

Produção de Carboximetilcelulase e Avicelase pelo *Bacillus* sp SMIA-2

Andréia Boechat Delatorre (*), Silvania Alves Ladeira, Cristiane de Jesus Aguiar, Thiago Freitas de Almeida, Meire Lelis Leal Martins.

* Universidade Estácio de Sá (Bolsista de Extensão UNESA) – andreiadelatorre@hotmail.com

RESUMO

Os estudos foram realizados para investigar a produção de carboximetilcelulase e avicelase pelo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2 utilizando substratos sintéticos puros (Avicel e Carboximetilcelulose) e bagaço de cana-de-açúcar (tratados e não tratados). A produção de avicelase e carboximetilcelulase por *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo 0,5% de avicel e 0,5% de carboximetilcelulose como fonte de carbono atingiu o máximo em 120 h (37,38 U/mL) e 144 h (124,84 U/mL), respectivamente. O microrganismo também foi capaz de produzir avicelase e carboximetilcelulase quando cultivado em culturas contendo bagaço de cana. No entanto, menores atividades enzimáticas foram obtidas em comparação com a da celulose sintética. O tratamento do bagaço de cana com 4% de Ca(OH)_2 + 4% NaOH em conjunto com a autoclave, promoveu maior quebra na fibra e aumentou a atividade da carboximetilcelulase e da avicelase.

PALAVRAS-CHAVE: bagaço de cana, avicelase, carboximetilcelulase.

ABSTRACT

Studies were carried out to investigate the carboxymethylcellulase and avicelase production by thermophilic *Bacillus* sp SMIA-2 using pure synthetic substrates (Avicel and Carboxymethylcellulose) as well as sugarcane bagasse in two different statuses (i.e. treated and untreated). Avicelase and carboxymethylcellulase production by *Bacillus* sp SMIA-2 cultivated in liquid cultures containing 0.5% avicel and 0.5% carboxymethylcellulose as a carbon source reached a maximum at 120 h, (37,38 U/mL) and 144 h (124.84 U/mL), respectively. The microorganism was also capable to produce avicelase and carboxymethylcellulase when grown in cultures containing sugarcane bagasse. However, lower enzyme activities were obtained compared with that from synthetic cellulose. The treatment of the sugarcane bagasse in conjunction with 4% Ca(OH)_2 + 4% NaOH + autoclave promoted more breakage in the fiber and increased the carboxymethylcellulase and avicelase activity.

KEYWORDS: Sugarcane bagasse, avicelase, carboxymethylcellulase

INTRODUÇÃO

Celulases são enzimas capazes de atuar sobre os materiais celulósicos promovendo sua hidrólise. Neste processo estão envolvidos três principais grupos de enzimas: β -1,4-endoglucanase (EC 3.2.1.4), β -1,4-exoglucanase, que são representadas pelas celobioidrolases (EC 3.2.1.91) e glucanohidrolases (EC 3.2.1.74) e o grupo representado pelas β -1,4-glucosidases (EC 3.2.1.21) (Lynd, et al., 2002). As carboximetilcelulases (β -1,4-endoglucanase) clivam as ligações das regiões menos compactadas (amorfa) da celulose, diminuindo o comprimento da fibra e gerando novas extremidades livres. Já as avicelases (exoglucanases) agem de maneira progressiva em extremidades redutoras ou não-redutoras da celulose, com maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e principalmente celobiose como produtos. Por outro lado, as β -glicosidases atuam nos resíduos de celobiose liberados e os hidrolisam a glicose (Bisaria e Ghose, 1981; Philippidis e Smith, 1995; Teeri, 1997; Zeilinger, et al., 2000; Lee, et al., 2002; Lynd, et al., 2002; Howard, et al., 2003).

As celulases, juntamente com as hemicelulases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais e são amplamente utilizadas em diversos ramos da indústria. Na indústria de alimentos, são empregadas nos processos de extração e clarificação de sucos de frutas. As celulases são também empregadas na extração de óleos, pigmentos, essências, alcalóides e amido; preparação de alimentos infantis, produtos dermatológicos, produtos estimulantes de digestão, rações animais, produtos estimuladores de ensilagem, adjuvante para o malte da cerveja e no tratamento de lixo orgânico (Bhat, 2000). Também são empregadas em formulações de detergentes domésticos e industriais. Na área energética, as celulases vêm sendo empregadas em plantas piloto para obtenção de hidrolisado de celulose, que são utilizados na fermentação visando à fabricação de produtos de interesse, tal como etanol (Kubicek, et al., 1993). Celulases são responsáveis por aproximadamente 20% do mercado mundial de enzimas. Em 2008, estas enzimas movimentaram um montante de USD 1,35 milhões (Pereira e Castro, 2010).

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que degradam biomassa, principalmente celulose, produzindo diferentes complexos de enzimas (Lynd, *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2010). A maior parte das bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* sp. apresenta uma variedade de sistemas de enzimas hidrolíticas, incluindo as celulasas, e são capazes de utilizar substâncias orgânicas consistindo de misturas complexas típicas de resíduos. Com exceção do grupo *Bacillus cereus* (que inclui o *Bacillus anthracis*), são saprófitas inofensivos que não produzem toxinas e são incluídos no grupo de organismos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (Mahmood, *et al.*, 1998).

Atualmente a escolha de novos microrganismos produtores de enzimas é talvez o maior obstáculo na comercialização de novas enzimas. Sendo assim, a escolha de linhagens de microrganismos apropriados, a partir de fontes diversificadas e de baixo custo, como os resíduos agroindustriais, podem levar a uma melhor produção enzimática, além de reduzir os custos de produção. Neste contexto, a bactéria termofílica *Bacillus* sp. cepa SMIA-2, que foi utilizada neste trabalho, foi isolada por Nunes e Martins (2002) de amostras de solo da região norte fluminense do estado do Rio de Janeiro. Neste trabalho foi investigado a habilidade desta bactéria para produzir celulasas em culturas submersas contendo celulose sintética e bagaço de cana de açúcar.

METODOLOGIA

O micro-organismo utilizado neste estudo foi *Bacillus* sp. SMIA-2, uma bactéria termofílica, isolada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) a partir de amostras de solo do município de Campos dos Goytacazes-RJ. O meio de cultura utilizado para a produção das celulasas continha (g/L): peptona 1,0; e traços de metais em várias concentrações. O pH foi ajustado para 7,5 com 1,0M NaOH e este meio foi esterilizado em autoclave a 121 ± 2 °C por 15 minutos. A fonte de carbono (Avicel, Carboximetilcelulose e bagaço de cana de açúcar obtido localmente) na concentração de 0,5% foi esterilizada separadamente e asépticamente adicionada aos erlenmeyers contendo o meio líquido, depois de resfriado. O meio de cultura (25mL em frascos Erlenmeyers de 250 mL), foi inoculado com 0,5 mL de um pré-inóculo preparado no dia anterior e incubado a 50 °C em um shaker orbital operando a 150 rpm. Frascos em triplicata foram retirados a intervalos de tempo pré-determinados para a determinação do crescimento do microrganismo e da atividade das celulasas.

Preparação do bagaço de cana

O bagaço de cana foi lavado com água destilada, seco a aproximadamente 70°C por 48 horas e triturado em moinho de facas tipo Wily, peneira 30 mesh e posteriormente peneirado em peneira de 60 mesh. Em seguida, 10g deste material foram suspensos em uma solução contendo hidróxido de cálcio - 4% (p/v) e hidróxido de sódio - 4% (p/v) e posteriormente autoclavado a 121°C por 30 minutos. Após 12 horas de incubação a temperatura ambiente, o bagaço foi separado por filtração em um funil de Buchner usando papel de filtro Whatman no 1 e lavado com água destilada até atingir pH neutro. O controle consistiu no bagaço de cana adicionado apenas de água destilada.

Microscopia eletrônica de varredura

A análise da morfologia do bagaço foi realizada em microscópio eletrônico de varredura 1450 V operando a 20 kW. As amostras foram metalizadas com ouro e as imagens geradas a partir de elétrons secundários a vácuo. As amostras foram dispostas de forma que possibilitasse observar as modificações superficiais das fibras do bagaço depois do pré-tratamento.

Determinação da produção de celulasas através de ensaio enzimático

A produção das celulasas foi determinada indiretamente através da avaliação da atividade celulásica de extratos brutos do caldo de fermentação. Quando concluídas as fermentações, os meios de cultura foram centrifugados a 4500 x g por 15 min a 4 °C, e o sobrenadante livre de células foi utilizado para dosagem da atividade das enzimas. As atividades da carboximetilcelulase (CMCase) e da avicelase foram determinadas baseando-se na técnica descrita por TANAKA *et al.* (1981) 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

O crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 e a atividade da CMCase foram observados por 192 horas em meio líquido contendo 0,5% de carboximetilcelulose como fonte de carbono (Figura 1). O crescimento exponencial do microrganismo foi observado por um período longo de tempo, iniciando logo após a incubação da cultura e finalizando após 144 horas. A partir deste tempo, a cultura entrou na fase estacionária. A atividade da CMCase aumentou concomitantemente com a densidade ótica da cultura, alcançando a atividade máxima após 144 horas de incubação do microrganismo, com níveis de 124,84 U/mL, quando o crescimento já havia sido cessado e a cultura se encontrava na fase estacionária. Durante esta fase, quando a cultura já havia alcançado a máxima produtividade enzimática, a atividade da CMCase foi reduzida drasticamente, o que sugere que a produção desta enzima está associada ao crescimento e que a mesma foi produzida, quando a cultura estava metabolicamente ativa.

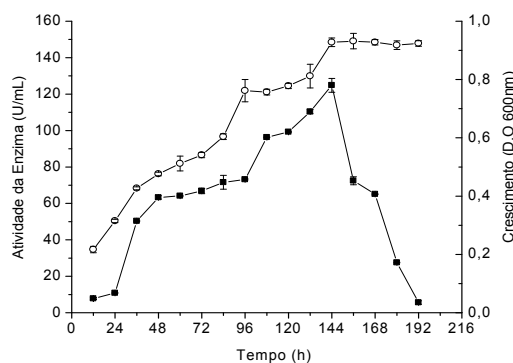


Figura 1. Crescimento (○) e atividade da carboximetilcelulase (■) secretada pelo *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em meio mineral contendo 0,5% de carboximetilcelulose por 192 horas a 50° C. As barras representam o desvio padrão.

Uma das características interessantes de espécies do gênero *Bacillus* é a sua habilidade para degradar substratos amorfos tais como a carboximetilcelulase, apesar de sua incapacidade para degradar Avicel. Entretanto, *Bacillus* sp SMIA-2 também mostrou capacidade para sintetizar a avicelase, quando cultivado num meio de cultura contendo avicel como fonte de carbono. Como mostrado na Figura 2, a atividade desta enzima aumentou concomitantemente com a densidade ótica da cultura, alcançando a atividade máxima após 120 horas de incubação do microrganismo, com níveis de 37,38 U/mL.

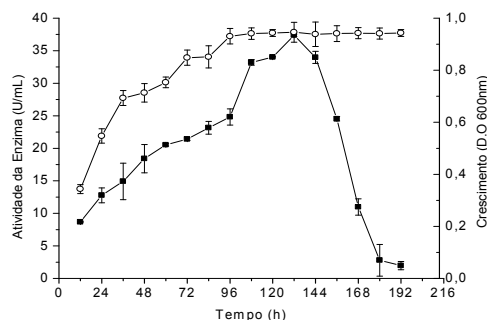


Figura 2. Crescimento (○) e atividade da avicelase (■) secretada pelo *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em meio mineral contendo 0,5% de avicel por 192 horas a 50° C. As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor do que o símbolo.

Perfil da atividade da Avicelase, e CMCase secretada por *Bacillus* sp SMIA-2

Um dos critérios importantes considerados na seleção de um microrganismo com potencial biotecnológico para uso industrial é sua habilidade para secretar enzimas, quando cultivado em substratos de baixo custo e localmente disponíveis. Neste sentido, *Bacillus* sp SMIA-2, foi cultivado em meio contendo bagaço de cana de açúcar e a atividade das enzimas CMCase e avicelase foram determinadas. A secreção da enzima CMCase iniciou logo após a incubação da cultura, alcançando o valor máximo na fase estacionária de crescimento, com níveis de 21,65 U/mL (Figura 3). A secreção da

avicelase também foi iniciada logo após a incubação da cultura, entretanto a atividade máxima desta enzima (20 U/mL) foi mais tardiamente alcançada em relação à CMCase.

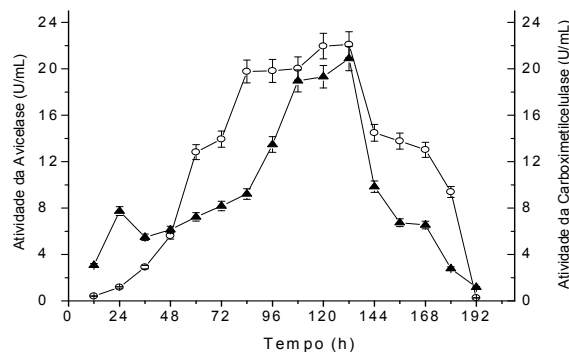


Figura 3. Atividade da carboximetilcelulase (○) e atividade da avicelase (▲), secretada pelo *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em meio mineral contendo 0,5% de bagaço de cana por 192 horas a 50° C. As barras representam o desvio padrão.

O tratamento do bagaço de cana (BCT) com uma solução conjugada de 4% Ca(OH)₂ e 4% de NaOH promoveu um aumento de cerca de 4 vezes na atividade máxima da CMCase, em relação ao bagaço de cana não tratado (BCNT). Ressaltá-se, entretanto, que o valor da atividade obtida (79 U/mL) ainda foi inferior aquele encontrado quando a carboximetilcelulose foi utilizada como substrato (125 U/mL). Em relação à avicelase, também foi observado um aumento na sua atividade, quando o bagaço de cana foi tratado com a solução alcalina, entretanto, este aumento foi bem menos pronunciado que o observado para a carboximetilcelulase (Figura 4).

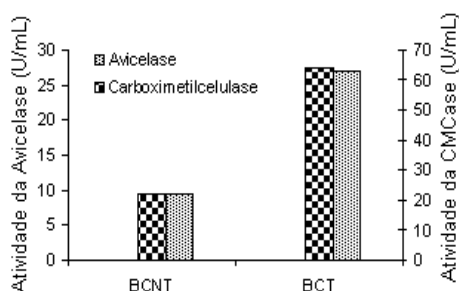


Figura 4. Influência do pré-tratamento do bagaço de cana sobre a atividade da avicelase e da carboximetilcelulase secretadas por *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado por 120h a 50° C

A morfologia das fibras do bagaço de cana tratadas e não tratadas superficialmente com hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio foram analisadas através da técnica de microscopia eletrônica de varredura. Como mostrado na Figura 5, as superfícies das fibras tratadas com a solução alcalina apresentaram características ligeiramente diferentes em relação às das superfícies das fibras não tratadas.

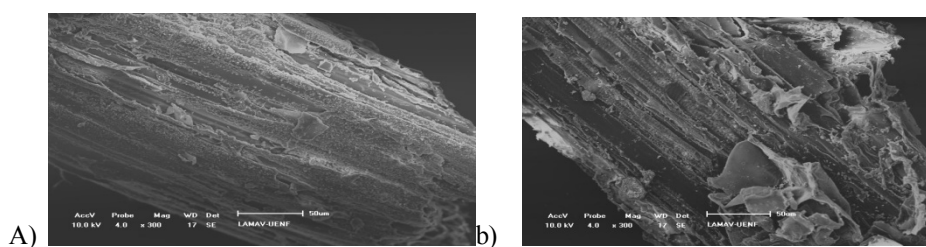


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura para o bagaço de cana não tratado (a) bagaço de cana tratado (b).

No bagaço tratado foi observada uma pequena quebra na estrutura da fibra, indicando perda da consistência fibrilar e desestruturação da lignina. De acordo com Ferreira et al., (2006), o tratamento alcalino, além de remover impurezas e tornar a superfície da fibra mais rugosa, retira parcialmente a lignina da fibra e solubiliza a hemicelulose deixando a

celulose mais exposta ao ataque enzimático. A solubilização da hemicelulose em meio alcalino também foi comprovada por Caraschi e Titã (1996).

CONCLUSÃO

Bacillus sp. SMIA-2 secretou carboximetilcelulase e avicelase quando cultivado em um meio de cultura contendo como fonte de carbono carboximetilcelulose e avicel, respectivamente. A utilização do bagaço de cana de açúcar como substrato no meio de cultura (em substituição a carboximetilcelulose e avicel) induziu a síntese das enzimas carboximetilcelulase e avicelase. Os níveis de atividade das enzimas foram inferiores aqueles observados quando carboximetilcelulose e a avicel foram utilizadas como fonte de carbono. O pré-tratamento do bagaço de cana com uma combinação dos álcalis $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e NaOH causou uma quebra na estrutura da fibra como evidenciado pela microscopia eletrônica de varredura. Além disso, promoveu um aumento na atividade da avicelase e carboximetilcelulase, sendo mais pronunciado para a última enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. **Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology**. Microbiol Mol Biol Rev. 2002, 66, 506. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC120791/>. Acesso em 26 de novembro de 2016.
- Philippidis, G.P., Smith, T.K. **Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol**. Applied Biochemistry and Biotechnology. 1995, 51, 117. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02933416>. Acesso de 15 janeiro 2017.
- Teeri, T.T. **Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases**. Trends in Biotechnology. 1997, 15, 160. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/biotechnology/abstract/S0167-7799\(97\)01032-9](https://www.cell.com/trends/biotechnology/abstract/S0167-7799(97)01032-9). Acesso em: 27 de novembro de 2016.
- Howard, R.L.; Masoko, P.; Abotsi, E. **Enzyme activity of a *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase (CBHL1) expressed as a heterologous protein from *Escherichia coli***. African Journal of Biotechnology. 2003, 2, 296. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/journal/AJB/how-to-cite-article/B35079F10148>. Acesso em: 25 de janeiro de 2017.
- Bisaria, V.S., Ghose, T.K. **Biodegradation of cellulosic materials: Substrates, microorganisms, enzymes and products**. Enzyme and Microbial Technology. 1981, 3, 90. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141022981900661>. Acesso em: 29 de novembro de 2016.
- Zeilinger, S., Haller, M., Mach, R., Kubicek, C.P. **Molecular characterization of a cellulase-negative mutant of *Hyphocrea jecorina***. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2000, 277, 581. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X00937264>. Acesso em: 26 de novembro de 2016.
- Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Robert, F., Odom, D.T., Bar-Joseph, Z., Gerber, G.K., Hannett, N.M., Harbison, C.T., Thompson, C.M., Simon, I., Zeitlinger, J., Jennings, E.G., Murray, H.L., Gordon, D.B., Ren, B., Wyrick, J.J., Tagne, J.B., Volkert, T.L., Fraenkel, E., Gifford, D.K., Young, R.A. **Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae***. Science. 2002, 298, 799. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12399584>. Acesso em: 16 de janeiro de 2017.
- Bhat, M.K. **Celulases and related enzymes in biotechnology**. Biotechnol Adv. 2000, 18, 355. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14538100>. Acesso em: 09 de março de 2017.
- Kubicek, C.P., Messner, R., Gruber, F., Mach, R.L., Kubicek-Pranz, E.M. **The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: From the interior life of a secretory fungus**. Enzyme and Microbial Technology. 1993, 15, 90. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141022993900306?via%3Dihub>. Acesso em: 18 de janeiro de 2017.
- Pereira Jr, N.; Castro, A.M. **Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais**. Química Nova. 2010, 33, 181. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n1/31.pdf>. Acesso em: 08 de março de 2017.
- Castro, A.M.; Carvalho, M.L.A.; Leite, S.G.F.; Pereira Jr, N.; J. Ind. Microbiol Biotechnol. 2010, 37, 151.
- Mahmood, A.U., Greenman, J., Scragg, A.H. **Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture**. Enzyme Microbial Technology. 1998, 22, 130. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022997001506>. Acesso em: 06 de março de 2017.
- Nunes, A.S.; Martins, M.L.L. **Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus***. Brazilian Journal of Microbiology. 2001, 32, 271. Acesso em: 29 de novembro de 2016.