

Imobilização de endoglucanase de *Aspergillus brasiliensis* 3.7TA em esfera de alginato de cálcio

Tarcísio Michael Ferreira Soares de Oliveira^{1*}, Ana Vitória Moreira Cunha², Vivian Machado Benassi⁵

¹Estudante do Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da UFMG, nível doutorado. E-mail: tarcisio.michael@ufvjm.edu.br

²Estudante do Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da UFMG, nível mestrado. E-mail: moreira.vitoria@ufvjm.edu.br

³Professor do Instituto de Ciências e Tecnologia da UFMG. E-mail: vivian.benassi@ufvjm.edu.br

Resumo: A imobilização de enzimas é uma alternativa para melhorar a atividade e a estabilidade das enzimas. Neste trabalho, foi estudada a imobilização em alginato de cálcio de enzimas com atividade CMCase produzidas pela linhagem de fungo filamentososo *Aspergillus brasiliensis* 3.7TA, isolada de bagaço de cana-de-açúcar. Para a imobilização da CMCase em esferas de alginato de cálcio foi realizado um planejamento fatorial do tipo DCCR em que foram variadas as concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio. A melhor condição foi aquela com 4,26% de alginato de sódio e 5,34% de cloreto de cálcio. A enzima imobilizada apresentou atividade máxima de $0,14 \pm 0,01$ mU a 65°C e pH 4,60.

Palavras-chave: *fungos Filamentosos, hidrólise, microrganismo, açúcar redutor.*

1 - Introdução

A busca por alternativas sustentáveis aos combustíveis fósseis tem impulsionado o desenvolvimento de biocombustíveis de segunda geração (2G), uma opção promissora para reduzir impactos ambientais sem comprometer a produção de alimentos. Dentre os desafios desse setor, a degradação eficiente da biomassa lignocelulósica requer biocatalisadores eficazes, como as celulases produzidas por fungos filamentosos, cuja prospecção e otimização ainda são pouco exploradas no Brasil (BRYNGEMARK, 2019; KARIMI et al., 2021).

As celulases desempenham um papel essencial na conversão da celulose em açúcares fermentáveis, sendo amplamente aplicadas em setores como alimentos, têxtil, farmacêutico e biocombustíveis (GUPTA et al., 2020).

Entretanto, a utilização industrial dessas enzimas pode ser limitada por sua estabilidade e custo de produção, tornando a imobilização uma

estratégia viável para melhorar sua reutilização, resistência a condições adversas e eficiência catalítica. Diferentes métodos de imobilização, físicos e químicos, têm sido estudados para otimizar a interação entre enzima e suporte, garantindo maior desempenho e estabilidade (ZHANG et al., 2020).

Diante desse contexto, este trabalho teve como objetivo produzir celulases a partir do *Aspergillus brasiliensis* 3.7TA em suas melhores condições e caracterizá-las bioquimicamente a fim de avaliar estratégias de imobilização para aprimorar sua estabilidade e potencial de reaproveitamento.

2 - Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micologia, Enzimologia e Desenvolvimento de Produtos (LMEDP) localizado no Instituto de Ciências e Tecnologia, da Universidade Federal dos Vales do

4º WORKSHOP DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS UFVJM-UFU

Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) *campus* JK, Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

A etapa de identificação do fungo *Aspergillus* 3.7TA foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia, da Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

As análises de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) foram feitas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Avançada na UFMG, Diamantina, Minas Gerais.

O microrganismo foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), número A64AD93.

O fungo *Aspergillus* 3.7TA foi isolado de bagaço de cana-de-açúcar na usina de álcool e açúcar São Judas Tadeu-SADA Bio-Energia e Agricultura LTDA, na cidade de Jaíba no Norte de Minas Gerais.

Realizou a manutenção da cepa de duas formas: (1) em tubo de ensaio contendo meio de cultura sólido inclinado composto por aveia (EMERSON, 1941), armazenados em geladeira à 4°C e (2) em tubo com tampa de rosca contendo sílica gel, lacrado e armazenados à 4°C.

Padronizou-se o cultivo do microrganismo em meio de cultura submerso CP (PEIXOTO et al., 2003), contendo sais do próprio meio CP, ureia como fonte de nitrogênio e farelo de trigo como fonte de carbono, pH inicial de meio 5,46 e 1 mL da solução de esporos do microrganismo, sendo mantido por cinco dias, à 30°C, em estufa bacteriológica.

Com o meio de cultivo padronizado em suas melhores condições, caracterizou-se bioquimicamente a endoglucanase.

2.1 Determinação da atividade da endoglucanase imobilizada pelo método sacarificante

A reação da enzima imobilizada em esferas de alginato foi realizada através da incubação dos derivados imobilizados com 1000 µL de carboximetilcelulose Sigma®, a uma concentração de 1% (m/v) em tampão citrato de sódio 100 mM com pH 2,57. A incubação ocorreu em banho-maria à 55°C, por um período de 10 minutos, de acordo com Ghose (1987).

Após o tempo de reação foram retiradas alíquotas de 250 µL e adicionadas a tubos contendo 250 µL de DNS. Esses tubos foram fervidos por 5 minutos e, após resfriamento, adicionou-se 2 mL de água destilada. Uma alíquota retirada antes da mistura ser adicionada ao banho foi considerada como branco. As leituras foram feitas a 540 nm. A atividade endoglucanásica foi realizada por quantificação de açúcares redutores (Miller, 1959).

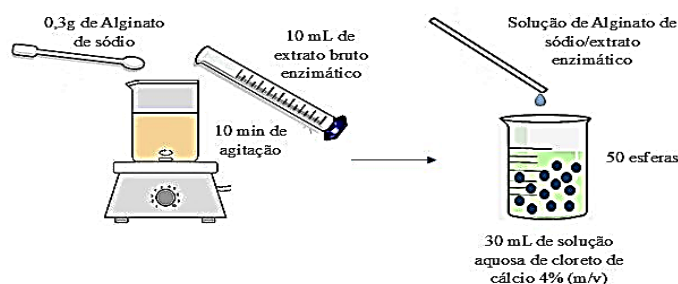
2.2 Processo de formação das esferas de alginato

Foi utilizada a metodologia descrita por Bickerstaff (1997) para o processo de imobilização. Primeiramente, uma solução de 10 mL de alginato de sódio (C₆H₇O₆Na)_n Isofar® foi preparada com a adição do extrato bruto extracelular rico em celulases em uma concentração de 3% (m/v). Essa solução foi homogeneizada utilizando um agitador magnético por 10 minutos.

Em seguida, uma solução aquosa de cloreto de cálcio (CaCl₂·2H₂O) Dinâmica® foi preparada com uma concentração de 4% (m/v). A solução de alginato de sódio foi gotejada em 30 mL da solução de cloreto de cálcio e foram padronizadas 50 esferas para cada 30 mL da solução de cloreto de cálcio.

Para a aplicação na reação, as esferas formadas foram separadas da solução de cloreto de cálcio através de filtração com o auxílio de uma peneira, e em seguida foram lavadas com água destilada para posterior reação enzimática e quantificação da atividade (Figura 1).

Figura 1 - Desenho esquemático do preparo das soluções e gotejamento da mistura alginato de sódio e extrato enzimático em solução de cloreto de cálcio.



2.3 Teste do instrumento para gotejamento e formação das esferas imobilizadas

Diversos equipamentos foram testados para o gotejamento da solução enzimática contendo alginato de sódio a 3% (m/v) em uma solução aquosa de cloreto de cálcio a 4% (m/v). Esses equipamentos incluíram uma micropipeta de 1000 μ L, uma pipeta de plástico Pasteur (3 mL), um bastão de vidro grosso com 1,0 cm de diâmetro e um bastão de vidro fino com 0,5 cm de diâmetro. As esferas formadas foram peneiradas e lavadas com água destilada e, em seguida, foram submetidas à dosagem enzimática de acordo com o item 2.1 do Material e Métodos.

2.4 Determinação do número de esferas na reação enzimática

Com o objetivo de determinar a quantidade de esferas imobilizadas na reação, foram realizadas variações no número de esferas incubadas, variando de 2 a 10 esferas. O substrato utilizado foi o CMC Sigma® a uma concentração de 1% (m/v) em tampão citrato de sódio 100 mM com pH 2,57.

2.5 Efeito da concentração de alginato de sódio e cloreto de cálcio no processo de

imobilização aplicando o planejamento fatorial

A análise foi realizada utilizando a ferramenta estatística de planejamento fatorial chamada Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), seguindo o método descrito por Rodrigues e Lemma (2009). Esse planejamento incluiu um fatorial 2^2 , com os 3 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios, aplicando o erro puro.

Os dois fatores variados foram a concentração de alginato de sódio e a concentração de cloreto de cálcio. Segundo Cunico et al. (2008), essa ferramenta auxilia na redução do número de ensaios necessários, sem comprometer a qualidade das informações, permitindo estudar simultaneamente várias variáveis e obter resultados mais confiáveis.

O experimento foi iniciado com o ponto central (0), utilizando as concentrações de alginato de sódio a 3% (m/v) e cloreto de cálcio a 4% (m/v). A concentração de alginato foi variada em 0,5 e a concentração de cloreto de cálcio em 1, seguindo as equações 3 para obter os valores necessários para montar a Tabela 1.

As variáveis foram usadas em seus níveis superiores (+1) e inferiores (-1) em 11 ensaios, incluindo os pontos centrais com X_1 [Alg] = 3%

4º WORKSHOP DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS UFVJM-UFU

(m/v) e X_2 [Cl] = 4,0% (m/v) (Tabela 2). Os resultados das atividades obtidas foram analisados utilizando o software Protimiza Experimental Design[®], conforme a Equação 1.

$$+ 1,41 = \frac{Vr-(0)}{\text{variação}} \qquad - 1,41 = \frac{Vr-(0)}{\text{variação}} \qquad (1)$$

Onde:

- Vr: Valor real;
- (0): ponto central;
- Variação: estimado, podendo ser ajustado.

Tabela 1 - Variáveis avaliadas e respectivos níveis do DCCR.

Variáveis avaliadas	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Alginato de sódio (%) (X ₁)	4,69	5,00	5,75	6,5	6,81
Cloreto de cálcio (%) (X ₂)	6,19	6,5	7,25	8,00	8,31

Tabela 2 - Matriz de planejamento para imobilização das endoglucanases, com planejamento fatorial contendo valores codificados e valores Reais.

Ensaio	X1	X2	Alginato de sódio (%)	Cloreto de Cálcio (%)
1	-1	-1	2,50	3,00
2	1	-1	3,50	3,00
3	-1	1	2,50	5,00
4	1	1	3,50	5,00
5	-1,41	0	2,29	4,00
6	1,41	0	3,71	4,00
7	0	-1,41	3,00	2,59
8	0	1,41	3,00	5,41
9	0	0	3,00	4,00
10	0	0	3,00	4,00
11	0	0	3,00	4,00

2.6 Análise da viscosidade da solução de alginato de sódio conforme padronizado

Com o objetivo de analisar a viscosidade da solução de alginato de sódio utilizado no processo de imobilização, para isso utilizou a viscosímetro BROOKFIELD DV – III Ultra[®].

Preparou em um béquer 50 mL da solução de alginato de sódio 4,30% (m/v), onde

foi homogeneizada em agitador magnético por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado uma Haste (splinder - padronizado), mergulhando na solução de alginato (20,2°C), e uma determinada rotação por minuto foi imposta à haste utilizada. Através do visor acompanhavam-se as oscilações no valor da viscosidade até que a mesma atingisse um valor constante. Para chegar no

4º WORKSHOP DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS UFVJM-UFU

valor de viscosidade constante, foi feita várias tentativas com outras hastes de outros calibres.

A haste é rotacionado de forma constante e uniforme, enquanto o aparelho mede a força necessária para vencer a resistência do material. A viscosidade é a medida de resistência de um dado material ao fluxo que é originada pela força de atrito entre as “camadas” que compõem o material

A viscosidade Brookfield é determinada a partir do torque necessário para aplicar uma dada rotação a um fuso (“spindle”), com dimensões padronizadas, imerso em uma amostra de na temperatura de ensaio desejada (Equação 4).

Segundo Fox e McDonald (1998), uma substância fluida é aquela que obedece à Lei de Newton da viscosidade dada pela Equação 2:

$$\tau = \mu \frac{dv}{dy} \quad (2)$$

Onde:

τ : tensão de cisalhamento [Pa];

μ : viscosidade absoluta do fluido [Pa.s];

dv/dy : velocidade de deformação angular do fluido [s^{-1}].

2.7 Análise das esferas imobilizadas no microscópio eletrônico de varredura

As esferas imobilizadas foram produzidas na concentração padronizada de alginato de sódio (4,30% m/v) e cloreto de cálcio (5,27% (m/v)). Em seguida foram liofilizadas no Departamento de Engenharia de Alimentos e posterior levados ao dessecador para não absorver umidade do ambiente.

As esferas imobilizadas em esferas de alginato liofilizadas foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). A morfologia das partículas das amostras foi

avaliada usando MEV marca HITACHI TM3000 (Japão) e foi operado a 15 kV com magnificação de 100, 500 ou 1000 vezes.

As amostras estavam presas em uma fita de dupla face sobre um *stub* (porta amostra) com um diâmetro de 2 cm e uma altura de 1 cm.

2.8 Efeito da temperatura e do pH na atividade do derivado imobilizado em esferas de alginato

Para determinar a temperatura e pH ótimos da endoglucanase bruta imobilizada, foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Esse delineamento envolveu quatro pontos centrais, uma repetição genuína e um nível de confiança de 95% ($\alpha = 5\%$), método descrito por Rodrigues; Lemma, (2009). As variáveis utilizadas foram o pH da reação (X_1) e a temperatura do substrato (X_2) e a atividade da endoglucanase imobilizada ($U.mL^{-1}$) foi a variável resposta analisada.

No DCCR foram avaliados diferentes valores de pH dos substratos no intervalo de 3,6 (-1) a 6,4 (+1). O substrato foi preparado com uma concentração de 1% (m/v) de CMC, utilizando tampão citrato de sódio 100 mM para os pH 3,02; 3,6 e 5,0; 6,4; 6,98. A temperatura da reação foi avaliada em um banho-maria, variando de 36°C (-1) à 64°C (+1).

A dosagem enzimática foi realizada nos pH e temperaturas específicos, conforme indicado na tabela de níveis das variáveis (Tabela 3) e na matriz experimental do DCCR (Tabela 4). Como controle externo, foi utilizado um substrato de celulose 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 100 mM, com pH 4,8 e temperatura de reação de 55°C. Os resultados foram analisados no *softer* Protimiza Experimental Design.

Tabela 3 - Variáveis avaliadas e respectivos níveis do DCCR.

Variáveis avaliadas	Níveis
---------------------	--------

**4º WORKSHOP DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS
UFVJM-UFU**

	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH (X ₁)	3,02	3,6	5,00	6,4	6,98
Temperatura (X ₂)	30,20	36	50,00	64	69,80

Tabela 4 - Matriz experimental do DCCR para a temperatura da reação e o pH do substrato, valores codificados e reais.

Ensaio	X1	X2	Temperatura (°C)	pH
1	-1	-1	3,60	36,00
2	1	-1	6,40	36,00
3	-1	1	3,60	64,00
4	1	1	6,40	64,00
5	-1,41	0	3,02	50,00
6	1,41	0	6,90	50,00
7	0	-1,41	5,00	30,20
8	0	1,41	5,00	69,80
9	0	0	5,00	50,00
10	0	0	5,00	50,00
11	0	0	5,00	50,00
12	0	0	5,00	50,00

2.9 Teste de reuso do conjugado imobilizado em esferas de alginato

A análise foi conduzida para determinar o número de ciclos de reutilização das esferas de alginato contendo o conjugado enzimático rico em celulasas na reação enzimática. O procedimento seguiu a metodologia de dosagem enzimática conforme descrito no item 2.1. Após cada ciclo de reação, as esferas foram submetidas a filtração, lavagem e incubação em uma solução tampão de citrato de sódio a 100 mM, pH 2,57, por um minuto, seguida por uma nova dosagem enzimática. A quantidade de açúcares produzidos em cada ciclo de reação foi analisada de acordo com o descrito no item 2.1.

2.10 Elaboração da curva padrão de glicose para o método sacarificante

O método foi previamente padronizado por uma curva padrão de glicose, no intervalo de

concentração de 0 a 1,0 mg.mL⁻¹. A unidade de atividade (U) da enzima foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcar redutor por mL de substrato na reação, por minuto, nas condições de ensaio, $U = \mu mol.mL^{-1}.min^{-1}$. Conforme a Equação 3. O *f* corresponde ao fator do DNS preparado, *t* tempo de reação em minutos, *v* o volume de enzima incubado na reação em mililitro, *D* é a diluição do extrato bruto na reação (caso seja necessário) e *ABS* é a absorbância obtida no espectrofotômetro, obtendo a Atividade Celulolítica (AC) (DOS SANTOS et al., 2017; MILLER, 1959).

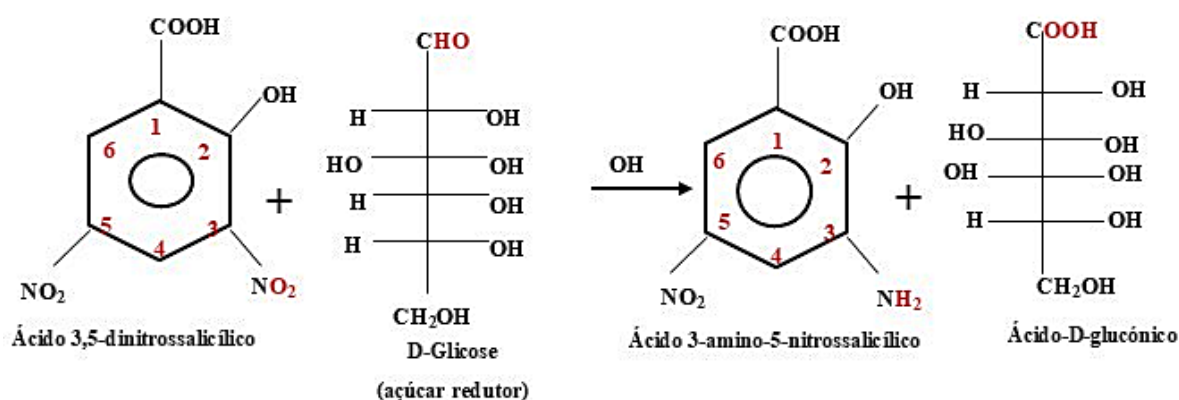
$$AC \left(\frac{U}{mL} \right) = ABS (nm) \cdot \frac{1}{t(min)} \cdot f \left(\frac{\mu mol}{nm} \right) \cdot \frac{1}{v(mL)} \cdot D \quad (3)$$

A reação de DNS é utilizada para detectar açúcares redutores (Figura 28). O grupo carbonila livre do açúcar redutor reage com o

DNS em condições alcalinas, formando um composto aromático de ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, resultando em um complexo de coloração acastanhada (BOSHAGH, 2021). Para proteger o reagente da oxidação pelo oxigênio dissolvido em solução, utiliza-se o sal de Rochelle (tartarato de potássio e sódio

tetrahidratado). Além disso, o hidróxido de sódio é adicionado como redutor da ação da glicose (Figura 2). A absorbância do composto formado segue a lei de Lambert-Beer, permitindo a correlação entre a intensidade de cor e a concentração da amostra.

Figura 2 - Reação de redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico.



2.11 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata, onde as médias e desvios-padrão são calculados utilizando o software MS Excel. As análises estatísticas foram realizadas com

programa livre Sisvar 5.8 – Build 92, sendo a estatística pelo Teste Tukey com α igual a 0,05. O teste de Tukey é utilizado para examinar a significância da diferença entre as médias de tratamento (SRIVASTAVA et al., 2020).

3 - Resultados e Discussão

A partir do material coletado do bagaço da cana-de-açúcar, foram isolados seis fungos filamentosos dos gêneros *Mucor*, *Aspergillus* e *Neurospora*. Todos esses isolados demonstraram maior crescimento a 30°C, sendo classificados como fungos mesófilos. Dentre os fungos testados em cultura submersa CP, o *Aspergillus brasiliensis* 3.7TA apresentou a melhor atividade celulolítica, sendo selecionado para otimização da produção enzimática.

Após a otimização do meio de cultivo, as melhores condições para o *Aspergillus* 3.7TA foram em meio de cultura submerso CP contendo ureia como fonte de nitrogênio, sais CP e farelo de trigo como fonte de carbono, em pH 5,46 e 1mL de solução de esporos para o inóculo, em

condições estacionárias durante cinco dias, em estufa bacteriológica.

Os melhores parâmetros para a reação enzimática para a enzima CMCase foi em pH 2,75, em tampão citrato de sódio 100 mM em temperatura de reação de 55°C, resultando em uma atividade máxima de CMCase de $0,25 \pm 0,02$ U/mL.

3.1 Padronização do método de imobilização

Antes de começar a testar as diferentes concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio, padronizou-se o método, então fixamos a quantidade de 10 mL de solução de alginato de sódio e 20 mL da solução de cloreto de cálcio para todas as imobilizações, realizou teste para a escolha do melhor equipamento de gotejamento para imobilizar as enzima, sendo eles: (1) bastão

4º WORKSHOP DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS UFVJM-UFU

de vidro fino, (2) bastão de vidro grosso, (3) micropipeta de 1 mL e (4) pipeta Pasteur. A imobilização foi feita com esses objetos, na concentração de 3% de Alginato de sódio e 4% de cloreto de cálcio, além de verificar a concentração do substrato (CMC) em 1% (m/v) (Tabela 5).

Comparando os diferentes equipamentos utilizados para o gotejamento da solução e formação das esferas, observou-se que o bastão de vidro grosso resultou em esferas mais uniformes e esféricas em comparação com os outros métodos. Por outro lado, as esferas formadas pelas pipetas volumétrica e Pasteur apresentaram tamanhos desiguais e bolhas (Figura 3).

Devido a essa diferença na qualidade da formação das esferas, optou-se por utilizar o bastão de vidro grosso como o melhor método para o gotejamento da solução e formação das esferas. Isso foi especialmente relevante, considerando que esse método resultou nos maiores valores de atividade CMC_{case} no conjugado enzima-suporte. A atividade celulolítica alcançou atividade de $0,293 \pm 0,015$ U da atividade da enzima solúvel utilizando o bastão de vidro grosso, enquanto que com a pipeta de plástico Pasteur foi de apenas 8,8% e com a pipeta de vidro foi de 4,53%.

Tabela 5 - Teste de diferentes objetos para gotejamento

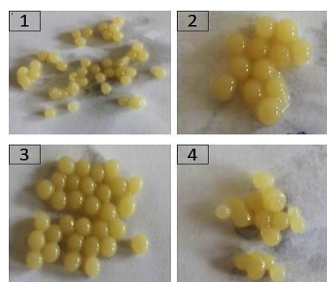
Objetos de gotejamento*	Atividade enzimática (U)
1	$0,257 \pm 0,010$ b
2	$0,293 \pm 0,015$ a
3	$0,244 \pm 0,020$ c
4	$0,220 \pm 0,017$ e
Livre	$0,227 \pm 0,006$ d

*(1) bastão de vidro fino; (2) bastão de vidro grosso; (3) micropipeta de 1 mL (4) pipeta Pasteur.

Enzima livre refere-se a enzima em passar por processo de imobilização. O teste

estatístico utilizado foi o Tukey, com nível de significância de 5%. Os resultados estão expressos juntamente com os seus respectivos desvios padrões. Os índices que representam as maiores médias são “a”.

Figura 3 – Extrato bruto imobilizado.



*(1) bastão de vidro fino; (2) bastão de vidro grosso; (3) micropipeta de 1 mL (4) pipeta Pasteur.

Portanto, os resultados indicam que o bastão de vidro grosso proporcionou esferas mais uniformes e eficientes na imobilização da enzima, resultando em maior atividade xilanolítica no conjugado enzima-suporte em comparação com os outros métodos testados. Essa escolha do método de imobilização é essencial para garantir a melhor performance da enzima imobilizada e pode ser relevante para aplicações em diferentes áreas, como a indústria e a pesquisa em biotecnologia.

3.2 Determinação do número de esferas na reação enzimática

Ao realizar o teste do número de esferas imobilizadas na reação enzimática, observou-se que o aumento dos valores da atividade celulolítica ocorreu progressivamente até atingir um patamar após a inserção de 8 esferas no sistema. Comparando com o valor de atividade no sistema com 4 esferas, foi constatado que ao adicionar 6 e 8 esferas, houve um aumento na atividade de 22,93% e 43,31%, respectivamente (Tabela 6).

4º WORKSHOP DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS UFVJM-UFU

Além disso, é importante mencionar que a quantidade de açúcares redutores formados pelo acréscimo de mais duas esferas na reação, totalizando dez beads, manteve-se praticamente a mesma, o que sugere o início da saturação do processo reacional. Nesse ponto, o sistema parece ter atingido uma capacidade máxima de atividade enzimática em relação ao número de esferas.

Portanto, ao analisar os dados, conclui-se que o número de esferas imobilizadas influencia a atividade xilanolítica, mas existe um ponto de saturação onde o acréscimo de mais esferas não resulta em aumento significativo da atividade. Nesse contexto, a escolha de oito esferas parece ser uma abordagem adequada para garantir um alto nível de atividade enzimática no sistema, sem atingir a saturação do processo.

Tabela 6 - Quantificação de esferas enzimáticas na reação e quantificação da atividade da exoglucanase.

Quantidade de esferas na reação	Atividade enzimática (U)
4	0,157±0,015 e
6	0,193±0,009 d
8	0,225±0,007 a
10	0,214±0,004 c
Livre	0,220±0,011 b

O teste estatístico utilizado foi o Tukey, com nível de significância de 5%. Os resultados estão expressos juntamente com os seus respectivos desvios padrões. Os índices que representam as maiores médias são “a”.

3.3 Efeito da concentração de alginato de sódio e cloreto de cálcio no processo de imobilização aplicando o planejamento fatorial

O delineamento composto central rotável (DCCR) realizado pelo software Protimiza Experimental Design, com nível de significância α de 5%, produziu a tabela de Regressão (Tabela 31), revelando que a média experimental foi estatisticamente significativa, visto que o p-valor foi inferior a 5% (0,05).

Além disso, apenas as variáveis do termo quadrático da concentração de alginato (X_1^2) e o termo quadrático da concentração da solução do cloreto de cálcio (X_2^2) foram estatisticamente significativas e proporcionaram maior valor de atividade celulolítica, conforme coeficiente positivo pela Equação 6 e o gráfico de Pareto.

Enquanto isto, a concentração de alginato de sódio, a concentração do cloreto e a interação entre estes, não apresentam influência na atividade da CMCCase (Tabela 7). Na Figura 4 mostra o gráfico de Pareto, o qual relacionou as variáveis com o T calculado, demonstrando as

variáveis significativas. O gráfico de Pareto (Figura 4A) corroborou com esses resultados, apresentando que alguns dados experimentais estão pouco afastados dos dados preditos (Figura B).

Tabela 7 - Regressão do DCCR da concentração da solução de alginato de sódio versus concentração de solução de cloreto de cálcio, com a atividade da CMCCase como resposta.

Nome	Coeficiente	Erro Padrão	T calculado	p-valor
Média	0,05	0,01	7,66	0,0003
X_1	0,00	0,00	0,89	0,4085
X_1^2	0,02	0,01	4,34	0,0049
X_2	0,00	0,00	-0,36	0,7292
X_2^2	0,03	0,01	4,31	0,0007
$X_1 \cdot X_2$	0,00	0,01	-0,86	0,4315

Com base nisto e realizando a reparametrização do modelo ao nível de significância de 5%, obteve-se a Equação 4, que é um modelo quadrático (segunda ordem), com concavidade voltada para cima.

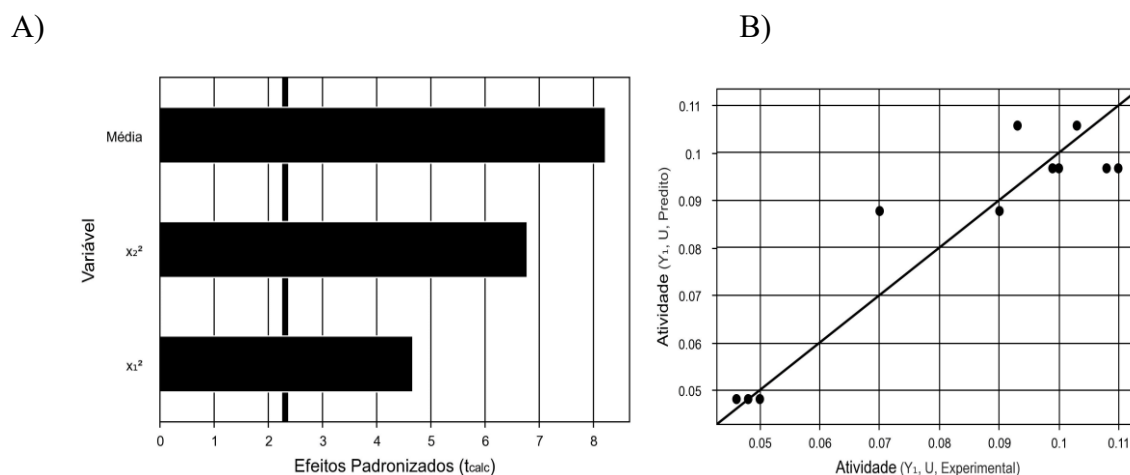
4º WORKSHOP DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS UFVJM-UFU

$$\text{Atividade} \left(\frac{U}{mL} \right) = 0,05 + 0,02Alg^2 + 0,03Cl^2 \quad (4)$$

Esses resultados corroboram a confiabilidade do modelo matemático gerado

pelos delineamento composto central rotável (DCCR) e a adequação dos valores preditos em relação aos experimentais.

Figura 4 – (A) Gráfico de Pareto do DCCR da concentração da solução de alginato de sódio versus concentração da solução de cloreto de cálcio, (B) Valores experimentais versus preditos



O DCCR realizado com α de 5% gerou a tabela ANOVA (Tabela 8) e o R^2 quadrado do modelo reparametrizado apresenta 87,05%. Pode-se observar pelo teste de Fischer-Snedecor (Teste F) o F calculado da regressão ($F_{\text{regressão/resíduos}}$) e o F tabelado da regressão (F_{tab1}) foram de 26,9 e 4,46, respectivamente.

Seguindo as indicações do *software* têm-se que o modelo obtido com a regressão foi estatisticamente significativo, apresentando um R^2 acima de 85% alto. O R (coeficiente de correlação) mede o grau de dispersão dos dados obtido, indicando a quantidade de variabilidade que é indicada. o $F_{\text{regressão/resíduos}}$ foi maior que o F_{tab1} , e o $F_{\text{falta de ajuste/erro puro}}$ foi menor que o F_{tab2} .

Assim como, o p -valor da regressão e da falta de ajuste foram inferiores a 5%. Com base nisto, pode-se inferir que a hipótese H_0 foi rejeitada, ou seja, a variância da concentração da solução de alginato de sódio e da solução cloreto de cálcio são estatisticamente diferentes, a 5% de significância, pelo teste F.

A análise das Figuras 5 e 6 revelaram a superfície de resposta em 3D e 2D, respectivamente, para a atividade da CMCase imobilizada em alginato de sódio, produzida pelo *Aspergillus brasiliensis* 3.7TA. Ao observar ambas as figuras, identificou-se que as extremidades começam a apresentar as maiores atividades, um ponto ótimo aparente para a ação da enzima, resultando em uma atividade máxima de CMCase de $0,17 \pm 0,02$ U, com concentrações de alginato de sódio de 4,26% (m/v) e 5,34% (m/v) de cloreto de cálcio, com viscosidade de 407,9 cP (centipoise) à 20,20°C, a viscosidade da água apresenta 1cP, isso demonstra a alta viscosidade da amostra.

Tabela 8 - Tabela ANOVA do DCCR

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{ca} _{lc}	p-valor
Regressão	0,0	2	0,0	26,9	0,00028
Resíduos	0,0	8	0,0	-	-
Falta de ajuste	0,0	6	0,0	33,7	0,02913
Erro puro	0,0	2	0,0	-	-
Total	0,0	10	-	-	-

Figura 5 - Superfície resposta para concentração do alginato de sódio e do cloreto de cálcio na reação enzimática da CMCase.

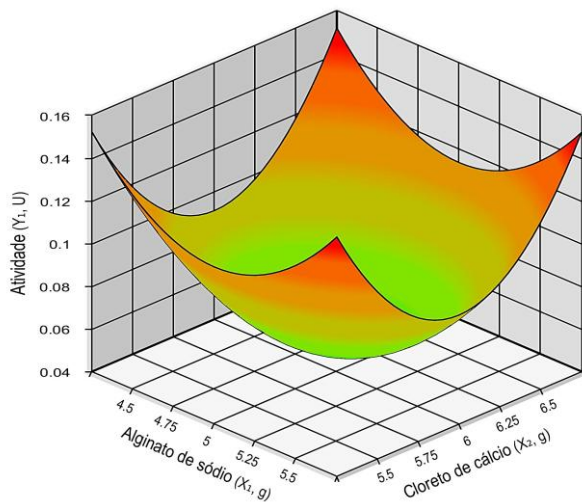
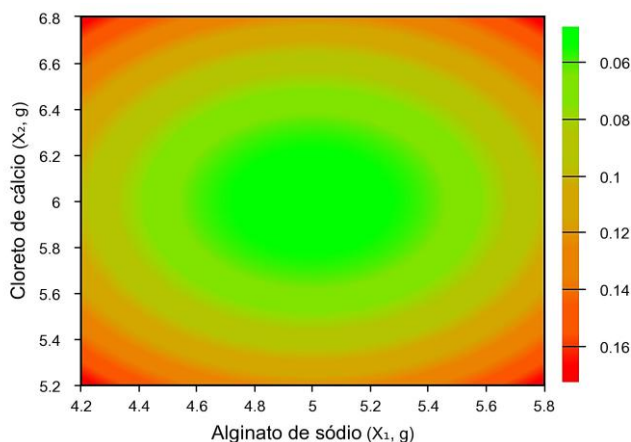


Figura 6 - Resposta para concentração do alginato de sódio e do cloreto de cálcio, na reação enzimática da CMCase.



Observou-se, além disso, que em concentrações de alginato muito baixas não foi

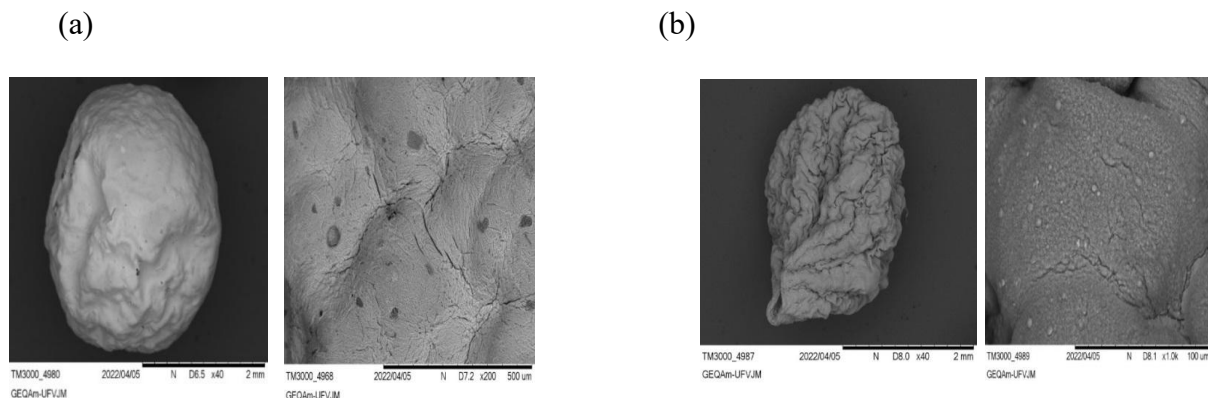
possível formar esferas. Além disso, em outros planejamentos fatoriais realizados, percebeu-se que em concentrações muito elevadas de alginato a solução fica muito viscosa, o que também dificulta o gotejamento e, conseqüentemente, a formação dos beads. Em relação à concentração da solução de cloreto de cálcio, ponderou-se que a mesma, também, tem interferência na formação das esferas, cuja concentração de alginato permanece a mesma, mas com a variação da concentração de cloreto o aspecto das esferas formadas é distinto.

A Figura 7 (a) ilustra a esfera imobilizada com o extrato bruto enzimático produzido pelo *Aspergillus brasiliensis* 3.7TA, apresentando certa esfericidade na amostra e poucas aberturas ou fissuras. No entanto, ao comparar com a Figura 7 (b), é notável uma diferença superficial significativa. A amostra após a reação enzimática apresenta menor esfericidade, com aspecto mais áspero e denotando que sofreu algum processo de deteriorização durante o processo de reação, podendo ser atribuída ao tempo de exposição do mesmo na temperatura da reação.

Essa observação é relevante para a discussão dos resultados, pois indica que a imobilização da enzima no suporte não é permanente e que a estabilidade da esfera imobilizada pode ser afetada ao longo do tempo de reação. Essa deteriorização da esfera pode ter implicações práticas em aplicações industriais, uma vez que a durabilidade da imobilização é um fator importante para a eficiência e reprodutibilidade do processo enzimático.

Portanto, é necessário levar em consideração esse aspecto ao discutir os resultados da imobilização enzimática e considerar estratégias para melhorar a estabilidade da esfera imobilizada ao longo do processo de reação. Medidas como o uso de suportes mais resistentes a temperatura, ação enzimática ou o tratamento da esfera imobilizada antes do uso podem ser consideradas para aumentar a sua durabilidade e eficiência em aplicações industriais.

Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura (a) As esferas immobilizadas sem sofrer reação enzimática, (b) esferas immobilizadas após participar da reação enzimática.



3.4 Efeito da temperatura e do pH na atividade do derivado immobilizado em esferas de alginato

O delineamento composto central rotável (DCCR) realizado pelo software Protimiza Experimental Design, com nível de significância α de 5%, produziu a tabela de Regressão (Tabela 33), revelando que a média experimental foi estatisticamente significativa, visto que o p-valor foi inferior a 5% (0,05). Além disso, as variáveis pH (X_1) e Temperatura (X_2), bem como o quadrado da temperatura (X_1^2) também foram estatisticamente significativas.

Reparametrizando o modelo matemático gerado, eliminando as combinações da temperatura e pH bem como o quadrado da temperatura (X_2^2) (Tabela 9). Resultando no modelo matemático gerado pelo delineamento reparametrizado, as variáveis envolvidas tiveram um impacto significativo na atividade

O gráfico de Pareto (Figura 8) corroborou com esses resultados, apresentando as variáveis significativas que influenciaram na atividade experimental, e demonstrou que os pontos da atividade experimental estavam próximos da linha predita pelo modelo.

Tabela 9 - Regressão obtida com o DCCR da temperatura versus pH, com a atividade da CMCase como resposta.

Nome	Coefficiente	Erro Padrão	T calculado	p-valor
Média	0,09	0,01	13,74	0,0000
X_1	-0,01	0,00	-2,32	0,00595
X_1^2	-0,02	0,01	-4,46	0,0043
X_2	0,03	0,00	6,95	0,0004
X_2^2	0,01	0,01	0,94	0,3819
$X_1 \cdot X_2$	0,01	0,01	1,14	0,2971

celulolítica. Ao analisar a equação gerada pelo delineamento (Equação 6), percebeu-se que a temperatura contribui contribuição positiva para maior atividade celulolítica, conforme evidenciado pelos coeficientes positivos (Tabela 9).

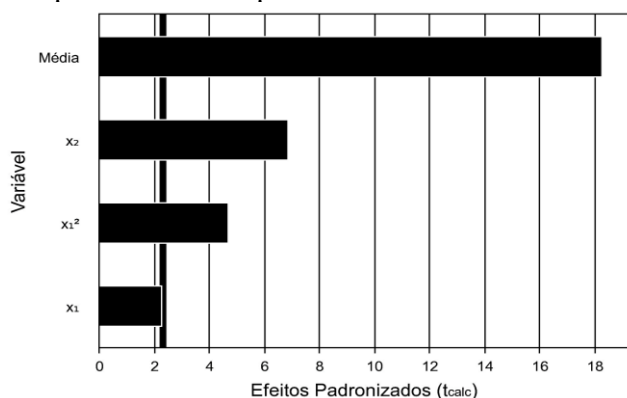
Esses achados destacam a relevância das variáveis de temperatura e pH na atividade da CMCcase, bem como a importância da interação entre esses fatores. A compreensão desses parâmetros é fundamental para otimizar a produção industrial de enzimas celulolíticas,

garantindo a obtenção de atividades enzimáticas elevadas e a eficiência dos processos.

A reparametrização do modelo, com um nível de significância de 5%, levou à obtenção da Equação 6. Ao analisar o gráfico que relacionou os valores experimentais com os valores preditos pelo modelo, verificou-se que a quadriplicata do

ponto central apresentou proximidade nos valores preditivos, evidenciando uma boa repetibilidade do experimento. Além disso, os demais pontos não mostraram um desvio significativo entre os valores de atividade preditos e experimentais (Figura 9).

Figura 8 - Gráfico de Pareto do DCCR da temperatura versus pH.



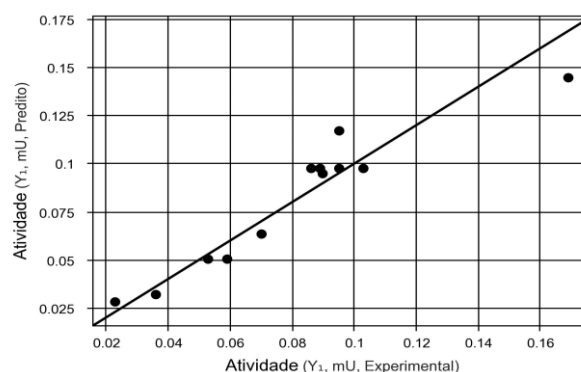
$$Atividade \left(\frac{U}{mL} \right) = 0,10 - 0,01 X_1 - 0,02 X_1^2 + 0,03 X_2 \quad (5)$$

Esses resultados corroboram a confiabilidade do modelo matemático gerado pelo delineamento composto central rotável (DCCR) e a adequação dos valores preditos em relação aos experimentais. A boa concordância entre as previsões do modelo e os resultados reais demonstra que o DCCR foi uma abordagem eficaz para investigar as interações das variáveis de temperatura e pH na produção de enzimas celulolíticas.

O DCCR realizado com α de 5% gerou a tabela ANOVA (Tabela 10) e o R² do modelo de 90,30% após reparametrização. Pode-se observar

pelo teste de Fischer-Snedecor (Teste F) o F calculado da regressão (F_{regressão/resíduos}) e o F tabelado da regressão (F_{tab1}) foram de 24,80 e 4,07, respectivamente.

Figura 9 - Valores experimentais versus preditos do DCCR da temperatura versus pH.



Seguindo as indicações do *software* têm-se que o modelo obtido com a regressão foi estatisticamente significativo, apresentando um R² acima de 90%. O R (coeficiente de correlação) mede o grau de dispersão dos dados obtido, indicando a quantidade de variabilidade que é indicada. Assim como, o *p*-valor da regressão foi inferior a 5%. Com base nisto, pode-se inferir que a hipótese H₀ foi rejeitada, ou seja, a variância da temperatura e do pH são estatisticamente diferentes, a 5% de significância, pelo teste F.

Tabela 10 - Tabela ANOVA do DCCR da temperatura versus pH, com a atividade celulolítica como resposta.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	<i>p</i> -valor
Regressão	0,0	3	0,0	24,8	0,00193

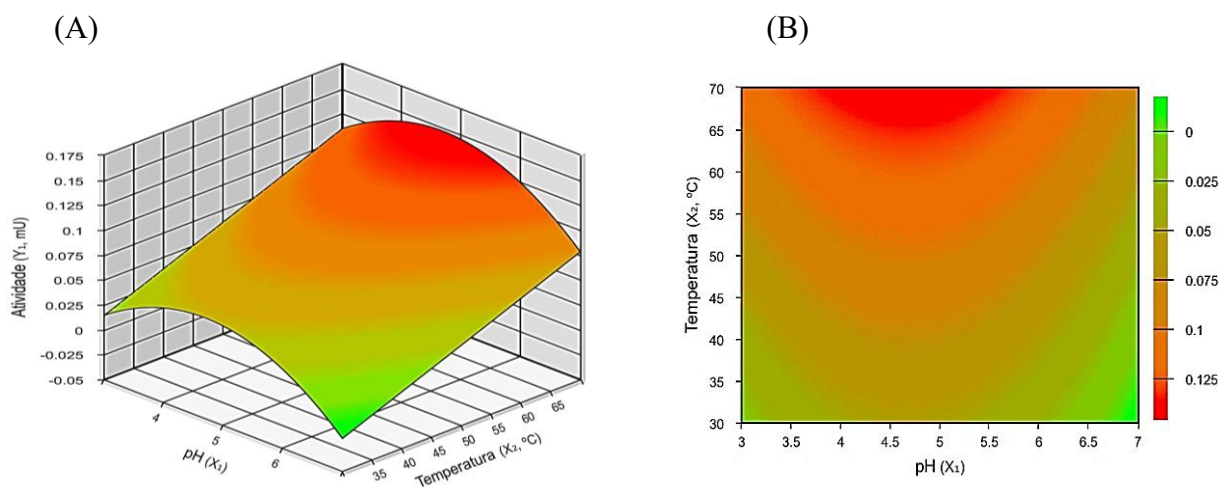
4º WORKSHOP DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS UFVJM-UFU

Resíduos	0,0	8	0,0	-	-
Falta de ajuste	0,0	5	0,0	4,8	0,11432
Erro puro	0,0	3	0,0	-	-
Total	0,0	11	-	-	-

A análise das Figura 10 (A e B) revelou a superfície de resposta em 3D e 2D, respectivamente, para a atividade da CMCase imobilizada em alginato de sódio, enzima essa produzida pelo *Aspergillus brasiliensis* 3.7TA. Ao observar ambas as figuras, tem-se um pH ótimo variando de 3,34 a 5,5 e temperatura de 60 à 70°C. O ponto ótimo aparente para a ação da

enzima, que foi alcançado a 65°C em tampão citrato de sódio 100 mM com pH 4,60, resultando em uma atividade máxima de CMCase de $0,14 \pm 0,01$ mU. Ficou claro que pH acima de 5,80 e temperaturas inferiores a 60°C não são ideais para a reação enzimática com enzimas imobilizadas (conforme as colorações), uma vez que a atividade da CMCase diminuiu nessas condições.

Figura 10 – (A) Superfície resposta para temperatura versus pH na reação enzimática da CMCase em estudo, (B) Resposta para temperatura versus pH, em 2D, da CMCase produzidas por *Aspergillus brasiliensis* 3.7TA.



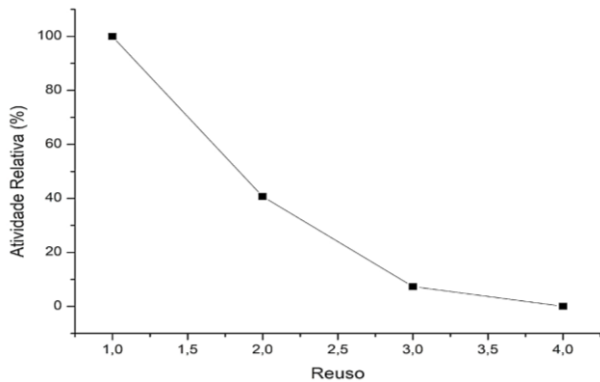
Desta forma, padronizou a reação em pH 4,60, em tampão citrato de sódio 100 mM com pH em temperatura de reação de 65°C.

3.5 Reuso do extrato bruto celulolítico

Durante o processo de reutilização dos derivados imobilizados na hidrólise da carboximetilcelulose, observou-se uma redução progressiva na atividade enzimática. Após o primeiro uso, a atividade caiu para 40,71% do valor inicial, e após o terceiro reuso, essa redução se acentuou ainda mais, chegando a 7,38%. No quarto reuso, não foi mais detectada nenhuma

atividade enzimática, como pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 - Reuso das enzimas imobilizadas.



O método de imobilização utilizado, conhecido como "aprisionamento", é caracterizado por ser irreversível. Nesse processo, a celulase é retida dentro de uma matriz porosa ou rede polimérica, sem a formação de ligações diretas com o material suporte. Essa abordagem permite que apenas substratos e produtos atravessem a matriz, evitando o vazamento de enzimas. Portanto, o tamanho adequado dos poros da matriz é um fator crucial na seleção do suporte. O "aprisionamento" pode melhorar a estabilidade enzimática, reduzir a lixiviação de enzimas e proteger a enzima de ambientes adversos, prevenindo, assim, a desativação e desnaturação da celulase (IMAM et al., 2021).

Alguns transportadores comuns para o método de "aprisionamento" incluem contos de alginato de cálcio e matrizes sol-gel. Por exemplo, estudos anteriores demonstraram eficiências notáveis na hidrólise de celulose

utilizando esse método. Nesses estudos, a imobilização de celulase em materiais hospedeiros, como sílica porosa, através de uma reação sol-gel, resultou em melhorias significativas na eficiência de hidrólise, superando a atividade da enzima livre. Além disso, a imobilização da celulase por meio do encapsulamento sol-gel demonstrou melhorias na termoestabilidade, estabilidade de pH e resistência à glicose (XU et al., 2023).

Mesmo após cinco ciclos de reutilização, a atividade da celulase imobilizada ainda mantinha uma porção significativa de sua atividade inicial, indicando seu potencial para aplicações em grande escala (XU et al., 2023).

Embora o "aprisionamento" seja um método de imobilização relativamente simples que geralmente resulta em maior atividade enzimática e estabilidade, ele apresenta limitações práticas. A transferência de substratos para os sítios ativos da enzima pode ser prejudicada devido ao confinamento da celulase. Além disso, o tamanho dos portadores imobilizados pode afetar negativamente a taxa de reação catalítica das celulases, especialmente quando se trata de substratos macromoleculares. Outras desvantagens incluem a capacidade limitada de carga, inativação enzimática e vazamento de enzimas devido ao tamanho inadequado dos poros na matriz (QAMAR et al., 2021).

4 - Conclusões

O método de imobilização foi padronizado utilizando o bastão de vidro grosso, com a reação contendo oito esferas imobilizadas, obtendo uma atividade enzimática de $0,225 \pm 0,007$ U. Após aplicação do planejamento experimental para as duas variáveis: Concentração de alginato de sódio e cloreto de cálcio, foram obtidas as melhores concentrações para o método de imobilização, utilizando 4,26% (m/v) de alginato de sódio e 5,34% (m/v) de

cloreto de cálcio, com uma atividade máxima de CMC_{case} de $0,17 \pm 0,02$ U.

Além disso, foi verificado o efeito da temperatura e pH na reação enzimática, tendo o ponto ótimo para a ação da enzima, foi alcançado a 65°C em tampão citrato de sódio 100 mM com pH 4,60, resultando em uma atividade máxima de CMC_{case} de $0,14 \pm 0,01$ U, podendo reutilizar esse extrato enzimático imobilizado por mais três vezes no processo, onde Após o primeiro uso, a atividade caiu para 40,71% do

valor inicial, e após o terceiro reuso, essa redução se acentuou ainda mais, chegando a 7,38%.

Em conclusão, o estudo demonstrou a viabilidade e eficiência do *Aspergillus brasiliensis* 3.7TA para a produção de celulases em meio submerso CP, com otimização do processo de imobilização utilizando esferas imobilizadas. Esses resultados destacam o potencial industrial dessa abordagem, que pode contribuir para a produção de enzimas celulolíticas de forma mais econômica e sustentável. Assim, o presente estudo abre caminho para aplicações biotecnológicas relevantes e pode ser útil no desenvolvimento de processos industriais mais eficientes e ambientalmente amigáveis.

5 - Agradecimentos

À UFMG e ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis pela estrutura e recursos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradecimento especial à Fundação de Amparo do Estado de Minas Gerais (FAPEMG) pelo apoio financeiro (Demanda Universal APQ-02178-21).

Aos laboratórios LIPEMVALE-UFVJM; Ao LIMA financiado pela FAPEMIG (CEX-112-10), SECTES/MG e RQ-MG.

6 - Referências

BICKERSTAFF, G. Immobilization of enzymes and cells. **Methods in Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 22–27, 1997.

BOSHAGH, F. Measurement methods of carbohydrates in dark fermentative hydrogen production- A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 47, p. 24028–24050, 2021.

BRYNGEMARK, E. Second generation biofuels and the competition for forest raw materials: A partial equilibrium analysis of Sweden. **Forest**

Policy and Economics, v. 109, March, p. 10202–10209, 2019b. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.forpol.2019.102022>.

DOS SANTOS, A. A. et al. Microwell plate-based method for the determination of reducing sugars with the DNS reagent. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017.

ERSON, R. An experimental study of the life cycles and taxonomy of Allomyces. **Lloydia**, v. 4, p. 77–144, 1941.

FOX, R.; MCDONALD, A. T. **Introdução à Mecânica dos Fluidos**. Rio de Janeiro: [s.n.].

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Ap. Chem.**, v. 59, p. 257–268, 1987.

GUPTA, S. K.; KATAKI, S.; CHATTERJEE, S.; PRASAD, R. K.; DATTA, S.; VAIRALE, M. G.; SHARMA, S.; DWIVEDI, S. K.; GUPTA, D. K. Cold adaptation in bacteria with special focus on cellulase production and its potential application. **Journal of Cleaner Production**, V. 258, 2020, 120351. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120351>.

IMAM, H. T.; MARR, P. C.; MARR, A. C. Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment. **Green Chemistry**, 23(14), 4980-5005, 2021.

KARIMI, S.; KARRI, R. R.; TAVAKKOLI YARAKI, M.; KODURU, J. R. Processes and separation technologies for the production of fuel-grade bioethanol: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 4, p. 2873–2890, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01208-9>.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

QAMAR, S. A. et al. Cellulose-deconstruction potential of nano-biocatalytic systems: A strategic drive from designing to sustainable applications of immobilized cellulases.

**4º WORKSHOP DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS
UFVJM-UFU**

International Journal of Biological Macromolecules, v. 185, n. June, p. 1–19, 2021.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de processos**. 1. ed. Campinas, São Paulo: [s.n.].

SRIVASTAVA, N. et al. Enhance production of fungal cellulase cocktail using cellulosic waste. **Environmental Technology and Innovation**, v. 19, p. 100949, 2020.

STRONG, P. J. et al. Filamentous fungi for future functional food and feed. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 76, n. May, p. 102729, 2022.

XU, C.; TONG, S.; SUN, L.; GU, X. Cellulase immobilization to enhance enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: An all-inclusive review, **Carbohydrate Polymers**, Volume 321, 2023.

ZHANG, J.; RENTIZELAS, A.; ZHANG, X.; LI, JU. Sustainable production of lignocellulosic bioethanol towards zero waste biorefinery, **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, Vol. 53, Part C, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.seta.2022.102627>.