

**PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE POR *Aspergillus*
tubingensis AN1257 COM USO DE PALHA DE MILHO
COMO SUBSTRATO**

RICARDO SALVIANO DOS SANTOS
STÉFANY SOUZA CAMPOS
ALICE LOPES MACEDO
CIMARA DA SILVA VIEIRA

Diamantina
2019

RICARDO SALVIANO DOS SANTOS
STÉFANY SOUZA CAMPOS
ALICE LOPES MACEDO
CIMARA DA SILVA VIEIRA

**PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE POR *Aspergillus*
tubingensis AN1257 COM USO DE PALHA DE MILHO
COMO SUBSTRATO**

Diamantina
UFVJM
2019

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P964

Produção de β -glicosidase por *Aspergillus tubingensis* AN1257 com uso de palha de milho como substrato / Ricardo Salviano dos Santos... [et al.]. – Diamantina: UFVJM, 2019.

39 p. : il.

Outros autores: Stéfany Souza Campos, Alice Lopes Macedo, Cimara da Silva Vieira.

Inclui bibliografia

ISBN:978-85-7045-045-6

1. Fermentação. 2. Etanol. 3. Biocombustível. 4. Resíduo
I. Santos, Ricardo Salviano dos. II. Campos, Stéfany Souza. III. Macedo, Alice Lopes. IV. Vieira, Cimara da Silva. V. Título. VI. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 660

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Nádia Santos Barbosa - CRB-6/3468

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO.....	5
1.1 Enzimas holocelulolíticas: a degradação da parede celular vegetal	6
1.2 Enzimas celulolíticas	7
1.3 Glicosidase	10
1.4 Microrganismos usados na produção de celulose.....	10
1.5 Fungos filamentosos	13
1.6 Gênero <i>Aspergillus</i>	13
1.7 <i>Aspergillus tubingensis</i>	15
1.8 Processos de fermentação	16
1.9 Biomassas residuais utilizadas como substrato na produção de celulases	18
1.10 Aplicação de celulases – etanol de 2º geração	20
CAPÍTULO 2- MATERIAS E MÉTODOS	21
2.1 Obtenção e preparo dos substratos	21
2.2 Obtenção e manutenção da linhagem <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257.....	21
2.3 Processo fermentativo para a produção da enzima com uso de palha de milho como fonte de carbono – preparação do inóculo	21
2.4. Otimização da produção de β -glicosidase – Fermentação	22
2.5 Determinação da atividade enzimática: β -glicosidase.....	23
2.6 Caracterização bioquímica	24
CAPÍTULO 3- RESULTADO E DISCUSSÃO.....	25
3.1. Curva analítica para determinação da atividade de β -glicosidase	25
3.2. Otimização da produção de β -glicosidase	25
3.3 Caracterização bioquímica	29
CAPÍTULO 4- CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	34

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Atualmente, no Brasil, o etanol é produzido principalmente a partir da sacarose da cana-de-açúcar. Já nos EUA, é obtido a partir de hidrolisados de milho como a glicose, maltose e dextrinas. Tendo em vista o aumento da demanda energética mundial por combustíveis líquidos e a competição por cultura alimentares entre setores de produção de alimentos e energia, tem-se investido cada vez mais na produção de etanol de segunda geração (2G) a partir de fontes lignocelulósicas, como palhas, farelos, cascas, resíduos de exploração madeireira, entre outros. No entanto, a utilização de enzimas holocelulolíticas na conversão do material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis consiste no maior gargalo do processo produtivo do etanol 2G, devido ao alto custo de produção das enzimas comerciais. Deste modo, torna-se cada vez mais importante a busca por alternativas que viabilizem economicamente a produção destas enzimas.

Uma alternativa para a produção destes biocatalisadores a um baixo custo seria utilizar as próprias biomassas empregadas como matéria-prima para produção do etanol de segunda geração, como substratos para micro-organismos produtores de holocelulases. O uso destas biomassas residuais para produção de etanol de 2^o geração, assim como para produção das próprias enzimas holocelulolíticas, tornam estes processos economicamente viáveis, pois além de minimizar problemas ambientais que seriam causados devido ao incorreto descarte na natureza, agregam valor a coprodutos de baixo valor agregado e diminuem os custos da cadeias produtivas.

Estudos utilizando microrganismos celulolíticos têm evidenciado fungos filamentosos, dentre eles o gênero *Aspergillus*, como excelentes produtores de enzimas holocelulolíticas. A espécie *Aspergillus tubingensis* (*A. tubingensis*) tem demonstrado potencial na produção destes catalisadores, sobretudo de enzimas com atividade β -glicosidásica (SANTOS, 2015). No entanto, o número de trabalhos desenvolvidos com a referida espécie ainda é reduzido, revelando a necessidade de pesquisas mais aprofundadas com o uso do referido microorganismo.

Neste contexto, o presente estudo teve como foco principal promover a otimização da produção de β -glicosidase utilizando palha de milho como substrato, de forma

a contribuir significativamente para o desenvolvimento biotecnológico da produção de enzimas holocelulolíticas e consolidação de processos de produção de etanol de 2ª geração.

1.1 Enzimas holocelulolíticas: a degradação da parede celular vegetal

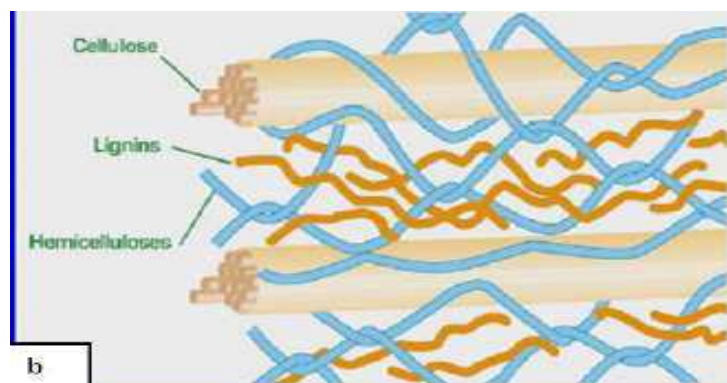
As enzimas são conhecidas como catalisadores capazes de acelerar a velocidade de reações (CASTRO, 2010). Estes biocatalizadores possuem alta eficiência e conseguem atuar de maneira específica sob o respectivo substrato, o que é considerado uma das suas principais características apresentando um excelente poder catalítico que as diferem dos catalisadores sintéticos e inorgânicos e, de forma geral, apresentam grande utilidade industrial (SANTOS, 2015).

Dentre as variedades de enzimas com aplicação industrial pode-se destacar as enzimas holocelulolíticas, que vem chamando atenção dos pesquisadores por conseguirem degradar a celulose e hemicelulose da parede celular vegetal em açúcares mais simples que podem ser fermentados para produção de etanol de 2ª geração. Basicamente a celulose que corresponde cerca de 40 a 50% de uma parede vegetal forma o esqueleto que é envolto pela hemicelulose (30 a 40%) e lignina (8 a 10%) (MOREIRA *et al.*, 2012).

De forma geral, esse contato entre a celulose, hemicelulose e lignina é capaz de formar uma ligação estável gerando uma rigidez considerável necessária para a célula vegetal, assim todos os componentes estão em contato umas nas outras de forma entrelaçada como pode ser visto na Figura 1. A degradação dessa estrutura para geração de açúcares mais simples é possível, pelo menos em parte, com o uso de várias enzimas como as xilanases, manases, poligalacturonases, endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidades que são conhecidas e desempenham papéis de respeito quando se trata da hidrólise de holocelulose (SIQUEIRA *et al.*, 2010).

Vale ressaltar que a estrutura relutante do substrato pode impedir a acessibilidade das enzimas supracitadas à celulose e hemicelulose (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Assim, etapas de pré-tratamento químicos e físicos muitas vezes são necessários como um meio para alterar a estrutura química originalmente complexa e recalcitrante de substratos lignocelulósicos (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010)

Figura 1 - Constituição do material vegetal



Fonte: BOUDET *et al.*, 2003

1.2 Enzimas celulolíticas

As celulasas são enzimas que possuem a capacidade de atuarem sob o material celulósico fazendo com que ocorra hidrólise e por fim favorecer a liberação de glicose sendo este um produto importante como, por exemplo, para a produção de etanol de segunda geração (CASTRO, 2010). Estruturalmente falando, a celulose é um polímero disposto de forma linear, plano e com resíduos de glicose unidos entre si por ligação β (1-4) tendo como características a insolubilidade em água e resistência a hidrólise (SANTOS *et al.*, 2015).

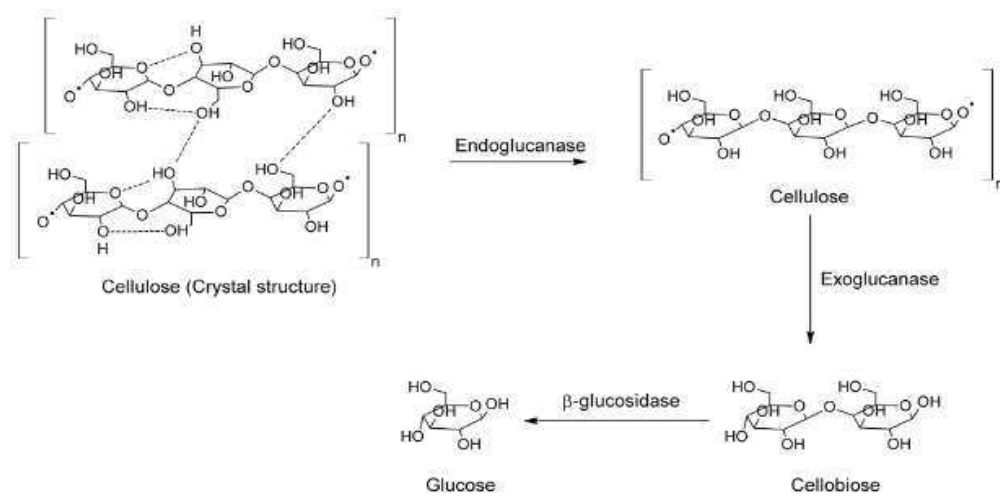
O processo eficiente de degradação da celulose é realizado por um conjunto de enzimas glicosídicas compostas por três tipos de enzimas sendo elas as endo- β -1,4-glucanases ou endoglucanases, as exo- β -1,4-glucanases ou celobiohidrolases, ou ainda exoglucanases e por fim as β -1,4-glicosidade sendo essas as celulasas verdadeiras por atuarem degradando substratos solúveis (VAN DEN BRINK; VRIES, 2011; LIAO *et al.*, 2015).

Atuando de maneira sinérgica e de forma complementar onde cada uma exerce sua função a fim de promover a hidrólise da celobiose (JUTURO; WU, 2014) que ocorre com a passagem do complexo celulósico do seio do fluido para uma região do substrato (DIAS, 2011).

Para ter uma eficiência no processo de quebra da celulose em monômeros são necessários basicamente três grupos de enzimas: endoglucanases, exoglucanases e a β -glicosidase que agem em conjunto. A endoglucanase quebra cadeias de celulose gerando novas extremidades que são redivididas em celobiose e celo-oligossacarídeos, função executada pela exoglucanase, depois a celobiose sofre mais uma quebra se transformando em

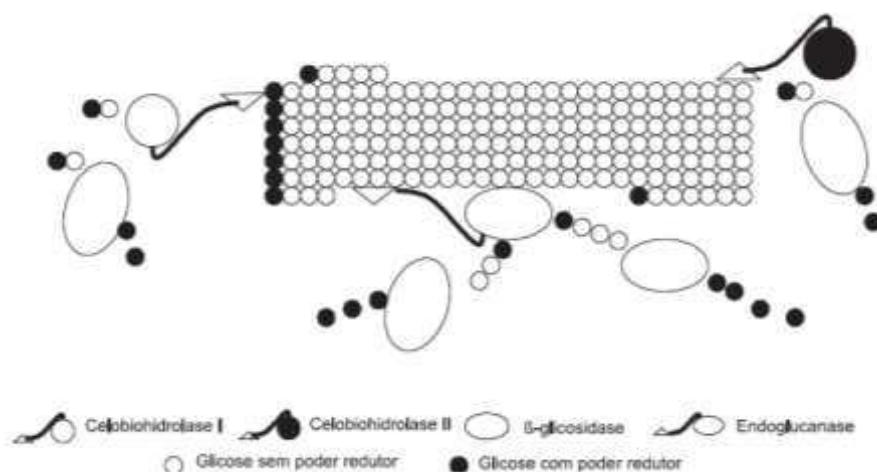
glicose pela β -glicosidase, esquema que pode ser observado na figura 2 que mostra todo esse processo de hidrólise já que é interessante industrialmente transformar a celulose em monômeros de glicose e esse processo só seria possível com a hidrólise química ou enzimática. Já na figura 3 é possível visualizar como ocorre a ação das enzimas do complexo celulolítico. (CASTRO., 2010; YOON *et al.*, 2014).

Figura 2 - Mecanismo de hidrólise da celulose



Fonte: YOON *et al.*, 2014

Figura 3 - Ação das enzimas no complexo

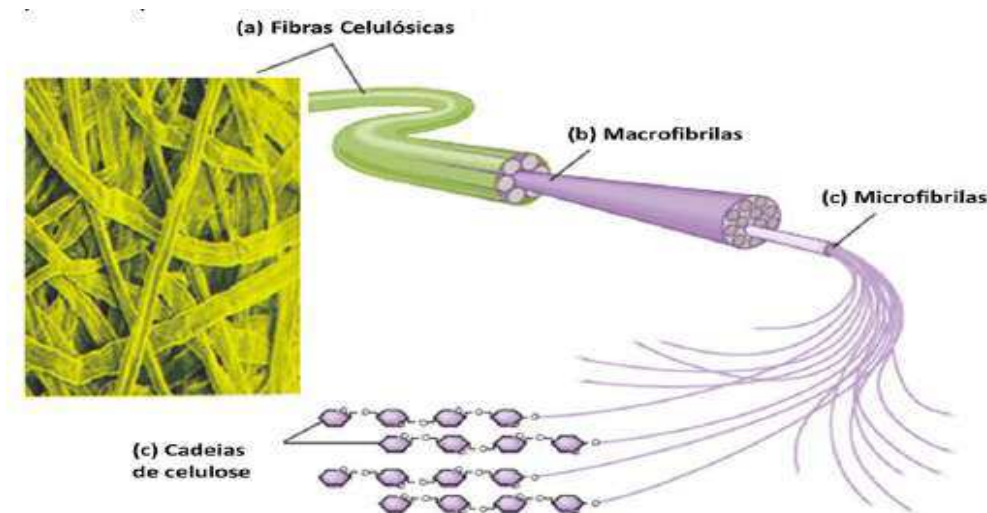


Fonte: CASTRO., 2010

Como visto anteriormente, a celulose está disposta em feixes formando

microfibras e em seguida macrofibras e vale ressaltar que a sua estrutura é cristalina regular, o que fornece tanto uma resistência física quanto também a biodegradação mostrada na figura 4 (JUTURO, 2014).

Figura 4 - Estrutura da celulose



Fonte: <http://nutrition.jbpub.com/resources/chemistryreview9.cfm>

Sendo assim, para que se consiga transformar a celulose em glicose, entram em ação as enzimas celulasas para atuarem sobre esse material celulósico sendo este um método tecnológico bastante promissor para desenvolvimento de produtos com um alto valor agregado (CASTRO, 2010). Ao se utilizar processos biocatalisados gera um menor impacto ambiental com um menor consumo energético já que as enzimas são biodegradáveis e com um excelente potencial específico. Vale ressaltar também que as enzimas substituem produtos químicos e solventes tóxicos minimizando os riscos para o meio ambiente (ROCHA *et al.*, 2010).

As enzimas do complexo celulolítico possuem uma ampla área de aplicação como clarificação de sucos, alimentação animal, indústria têxtil e também papelaria, produção de vinhos e cervejas e mais recentemente tem sido bastante procurada na utilização para a produção de etanol de segunda geração (JUTURO, 2014) porém as celulasas possuem um custo elevado, sendo assim na procura por redução de custos, o uso de resíduos agroindustriais como substratos para o crescimento de fungos seria o ideal para tornar o processo mais em conta financeiramente (YOON *et al.*, 2014).

1.3 Glicosidase

É a β -glicosidase a responsável por catalisar a hidrólise da celobiose resultando em duas moléculas de glicose que quando passa por processo de fermentação é transformado em etanol. Elas formam uma classe importante presente em inúmeros organismos, tanto nos procarióticos quanto nos eucarióticos (DAROIT., 2007).

Após a atuação das enzimas celulases origina-se a celobiose que exerce um feedback negativo para a produção das celulases, então predomina a ação da β -glicosidase que atua minimizando esse efeito inibitório fazendo com que mais celulases sejam produzidas pelo microrganismo (VILELA *et al.*, 2013).

As β -glicosidades então subdivididas em famílias formando um grupo heterogêneo de enzimas hidrolíticas, sendo elas GH1, GH3, GH5, GH9 e GH30, entretanto é normal encontrar algumas sem classificação. Essas famílias têm em comum a mesma estrutura de domínio catalíticos e similaridade entre a sequência de aminoácidos conservados que é considerado o método mais aceito por levar em consideração as características estruturais (BHATIA *et al.*, 2002). Em microrganismos é comum encontrar β -glicosidades da família GH1 (VILELA *et al.*, 2013).

A afinidade pelo substrato varia de acordo com a origem, função fisiológica e da localização da enzima, apesar disso, quando colocada em condições variadas como baixa atividade de água, alta concentração de substrato, presença de nucleófilos diferentes da água, as β -glicosidades podem catalisar a síntese de ligações β -glicosídicas entre moléculas (BHATIA *et al.*, 2002).

1.4 Microrganismos usados na produção de celulose

O biosistema microbiano é bem rico quando se trata da variedade de organismos de interesse industrial para produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, como bactérias, fungos filamentosos e leveduriformes (SINGHANIA *et al.*, 2010). Algumas bactérias que se destacam na produção de celulases pertencem aos gêneros *Pseudomonas*, *Actinomicetos*, *Bacillus*, *Cellulomonas* e *Clostridium* (FARINAS, 2011). Já os fungos filamentosos potenciais produtores de celulases são dos gêneros *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Sporotrichum*, *Fusarium*. As leveduras produtoras de celulases são

principalmente as do gênero *Trichosporium* e *Cryptococcus* (HANSEN *et al.*, 2015; SINGHANIA *et al.*, 2010; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

Na Tabela 1 é possível analisar algumas linhagens produtoras de celulasas e xilanases, as respectivas biomassas utilizadas como substratos e o tipo de fermentação, foram encontrada apenas duas referências para a enzima estudada, a β -Glicosidase.

Tabela 1 - Linhagens de fungos filamentosos isolados a partir de biomassas lignocelulósicas e produtores de celulases e xilanases

Linhagens	Enzimas Estudadas	Biomassa	Tipo de Fermentação	Valor	Fonte
<i>Acremonium strictum</i>	β -glucosidase	Bagaço de cana	FSb	3,8 U L ⁻¹	Goldbeck <i>et al.</i> , 2012
<i>Acremonium zeae</i>	Fpase	Palha de milho	FSb	0,14 U L ⁻¹	Almeida <i>et al.</i>
<i>Aspergillus awamori</i> 2B.361	β -glucosidase	Bagaço de cana	FES	45,6 U L ⁻¹	Gottschalk <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus awamori</i> 2B.361	Endoglucanase	Bagaço de cana	FES	4,9 U L ⁻¹	
<i>Aspergillus candidus</i>	Endoglucanase	Farelo Mamona	FSb	0,53 U L ⁻¹	Herculano <i>et al.</i> 2011
<i>Aspergillus Níger</i>	Xilanase	Farelo de cacau	FES	11,86 U L ⁻¹	Santos <i>et al.</i> , 2012
<i>Aspergillus Níger</i>	Fpase	Farelo de cacau	FES	7,51 U L ⁻¹	
<i>Aspergillus oryzae</i>	Endoglucanase	Resíduos de algodão	FSb	0,223 U L ⁻¹	Siqueira <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus terreus</i>	Xilanase	Resíduos de algodão	FSb	2,467 U L ⁻¹	Siqueira <i>et al.</i> , 2010
<i>Fusarium oxysporum</i> (F3)	CMCase	Palha de trigo	FES	26,2 U L ⁻¹	Hansen <i>et al.</i> , 2015
<i>Fusarium verticillioides</i>	Endoglucanase	Resíduos de algodão	FES	0,03 U L ⁻¹	Siqueira <i>et al.</i> , 2010
<i>Mucor sp.</i> (Blu 33)	Xilanase	Resíduos de algodão	FES	1,418 U L ⁻¹	Siqueira <i>et al.</i> , 2010
<i>Neosartorya spinosa</i> P2D19	Xilanase	Farelo de trigo	FSb	15,1 U L ⁻¹	Prado <i>et al.</i> , 2010
<i>Neosartorya spinosa</i> P2D19	CMCase	Farelo de trigo	FSb	3,60 U L ⁻¹	Prado <i>et al.</i> , 2010
<i>Penicillium echinulatum</i>	CMCase	CMC	FES	1,53 U L ⁻¹	Martins <i>et al.</i> , 2008

FSb- Fermentação Submersa; FES: Fermentação em Estado Sólido; CMC: Carboximetilcelulose
Modificado de SANTOS., 2015

1.5 Fungos filamentosos

Conhecidos como bolores ou mofos, os fungos filamentosos são organismos incríveis com grande interesse biológico e com destaque economicamente e biotecnologicamente gerando produtos metabólicos como enzimas, alcoóis, ácidos, pigmentos corantes e antibióticos (CARVALHO, 1999).

Compostos por hifas formando um envoltório esbranquiçado ou colorido sob o substrato por onde se desenvolve e o complexo emaranhado constitui o micélio de acordo com SOUZA, 2009. Esses microrganismos são encontrados facilmente e em grande variedade na natureza, são versáteis, apresentando um bom crescimento e baixo custo para cultivo. Os fungos filamentosos obtêm energia, prioritariamente, da degradação de carboidratos, incluindo materiais lignocelulósicos, devido à rica disponibilidade de biomassa de plantas na natureza (SOUZA *et al.*, 2009).

Os meios de cultura onde são cultivados são de fácil controle ocupando moderado espaço conseguindo se desenvolver melhor onde possui fonte de carbono, umidade e calor. Em análises laboratoriais podem ser usados vários substratos com intuito de promover a produção do complexo lignocelulolítico, como algodão, papel de filtro, resíduos agrícolas, carboximetilcelulose (CMC), entre outros (TREVISAN *et al.*, 2004)..

O fungo filamentoso *Trichoderma reesei* é uma das espécies mais amplamente empregadas na produção de coquetéis enzimáticos devido à eficiência de secreção de celulases e hemicelulases. Entretanto, a utilização do seu complexo celulolítico apresenta limitação devido à quantidade relativamente baixa de expressão de β -glicosidases. Já o gênero *Aspergillus* demonstra potencialidade para a produção de celulases, especialmente β -glicosidase, enzima deficiente nos coquetéis enzimáticos produzidos por *T. reesei*. Deste modo, a combinação de coquetéis enzimáticos produzidos por diferentes micro-organismos torna-se muitas vezes necessária para obtenção de um produto com alta eficiência hidrolíticas (YOON *et al.*, 2014).

1.6 Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* é de fungos pertencentes à família Aspergillaceae da ordem

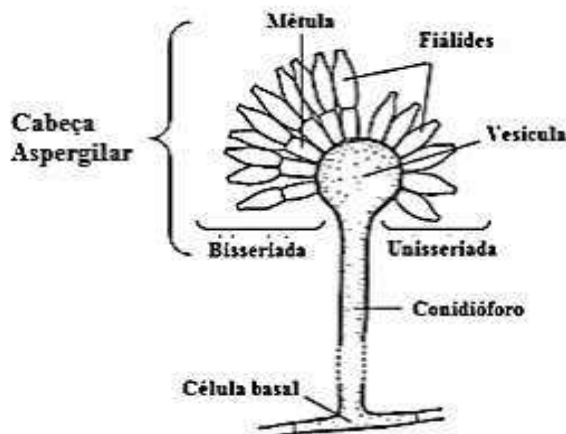
Eurotiales, classe dos Eurotiomycetes e filo Ascomycota (LEE; YAMAMOTO, 2015). Segundo Peterson (2015), este foi reconhecido pela primeira vez em 1729, na Florência, onde foi notada a sua semelhança estrutural com o hissope, objeto utilizado para aspergir água benta, esse gênero compreende um grupo diversificado que comporta cerca de 340 espécies. Sua classificação e identificação foram baseadas em caracteres fenotípicos, mas nas últimas décadas a maior influência se deu pela caracterização molecular e quimiotaxonômica (SAMSON *et al.*, 2014).

Fungos do gênero *Aspergillus* são os mais habituais dos fungos filamentosos e são também os mais bem estudados. As espécies que fazem parte desse gênero possuem uma ampla distribuição mundial estando presente em toda parte como no ar, água e até mesmo em organismos vegetais incluindo animais, estão também associados com o perecimento de materiais vegetais e alimentos, apresentando uma maior proporção em regiões de clima tropical e sub-tropical (ROSA; CAMPOS; BARONI, 2002).

As colônias produzidas geralmente possuem um bom crescimento, inicialmente claras a amareladas podendo chegar ao marrom e até mesmo ao negro, compostas por micélio aéreo com conidióforos eretos distribuídos sobre a superfície do meio com uma farta produção de conídios. É importante ressaltar que esse gênero é amplamente usado como produtor de enzimas do tipo lignocelulolíticas (SANTOS *et al.*, 2012; MENEZES, 2006).

De acordo com a Figura 5 pode-se observar a morfologia, a cabeça aspergilar localizada no topo de um conidióforo que se dilata na sua extremidade forma a vesícula, as células produtoras de esporos (fiálides) são suportadas diretamente pela vesícula ou por uma camada de células estéreis chamadas métula. As fiálides podem cobrir toda a vesícula ou apenas o seu topo, sendo a sua disposição uma característica essencial na identificação morfológica das diferentes espécies de *Aspergillus*spp. A partir da extremidade das fiálides, surgem os conídios cujas dimensões são variáveis consoantes a espécie. Na base dos conidióforos, sustentados por uma célula basal, encontram-se as hifas (COLLIER L, BALOWS A, SUSSMAN M, 1998)

Figura 5-Representação esquemática da morfologia de um *Aspergillus* spp



Fonte: ELVIA *et al.*, 2013

1.7 *Aspergillus tubingensis*

O *Aspergillus tubingensis* é uma espécie ainda pouco explorada na produção de enzimas aplicadas a biocombustíveis, contudo, os trabalhos reportados por Santos (2012) e Santos (2015) revelaram que o *A. tubingensis* destaca-se na produção de celulases e hemicelulases ao utilizar coprodutos oriundos da cadeia produtiva do biodiesel. Esta espécie foi considerada superior quando comparada a outras quatro espécies usuais na produção de enzimas holocelulolíticas (*Aspergillus niger* INCQS:40065, *Fusarium oxysporum* INCQS:40144, *Penicillium oxalicum* INCQS:40103, *Trichoderma reesei* CCT2768), utilizando a torta de caroço de algodão como fonte de carbono para indução das enzimas celulolíticas e xilanolíticas (SANTOS, 2015).

A linhagem AN1257 da espécie *A. tubingensis* também demonstrou grande potencial na produção de holocelulases em processos fermentativos com uso de sabugo e palha de milho como substrato (LIMA, 2005). Vries *et al.* (2017) realizaram o sequenciamento genômico do *A. tubingensis* e relatam que sua filogenia apresentou máxima compatibilidade com o *A. niger*, espécie promissora na produção de enzimas holocelulolíticas. Além disso, os autores cultivaram o *A. tubingensis* em biomassa lignocelulósicas observando que a expressão de genes relacionados à degradação de polissacarídeos da parede celular das plantas, tais como celulose, xilana, galactomanana e xiloglucana, foi superior à expressão genética de enzimas da degradação dos outros açúcares.

1.8 Processos de fermentação

As estratégias de melhorias na produtividade e atividade específica das enzimas incluem a definição das variáveis utilizadas durante o crescimento dos fungos filamentosos e da tecnologia aplicada à fermentação, que pode ser realizada em estado sólido ou submersa. O que diferencia esses dois tipos de processo fermentativo é basicamente o teor de água presente durante o processo reacional (CASTRO; PEREIRA Jr, 2010).

A fermentação submersa (FS) tem como sua principal característica à mistura perfeita, onde, teoricamente em cada parte do reator deverá ter ao mesmo tempo a mesma quantidade de microrganismo, nutrientes e metabólitos. Possui uma grande variedade dos processos microbianos em que a biomassa utilizada no processo é completamente rodeada pelo meio de cultivo líquido em questão podendo ser utilizado substratos sólidos dissolvidos ou submersos. Apesar de a fermentação submersa apresentar desvantagens quando comparada a FES, processos que envolvem limitações quanto ao teor de água livre no sistema são evitados quando o objetivo é a geração de muitos produtos principalmente se tratando de escalas maiores (JUTURO *et al.*,2014).

Na fermentação em estado sólido (FES) há uma menor quantidade de água presente no sistema sendo que a água desse sistema encontra-se ligada à fase sólida formando uma fina camada absorvida pelas partículas, as enzimas são concebidas pelos fungos diretamente sobre substratos insolúveis em água como cereais.

Uma característica principal da FES é a utilização de substrato com uma baixa atividade de água, nessa condição de crescimento pode haver uma semelhança ao habitat natural do fungo favorecendo o crescimento e a produção na quantidade de enzimas. Neste processo o teor de umidade pode variar de 30 a 85% e a atividade da água vai de 0,40 a 0,90 valores próximos as condições encontradas a natureza podendo diminuir até mesmo fatores externos como a contaminação (CASTRO; PEREIRA Jr, 2010).

Na Tabela 2 que segue é possível listar as principais características da fermentação em estado sólido e da fermentação submersa.

Tabela 2- Comparação das características de fermentação no estado sólido (FES) e a submersa (FS)

FES	FS
Menor gama de produtos obtidos e de microrganismos aptos a crescer nessas condições	Maior demanda energética associada a esterilização do meio e à remoção de produto do meio fermentado
Menor possibilidade de contaminação, pela ausência de água livre no sistema	Em que pese a menor concentração de produtos obtida pela FS, a purificação dessas moléculas é facilitada pela ausência ou baixa concentração de partículas de substrato
Menor disponibilidade de informações na literatura, no que tange a fenômenos de transporte e cinética de crescimento e de produção enzimática	O alto teor de água e a natureza diluída do meio facilitam o controle da temperatura de cultivo, reduzindo a degradação do produto, em especial enzimas com baixa termoestabilidade
O extrato obtido é em geral de três a quatro vezes menos diluído que na FS, de forma que a produtividade e a concentração final de produto são maiores na FES	Quando operando com elevadas concentrações de substrato, podem ocorrer problemas reológicos no sistema.
Maior dificuldade no controle do processo e na adição de soluções desejadas	Processos difusionais e de mistura são facilitados devido ao caráter homogêneo do sistema
Menor volume de resíduos líquidos gerado	Tecnologias de monitoramento de variáveis <i>online</i> mais amplamente disponíveis

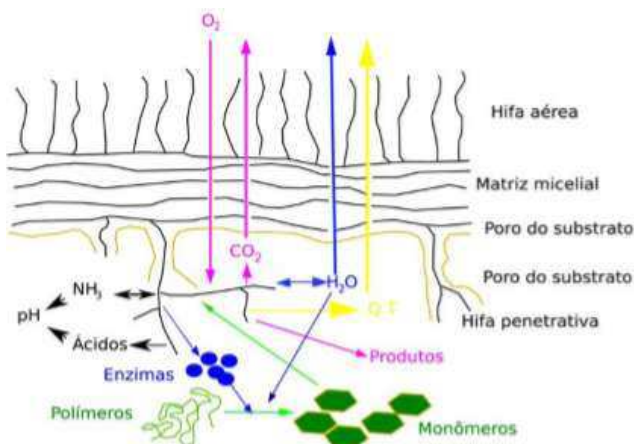
Fonte: CASTRO; PEREIRA Jr, 2010.

Uma diferença conhecida entre a FES e a FS é quanto à esporulação do fungo, quando o processo é feito pelo estado sólido é possível obter mais fácil os esporos e o motivo disso é que a cultura de superfície sólida se parece com o ambiente natural dos fungos tornando mais fácil o controle e conservação do ciclo morfológico. Na Figura 6 é possível observar como seria a representação esquemática do crescimento do fungo quando cultivado em um substrato sólido (BANSAL *et al.*,2012).

De modo geral o sistema de cultivo realizado em meio sólido descreve por serem meios heterogêneos em termos de população microbiana e concentração de soluto, essa heterogeneidade refere-se também as variações na estrutura química de cada molécula

presente e a proporção entre componente variante de acordo com espécie e tecido vegetal (PINTO *et al.*, 2005, PALMA, 2003).

Figura 6-Representação esquemática do crescimento do fungo em substrato sólido



Fonte: HOLKER e LENZ, 2005.

Alguns fatores intervêm na FES como as condições ambientais, pH, atividade de água e nível de oxigênio podendo afetar significativamente o bom crescimento celular e a formação de produto, por isso a maioria dos processos de fermentação em estado sólido necessitam de etapas de seleção cuidadosa da matéria prima ou substrato, escolha de um microrganismo, controle dos parâmetros da fermentação e a purificação dos produtos, só assim pode-se afirmar com certeza que trará um bom resultado ao processo de fermentação em estado sólido (PEREIRA *et al.*, 2008).

1.9 Biomassas residuais utilizadas como substrato na produção de celulases

Um tópico importante para a produção de enzimas é o tipo e a organização do substrato que será utilizado como fonte de carbono, sendo necessário escolher um substrato apropriado e que seja apto de segurar o crescimento do fungo e também estimular a produção. Além disso, vale considerar ainda os substratos que possuem nutrientes capazes de completar o crescimento do fungo e que possa permitir o seu aporte durante o crescimento (SANTOS *et al.*, 2012). Vale ressaltar que uma determinada linhagem de fungo filamentoso pode produzir níveis elevados de celulases utilizando um substrato específico e não conseguir produzir níveis significativos de celulases quando cultivada em outro substrato. Da mesma forma,

diferentes linhagens de fungos cultivadas no mesmo substrato podem resultar numa diferença significativa em concentrações de celulases produzidas (HANSEN *et al.*, 2015). Logo, é de grande importância pesquisar a combinação adequada de estirpe fúngica e substrato lignocelulósico para produção ótima de celulases.

Sendo assim, estudos com foco em desenvolver processos de produção de produtos biotecnológicos que envolva a utilização de biomassas residuais como sabugo e palha de milho, arroz, bagaço de cana de açúcar, resíduos que fazem parte da indústria de celulose e que são produzidos de maneira abundantemente em setores agrícolas e florestais tem sido realizado há alguns anos (MEDINA *et al.*, 2015; VÁSQUEZ *et al.* 2007).

Dentre estas biomassas supracitadas com a possibilidade de uso com substrato para produção de celulases, vale destacar os coprodutos gerados com a produção do milho, que vem aumentando no Brasil devido aos recordes a cada safra de acordo com dados da CONAB 2018. A palha é um dos coprodutos da produção do milho, produzida em grande volume. Em 2018, no Brasil, com a produção de 92 milhões de tonelada de milho em grão, foi gerado cerca de 10 milhões de toneladas de palha. Este resíduo é utilizado como alimento para animais ou devolvido à lavoura para aplicação no solo para retenção de água, fazendo com que a terra se mantenha úmida o suficiente para um bom desenvolvimento da próxima safra, segundo dados da CONAB.

A palha de milho também é destinada à incineração ou utilizada como cama nos criadouros de aves em propriedade rurais brasileiras, sendo um material abundante, mas pouco usado para gerar renda, a não ser quando destinado a produção de artesanato. No entanto, existem estudos que demonstram várias potencialidades para uso da palha de milho. A palha apresenta grande utilidade para a produção de produtos químicos, como plástico, colas adesivas, compostos de borracha, pneus, polidor em produtos de limpeza, fabricação de tijolos, cerâmicas e compostos furfurais (FACHHINI, 2011) .

Além destas inúmeras possibilidades, a utilização da palha de milho para produção de enzimas celulolíticas é de grande potencial, o que vem sendo demonstrado em vários estudos, como os reportados por Fachhini e seus colaboradores. Deste modo, torna-se relevante avaliar o uso desta biomassa como substrato para produção de enzimas celulolíticas por microrganismos competentes.

1.10 Aplicação de celulases – etanol de 2º geração

Uma das possibilidades de aplicação de holocelulases é a hidrólise de biomassas para produção de etanol de segunda geração (LIAO *et al.*, 2015; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). A classificação em tecnologias de geração é feita de acordo com as matérias-primas empregadas, sendo o etanol produzido a partir de matérias-primas açucaradas e/ou amiláceas denominado de primeira geração e a segunda geração, conforme já citado, utiliza como matérias-primas os materiais lignocelulósicos, constituídos em sua maioria por polissacarídeos tais como a celulose e a hemicelulose (LIMA; 2005).

O complexo sucroalcooleiro nacional tem como matéria-prima principal a cana-de-açúcar para a produção do etanol de 1º geração contando com uma alta produtividade por hectare e com uma elevada eficácia energética comparada a outras matérias primas. No entanto, a produção de etanol de milho no Brasil e também de biomassas lignocelulósicas (2G) é crescente e tem ganhado espaço ao lado do etanol de cana (Santos; 2015). Sendo assim, usinas de processamento de cana-de-açúcar estão se modernizando para processar além dessa, outros produtos, como milho ou biomassas lignocelulósicas sendo denominadas de “usinas flex”. No que tange a produção do etanol de 2º geração é importante frisar novamente que o custo das enzimas holocelulolíticas utilizadas no processo ainda é bastante elevado (LIAO *et al.*, 2015), o que reflete diretamente no preço final do biocombustível produzido. Diante deste cenário e da importância política e econômica do setor de biocombustíveis para qualquer país, há uma corrida por desenvolvimento de tecnologia e produtos que suportem o estabelecimento de usinas flex para a produção de etanol de 1ª e 2ª geração. Dessa forma, torna-se necessário a realização de estudos que permitam a produção destas enzimas holocelulolíticas a um baixo custo. Além do mais, o uso de resíduos agroindustriais tanto na produção do etanol (2ª geração) como na produção de enzimas celulolíticas é bastante promissor agregando valor às biomassas subutilizadas gerando caminhos produtivos com menores custos (SANTOS, 2015).

É neste contexto que o presente trabalho pretende contribuir, se valendo da avaliação de um microrganismo competente na produção de enzimas holocelulolíticas recorrendo a substratos alternativos de baixo valor agregado, afetando diretamente nos custos da produção de etanol de 2º geração.

CAPÍTULO 2

MATERIAS E MÉTODOS

2.1 Obtenção e preparo dos substratos

A palha de milho utilizada neste trabalho como substrato foi adquirida por doação dos pequenos produtores rurais do município de Diamantina – MG. A biomassa íntegra foi seca em estufa de circulação forçada de ar a uma temperatura por volta dos 60°C por 48 horas para que fossem reduzidos e que tivessem sua umidade padronizada. Em seguida foi cominuída em um moinho de facas e posteriormente passados por uma peneira de malha 0,5 mm com intuito de padronização do tamanho de partícula e após esses processo foi armazenado em laboratório.

2.2 Obtenção e manutenção da linhagem *Aspergillus tubingensis* AN1257

O fungo filamentosos utilizado foi da linhagem do *Aspergillus tubingensis* AN1257, isolado e cedido pela Prof^a Dra. Ana Paula de Figueiredo Conte Vanzela adjunta do Departamento de Farmácia doados pelo Professor Rinaldo Duarte isolados de amostras de vegetais de Diamantina. Para que esta linhagem fosse utilizada na execução deste trabalho foi estocada em tubos de ensaio em meio BDA - ágar batata dextrose. Para manutenção deste fungo, foram feitos repiques periódicos a cada 3 meses e cultivados a 30°C por 7 dias, feito isso, essas culturas seguiram para serem conservadas sob refrigeração em torno de 4°C com o intuito de manutenção e conservação da linhagem.

2.3 Processo fermentativo para a produção da enzima com uso de palha de milho como fonte de carbono – preparação do inóculo

O crescimento da linhagem *Aspergillus tubingensis* AN1257 para produção do inóculo; foi realizado por repicagem sob o bico de Bunsen a partir de cultura em estoque em placas de Petri estéreis contendo o meio sólido ágar batata dextroseas quais foram incubadas em estufa a 30° durante um período de sete dias.

Após esse processo, foi feita a coleta dos conídios produzidos durante o período de incubação com o auxílio de um meio líquido asséptico preparado previamente contendo 0,20% de KH_2PO_4 , 0,03% de CaCl_2 , 0,02% de MgSO_4 e H_2O que possuem fontes importantes para a sobrevivência e desenvolvimento do microrganismo.

A coleta foi realizada de maneira estéril em capela de fluxo contínuo: com o auxílio de uma pipeta de Pasteur colocou-se uma quantidade significativa da solução enriquecida e com o auxílio de um espalhador de células realizou-se a raspagem.

Em seguida recuperou-se essa solução enriquecida por conídios também com a ajuda de uma pipeta de Pasteur, posteriormente realizou-se a filtração em gaze estéril para obtenção de uma solução enriquecida de conídios, sem qualquer requisito do meio ágar batata dextrose.

A contagem de esporos coletados foi realizada em Câmara de Neubauer em microscópio óptico para quantificar a concentração de conídios presente na suspensão. Esta solução foi devidamente armazenada para utilização como inóculo no processo de otimização da produção de β -glicosidase chegando a ser diluído 200 vezes.

2.4. Otimização da produção de β -glicosidase – Fermentação

Visando obter a condição ótima de produção de β -glicosidase foi utilizado um planejamento estatístico de superfície resposta do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) com dois níveis e três fatores, seis pontos axiais e quatro centrais (Tabela 3). Para tanto, foram preparados previamente para o ensaio de fermentação em estado sólido 90 Erlenmeyers de 50 mL e foi adicionado em cada um deles 3g de palha de milho que foram esterilizados em autoclave e deixados em estufa para retirar o excesso de umidade deixado pelo vapor da autoclave.

Os fatores analisados foram a concentração do inóculo, razão sólido/líquido do meio fermentativo e concentração da fonte de nitrogênio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O processo fermentativo foi conduzido a 30° C em estufa incubadora sem agitação, onde após 6, 7, 8 e 9 dias foi realizada a extração do extrato enzimático para determinação da atividade da β -glicosidase (Ghose, 1987). O software *STATISTICA Versão 7.0* (Statsoft®) foi utilizado para geração e análise do planejamento experimental. A qualidade do ajuste da equação do modelo foi expressa pelo coeficiente de determinação (R^2) e sua significância estatística condicionada

pelo teste-*F*. Os efeitos de cada parâmetro foram expressos em gráficos de superfície de resposta.

Tabela 3 - Planejamento delineamento composto central rotacional

Experimento	Razão S/L (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/100g)	Inóculo (c/g de torta)
1	20,00000	0,500000	5000000
2	20,00000	0,500000	15000000
3	20,00000	2,000000	5000000
4	20,00000	2,000000	15000000
5	60,00000	0,500000	5000000
6	60,00000	0,500000	15000000
7	60,00000	2,000000	5000000
8	60,00000	2,000000	15000000
9	14,25623	1,250000	10000000
19	65,74377	1,250000	10000000
11	40,00000	0,284609	10000000
12	40,00000	2,215391	10000000
13	40,00000	1,250000	3564057
14	40,00000	1,250000	16435943
15 (C)	40,00000	1,250000	10000000
16 (C)	40,00000	1,250000	10000000
17 (C)	40,00000	1,250000	10000000
18 (C)	40,00000	1,250000	10000000

A extração enzimática foi realizada por adição de 20 mL de tampão acetato 50mmol/L, conservado em geladeira, pH 5, adicionado a cada frasco seguindo de agitação vigorosa com auxílio do vórtex. Os extratos foram filtrados a vácuo sob papel de filtro em sistema contendo funil de Buchner e Kitassato, os conteúdos filtrados foram recolhidos em tubos Falcon e armazenados em geladeira até a quantificação das atividades de β -glicosidase.

2.5 Determinação da atividade enzimática: β -glicosidase

A atividade da β -glicosidase foi quantificada seguindo método descrito por Ghose (1987) que consiste em realizar a hidrólise de uma solução de celobiose a 1% em tampão acetato 50 mmol/L e pH 5, isso na presença do extrato enzimático obtido anteriormente. O método foi adaptado para dosagem e leitura em microplacas de 96 poços (12x8). Assim, para cada uma das amostras, foram realizadas oito diluições seriadas em tampão acetato 50

mmol/L, pH 5 obtendo um volume final de cada extrato enzimático de 50 μ L. Em seguida foi adicionado em cada ensaio 50 μ L da solução celobiose 1% obtendo no total um volume de 100 μ L, a microplaca foi vedada com plástico Parafilm e colocada em estufa a 50°C por 30 minutos.

Feito isso, o ensaio foi imediatamente colocado sob o banho fervente com temperatura por volta dos 95° por 2 minutos para que ocorresse a desnaturação das enzimas e interrompesse a reação. Posteriormente foi adicionado a cada poço 200 μ L de solução reagente para determinação de glicose (procedimento padrão enzimático Glicose-oxidase/Peroxidase GOD/POD), vedou-a e a colocou novamente a banho-maria a 30° por 10 minutos.

A leitura espectrofotométrica foi realizada a 510nm em leitor de microplacas utilizando-se uma curva analítica de glicose como referência nas concentrações de 0 a 2mg/mL com intervalos de 0,02 mg/mL. A unidade de atividade β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de libertar 1 μ mol de glicose por minuto de reação.

2.6 Caracterização bioquímica

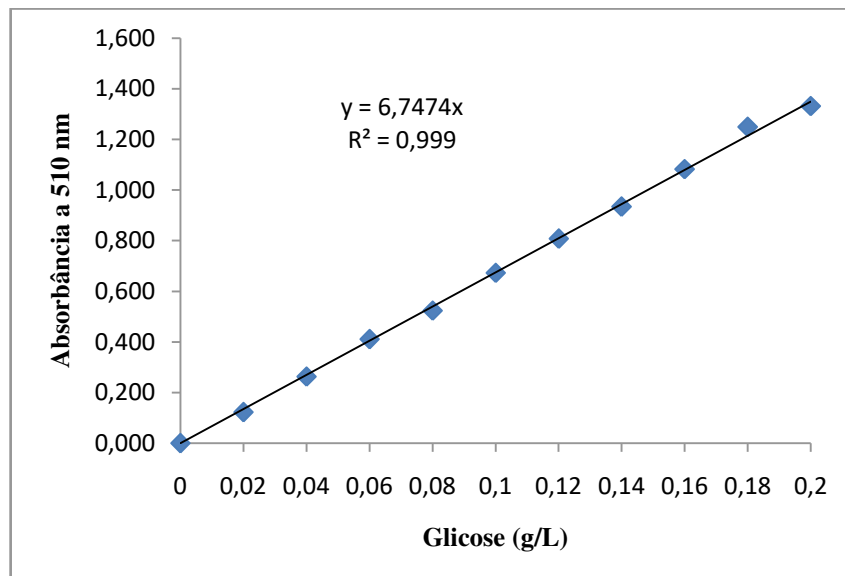
Os efeitos da temperatura e do pH sobre a atividade hidrolítica da enzima β -glicosidase foram determinados a partir da dosagem de sua atividade a temperaturas de ensaio de 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 °C combinadas com os valores de pHs de 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e 6,0.

A estabilidade sob diferentes condições de temperatura e pH, combinados, foi determinada incubando-se o extrato bruto enzimático, diluído na proporção de 1:1 em tampão acetato em diferentes pHs (3,0 a 6,0) e em diferentes temperaturas (30 a 60 °C). Nos intervalos de tempos de 0, 5 e 24 horas, após incubação nas temperaturas e pHs pré-determinados, foram retiradas alíquotas para dosagem da atividade de β -glicosidase (GHOSE, 1987).

3.1. Curva analítica para determinação da atividade de β -glicosidase

A curva analítica de glicose utilizada como referência para determinação das atividades de β -glicosidase está disposta na Figura 7. Pode-se observar que houve um bom índice de correlação representado pelo R^2 igual a 0,999.

Figura 7– Curva analítica de glicose



3.2. Otimização da produção de β -glicosidase

Os valores das atividades de β -glicosidase em processo fermentativo por *A. tubingensis* AN1257 com uso de palha de milho como fonte de carbono das matrizes empregando planejamento experimental composto central rotacional (DCCR), com dois níveis e três fatores (concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, tamanho do inóculo e razão S/L) encontram-se expressos na Tabela 4.

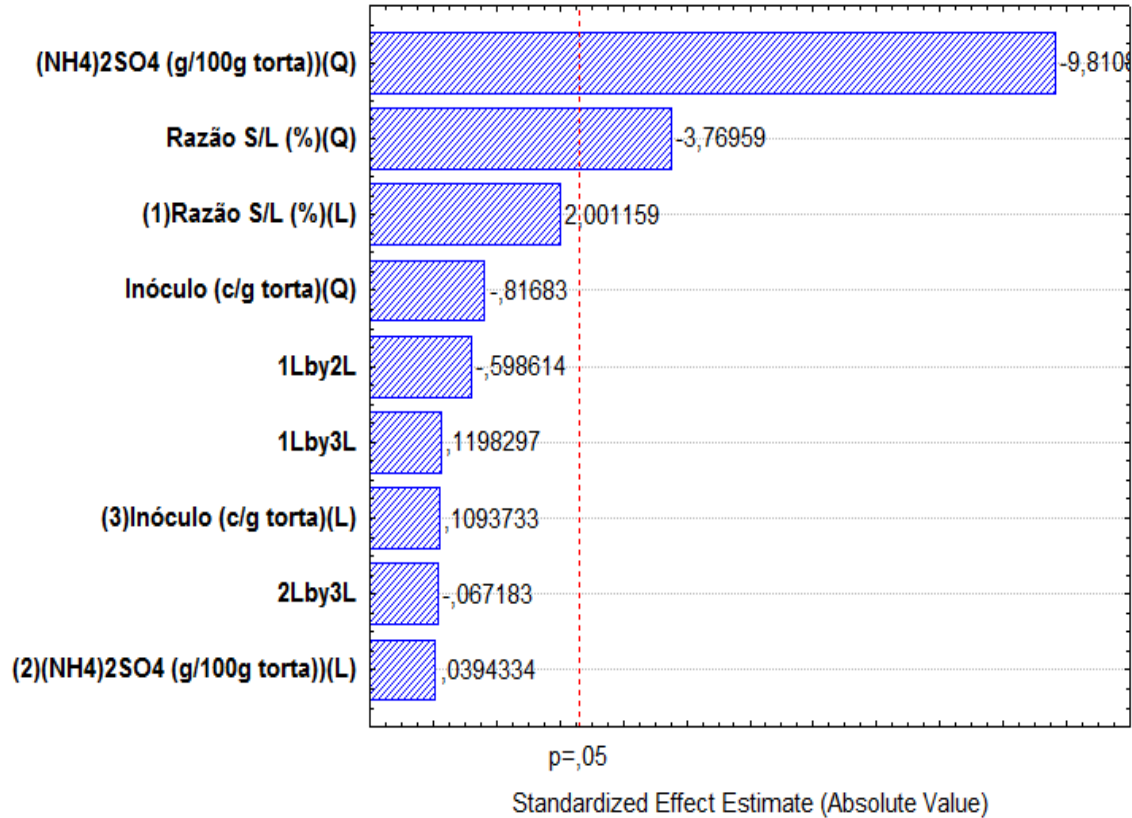
Tabela 4 -Matriz do DCCR para atividade β -glicosidase no processo de FES por *A. tubingensis*

Exp.	Razão S/L(%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/100g)	Inóculo (c/g de torta)	β -glicosidase (U/g)			
				6 dias	7d	8d	9d
1	20,00	0,50	5000000	4,45	5,11	1,27	1,25
2	20,00	0,50	15000000	4,70	4,88	0,91	1,71
3	20,00	2,00	5000000	5,08	9,50	2,48	2,18
4	20,00	2,00	15000000	5,96	10,63	4,12	2,39
5	60,00	0,50	5000000	5,72	9,85	1,55	1,68
6	60,00	0,50	15000000	6,08	13,86	2,26	1,44
7	60,00	2,00	5000000	6,45	7,42	2,02	1,41
8	60,00	2,00	15000000	5,23	8,00	1,57	1,43
9	14,26	1,25	10000000	13,62	24,70	8,75	7,79
19	65,74	1,25	10000000	20,77	74,62	17,30	15,72
11	40,00	0,28	10000000	4,32	5,92	0,51	1,11
12	40,00	2,22	10000000	5,02	5,62	2,93	1,84
13	40,00	1,25	3564057	21,60	71,69	13,21	18,07
14	40,00	1,25	16435943	32,29	70,53	22,00	17,31
15 (C)	40,00	1,25	10000000	27,14	67,15	14,04	22,64
16 (C)	40,00	1,25	10000000	29,64	71,63	26,21	23,46
17 (C)	40,00	1,25	10000000	26,90	74,97	23,74	17,73
18 (C)	40,00	1,25	10000000	29,88	69,55	17,14	19,47

A produção máxima de β -glicosidase foi observada após 7 dias de processo fermentativo (Tabela 4), período no qual foi realizado a análise estatística do planejamento proposto. Após análise do modelo matemático, com base nos resultados expressos na Tabela 3, observou-se que ajuste feito pelo programa estatístico, representado por R² igual a 0,94339, foi satisfatório. Estes resultados forneceram dados importantes sobre os efeitos das variáveis estudadas, os quais podem ser observados em gráficos de Pareto representados na Figura 8.

De acordo com os resultados expostos em gráfico de Pareto (Figura 8) pode-se observar que concentração da fonte de nitrogênio (NH₄)₂SO₄ foi a variável que teve maior influência significativa no processo fermentativo. Para esta variável foi observado efeito do tipo quadrático negativo. Pandya e Gupte (2012) também relataram (NH₄)₂SO₄ como fonte de nitrogênio eficiente na produção de xilanase por *Aspergillus tubingensis* JP-1. Vale ressaltar que o comportamento quadrático negativo, em relação à concentração de (NH₄)₂SO₄ do meio fermentativo, foi similar ao estudo reportado por Santos (2015), na otimização da produção de endoglucanase, β -glicosidase e xilanase por *Aspergillus tubingensis* AN1257 com uso de torta de caroço de algodão como substrato em fermentação em estado sólido.

Figura 8- Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/100g torta), inóculo (conídios/g torta) e razão S/L (%) na produção de β -glicosidase após 7 dias de FES por *A. tubingensis*



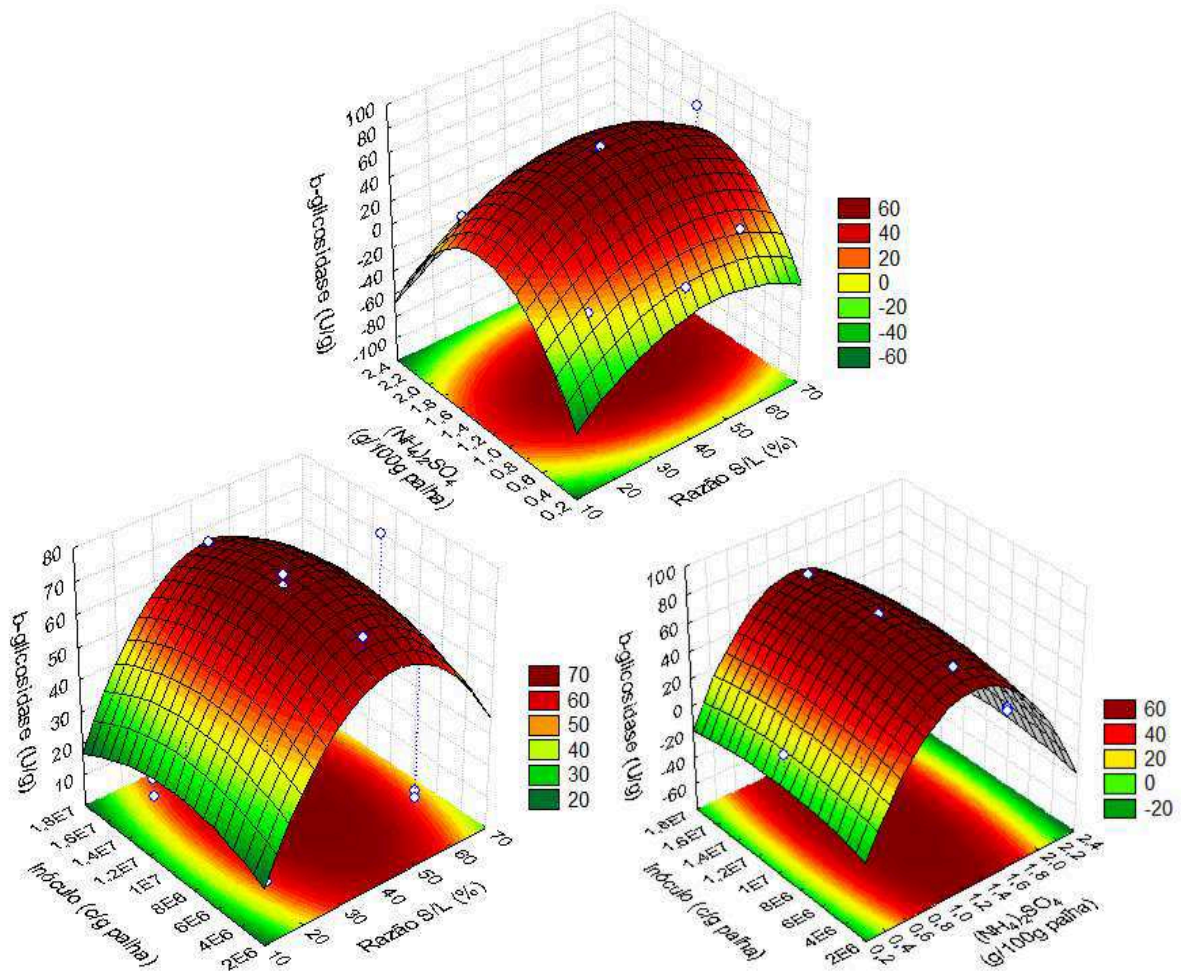
Com base nos resultados ainda ilustrados na Figura 8, foi possível observar que a variável razão S/L também provocou efeito significativo, do tipo quadrático negativo na produção de β -glicosidase neste estudo. Este efeito foi explicado por Santos (2015) em duas situações: a primeira tem em vista que quando o teor de umidade é menor do que o nível exigido, a solubilidade de nutrientes é limitada, e impede a eficaz captação de nutrientes pelos fungos. Pelo contrário, quando o teor de umidade é demasiadamente elevado, as partículas de substrato são rodeadas por uma espessa camada de água e, por conseguinte, as partículas tendem a ficar em conjunto, e isto limita a difusão do ar entre as partículas. Vale ressaltar que o comportamento quadrático negativo, em relação à umidade do meio fermentativo, foi similar ao estudo reportado por Santos (2015), na otimização da produção de endoglucanase, β -glicosidase e xilanase por *Aspergillus tubingensis* AN1257 com uso de torta de caroço de algodão como substrato em fermentação em estado sólido.

Com base ainda nos resultados expostos no gráfico de Pareto (Figura 8) foi possível observar que em relação ao tamanho do inóculo, na faixa avaliada, não houve efeito na produção de β -glicosidase. No entanto, é interessante destacar que valores demasiadamente elevados ou baixos de inóculo prejudicam o rendimento na produção de enzimas por fungos filamentosos. Quando uma quantidade baixa de inóculo é usada, a colonização de fungos filamentosos sobre o substrato lignocelulósico pode levar um tempo relativamente longo, prejudicando na produção do produto biotecnológico desejado. Além disso, a baixa concentração de inóculo aumenta o risco de contaminação quando outros fungos de taxa de crescimento mais rápida por ventura colonizar o substrato. A quantidade de inóculo mais elevada pode acelerar a taxa de crescimento dos fungos, mas ao mesmo tempo, aumentar a taxa de esgotamento de nutrientes. Após o esgotamento de nutrientes, o crescimento dos fungos é afetado e isso pode não ser útil para melhorar o rendimento de produção das enzimas holocelulolíticas (SANTOS, 2015).

O modelo codificado foi utilizado para gerar gráficos de superfície de resposta, expostos na Figura 9. Estes gráficos delineiam o perfil da influência da fonte de nitrogênio, razão sólido/líquido e concentração de inóculo β -glicosidase.

Os gráficos de superfície resposta representado pela Figura 9 ilustram a região de otimização das variáveis na forma real, duas a duas, em relação à β -glicosidase. Foi possível observar em todas estas figuras efeitos quadráticos negativos e a condição onde a maior atividade β -glicosidásica foi obtida, ou seja, a condição ótima. Assim, foi possível determinar a condição fermentativa relativa ao ponto de maximização para a atividade de β -glicosidase, a qual corresponde a uma razão S/L de 44%, 1,24g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para 100g de palha de milho e inóculo de $1,03 \times 10^7$ conídios/g de palha. O valor de atividade de β -glicosidase para a referida condição é de 74 U/g de palha de milho. Este resultado foi superior aos reportados por Shimokawa *et al.* (2012) e Sukumaran *et al.* (2009), onde foram relatados a produção de extratos com atividade β -glicosidásica de 33 U/g e 21,4 U/g, respectivamente, ambos por *Aspergillus niger* e com uso de farelo de trigo como fontes de carbono.

Figura 9 – Gráficos de superfície resposta para os efeitos combinados da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/100g torta), tamanho do inóculo (conídios/g torta) e razão S/L (%) na produção de β -glicosidase (U/g) após 7 dias de FES por *A. tubingensis*



3.3 Caracterização bioquímica

Os efeitos combinados da temperatura e do pH sobre a atividades da enzima β -glicosidase produzida por *A. tubingensis* estão expressos na Figura 10. Estes resultados denotam uma boa aplicabilidade destas enzimas sob temperaturas entre 45 e 60°C, e pH em torno de 4,0 a 5,0, com atividade máxima observada à 50°C e pH de 4,5.

Os valores de atividade relativa quanto à estabilidade da enzima β -glicosidase incubadas por um período de até 24 horas em diferentes valores de temperatura e pH estão expressos na Tabela 5. Estes resultados apontam que a referida enzima é estável, mantendo aproximadamente 100% de sua atividade, após o período de incubação de 24 horas a 0°C e

pH entre 4,0 e 6,0. Deste modo, observa-se uma boa possibilidade de estocagem do extrato enzimático a baixas temperaturas.

Figura 10 -Efeito da temperatura e pH sob a atividade da enzima β -glicosidase produzida por *A. tubingensis* AN1257

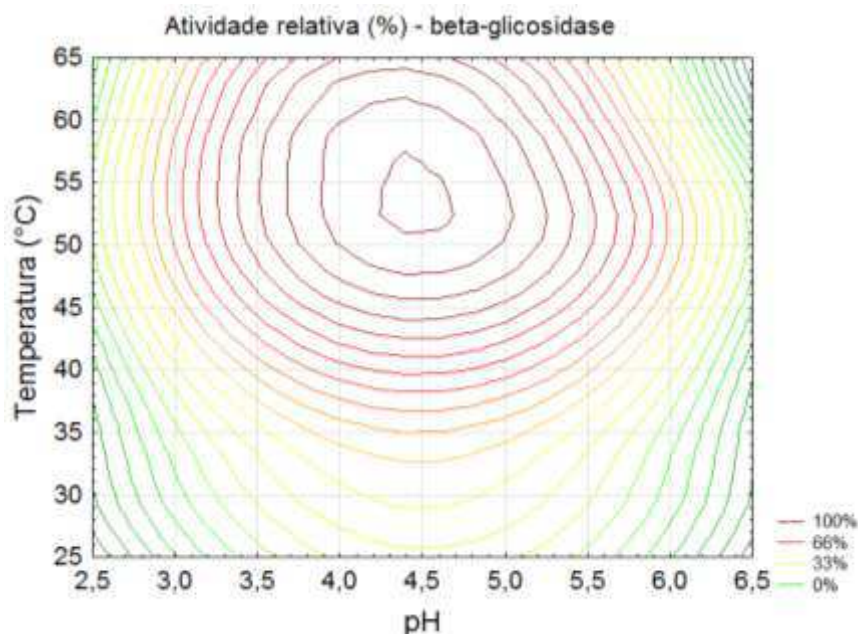


Tabela 5 - Estabilidade da enzima β -glicosidase produzida por *A. tubingensis* AN1257 em relação à diferentes valores de temperatura de incubação e pH

pH	Temperatura (°C)	Atividade relativa (%) após 5 horas	Atividade relativa (%) após 24h
3,0	0	79,60 ± 2,99	73,38 ± 10,45
3,5	0	84,16 ± 9,54	77,64 ± 10,91
4,0	0	89,22 ± 3,24	88,80 ± 6,20
4,5	0	97,48 ± 4,51	92,91 ± 10,75
5,0	0	97,40 ± 8,87	95,67 ± 11,52
5,5	0	94,99 ± 6,49	93,81 ± 10,01
6,0	0	99,41 ± 7,85	93,96 ± 10,35
3,0	30	72,26 ± 3,00	61,34 ± 0,60
3,5	30	81,24 ± 3,38	70,81 ± 6,05
4,0	30	88,94 ± 5,12	76,33 ± 8,01
4,5	30	91,50 ± 3,70	80,73 ± 8,99
5,0	30	102,19 ± 5,22	83,48 ± 10,81
5,5	30	84,80 ± 8,12	83,05 ± 6,73
6,0	30	81,09 ± 5,40	80,18 ± 8,77
3,0	35	67,84 ± 0,37	64,44 ± 4,23

Tabela 5 - Estabilidade da enzima β -glicosidase produzida por *A. tubingensis* AN1257 em relação à diferentes valores de temperatura de incubação e pH (Continuação)

pH	Temperatura (°C)	Atividade relativa (%) após 5 horas	Atividade relativa (%) após 24h
3,5	35	77,96 ± 5,37	68,21 ± 13,15
4,0	35	89,21 ± 4,94	74,09 ± 0,76
4,5	35	88,15 ± 4,10	72,63 ± 9,45
5,0	35	83,44 ± 9,97	69,01 ± 5,44
5,5	35	64,20 ± 0,86	62,37 ± 2,27
6,0	35	68,62 ± 2,20	55,64 ± 28,72
3,0	40	66,77 ± 2,23	64,97 ± 2,27
3,5	40	74,82 ± 4,61	71,90 ± 3,93
4,0	40	73,33 ± 6,79	72,06 ± 1,28
4,5	40	80,67 ± 3,11	74,88 ± 4,99
5,0	40	78,10 ± 4,57	73,45 ± 4,16
5,5	40	76,89 ± 5,58	72,23 ± 5,37
6,0	40	64,70 ± 7,56	60,91 ± 7,03
3,0	45	59,59 ± 4,90	49,35 ± 4,23
3,5	45	67,98 ± 10,81	66,95 ± 4,46
4,0	45	73,93 ± 7,75	69,91 ± 5,46
4,5	45	76,07 ± 6,18	72,00 ± 4,67
5,0	45	75,94 ± 4,65	71,87 ± 6,73
5,5	45	63,84 ± 2,84	60,39 ± 6,18
6,0	45	46,18 ± 1,67	59,60 ± 7,59
3,0	50	46,32 ± 2,11	29,91 ± 2,10
3,5	50	58,22 ± 3,78	50,24 ± 6,31
4,0	50	70,48 ± 4,65	66,59 ± 3,11
4,5	50	72,47 ± 4,37	68,12 ± 4,76
5,0	50	67,53 ± 4,32	60,06 ± 1,17
5,5	50	66,84 ± 5,88	61,53 ± 5,24
6,0	50	43,22 ± 3,35	32,74 ± 2,67
3,0	55	41,16 ± 2,30	29,67 ± 4,04
3,5	55	63,56 ± 4,57	40,62 ± 4,48
4,0	55	66,27 ± 3,73	56,66 ± 4,19
4,5	55	65,59 ± 2,29	59,62 ± 5,86
5,0	55	61,32 ± 3,11	59,47 ± 9,10
5,5	55	66,02 ± 2,29	55,80 ± 4,03
6,0	55	35,30 ± 2,88	25,73 ± 0,34
3,0	60	11,56 ± 0,16	8,63 ± 0,08
3,5	60	12,40 ± 0,16	11,67 ± 3,78
4,0	60	39,76 ± 4,12	21,43 ± 4,27
4,5	60	51,59 ± 8,27	30,68 ± 6,12
5,0	60	36,45 ± 2,53	20,90 ± 4,91
5,5	60	22,66 ± 1,76	12,38 ± 5,37
6,0	60	16,86 ± 0,83	10,09 ± 1,44

Ainda com base na Tabela 5, observou-se consideráveis valores de atividade residual para β -glicosidase, com valores próximos à 80% de atividade relativa, quando o extrato é incubado entre 30°C e 40°C e com pH entre 4 e 5. No entanto, a melhor condição para aplicação da enzima β -glicosidase é na temperatura de 50°C com pH de 4,5. Nesta condição, após 24 horas de incubação, o extrato enzimático permanece com aproximadamente 70% da atividade inicial de β -glicosidase. Deste modo, a estabilidade um pouco menor à temperatura de 50°C quando comparada com temperaturas menores é compensada pelo efeito máximo desta temperatura sobre a atividade da enzima β -glicosidase. Tendo em vista que a estabilidade frente à temperatura e pH são um dos parâmetros mais importantes a serem investigados quando se estuda uma enzima com aplicação industrial, pode-se inferir que a enzima produzida neste trabalho apresenta boa aplicabilidade em relação aos parâmetros analisados.

CAPÍTULO 3

CONCLUSÃO

A utilização de palha de milho, um resíduo agroindustrial, como fonte de carbono na fermentação em estado sólido por *Aspergillus tubingensis* AN1257 foi bastante significativa para a produção de β -glicosidase, por agregar valor a um coproduto com baixo valor de mercado, bem como pela sua eficiência quando utilizado como substrato no processo avaliado.

A utilização de modelos estatísticos aplicadas a estudos de produção de enzimas celulolíticas se mostrou eficiente por possibilitar a obtenção de resultados otimizados em processos fermentativos de forma confiável e rápida. A condição fermentativa relativa ao ponto de maximização para a atividade de β -glicosidase corresponde a uma razão S/L de 44%, 1,24g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para 100g de palha de milho e inóculo de $1,03 \times 10^7$ conídios/g de palha, após 7 dias de fermentação. O valor de atividade de β -glicosidase para a referida condição é de 74U/g de palha de milho.

Se tratando da caracterização bioquímica, os resultados denotam uma boa aplicabilidade sobre temperaturas entre 40 e 60°C e pH em torno de 4,0 a 5,0. O extrato enzimático obtido na condição otimizada mostrou-se estável sem a adição de nenhum aditivo conservante, mantendo, pelo menos, 70% do valor de atividade de β -glicosidase por 24 horas a 50°C e pH próximo de 4,5.

Deste modo, nota-se que a palha de milho trás bons resultados quando em associação com *Aspergillus tubingensis* AN1257 para a produção de β -glicosidase, gerando perspectivas futuras para utilização na produção de bioetanol de 2º geração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, M.J., BIELY, P., POUTANEN, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J Biotechnol.**23, 257–270.
- BANSAL N.; TEWARI R.; SONI R.; SONI S.K.; Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management*, v. 32, p. 1341–1346, 2012.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S Microbial β -glucosidases: cloning, properties and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v. 22, p. 375-407, 2002.
- BOUDET, A.; KAJITA, M.; PETTENATI, G. J.; GOLFNER, D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. **Trends in Plant Science**, v.8, n.12, 2003.
- CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101(13), p 4754-66, 2010.
- CARVALHO, S.M.S. **Análise das Enzimas Amiolíticas Produzidas por Microrganismos Isolados do Tarubá**. Manaus: UFAM, Dissertação em Ciência de Alimentos. Curso de Farmácia, Universidade Federal do Amazonas, 1999.
- CASTRO A. M.; PEREIRA Jr. N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- COLLIER L, BALOWS A, SUSSMAN M. *Micrbiology and Microbial infections*, 9th edn. New York: Arnold Publisher, 1998.
- DAROIT D. J. **Caracterização de uma Beta Glicosidase de *Monascus purpureus***. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Centro Universitário UNIVATES, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2007.
- DIAS, D. S. B. **Produção, caracterização parcial e aplicação de β -glucosidases de *Aspergillus niger***. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Tecnologia de

Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2011.

FACCHINI, F. D. A.; VICI, A. C.; BENASSI, V. M.; FREITAS, L. A. P.; REIS, R. A.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI M. L. T. M. 2011. Optimization of fibrolytic enzyme production by *Aspergillus japonicus* C03 with potential application in ruminant feed and their effects on tropical forages hydrolysis. **Bioprocess Biosyst Eng**.

FARINAS, C. S., A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa Instrumentação**, São Carlos, v. 54, 13p., 2011.

GHOSE, T. K., 1987. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, 59, 257–268.

HANSEN, G.H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J.C.; LÜBECK, P.S.; ANDERSEN, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1327–1341, 2015.

HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Review: Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.100, p.10-18, 2009.

HOLKER, U., LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p. 301-306, 2005.

JUTURO, V.; WU, J.C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188–203, 2014.

LEE, S.; YAMAMOTO N.; Accuracy of the high-throughput amplicon sequencing to identify species within the genus *Aspergillus*, **Fungal Biology**, v.119, n. 12, p. 1311-1321, 2015.

LIAO, H.; FAN, X.T.; MEI, X.; WEI, Z.; RAZA, W.; SHEN, Q.; XU, Y. Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification. **Biomass and Bioenergy**, v. 74, p. 122 – 134, 2015.

LIMA, A.L.G., NASCIMENTO, R.P., BOM, E.P.S., COELHO, R.R.R (2005) *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and tertil industries. **Enzyme and Microbial Technology**

37:272-277.

MEDINA, J.; MONREAL, C.; BAREA, J.M.; ARRIAGADA, C.; BORIE, F.; CORNEJO, P. Crop residue stabilization and application to agricultural and degraded soils: A review. **Waste Management**, v.42, p.41–54, 2015.

MENEZES, G.D.G. **Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 por fermentação semi-sólida em biorreatores de coluna.** 2006. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006

MOREIRA, L.R.S.; FERREIRA, G.V.; SANTOS, S.S.T.; RIBEIRO, A.P.S.; SIQUEIRA, F.G.; FERREIRA FILHO E.X. The hydrolysis of agro-industrial residues by holocellulose-degrading enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 498-505, 2012.

PANDYA, J.J., GUPTE, A. Production of xylanase under solid-state fermentation by *Aspergillus tubingensis* JP-1 and its application. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 35, p. 769–779, 2012.

PALMA, M.B., **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido.** Tese (Doutorado em Engenharia Química), - Centro Tecnológico, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PEREIRA JR N, COUTO MAPG, SANTA ANNA LMM. (2008). **Series on biotechnology: Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery.** 1th ed. Rio de Janeiro: Pereira Jr N. ed.

PINTO, G.A.S., BRITO, E.S., ANDRADE, A.M.R., FRAGA, S.L.P., TEIXEIRA, R.B., Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. Comunicado Técnico online Embrapa, ISSN 1679-6535, 2005

PRETO, E. V.; MORTOZA, G. L. Geração de energia elétrica utilizando biomassa. 2011. 1, 5, 6, 8, 9, 11

ROCHA, C.P., 2010. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado sólido.** Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, UFU-MG.

ROSA, C. A. R; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A.; *Práticas de micologia veterinária* UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. **Micologia Veterinária.** Prática 8.Seropédica, 2002.

SAMSON, R. A; VISAGIE, C. M; HOUBRAKEN, J.; HONG, S. B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C, Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*, *Studies in Mycology*, v. 78, p. 141173, 2014.

SANTOS, S. Produção de hidrolases holocelulolíticas por fermentação em estado sólido com uso de fungos filamentosos e coprodutos da agroindústria de óleos vegetais como fontes de carbono v. , p, 27-40, 2012.

SANTOS, R. S. **Produção de hidrolases holocelulolíticas por fermentação em estado sólido com uso de fungos filamentosos e coprodutos da agroindústria de óleos vegetais como fonte de carbono.** Tese (doutorado) do Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, 2015.

SINGHANIA R. R; SUKUMARAN, R. K; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A., Advancement and comparative profiles in the production Technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview.**Bioresource Technology**, v. 199, p. 76–82, 2016.

SIQUEIRA, F.G.; SIQUEIRA, A.G.; SIQUEIRA, E.G.; CARVALHO, M.A.; PERETTI, B.M.P.; JARAMILLO, P.M.D.; SPOSINA, S.S.T.; DIAS, E.S.; FELIX, C.R.; FILHO, E.X.F. Evaluation of holocellulase production by plantdegrading fungi grown on agro-

industrial residues. **Biodegradation**, v. 21, p. 815-824, 2010.

SOUZA, F. H. M. **Caracterização da atividade β -glicosidásica de *Humicolainsolens***. Dissertação (Mestrado) Programa de pós-graduação em Química, Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto - SP, 2009.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v.34, p.421–424, 2009.

TREVISAN, H.C.; SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Enzimas como agente Biotecnológico, 1. ed. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 115-135, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, p.964.

VAN DEN BRINK, J. VRIES, R.P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1477–1492, 2011.

VALADARES, F. L. **Produção e uso de enzimas derivadas do fungo *Pleurotus treatus* na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermomecânico**. Dissertação (Mestrado) do Programa de pós-graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade de São Paulo – USP, Lorena – SP, edição reimpressa e corrigida, 2013.

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; SOUZA Jr., M. B.; PEREIRA Jr., N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p.137-140, issues 12, 2007.

VILELA, E. D. S. **Análise da Produção de Celulase e Beta Glicosidase produzida por *Streptomyces sp.*** Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiania – GO, 2013.

YOON, L.W., ANG, T.N., NGOH, G.C., CHUA, A.S.M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.

