

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS DE CARBOXIMETILCELULASE PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO CASCA DE SOJA

V. ASTOLFI¹, A. L. ASTOLFI¹, C. E. B. VARGAS¹, E. RIGO², M. DI LUCCIO³, H. TREICHEL⁴

¹ Universidade Regional Integrada - Campus de Erechim, Departamento de Engenharia de Alimentos: vivi_ast@yahoo.com.br; angelaastolfi@hotmail.com; cindyelena506@hotmail.com

² Universidade do Estado de Santa Catarina - Campus de Pinhazinho, Departamento de Engenharia de Alimentos: iserigo@yahoo.com.br

³ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos: di.luccio@ufsc.br

⁴ Universidade Federal Fronteira Sul: helentreichel@gmail.com

RESUMO – As celulasas são recursos-chave em biorrefinarias, onde são utilizadas para produzir combustíveis alternativos e produtos químicos a partir de biomassa lignocelulósica. Para que se tenha a completa degradação dos resíduos lignocelulolíticos, são necessárias reações sinérgicas entre diferentes enzimas, por isso a importância da caracterização de cada uma das enzimas. Este trabalho teve como objetivo caracterizar parcialmente carboximetilcelulase produzida por *Trichoderma reesei* NRRL 3652 usando casca de soja em fermentação em estado sólido, em termos de temperatura ótima, termoestabilidade, pH ótimo, estabilidade de pH e parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$. O extrato bruto de CMCase apresentou alta estabilidade à temperatura de 40 °C e pH 5,5. O extrato enzimático foi estável em armazenamento em baixas temperaturas (-80; -10 e 4 °C) por cerca de 290 dias. Os valores de K_m e $V_{máx}$ aparentes são 0,65 mg.mL⁻¹ e 0,62 mol.mg⁻¹.min⁻¹, respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

As celulasas e hemicelulasas são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais lignocelulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares fermentescíveis, despertando interesse industrial para produção em larga escala de bioetanol de segunda geração (Jurutu e Wu, 2014).

Além de serem utilizadas na produção de bioetanol, celulasas e hemicelulasas são amplamente utilizadas em diversos ramos da indústria. Na indústria de alimentos, celulasas são utilizadas em processos de maceração, geralmente em conjunto com hemicelulasas e pectinases, como na extração de suco de frutas e óleo de sementes. Já na indústria têxtil e lavanderia, as celulasas são utilizadas para a remoção do excesso de corantes em tecidos *jeans*, processo denominado bioestonagem. Na indústria de polpa de celulose e papel, são utilizadas no refino da polpa, melhorando a sua qualidade. Na área de

alimentação animal, as celulases são comercializadas como componentes aceleradores do processo de silagem e em ração para aves e suínos com a finalidade de aumentar a digestibilidade de alimentos ricos em fibras de celulose (Bhat, 2000).

As celulases são sintetizadas e produzidas por várias bactérias ou fungos. *Trichoderma reesei* é o fungo mais eficiente produtor de endo e exo-celulases (Knob *et al.*, 2010; Guoweia *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). No entanto, outros micro-organismos são relatados como possíveis produtores de enzimas celulolíticas e xilanolíticas, tais como *Trichoderma harzianum* (Deladona *et al.*, 2012), *Trichoderma asperellum* (Raghuwanshi *et al.* 2014); *Aspergillus niger* (Ncube *et al.*, 2012), *Aspergillus terreus* (Narra *et al.*, 2014), *Termitomyces clypeatus* (Pal *et al.*, 2013), *Sporotrichum thermophile* (Sadaf e Khare, 2014), entre outros.

A fermentação em estado sólido (FES) utiliza resíduos agroindustriais de baixo custo e oferece várias vantagens práticas e econômicas. Portanto, tem sido reportada como uma alternativa interessante para a produção de enzimas de uso em diversos ramos da indústria, do qual, muitas vezes utiliza enzimas de alto custo (Falkoski *et al.* 2013; Pensupa *et al.* 2013; Waghmare, *et al.* 2014).

A compreensão estrutural e funcional do modo de ação de enzimas lignocelulolíticas tem sido alvo de uma série de pesquisas (Silveira *et al.*, 2014). Para que se tenha a completa degradação dos resíduos lignocelulósicos, por exemplo, são necessárias reações sinérgicas entre diferentes enzimas, e portanto a caracterização de cada uma das enzimas é de grande relevância para a sua aplicação. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi a caracterização da carboximetilcelulase (CMCase) produzida por *Trichoderma reesei* NRRL 3652 por fermentação em estado sólido utilizando casca de soja como substrato.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O extrato enzimático bruto foi obtido da condição experimental ótima ($4,30 \text{ U.g}^{-1}$) da fermentação em estado sólido (FES) usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em casca de soja.

2.1 Temperatura e pH ótimos

A temperatura e pH ótimo da enzima foram avaliados por meio de um delineamento composto central rotacional (DCCR), na faixa de 40 a 70 °C e pH 3,0 a 6,2, utilizando-se tampão citrato de sódio 0,05 M.

2.2 Estudo da estabilidade em relação ao pH e temperatura

A estabilidade térmica da CMCase foi testada incubando o extrato enzimático bruto em tampão citrato de sódio 0,05 M a pH 4,6 nas temperaturas 40; 50; 60 e 70 °C. As amostras foram retiradas em determinados intervalos de tempo, para as medidas de atividade. Para a estabilidade de CMCase em relação ao pH, incubou-se o extrato em tampão citrato de sódio 0,05 M nas faixas de pH 3,5; 4,5; 5,5 e 6,5 a uma temperatura de 55 °C. Além disso, as amostras do extrato enzimático bruto foram armazenadas nas temperaturas: -80; -10 e 4 °C e em determinados intervalos de tempo realizou-se as

medidas de atividade. As amostras foram retiradas em determinados intervalos de tempo medindo-se a atividade residual pelo método DNS, como descrito no item 2.4.

2.3 Determinação da cinética enzimática

As taxas iniciais de reação da hidrólise de carboximetilcelulose (Sigma-Aldrich), foram determinadas em concentrações do substrato variando de 1 a 30 mg.mL⁻¹, em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 5,3, a 50 °C. As constantes K_m e V_{max} foram estimadas de acordo com o método de Lineweaver-Burk.

2.4 Dosagem da atividade enzimática

A dosagem da atividade de CMCase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir da solução 2% carboximetilcelulose, conforme descrito por Ghose (1987). Os açúcares redutores foram dosados em espectrofotômetro, pelo método do DNS (Miller, 1959), sendo uma unidade de atividade enzimática (U) definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcares redutores, por minuto, nas condições de cada ensaio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no DCCR mostraram que os valores de atividade de CMCase variaram de 0,09 a 0,31 CMCase.mL⁻¹ (Tabela 1). Como pode ser observado na Figura 1, a atividade máxima de CMCase foi obtida nos pontos centrais, ou seja, na temperatura e pH de 55 °C e 4,6, respectivamente.

Tabela 1 - Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com a resposta em termos da atividade de CMCase em função do pH e temperatura obtida do extrato enzimático da FES em casca de soja

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	CMCase U.mL ⁻¹
1	3,5 (-1)	44,4 (-1)	0,12
2	5,7 (1)	44,4 (-1)	0,10
3	3,5 (-1)	65,6 (1)	0,12
4	5,7 (1)	65,6 (1)	0,09
5	3,0 (-1,41)	55,0 (0)	0,10
6	6,2(1,41)	55,0 (0)	0,10
7	4,6 (0)	40,0 (-1,41)	0,12
8	4,6 (0)	70,0 (1,41)	0,09
9	4,6 (0)	55,0 (0)	0,25
10	4,6 (0)	55,0 (0)	0,31
11	4,6 (0)	55,0 (0)	0,29

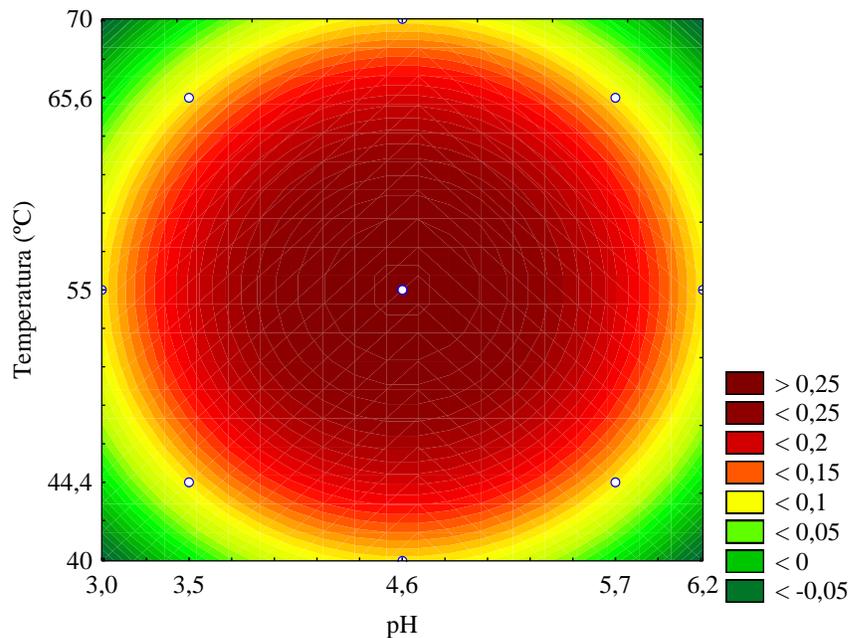


Figura 1 - Curvas de contorno indicando a influência da temperatura e pH na atividade de CMCase obtidos no DCCR.

Estes resultados são semelhantes ao reportado para a produção de celulases por outros microorganismos. Por exemplo, Falkoski *et al.* (2013) estudaram a caracterização de enzimas produzidas por FES usando *Chrysosporthe cubensis* em farelo de trigo como fonte de carbono, os quais relataram pH e temperatura ótimos de 4 e 60 °C, respectivamente.

Os resultados de estabilidade térmica mostraram que a CMCase apresentou maior estabilidade a 40 °C, com uma redução de cerca de 25% na atividade após 60 horas de incubação e de 65% após 96 horas. A 50 °C, a enzima apresentou redução de 50% após 8 horas de incubação. Perdas mais acentuadas foram observadas a 60 e 70 °C (Figura 2a). Na avaliação da estabilidade ao pH, a CMCase apresentou redução de 45% na atividade após 16 horas de incubação em pH 5,5. Em pH 3,5 foi verificada a perda total de atividade em poucas horas de incubação. Provavelmente, e este pH é muito próximo do ponto isoelétrico da proteína, o que pode levar à desnaturação da enzima (Figura 2b).

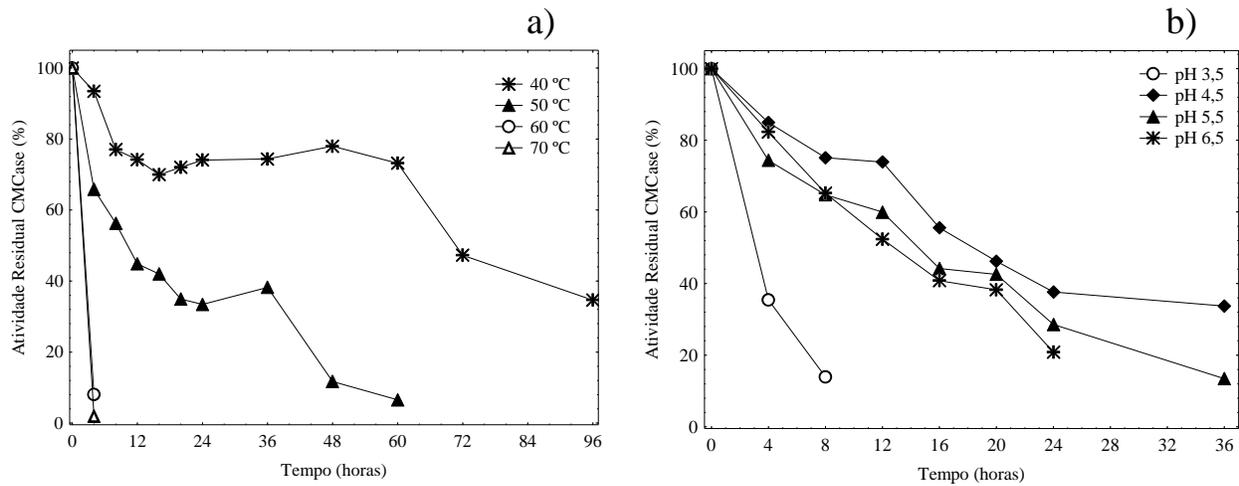


Figura 2 - Influência da temperatura (a) e pH (b) na estabilidade do extrato enzimático bruto de CMCCase obtido por FES de casca de soja.

A estabilidade do extrato enzimático bruto a baixas temperaturas foi avaliada, observando-se que não houve comportamento distinto entre as diferentes temperaturas de armazenamento em teste. Após 290 dias cerca, de 20 % da atividade de CMCCase foi perdida em relação à atividade inicial.

Observou-se um aumento nas atividades de CMCCase, conforme se aumentou a concentração do carboximetilcelulose, não se verificando indícios de inibição pelo substrato, mesmo na maior concentração avaliada (Figura 2a). As constantes cinéticas foram determinadas utilizando-se o método gráfico de Lineweaver-Burk. A correlação entre $1/v$ e $1/[S]$ (Figura 2b) forneceu o valor de $K_m = 0,65 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $V_{\max} = 0,62 \text{ mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Nara *et al.* (2014) encontraram $K_m 12,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $V_{\max} 16,15 \text{ } \mu\text{mol.min.mg}^{-1}$, para CMCCase produzida em FES por *Aspergillus terreus* utilizando palha de arroz com fonte de carbono, mostrando portanto menor afinidade pelo substrato do que no presente trabalho.

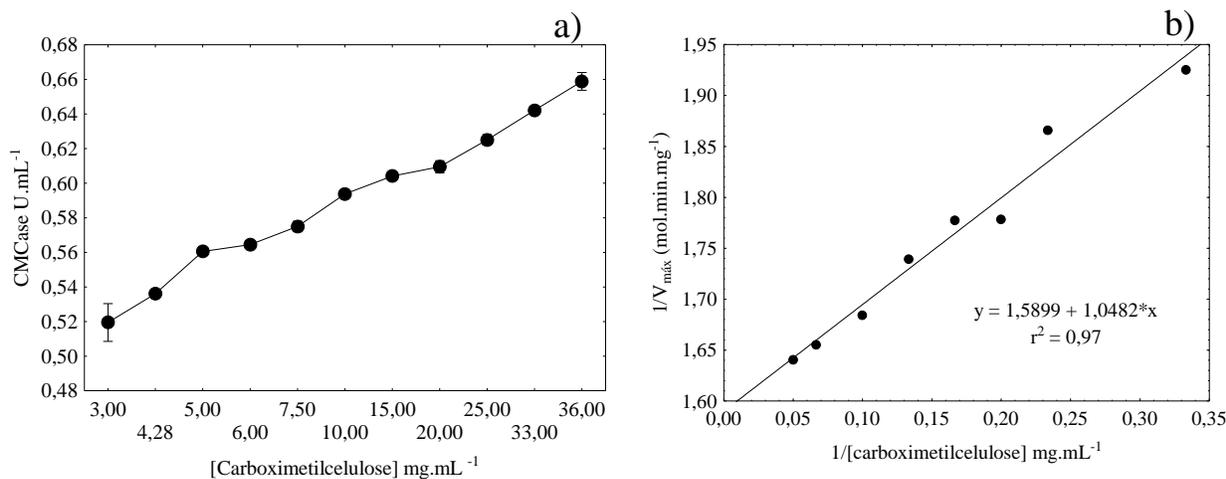


Figura 3 - Velocidade da reação de CMCCase em função de diferentes concentrações de carboximetilcelulose (a); representação gráfica linearizada pelo método de Lineweaver-Burk (b).

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que a CMCCase obtida da FES usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em casca de soja apresentou uma temperatura e pH ótimos de 55 °C e 4,6, respectivamente. O extrato enzimático bruto apresentou alta estabilidade a 40 °C e pH 5,5. Nas três formas de armazenamento em baixas temperaturas (-80; -10 e 4 °C) obteve-se alta estabilidade, sendo que somente 20% da atividade CMCCase foi perdida após 290 dias de estocagem. As constantes cinéticas aparentes, K_m e V_{max} foram de 0,65 mg.mL⁻¹ e 0,62 mol.mg⁻¹.min⁻¹, respectivamente.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à URI – Campus de Erechim pela infraestrutura e à CAPES pelo apoio financeiro deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

BHAT, M. K., Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.*, v. 18, p. 355-383, 2000.

DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S.; Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass Bioenerg.*, v. 37, p. 243-250, 2012.

FALKOSKI, D. F.; GUIMARÃES, V. M.; ALMEIDA, M. N.; ALFENAS, A. C.; COLODETTE, J. L.; REZENDE, S. T., *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. *Bioresour. Technol.*, v. 130, p. 296-305, 2013.

GHOSE, T. K., Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.*, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GUOWEIA, S.; MAN, H.; SHIKAI, W.; HE, C., Effect of some factors on production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. *Procedia Env. Sci.*, v. 8, p. 357-361, 2011.

JUTURU, V.; WU, J. C., Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, v. 33, p. 188-203, 2014.

KNOB, A.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C., β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World. J. Microb. Biot.*, p. 26, p. 389-407, 2010.

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

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; KUMAR, K.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. R., Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. *Int. Biodeter. Biodegr.*, v.88, p. 150-161, 2014.

NCUBE, T.; HOWARD, R. L.; ABOTSI, E. K.; RENSBURG, E. L. J. V.; NCUBE, I. *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. *Ind. Crop. Prod.*, v. 37, p.118-123, 2012.

PAL, S.; BANIK, S. P.; KHOWALA, S., Mustard stalk and straw: A new source for production of lignocellulolytic enzymes by the fungus *Termitomyces clypeatus* and as a substrate for saccharification. *Ind. Crop. Prod.*, v. 41, p. 283-288, 2013.

PENSUPA, N.; JIN, M.; KOKOLSKI, M.; ARCHER, D. B.; DU, C., A solid state fungal fermentation-based strategy for the hydrolysis of wheat straw. *Bioresour. Technol.*, v. 149, p. 261-267, 2013.

RAGHUWANSHI, S.; DESWAL, D.; KARP, M.; KUHAD, R. C., Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. *Fuel*, v.124, p. 183-189, 2014.

SADAF, A.; KHARE, S.K. Production of *Sporotrichum thermophile* xylanase by solid state fermentation utilizing deoiled *Jatropha curcas* seed cake and its application in xylooligosaccharide synthesis. *Bioresour. Technol.*, v.153, p.126-130, 2014.

SILVEIRA, M. H. L.; AGUIAR, R. S.; SIIKA-AHO, M.; RAMOS, L. P., Assessment of the enzymatic hydrolysis profile of cellulosic substrates based on reducing sugar release. *Bioresour. Technol.*, v.151, p. 392-396, 2014.

WAGHMARE, P. R.; KADAM, A. A.; SARATALE, G. D.; GOVINDWAR, S.P.; Enzymatic hydrolysis and characterization of waste lignocellulosic biomass produced after dye bioremediation under solid state fermentation. *Bioresour. Technol.*, 2014, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.099>

ZHANG, L.; LIU, Y.; NIU, X.; LIU, Y, W., Effects of acid and alkali treated lignocellulosic materials on cellulase/xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 and corresponding enzymatic hydrolysis. *Biomass Bioenerg.*, v. 37, p. 16-24, 2012.