

Quantificação da atividade de CMCase e FPase produzidas a partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira

Tamires Carvalho dos Santos,

Graduanda em Eng. Ambiental, Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais – UESB
tamicarvalhods@gmail.com

**Gleydison Amarante Soares, Thiago José Onorio Rocha, Alexsandra N. Ferreira,
Clissiane Soares Viana Pacheco**

Graduandos em Química, Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais – UESB
gleydison_chemistry@hotmail.com, tjor.mqf@gmail.com, alexsandraquimica@hotmail.com,
clissianesoares@hotmail.com

Marcelo Franco

Professor do Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais - UESB
45700-000 - Itapetinga, BA
marcelofranco@cnpq.br

Resumo

O termo fermentação no estado sólido que se refere ao crescimento de microrganismos sobre matriz sólida. A palma miúda (*Nopalea cochenillifera*) cultivada na região semi-árida do Nordeste pode ser um meio de cultivo alternativo e de baixo custo econômico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de fermentação e do teor de água sobre a atividade cinética de celulasas produzidas através da espécie fúngica *Rhizopus sp.*, sendo a palma o único meio de cultivo. O método utilizado para quantificar a enzimática utilizou a carboximetilcelulose e o papel filtro como substrato. A unidade de atividade enzimática (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcares redutores, por minuto a 50 °C, açúcares quantificados pelo método do DNS. A maximização da atividade enzimática para CMCase (endoglucanase), foi 5,7 U/mL a 0,949 de atividade de água em 96 h, enquanto que para a FPase (endoglucanase + exoglucanase) foi 8,7 U/mL a 0,993 de atividade de água em 72 h. A fermentação foi realizada a 30°C em estufa bacteriológica. O fungo sintetizou ambas as enzimas sem a necessidade de qualquer indutor ou suprimento além da celulose presente no resíduo e água em diferentes concentrações.

Palavras-chave: Tempo de fermentação, Teor de água, *Rhizopus sp.*

Abstract

The term solid state fermentation refers to the growth of microorganisms on solid matrix. The palm girl (*Nopalea cochenillifera*) grown in semi-arid region of Northeast can be an alternative culture medium and low economic cost. The objective of this study was to evaluate the effect of fermentation and water content on the kinetic activity of cellulases produced by fungal species *Rhizopus sp.* The palm being the only medium. The method used to quantify the enzyme used the filter paper and carboxymethylcellulose as a substrate. The unit of enzyme activity (U/mL) was defined as the amount of enzyme capable of releasing 1 μ mol of reducing sugars per minute at 50 °C, sugars quantified by the DNS. The maximization of enzyme activity for CMCase (endoglucanase) was 5.7 U/mL to 0.949 water activity at 96h, while for FPase (endoglucanase + exoglucanase) was 8.7 U/mL to 0.993 activity water in 72h. The fermentation was conducted in a bacteriological incubator at 30 °C. The fungus synthesized both enzymes without the need of any supplies or inducer addition of the cellulose present in the waste and water at different concentrations.

Keywords: Fermentation time, water content, *Rhizopus sp.*

Introdução

O aproveitamento de biomassa regional é fundamental para a redução nos custos de produção de biocompostos. As vantagens de obtenção de produtos com alto valor agregado usando microrganismos em meio sólido, são: a obtenção de produtos concentrados; o baixo teor de umidade dos substratos, baixo consumo de água.^[1]

A fermentação no estado sólido (FES) é compreendida como o processo de crescimento de microrganismos sobre partículas sólidas. O conteúdo de líquido deve assegurar o crescimento celular e não exceder à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida.^[2]

Os fungos são os principais microrganismos decompositores de matéria orgânica. Esta atividade ocorre, sobretudo, através de sua fase vegetativa ou miceliana. Nas fases vegetativa e reprodutiva, a formação de biomassa depende da produção de enzimas extracelulares, que são fundamentais na degradação dos componentes dos substratos.^[3]

A palma miúda, largamente cultivada na região semi-árida nordestina, é apropriada para o cultivo e desenvolvimento de microrganismos conhecida também como palma forrageira e palma doce (*Nopalea cochenillifera*). Esta última é resistente, à seca, sobrevivendo com pluviosidade mínima, e pode representar um importante recurso para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido.

O conjunto de enzimas envolvidas na degradação da celulose é denominado complexo celulase. Esse complexo é dividido em três grupos: 1º) Endoglucanases (EC 3.2.1.4) - enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise e pela rápida solubilização do polímero celulósico, as quais hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor; 2º) Exoglucanases - enzimas divididas em celobiohidrolases (CBHs) e glucanohidrolases (GHs); o GHs (EC 3.2.1.91), embora raras, possuem estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois são capazes de liberar glicose diretamente do polímero; 3º) β -glicosidases (EC 3.2.1.21): enzimas que têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) em glicose.^[4,5,6]

Atualmente a atenção dos investidores em bioenergia volta-se para a etapa de hidrólise enzimática dos polissacarídeos. Esta fase é decisiva tanto para o custo quanto para a eficiência do processo de bioconversão. O emprego de enzimas específicas para degradação de biomassa vegetal é muito mais interessante que a hidrólise ácida diante do alto custo e risco ao ambiente apresentado por este último. As celulases podem ser utilizadas em várias indústrias como a de alimentos, a têxtil, a de papel e celulose, no tratamento de resíduos, entre outras.^[7,8]

O trabalho foi realizado com o objetivo de determinar o efeito do tempo de fermentação e da atividade de água sobre a cinética de produção de celulases através da fermentação em estado sólido (FES) com palma miúda (*Nopalea cochenillifera*) como substrato.

Material e métodos

Microrganismo e Substratos

A amostra foi coletada no campo Agrostológico da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus de Itapetinga. Após a higienização e corte foram secos em estufa de secagem a 70°C por 24 horas (SOLAB), e triturados moinho tipo Willey (ACB LABOR) a uma granulométrica aproximada de 2 mm. O teor de água inicial do substrato estudado foi de 2% foi obtido a partir do determinador de umidade infravermelho (MARTE ID200). A massa seca foi quantificada em 12%, determinada em estufa de secagem a 105°C (DELEO-A3 SEDT) por 24 horas. A atividade de água inicial foi 0,457.

A cultura esporulada (em PDA HIMEDIA acidificado 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 (BIOVAL L1000). Foram utilizados volumes de suspensão quantificando o valor de 10^7 esporos por grama de substrato ^[9]

Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido ocorreu em erlenmeyers (125 mL) contendo 10g dos resíduos os quais foram inoculados com 10^7 esporos por grama de substrato, após esse procedimento ocorreu à hidratação a 0,827, 0,892, 0,949, 0,988, 0,993 de atividade de água. Os cultivos foram conduzidos a 35°C em estufa bacteriológica (SL 101 SOLAB), durante 24, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação. Foram realizadas triplicatas de todo o procedimento. Após o processo fermentativo, obteve-se o extrato enzimático através de prensagem mecânica, com solução tampão de citrato de sódio (VETEC) com o pH 4,8 a 50 mM, o extrato enzimático proveniente da fermentação, foi recolhido e centrifugado a 1000 rpm por 10 min (CETRIBIO modelo 80-2B).

Dosagem de CMCase (endoglucanase)

A atividade de CMCase (endoglucanases), foi quantificada através da dosagem dos açúcares redutores produzidos pela degradação de carboximetilcelulose a 2% p/v diluído previamente na solução citrato de sódio VETEC com o pH 4,8 a 50 mM. 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 (2% p/v). No controle da reação foram adicionados 0,5 mL da 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. Todas as amostras foram incubadas em estufa bacteriológica (SOLAB SL 101) a 50 °C por 10 minutos. Após esse tempo as reações foram interrompidas com a adição de 0,5 mL da solução de ácido 3,5- dinitrosalicílico (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 de 540 nm realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV). A quantificação dos açúcares redutores foi feita a partir do método do DNS (MILLER, 1959).

Dosagem de FPase (endoglucanase e exoglucanase)

Foram adicionados 1,0 mL de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 a 50mM, 0,5 mL de extrato enzimático e uma tira de papel filtro (1x6 cm nº1 Whatman), no controle na reação foram adicionados 1,0 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático, enquanto o controle do substrato foram adicionados 1,5 ml de solução tampão e uma tira de papel filtro. Todos os tubos foram levados ao banho maria contendo água fervente por 5 minutos, logo após foram adicionados 20,0 mL de água destilada para posterior medição de absorbância a 540 nm realizada em espectrofotômetro BEL PHOTONICS 2000 UV (Ghose, 1987).

Quantificação da atividade enzimática

A curva padrão foi feita a partir da determinação de glicose nas concentrações de 0,2 a 1,0 g/L pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico DNS^[10]. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcares redutores, por minuto a 50 °C, onde a atividade enzimática expressa em U por grama de substrato (U/g). A absorbância foi medida no espectrofotômetro a 540 nm.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por análises de regressão com base em três repetições experimentais. A análise de variância (ANOVA) para os modelos foi realizada e a sua importância examinada pelo teste estatístico de Fisher (teste F). O software estatístico utilizado foi o *Statistical Analysis System* (SAS®) versão 8.0.

Resultados e discussão

Durante o processo de fermentação em estado sólido o fungo degradou a biomassa vegetal através da produção de enzimas extracelulares. Na tabela 1 são apresentados os valores obtidos durante os ensaios com base em três repetições experimentais.

Tabela 1: Atividades das enzimas CMCase (endoglucanase) e FPase (endoglucanase e exoglucanase) em cinco tempos e cinco atividades de água.

CMCase (U/g)					
Tempo (h)	0,827(a _w)	0,892(a _w)	0,949(a _w)	0,988(a _w)	0,993(a _w)
24	1,189	1,503	1,907	2,266	1,055
48	1,391	1,773	2,401	2,647	1,907
72	2,401	2,468	2,737	4,195	2,378
96	2,625	3,298	3,792	5,070	2,737
120	2,984	4,240	4,644	4,666	2,917

FPase (U/g)					
Tempo (h)	0,827(a _w)	0,892(a _w)	0,949(a _w)	0,988(a _w)	0,993(a _w)
24	2,154	3,074	3,814	4,644	5,003
48	2,715	4,083	4,958	5,339	6,080
72	4,038	4,734	5,295	5,990	8,211
96	6,057	6,753	7,089	7,560	7,067
120	4,644	5,519	6,125	6,842	6,753

Na tabela 2 são apresentados os modelos reduzidos para cada atividade de água os coeficientes de variação para cada equação. Os resultados indicam que todos os modelos são estatisticamente significativos ($F >$ valor crítico, valor $P < 0,05$).

Tabela 2: Modelos de ajuste de dados obtidos a partir da análise de regressão, equações ajustadas em função do tempo de fermentação (t).

Atividade de água	Equação	R ²	Coefficiente de Variação
CMCase			
0,827	$1,378 - (0,0266 * t) + (0,000818 * t^2) - (0,00000406 * t^3)$	0,964	8,824
0,892	$1,737 - (0,0230 * t) + (0,000593 * t^2) - (0,00000189 * t^3)$	0,988	9,528
0,949	$1,818 - (0,000712 * t) + (0,000236 * t^2) - (0,000000270 * t^3)$	0,991	5,206
0,988	$3,904 - (0,130 * t) + (0,00291 * t^2) - (0,0000147 * t^3)$	0,845	7,987
0,993	$-0,179 + (0,0616 * t) - (0,000444 * t^2) + (0,00000122 * t^3)$	0,999	2,520
FPase			
0,827	$5,672 - (0,251 * t) + (0,00506 * t^2) - (0,0000253 * t^3)$	0,976	13,363
0,892	$5,057 - (0,150 * t) + (0,00338 * t^2) - (0,0000174 * t^3)$	0,926	4,196
0,949	$4,784 - (0,0825 * t) + (0,00220 * t^2) - (0,0000118 * t^3)$	0,901	3,044
0,988	$6,278 - (0,122 * t) + (0,00268 * t^2) - (0,0000135 * t^3)$	0,954	6,892
0,993	$2,563 + (0,108 * t) - (0,000459 * t^2) - (0,00000135 * t^3)$	0,820	1,521

Nas figuras 1 e 2 estão representados atividade enzimática (U/mL) para as enzimas CMCase e FPase, respectivamente, em função da teor de água (%) e do tempo de fermentação (h).

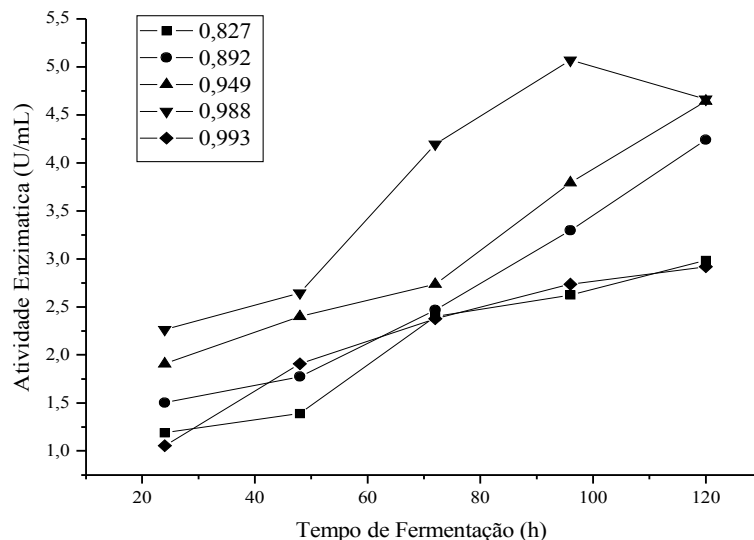


Figura 1. Efeito do tempo de fermentação e umidade sobre a atividade de CMCase (endoglucanase).

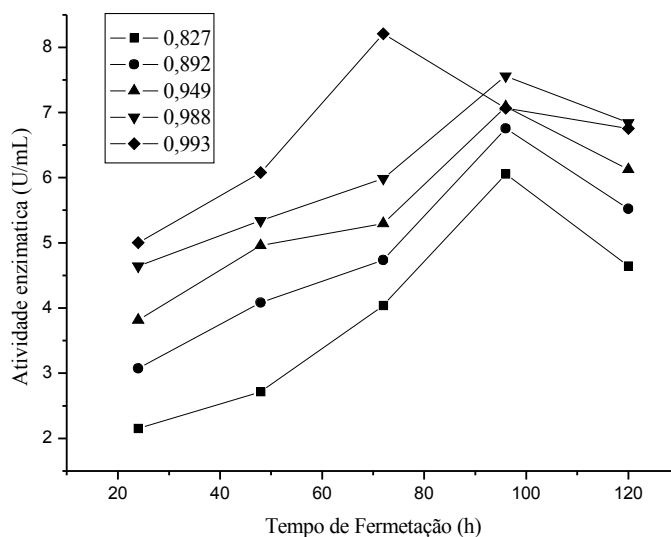


Figura 2. Efeito do tempo de fermentação e umidade sobre a atividade de FPase (endoglucanases e exoglucanases).

A Figura 1 apresenta a variação do tempo de fermentação e do teor de água sobre a atividade enzimática da CMCase, o fungo *Rhizopus sp.* obteve crescimento considerável em todas as umidades testadas, apresentando destaque a 0,988 de atividade de água, a qual apresentou a maior produção estimada em 96 horas de fermentação com uma atividade enzimática quantificada a 5,7 U/g, em 120 horas, na com o mesmo teor de água foi observado uma redução de 9,92%, onde a atividade enzimática foi quantificada à 4,66 U/g. Nos demais teores de água foi observado que a atividade não decaiu em

relação ao tempo de fermentação. Já a Figura 2 apresenta a variação do tempo de fermentação e da umidade sobre a atividade enzimática da FPase onde o microrganismo selecionado obteve crescimento considerável em todas as umidades testadas, apresentando destaque a 95% de umidade, a qual apresentou a maior produção estimada em 72 horas de fermentação com uma atividade enzimática quantificada a 8,7 U/g, no mesmo teor de água foi notado um decaimento do potencial enzimático 21,59%, onde a atividade enzimática foi quantificada à 6,753 U/g. Nos outros níveis de água os máximos para atividade enzimática ocorreram a 96 horas com decaimento em 120 horas.

A umidade é um fator crítico para o crescimento de fungos em substrato sólido. Como a quantidade de água é sempre limitada, o controle do nível de umidade é essencial para a otimização do processo em estado sólido. O teor de água adequada para o substrato deve permitir a formação de um filme de água na superfície, para facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e oxigênio. Entretanto, os espaços entre as partículas devem permanecer livres para permitir a difusão de oxigênio e a dissipação de calor. ^[11, 12]

Enzimas geralmente apresentam mecanismo de controle da expressão que podem ser estimulados ou inibidos por compostos secretados. Produtos de uma via metabólica são frequentemente inibidores das enzimas que catalisam essa rota. Esse mecanismo é conhecido como *Feedback* negativo ou auto-alimentação. ^[13] Em trabalhos com malte de milho, observou-se que a produção de enzimas, a princípio, é lenta, acelerando posteriormente até alcançar seu máximo, após esse processo, a concentração de produtos inibe a enzima provocando sua redução, fato também observado nesse trabalho. Obtiveram maior rendimento de hidrólise do amido de mandioca por *Aspergillus niger* após 72 horas de fermentação concordando com o decréscimo na atividade da enzima com o aumento do tempo de incubação pode ser devido à produção de co-produtos resultante do metabolismo microbiano, além do esgotamento de nutrientes, inibindo o crescimento do fungo e a formação da enzima. ^[13,14,15,16]

A literatura mostra a produção de endoglucanases por actinomicetos, em especial *Streptomyces*, em diferentes substratos. Uma estirpe de *Streptomyces*, a T3-1, produziu 40,3 U/mL em 1,5% de CMC e sulfato de amônio, uréia e peptona ^[17], porém a estirpe era transformante, e os nutrientes utilizados não eram substratos de baixo custo. *Streptomyces* sp. isolada de solo do Canadá foi cultivada em uma solução de sais de Mandel contendo peptona, tween 80 em 1,0% de celulose cristalina e produziu 11,8 U/mL de CMCase^[18], enquanto *Thermomonospora* sp., um actinomiceto alcalotermofílico ^[19] quando cultivado em meio contendo celulose de papel em pó, extrato de levedura e Tween 80, apresentou um pico de atividade de 23 U/mL, enquanto que quando cultivada em farelo de trigo a atividade foi de 8,5 U/mL. Em trabalhos envolvendo a quantificação da atividade de FPase por fungos se encontram disponíveis. Em *Penicilium brasilianum* IBT 20888, quando cultivado em biorreator em meio contendo extrato de levedura e madeira de um tipo de pinheiro submetido à explosão a vapor, valores de 0,59 U/mL de FPase^[20]. *Trichoderma viride* NCIM 1051 em 1,0% de bagaço de cana tratado com NaOH resultou em uma atividade FPásica de 0,4 U/mL^[21].

Conclusões

Os resultados indicam que a estirpe de *Rhizopus* sp. é bastante promissora, no que se diz respeito à obtenção de enzimas celulósicas, a análise obtida indica que para a CMCCase o tempo ótimo foi de 96 horas de fermentação com estimativa de produção de 5,070U/g a 90% de teor de água. Para FPase a melhor condição encontra-se próximo a 72 horas de fermentação para uma produção enzimática de 8,211U/g a 95% de teor de água. Em todos os trabalhos citados anteriormente os tempos de incubação variaram de 7 a 15 dias, bem maiores que aqueles utilizados em nosso trabalho. É importante também ressaltar que não foi utilizado nem um tipo de indutor, suprimento ou hidrólise no resíduo. Futuramente novos experimentos poderão ser realizados com variáveis e diferentes substratos. A FES é uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para a reutilização dos resíduos, diminuindo passivos ambientais bem como a valorização econômica desses rejeitos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de ITI (Iniciação Tecnológica Industrial) e ao Banco do Nordeste (BNB) pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] R. Gutierrez; M. Favela et al., Curso de Fermentaciones em médio sólido. Biotecnologia para el aprovechamiento de residuos agroindustriales e municipales. Jaguariúna: EMBRAPA 1992.
- [2] V. L. Del Bianchi; D. M. F. Capalbo et al., Fermentação em estado sólido. In: Biotecnologia Industrial, Coord. Schmidell, W. et al., 247-276, 2001.
- [3] M. A. Velazquez-Cedeño, G. Mata, J. M. Savoie. Waste reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulpe changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 18, n. 3, p. 201-207, 2002.
- [4] N. Reddy; Y. Yang, Biofibers from agricultural by products for industrial applications, trends in Biotechnology 23 (2005) 22-27.
- [5] A. V. Gusakov; T. N. Salanovich et al., Design of Highly Efficient Cellulase Mixtures for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 97 (2007) 1028-1038.
- [6] R. Kumar; S. Singh et al., Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35 (2008) 377-391.
- [7] G. Laufenberg, B. Kunz, M. Nystrom. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; (B) Practical implementations. *Bioresource Technology*. 2003;87(2):167-98.
- [8] M.J.S. Ruegger, Tauk-Tornisielo SM. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. 2004;27(2):205-11.
- [9] T.C. Santos, G. Abreu Filho, T.J.O. Rocha, M. Franco. Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma Cacao L.*): Obtenção de ligninases. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 32, n. 1, p. 87-96, 2011.
- [10] G. L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1 (1959) 426-28.
- [11] P. Gervais, P. Molin. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2003;13(1):85-01.
- [12] C. Sanchez. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv*. 2009;27(2):185-94.
- [13] J.R. Whitaker, "Principles of enzymology for the food sciences", DEKKER: Boca Raton, New York, 1994.
- [14] J.P.M. Biazus; R.R. Souza et al., Otimização da secagem do malte de Zea mays. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26 (2006) 787-792.
- [15] A.M. Omemu, A.M.; L. Akpan et al., Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil. *African Journal of Biotechnology*, 4 (2005) 19-25.

- [16] S. Alva; J. Anupama et al., Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus sp.* JGI 12 in solid state culture. *African Journal of Biotechnology*, 6 (2007) 576-581.
- [17] A. Gupta; N. Gautam et al., Optimization of α -amylase production from free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research*, 1 (2010) 1-8.
- [18] H. Jorgensen; L. Olsson, Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, 38 (2006) 381–390.
- [19] F. Alani; W.A. Anderson et al., New isolate of *Streptomyces sp.* with novel thermoalkalotolerant cellulases. *Biotechnology Letters*, 30 (2008) 123-126.
- [20] S.P. George; A. Ahmad et al., Studies on carboxymethyl cellulose produced by an alkalothermophilic actinomycete. *Bioresource Technology*, 77 (2001) 171– 175.
- [21] H. Jorgensen; L. Olsson, Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, 38 (2006) 381–390.
- [22] M.G. Adsul; J.E. Ghule et al., Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydrate Polymers*, Bromsgrove, 57 (2004) 67-72.