



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DA ENZIMA XILOSE REDUTASE POR *Candida tropicalis* ATCC 750 USANDO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DO BAGAÇO DE CAJU

J. de F. SERPA¹, F. D. dos SANTOS², B. A. NOBRE¹, J. S. SILVA¹, C. E. A. SOARES², M. V. P. ROCHA¹

¹ Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

² Universidade Federal de Campina Grande, Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais

E-mail para contato: serpajuli@hotmail.com¹, valponterocha@yahoo.com.br¹

RESUMO – A enzima xilose-redutase (EC 1.1.1.21) tem potencial aplicação na produção de xilitol a partir de xilose e é uma enzima intracelular comumente encontrada em leveduras. Neste trabalho, avaliou-se a influência da temperatura (25, 30, 35 e 40 °C) na produção da enzima xilose redutase (XR) por *Candida tropicalis* ATCC 750 utilizando o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju como substrato. O hidrolisado foi obtido por hidrólise ácida utilizando 0,6 M H₂SO₄ a 121 °C por 15 min. A levedura consumiu xilose e as temperaturas que favoreceram um maior crescimento celular foram 25 °C e 30 °C, obtendo aproximadamente 9,5 g/L de células, e ocorreu uma diminuição a 40 °C (4,8 g/L de células). A atividade de XR foi determinada por reação de oxidação de NADPH e a maior produção da enzima ocorreu a 25 °C, com uma atividade enzimática de 0,265 U/mL. A temperatura e pH ótimos da enzima XR foram 50 °C e pH 7,0. O hidrolisado de bagaço de caju apresentou-se como substrato promissor para a produção de xilose redutase.

1. INTRODUÇÃO

A xilose redutase (XR) é uma enzima oxido redutase, pertencente ao membro da família da aldose-redutase (EC 1.1.1.21), geralmente encontrados em leveduras e fungos, além de ser comumente dependente de NADPH. A produção em larga escala de XR bem como a sua aplicação industrial para a fabricação de xilitol e outros bioprodutos de valor agregado tem sido limitado devido o alto preço da xilose comercial (Rafiqul e Sakinah, 2015a). Este problema tem incentivado aos pesquisadores a trabalhar para o desenvolvimento de melhores técnicas para reduzir os custos de obtenção da XR, como, por exemplo, a busca por novas fontes de matéria-prima e condições do processo.

A produção da enzima xilose redutase depende de condições de cultivo para se obter alta atividade da enzima XR, onde as células são cultivadas em diferentes concentrações do

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



hidrolisado suplementado com nutrientes, sob variadas condições de temperatura (25, 30, 35 e 40 °C), pH e aeração.

Neste contexto, materiais lignocelulósicos como, o bagaço de caju, são fontes de baixo custo com potenciais em bioprocessos. A composição do bagaço de caju (BC) é celulose, hemicelulose e lignina que pode fornecer uma quantidade considerável de açúcares fermentáveis tais como glucose e xilose para a produção biotecnológica de etanol e xilitol, respectivamente (Albuquerque *et al.*, 2015; Rocha *et al.*, 2011).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de xilose redutase através de processos biotecnológicos utilizando a levedura *Candida tropicalis* ATCC 750 e hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Bagaço de caju

O bagaço de caju (BC) utilizado foi gentilmente cedido pela Indústria de Processamento de Sucos Jandaia (Ceará, Brasil). Inicialmente, o bagaço de caju (BC) foi lavado, seco a 60 °C durante 24 h, triturado e peneirado, selecionando-se partículas com tamanho entre 0,25 mm a 0,84 mm, e estocados até seu uso.

2.2 Micro-organismo *Candida tropicalis* ATCC 750

O micro-organismo utilizado para a produção da enzima xilose redutase foi a levedura *Candida tropicalis* ATCC 750, pertencente ao laboratório do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

O armazenamento da cultura foi em meio Ágar YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) em tubos inclinados contendo 20 g/L de D (+) glucose anidra (dextrose), 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona bacteriológica, 1 g /L de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), 5 g/L de sulfato de magnésio mono-hidratado (MgSO₄.7H₂O) e 20 g/L de ágar dissolvidos em água, esterilizados a 121 °C durante 15 min e mantidos a -4 °C. Posteriormente, a levedura *Candida tropicalis* ATCC 750, foi replicada em placas de Petri que continha o meio Ágar YEPD, sendo incubada a 30 °C por 24 h em estufa microbiológica.

2.3 Hidrólise ácida do bagaço de caju: obtenção do hidrolisado hemicelulósico

O bagaço de caju (BC) foi hidrolisado utilizando ácido sulfúrico diluído (0,6 mol/L) em autoclave a 121 °C durante 30 min usando uma concentração de 20 % m/v de bagaço, de acordo com a metodologia descrita por Albuquerque *et al.*, (2014). A seguir, o hidrolisado passou por filtração a vácuo e o pH da fração líquida foi ajustado para 6,0 usando Ca(OH)₂. Após o ajuste do pH, filtrou-se novamente a amostra para separar o precipitado formado.

2.4 Processo de detoxificação do hidrolisado de bagaço de caju

Como meio de evitar inibidores microbianos como, por exemplo, ácido fórmico e ácido acético, o hidrolisado do BC passou por um processo de detoxificação usando carbono ativado. Foi usado a concentração de 3 % m/m de carbono ativado em grânulos de origem natural, mantidos a 200 rpm durante 2 h e 30 °C. O hidrolisado do bagaço de caju com pH ajustado (pH 6.0) e após passar pelo processo de detoxificação (nomeado de MCABH) foi então utilizado como meio para o processo fermentativo.

2.5 Preparação do meio de inóculo do micro-organismo

O meio de inóculo foi o do hidrolisado hemicelulósico (MCABH), o qual foi suplementado com 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de fosfato de potássio dibásico anidro P.A. (K_2HPO_4), 1 g/L de sulfato de magnésio mono-hidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), esterilizado a 110 °C por 10 min. Após o crescimento em placa Petri, três alças de células foram transferidas para 100 mL de meio de inóculo (MCABH), contidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL, funcionando como o meio de adaptação das células para, posteriormente, serem transferidas para os meios de produção. O inóculo foi incubado em agitador orbital (TECNAL, TE-420) a 30 °C durante 24 h. Após 24 h, o meio foi centrifugado (REFRIGERATED CENTRIFUGUE MOD.280 R) a 6.000 rpm por 15 min a 4 °C, para obter células para os ensaios de produção.

2.6 Processo fermentativo para a produção da enzima xilose redutase

Nesta etapa, avaliou-se a produção da enzima xilose redutase por *Candida tropicalis* ATCC 750 em batelada utilizando o meio MCABH. A concentração inicial de células utilizadas foi $0,3 \pm 0,1$ g/L, sendo transferidas para 100 mL de meio de produção (em Erlenmeyer de 250 mL) e incubadas sob agitação de 150 rpm em agitador orbital (TECNAL, TE-420), onde foi avaliado a influência da temperatura na produção de XR, sendo o processo conduzido nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40 °C. Durante o processo de produção foi avaliado o pH e coletadas amostras do meio de cultivo e submetidas as análises do teor de açúcares (glicose, xilose e arabinose) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando um sistema de CLAE (Waters, Milford, MA, E.U.A.), atividade enzimática, concentração de biomassa e concentração de xilitol. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

2.7 Processo de extração da enzima xilose redutase (XR)

Após as 72 h do processo de produção utilizando o meio hidrolisado hemicelulósico (MCABH), foram coletadas amostras do caldo cultivado e centrifugado a 6.000 rpm por 15 min para obter a massa celular, que foi lavada com tampão fosfato de potássio (0,1 M /pH 7,0) na proporção de 1:3 (massa seca: tampão), e centrifugado novamente, sendo acrescentado novamente o tampão para armazenar (1:2 massa seca: tampão) e, em seguida, romper as células por ultrassom. O método utilizado para romper as células em suspensão foi o método físico, segundo a metodologia descrita por Freitas (2013) e Rafiqul e Sakinah (2015a), no qual a

suspensão celular foi rompida através de ponteira ultrassônica (QSONICA SONICATORS) usando sonicação a 20 kHz, amplitude 40%, com ciclos de 5 min por 15 min (pulse de 5s). Em seguida, a solução foi centrifugado nas condições já citadas para se obter o extrato enzimático. Após toda a operação, o sobrenadante foi armazenado a - 4 °C e utilizado como extrato bruto de enzima.

2.8 Determinação da atividade enzimática da xilose redutase (XR)

A quantidade de NADPH oxidado durante o procedimento, assim como a redução de xilose a xilitol a uma determinada temperatura, foi utilizado para determinar a atividade da enzima XR, de acordo com a metodologia de Yokoyama *et al.*, (1995) e Rafiqul e Sakinah (2015a) com modificação. O procedimento foi realizado adicionando 1,2 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH7.0). Acrescentou-se 0,2 mL 2-mercaptoetanol 0,1 M, seguido de 0,1 mL de extrato bruto de xilose redutase (XR), 0,1 ml de NADPH 3,4 mM. 2-ME foi adicionado na mistura reacional para inibir a atividade de protease, caso esteja presente na mistura reacional ou na XR. Após 1 min em agitação no espectro a 25 °C, adicionou-se 0,2 mL de D-xilose 0,5 M. Para um controle da reação, desnaturou-se a enzima aquecendo-a a 100 °C por 10 min. A taxa de oxidação do NADPH foi medida a 340 nm por espectroscopia UV-VIS a intervalos de 1 min durante 5 min. Uma unidade (U) de XR é definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a oxidação de 1 µmol de NADPH por min a pH 7,0 e 25 °C.

2.9 Caracterização da enzima XR produzida

A temperatura ótima para a atividade de XR foi calculada incubando a mistura de reação a diferentes temperaturas variando de 10 a 60 °C, durante 5 min, a pH 7. O pH ótimo da enzima foi determinado pelo ensaio de atividade de XR no tampão de fosfato de potássio 0,1 M (pH 3, 5,0, 7,0, 8,0) e tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 10) a 25 °C durante 5 min. O procedimento de ensaio mencionado antes XR foi essencialmente seguido durante o estudo de efeitos de pH e temperatura sobre a enzima.

2.10 Análise de SDS-PAGE de cultura sobrenadante

As análises dos extratos enzimáticos de XR produzida utilizando os meios hidrolisado hemicelulósico (MBCH) ou meio formulado (MF) foram realizadas através do equipamento para eletroforese da Bio-Rad-Mini-PROTEAN® TGX™, utilizando gel de separação.

Inicialmente preparou-se o gel para montar o suporte usando 1,25 mL de tampão de separação, 2 mL de acrilamida, 1,72 mL de água destilada, 10 µL de TEMED e 50 µL de APS 10 % (supersulfato de amônia). Após 10 min, preparou-se a outra etapa do processo para concentrar o gel com 750 µL de tampão de concentração, 300 µL de acrilamida 30 %, 1,5 mL de água destilada, 200 µL de bis-acrilamida (2%), 15 µL de APS e 5 µL de TEMED.

Utilizou-se 40 µL das amostras de extrato enzimático com 10 µL de tampão de ruptura para cada análise na eletroforese. As diferentes soluções foram aquecidas a 100 °C por 5 min, onde alíquotas de 10 µL de cada amostra foram inseridas nos poços de gel e no tempo de corrida de, aproximadamente 1 h, esperou-se as amostras percorrerem todo o caminho dos poços até

atingirem a base do gel. Após esse procedimento, o material em gel foi transferido para um banho com o azul brilhante de Comassie até ser possível a visualização das proteínas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Influência da temperatura na produção da enzima xilose redutase utilizando hidrolisado do bagaço de caju

O hidrolisado do bagaço de caju (BCH) continha 28,57 g.L⁻¹ de glicose, 18,30 g.L⁻¹ de xilose, 11,74 g.L⁻¹ de arabinose, 6,79 g.L⁻¹ de celobiose, 1,64 g.L⁻¹ de ácido acético e 0,90 g.L⁻¹ de ácido fórmico. A concentração total de açúcares fermentáveis obtidos por hidrólise ácida, incluindo glicose, xilose e arabinose foi aproximadamente 58,62 g.L⁻¹. Assim, BCH mostrou-se favorável para o meio microbiano devido a estas fontes de carbono presentes.

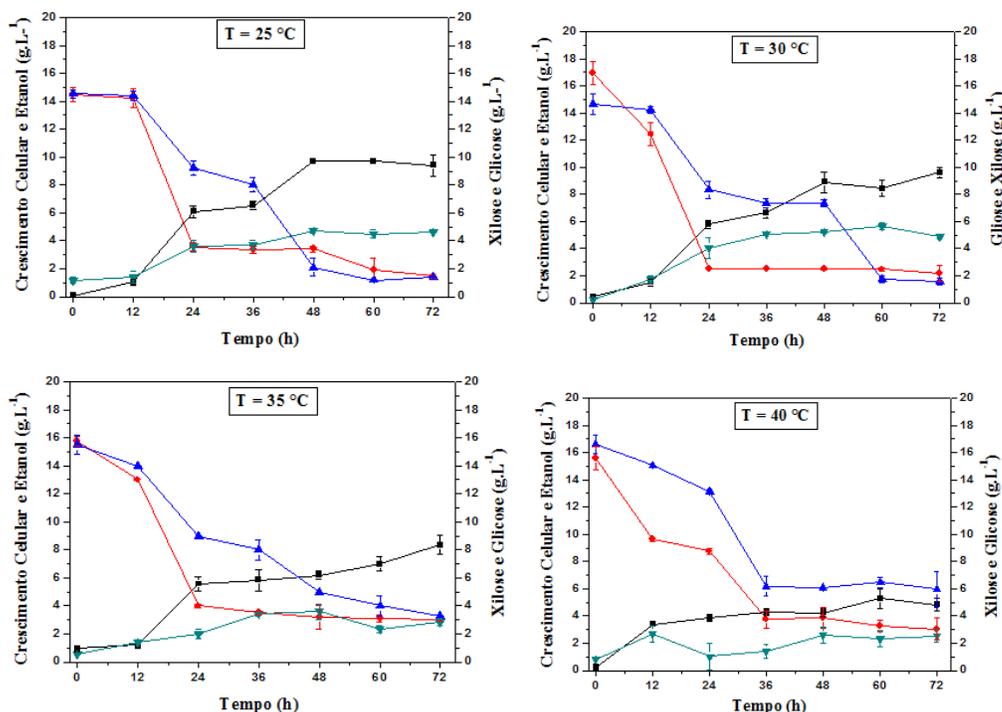


Figura 1 - Perfil do crescimento celular, concentração de carboidratos e etanol no bioprocesso utilizando o meio hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju (MCABH) por *Candida tropicalis* ATCC 750 em diferentes temperaturas: (A) 25 °C, (B) 30 °C, (C) 35 °C e (D) 40 °C. Os dados experimentais são os seguintes: (■) Concentração celular (g.L⁻¹); (▲) Xilose (g.L⁻¹); (●) Glicose (g.L⁻¹) e (▼) Etanol (g.L⁻¹).

Avaliou-se a influência da temperatura na produção da enzima xilose redutase (XR) pela levedura *Candida tropicalis* ATCC 750 no meio hidrolisado hemicelulósico (MCABH), cujo perfil de crescimento celular, consumos de glicose e xilose, e formação de produtos estão representados pela

Figura 1. As temperaturas que favoreceram o maior crescimento celular foram 25 °C (9,39 g.L⁻¹) e 30 °C (9,63 g.L⁻¹) e com o aumento da temperatura houve uma diminuição do crescimento celular, obtendo 4,84 g.L⁻¹ de biomassa a 40 °C. A levedura consumiu preferencialmente glicose, por exemplo, na temperatura de 25 °C, aproximadamente 70% da glicose foi consumida nas primeiras 24 h, com 40 % de xilose consumida nesse mesmo processo. E após 72 h, a levedura consumiu 90 % de xilose e glicose. O menor consumo de xilose foi obtido na temperatura de 40 °C, restando no meio 5,93 g.L⁻¹ de xilose.

No meio MBCH não foi observado à produção de xilitol, porém, houve a produção de etanol em todas as temperaturas, com a maior concentração a 30 °C (5,66 g.L⁻¹). Estes resultados indicam que nas condições avaliadas, o micro-organismo prefere a rota da glicose em relação à xilose, desviando a rota de produção do xilitol devido à repressão da glicose presente no meio hidrolisado hemicelulósico. Apesar do micro-organismo não sintetizar xilitol, foi observado à produção da enzima XR através da determinação da atividade enzimática do extrato bruto. Observa-se na Tabela 1, que a maior atividade foi obtida a 25 °C (0,265 U/mL), correspondendo a atividade enzimática por célula de 0,530 U/g e atividade específica de 0,071 U/mg.

Tabela 1 - Influência da temperatura na produção da enzima xilose redutase por *Candida tropicalis* ATCC 750 usando o meio hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (MCABH).

Temperatura (°C)	Atividade Enzimática (U/mL _{EXTRATO})	Atividade Específica (U/g _{CÉLULAS})	Atividade Específica (U/mg _{PROTEÍNAS})
25	0,265	0,530	0,071
30	0,181	0,362	0,041
35	0,111	0,222	0,036
45	0,033	0,066	0,06

Apesar das concentrações celulares serem semelhantes nas temperaturas de 25 °C e 30 °C houve uma diminuição da atividade em praticamente 30 %, 0,181 U/mL a 30 °C, em relação a atividade da XR produzida a 25 °C (0,265 U/mL), provavelmente devido a rota metabólica ter desviado para a produção de etanol, pois a 30 °C obteve-se a maior concentração de etanol (5,66 g.L⁻¹). A atividade específica de XR de *C. tropicalis* ATCC750 produzida a 25 °C é semelhante ou superior aos resultados obtidos por outros autores. Cortez *et al.* (2006) estudaram a produção de XR por *Candida guilliermondii* usando o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e a atividade específica obtida foi 0,38 U/mg. Rafiqul e Sakinah (2015a) avaliaram em seu estudo o uso do hidrolisado de serragem de madeira Meranti na produção de XR por *C. tropicalis*, e a maior atividade específica encontrada foi 0,91 U/mg.

3.2 Caracterização da enzima xilose redutase

A xilose redutase produzida usando o meio MCABH a 25 °C foi caracterizada determinando-se o pH ótimo e a temperatura ótima. Os resultados da atividade enzimática de XR a várias temperaturas estão representados na Figura 2A. Observou-se que a temperatura ótima para XR foi de 50 °C (com atividade de 0,326 U.mL⁻¹), utilizando xilose como substrato. O pH ótimo de atividade da enzima xilose redutase foi obtido pela determinação da atividade em

diferentes pHs fixando a temperatura em 25 °C e os resultados estão ilustrados na Figura 2B. A enzima XR de *C. tropicalis* ATCC 750 exibiu uma atividade ótima, utilizando xilose como substrato, na faixa de pH 7,0 a 8,0, comportamento semelhante com XR obtidas por *Candida tropicalis* (RAFIQUL *et al.*, 2015a), *Candida parapsilosis* (LEE *et al.*, 2003) e *C. intermedia* (NIDETZKY *et al.*, 2003).

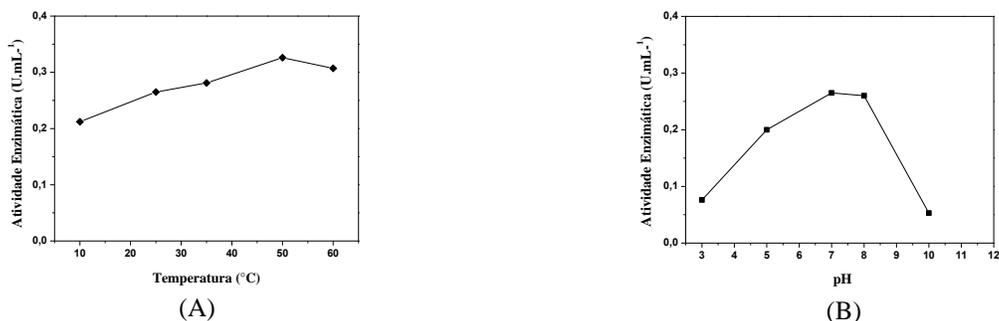


Figura 2: Influência da temperatura (A, a pH 7,0) e influência do pH (B, a 25 °C) na atividade enzimática da enzima xilose redutase de *Candida tropicalis* ATCC750, produzida a 25 °C utilizando o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju (MCABH) como substrato.

3.3 Eletroforese e identificação de proteínas da xilose redutase

A Figura 3 representa a eletroforese da enzima xilose redutase (XR) produzida. Na primeira banda (M), tem-se os marcadores de massa molar.

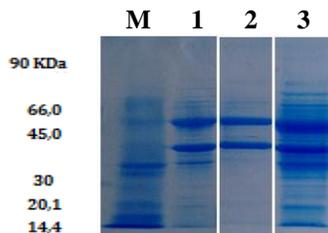


Figura 3: Eletroforese em SDS-PAGE do extrato enzimático de XR de *Candida tropicalis* ATCC 750 produzida em diferentes meios e a diferentes temperaturas.

Da segunda à sexta banda, encontram-se as amostras da enzima XR produzida por *Candida tropicalis* ATCC 750. As bandas denominadas 1, 2 e 3 representam a XR obtida utilizando o meio MBCH a 25 °C, 30 °C e 40 °C respectivamente. De acordo com o eletrograma (Figura 14), pode ser identificado a massa molecular na faixa de aproximadamente 30 kDa para a XR produzida em todas as condições, sendo este resultado corroborado pela faixa de massa molecular da enzima xilose redutase encontrado na literatura.

4. CONCLUSÕES

A levedura *Candida tropicalis* ATCC 750 produziu a enzima xilose redutase utilizando o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju como substrato, indicando uma possível fonte de carboidratos



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

promissora para a produção desta enzima. A enzima xilose redutase apresentou maior atividade enzimática a pH 7,0 e temperatura de 25 °C, e possivelmente apresenta uma estrutura dimérica.

5. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, T. L. Produção Biotecnológica de xylitol a partir de hidrolizadp de bagaço de caju. 148 f. *Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará*, Fortaleza-CE, 2014.

ALBUQUERQUE, T.L.; GOMES, S.D. L.; MARQUES Jr., J. E.; SILVA Jr., I. J., ROCHA, M. V. P., Xylitol production from cashew. *Catalysis Today* 255, 33-40, 2015.

CORTEZ, E. V.; PESSOA-JR, A.; FELIPE, M. G. A.; ROBERTO, J. C.; VITOLO, M. Characterization of xylose reductase extracted by CTAB-reversed micelles from *Candida guilliermondii* homogenate. **Brazilian Journal od pharmaceutical Sciences**, v. 42, n.2, 2006.

FREITAS, M. F. M. Imobilização da Enzima b-Galactosidade produzida por *Kluyveromyces Lactis* NRRL Y1564 em soro de leite. *Dissertação de Mestrado. Programação de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Ceará*, 2013.

LEE, J. K.; KOO, B. S.; KIM, S. Y. Cloning and characterization of the *xyll* gene, encoding an NADH-Preferring xulose reductase from *Candida parapsilosis*, and Its functional expression in p.6179-6188, 2003.

NIDETZKY, B., BRÜGGLER, K., KRATZER, R., MAYR, P. Multiple forms of xylose reductase in *Candida intermedia*: comparison of their functional properties using quantitative structure–activity relationships, steady-state kinetic analysis, and pH studies. **J. Agric. Food Chem.** 51 (27), 7930–7935, 2003.

RAFIQUL, I. S. M., SAKINAH, A. M. M., Biochemical Properties of Xylose REDUTASE Prepared from Adapted Strains of *Candida tropicalis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175:387-399, 2015a.

ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; MACEDO, G. R. Cashew apple bagasse as a source of sugars for etanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 38, n. 8, p. 1099-107, 2011.

YOKOYAMA, S., SUZUKI, T., KAWAI, K., HORITSU, H., & TAKAMIZAWA, K. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79 (3), 217-223, 1995.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO

