
Production of cellulolytic enzymes from microorganisms isolated from coconut fiber

Produção enzimas celulolíticas a partir de microrganismos isolados da fibra do coco

Received: 2023-01-11 | Accepted: 2023-02-12 | Published: 2023-03-03

Keilla Santos Cerqueira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1308-0754>
Bahia Federal University, Bahia, Brazil
E-mail: keillascerqueira@hotmail.com

Graziella do Nascimento Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5615-2992>
Sergipe Federal University, Sergipe, Brazil
E-mail: graziellanas.silva@gmail.com

Karollyna Menezes Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7824-3377>
Sergipe Federal University, Sergipe, Brazil
E-mail: karollmenezes1@gmail.com

Jacqueline Rêgo da Silva Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4033-5254>
Sergipe Federal University, Sergipe, Brazil
E-mail: jregrodrigues@gmail.com

Roberto Rodrigues Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8919-2675>
Sergipe Federal University, Sergipe, Brazil
E-mail: rrsouza@ufs.br

Ana Katerine de Carvalho Lima Lobato

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2006-5074>
Bahia Federal University / Salvador University, Bahia, Brazil
E-mail: ana.lobato@unifacs.br

ABSTRACT

The worldwide production of microbial enzymes is generally limited by the cost of the substrate used for the cultivation of microorganisms. Thinking of a low-cost and abundant lignocellulosic substrate, coconut fiber is an alternative because it is rich in cellulose, hemicellulose, and lignin, presenting itself as a promising raw material for the production of an enzyme cocktail, which can be used in the production of second-generation biofuels. The objective of this work was to produce cellulolytic enzymes from microorganisms isolated from coconut fiber. In the production of the enzyme, the kinetic profile of the enzymatic complex was evaluated, analyzing the effects of moisture content, temperature, and pH during solid-state fermentation of coconut fiber, using a microorganism isolated from the bagasse itself. Statistica software was used to evaluate the enzyme complex production parameters. Statistical results indicated that the best humidity, temperature, and pH conditions were 80%, 30°C and 3, respectively, with activities of 119.93 U/g CMCase (endoglucanase) and 89.32 U/g FPase (total cellulases) over a period of 48 h.

Keywords: Enzymes; Cellulases; Coconut residue.

RESUMO

A produção mundial de enzimas microbianas é, geralmente, limitada pelo custo do substrato utilizado para o cultivo dos microrganismos. Pensando em um substrato lignocelulósico de baixo custo e abundante a fibra do coco entra como uma alternativa por ser rica em celulose, hemicelulose e lignina, apresentando-se como uma matéria-prima promissora para a produção do coquetel de enzimas, que pode ser utilizado na produção de biocombustíveis de segunda geração. O objetivo do trabalho foi produzir enzimas celulolíticas a partir de microrganismos isolados da fibra do coco. Na produção da enzima foi avaliado o perfil cinético do complexo enzimático analisando os efeitos do teor de umidade, temperatura e pH durante a fermentação em estado sólido da fibra do coco, utilizando um microrganismo isolado do próprio bagaço. O software Statistica foi usado para avaliação dos parâmetros de produção do complexo enzimático. Os resultados estatísticos indicaram que as melhores condições de umidade, temperatura e pH foram 80%, 30°C e 3, respectivamente, com atividades de 119,93 U/g CMCase (endoglucanase) e 89,32 U/g FPase (celulases totais) num tempo de 48 h.

Palavras-chave: Enzimas; Celulases; Resíduo coco.

INTRODUÇÃO

As tendências mundiais para o avanço científico e tecnológico na área de novos combustíveis destacam a importância da utilização de resíduos agroindustriais lignocelulósicos como matéria-prima nos processos de produção. A reutilização destes resíduos pode minimizar os problemas ambientais ligados ao seu acúmulo e diminuir o uso de combustíveis fósseis, além de resultar em uma melhora no aproveitamento da matéria-prima, que é de grande interesse na atualidade. Uma das potenciais aplicações desses materiais é a produção de etanol de segunda geração.

O bioetanol de segunda geração (E2G) tem sido amplamente considerado como uma importante fonte de energia e uma alternativa limpa e sustentável aos combustíveis fósseis. Os defensores do bioetanol o promoveram como um componente vital da transição para um futuro neutro em carbono, reduzindo emissões, aumentando a segurança energética e fortalecendo as economias rurais (KIRSHNER et al., 2022). A produção de E2G envolve o uso de açúcares liberados por enzimas a partir do teor de celulose encontrado em vários resíduos de culturas, incluindo a casca de coco. Mas, a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica ainda não é considerada econômica devido ao custo das enzimas celulolíticas.

Por outro lado, todos os organismos vivos são produtores de enzimas, entretanto, apenas 8% da produção de enzimas comerciais provêm da extração de animais e 4% de plantas, sendo o restante obtido a partir de fermentação microbiana (RAVINDRAN; JAISWAL, 2018). Devido à sua fácil disponibilidade e rápida taxa de crescimento, os microrganismos são considerados fontes preferenciais para obtenção das enzimas industriais (ABADA, 2019).

Existem muitos grupos de microrganismos envolvidos na produção de celulase, no âmbito industrial as celulases são produzidas principalmente a partir de fungos filamentosos (SUBSAMRAN et al., 2019) podendo ser através da fermentação submersa ou de processos de fermentação em estado sólido (HU et al., 2021). Segundo Subsamran et al. (2019) a fermentação em estado sólido é adequada para o crescimento de fungos e produção de enzima celulolíticas em material lignocelulósico devido ao menor consumo de energia e aumento da concentração de enzima.

Nesse contexto, o uso e produção de enzimas provenientes de fontes renováveis tem se tornado uma das áreas de maior interesse da indústria biotecnológica. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi otimizar a produção de enzimas celulolíticas a partir do microrganismo isolado da fibra do coco em trabalhos anteriores por Cerqueira et al. (2022) para posterior utilização no processo de produção de etanol de segunda geração.

METODOLOGIA

O microrganismo isolado do resíduo do coco por Cerqueira et al. (2022) foi utilizado para produzir as enzimas nesse trabalho. Através do levantamento bibliográfico, selecionou-se as variáveis que mais influenciam no processo de produção enzimática: umidade, temperatura e pH nas faixas indicadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Nível do planejamento da produção de enzimas na fermentação em estado sólido.

Variáveis independentes	Níveis codificados das variáveis independentes		
	-1	0	+1
Umidade (%)	60	70	80
pH	3,0	4,5	6,0
Temperatura (°C)	30	35	40

A fermentação em estado sólido seguiu o planejamento fatorial composto central 2^3 com 6 combinações dos níveis para permitir a estimativa de todos os efeitos quadráticos principais e 2 repetições no ponto central. A metodologia de superfície de resposta foi usada para otimizar os fatores temperatura, teor de umidade e pH inicial na produção das enzimas celulolíticas (Celulases totais e Endoglucanase) por fermentação em estado sólido.

Os ensaios de fermentações foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL contendo o substrato previamente umidificado, de acordo com as condições do planejamento experimental. Após umidificação, o substrato foi mantido *overnight* (em média 15 horas), em embalagem hermeticamente fechada sob refrigeração (5 °C), de acordo com cada ensaio do planejamento (SEDGWICK; HOLT, 1983). Decorridas as 15 h, foram pesadas 5 g do substrato umidificado em Erlenmeyers de 250 mL, vedados com tampão de algodão envolvido com gaze e papel alumínio, e em seguida foram autoclavados por 15 minutos a 120 °C. Após resfriamento cada meio de cultivo foi inoculado com o microrganismo na concentração de 10^7 esporos/g de fibra de coco. Os Erlenmeyers foram incubados em câmara climática com temperatura controlada de 30 a 40 °C de acordo com o planejamento, durante um período de 48 horas.

A extração, do complexo enzimático produzido na fermentação sólida, foi feita com uma solução tampão de citrato de sódio (0,05 mol/L, pH = 4,8) (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992), na proporção de 5 mL de tampão por grama de substrato fermentado. Esse material foi homogeneizado e levado para centrifuga a 3400 rpm por 15 minutos. Logo após a extração, foi realizada a filtração, com gaze, algodão e papel filtro (autoclavados a 120 °C por 15 minutos), para remoção dos esporos. O complexo enzimático foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas expressas em CMC_{case} e FPase presente em cada meio fermentado.

A atividade celulolítica da carboximetilcelulase (CMCase) e da Filter Paperase (FPase) foi determinada seguindo o procedimento descrito em GHOSE (1987). A atividade enzimática

da CMC_{Case} foi expressa em U/g de substrato úmido, a qual foi calculada seguindo a Equação 1. A unidade de atividade de FPase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol/L de açúcar redutor por minuto. O resultado foi calculado com o auxílio da Equação 2. Sendo, $AR_{Com\ Reação}$ igual a concentração da amostra com reação (g de AR liberado/g de meio fermentado); $AR_{Sem\ Reação}$ concentração da amostra sem reação (g de AR liberado/g de meio fermentado); 106 o fator de conversão de mols de glicose para µmol de glicose; 180 a massa molar da glicose (g/mol) e 30 e 60 o tempo de reação em minutos para CMC_{Case} e FPase, respectivamente.

$$CMC_{Case} = \frac{AR_{Liberado} \times 10^6}{(180) \times (30)} = \frac{(AR_{Com\ Reação} - AR_{Sem\ Reação}) \times 10^6}{(180) \times (30)} \quad (1)$$

$$FPase = \frac{AR_{Liberado} \times 10^6}{(180) \times (60)} = \frac{(AR_{Com\ Reação} - AR_{Sem\ Reação}) \times 10^6}{(180) \times (60)} \quad (2)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a análise estatística do planejamento experimental na produção de FPase e CMC_{Case}, as atividades enzimáticas selecionadas para compor a matriz do planejamento como variável resposta, foram as obtidas no tempo de 48 horas. A Tabela 2 mostra os dados do planejamento experimental tendo como variável resposta as atividades da FPase e CMC_{Case} no tempo de 48 horas.

Tabela 2 - Ensaios do planejamento experimental para a produção de FPase e CMC_{Case} em 48 h na fermentação em estado sólido.

Ensaio	U _i % (b.u)	pH	Temperatura (°C)	FPase (U/g)	CMC _{Case} (U/g)
1	60 (-1)	3,0 (-1)	30 (-1)	83,51	116,76
2	60 (-1)	3,0 (-1)	40 (+1)	30,19	74,95
3	60 (-1)	6,0 (+1)	30 (-1)	53,31	73,47
4	60 (-1)	6,0 (+1)	40 (+1)	35,36	101,13
5	80 (+1)	3,0 (-1)	30 (-1)	89,32	119,93
6	80 (+1)	3,0 (-1)	40 (+1)	79,08	160,27
7	80 (+1)	6,0 (+1)	30 (-1)	46,34	68,40
8	80 (+1)	6,0 (+1)	40 (+1)	17,83	50,66
9	60 (-1)	4,5 (0)	35 (0)	46,13	40,75
10	80 (+1)	4,5 (0)	35 (0)	51,41	51,51
11	70 (0)	3,0 (-1)	35 (0)	91,64	119,81
12	70 (0)	6,0 (+1)	35 (0)	50,15	50,45
13	70 (0)	4,5 (0)	30 (-1)	41,06	58,05
14	70 (0)	4,5 (0)	40 (+1)	21,74	48,55
15	70 (0)	4,5 (0)	35 (0)	39,48	56,79
16	70 (0)	4,5 (0)	35 (0)	37,69	59,79

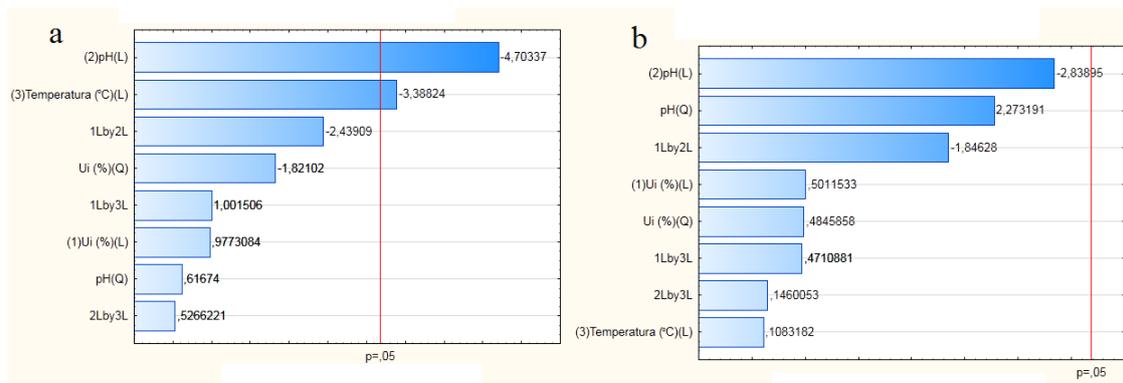
Observa-se na Tabela 2, que os resultados para atividade da FPase e CMC_{Case} variaram entre 17,83 - 91,64 U/g e 40,75 - 160,27 U/g, respectivamente. Analisando os resultados da

Tabela 2 nota-se, que quando se utilizou a umidade maxima de 80% à atividade foi a maior obtida. Comparando os resultados dos experimentos 1, 5, 6 e 11, verifica-se as maiores atividades enzimáticas e ambos os experimentos com pH 3. De forma diferente das demais variáveis a temperatura pareceu não ter influência sobre os resultados de atividades enzimáticas obtidas.

Com os resultados experimentais de atividade enzimática em função da relação da umidade (1), pH (2) e temperatura (3) realizou-se uma regressão múltipla e analisou-se os valores do Coeficiente de correlação (R^2) para as celulases totais e para as endoglucanases, 0,94 e 0,85 - respectivamente. Este valor de R^2 indica que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 94% da variabilidade dos dados para as celulases totais e 85% para as endoglucanases.

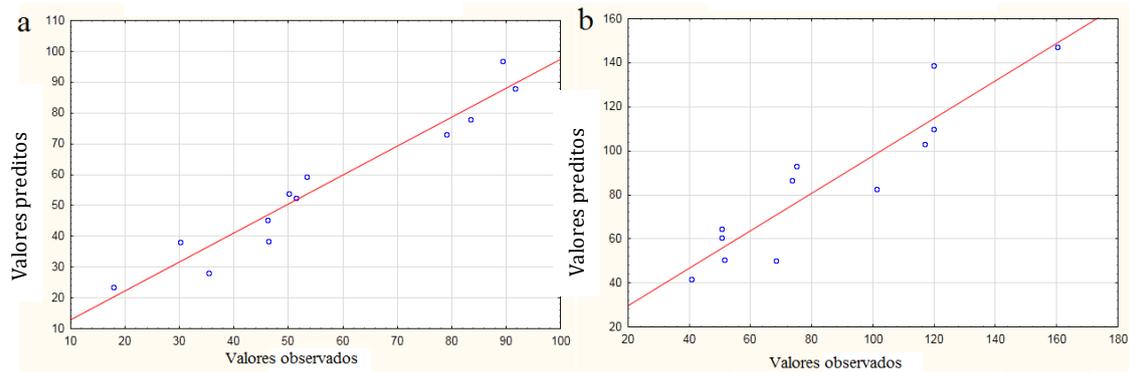
De acordo com o Diagrama de Pareto apresentado na Figura 1, para a atividade da FPase e CMCase, apenas o pH e a temperatura foram estatisticamente significativos para a FPase para o nível de confiança de 95%. Observando-se que o pH e a temperatura influenciaram negativamente, no sentido que quanto menor o pH e a temperatura maior a atividade das celulases totais. O mesmo não aconteceu com a CMCCase em que os parâmetros e nem as interações entre elas não foram significativos no Diagrama de Pareto.

Figura 1 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais e interações do pH, temperatura e umidade para a atividade Fpase (a) e CMCCase (b).



A Figura 2 mostra a representação dos valores previstos em função dos valores experimentais.

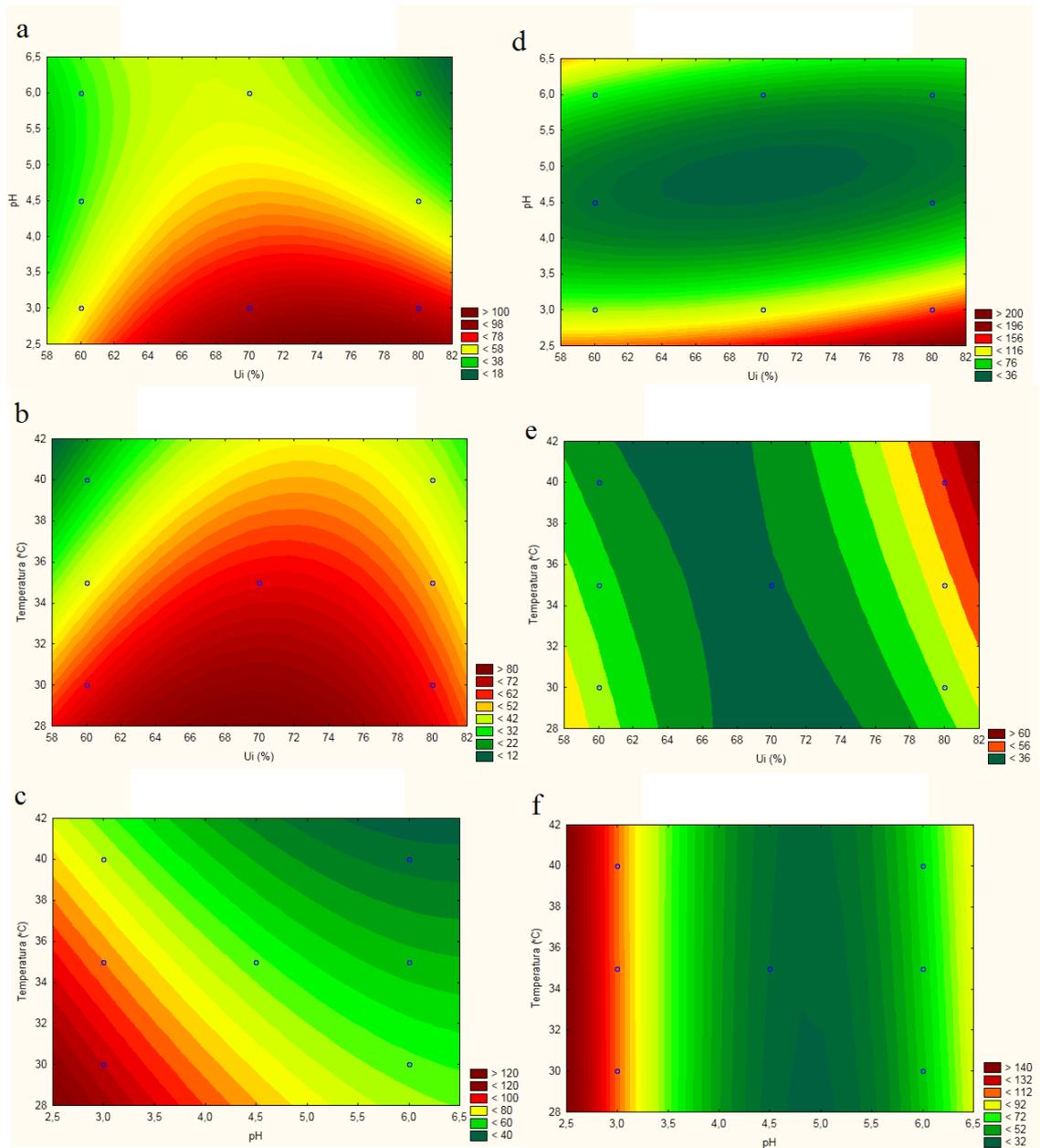
Figura 2 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta da atividade FPase (a) e CMCase (b).



Na Figura 2, nota-se que as respostas experimentais obtidas para atividade enzimática apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica. Para ilustrar os efeitos das variáveis na atividade FPase e CMCase, são apresentadas as curvas de contorno na Figura 3. Estas figuras mostram a região de otimização das variáveis na forma real, duas a duas, em relação à resposta atividade enzimática das enzimas produzidas.

A Figura 3 apresenta a superfície de resposta do efeito da umidade inicial, pH e temperatura sobre a produção da FPase (celulases totais) e CMCase (endoglucanase). Observou-se que a produção das celulases totais foi maior com o aumento da umidade inicial, e redução de pH pois a região vermelho-escura indica os melhores resultados de produção das enzimas. As análises da curva de resposta para umidade mostraram que o aumento da umidade teve impacto positivo tanto na produção de FPase quanto para CMCase.

Figura 3 - Gráficos de superfície de resposta para atividade da FPase (U/g substrato) no tempo de 48h avaliando o: teor de umidade e pH inicial (a), teor de umidade e temperatura (b), pH inicial e temperatura (c) e da CMCCase (U/g substrato) no teor de umidade e pH inicial (d), teor de umidade e temperatura (e), pH inicial e temperatura (f).



Teigiserova, Bourguine e Thomsen (2021) apresentam uma revisão sistemática de 487 exemplos de produção quantificada de enzimas de 209 estudos relatados no *Science Direct*, a coleta de dados permitiu a identificação dos principais substratos e enzimas para potenciais vias de produção. Os substratos principais foram trigo (53 experimentos), arroz (22 experimentos) e milho (22 experimentos), enquanto as enzimas mais comuns relatadas foram xilanase, CMCCase e FPase com 92, 83 e 61 exemplos, respectivamente. Suas atividades mostraram uma ampla gama com atividades de xilanase 7-10.000 U/g de substrato, atividades CMCCase 1,4-950 U/g de substrato e atividades FPase 1,7-438 U/g de substrato. Sendo o coco um substrato ainda não

muito explorado nesse âmbito de produção de enzimas mesmo estando com as atividades da CMCase e FPase elevada e dentro dos limites dos artigos revisados.

CONCLUSÕES

O software Statistica foi usado para otimização dos parâmetros de produção do coquetel de enzimas (FPase, CMCase) na temperatura, teor de umidade inicial e pH inicial. A condição com maior atividade enzimática resultou em um teor de umidade de 80% e pH de 3,0 com atividades enzimáticas de 160,27 U/g e 89,32 U/g para CMCase e FPase, respectivamente. A temperatura foi uma variável que alternou entre as duas atividades destacadas, 30 °C para FPase e 40 °C para a CMCase. Assim podemos constatar que a celulose extraída da fibra do coco pode vir a ser uma forma promissora de promover seu aproveitamento, uma vez que o desenvolvimento sustentável requer cada vez mais a utilização de fontes alternativas de energia.

REFERÊNCIAS

- ABADA, E. A. Application of microbial enzymes in the dairy industry. In: (Ed.). **Enzymes in Food Biotechnology**: Elsevier p.61-72. 2019.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257-270, 1992.
- CERQUEIRA, K. S.; SILVA, K. M.; DO NASCIMENTO SILVA, G.; DA SILVA RODRIGUES, J. R.; LOBATO, A. K. D. C. L.; DE SOUZA, R. R. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de enzimas elulolíticas Isolation and selection of cellulolytic enzyme-producing microorganisms. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 4, p. 28693-28699, 2022.
- GHOSE, T. Measurement of cellulase activities. **Pure Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- HU, Y.; ZHAO, K.; QU, Y.; SONG, X.; ZHAO, J.; QIN, Y. Penicillium oxalicum S-adenosylmethionine synthetase is essential for the viability of fungal cells and the expression of genes encoding cellulolytic enzymes. **Fungal Biology**, v. 125, n. 1, p. 1-11, 2021.
- KIRSHNER, J.; BROWN, E.; DUNLOP, L.; CAIRO, J. P. F.; REDEKER, K.; VENEU, F.; BROOKS, S.; KIRSHNER, S.; WALTON, P. H. "A future beyond sugar": Examining second-generation biofuel pathways in Alagoas, northeast Brazil. **Environmental Development**, v. 44, p. 100739, 2022.
- RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. Enzymes in Bioconversion and Food Processing. In: (Ed.). **Enzymes in Food Technology**: Springer p.19-40. 2018.
- SEDGWICK, J.; HOLT, P. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. **Journal of immunological methods**, v. 57, n. 1-3, p. 301-309, 1983.

SUBSAMRAN, K.; MAHAKHAN, P.; VICHITPHAN, K.; VICHITPHAN, S.; SAWAENGKAEW, J. Potential use of vetiver grass for cellulolytic enzyme production and bioethanol production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 261-268, 2019.

TEIGISEROVA, D. A.; BOURGINE, J.; THOMSEN, M. Closing the loop of cereal waste and residues with sustainable technologies: an overview of enzyme production via fungal solid-state fermentation. **Sustainable Production and Consumption**, v. 27, p. 845 -857, 2021.