

ESTABILIDADE AO pH E À TEMPERATURA E EFEITO DE ÍONS SOBRE A ATIVIDADE DE ENDOGLUCANASE PRODUZIDA POR FUNGO TERMOFÍLICO EM CULTIVO SÓLIDO

F. P. CASCIATORI¹, P. A. CASCIATORI², R. da SILVA², J. C. THOMÉO¹

¹ Universidade Estadual Paulista, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos

² Universidade Estadual Paulista, Departamento de Química e Ciências Ambientais

E-mail para contato: fernandacasciatori@yahoo.com.br

RESUMO – Enzimas celulolíticas são essenciais na sacarificação do bagaço de cana para obtenção do etanol de segunda geração, mas a atividade dessas enzimas depende de variáveis como temperatura, pH e íons. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a estabilidade ao pH, à temperatura e à presença de íons do extrato celulolítico produzido pelo fungo termofílico *Myceliophthora sp.* I-1D3b por cultivo sólido em bagaço de cana e farelo de trigo (7:3 m/m). O extrato foi incubado por 1 h em três pHs e três temperaturas, após o que foi determinada a atividade de endoglucanase (CMCase) pelo método DNS, sendo as endoglucanases as enzimas do complexo celulolítico responsáveis por hidrolisar a fração amorfa da celulose. Para íons, adicionaram-se aos extratos 10 µL de soluções 1,0 mmol L⁻¹ de Zn²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Al³⁺, Ag¹⁺ e EDTA. A atividade de endoglucanase foi maior para pH 4,5 (CMCase = 332 U/g) e 57 e 94% menor em pHs 5,5 e 6,5 respectivamente, bem como foi maior para a temperatura de 55°C (CMCase = 273 U/g) e 51 e 94% menor após incubação a 65 e 75°C, respectivamente. A atividade de endoglucanase também foi reduzida pelos íons testados e por EDTA e foi nula na presença de Mn²⁺. Como a enzima é estável em pH ácido e temperaturas superiores a 50°C, tem potencial de aplicação na cadeia do bioetanol, mas sua aplicação industrial requer planejamento baseado nesses estudos de estabilidade, já que a atividade catalítica varia drasticamente para diferentes condições operacionais.

1. INTRODUÇÃO

A produção de enzimas celulolíticas tem despertado grande interesse nos pesquisadores ao redor do mundo, devido à sua possível utilização no processo de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos visando à produção do etanol de segunda geração, tendo em vista a crescente busca por fontes de energia renováveis e novas tecnologias que possibilitem a autonomia energética dos países. Cabe lembrar que, para converter os carboidratos das cadeias de celulose ou hemicelulose da biomassa vegetal a açúcares fermentescíveis, é possível optar por rotas químicas ou enzimáticas. A via química é eficiente e rápida, mas gera resíduos tóxicos que devem ser tratados, aumentando o número de operações e consumindo mais energia, tornando o processo economicamente desfavorável. Já a via enzimática é mais lenta e tem como uma das principais barreiras processos eficientes e

viáveis de produção de enzimas a custo que não inviabilize seu uso.

A fermentação em estado sólido (FES), processo biotecnológico no qual uma matriz sólida porosa é fermentada geralmente por fungos que durante seu desenvolvimento no substrato secretam enzimas para o meio extracelular, é uma alternativa interessante para obtenção de enzimas celulolíticas a serem aplicadas na produção do bioetanol. A denominação de celulasas designa uma classe de enzimas constituídas por endoglucanases (quebra a celulose na região amorfa e libera celooligossacarídeos), exoglucanases (quebra a celulose e celooligossacarídeos maiores e libera celobiose) e β -glucosidase (libera moléculas de glicose). No entanto, cada enzima produzida por microrganismos e processos diferentes poderá apresentar características particulares de atuação e estabilidade, o que pode determinar o controle de processo mais adequado para máximo aproveitamento da atividade catalítica da enzima de interesse. De um modo geral, a velocidade das reações enzimáticas, ou mais simplificada a atividade enzimática, varia com fatores diversos como concentração de enzima ou de substrato, temperatura, pH e efeito de inibidores ou ativadores enzimáticos (Nelson e Cox, 2003).

Para que a aplicação industrial seja viável, é fundamental que as enzimas apresentem certa estabilidade, ou seja, que tenham habilidade em manter sua capacidade catalítica e/ou sua conformação estrutural sob diferentes condições de reação ao longo do tempo, por exemplo, quando sujeitas à estocagem, isolamento, purificação ou várias outras manipulações físicas ou químicas. Assim, a estabilidade frente a diferentes valores de temperatura e de pH, por exemplo, são importantes parâmetros para uso de enzimas na biocatálise orgânica.

A temperatura e o pH de armazenamento ou de exposição de uma enzima são fatores indispensáveis para a manutenção de sua atividade catalítica, já que o calor e as condições extremas do meio são agentes desnaturantes. Existe um interesse especial nos microrganismos capazes de produzir enzimas que possam agir em faixas amplas de pH e serem termoestáveis (Ema *et al.*, 2003; Hou, 1994), já que enzimas termoestáveis são altamente específicas e, portanto, têm um potencial considerável para muitas aplicações industriais.

De acordo com Furigo Jr. e Pereira (2001), os efeitos do pH na estabilidade de uma enzima devem levar em conta qualquer efeito do pH na ligação do substrato e na catálise. Os sítios ativos nas enzimas são frequentemente compostos por grupos ionizáveis que devem se encontrar numa forma iônica adequada para que mantenham a conformação do sítio ativo, liguem-se aos substratos ou catalisem a reação. Além disso, os próprios substratos podem conter grupos ionizáveis e somente uma forma iônica deste substrato pode se ligar à enzima ou sofrer catálise.

Já o efeito da temperatura sobre a estabilidade de uma enzima depende de um número de fatores, que incluem o pH e a força iônica do meio e a presença ou ausência de ligantes. Alguns substratos frequentemente protegem a enzima da desnaturação pelo calor, evitando que ocorra a perda da atividade biológica da enzima. No entanto, por serem proteínas, a partir de certa temperatura e dependendo do tempo de exposição a altas temperaturas, as enzimas podem começar a desnaturar-se pelo efeito do calor (Madigan, 2004).

Além disso, certas moléculas podem inibir a ação catalítica de uma enzima, as quais são chamadas inibidores. Estes podem ocupar temporariamente o centro ativo por semelhança estrutural com o substrato original (inibidor competitivo) ou alterar a conformação espacial da enzima, impedindo sua união ao substrato (inibidor não competitivo). Normalmente, íons metálicos e agentes quelantes atuam como inibidores enzimáticos. Por outro lado, também há moléculas que podem potencializar a ação de uma enzima, sendo chamadas ativadores ou cofatores enzimáticos, que propiciam ou favorecem a interação da enzima com o substrato, podendo também ser íons metálicos ou vitaminas, dependendo da enzima (Nelson e Cox, 2003).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, por meio da atividade de endoglucanase (CMCase), a estabilidade ao pH, à temperatura e à presença de substâncias químicas do extrato celulolítico bruto produzido pelo fungo termofílico recentemente isolado *Myceliophthora thermophila* I-1D3b por cultivo sólido em bagaço de cana e farelo de trigo (7:3 m/m). O fungo escolhido é reportado na literatura como produtor de altos níveis de enzimas celulolíticas termoestáveis no substrato empregado (Zanelato *et al.*, 2012), de modo que o extrato celulolítico cuja estabilidade é estudada apresente alto potencial de aplicação para a hidrólise enzimática da biomassa vegetal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia de Processos e Biorreatores do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE/ UNESP).

2.1. Microrganismo e Substrato

Como agente fermentativo para obtenção do extrato celulolítico a ser estudado, foi empregado o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. O microrganismo pertence à coleção do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica Aplicada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José do Rio Preto, estando estocado em tubos de ensaio com Agar Sabouraud inclinado submerso em óleo mineral a -80°C . Para utilização, a cultura foi repicada em tubos e posteriormente inoculada em erlenmeyers com meio Agar Sabouraud Dextrose, os quais foram mantidos em câmara BOD por 48 horas a 45°C . Após crescimento, foram adicionados 100 mL de solução nutriente aos frascos de erlenmeyer para suspensão dos esporos.

Como substratos, foram empregados bagaço de cana e farelo de trigo. O bagaço foi doado pela Usina Vale, de Onda Verde-SP, e o farelo comprado no comércio local. Ambos os materiais foram lavados para remoção de açúcares. O bagaço foi triturado e peneirado para uniformização das fibras. Ambos os materiais foram secos em estufa a 60°C até peso constante, sendo posteriormente acondicionados em sacos de polietileno de parede espessa em câmara de refrigeração até utilização. Para os ensaios, o substrato foi autoclavado juntamente com a solução nutriente do microrganismo. Posteriormente, o substrato foi inoculado com a suspensão fúngica e o teor de umidade acertado com solução nutriente, após o que foi homogeneizado e incubado.

2.2. Fermentação em Estado Sólido

As fermentações foram realizadas em sacos de polipropileno de 12 cm x 20 cm acoplados com bocal de PVC de 3,6 cm de diâmetro, os quais foram tampados com tampão de algodão envolto por gaze, a fim de garantir a troca de gases e assegurar que não houvesse contaminação por outros microrganismos. Os tubos de PVC foram fixados aos sacos com fita adesiva, para garantir que não ocorresse troca de gases por outro local que não através dos tampões. Dentro de cada saco fermentador foi ainda colocado um arame na forma de espiral, visando a facilitar a aeração do meio e evitar a aglomeração do substrato, auxiliando no processo fermentativo.

Em cada saco plástico, foram colocados 5 g de substrato composto por bagaço de cana e farelo de trigo na proporção de 7:3 m/m e com 80% de umidade em base úmida (Zanelato *et al.*, 2012). O substrato foi inoculado com a suspensão fúngica e sua umidade foi acertada com solução nutriente composta por 0,35% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3% de KH_2PO_4 , 0,05% de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05% de CaCl_2 e 0,1% de Tween 20, pH 5,0.

Ao final do processo, a extração das enzimas foi feita por água destilada (20 mL/g de substrato seco) em câmara de agitação orbital por 30 minutos a 100 rpm. O extrato foi filtrado em tecido sintético e centrifugado a 10000 rpm por 15 min a 5°C. O sobrenadante foi tomado como solução enzimática bruta para os testes de atividade enzimática.

2.3. Determinação da Atividade Enzimática

A atividade celulolítica de endoglucanase (CMCase) foi tomada como base para análise da estabilidade do extrato celulolítico. A atividade sobre a CMC foi determinada a partir de reações contendo 0,1 mL da solução enzimática e 0,9 mL de solução de carboximetilcelulose (CMC – Sigma) a 1% em solução tamponante NaOH/ácido acético a 0,1 mol/L.

A reação deu-se em banho termostático durante 10 minutos, sendo interrompida pela adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido 1-3-dinitrosalicílico), como proposto por Miller (1959) para determinação do teor de açúcares redutores liberados na reação pelo ataque da enzima à estrutura da CMC. Em seguida, essa solução foi mantida em água em ebulição por 10 minutos, sendo a reação interrompida com o abaixamento súbito da temperatura em banho de gelo.

Posteriormente, foram adicionados 8,0 mL de água destilada à solução e, em seguida, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm, e a atividade foi calculada com base na curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de glicose por minuto de reação por mL de extrato enzimático.

2.4. Ensaios de Estabilidade em Diferentes Temperaturas e pHs

Os ensaios de estabilidade à temperatura foram realizados em pH = 5,5. Na ausência de substrato, as enzimas foram incubadas na solução tamponante por 1 hora às temperaturas de 55, 65 e 75°C. Após o tempo de incubação, foi realizado o teste de CMCase para avaliar a atividade residual

da enzima, em triplicata.

Em seguida, os ensaios de estabilidade ao pH foram realizados na temperatura de 65°C. Na ausência de substrato, as enzimas foram incubadas por 1 hora nas soluções com pHs 4,5, 5,5 e 6,5. Novamente, após a incubação foi realizado o teste de CMCase para avaliar a atividade residual, em triplicata.

2.5. Ensaios do Efeito de Inibidores ou Ativadores Enzimáticos

Foi avaliado ainda o efeito de íons ou moléculas que pudessem inibir ou ativar as celulasas. Os testes foram realizados a 65°C e pH = 5,5, utilizando soluções a 1,0 mmol/L de ZnCl₂, MgSO₄.7H₂O, MnSO₄.H₂O, CuSO₄.5H₂O, FeCl₃, AlCl₃, AgNO₃ e EDTA cálcio-dissódico, de modo que 10 µL dessas soluções foram adicionados ao extrato enzimático bruto empregado no ensaio de atividade, após o que se procedeu ao ensaio de atividade CMCase em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Estabilidade da Enzima em Diferentes Condições de Temperatura e pH

Os resultados dos ensaios de estabilidade frente a diferentes condições de temperatura e de pH do extrato celulolítico produzido pelo fungo termofílico recentemente isolado *Myceliophthora thermophila* I-1D3b por cultivo sólido em bagaço de cana e farelo de trigo são apresentados na Tabela 1. Foram consideradas as atividades residuais de endoglucanase (CMCase) após 1 hora de exposição da enzima a temperaturas e pHs típicos da reação para ensaios da atividade enzimática deste extrato.

Tabela 1 – Atividade CMCase residual após 1 hora de exposição a diferentes temperaturas e pHs.

Temperatura (°C)	pH	Atividade CMCase residual (U/gss*)	Atividade CMCase residual relativa à atividade em condições padrões** (%)
65	4,5	332	83
	5,5	142	36
	6,5	20	5
55	5,5	273	68
65		134	34
75		16	4

* U/gss = unidade de atividade de endoglucanase por grama de substrato sólido seco inicial.

** Atividade CMCase em condições padrões (T = 65°C, pH = 5,5, sem interferentes): 400 U/gss.

Como se observa, a atividade CMCase residual foi mais elevada para o extrato que foi mantido por 1 hora à temperatura fixa de 65°C e em pH 4,5 (CMCase = 332 U/g), tendo sido 57 e 94% menor para os pHs 5,5 e 6,5, respectivamente, o que indica que a alta concentração hidrogeniônica do meio com menor pH pode ter exercido um efeito protetor contra a desnaturação da enzima. Roy *et al.* (1990) estudaram a estabilidade de celulasas produzidas por *Myceliophthora thermophila* (ATCC 48104), e mostrou que sua endoglucanase purificada também foi estável apenas em estreita faixa de

pH ácido.

Quando o pH foi fixado em 5,5, a atividade CMCase residual foi mais elevada para o extrato que foi mantido por 1 hora à temperatura de 55°C (CMCase = 273 U/g), tendo sido 51 e 94% menor após incubação a 65 e 75°C, respectivamente, reiterando que, para um dado tempo de exposição da enzima ao aquecimento em pH fixo, temperaturas mais elevadas promovem efeitos de desnaturação mais intensos. Moretti *et al.* (2012) estudaram a termoestabilidade de celulasas produzidas por *Aspergillus fumigatus* e outra linhagem de *Myceliophthora thermophila*, tendo encontrado que as enzimas de ambos os fungos foram bastante termoestáveis, tendo em vista que mantiveram 90% da atividade inicial quando mantidas por 1 hora a 65°C na ausência de substrato. Tal resultado mostra que as enzimas dessa outra linhagem são mais termoestáveis que a produzida por *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, aqui estudada, uma vez que no presente trabalho a enzima manteve apenas cerca de 50% da sua atividade inicial após ter sido submetida ao mesmo tratamento.

Ainda assim, como a enzima foi relativamente estável em pH ácido e temperaturas superiores a 50°C, a mesma tem potencial de aplicação na cadeia do bioetanol, porém sua aplicação industrial requer planejamento com base nesses estudos de estabilidade, já que a atividade catalítica mostrou-se variar drasticamente para pequenas variações de temperatura e pH. Além disso, a atividade de endoglucanase do extrato reduziu-se dramaticamente devido ao longo tempo de exposição a altas temperaturas, sugerindo que a etapa de hidrólise enzimática deve ser tão breve quanto possível.

3.2. Efeito de Interferentes sobre a Atividade da Enzima

Os resultados dos ensaios do efeito da presença de íons e de EDTA sobre a atividade do extrato celulolítico produzido pelo fungo termofílico recentemente isolado *Myceliophthora thermophila* I-1D3b por cultivo sólido em bagaço de cana e farelo de trigo são apresentados na Tabela 2. Foram consideradas as atividades de endoglucanase (CMCase) obtidas quando da presença de 10 µL de soluções a 1,0 mmol/L de Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Ag^{1+} e EDTA na solução de CMC em pH 5,5 e à temperatura de 65°C.

Tabela 2 – Atividade CMCase residual na presença de interferentes.

Interferente	Atividade CMCase residual (U/gss)	Atividade CMCase residual relativa à atividade em condições padrões (%)
Zn^{2+}	11	3
Mg^{2+}	195	49
Mn^{2+}	0	0
Cu^{2+}	212	53
Fe^{3+}	265	66
Al^{3+}	282	71
Ag^{1+}	74	19
EDTA	211	53

Como se observa, a atividade de endoglucanase do extrato bruto foi reduzida por todos os íons testados e por EDTA, tendo sido nula na presença de Mn^{2+} . No entanto, como o extrato é composto

por um pool de enzimas, também pode ter ocorrido que alguns dos íons tenham interferido na atividade de outras enzimas possivelmente presentes no extrato bruto, as quais por sua vez podem ter inibido a atividade da endoglucanase, como pode ser o caso da enzima manganês-peroxidase.

Roy *et al.* (1990) também observaram significativa inativação das endoglucanases produzidas por *Myceliophthora thermophila* (ATCC 48104) na presença de Fe^{2+} , Cu^{2+} e EDTA. De acordo com estes autores, a inibição da enzima na presença de EDTA pode ser devido ao fato de o EDTA quelar certos íons metálicos requeridos para a ativação ou estabilização da enzima.

A inativação por Zn^{2+} deve alertar para os cuidados que se deve ter com relação ao material de construção dos equipamentos de processo envolvidos na etapa de hidrólise. Equipamentos em aço galvanizado, embora sejam mais resistentes à corrosão, devem ser evitados devido à possibilidade de perda de atividade da enzima devido ao contato com o zinco. Como o Al^{3+} provocou pequena redução da atividade de endoglucanase, equipamentos em alumínio podem ser empregados, caso o custo da planta de produção em aço inoxidável seja muito elevado.

4. CONCLUSÕES

A atividade de endoglucanase (CMCase) do extrato celulolítico bruto produzido pelo fungo termofílico recentemente isolado *Myceliophthora thermophila* I-1D3b por cultivo sólido em bagaço de cana e farelo de trigo foi maior após 1 hora de incubação a 65°C e pH 4,5 (CMCase = 332 U/g), tendo sido 57 e 94% menor para pHs 5,5 e 6,5, respectivamente, bem como foi maior após 1 hora de incubação em pH 5,5 a 55°C (CMCase = 273 U/g), tendo sido 51 e 94% menor para 65 e 75°C, respectivamente. A atividade de endoglucanase do extrato também foi reduzida pelos íons testados e por EDTA, tendo sido nula na presença de Mn^{2+} .

Como a enzima é relativamente estável em pH ácido e em temperaturas superiores a 50°C, a mesma tem potencial de utilização na cadeia do bioetanol, mas sua aplicação industrial requer planejamento dos parâmetros do processo e materiais de construção dos equipamentos com base em estudos de caracterização como o aqui reportado, já que a atividade catalítica e a estabilidade da enzima mostraram-se variar drasticamente mediante pequenas variações de temperatura e pH e na presença de baixas concentrações de interferentes na solução.

5. REFERÊNCIAS

- EMA, T.; KAGEYAMA, M.; KORENAGA, T.; SAKAI, T. Highly enantioselective lipase-catalyzed reactions at high temperatures up to 120°C in organic solvent. *Tetrahedron Asymmetry*, v. 14, n. 24, p. 3943-3947, 2003.
- FURIGO JR., A.; PEREIRA, E. B. Enzimas e suas aplicações: Cinética enzimática. (Apostila) 39f. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.
- HOU, C. T. pH dependence and thermostability of lipases from cultures from the ARS Culture Collection. *J. Ind. Microbiol.*, v. 13, p. 242-248, 1994.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Brock Biology of Microorganisms*. New York: Prentice Hall International Inc., 2004.

- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MORETTI, M. M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; DA SILVA, R.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. *Braz. J. Microbiol.*, p. 1062-1071, 2012.
- NELSON, D. L.; COX, M. Carbohydrates and Glycobiology. In: *Lehninger Principles of Biochemistry*. Basingstoke: Palgrave Macmillan, 2003.
- ROY, S. K.; DEY, S. K.; RAHA, S. K.; CHAKRABARTY, S. L. Purification and properties of an extracellular endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104). *J. Gen. Microbiol.*, v. 136, p. 1967-1971, 1990.
- ZANELATO, A. I.; SHIOTA, V. M.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; THOMÉO, J. C. Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora* sp. I-1D3b in a packed bed solid state fermentor. *Braz. J. Microbiol.*, v. 43, p. 1536-1544, 2012.