



## ESTUDO DO EFEITO DA VARIAÇÃO TÉRMICA NA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA DE UM EXTRATO CELULOLÍTICO

Maria Cecília Dantas de Medeiros<sup>1</sup>, Líbia de Sousa Conrado<sup>2</sup>

### RESUMO

Este trabalho tem por objetivo determinar a estabilidade do extrato celulolítico frente a variação térmica. O extrato foi obtido após a fermentação semi-sólida (FSS) do bagaço do pedúnculo de caju, sem lavar, pelo microrganismo *Aspergillus niger* mutante CCT 0916 inoculado no substrato nas condições de umidade inicial de 45%, 1% de nitrogênio, temperatura de fermentação de 30 °C. A extração do complexo enzimático foi realizada utilizando como solvente água destilada deixando 5g de substrato em contato com 30 ml do solvente por 3h a 4°C sob lenta agitação em erlenmeyers. A atividade celulolítica máxima foi de 0,15 U/mL determinada logo após processo de fermentação. A variação de temperatura utilizada para o estudo da estabilidade térmica foi de 10 a 70 °C, com intervalos de 10 °C e tempo de incubação de 20 minutos. Esse extrato celulolítico apresentou uma atividade residual de 96% da atividade máxima nas temperaturas de incubação de 30, 40, 50 e 60 °C. A 10, 20 e 70 °C houve uma diminuição da atividade do extrato celulolítico, sendo a atividade celulolítica residual de 10 e 70 iguais a 0,13 U/ml. Também foi realizada uma caracterização físico-química do bagaço do caju (Umidade, pH, açúcares redutores, °Brix, Teor de celulose).

**Palavras-chave:** estabilidade enzimática, enzimas celulolíticas, bagaço de caju.

### STUDY OF THE EFFECT OF IT VARIATION TO THE THERMAL ONE IN THE ENZYMATIC STABILITY OF AN EXTRACT CELLULOLYTIC

#### ABSTRACT

The present work aimed to determining stability of cellulolytic extract submitted to the thermal variation. This extract cellulolytic was obtained after fermentation of crushed stalk of the cashew, without washing, by microorganism mutant *Aspergillus niger* CCT 0916. The fermentation was performed with 45% initial moisture and nitrogen to 1%. The extraction of the enzyme complex was made using distilled water as solvent leaving it stay for 3 hours to 4°C. The range of temperature used was from 10°C to 70°C with intervals of 10°C. The highest cellulolytic activity registered from 0.15 U / mL. The cellulolytic extract showed a stable activity about 96% of maximum activity. At 10 °C, 20°C and 70 °C there was a decrease in activity of cell extract. Was also carried out physico-chemical characterization of bagasse of cashew (Humidity, pH, reductor sugars, content of cellulose).

**Keywords:** enzyme stability, cellulolytic enzymes, bagasse of cashew

#### INTRODUÇÃO

O Brasil é o principal produtor mundial de frutas *in natura*. Dentre estas frutas destaca-se o caju de aparência exótica, aroma agradável e sabor singular.

A cajucultura tem grande importância na fruticultura brasileira, principalmente para o Nordeste, pois representa uma atividade econômica e social de grande expressão nessa região. Conforme estudos já realizados, o pedúnculo do cajueiro é rico em vitamina C, carotenóides e compostos fenólicos. Além do potencial vitamínico, estes compostos conferem potencial antioxidante a polpa do caju.

<sup>1</sup> Aluna de Curso de Engenharia Química, Depto. de Engenharia Química, UFCG, Campina Grande, PB, E-mail: [cecilia\\_medeiros\\_22@hotmail.com](mailto:cecilia_medeiros_22@hotmail.com)

<sup>2</sup> Engenheira Química, Prof. Doutora, Depto. de Engenharia Química, UFCG, Campina Grande, PB, E-mail: [libiac@deq.ufcg.edu.br](mailto:libiac@deq.ufcg.edu.br)

O caju é rico em glicose e frutose e, dessa forma, funciona como fonte de aceptores microbianos.

A produção de pedúnculos de caju no Brasil é estimada em torno de 1,8 milhão de toneladas/ano concentrando-se basicamente na região Nordeste (Globo Rural, 2005). A área ocupada com cajueiro no Brasil é estimada em 700.000 ha dos quais, mais de 90% se encontra na região Nordeste e, 80% estão distribuídos nos estados do Piauí, Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte. Os produtos industriais são consumidos basicamente pelo mercado local e não desempenham um papel importante na economia brasileira. Além disso, grande parte do caju é perdida na colheita acumulando-se no solo. Quando o pedúnculo é industrialmente processado para a produção do suco, 40% (p/p) de bagaço são produzidos, geralmente rejeitados pela indústria local. Esses fatores tornam o bagaço um substrato interessante e de baixo custo para diversas aplicações, potenciais, como por exemplo, a produção de enzimas e de bioetanol, uma fonte limpa e renovável de energia, por fermentação e sacarificação simultâneas.

A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica envolve diferentes etapas de pré-tratamento, hidrólise (sacarificação) do etanol e recuperação. A hidrólise da biomassa é essencial para a produção de açúcares fermentáveis, que são depois convertidos em etanol por ação microbiana. Os dois métodos, ou seja, hidrólise ácida e hidrólise enzimática são empregadas principalmente para hidrólise da biomassa com diferentes rendimentos, dependendo das condições de tratamento, do tipo de biomassa e das propriedades dos agentes hidrolíticos. O primeiro é uma tecnologia madura, mas com a desvantagem da geração de resíduos perigosos e as dificuldades técnicas na recuperação do açúcar a partir do ácido. A hidrólise enzimática, porém, é mais eficiente e prossegue sob condições ambiente, sem qualquer geração de resíduos tóxicos. Este método, que está em rápido desenvolvimento, tem imensos potenciais de melhoria na eficiência e no custo. A comercialização do etanol produzido a partir de biomassa lignocelulósica é dificultada principalmente pelo custo proibitivo da produção de celulase (enzima usada para sacarificação) disponível atualmente. Essa enzima tem interesse sob o ponto de vista tecnológico e industrial, uma vez que a mesma hidrolisa as matérias lignocelulósicas (materiais indiretamente fermentescíveis) fonte para produção do bioetanol. A redução no custo de celulases só pode ser alcançada através de esforços que abordem diversos aspectos da produção enzimática a partir da matéria-prima utilizada e através da melhoria de cepas microbianas usadas na produção. A utilização de matérias-primas mais baratas e rentáveis na fermentação traz como estratégia a fermentação em estado sólido, que pode melhorar o custo da produção de celulase.

Mais recentemente, o Programa de Biodiesel tem gerado resíduos com características similares aos demais resíduos agroindustriais já citados, podendo ser incluído neste conjunto. A produção de bioprodutos, destacando-se enzimas e bioetanol, pode ser realizada através da conversão destes resíduos, que são ricos em açúcares diretamente fermentescíveis ou não, proteínas e sais minerais. Destes constituintes, chama-se a atenção para a celulose e lignocelulose, que são apropriados para a produção de bioetanol, permitindo a ampliação da matriz de energia alternativa do NE sem maiores conseqüências ambientais (Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, 2006). Em materiais lignocelulósicos, a celulose, a hemicelulose e a lignina encontram-se dispostas em um arranjo muito complexo, o que dificulta o processo de hidrólise. A rota de hidrólise pode ser química ou enzimática, e os hidrolisados contêm quantidades variáveis de monossacarídeos, tanto pentoses quanto hexoses. Possui também uma faixa grande de outros compostos, derivados da matéria-prima ou produtos de reações de açúcares e de degradação de lignina. Muitos destes compostos são co-produtos indesejáveis, que apresentam efeitos inibitórios sobre os microrganismos nas etapas subseqüentes de fermentação. O processo enzimático de hidrólise da celulose apresenta a vantagem de ser realizado em pressão atmosférica e temperatura moderada, com maior rendimento e sem a formação de subprodutos tóxicos. O custo das enzimas, no entanto, ainda se apresenta como um gargalo para um processo tecnológico competitivo. Apesar dos esforços tecnológicos empregados para aproveitamento destes resíduos a demanda ainda é muito modesta em relação à sua disponibilidade ( Bastos, 2002).

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos dos catalisadores produzidos pelo homem. Praticamente todas as reações que caracterizam o metabolismo celular são catalisadas por enzimas. Como catalisadores celulares extremamente poderosos, as enzimas aceleram a velocidade de uma reação sem, no entanto, participar dela como reagente ou produto.

As enzimas por serem proteínas globulares podem sofrer alterações estruturais devido a vários fatores tais como: variações de temperatura, de pH e processos de agitação. Várias enzimas por serem lábeis podem sofrer desnaturações reversíveis ou irreversíveis por qualquer um dos fatores acima.

Desta forma o presente trabalho teve como objetivo o estudo da termoestabilidade enzimática a partir de um extrato celulolítico obtido da matéria prima lignocelulósica, bagaço do caju, após processo de fermentação semi-sólida (FSS) utilizando-se como microrganismo metabolizador o *Aspergillus niger* mutante CCT 0916.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Unidade Acadêmica de Engenharia Química (UAEQ) do Centro de Ciências e Tecnologia (CCT) da Universidade Federal de Campina Grande – PB (UFCG).

### Material

O bagaço de caju seco foi obtido após a extração da polpa dos frutos maduros, sendo esses, previamente selecionados e lavados em água clorada. Após a extração da polpa, o bagaço foi colocado em estufa a 105 °C até obter massa constante. Após a secagem, o substrato foi passado em um moinho, colocado em sacos plásticos tipo *zipplot* e armazenados em recipientes de isopor contendo no seu interior sílica gel.

### Umidade

Para análise da umidade seguiu-se a metodologia descrita por Brasil (2005), a partir da diferença de massa da amostra úmida e a seca. Pesou-se 1g da amostra em placas de *petri*, deixando secar na estufa a 105°C por 24 horas. Após a secagem, colocaram-se as amostras em um dessecador até atingirem a temperatura ambiente sendo, em seguida, pesada novamente. Os cálculos foram realizados através da seguinte equação:

$$\text{Umidade}\% = \frac{(\text{massa inicial} - \text{massa final da amostra})}{\text{massa final da amostra}} \times 100$$

### Teor de açúcares redutores

Foi determinado seguindo o método do DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico), Miller (1959), que se baseia na redução do ácido 3,5 a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, concomitantemente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. Após aquecimento, a solução tornou-se avermelhada, sendo lida, no espectrofotômetro a 540 nm.

### °Brix

A concentração de sólidos solúveis medida em °Brix é uma medida relacionada com a quantidade de açúcares presentes na amostra. Foram adicionados 9 mL de água destilada a 1g do resíduo, agitando até perfeita homogeneização deixando suspender por 30 minutos. Após este período a suspensão foi filtrada com algodão, e feita a leitura em refratômetro.

### pH

Foi preparada uma suspensão com 10mL de água destilada e 0,5g da amostra sólida. Após homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por um período de 30 minutos, e em seguida filtrada. Depois o pH foi medido em potenciômetro digital, previamente calibrado com as soluções padrões. (Brasil, 2005).

### Teor de celulose

O teor de celulose nos materiais utilizados foi determinado conforme metodologia de Updegraff (1969) com adaptação para o tempo de hidrólise.

### Fermentação

O fermentado utilizado nesse trabalho foi obtido do bagaço de caju, com umidade inicial de 45% e 1% de fonte de nitrogênio, com concentração de inóculo de aproximadamente  $10^7$  esporos/ml de *Aspergillus niger* a temperatura de 30 °C. A fermentação foi realizada de forma descontínua em erlenmeyers contendo 5 g do substrato durante 72h. Para o presente trabalho foi utilizado o fermentado submetido a 7 horas de fermentação devido nesse tempo o extrato obtido ter apresentado a maior atividade durante todo o processo fermentativo.

## Extração da enzima

A extração do complexo enzimático foi realizada de acordo com metodologia descrita por Ruegger (2004). O extrato enzimático bruto foi obtido pela adição de 30 mL de água destilada/grama de fermentado em Erlenmeyers. Os substratos foram agitados com espátula e permaneceram em repouso por 3h a 4°C. O sobrenadante foi separado através de filtração com gaze e algodão, permanecendo congelado a -18°C em frascos de vidro tampados e rotulados até o momento da análise.

## Determinação de atividade celulolítica

A atividade de celulase foi determinada seguindo a metodologia descrita por Attili (1994). A atividade foi determinada no extrato obtido ao final da extração, usando-se uma fita de papel de filtro de 1cm x 6cm em um tubo de ensaio contendo 0,5 mL do extrato e 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5,0. Após incubação por 60 min a 50°C, a reação é interrompida pela adição de 1 mL do reagente DNS. Para desenvolvimento da cor, os tubos foram aquecidos por 5 min em banho de água fervente e, depois de esfriar por aproximadamente 5 min, foi adicionado 8mL de água destilada e os açúcares redutores foram determinados em espectrofotômetro, utilizando-se comprimento de onda de 540 nm.

Para o cálculo da atividade enzimática, foram comparados os valores de açúcares redutores após a incubação da celulose no extrato e as leituras do tubo em branco obtido nas mesmas condições, contudo, sem a fonte de celulose.

A unidade de atividade enzimática foi expressa em U/mL. 1 U de atividade foi definido como a quantidade de enzima que libera 1µmol de glicose por minuto de reação nas condições especificadas anteriormente. A atividade foi calculada de acordo com a seguir, na qual alguns fatores convertem o teor de

AR liberado de  $\frac{g}{L.hora}$  para  $\frac{\mu mol}{min \times mL}$ .

$$Atividade(U / mL) = \frac{AR_{liberado} \times 1000}{18 \times 60}$$

## Estudo da estabilidade térmica

Para tal finalidade foi usada a metodologia baseada na descrita por Zheng & Shetty (2000). Para o estudo da termoestabilidade do extrato enzimático obtido, após ser extraído de acordo com o processo de descrito anteriormente,, foi incubado em temperaturas de 10 a 70°C, em intervalos de 10°C, por 20 minutos e em seguida realizada a medida da atividade celulolítica. Os resultados foram expressos em termos da atividade residual(%):

$$Atividade\ residual\ \% = \frac{atividade_R}{atividade_{padrão}} \times 100$$

Sendo

$atividade_R$  - atividade remanescente, ou seja, a atividade medida após o processo de incubação pó 20 min nas temperaturas estudas para verificação da estabilidade térmica.

$atividade_{padrão}$  - a atividade máxima, e por isso denominada de padrão, do extrato obtido após 7 horas do processo de fermentação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização do bagaço de caju

Os valores experimentais de umidade, pH, °Brix, teor de açúcares redutores e celulose do bagaço de caju sem lavar estão expressos na **Tabela 1**.

**Tabela 1 – Resultados das análises físico-químicas do bagaço de caju sem lavar (base seca)**

| Análise      | Bagaço de caju sem lavar |
|--------------|--------------------------|
| Umidade (%)  | 6,57                     |
| pH           | 5,00                     |
| °Brix (%)    | 13,50                    |
| AR (mg/ml)   | 9,26 ± 0,10              |
| Celulose (%) | 10,70                    |

Podemos observar que o pH dos resíduos do bagaço de caju sem lavar (5,0), mostram-se adequados para a adaptação do microrganismo ao meio. Uma das vantagens em se utilizar frutas cítricas para produção de enzimas é que o microrganismo se adapta ao meio já na sua forma *in natura*.

A umidade obtida com a secagem do bagaço sem lavar (6,57%) está abaixo ao reportado por Santos et al. (2005). A quantidade de água no meio fermentativo semi-sólido é um fator limitante e afeta diretamente as necessidades metabólicas do microrganismo. É importante salientar que baixos níveis de umidade em geral apresentam baixa atividade de água o que significam baixa disponibilidade de moléculas de água livre nas proximidades das células, dificultando a troca de solutos na fase sólida, diminuindo o metabolismo e gerando menores taxas de crescimento ou de síntese de metabólitos.

Em relação ao °Brix, onde apresenta o teor de sólidos solúveis, o bagaço apresentou um teor de 13,5%, indicando que o mesmo pode ser utilizado na produção da enzima através da fermentação.

Os açúcares redutores e o teor de glicose contidos no bagaço se apresentaram com valores apreciáveis para se garantir a fermentação e obtenção da atividade celulolítica.

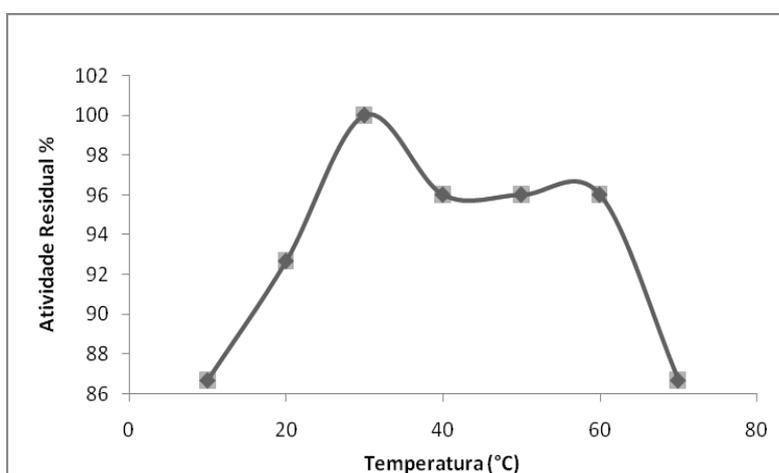
### Estudo da estabilidade térmica da celulase produzida

Durante o acompanhamento da cinética de fermentação, dados não apresentados no presente trabalho, a atividade máxima obtida do extrato celulolítico foi de 0,150 U/ml após 7h de fermentação. Esses extratos enzimáticos depois de submetido às variações de temperatura apresentaram as atividades enzimáticas apresentadas na Tabela2.

**Tabela 2 – Atividade enzimática residual após variação de temperatura de incubação**

| Temperatura °C | Atividade Remanescente (U/mL) | Atividade Residual % |
|----------------|-------------------------------|----------------------|
| 10             | 0,130                         | 87,70                |
| 20             | 0,139                         | 92,70                |
| 30             | 0,150                         | 100,0                |
| 40             | 0,144                         | 96,00                |
| 50             | 0,144                         | 96,00                |
| 60             | 0,144                         | 96,00                |
| 70             | 0,130                         | 86,70                |

A Figura 1 apresenta o comportamento da atividade residual em função da variação da temperatura de incubação.



**Figura 1: Estabilidade do extrato celulolítico frente às variações de temperatura**

Pode-se observar três comportamentos distintos da atividade residual frente à variação da temperatura. *Primeiro*: há uma diminuição da atividade máxima obtida abaixo de 30 °C, a atividade celulolítica decai a aproximadamente 88 %, esse comportamento pode ser considerado positivo uma vez que essa perda de atividade por desnaturação é reversível quando a mesma atinge 30 °C. *Segundo*: de 40 a 60 °C a estabilidade do extrato permanece constante e as atividades residuais nessas temperaturas decaem no máximo 4%. *Terceiro*: a estabilidade cai a partir de 60 °C e a 70 °C atinge o mesmo valor do que o medido a 10 °C. Não foi verificado se a desnaturação ocorrida a 70 °C é reversível ou não.

Assim, pode-se dizer que a utilização desse extrato em hidrólise enzimática não deve exceder a temperatura de 60 °C e 20 min de processamento, uma vez que, nas temperaturas abaixo de 30°C e 60° a queda da atividade residual máxima é de 12%.

## CONCLUSÕES

- O pH apresentado no substrato é comumente aquele encontrado em fermentações em que o microrganismo metabolizador é o *Aspergillus niger*.
- O teor de açúcares redutores e de celulose é favorável a produção da enzima.
- O extrato enzimático apresenta atividade máxima de 0,15 U/mL.
- O estudo da estabilidade frente à variação da temperatura demonstrou que a estabilidade decai em até 12% a partir de 60 °C. Que a temperaturas abaixo de 30 °C a enzima sofre desnaturação, porém reversível, e que a estabilidade da enzima permanece constante no intervalo de temperatura entre 40 e 60 °C tendo um decaimento de apenas 4% da atividade residual máxima.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica.

Ao aluno Daniel Portela pela ajuda na realização dos ensaios.

A EMBRAPA TROPICAL por ceder o microrganismo para a realização do presente trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATTILI, D. S. Isolamento, identificação e ecologia de fungos celulolíticos do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1994.

BASTOS, V. D. Etanol, Alcooquímica e Biorrefinarias, BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p.5-38, março, 2007.

BRASIL. Métodos Físico-Químicos para Análises de Alimentos/Ministério da Saúde, Instituto Adolfo Lutz, 2005.

GLOBO RURAL. Reforma na casa, *Globo Rural, Agropecuária, Negócios e Vida no Campo*, março, nº 233, p. 58-63, 2005.

MILAGRES, A. M. F., BORGES, L., AGUIAR, C. L. Degomagem de rami para fins têxteis utilizando extratos enzimáticos. **Anais do SHEB**, n. 4, p. 261269,1994.

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

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. Fórum de Competitividade de Biotecnologia. Estratégia Nacional de Biotecnologia. Política de desenvolvimento da bioindústria, Brasília, julho, 2006.

SANTOS, S. F. M.; Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. 2007. 130f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

UPDEGRAFF, D. M. Semimicro determination of cellulose in biological materials *Analytical Biochemistry*, V.32, p.420-424, December 1969.

ZHENG, Z.; SHETTY, K., Cranberry processing waste for solid state fungal inoculant production. *Proc. Biochem.*, v.33, pp.323-329, 2000.