

Área: Engenharia de Alimentos

AVALIAÇÃO DA CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE CELULASES VISANDO POSTERIOR APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE LIGNOCELULÓSICOS

Guilherme A. Balsan¹, Viviane Astolfi¹, Marco Di Luccio¹,
Marcio A. Mazutti², Helen Treichel^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos, URI - Campus de Erechim.

²Universidade Federal de Santa Maria - Departamento de Engenharia Química, Santa Maria – RS

*E-mail: helen@uricer.edu.br

RESUMO

A celulase possui grande aplicação em diferentes tipos de indústrias tais como têxteis, de papel, de produção de etanol a partir de biomassa, entre outras. Isso se deve ao fato de que esta enzima atua na hidrólise da celulose, o mais abundante polissacarídeo encontrado na natureza. Este trabalho teve como objetivo a caracterização parcial de uma celulase comercial objetivando a hidrólise de celulose de resíduos agroindustriais como bagaço de cana, casca de arroz e casca de soja, palha de trigo, inhame e yacon. A enzima apresentou temperatura e pH ótimo para a atividade hidrolítica na faixa de 40-50 °C e 5,2-5,5, respectivamente em tampão acetato de sódio 0,2M. A enzima apresentou alta afinidade para a casca de soja, uma vez que seu valor de Km 0,09 U.mL⁻¹ foi o menor entre os substratos.

Palavras-chave: Celulase comercial, Caracterização parcial, resíduos industriais.

1 INTRODUÇÃO

As celulases constituem um sistema complexo enzimático e apresentam especificidade para as ligações glicosídicas β -1,4 (HEDGES e WOLFE, 1997). Estas enzimas são necessárias para a solubilização completa da celulose, mesmo das regiões cristalinas, existindo sinergismo na sua forma de atuar. A degradação de materiais lignocelulósicos em açúcares monoméricos através da ação concertada de enzimas celulolíticas tem grande

importância, uma vez que os açúcares podem servir como matérias-primas para diversos processos de produção biotecnológica. A maioria dos materiais lignocelulósicos, incluindo madeiras, gramíneas e resíduos agrícolas são compostos principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, e seus altos rendimentos são importantes para a economia global (WYMAN et al, 2003).

Portanto, os materiais lignocelulósicos tornaram-se uma fonte de interesse econômico considerável para desenvolver processos biotecnológicos, pois são uma fonte de carbono de baixo custo. As celulasas oferecem uma oportunidade chave para alcançar enormes benefícios da utilização da biomassa (WEN et al, 2005).

As principais aplicações industriais de celulasas estão na indústria têxtil e de detergentes domésticos para melhorar a maciez e o brilho (CAVACO-PAULO, 1998), assim como na indústria de celulose e papel (BAJPAI, 1999). Na indústria de alimentos, essas enzimas têm sido utilizadas como auxiliares tecnológicos na extração do óleo das sementes (CHE MAN et al, 1996). No entanto, as celulasas podem se tornar o maior volume de enzimas industriais, se o etanol a partir da biomassa lignocelulósica por via enzimática tornar-se um importante combustível para transporte.

Considerando o exposto acima, este trabalho propõe caracterização de celulasas comerciais objetivando a hidrólise de celulose de resíduos agroindustriais como bagaço de cana, casca de arroz, casca de soja, palha de trigo, inhame e yacon.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Atividade de hidrólise em papel de filtro (FPase)

A enzima utilizada neste estudo foi a Novozym 1470 obtida a partir da Novozymes do Brasil. Seguindo a proposta de Mendels et. al. (1976) com algumas alterações, foram pesados 50 mg de papel de filtro Whatman número 1 (fonte de celulose) e adicionados a tubos de ensaio contendo 2 mL de tampão acetato 0,2 M, pH 5,5. Um volume de 1 mL da solução enzimática foi adicionado ao tubo em banho termostático a 50 °C por 1 hora. A liberação de

açúcares redutores totais foi medida pelo método DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade de FPase foi determinada como a capacidade da enzima em liberar 1 μmol de glicose por minuto a partir do papel de filtro original.

2.1.2 Temperatura e pH ótimo sobre a atividade da celulase

A temperatura e pH ótimo na atividade enzimática foi avaliada por meio de dois projetos composto central rotacional (CCRD) Tabela 1. No primeiro CCRD foi avaliado o efeito da temperatura e pH na faixa de 40 a 70 °C e 4,5 a 5,5, respectivamente, utilizando tampão acetato de sódio 0,2 M. Pela análise dos efeitos do primeiro CCRD, foi realizado um segundo CCRD para avaliar os efeitos da temperatura e pH na faixa de 35 a 60 °C e 5,2 a 8,0, respectivamente, utilizando tampão fosfato de sódio 0,2 M. A atividade da celulase foi determinada como descrito anteriormente e sua unidade foi expressa como FPU.mL⁻¹.

Tabela 1: Faixa de valores investigados nos dois delineamentos experimentais.

Nível	-1,41	-1	0	1	1,41
Primeiro delineamento experimental					
pH	4,5	4,6	5,0	5,4	5,5
Temperatura (°C)	40,0	44,4	55,0	65,6	70,0
Segundo delineamento experimental					
pH	5,2	5,6	6,6	7,6	8,0
Temperatura (°C)	35,0	39,0	47,0	56,0	60,0

2.1.3 Determinação das constantes de Michaelis-Menten

Ensaio enzimáticos com 1,5 FPU.mL⁻¹ de soluções enzimáticas foram realizados em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,5 à 50 °C em diferentes concentrações de substratos: 5-100 g.L⁻¹. Os substratos usados foram: papel filtro, bagaço de cana, casca de arroz, casca de soja, palha de trigo, inhame e yacon. O Km e Vmax foram determinados pelo método de Lineweaver-Burk para cada substrato.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Temperatura e pH ótimo sobre a atividade da celulase

Os resultados obtidos no primeiro CCRD mostraram que os valores de atividade da celulase obtidos experimentalmente variaram de 0,73 à 3,24 FPU.mL⁻¹ (Tabela 1). Como pode ser visto na Figura 1, a atividade da celulase máxima foi obtida para uma temperatura e faixa de pH 40-50 °C e 5,2-5,5, respectivamente. Esta região permite uma grande flexibilidade na utilização da enzima, uma vez que as variações em torno do ponto ótimo não afetam a atividade enzimática. Além disso, observa-se de que há uma tendência de que o aumento no pH e na diminuição da temperatura pode aumentar a atividade enzimática.

Com base nestes resultados, foi realizado um segundo CCRD alterando os níveis das variáveis. É importante ressaltar a necessidade de mudar o tampão, uma vez que o tampão acetato de sódio cobre uma faixa de pH 3,0-5,5. Nesse sentido, foi utilizado tampão fosfato de sódio (0,2 M), que apresenta pH entre 5,2-8,0. A atividade da enzima diminuiu, (0,09 à 1,43 FPU.mL⁻¹) quando comparados com os obtidos no primeiro CCRD usando tampão acetato de sódio (Tabela 2). Este resultado pode ser devido a alterações de íons, que podem alterar a estrutura terciária da enzima, com consequente alteração de atividade. A atividade máxima da celulase foi obtida na temperatura e pH variando entre 40 a 50 °C e 5,6 a 6,6, respectivamente (Figura 2).

No entanto, essas atividades foram inferiores aos obtidos no CCRD anterior. É importante observar a consistência dos resultados, já que a região ideal para a temperatura foi semelhante nos dois CCRD. Com base nos resultados obtidos na primeiro CCRD usando tampão acetato de sódio, verificou-se que a atividade ótima da celulase foi obtida em uma faixa de pH 5,2 - 5,5.

Tabela 1. Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com a resposta em termos da atividade enzimática em função do pH e da temperatura usando tampão acetato de sódio.

Ensaio	Ph	Temperatura (°C)	Atividade (FPU.mL ⁻¹)
1	4.6 (-1)	44.4 (-1)	2.07
2	5.4 (1)	44.4 (-1)	3.24
3	4.6 (-1)	65.6 (+1)	0.73
4	5.4 (1)	65.6 (+1)	1.10
5	4.5 (-1.41)	55.0 (0)	1.32
6	5.5 (+1.41)	55.0 (0)	2.58
7	5.0 (0)	40 (-1.41)	3.02
8	5.0 (0)	70 (+1.41)	0.76
9	5.0 (0)	55.0 (0)	2.63
10	5.0 (0)	55.0 (0)	2.71
11	5.0 (0)	55.0 (0)	2.53

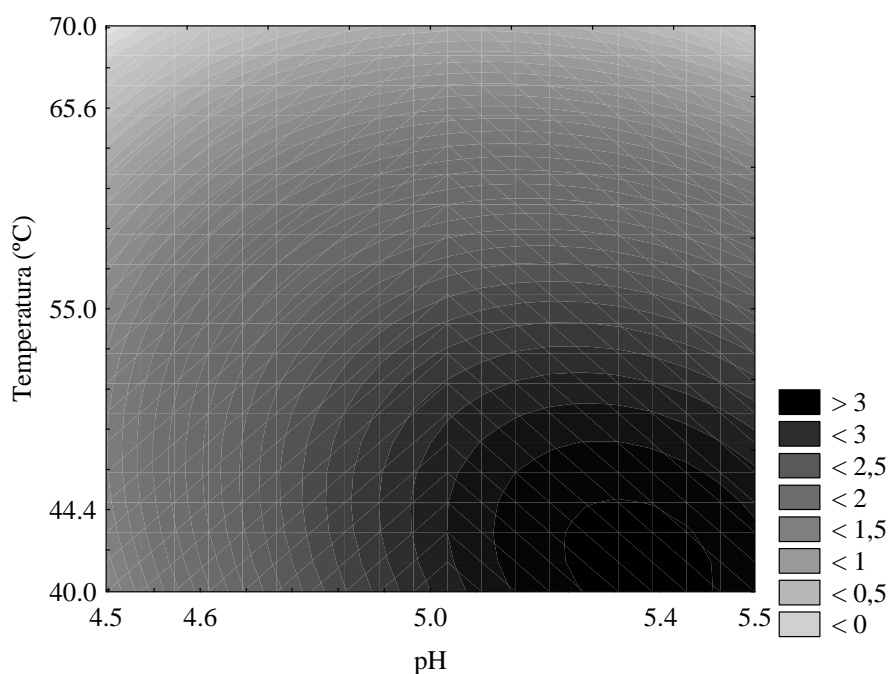


Figura 1: Curvas de nível, indicando a influência da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática obtidos no primeiro CCRD utilizando tampão acetato de sódio.

Tabela 2. Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com a resposta em termos da atividade enzimática em função do pH e da temperatura usando tampão fosfato de sódio.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade (FPU.mL ⁻¹)
1	5.6 (-1)	39.0 (-1)	0.98
2	7.6 (1)	39.0 (-1)	0.77
3	5.6 (-1)	56.0 (+1)	1.12
4	7.6 (1)	56.0 (+1)	0.17
5	5.2 (-1.41)	47.0 (0)	1.02
6	8.0 (+1.41)	47.0 (0)	0.18
7	6.6 (0)	35 (-1.41)	0.81
8	6.6 (0)	60 (+1.41)	0.09
9	6.6 (0)	47.0 (0)	1.21
10	6.6 (0)	47.0 (0)	1.30
11	6.6 (0)	47.0 (0)	1.43

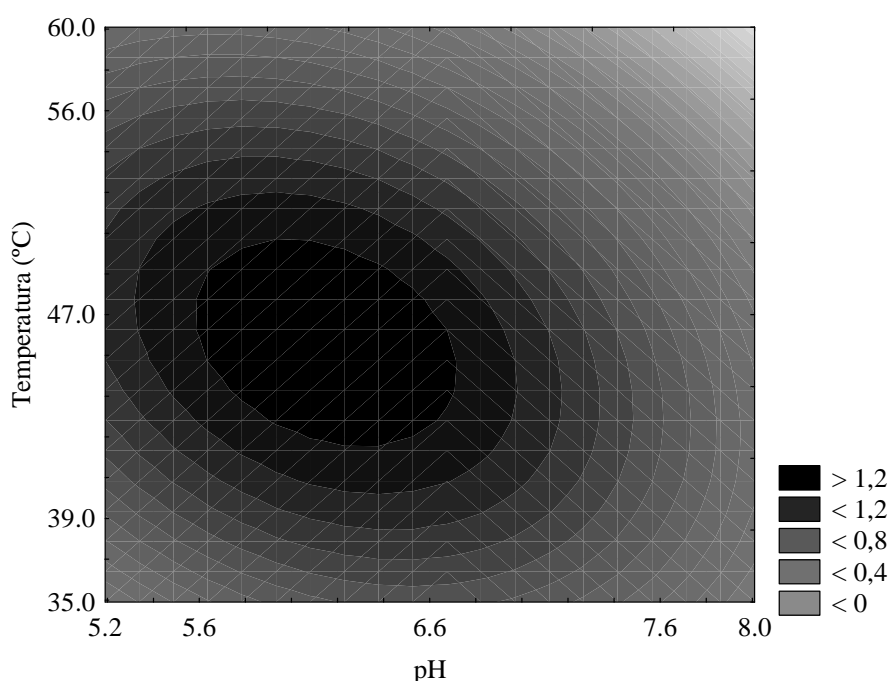


Figura 2: Curvas de nível, indicando a influência da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática obtidos no segundo CCRD utilizando tampão fosfato de sódio.

2.2.2 Efeito do substrato sobre os parâmetros de Michaelis-Menten

A Tabela 3 resume os resultados obtidos para a influência do substrato sobre as constantes cinéticas V_{max} e K_m para a celulase determinados por Lineweaver-Burk (dados não mostrados). A taxa de reação máxima (V_{max}) foi obtido para inhame seguido pelo papel filtro, palha de trigo, inhame, casca de arroz, bagaço de cana e casca de soja. A enzima apresentou alta afinidade para a casca de soja, uma vez que seu valor de K_m foi o menor entre os substratos. Yacon, bagaço de cana e casca de arroz apresentaram valores de 91,85 km, 87,97 e 77,20 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$, respectivamente, enquanto o papel de filtro e palha de trigo apresentou valores de 270,72 e 213,56 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$, respectivamente. A enzima apresentou a menor afinidade com inhame, uma vez que o valor de K_m foi de 1.207,68 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$.

Tabela 3. Efeito dos parâmetros de Michaelis-Menten da celulase para cada substrato.

Substrato	k_m ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)	v_{max} (FPU.mL ⁻¹)	R^2
Papel Filtro	270,72	1,48	0,97
Bagaço de cana	87,97	0,15	0,92
Casca de soja	21,81	0,09	0,95
Casca de arroz	77,20	0,16	0,94
Palha de trigo	213,56	0,26	0,96
Inhame	1207,68	2,19	0,94
Yacon	91,85	0,21	0,95

3 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que a atividade máxima da celulase é obtida em uma temperatura e faixa de pH de 40-50 °C e 5,2 - 5,5, respectivamente. A enzima apresentou alta afinidade para a casca de soja, uma vez que seu valor de K_m 0,09 U.mL⁻¹ foi o menor entre os substratos. Porém, a partir dos resultados obtidos durante a avaliação dos substratos agroindustriais sobre as constantes cinéticas, observou-se que a celulase apresentara resultados satisfatórios quando usado apenas para hidrolisar o polímero de celulose (papel filtro), enquanto que para os substratos agroindustriais a enzima apresenta baixo desempenho.

REFERÊNCIAS

CAVACO-PAULO, A., Mechanism of cellulase action in textile processes. *Carbohydrate Polymers*. v.37, p. 273-277, 1998.

CHE MAN, Y. B., SUHARDIYONO, A. B., ASBI, A. B., AZUDIN, M. N., WEI, L. S., Aqueous enzymatic extraction of coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. v. 73, p. 683-686, 1996.

HEDGES, A., WOLFE, R. S., Extracellular enzyme from *Myxobacter* AL-1 that exhibits both β -1,4-glucanase and chitosanase activities. *Journal of Bacteriology*. v.120, p. 844-853, 1997.

MENDELS, M., STERNBERG, D., Recent advances in cellulase technology. *Journal of Fermentation Technology*. v.54, 267-286, 1976.

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

WEN, Z., LIAO, W., CHEN, S., Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. *Bioresource Technology*. v. 96, p. 491-499, 2005.

WYMAN, C. E., DALE, B. E., ELANDER, R. T., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M.R., LEE, Y. Y., MITCHINSON, C., SADDLER, J. N., Comparative sugar recovery and fermentation data following pretreatment of poplar wood by leading technologies. *Biotechnology Progress*. v. 25, p. 333-339. 2009.