

# PRODUÇÃO DE CELULASES ESTÁVEIS A TEMPERATURA E PH A PARTIR DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SOLIDO DA PALMA FORRAGEIRA

T. C. SANTOS<sup>1</sup>, G. A. DINIZ<sup>2</sup>, D. C. SANTOS<sup>2</sup>, I. P. C. SANTOS<sup>2</sup> e M. FRANCO<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica <sup>2</sup>Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais <sup>3</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas.

E-mail para contato: tcsantos@ufrj.br

**RESUMO** – Objetivou-se avaliar a utilização da palma forrageira como substrato para a produção de enzimas celulolíticas, através da fermentação em estado sólido com o auxílio do fungo filamentoso *Rhizopus sp.* A palma foi desidratada até atingir aproximadamente 2% de umidade. As variáveis avaliadas no processo fermentativo foram, a atividade de água, tempo de fermentação e atividade de água, para adequação dos modelos lineares de segunda ordem para a estimativa de superfícies de respostas. Os tempos ótimos para as enzimas produzidas pelo *Rhizopus sp.* foram em 68,12 h para a produção de endoglucanase com 7,859 U/mL e 72,48 h para celulases totais com 13,571 U/mL. As enzimas demonstraram grande tolerância a exposição em uma ampla faixa de temperatura (0 a 80°C) e pH (3 a 9) a cerca de 150 minutos com atividade relativa superior a 50% para todas as enzimas em ambas as análises. O complexo celulásico não sofre desativação considerável se armazenado congelado na temperatura de -18°C até 144 horas.

## 1. INTRODUÇÃO

A palma (*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. A 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 et al. 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, estando 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 e sua cobertura vegetal é constituída por plantas que suportam longos períodos de estiagem (CHIAICCHIO et al., 2006). Devido à sua composição 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 et al., 2010).

Dentre esses biocompostos, as enzimas são aplicadas em diversos processos industriais. Esse setor apresenta muitas iniciativas de pesquisa e desenvolvimento, resultando na elaboração 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 estender essa aplicação (PARK et al., 2005). Nesse sentido, estudar a aplicação da palma forrageira como matéria prima para bioprocessos, pode viabilizar a aplicação na produção de biocompostos (GHORAI et al., 2009). O mercado global de enzimas movimentou aproximadamente US\$ 5,1 bilhões em 2008 e a projeção estimada em 2013 foi 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).

Objetivou-se investigar a utilização da palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*) como matéria prima para a produção de enzimas celulolíticas através do processo de fermentação em estado sólido (FES) com o fungo filamentoso *Rhizopus* sp.

## **2. MATERIAIS E METODOS**

### **2.1. Material**

A palma forrageira foi coletada no campo Agrostológico da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus de Itapetinga. Após a higienização e corte foi seca em estufa de secagem (SOLAB SL 102, Piracicaba-SP, Brasil) a 65 °C por 24 horas e trituradas em moinho tipo Willey (ACB LABOR, São Paulo-SP, Brasil) a uma granulométrica aproximada de 2 mm, assim como descrito por Santos et al. (2011a). O microrganismo utilizado para a fermentação foram utilizados o *Rhizopus* sp. proveniente do Laboratório de Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais da UESB campus de Itapetinga. A cultura esporulada (em PDA HIMEDIA acidificado a pH 5,2 e inclinado) foi suspensa em solução de Tween 80 (VETEC) a 0,01% procedendo-se a contagem do número de esporos em suspensão, utilizando câmara de Neubauer dupla espelhada e microscópio binocular (SANTOS et al., 2011b).

### **2.2. Condições experimentais e Métodos Analíticos**

Os ensaios foram realizados em erlenmeyers contendo 10 g de farelo de palma. Os cultivos foram conduzidos em estufa bacteriológica refrigerada com ventilação forçada (SOLAB SL 222/CFR Piracicaba, SP – Brazil). Após o processo fermentativo, a extração realizada foi mecânica (filtração por pressão) do extrato enzimático com solução tampão de citrato de sódio (SIGMA) com o pH 4,8 a 50 mM, o extrato enzimático proveniente da fermentação foi recolhido e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C (CIENTEC CT – 6000R Piracicaba, SP – Brazil).

### **2.3. Quantificação da enzima Endoglucanase**

Para a atividade de endoglucanase, o método escolhido se baseia na dosagem de açúcares redutores produzidos pela degradação de carboximetilcelulose (CMC - QUIMICS) a 2 % (p/v) diluído previamente na solução citrato de sódio (QUIMICS) com o pH 4,8 a 50 mM, utilizando-se para tal o método do ácido dinitrosalicílico (DNS - SIGMA) (MILLER, 1959). Onde para os tubos contendo os ensaios reacionais foram adicionados 0,5 mL de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 a 50 mM, 0,5 mL de extrato enzimático e 0,5 mL de CMC, o controle na reação foram adicionados 0,5 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático. O branco da análise continha 0,5 mL de DNS e 0,5 mL de solução tampão. As amostras foram incubadas em estufa bacteriológica (SOLAB SL 222/CFR Piracicaba – SP – Brazil) a 50 °C por 10 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 0,5 mL de DNS. Os tubos foram submergidos a 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 (BEL PHOTONICS SF200DM – UV Vis – 1000 nm, Osasco – SP – Brazil). (GHOSE, 1987).

#### 2.4. Quantificação do complexo Celulases Totais (exoglucanases e endoglucanases)

A atividade de celulases totais foi determinada através da dosagem, pelo método do DNS, também através dos açúcares redutores liberados durante a degradação de uma tira de papel de filtro Whatman n° 1 medindo 1,0 cm x 6,0 cm. Para os tubos contendo os ensaios reacionais foram adicionados 1,0 mL de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 a 50 mM, 0,5 mL de extrato enzimático e uma tira de papel filtro. Para o controle na reação foram adicionados 1 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático, o controle do substrato foram adicionados 1,5 mL de solução tampão e uma tira de papel filtro (GHOSE, 1987). As amostras foram incubadas em estufa bacteriológica (SOLAB SL 222/CFR Piracicaba – SP – Brazil) a 50 °C por 60 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 3 mL de DNS. Os tubos foram submergidos a água fervente por 5 minutos, logo após foram adicionados 20 mL de água destilada para posterior medição de absorbância na faixa de 540 nm realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS SF200DM – UV Vis – 1000 nm, Osasco – SP – Brazil). (GHOSE, 1987).

#### 2.5. Cálculo das atividades enzimáticas celulolíticas

A curva padrão para a endoglucanase e celulases totais foi determinada a partir da determinação de glicose (SIGMA) nas concentrações de 0,1 a 2,0 g/L pelo método do DNS (MILLER, 1959) com posterior medição de absorbância na faixa de 540 nm realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS SF200DM – UV Vis – 1000 nm, Osasco – SP – Brazil). (GHOSE, 1987).

#### 2.6. Ensaios de termoestabilidade

Com o objetivo de se determinar a estabilidade térmica das enzimas produzidas, os extratos enzimáticos foram submetidos às temperaturas de 20 °C a 100 °C, com intervalos de 10° C durante 0 a 240 minutos. Após o tempo de reação, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos para encerrar a reação de hidrólise enzimática e seguiu a determinação das atividades enzimáticas conforme descrito anteriormente.

#### 2.7. Ensaios de estabilidade ao pH

A estabilidade ao pH foi determinada por incubação, retirando-se alíquotas durante 0 a 240 minutos incubação nos pHs: 3, 4, 5, 6, 7 e 8 em tampão citrato de sódio. A atividade de cada enzima foi avaliada de acordo com a otimização da metodologia de superfície de resposta em três repetições experimentais conforme descrito anteriormente.

## 2.8. Análises estatísticas

O planejamento fatorial  $2^{3-1}$  fracionado constituiu, em dois níveis (-1 e +1), envolvendo as variáveis independentes citadas, contou ainda com 4 repetições no pontos centrais (nível zero) para o cálculo de resíduos e erro padrão, a partir da verificação dos resultados foram aplicados na metodologia de Superfície de Resposta (SR) e do Delineamento de Box e Behnken (DBB). Assim, o planejamento fatorial consistiu em 18 ensaios e os valores das variáveis estudadas estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Valores codificados e valores reais para cada fator em estudo

Ensaio	Fatorial em valores codificados			Fatorial em valores reais		
	(X <sub>1</sub> , h)	(X <sub>2</sub> , a <sub>w</sub> )	(X <sub>3</sub> , °C)	(X <sub>1</sub> , h)	(X <sub>2</sub> , a <sub>w</sub> )	(X <sub>3</sub> , °C)
1	-1	-1	-1	24	0.786	25
2	-1	-1	+1	24	0.786	35
3	+1	-1	-1	120	0.786	25
4	+1	-1	+1	120	0.786	35
5	-1	+1	-1	24	0.903	25
6	-1	+1	+1	24	0.903	35
7	+1	+1	-1	120	0.903	25
8	+1	+1	+1	120	0.903	35
9	0	-1	0	72	0.786	30
10	0	+1	0	72	0.903	30
11	-1	0	0	24	0.865	30
12	+1	0	0	120	0.865	30
13	0	0	-1	72	0.865	25
14	0	0	+1	72	0.865	35
15	0	0	0	72	0.865	30
16	0	0	0	72	0.865	30
17	0	0	0	72	0.865	30
18	0	0	0	72	0.865	30

\* Matriz do planejamento experimental.

A análise de variância (ANOVA) para os modelos foi realizada e a importância do modelo foi examinada pelo teste estatístico de Fisher (teste F) através do teste de diferenças significativas entre as fontes de variação nos resultados experimentais, ou seja, a significância da regressão (SOR), a falta de ajuste, e o coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$ ). Em primeiro

lugar, os resultados obtidos a partir de experiências foram submetidos a análise de variância ANOVA, e os efeitos foram considerados significativos quando  $p < 0,01$ . Com um modelo polinomial de segunda ordem (Eq. (1)), dados experimentais e de regressão coeficiente foram ajustadas e coeficientes de regressão foram obtidos por regressão linear múltipla, onde  $b_0$ ,  $b_i$ ,  $b_{ii}$ ,  $b_{ij}$ , e  $b_{ijk}$  representar todo o processo constante efeito, os efeitos linear e quadrático de  $X_i$ , e o efeito de interação entre  $X_i$  e  $X_j$ ,  $X_i$ ,  $X_j$  e  $X_k$  sobre a atividade enzimática, respectivamente.

$$EA = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ijk} X_i X_j X_k \quad (1)$$

O software estatístico utilizado foi o *Statistical Analysis System*® (SAS) versão 9.3, para elaboração dos gráficos foi utilizado o software *Sigma Plot*® versão 11.0.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados experimentais para a atividade enzimática nas condições de atividade de água e tempo estudadas foram submetidos a ANOVA (Tabela 2) e análise de regressão.

Tabela 2. Ajuste de dados obtidos a partir da ANOVA para o modelos de superfície de respostas quadráticas.

	GL	SQ	MS	F	P
Endoglucanase					
Modelo	4	55,45346	13,86336	10,19	0,0006
Erro	13	17,68501	1,36039		
Falta de ajuste	14	73,05206400	5,21800457	181,18	
Erro puro	3	0,08640000	0,02880000		
Total	17	73,13846			
R <sup>2</sup>	0,7582				
Celulases Totais					
Modelo	4	207,97351	51,99338	1,61754	<0,0001
Erro	13	21,02796	1,61754		
Falta de ajuste	14	228,974976	16,3553554	1851,83	
Erro puro	3	0,026496	0,0088320		
Total	17	229,00147			
R <sup>2</sup>	0,9082				

O comportamento dos sistemas estudados pode ser descrito por um modelo polinomial de segunda ordem, onde o termo de interação entre as variáveis independentes foi não significativo ( $p > 0,01$ ). Os modelos reduzidos podem ser descritos por equações (2 - 3), em termos de valores não codificados.

Eq.2  $-4,436 + 0,101X_1 - 0,0007X_1^2 + 0,290X_3 + 0,291X_3^2$

$$\text{Eq.3} \quad -3082,322 + 0,326X_1 + 7038,565 X_2 + 8,481X_3 - 0,00240 X_1^2 - 4163,338 X_2^2 - 0,142X_3^2$$

A otimização do tempo foi de 68,12 h para a produção de endoglucanase com 7,859 U/mL e 72,48 h para celulasas totais com 13,571 U/mL.

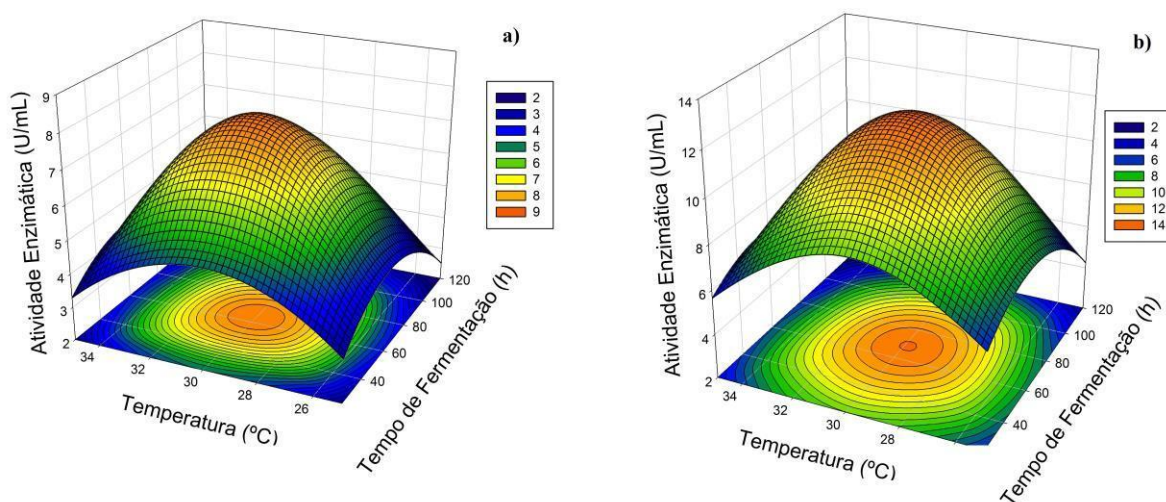


Figura 2. Superfície de resposta das atividades enzimáticas em função do tempo de fermentação e temperatura: a) endoglucanase, b) celulasas totais.

A produção das enzimas observadas as somente o complexo celulasas totais que foi verificado a otimização em relação a atividade de água em 0,875  $a_w$ . As melhores atividades enzimáticas foram encontradas em 30,41 °C para a produção de endoglucanase e 27,86 °C para celulasas totais.

Nas enzimas avaliadas neste trabalho (Figura 3.) todas permaneceram com pelo menos 75% de atividade relativa quando submetidas a 60 °C por 140 min, com destaque para a enzima endoglucanase que permaneceu 85% ativa a 80 °C depois de 240 minutos de exposição. Em relação a estabilidade ao pH (Figura 3), as enzimas demonstraram atividade relativa superior a 90% em pHs quantificados a 5 e 6 durante 240 minutos, as enzimas permaneceram ativas com 50% de atividade relativa durante 180 minutos nas demais faixas de pH (3 a 8), o que denota estabilidade estrutural e atividade ácido-alcalino-tolerante, que habilita utilização destas em diferentes processos industriais.



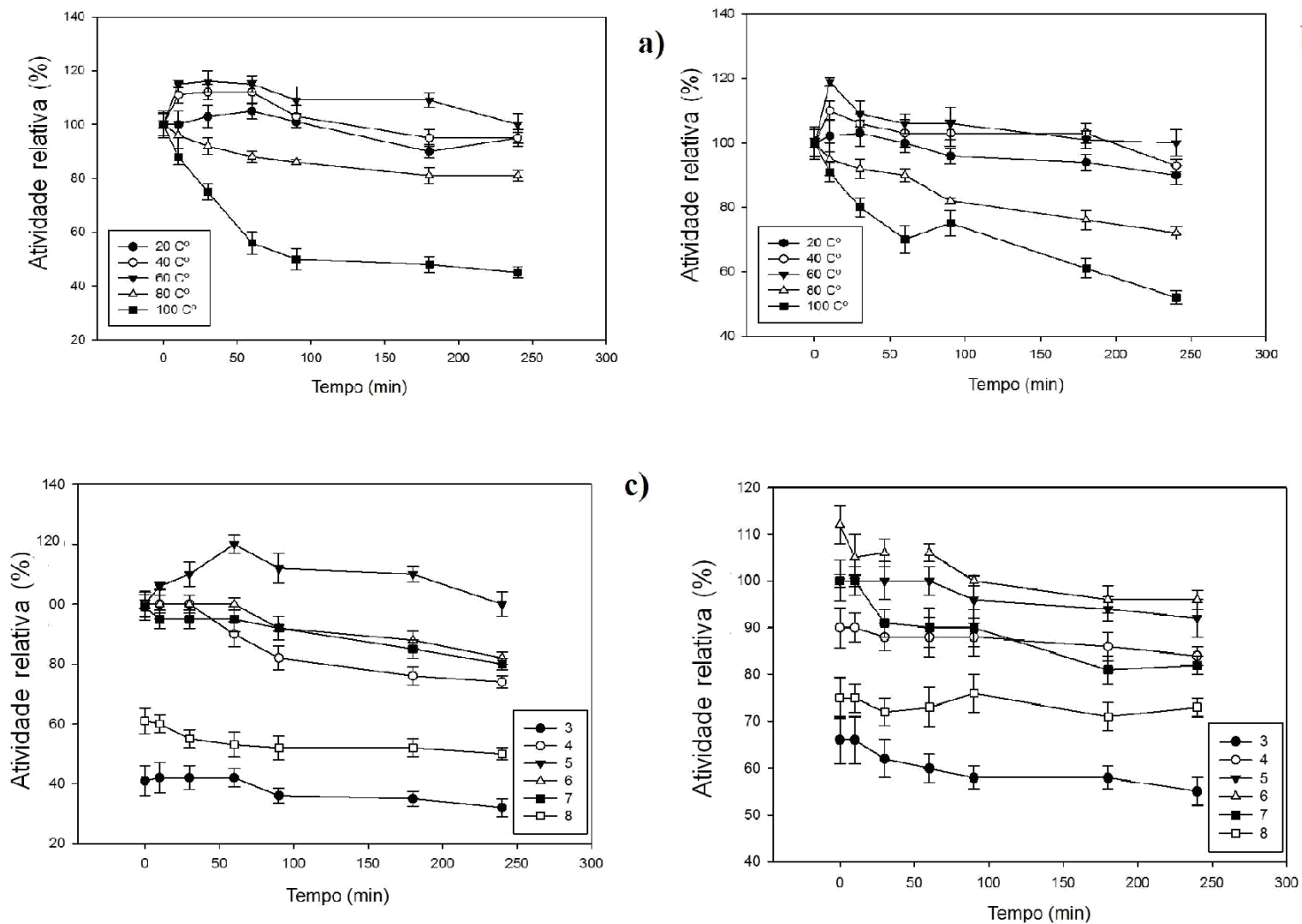


Figura 3. Termoestabilidade enzimática: a) endoglucanase, b) celulases totais. Estabilidade ao pH c) endoglucanase, d) celulases totais.

#### 4 – CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o *Rhizopus sp.* é bastante promissor, no que se diz respeito à obtenção de enzimas celulásicas com a fermentação em estado sólido da palma forrageira. As enzimas demonstraram grande tolerância a exposição em uma ampla faixa de temperatura e pH a cerca de 150 minutos com atividade relativa superior a 50%, para todas as enzimas em ambas as análises, o que indica grande relevância em aplicações industriais.

#### 5. REFERÊNCIAS

CHIACCHIO, F. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. **Bahia Agrícola**, v.7, n.3, p.39-49, 2006.

GHOSE T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de Quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v.34 n.5, p.831-840, 2011.

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

SANTOS, T. C.; ABREU FILHO, G.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma Cacao* L.): Obtenção de ligninases. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.32, p.87-96, 2011a.

SANTOS, T. C.; CAVALCANTI, I. S.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M. Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. **Ciência Rural** (UFSM. Impresso), v. 41, p. 2210-2216, 2011b.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BON, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v.101, p.4820-4825, 2010.