

## Parâmetros cinéticos para um complexo celulolítico comercial em relação à produção de açúcares redutores totais e solúveis

Marcos H. L. Silveira (PG), Larissa da Silva (PG), Rodrigo S. Aguiar (IC), e Luiz P. Ramos (PQ)\*. luiz.ramos@ufpr.br

Centro de Pesquisa em Química Aplicada (CEPESQ). Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná – UFPR; Curitiba-PR, Brasil.

Palavras Chave: celulasas, parâmetros cinéticos, inibição

### Introdução

A caracterização de celulasas é de extrema importância para a indústria, visto que é necessário conhecer os parâmetros cinéticos de um preparado enzimático para desenvolver o processo em escala industrial. O modelo cinético de Michaelis-Menten (MM) é baseado no princípio de interação substrato/enzima em sistema homogêneo, diferente da atuação das celulasas, no qual as enzimas precisam adsorver na superfície do substrato para agir. As celulasas atuam de maneira sinérgica pela formação de terminações reductoras na superfície do substrato via endo- $\beta$ -1,4-glucanases (EG), pela liberação de celobiose via exo- $\beta$ -1,4-glucanases e finalmente, pela conversão de pequenos oligossacarídeos em glucose<sup>1</sup> via  $\beta$ -1,4-glucosidases. Logo, existem açúcares redutores (AR) solúveis e insolúveis. Os atuais modelos cinéticos propostos são baseados principalmente na produção de açúcares redutores solúveis. O presente trabalho tem por objetivo a caracterização dos parâmetros cinéticos para um complexo celulolítico em relação à produção de açúcares redutores totais e solúveis utilizando o mesmo substrato.

### Resultados e Discussão

Os ensaios de cinética de degradação de celulose foram realizados utilizando papel de filtro Whatman n°1 como substrato, na presença de uma mistura de Celluclast® 1.5L FG e Novozym® 188 na proporção 50/15 (p/p) (Novozymes). As reações foram realizadas conforme Ghose (1987)<sup>2</sup> e monitoradas em intervalos de 10 minutos utilizando alíquotas de 1,0 mL de sobrenadante, contendo de 0,0094 a 0,000603 mg.mL<sup>-1</sup> de enzima, que foram diluídas em 1,0 mL de tampão acetato de sódio em pH 4,8 (50 mmol.L<sup>-1</sup>). A quantificação de AR totais e solúveis foi realizada separadamente através da reação com o reagente ADNS (ácido-3,5-dinitrosalicílico)<sup>3</sup>. A Tabela 1 apresenta os dados encontrados para os experimentos segundo cálculos realizados com as equações da Figura 1. Os parâmetros cinéticos em consideração à produção de AR totais são maiores quando comparados com AR solúveis, diferença esta que é

devida à formação de AR insolúveis via ação das EG.

$$v_o = \frac{v_{\max} \cdot [E]}{k_e + [E]} \quad \frac{1}{v_o} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{k_e}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[E]}$$

Michaelis-Menten

Lineweaver-Burk

Figura 1. Equações dos modelos cinéticos adaptados para celulasas.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos.

Modelo	Michaelis-Menten			Lineweaver-Burk		
	R <sup>2</sup>	V <sub>max</sub>	k <sub>e</sub> <sup>*</sup>	R <sup>2</sup>	V <sub>max</sub>	k <sub>e</sub>
AR						
Total	0,9334	0,9703	0,0116	0,9734	-0,0949	-0,0054
Solúvel	0,9469	0,7080	0,0039	0,9756	-0,8679	-0,0129

\*Unidades: V<sub>max</sub>[=]  $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}\cdot\text{min}}$ ; k<sub>e</sub>[=]  $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$ .

A determinação dos parâmetros cinéticos foi realizada com base na velocidade inicial da reação, permitindo demonstrar que os tempos de inibição são diferentes para a produção de AR totais e solúveis. Apesar do modelo de Lineweaver-Burk exibir bons valores de R<sup>2</sup>, a determinação de parâmetros cinéticos para celulasas deve ser realizada com a equação de MM (Figura 1), visto que os valores dos parâmetros cinéticos encontrados com LB são negativos. No entanto, o gráfico de LB lineariza a equação de MM e assim pode ser empregado para melhor visualização da inibição presente na reação.

### Conclusões

Com os resultados obtidos, pode-se sugerir que os atuais métodos para caracterização dos parâmetros cinéticos para a degradação enzimática da celulose são incompletos. Além disso, o melhor modelo para a determinação dos parâmetros cinéticos foi o de MM, ao passo que o modelo de LB deve ser aplicado quando há a necessidade de visualizar a inibição competitiva por parte dos produtos.

### Agradecimentos

CNPq, CAPES, UFPR.

<sup>1</sup> Ramos, L. P. J. *Quim Nova*. 2003, 26, 863-8871.

<sup>2</sup> Ghose, T.K. *Pure and Applied Chemistry*. v. 59, 1987, p. 257- 268.

<sup>3</sup> Miller, G. L. *Anal Chem*. 1959, 31, 426-428.