

## PRODUÇÃO DE CELULASES POR RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Erica Cruz (\*), Edite Andrade Costa, Andréia Boechat Delatorre, Meire L. L. Martins.

\*Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ, Brasil.

E-mail: [ericapurac@gmail.com](mailto:ericapurac@gmail.com)

### RESUMO

Questões ambientais têm alavancado o interesse por fontes renováveis e os resíduos agroindustriais tornaram-se uma fonte importante para a produção de novos materiais, de produtos químicos e de energia. O desenvolvimento e implementação de processos sustentáveis capazes de converter biomassa em vários produtos com valor agregado é uma necessidade absoluta para aproveitar resíduos agroindustriais e gerar menor impacto ambiental. A substituição da celulose pura comumente utilizada como substrato indutor da síntese enzimática por substratos relativamente mais baratos como o bagaço de cana-de-açúcar tem se mostrado efetiva para a redução do custo de produção das celulases (Muthukrishnan, 2007). A farinha da casca de maracujá, um subproduto da indústria processadora de suco de maracujá, rica em celulose e hemicelulose além de minerais e pectina, foi efetiva como co-substrato para a produção de celulases pela bactéria *Bacillus licheniformis* SMIA-2 (Costa et al., 2017). Da mesma forma, a substituição de fontes caras de nitrogênio no meio de cultura, como o extrato de levedura e extrato de carne, pela água de maceração de milho, um subproduto de baixo custo da indústria de moagem de milho e disponível em larga escala, tem sido explorada por diversos pesquisadores (Parekh et al., 1999). Neste trabalho as concentrações do bagaço de cana de açúcar, água de maceração de milho (AMM) e farinha da casca de maracujá (FCM) foram otimizadas para a produção de celulases usando a bactéria *Bacillus licheniformis* SMIA-2, visando formular um meio de baixo custo, como alternativa aos meios caros usados atualmente agregando valores aos resíduos da agroindústria e ajudando os problemas ambientais decorrentes de incorretos descartes desses resíduos.

### METODOLOGIA

Para realização deste estudo, foi utilizado uma cultura bacteriana gram-positiva, aeróbica, termofílica e formadora de esporos capaz de produzir enzimas termoestáveis, como celulases (Ladeira et al. 2015). A bactéria foi isolada de uma amostra de solo coletada na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. A análise filogenética mostrou que essa cepa é um membro do grupo de rRNA do *Bacillus* 5 (Souza e Martins, 2001). Bernardo et al. (2020), realizaram um resequenciamento do genoma e revelaram que o SMIA-2 se agrupou com a cepa do tipo *Bacillus licheniformis* Gibson 46 (ATCC 14580T) com 100% de similaridade. Segundo esses autores, as atividades enzimáticas termoestáveis do SMIA-2 poderiam ser suportadas por inventários de genes, incluindo cinco genes da amilase; 13 loci para o metabolismo da xilose, 55 loci associados à degradação de proteínas e três loci de enzimas celulolíticas (por exemplo, endoglucanase) sob um complexo putativo de celulosoma.

O meio de cultura utilizado para a produção de celulase continha (g / L de água destilada): KCl - 0,3, MgSO<sub>4</sub> - 0,5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,87, CaCl<sub>2</sub> - 0,29, ZnO - 2,03x10<sup>-3</sup>, FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O - 2,7x10<sup>-2</sup>, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O - 1,0x10<sup>-2</sup>, CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O - 8,5x10<sup>-4</sup>, CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O - 2,4x10<sup>-3</sup>, NiCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O - 2,5x10<sup>-4</sup>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 3,0x10<sup>-4</sup>, bagaço de cana (SCB) (81,05% de celulose, 18,75% de hemicelulose, 5,45% de lignina) - 0,3%, licor comercial de maceração de milho (Sigma Aldrich) - 0,3% e farinha de casca de maracujá (obtida no mercado local) - 0,3% (Paixão et al., 2016).

O meio de cultura (50 mL em frascos Erlenmeyer de 250 mL) foi inoculado com 4 mL do inóculo e incubado a 50°C em um agitador orbital (Thermo Forma, Ohio, EUA), operando a 150 rpm durante 168 horas. A otimização das condições do meio de cultivo foram elaboradas seguindo um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2<sup>3</sup>, em relação às variáveis independentes, bagaço de cana de açúcar tratado (BCT), água de maceração de milho (AMM) e farinha da casca de maracujá (FCM), com cinco repetições do ponto central e seis pontos axiais, totalizando 19 ensaios. A temperatura e a agitação serão mantidas a 50 °C e 150 rpm, respectivamente.

As atividades da carboximetilcelulase (CMCase) e da avicelase foram determinadas baseando-se na técnica descrita por Tanaka et al. (1995) que consistiu em conduzir a hidrólise de uma solução de carboximetilcelulose 1,0% (p/v) em tampão Tris-HCl (0,05M e pH 8,0) para a atividade da fração CMCase e de uma suspensão a 1,0% (p/v) no mesmo tampão, de celulose microcristalina (avicel) para a avicelase. A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS. A curva padrão foi feita a partir de glicose, nas concentrações de 0,2 a 1,0 g/L.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2<sup>3</sup> e posterior construção das superfícies de resposta foram utilizados para avaliar os efeitos das concentrações de bagaço de cana de açúcar (BC), farinha da casca do maracujá

(FCM) e água de maceração de milho (AMM) sobre a atividade da avicelase a fim de determinar as condições ótimas para se obter a máxima secreção dessas enzimas por *Bacillus licheniformis* SMIA-2. Na Tabela 1 está apresentada a Matriz do DCCR para a atividade da avicelase e CMCCase (U/mL).

**Tabela 1 - Matriz do DCCR 2<sup>3</sup> para a atividade da Avicelase e da CMCCase com os valores reais e codificados das variáveis independentes.**

Ensaio	FMC <sup>1</sup> (%m/V)	Bagaço (%m/V)	AMM <sup>2</sup> (%m/V)	Avicelase (U.mL <sup>-1</sup> )	CMCase (U.mL <sup>-1</sup> )
1	0,322 (-1)	0,322 (-1)	0,322 (-1)	1,961	0,308
2	0,828 (+1)	0,322 (-1)	0,322 (-1)	1,964	0,348
3	0,322 (-1)	0,828 (+1)	0,322 (-1)	1,044	0,334
4	0,828 (+1)	0,828 (+1)	0,322 (-1)	1,083	0,378
5	0,322 (-1)	0,322 (-1)	0,828 (+1)	1,214	0,367
6	0,828 (+1)	0,322 (-1)	0,828 (+1)	0,857	0,374
7	0,322 (-1)	0,828 (+1)	0,828 (+1)	1,974	0,189
8	0,828 (+1)	0,828 (+1)	0,828 (+1)	1,752	0,486
9	0,150 (-1,68)	0,575 (0)	0,575 (0)	1,575	0,340
10	1,00 (+1,68)	0,575 (0)	0,575 (0)	1,379	0,416
11	0,575 (0)	0,150 (-1,68)	0,575 (0)	1,360	0,331
12	0,575 (0)	1,000 (+1,68)	0,575 (0)	1,741	0,427
13	0,575 (0)	0,575 (0)	0,150 (-1,68)	0,871	0,352
14	0,575 (0)	0,575 (0)	1,000 (+1,68)	1,662	0,389
15	0,575 (0)	0,575 (0)	0,575 (0)	0,849	0,457
16	0,575 (0)	0,575 (0)	0,575 (0)	0,820	0,367
17	0,575 (0)	0,575 (0)	0,575 (0)	0,916	0,388
18	0,575 (0)	0,575 (0)	0,575 (0)	0,920	0,367
19	0,575 (0)	0,575 (0)	0,575 (0)	0,852	0,388

<sup>1</sup>Farinha da casca de maracujá    <sup>2</sup>Água de maceração de milho

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4 a atividade da avicelase variou de 0,820 (Ensaio 16) a 1,974 U/mL (Ensaio 7). A maior atividade da avicelase foi obtida quando *Bacillus licheniformis* SMIA-2 foi cultivado em meio líquido contendo 0,322% (m/V) de FCM, 0,828% (m/V) de BC e 0,828% (m/V) de AMM durante 168 horas de fermentação.

Costa et al. (2017), relatou a produção de Avicelase por *Bacillus* sp SMIA-2 quando cultivado em culturas submersas contendo BC, AMM. A maior atividade foi obtida quando o micro-organismo foi cultivado em BC (0,625 % m/V) e AMM (0,625 % m/V) por 168 horas. Ainda segundo estes autores a adição da farinha da casca de maracujá ao meio de cultura otimizado, aumentou a atividade da enzima (2,73 U.mg proteína<sup>-1</sup>).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, a atividade da CMCCase variou de 0,189 (Ensaio 7) a 0,486 U/mL (Ensaio 8). Analisando os parâmetros estudados, verificamos que a atividade máxima da CMCCase foi obtida quando *Bacillus licheniformis* SMIA-2 foi cultivado em meio líquido contendo 0,828% (m/V) 33 de farinha da casca de maracujá, 0,828% (m/V) de bagaço de cana e 0,828% (m/V) de água de maceração de milho durante 168 horas de fermentação.

Cirigliano et al. (2013) otimizou a produção de CMCCase por *Streptomyces misionensis* estirpe PESB-25 usando a metodologia de superfície resposta. Observou-se um acúmulo de CMCCase 1,01 U.mL<sup>-1</sup> num meio com bagaço de cana de açúcar (1,0% m/v) e água de maceração de milho (1,2% m/v) durante 72 horas de fermentação.

## CONCLUSÃO

A otimização das condições do meio de cultivo utilizando delineamento composto central rotacional (2<sup>3</sup>), em relação às variáveis independentes, concentração de farinha da casca do maracujá (FMC), concentração água de maceração de milho (AMM) e concentração de bagaço de cana de açúcar (BC), demonstrou que *Bacillus sp.* SMIA-2 produziu maiores atividades de Avicelase (1,974 U.mL<sup>-1</sup>) e CMCCase (0,486 U.mL<sup>-1</sup>) quando cultivado em meio de cultivo a base de farinha da casca de maracujá (0,828% m/V), água de maceração de milho (0,828% m/V) e bagaço de cana de açúcar (0,828% m/V) por 168 horas de fermentação, com um limite de confiabilidade de 95%. Foi demonstrado que *Bacillus licheniformis* SMIA-2 possui boa capacidade de produzir celulases em fermentação submersa a partir de resíduos agroindustriais de baixo custo. Uma opção viável, do ponto de vista econômico, para a obtenção das celulases.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bernardo, S.P.C., Rosana, A.R.R, Souza, A.N., Chiorean, S., Martins, M.L.L., Vederasb, J.C. (2020). **Draft Genome Sequence of the Thermophilic Bacterium *Bacillus licheniformis* SMIA-2, an Antimicrobial- and Thermostable Enzyme-Producing Isolate from Brazilian Soil.** *Microbiology Resource Announcements*, 1-3. doi:http://doi:10.1128/MRA.00106-20.
2. Cirigliano F, Novaes M, Rezende RC, Gravina MPO, Pereira PHF, Nascimento RP, Bon EPS, Macrae A, Coelho RRR.(2013).**Streptomyces misionensis PESB-25 produces a thermoacidophilic endoglucanase using sugarcane bagasse and corn steep liquor as the sole organic substrates.***BioMed Research International*. 2013:2013.
3. Costa, E. A., Fernandes, R. N., Cruz, E., Moraes, L. P., Carvalho, R. V., Martins, M. L. L. (2017). **Sugarcane bagasse and passion fruit rind flour as substrates for cellulase production by *Bacillus sp.* SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil.** *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2, 1-8. doi:https://doi:10.23880/OAJMB-16000115.
4. Ladeira, S. A., Cruz, E., Delatorre, A. B., Barbosa, J. B., Martins, M. L.L. (2015). **Cellulase production by thermophilic *Bacillus sp.* SMIA-2 and its detergent compatibility.** *Electronic Journal of Biotechnology*, 18, 110-115. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.12.008.
5. Muthukrishnan, R., (2007). **Characterisation of cellulase from organisms isolated from rumen fluid.** *Pharmaceutical Reviews*, 3.
6. Parekh, M., Formanek, J, Blaschek, H.P. (1999). **Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA 101 using a low-cost corn steep water based fermentation medium.** *Applied Microbiology Biotechnology*, 51:152-157.
7. Souza, A.N., Martins, M.L.L. (2001). **Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*.** *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 271-275. doi:https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822001000400003.
8. Tanaka, K.T.; Kawaguchi, Y.; Imada, T.; Arai, M. **Purification and properties of cellobiose phosphorylase from *Clostridium thermocellum*.** *J. Ferment. Bioeng.* 79:212–216, 1995
9. Tanaka, K.T., Kawaguchi, Y., Imada, T., Arai, M. (1995). **Purification and properties of cellobiose phosphorylase from *Clostridium thermocellum*.** *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79: 212-216.