de  $8,49 \times 10^{13}$  UI/L,  $8,44 \times 10^{12}$  UI/L e  $1,79 \times 10^{11}$  UI/L para Lacase, Peroxidase e Mn Peroxidase respectivamente, em 72 horas de fermentação a 30 °C.

Durante a fermentação foram avaliados o pH final e atividade de água (aw) final da fermentação apresentados na Figura 3. Durante o processo fermentativo foi observado a queda dos valores da atividade de água, o que pode estar relacionado com o consumo do teor umidificante do meio pelo microrganismo utilizado, promovendo assim a manutenção da espécie fúngica no sistema fermentativo. É possível observar o decréscimo dos valores dessas duas variáveis, devido possivelmente a fermentação apresentar um caráter ácido em relação ao tempo, já a diminuição da atividade de deste estudo evidenciaram que a produção de celulases depende do tipo de

substrato, escolha do inoculante utilizado durante o processo fermentativo o que o uso

de distintos métodos quantitativos e qualitativos.

**Figura 3 - Quantificação do pH final e atividade de água final ( $a_w$ ) durante o processo fermentativo.**



#### 4 Conclusões

A amostra utilizada de *Aspergillus niger* de sintetizou todas as enzimas do complexo lignocelulítico propostas, com índices consideráveis de atividade enzimática. A palma doce utilizada como substrato foi avaliada sem qualquer tipo de

pré-tratamento. Também é importante ressaltar que durante a fermentação não foi fornecido nenhum tipo de suplemento nutricional o que demonstra que as enzimas são constitutivas. Futuramente deve ser feito um estudo com novas variáveis independentes e com variação de novos substratos.

#### 5 Production of fungal enzymes by solid state fermentation of sweet palm (*nopalea coccinellifera*) using models statistical significant

**Abstract:** The microbial enzymes are one of biotechnological products most widely used in recent decades, being produced by a wide variety of microorganisms and substrates of various origins. Studies were performed in view of the production of lignocellulosic enzymes by fermentation of the cactus sweet (*Nopalea coccinellifera*) in the solid form via the filamentous fungus *Aspergillus niger*. The solid fermentations were performed in Erlenmeyers flasks containing 10 g of palm bran, to which was added a suspension containing  $10^8$  spores per gram of substrate. Volumes of sterile water were added until the water content value reaches 85% m/m which equates to a water activity of approximately 0.985. The cultures were conducted at 30°C in a bacteriological incubator. The maximization of the production of enzymes CMCCase, FPase, Xylanase, Laccase, Peroxidase and manganese peroxidase according to the mathematical statistical adjustment were 4.66 U/mL, 7.03 U/mL, 19.71 U/mL,  $1.25 \times 10^{13}$  IU/L,  $2.71 \times 10^{13}$  IU/L,  $9.78 \times 10^{12}$  IU/L respectively. During the fermentation process, the fungus was able to synthesize and excrete the enzyme without need of any other inductor beyond sweet palm and water, demonstrating the feasibility of using the sweet palm feedstock to the bioprocess.

**Keywords:** Fungus. *Aspergillus niger*. Enzymes. *Nopalea Coccinellifera*. Biotransformation.

## 6 Referências

- AGUIAR FILHO, J. M. M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana- de açúcar.** Dissertação (Mestrado em Agricultura Microbiologica) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.
- ANASTASI, A.; COPPOLA, T.; PRIGIONE, V. Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: role of laccases and peroxidases. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 165, p. 1229-1233, 2009.
- ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, Lund, n. 3, p. 1-11, 2010.
- ARAÚJO, L. F. et al. Enriquecimento protéico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 401-407, 2008.
- ARCHIBALD, F. S. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 9, p. 3110-3116, 1992.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CHIACCHIO, F. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. **Bahia Agricola**, Salvador, v. 7, n. 3, p. 39-49, 2006.
- CRAWFORD, D. L.; POMETTO, A. L. Lignin-depolymerization activity of *Streptomyces*. In: WOOD, K., KELLOGG, S. T. **Methods in Enzymology**, New York, v. 161, p. 238-240, 1988.
- DURÁN, N.; ESPÓSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase – like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, New York, v.28, p. 83-99, 2000.
- GHORAI, S.; BANIK, S.P.; VERMA, D.. Fungal Biotechnology in food and feed processing. **Food Research International**, Essex, v. 42, p. 577-587, 2009.
- GHOSE T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, p. 257-268, 1987.
- GRANATO, D.; RIBEIRO, J.C.B.; CASTRO, I.A.; et al. Sensory evaluation and physicochemical optimisation of soy-based desserts using response surface methodology. **Food Chemistry**, London, v.121, p. 899-90, 2010.
- GOKHALE, D. U. Xylanase and betaxyllosidase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 8, p. 137-138, 1986.
- JANG, H. D.; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hounds mills, v. 19, p. 263-268, 2003.
- JORGENSEN, H. & OLSSON, L. Production of cellulases by *Penicillium brasiliense* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 38, p. 381-390, 2006.
- MAWADZA, C.; HATTIKAUL, R.; ZVAUYA, R. . Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. **Journal of Biotechnology**???, v. 83, p. 177-187, 2000.
- MENDES, A. A.; et. al. Aplicação de Quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v.34, n.5, 831-840, 2011.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, p. 426-428, 1959.
- PANDEY, A. et al. **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005.
- PARK, C.; KAWAGUCHI, T.; SUMITANI. J.. Cloning and sequencing of a exoglucanase gene from *Streptomyces* sp. M23, and its expression in *Streptomyces lividans* TK-24. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 99, n. 4, p. 434-436, 2005.
- QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N.. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot funfus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**, London, v.39, p. 1561-1566, 2004.
- SANTOS, T.C. et al. Quantificação da atividade de CMCase e FPase produzidas a partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira. **Exatas Online Revista Científica do Departamento de Química e Exatas**, v. 2, p. 22-29, 2011a.
- SANTOS, T. C. et al. Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma Cacao L.*): Obtenção de ligninases. Semina. Ciências Exatas e

**REA – Revista de *estudos ambientais* (Online)**  
**v.14, n.3, p.48-57, jan./jun. 2012**

Tecnológicas (Impresso), v. 32, p. 87-96, 2011b.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, p. 4820-4825, 2010.

STONE, J. E; SCALLAN, A. M. A structural model for the cell wall of the water-swollen wood pulp fiber based on their accessibility to macromolecules. **Cellulose chemistry and Technology**. v.2, p: 321-342, 1968.

SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L.. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, New York, v. 81, p. 234-240, 1989.

TIEN. M.; KIRK, K.T. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Methods in enzymology**, New York, v. 49, p.161-238, 1988.

WOOD, T. M.; MCCRAE, S. I.; BHAT, K. M. The mechanism of fungal cellulose action. Synergism between enzyme components of *Penicillium pinophilum* cellulase in solubilizing hydrogen bond-ordered cellulose. **Biochemistry Journal**, v. 260, p. 37-43, 1989.

YANG, Y.Z; YANG, S.Q.; YAN, Q.J.. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v.97, n.15, p. 1794-1800, 2006.

## 7 Agradecimentos

Ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).