

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

MATHEUS CARVALHO DE MATOS

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FUNGO FILAMENTOSO ISOLADO DO SOLO E
CULTIVADO EM RESÍDUOS DE SAFRAS AGRÍCOLAS**

**PATOS DE MINAS - MG
DEZEMBRO DE 2018**

MATHEUS CARVALHO DE MATOS

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FUNGO FILAMENTOSO ISOLADO DO SOLO E
CULTIVADO EM RESÍDUOS DE SAFRAS AGRÍCOLAS**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia

Prof. Dr. Gilvan Caetano Duarte

**PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2018**

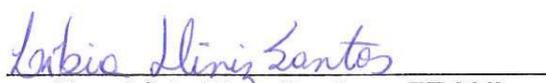
MATHEUS CARVALHO DE MATOS

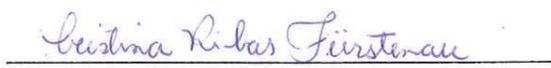
**Produção de enzimas por fungo filamentoso isolado do solo e cultivado em
resíduos de safras agrícolas**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a
obtenção do título de bacharel em
Biotecnologia

Banca Examinadora:


Dr. Gilvan Caetano Duarte - IBTEC
Presidente


Dra. Lúbia Diniz Santos - FEQUI
Membro


Dra. Cristina Ribas Fürstenau - IBTEC
Membro

Patos de Minas, Minas Gerais 13 de dezembro de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram de alguma forma da minha graduação, seja dentro ou fora da universidade, aos meus pais, técnicos e principalmente aos professores, bem como a banca avaliadora Profa. Dra. Líbia Diniz Santos e Profa. Dra. Cristina Ribas Fürstenau aqui presentes que aceitaram meu convite. Agradeço especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Gilvan Caetano Duarte que com muita paciência me mostrou um pouco de como é fazer pesquisa científica; ainda agradeço a ajuda do Luís Fernando Oliveira que fez parte do meu grupo de pesquisa e de meus amigos que mostraram um pouco dessa importante fase com boas experiências e amadurecimento que é a graduação, deles sentirei muita falta.

RESUMO

Os fungos constituem seres de grande importância na decomposição da biosfera, com a capacidade de degradar a biomassa residual pela atividade de suas exoenzimas, incluindo xilanases, pectinases e CM-Celulases. Com essa habilidade eles se tornam relevantes fontes de recursos para as inovações biotecnológicas e com a grande biodiversidade de suas enzimas esses seres se constituem primordiais na busca da pesquisa científica. O presente trabalho buscou mostrar o potencial de degradação de açúcares que as enzimas de uma morfoespécie fúngica, isolada de amostra de solo de Mata de Galeria do Parque Municipal do Mocambo poderiam ter, bem como suas possibilidades de aplicações industriais, com destaque no processamento e clarificação de sucos de frutas. O fungo isolado, identificado como MEV, apresentou morfologia típica de *Penicillium*. Quando cultivado em resíduos do beneficiamento da soja, apresentou crescimento acentuado e produziu diferentes enzimas degradadoras da parede celular vegetal, com destaque para o grupo das pectinases, com atividade de cerca de $0,71 \text{ UI.mL}^{-1}$. Ensaio de caracterização enzimática parcial realizados para o extrato bruto obtido do cultivo de MEV em resíduo do beneficiamento da soja, revelaram as melhores atividades enzimáticas em pH 4,0 e temperatura de 40°C . Dessa forma, foi possível adaptar e executar ensaios de sua aplicação na indústria de processamentos de sucos, com o potencial de servir como bases para inovações no mercado de bebidas industriais.

Palavras-chave: Resíduos agrícolas. Atividade enzimática. Degradação da parede celular vegetal. Clarificação de suco de frutas.

ABSTRACT

Fungi are beings of great importance in the decomposition of the biosphere, with the ability to degrade the residual biomass by the activity of its exoenzymes, including xylanases, pectinases and CM-Cellulases. With this ability they become relevant sources of resources for biotechnological innovations and with the great biodiversity of their enzymes these beings are primordial in the search of scientific research. The present work aimed to show the potential sugars' degradation that the enzymes of a fungal morphospecies, isolated from the soil sample of the gallery forest of the Municipal Park of Mocambo, could have, as well as their possibilities of industrial applications, especially in the processing and clarification of fruit juices. The isolated fungus, identified as MEV, presented a typical Penicilium morphology. When cultivated in residues from soybean processing, it showed a marked growth and produced different degrading enzymes of the plant cell wall, especially the pectinase group, with activity of about 0.71 UI.mL⁻¹. Partial enzymatic characterization tests performed for the crude extract obtained from the MEV culture in soybean residue showed the best enzymatic activities at pH 4.0 and temperature of 40°C. In this way, it was possible to adapt and execute tests of its application in the juice processing industry, with the potential to serve as bases for innovations in the industrial beverage market.

Keywords: Agricultural residues. Enzymatic activity. Degradation of plant cell wall. Clarification of fruit juice.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR: Açúcar redutor

BDA: Batata-Dextrose-Ágar

CE: Controle Enzima

CMC: Carboximetil-celulose

CS: Controle Substrato

DNS: Ácido 3,5-dinitro-salicílico

E: Ensaio

EB: Extrato bruto

EB-Arroz: Extrato bruto do resíduo do arroz

EB-Café: Extrato bruto do resíduo do café

EB-Soja: Extrato bruto do resíduo da soja

EPAMIG: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais

MEV: Morfoespécie Verde

S: Sul

W: Oeste

WS: Palha de trigo

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Atividades de pectinases sobre a pectina. Abreviaturas: (GLS), ácido galacturônico; (RHA), ramnose. | 12 |
| Figura 2. Resíduo das safras de arroz, soja e café da esquerda para a direita. As porções superiores referem-se aos resíduos anterior ao processamento; as porções inferiores referem-se aos resíduos triturados em processador doméstico e peneirados. | 15 |
| Figura 3. Cultivo da morfoespécie em resíduo de café. Os erlenmeyers foram preparados, pela pesagem de 2,5 g de cada resíduo das safras agrícolas, umedecido com 5 mL de meio líquido suplementado. Após autoclavagem, cada erlenmeyer recebeu 5 discos de 5 mm de diâmetro do inóculo, retirados de repiques de placas de Petri. O cultivo foi realizado por 5 dias a 28°C. | 17 |
| Figura 4 Morfoespécie verde, isolada de porção do solo coletadas abaixo da serapilheira, e no laboratório, posteriormente mantida em placas de Petri contendo meio BDA..... | 21 |
| Figura 5. Amostra do isolado fúngicos (MEV), corado com Azul de Metileno e visualizado em microscopia ótica. Aumento de 1000X. Microscopia obtida em microscópio LEICA DM500 e <i>software Leica Application Suite Version 3.4.0</i> | 22 |
| Figura 6. Amostra do isolado fúngicos (MEV), corado com KOH 20% e visualizado em microscopia ótica. Aumento de 1000X. Microscopia obtida em microscópio LEICA DM500 e <i>software Leica Application Suite Version 3.4.0</i> | 22 |
| Figura 7. Quantificação das atividades enzimáticas (Xilanase, Pectinase e CM-Celulase) dos extratos brutos. Os ensaios foram realizados pela dosagem de açúcar redutor pelo método de DNS, utilizando como referência curvas padrões de soluções dos monossacarídeos, xilose, ácido galacturônico e glicose, conforme o item 4.5..... | 24 |
| Figura 8. Resultados de proteína total e açúcar redutor total obtidos dos resíduos agrícolas conforme os itens 4.6 e 4.7..... | 26 |
| Figura 9. Resultado do efeito de diferentes temperaturas nas atividades enzimáticas de xilanase, pectinase e CM-celulase do EB-Soja conforme o item 4.8... | 27 |
| Figura 10. Resultado do efeito dos diferentes pHs nas atividades enzimáticas de xilanases, pectinases e CM-celulases do EB-Soja conforme o item 4.9. | 28 |
| Figura 11. Suco de maçã e de laranja da esquerda para a direita conforme o item 4.10.1 na proporção 1:1. | 29 |
| Figura 12. Clarificação de suco de frutas. Ensaio maçã, controle maçã, controle enzima, ensaio laranja, controle laranja, da esquerda para a direita conforme o item 4.10.3..... | 30 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 9 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 10 |
| 3 OBJETIVOS | 13 |
| 3. 1 Objetivo geral | 13 |
| 3. 2 Objetivos específicos | 13 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 14 |
| 4.1 Resíduos agroindustriais | 14 |
| 4.2 Pré-tratamento dos resíduos agroindustriais | 14 |
| 4.3 Isolamento, manutenção e identificação dos fungos..... | 15 |
| 4.4 Cultivo dos fungos e produção das enzimas..... | 16 |
| 4.5 Atividades xilanase, pectinase, endoglucanase (CM-celulase)..... | 18 |
| 4.6 Determinação do açúcar redutor total (AR-total)..... | 18 |
| 4.7 Determinação da concentração de proteína total..... | 19 |
| 4.8 Efeito da temperatura..... | 19 |
| 4.9 Efeito do pH | 19 |
| 4.10 Avaliação do potencial de clarificação do suco de laranja e de maçã..... | 20 |
| 4.10.1 Preparo dos sucos | 20 |
| 4.10.2 pH | 20 |
| 4.10.3 Ensaio enzimático de clarificação | 20 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 21 |
| 5.1 Análise morfológica | 21 |
| 5.2 Caracterização das enzimas produzidas | 23 |
| 5.2.1 Açúcar redutor total e proteína total..... | 25 |
| 5.2.2 Temperatura | 26 |
| 5.2.3 pH | 28 |
| 5.3 Aplicação Enzimática | 29 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 33 |
| REFERÊNCIAS..... | 34 |

1 INTRODUÇÃO

O trabalho faz parte de uma gama de aplicações biotecnológicas em que os fungos fazem parte, como exemplificado no setor de combustíveis em que é necessária a sacarificação de carboidratos para que outras espécies possam fazer a fermentação do monossacarídeo base e assim posteriormente, seja possível o beneficiamento do produto final, como o bioetanol. No trabalho apresentado, o fungo isolado promoveu a degradação de açúcares complexos para o seu estado mais simples podendo servir como um processo antecessor ao de produção de biocombustíveis ou mesmo na indústria têxtil, na qual é possível a estilização de calças *jeans* por meio da aplicação enzimática obtida de fungos sobre o algodão, o que é de grande interesse comercial. Com bases nesses exemplos, no conhecimento científico aplicado e nas condições disponíveis em laboratório, foi feita uma proposta de aplicação enzimática no setor de bebidas da indústria alimentícia.

O presente trabalho constituiu um exemplo de conhecimento aliado à aplicação da biotecnologia, na qual foi feita uma bioprospecção, avaliação e estudo parcial de uma morfoespécie fúngica isolada do Parque Municipal do Mocambo (Patos de Minas – MG). O indivíduo fúngico foi conduzido ao laboratório (Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular – UFU) onde seu isolamento, cultivo e produção de enzimas de degradação da biomassa lignocelulósica foram alcançados. A hipótese levantada é de que esse extrato enzimático tenha a capacidade de degradação de diferentes tipos de biomassas residuais, contendo polissacarídeos complexos, como os resíduos de arroz, soja e do beneficiamento do café. A partir desses resultados, vimos como poderiam ser úteis em alguma aplicação no setor industrial, como por exemplo, na clarificação de sucos de frutas por meio da atividade das enzimas contidas no extrato bruto, as quais, anteriormente tiveram suas condições ótimas de atividade elucidadas como pH e temperatura de catálise.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Os fungos são organismos eucariotas e dentre os mais conhecidos estão as leveduras, bolores, mofos e cogumelos. Constituem um reino de seres separados das plantas, animais e bactérias conhecido como *Fungi*. Possuem diferenças estruturais em relação às plantas, como ausência de clorofila, sendo por isso, incapazes de produzirem seu próprio alimento, ou seja, são obrigados a absorvê-lo do ambiente (TORTORA, 2012). Os fungos se nutrem de matéria orgânica viva ou morta que digerem através de exoenzimas que secretam. Novos estudos filogenéticos mostram que eles estão biologicamente mais próximos dos animais que das plantas e grande parte dos fungos é simbiote ou parasita de plantas, insetos, animais ou outros fungos. Eles são visíveis quando formam cogumelos ou bolores e não visíveis a olho nu quando em forma microscópica como as leveduras. Desempenham um papel essencial na decomposição da matéria orgânica, daí sua característica saprófita (ABCMED, 2014).

Esses organismos podem ter sua utilidade em áreas muito vastas da sociedade e da natureza, como alimentos, no caso dos biocomestíveis, embora existam algumas espécies que são venenosas para os humanos, com toxicidade que pode ir desde problemas digestivos ligeiros até a morte, além de outros terem efeitos psicotrópicos e alucinógenos (STAMETS, 1996). Ainda sobre sua utilidade alimentar, muitos são importantes para a produção do pão, do vinho, da cerveja e de molhos. Destaca-se ainda sua aplicação como agentes biológicos no controle de pragas agrícolas, antibióticos, vitaminas, como drogas anticancerígenas, redutoras do colesterol e como fonte de extração de enzimas que é o foco do presente trabalho (BRAKHAGE, 2004. HETLAND, 2008).

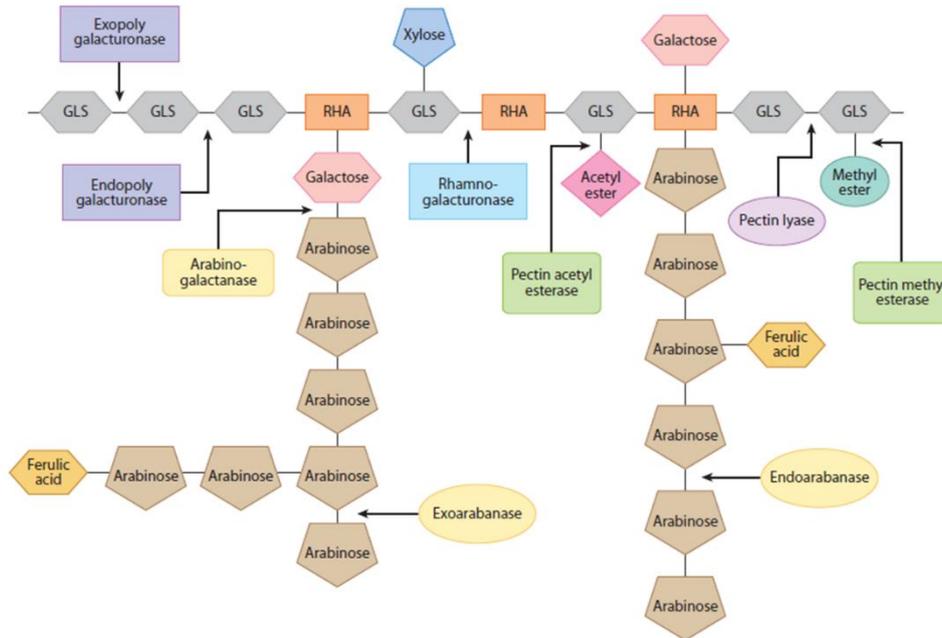
Este grupo de seres vivos têm propriedades que podem ser de extremo valor biotecnológico e econômico como a grande descoberta de Alexander Fleming que através de uma espécie fúngica foi feito o primeiro antibiótico, a penicilina, útil até os dias atuais à humanidade. Porém, ainda há muito para ser estudado, pois a maior parte desses não foi descoberta. Estima-se que cerca de 5 % das espécies fúngicas existentes mundialmente foram descritas na literatura e esse número é ainda mais reduzido quanto às oportunidades de sua utilização já estudadas, como enzimas de interesse socioeconômico (AZEVEDO, 2017).

Dessa forma, faz-se necessário uma busca de campo por fungos selvagens a fim de se pesquisar novas espécies para explorar e descrever suas características e conteúdo de cunho biotecnológico.

As enzimas adquiridas de espécies fúngicas podem servir para aplicação em diversas áreas econômicas, como associado a corantes servindo como novas técnicas no processamento da produção e estilização de roupas de interesse da indústria têxtil a qual poderá produzir com menos poluentes e de maneira mais barata. Pode ainda servir para a indústria de papel no processo do clareamento em que enzimas específicas podem degradar lignina que tem cor escura ou degradar hemicelulose afrouxando as ligações que fixam a lignina, o que facilita a saída deste permitindo assim obter-se um produto de melhor qualidade de maneira mais sustentável, principalmente com relação aos efluentes produzidos. Temos como exemplo já descrito em literatura, o isolamento de celulasas e hemicelulasas obtidas a partir das espécies dos fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*, os quais têm como característica a degradação de polissacarídeos vegetais em açúcares menores como glicose utilizando fontes de biomassa como meio de cultivo das espécies (VAN DEN BRINK, 2014).

Para que essa degradação seja possível é necessário um conjunto de enzimas que possam desempenhar esse papel para cada estrutura composicional da parede celular, dessa forma: lignina, hemicelulose e celulose representam porções poliméricas específicas que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos. A celulose que pode ser definida como um polímero de D-glicose com ligações beta 1,4 (UPDEGRAFF, 1969) que confere força e flexibilidade estando envolta por lignina que, como uma espécie de cimento, aumenta a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos. Em seguida, a hemicelulose, funciona entrelaçando quimicamente a celulose e a lignina, formando juntas blocos de pentoses como a xilose, de hexoses como a glicose e de ácidos urônicos como ácido galacturônico, açúcares que dão flexibilidade e resistência ao vegetal (CASTRO, 2010). Por fim, destacam-se as pectinases, que constituem um grupo diversificado de enzimas que catalisam a degradação de polímeros pécticos nas paredes das células vegetais (Figura 1) (KHAN et al., 2013) e, foram postos como parte da proposta de análise desse trabalho.

Figura 1. Atividades de pectinases sobre a pectina. Abreviaturas: (GLS), ácido galacturônico; (RHA), ramnose.



Fonte: Khan et al. (2013).

Existem subprodutos de grandes safras agrícolas que não são aproveitados após a colheita e que podem ser utilizados como fonte de cultivos dos fungos, como galhos, folhas e raízes da soja, por exemplo, na qual o fungo pode se propagar. A partir desse aproveitamento, busca-se um modo de cultivo dando um valor autossustentável e de melhor interesse financeiro, pois prescreve um destino aos resíduos agrícolas não utilizados e que são fontes de biomassa vegetal na qual já existem cultivos estabelecidos em literatura como palha de trigo e bagaço de cana-de-açúcar os quais já são utilizados e proporcionam redução dos gastos de produção das enzimas (VAN DEN BRINK, 2014; VAN DEN BRINK, 2013; VISSER et al., 2013).

Segundo a Sociedade Nacional de Agricultura (2014) anualmente, o Brasil produz 2,8 bilhões de cocos por ano e estima-se que cada fruto gere em torno de 1,5kg de resíduo sólido. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2013), cerca de 30% de toda a produção de arroz é casca, dado que representa cerca de 221,4 toneladas desse resíduo e que fazem parte das diversas fontes de biomassa existentes no Brasil gerando produtos que são aproveitados de diversas formas. Estes podem ser aplicados na complementação da ração de alguns animais ruminantes ou na fertilização de solos como parte dos húmus a ser cultivado garantindo até mesmo detoxificação do mesmo (ROSSOL, 2012). Sousa et al. (2010)

apresentaram um estudo sobre a avaliação dos resíduos lignocelulósicos da banana, como meio de fermentação para produção de metano e concluíram que os resíduos de casca de banana, folhas e pseudocaule podem ser utilizados com sucesso na produção de biogás com ótimo rendimento. Grande parte da produção de resíduos vegetais não lenhosos no Brasil pode ser utilizada para a hidrólise fermentativa e geração de produtos energéticos como etanol ou mesmo como substrato para a fermentação sólida gerando enzimas com várias vertentes de aplicação como as citadas anteriormente (IEE, 2018).

Dentre os objetivos da indústria alimentícia em produzir diferentes tipos de bebidas ao consumidor, a clarificação das bebidas é um desafio. Os sucos de frutas são naturalmente turvos, e essa característica é muitas vezes indesejada e um fator determinante de consumo dependendo do público que a indústria deseja atingir. Dessa forma, a clarificação dessas bebidas é um processo que na indústria pode ser melhorado através da aplicação enzimática de pectinases que são capazes de diminuir a turbidez e a viscosidade do líquido (SANDRI et al, 2011). Uma maneira de alcançar esse objetivo é a filtração aliada à mistura do extrato enzimático com o suco natural que além de degradar a pectina, principal componente promotor de turbidez em sucos de frutas, também degradará outros carboidratos responsáveis por essa aparência como celulasas, hemicelulasas e lignina (VAILLANT et al, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho objetivou isolar fungos filamentosos do solo e avaliar sua capacidade de produzir enzimas de interesse econômico cultivando-os em resíduos de safras agrícolas.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Isolar um indivíduo fúngico do solo como potencial de produção de enzimas lignocelulolíticas.

- ✓ Determinar os resíduos mais promissores de indução da produção de enzimas.
- ✓ Caracterizar parcialmente as atividades enzimáticas quanto ao pH e temperatura ótima de atuação.
- ✓ Avaliar a capacidade das enzimas contidas nos extratos enzimáticos em clarificar sucos de laranja e de maçã.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado nos Laboratórios de Microscopia e de Bioquímica e Biologia Molecular do Campus Patos de Minas da Universidade Federal Uberlândia, Patos de Minas/MG.

4.1 Resíduos agroindustriais

As fontes de biomassa lignocelulósica foram casca de arroz, resíduos da cultura da soja (contendo partes aéreas da planta, caules, folhas, legumes e alguns grãos) e resíduos do beneficiamento do café.

Todos os resíduos foram gentilmente cedidos pelo Sr. Maurício Coelho responsável pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e pelo agricultor Antônio Pereira da Silva do Centro de beneficiamento de café da cidade de Patrocínio-MG.

4.2 Pré-tratamento dos resíduos agroindustriais

Os resíduos foram, separadamente, triturados em liquidificador doméstico ou processador de alimentos para homogeneizar o tamanho médio das partículas de cada resíduo em torno de 2,0 mm.

Figura 2. Resíduo das safras de arroz, soja e café da esquerda para a direita. As porções superiores referem-se aos resíduos anterior ao processamento; as porções inferiores referem-se aos resíduos triturados em processador doméstico e peneirados.



Fonte: Luís Fernando Rocha Oliveira.

4.3 Isolamento, manutenção e identificação dos fungos

Amostras de fungos foram obtidas no interior do Parque Municipal do Mocambo ($18^{\circ}36'05''S$ e $46^{\circ}31'13''W$) em junho de 2017. Localizado no perímetro urbano da cidade de Patos de Minas/MG, o Parque possui área de 17 hectares, sendo 1,76 hectares representados por um remanescente de Mata de Galeria (LONDE et al., 2012). A pesquisa foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado sob o número de cadastro A4C7CC7, conforme estabelecido nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016 (ANEXO 1).

Os fungos foram isolados do habitat pela retirada de três (3) porções de solo (~50 gramas), coletadas logo abaixo da serapilheira, em localidade estabelecida no

interior do remanescente florestal (porção intermediária do Parque). As porções de solo foram acondicionadas em sacos plásticos identificados com o local da coleta.

As amostras de solo foram conduzidas ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Campus Patos de Minas, UFU para serem devidamente processadas. A partir das porções de solo foram retiradas três (3) sub-porções, as quais foram misturadas, para a partir dessa mistura retirar-se uma alíquota de 1 g de solo que foi adicionada com 9 mL de solução salina autoclavada. A mistura foi agitada vigorosamente e foi utilizada em diluição de 1:100, a partir da qual foi retirada 50 µL que foram espalhados na superfície de uma placa de Petri (15 cm de Ø) contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) [infuso de batata desidratado 4,0 g, dextrose 20 g e ágar 15 g; pH final 5,6 à 25 °C; Pradimol Biotecnologia], devidamente preparada em momento anterior.

A placa foi incubada por 7 (sete) dias a temperatura ambiente (~25°C); fez-se o acompanhamento do crescimento dos indivíduos fúngicos a cada 24 h. Por fim, a placa foi fotografada e mantida à 4°C para conservação.

A manutenção do isolado foi realizada em novas placas de Petri (9 cm de Ø) meio BDA, por meio de repiques realizados a cada 21 dias.

A etapa de identificação do isolado será realizada posteriormente, por meio de parcerias com outros grupos de pesquisadores e demais participantes do trabalho.

Uma análise inicial do micélio fúngicos foi realizada por meio de ensaios de microscopia ótica, nos quais uma amostra do isolado fúngicos (MEV) foi corado com Azul de Metileno ou KOH 20% (m/v) e visualizado em aumento de 1000X. Nessa etapa, utilizou-se o microscópio modelo LEICA DM500, e com o *software Leica Application Suite Version 3.4.0* as imagens foram adquiridas.

4.4 Cultivo dos fungos e produção das enzimas

O isolado fúngico foi submetido a cultivo em estado sólido, realizado em frasco tipo *Erlenmeyer* de 125 mL, contendo 2,5 g de resíduos de safras agrícolas pré-tratados de acordo com o item 4.2, umedecidas com 5 mL de meio líquido suplementado (m/v) [KH_2PO_4 0,7%, K_2HPO_4 0,2%, MgSO_4 e $7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1%, extrato de levedura 0,06%; pH 7,0 ajustado com solução de KOH $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$], utilizado em cultivos submersos. O teor de umidade alcançado foi de

aproximadamente 65% conforme estabelecido por Kerem et al. (1992). Antes da inserção do inóculo, os frascos foram fechados com rolhas de algodão, cobertos com papel tipo *kraft* e autoclavados a 121°C por 25 min.

O inóculo utilizado nos cultivos correspondeu a 5 discos de 5 mm de diâmetro retirados de repiques em placas de Petri contendo meio BDA, os quais foram assepticamente transferidos para os Erlenmeyers, conforme proposto por Alexandrino et al. (2007). O cultivo foi realizado em estufa microbiológica a 28°C por 5 dias sem agitação. Após o período de cultivo, foi realizada a extração das enzimas produzidas pelo isolado, por meio da adição de 25 mL de meio líquido suplementado e tensoativo tween 80 0,05% (v/v), em cada frasco de cultivo, sendo misturados com agitação manual e auxílio de um bastão de vidro. Os extratos foram filtrados a vácuo em funil de Büchner com papel de filtro comum. Ao filtrado, denominado Extrato Bruto (EB), foi adicionado de azida sódica 0,02% (m/v), antes de ser armazenado a 4°C e posteriormente utilizado como fonte de enzimas em ensaios subsequentes.

Figura 3. Cultivo da morfoespécie em resíduo de café. Os erlenmeyers foram preparados, pela pesagem de 2,5 g de cada resíduo das safras agrícolas, umedecido com 5 mL de meio líquido suplementado. Após autoclavagem, cada erlenmeyer recebeu 5 discos de 5 mm de diâmetro do inóculo, retirados de repiques de placas de Petri. O cultivo foi realizado por 5 dias a 28°C.

Fonte: Próprio Autor.



4.5 Atividades xilanase, pectinase, endoglucanase (CM-celulase)

Os ensaios enzimáticos para xilanase, pectinase e CM-celulase dos extratos brutos foram realizados pela reação de 1 volume de solução de enzimas (25 μL) dos filtrados com 2 volumes das respectivas soluções de substratos (50 μL) a 1,0% (m/v) [xilana de aveia, pectina e carboximetil-celulose (cmc)], incubados a 50°C por 30 min., conforme proposto por Filho et al. (1993). Após cada período de incubação, as reações foram interrompidas pela adição de 150 μL de solução de ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) (m/v) [ácido 3,5-dinitro-salicílico 1,0%, NaOH 16% e tartarato de sódio e potássio (4H₂O) 30%; diluídos em água destilada], e novamente incubadas em água fervente por 10 min. Em seguida, fez-se a adição de 750 μL de água destilada, seguido de breve agitação manual. A quantidade de açúcar redutor liberado (miligramas) em cada ensaio foi dosada pela leitura da absorbância a 540 nm (MILLER, 1959), em espectrofotômetro (Gehaka, UV-340g). Curvas de calibração para D-xilose, ácido D-galacturônico e D-glicose foram preparadas, anteriormente, para concentrações finais de 0,2 a 1,2 mg.mL⁻¹. Uma unidade de atividade enzimática (UI.mL⁻¹) foi definida como a quantidade de açúcar redutor liberado na unidade de tempo por mililitro (μmol de açúcar redutor.min⁻¹.mL⁻¹).

4.6 Determinação do açúcar redutor total (AR-total)

A dosagem de açúcar redutor total teve por finalidade quantificar o quanto de açúcares redutores (principalmente glicose) encontrava-se disponível em cada um dos resíduos, bem como nos extratos brutos posteriormente aos cultivos. O ensaio foi realizado pelo método de DNS, direto sem incubação em banho maria. Neste ensaio, utilizou-se 75 μL de solução de enzimas, juntamente a adição de 150 μL de solução de DNS e incubação em água fervente por 10 min. Os passos seguintes foram realizados conforme descrito no item 4.5. Os valores das absorbâncias foram inseridos em gráfico contra a curva de calibração de DNS para D-glicose, e a concentração de açúcar redutor total foi expressa em mg.mL⁻¹.

4.7 Determinação da concentração de proteína total

A concentração de proteínas totais dos extratos brutos foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Foi efetuada a dosagem pela adição de 100 µL de cada extrato bruto e 1,0 mL do reagente de Bradford [100 mg Coomassie Blue G-250, 50 mL de etanol 95% (v/v) e 100 mL de ácido fosfórico 85% (v/v)]. A mistura foi posteriormente incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Os valores das absorbâncias foram inseridos em gráfico contra a curva de calibração, variando de 0 a 100 µg/100µL, a partir de uma solução de albumina sérica bovina (albumina bovina fração V, segundo cohn, grau padrão, INLAB Brasil) 10 mg.mL⁻¹ diluída em NaCl 0,15 mol.L⁻¹, utilizada como proteína de referência.

4.8 Efeito da temperatura

O efeito da temperatura foi determinado por meio da dosagem da atividade enzimática nas temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C. Todas as etapas do ensaio enzimático foram realizadas conforme descrito no item 4.5, alterando apenas a temperatura de incubação do ensaio enzimático.

4.9 Efeito do pH

O efeito do pH foi determinado por meio da dosagem da atividade enzimática em diferentes pHs, à 50°C, utilizando os tampões acetato de sódio (4,5), fosfato de sódio (6,5) e Tri-HCl (8,0), todos a 100 mmol/L. Todas as etapas do ensaio enzimático foram realizados conforme já descrito no item 4.5, alterando apenas o pH como meio tamponante, em cada tubo de ensaio foi colocado 12,5µL de extrato enzimático bruto, 37,5µL do tampão correspondente e 25µL do substrato correspondente.

4.10 Avaliação do potencial de clarificação do suco de laranja e de maçã

4.10.1 Preparo dos sucos

Os sucos de maçã tipo nacional e laranja tipo pêra, foram produzidos na concentração de uma parte de fruta (picada) em gramas para uma parte de água em gramas (1:1), batidos no liquidificador por aproximadamente 60s com intervalo para mistura manual, caso necessário. Após liquefeito, fez-se o acondicionamento em um béquer para as demais etapas. O suco de laranja foi preparado sem casca, e o de maçã nacional foi feito com todas as partes da fruta.

4.10.2 pH

Com o auxílio de um pHmetro calibrado fez as medidas de pH para os dois sucos, maçã e laranja.

4.10.3 Ensaio enzimático de clarificação

Os ensaios enzimáticos com os sucos de maçã (1:1) e laranja (1:1) foram feitos em tubos de ensaios, pela mistura de 0,5 g de extrato enzimático para 1 g de suco (1:1), os quais foram incubados sob agitação a 40°C por 60 min. Após o período de incubação todos os tubos, inclusive os controle-substrato e controle-enzima, foram fervidos a 100°C por 15 min a fim de ser interromper a atividade enzimática e evitar diferenças de cor nos tubos analisados (SANDRI, 2011).

Após fervura, foi feita a centrifugação dos sucos submetidos à clarificação, a 3000g por 10 min. O sobrenadante foi, posteriormente, submetido à uma avaliação espectrofotométrica pela leitura das absorbâncias a 525 nm e 660 nm. Conforme estabelecido por Surajbhan et al. (2012), leituras em 525 nm pode ser utilizada na avaliação da manutenção da cor, enquanto a 660nm pode-se verificar a relação inversa entre a atividade de extratos enzimáticos e a turbidez de sucos, utilizando como controles de referência, ensaios realizados na ausência de extratos enzimáticos.

Todos os ensaios do item “Material e Métodos” foram realizados em triplicata com controles apropriados incluídos para cada um dos experimentos.

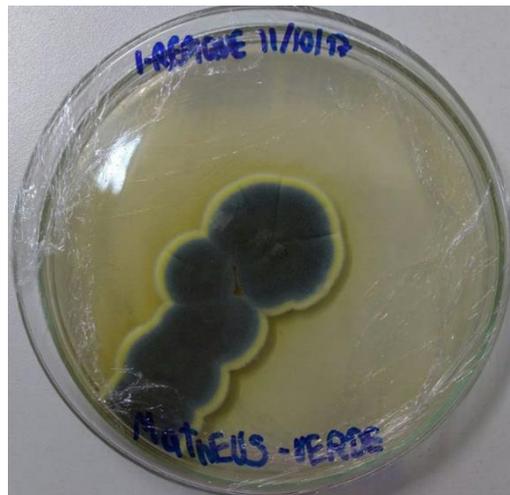
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Análise morfológica

Neste trabalho foi descrito o isolamento de uma morfoespécie fúngica retirada do solo no interior do remanescente de Mata de Galeria do Parque Municipal do Mocambo que tem cerca de 03 ha de mata no centro do Parque e, além desta, possui nascentes, represas e outros cursos d'água, além de possuir um dossel fechado, com altura média entre 10 e 15 m (PEREIRA, 2008). Tal isolamento foi feito juntamente às atividades práticas realizadas em uma visita técnica ao Parque durante a disciplina Micologia em junho de 2017.

Ao se observar a placa com muitas morfoespécies fúngicas diferentes se desenvolvendo em meio BDA, foi feita a escolha de uma que se destacou pela morfologia e pigmentação, pois tinha um aspecto pulverulento, reverso verde-escuro, um halo branco em torno da grande colônia e durante o crescimento liberava um pigmento amarelo no meio de cultivo como demonstrado na Figura 4.

Figura 4 Morfoespécie verde, isolada de porção do solo coletadas abaixo da serapilheira, e no laboratório, posteriormente mantida em placas de Petri contendo meio BDA.

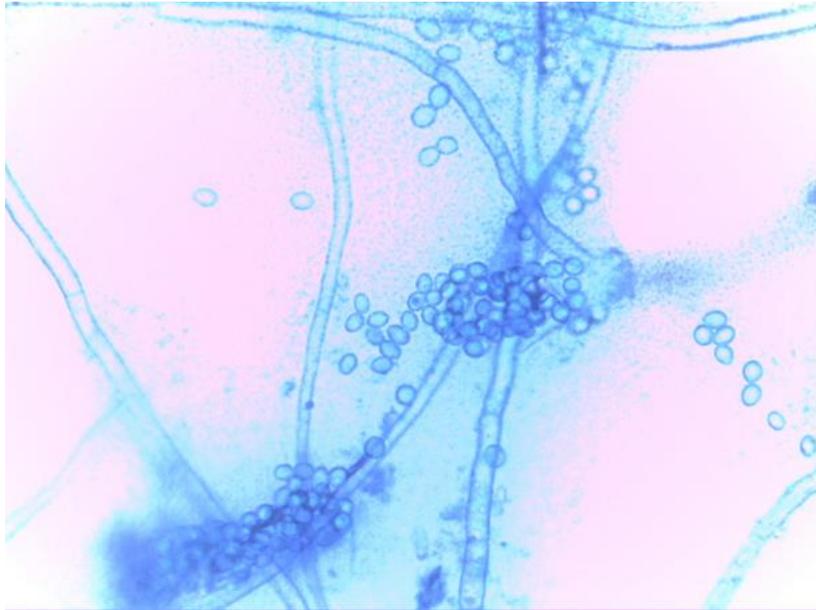


Fonte: Próprio autor

Amostras do isolado foram observadas em microscópio ótico no aumento de 1000x, permitindo a visualização da estrutura filamentosa, formada por emaranhado de hifas septadas (Figura 5) e estrutura de reprodução assexuada em forma de

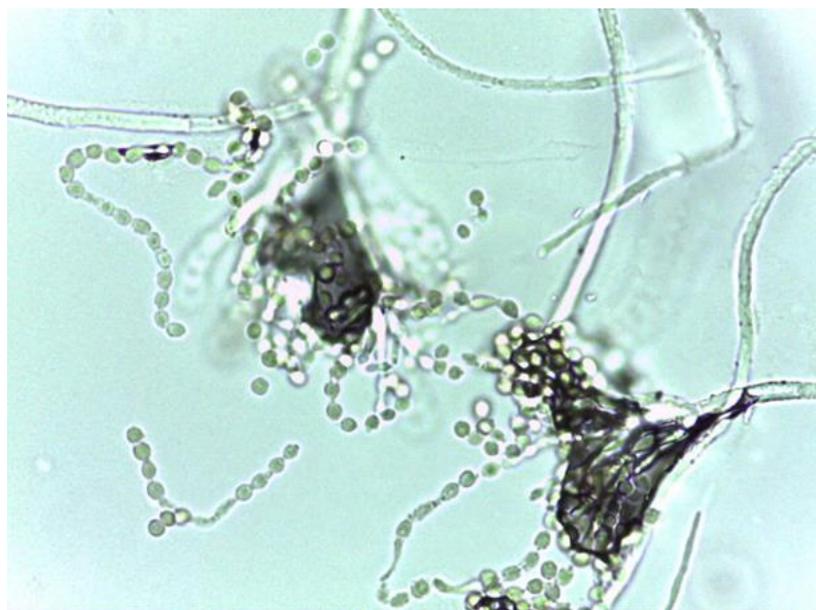
“pente”, somada a presença de esporos circulares dispersos (Figura 6). Sugerindo que a morfoespécie pertença ao grande grupo *Penicillium*.

Figura 5. Amostra do isolado fúngicos (MEV), corado com Azul de Metileno e visualizado em microscopia ótica. Aumento de 1000X. Microscopia obtida em microscópio LEICA DM500 e software *Leica Application Suite Version 3.4.0*



Fonte: Próprio Autor

Figura 6. Amostra do isolado fúngicos (MEV), corado com KOH 20% e visualizado em microscopia ótica. Aumento de 1000X. Microscopia obtida em microscópio LEICA DM500 e software *Leica Application Suite Version 3.4.0*



Fonte: Próprio autor

5.2 Caracterização das enzimas produzidas

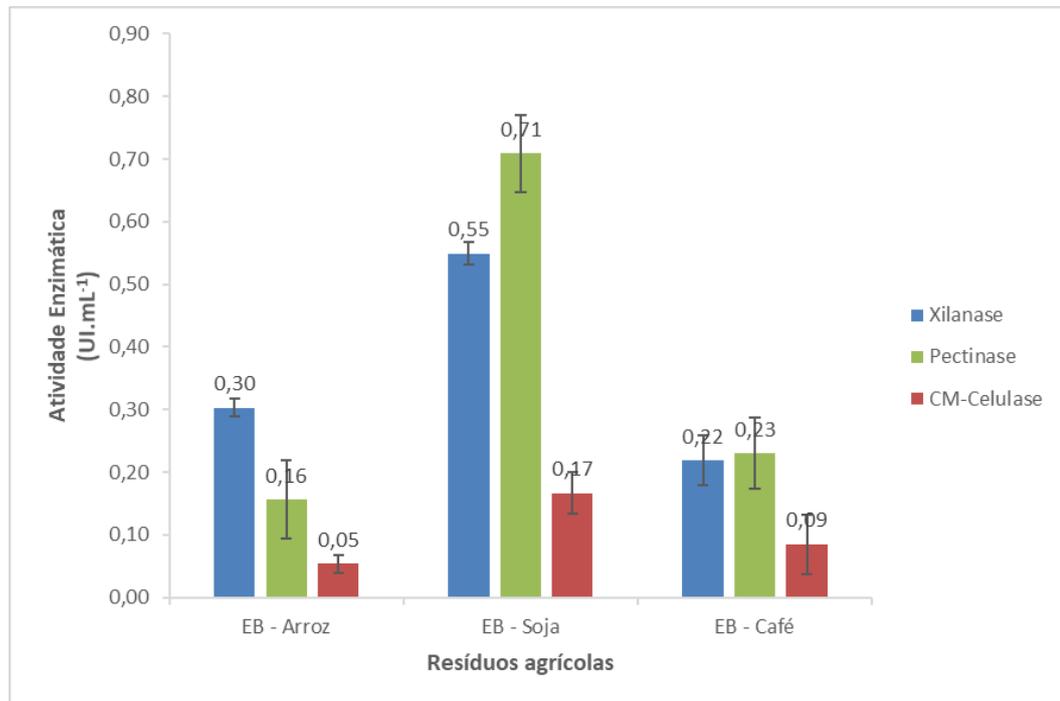
Após caracterização morfológica parcial, o isolado fúngico foi avaliado quanto à capacidade de crescimento em resíduos agrícolas como fonte de carbono, conforme descrito no item 4.4, objetivando a produção de enzimas de degradação da biomassa lignocelulósica. Na Figura 7 abaixo observou-se o perfil de enzimas produzidas pelo isolado, quando cultivado em diferentes resíduos que foram, arroz, soja e café. O cultivo em arroz e café não apresentaram grande desenvolvimento com valores máximos de xilanases e pectinases de $0,30 \text{ UI.mL}^{-1}$ e $0,23 \text{ UI.mL}^{-1}$, respectivamente.

Aproximadamente 0,18 toneladas de casca são produzidas a partir de uma tonelada de frutos de café, e na casca do café tem cerca de 24,5% de celulose, 29,7% hemiceluloses e 23,7% da lignina (DIAS, 2015).

Possivelmente assim como nos trabalhos de FAN, 2000, apesar do resíduo do café como a casca e folha de café possuírem componentes de nutrientes de natureza orgânica em grandes concentrações, este resíduo teve menor desenvolvimento devido a presença de substâncias tóxicas como cafeína, taninos, e polifenóis que impedem o fungo de se desenvolver nas mesmas proporções médias dos outros substratos.

A composição química geral dos resíduos da colheita da soja é 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina, e pode se apresentar como excelente substrato para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos fazendo a bioconversão de carboidratos mais complexo a carboidratos mais simples (CUNHA et al, 2016).

Figura 7. Quantificação das atividades enzimáticas (Xilanase, Pectinase e CM-Celulase) dos extratos brutos. Os ensaios foram realizados pela dosagem de açúcar redutor pelo método de DNS, utilizando como referência curvas padrões de soluções dos monossacarídeos, xilose, ácido galacturônico e glicose, conforme o item 4.5.



Fonte: Próprio autor.

Ao encontro com outro estudo feito por Silva EM et al. 2005, possivelmente a soja trouxe maior atividade devido a composição de sua estrutura bioquímica em detrimento a dos outros resíduos, pois era esperado que ela proporcionasse maiores rendimentos, já que este substrato apresenta maiores teores de proteína conforme mostrado na Figura 8, estimulando o fungo a produzir um emaranhado de enzimas capazes de degradar especificamente xilana e principalmente pectina com maior valor de atividade enzimática cerca de 0,71 UI.mL⁻¹ conforme explicitado no gráfico a cima, Figura 7.

No trabalho de Silva et al. 2005, foram feitos cultivos de fungos *Penicillium* sobre biomassa de arroz, soja e trigo, e do mesmo modo que agora a soja mostrou melhor suporte para o desenvolvimento das cepas, observaram também que justamente a maior proporção de C:N nos substratos com maior quantidade de proteína esteja diretamente relacionada ao maior desenvolvimento do micélio, enquanto que o arroz não gerou grandes resultados, sugerindo que este gênero tem preferência e menor tendência a crescer em meios contendo soja e arroz, respectivamente. Esse dado sugere que a baixa atividade enzimática no resíduo do arroz foi devido a sua

composição química. Após esses resultados o trabalho se direcionou a obter maiores detalhes do extrato enzimático advindo do resíduo da soja.

5.2.1 Açúcar redutor total e proteína total

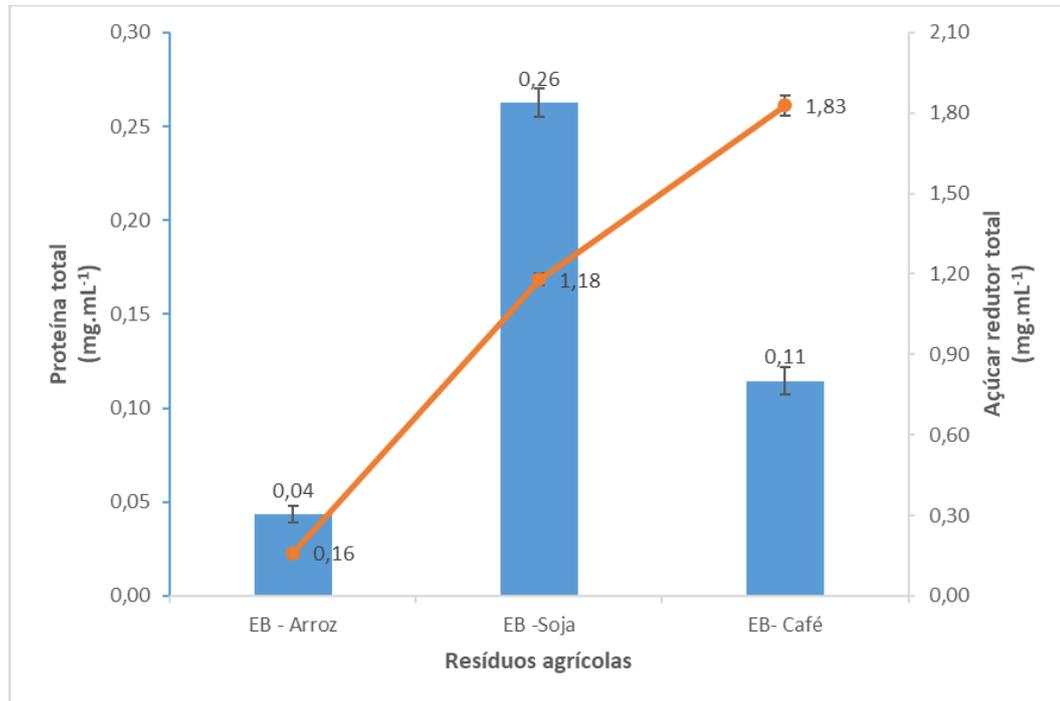
Os extratos enzimáticos produzidos pelo isolado foram avaliados quanto ao teor de açúcar redutor total e proteína total. Conforme apresentado na Figura 10 é observável que o extrato obtido pela soja teve valores superiores de proteína total com cerca de $0,26 \text{ mg.mL}^{-1}$ e um valor médio de $1,18 \text{ mg.mL}^{-1}$ para açúcar redutor total, enquanto o extrato obtido com o café teve um resultado médio de proteína total de $0,11 \text{ mg.mL}^{-1}$ e uma concentração elevada de açúcar redutor total com cerca de $1,83 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Do mesmo modo que foi discutido no item 5.2, os valores de soja estão muito elevados devido a natural presença de proteínas no substrato interferindo no teste feito de Bradford que sugere um valor falso positivo de teor proteínas, não representando um valor exato de enzimas celulolíticas (BRADFORD, 1976).

Ainda de acordo com a literatura discutida no item 5.2, e com a análise do gráfico abaixo é possível observar que existe um valor elevado de açúcar redutor total na análise do café, que pode ser explicado devido a presença de polifenóis que dão interferência na leitura de absorbância feita após a complexação com DNS no passo 4.6 do presente trabalho, sugerindo outro falso positivo que superestima os resultados obtidos, gerando dados não somente de açúcar presente mas também de extrativos vegetais advindos do resíduo do café. Ainda por meio de uma retroalimentação negativa, o isolado pode ter tendenciado a produzir menor quantidade de proteínas ou inibidas pela presença de compostos fenólicos que agem como componentes tóxicos citados anteriormente (Xu *et al.*, 2011 e Qin *et al.*, 2016).

O resíduo de arroz tem cerca de 33% de celulose, 26% de hemicelulose e 7 % lignina (CASTRO, 2010). E os valores abaixo da média relativos aos resultados do arroz vão de acordo com o desenvolvimento desse tipo específico de fungo e aos encontrados em literatura pois assim como os valores de atividade enzimática reduzidos mostrados na Figura 7 do item 5.2, os valores de açúcar redutor e de proteína total também reduzidos são resultados da baixa atividade fermentativa do fungo nesse tipo de substrato.

Figura 8. Resultados de proteína total e açúcar redutor total obtidos dos resíduos agrícolas conforme os itens 4.6 e 4.7

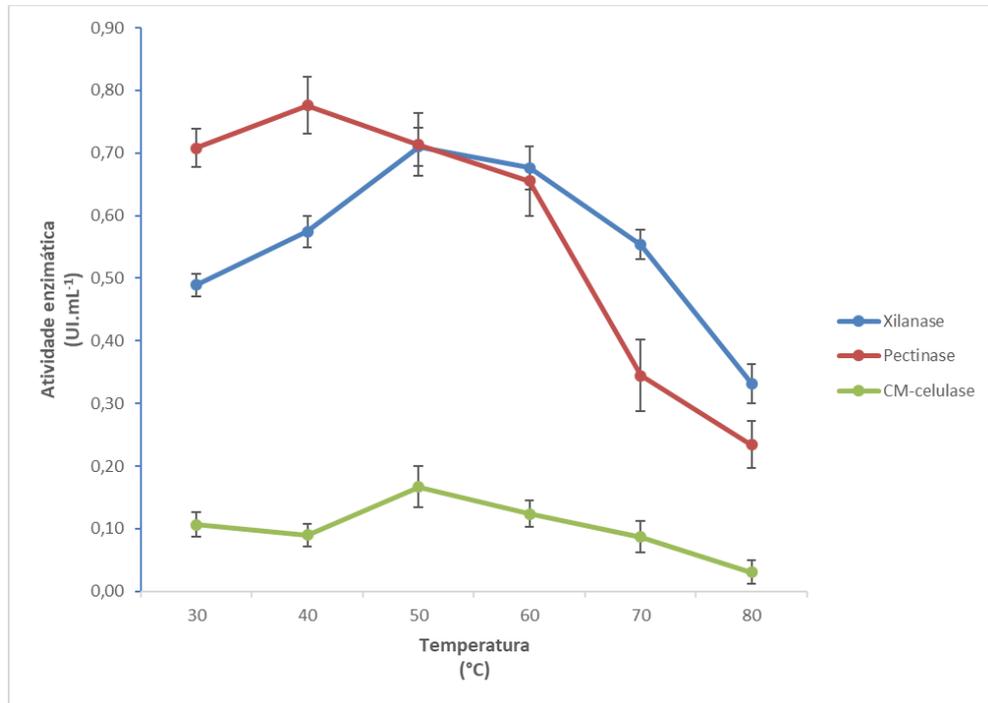


Fonte: Próprio autor

5.2.2 Temperatura

O efeito da temperatura sobre as atividades enzimáticas dos extratos brutos da soja é demonstrado na figura 9 em que a 40°C foi a temperatura ótima de atuação para a pectinase, a 50°C foi a temperatura ótima de atuação para o grupo da xilanase e CM-Celulase.

Figura 9. Resultado do efeito de diferentes temperaturas nas atividades enzimáticas de xilanase, pectinase e CM-celulase do EB-Soja conforme o item 4.8.



. Fonte: Próprio Autor

Conforme mostra a Figura 9, após a análise da capacidade das enzimas de degradar os açúcares do resíduo da soja em diferentes temperaturas, foi possível determinar a faixa de temperatura em que a enzima melhor atua, pois apesar de que a 50°C os três tipos enzimáticos funcionarem em maior intensidade, as enzimas pectinases estão em maior atividade da temperatura de 40°C. Dessa forma, sabe-se que nos ensaios da aplicação biotecnológica proposta, esta é a temperatura utilizada a fim de se obter seu melhor desempenho.

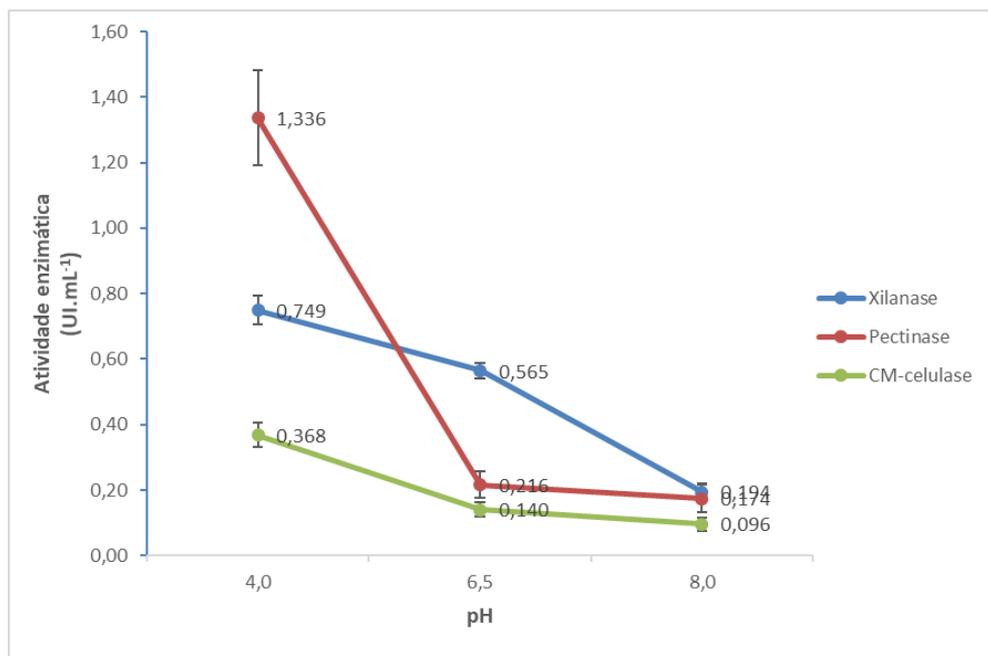
Outro ponto importante desse resultado é que as pectinases mantiveram uma faixa de mais e 20°C (de 30 a 50°C) em alta atividade sem sofrer grandes mudanças influenciadas pela temperatura, algo muito importante nas indústrias que desejam degradar pectinas permitindo que o monitoramento e controle da temperatura não seja tão restrito como ocorre com outras enzimas que perdem grandemente sua atividade em faixas menores de temperatura. Os achados de outros trabalhos mostram similaridade com os valores de temperatura ótimos aqui encontrado como no caso do *Penicillium italicum* que nos trabalhos de Jayani et al. 2005 registraram 40°C como temperatura ótima de atuação para enzimas do fungo de mesmo gênero *Penicillium*.

É possível observar também que próximo aos 50°C, as xilanases mantêm uma ótima atividade juntamente as pectinases, que também é exemplificado por Gomes, 2014 em que enzimas xilanases de *Chrysosporthe cubensis* mostraram grande atividade a 55°C.

5.2.3 pH

O efeito do pH sobre as atividades enzimáticas do extratos brutos é apresentado na Figura 10 no qual é evidenciado expressiva atividade de todo o *pool* enzimático em condições ácidas em que principalmente as pectinases atuaram com uma excelente atividade enzimática de 1,336 UI.mL⁻¹.

Figura 10. Resultado do efeito dos diferentes pHs nas atividades enzimáticas de xilanases, pectinases e CM-celulases do EB-Soja conforme o item 4.9.



. Fonte: Próprio autor

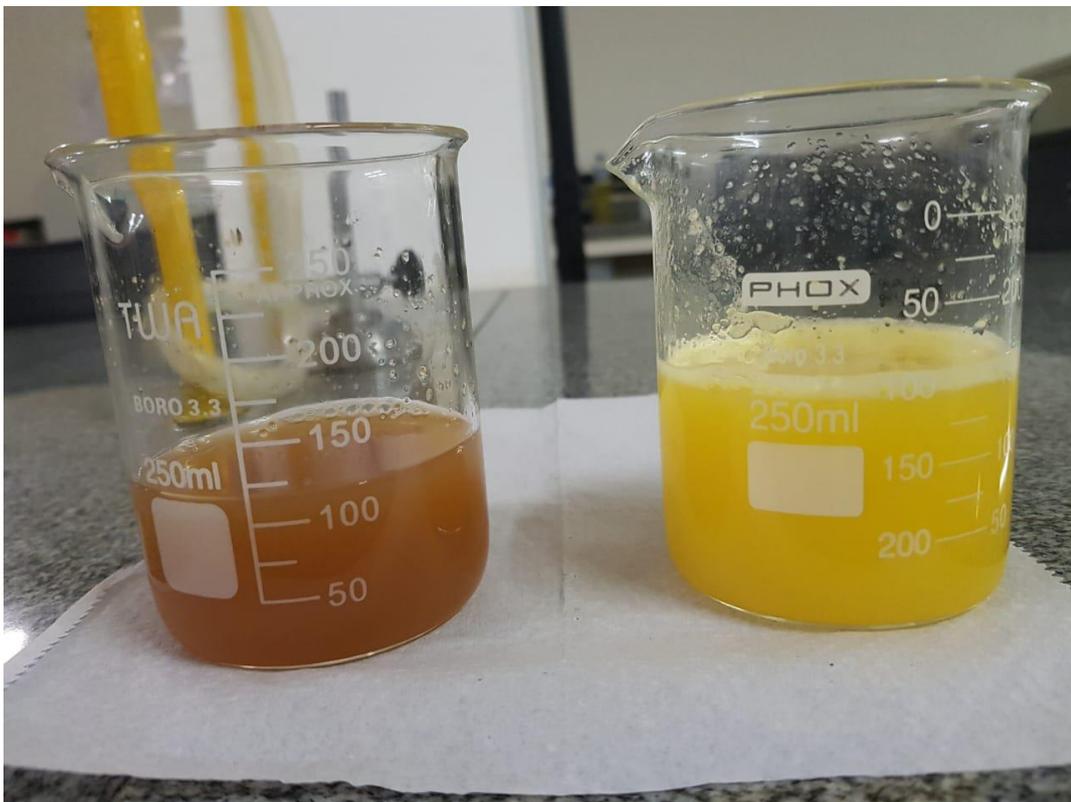
Após a observação da atividade enzimática nos diferentes potenciais hidrogeniônicos foi possível perceber que as enzimas atuam em sua maior capacidade nos pHs mais baixos, já previstos por Castro (2010) em que celulases produzidas por fungos filamentosos, costumam demonstrar uma atividade ótima em pH ácido. Este detalhe é interessante para a aplicação do extrato na indústria de sucos de frutas ácidas pois eles dispensam em sua maioria a utilização de substâncias para

mudança do pH do substrato, garantindo um barateamento para a indústria na produção e processamento de seu produto. O pH medido para os ensaios de clarificação do suco foram de 3,8 para a maçã e 3,89 para a laranja. Dessa forma as enzimas trabalham em suas ótimas condições de concentração iônica.

5.3 Aplicação Enzimática

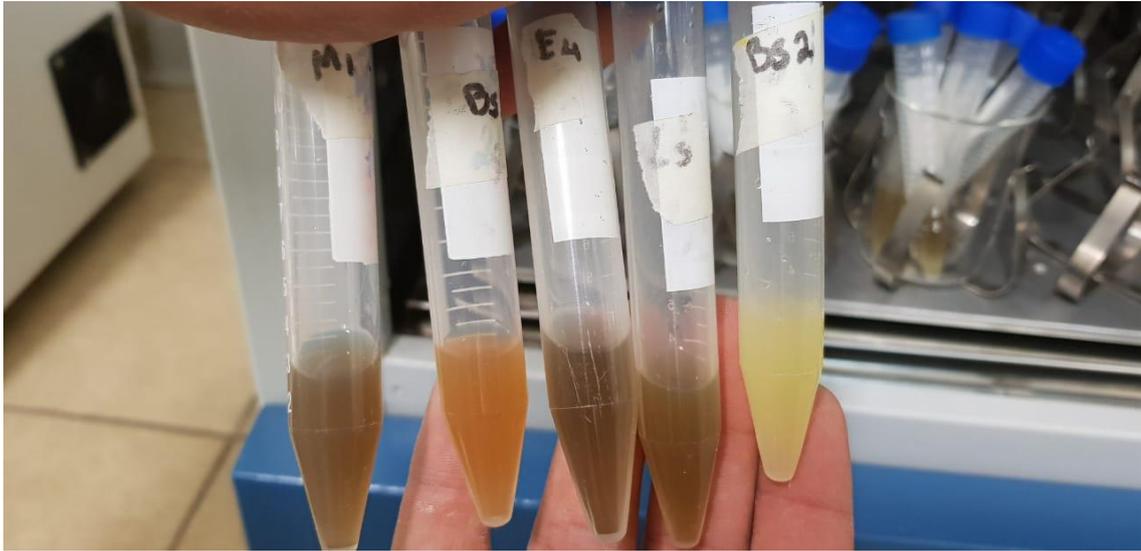
Após a determinação das caracterizações parciais de temperatura (40°C) e pH (4,0) das atividades enzimáticas do extrato bruto EB-Soja, foi possível nas condições laboratoriais vigentes estabelecer uma proposta de aplicação do extrato enzimático do fungo em estudo. Nesse sentido, buscou-se avaliar a capacidade das enzimas do extrato em clarificar sucos de maçã e laranja, conforme proposto por Sandri et al. (2011).

Figura 11. Suco de maçã e de laranja da esquerda para a direita conforme o item 4.10.1 na proporção 1:1.



Fonte: Próprio autor

Figura 12. Clarificação de suco de frutas. Ensaio maçã, controle maçã, controle enzima, ensaio laranja, controle laranja, da esquerda para a direita conforme o item 4.10.3.



Fonte: Próprio autor.

Com base nas leituras de absorvâncias a 525nm e 660nm, foi possível observar em comparativo ao controle substrato os parâmetros cor e variação de turbidez a partir da utilização dos extratos das frutas, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: EB-Soja aplicado em etapa de clarificação de extratos de polpas de maçã ou laranja [polpa de frutas: água destilada (1:1)], respectivamente. O ensaio foi realizado pela mistura de um terço de EB-Soja para dois terços de polpas de frutas, incubado a 40°C por 60 min, por meio da avaliação da absorvância média em 525nm ou 660nm.

| Comprimento de onda (nm) | Densidade óptica | | | |
|--------------------------|------------------|----------------------|-------------------------|------------|
| | Ensaio (E) | Controle enzima (CE) | Controle substrato (CS) | (E) – (CE) |
| <i>Suco de maçã</i> | | | | |
| Cor - 525 | 0,819 ± 0,122 | 0,497 ± 0,110 | 0,144 ± 0,000 | 0,322 |
| Turbidez - 660 | 0,433 ± 0,080 | 0,281 ± 0,096 | 0,065 ± 0,000 | 0,152 |
| <i>Suco de laranja</i> | | | | |
| Cor - 525 | 0,488 ± 0,082 | 0,497 ± 0,110 | 0,129 ± 0,000 | - 0,009 |
| Turbidez - 660 | 0,295 ± 0,056 | 0,281 ± 0,096 | 0,065 ± 0,000 | 0,014 |

Fonte: Próprio Autor

Na Tabela 1 é apresentado os resultados preliminares para a obtenção da clarificação de sucos. Para o extrato de maçã, os valores de absorvâncias dos ensaios e do controle enzima revelaram alteração, tanto no parâmetro cor, quanto na turbidez,

indicando valores superiores quando comparado ao controle substrato. Já para o extrato da laranja, ambos os parâmetros revelaram uma redução nos valores de absorvância comparado ao controle substrato. Nesse resultado particular, houve uma redução na cor ao final do ensaio, somado a uma redução na turbidez, indicando uma melhora no perfil de clarificação. Em contrapartida para o suco de maçã, os valores foram consideravelmente aumentados, muito possivelmente relativos ao efeito da oxidação evidenciado nas figuras 11 e 12. Para futuros ensaios envolvendo suco de maçã deve-se propor a inclusão de algum controle antioxidante que minimize os efeitos da oxidação como a adição de ácido cítrico ou extratos de frutas cítricas ou verificar a possibilidade de aquecimento antes da adição das enzimas a fim de se evitar o escurecimento enzimático.

Segundo Sandri et al. (2011), tanto parâmetro cor quanto turbidez refere-se a características que podem indicar uma maior ou menor intensidade de clarificação. O parâmetro aparente de mudança de cor após o tratamento enzimático, constitui um aspecto importante no processamento dos sucos industrializados pois, o extrato pode conter alguma substância que alteraria a cor do suco e dependendo do nível dessa mudança, seria necessário a utilização de corantes tornando o extrato menos interessante para a indústria.

Para se avaliar o parâmetro turbidez do suco após a aplicação do extrato enzimático foi feita a leitura a 660nm na qual observou-se uma redução na densidade ótica. Segundo ainda Sandri et al. (2011), dentre os vários carboidratos responsáveis pela turbidez, a presença da pectina se destaca por promover um aumento na viscosidade do suco de diversas frutas, inclusive da maçã e laranja, as quais foram escolhidas nesse trabalho devido a sua acidez, facilidade de acesso e popularidade na indústria.

Os resultados apresentados nesse trabalho, mesmo ainda com características preliminares, mostraram uma possibilidade de aplicação de enzimas produzidas por fungos filamentosos em processos envolvendo a clarificação de sucos. Dentre as enzimas produzidas pelo MEV, ficou destacado a expressiva atividade de hidrolases do grupo das pectinases, o que possivelmente responde a redução na turbidez visualizada no extrato de laranja. Segundo Vaillant et al. (2001), os sucos de frutas são constituídos por uma variedade de coloides, incluindo pectinas, celulosas, hemicelulosas, ligninas e amido. De acordo de Sulaiman et al. (1998), um dos principais problemas durante o preparo de suco de frutas é a turvação devido

primariamente à presença de pectina. A pectina pode estar associada a polímeros vegetais e *debris* celulares, ou seja, a inclusão de uma etapa de despectinação ao processo é relatado como facilitador na clarificação de suco de frutas. As pectinases hidrolisam pectina e levam a formação de um complexo proteína-pectina que floclula no sobrenadante. O suco resultante deste tratamento com pectinases terá uma menor quantidade de pectina e por sua vez menor viscosidade, trazendo vantagens principalmente em etapas subsequentes de filtração de sucos de frutas.

Devido ao não conhecimento de todas as possíveis substâncias presentes do extrato fúngico foi levantada a questão do quão comprometedor poderia ser a mistura de um extrato enzimático vindo de um fungo em análise preliminar com bebidas de consumo humano. Dessa forma foram propostas algumas alternativas para que seja concreta a utilização de extratos fúngicos em processos de clarificação enzimática de polpa de frutas, dentre elas está a análise composicional do extrato bruto para que assim possa ser detectada quaisquer possíveis toxinas ou até mesmo substâncias benéficas que trariam algum valor biológico para a nova bebida.

Outra alternativa, apesar de dispendiosa, seria a purificação das enzimas presentes no extrato bruto para que, isoladamente, possam ser aplicadas no processamento das bebidas.

Outra questão relevante neste trabalho é a presença de azida sódica como meio de preservação dos extratos enzimáticos após a filtração em funil de Büchner (item 4.4), uma vez que segundo a Merck KGaA (2018), azida sódica é mortal por ingestão; muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros e em contato com ácidos liberta gases muito tóxicos. Uma terceira alternativa que pode fazer parte de uma continuidade do presente trabalho para melhor elucidação dessa aplicação, bem como os efeitos maléficos ou benéficos gerados, é a adição de monensina sódica. Trata-se de um antibiótico natural que já é utilizado na ração de ruminantes trazendo bons resultados como um probiótico na pecuária brasileira, e que no caso dos sucos de frutas poderia servir como um aditivo que com sua capacidade antibiótica seria capaz de impedir o desenvolvimento da morfoespécie dentro da embalagem, protegendo o consumidor de possíveis metabólitos secundário que os microrganismos poderiam gerar, e corroborando para que esta bebida possivelmente tenha a oportunidade de ser comercializada como algum tipo de produto funcional, gerando grande destaque na indústria de alimentos (FERREIRA, 2016).

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi visualizado o isolamento de um fungo filamentosos, identificado inicialmente por “Morfoespécie verde”, obtida por uma porção de solo coletada logo a baixo da serapilheira de uma área remanescente de mata de galeria, do interior do parque municipal do Mocambo em Patos de Minas.

O isolado MEV apresentou crescimento evidente em todos os resíduos testados neste trabalho, com ênfase para o resíduo do beneficiamento da soja, cujo cultivo revelou maior produção de enzimas lignocelulolíticas.

Para todos os resíduos utilizados como fonte de carbono no cultivo de MEV foi visualizado a produção de xilanases, pectinases e CM-Celulases, destacando-se a expressiva atividade pectinolítica.

O melhor perfil das atividades enzimáticas para o EB-Soja correspondeu a uma faixa de 40°C – 50°C e pH 4,0.

O EB-Soja, quando submetido a etapa de clarificação de suco de frutas, sugere uma possível aplicação biotecnológica, principalmente para o suco de laranja, onde os parâmetros cor e turbidez revelaram, preliminarmente, melhores resultados em comparação com os respectivos controles dos substratos.

Ainda se faz necessário uma continuidade dos ensaios de aplicação biotecnológica para se obter resultados mais confiáveis para que se possa confirmar o papel positivo da adição do EB-Soja no processamento industrial de suco de frutas.

REFERÊNCIAS

ABCMED, (2014). **Fungos: como são? Eles podem causar doenças? Como Evitá-las?**. Disponível em <http://www.abc.med.br/p/vida-saudavel/526509/fungos-como-sao-eles-podem-causar-doencas-como-evita-las.htm>. Acesso em: 19 abr. 2017.

ALEXANDRINO, A. M., FARIA, H. G. D., SOUZA, C. G. M. D., e PERALTA, R. M. (2007) Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr), **Ciência e Tecnologia de Alimentos** **27**: 364-368.

AZEVEDO, J. L. DE. (2017). **Fungos. Genética e Melhoramento de Fungos na Biotecnologia**. Pesquisa. Atheneu, 2012

BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry** **72**: 248-254.

BRAKHAGE AA, SPRÖTE P, AL-ABDALLAH Q, GEHRKE A, PLATTNER H, TÜNCHER A. Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. **Advances in Biochemical Engineering/biotechnology**. 88: 45–90. PMID 15719552, 2004.

CASTRO, A. M. de; PEREIRA J, Nei. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.181-188, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010000100031>.

CUNHA, J. R. B. et al . Cultivo de *Penicillium* spp. em resíduos da colheita de soja para produção de celulase, protease e amilase. **Rev. Ceres, Viçosa**, v. **63**, n. **5**, p. **597-604**, out. 2016. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-737X2016000500597&lng=pt&nrm=iso. Acesso em 09 dezembro de 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201663050002>.

DIAS, M. Aproveitamento de resíduos do processamento de café para produção de carotenoides por leveduras e bactérias. **Universidade Federal de Lavras**. 2015.

FAN, L. SOCCOL, C. R. PANDEY, Ashok. Produção do cogumelo comestível-Flammulina velutipes em casca e borra de café. **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. 2000.

FERREIRA, A F. A. e PRADO, T. Utilização de monensina sódica para bovinos de corte. **Revista Investigação Medicina Veterinária**. Investigação, 15(7):37-42, 2016.

FILHO, E. X. F., PULS, J., AND COUGHLAN, M. P. (1993) Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*, **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** 11: 171-180.

GHOSE, T. K. (1987) Measurement of cellulase activities, **Pure and Applied Chemistry** 59: 257-268.

GOMES, KDES. Purificação e caracterização de xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis* e utilização na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. **Universidade Federal de Viçosa**, 2014.

HETLAND G, JOHNSON E, LYBERG T, BERNARDSHAW S, TRYGGESTAD AM, GRINDE B. Effects of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on immunity, infection and cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**. 68 (4): 363–70. PMID 18782264. doi:10.1111/j.1365-3083.2008.02156.x, 2008.

IEE – USP. Instituto de Energia e Ambiente da Universidade de São Paulo. Disponível em www.iee.usp.br/gbio/?q=livro/fonte-de-biomassa. Acesso em dezembro de 2018.

JAYANI, R. S. SAXENA, S. GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 40, n. 9, p.2931-2944, set. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026>.

KHAN, M. NAKKEERAN, E. UMESH-KUMAR, S. Potential application of pectinase in developing functional foods. **Annual review of food science and technology**, v. 4, p. 21-34, 2013.

KEREM, Z., FRIESEM, D., HADAR, Y. (1992) Lignocellulose Degradation during Solid-State Fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*, **Applied and Environmental Microbiology** 58: 1121-1127.

LONDE, P.R; AMARAL, A.F; VALE, V.S. Estrutura de uma comunidade arbórea de um fragmento de mata de galeria do Parque Municipal do Mocambo, Patos de Minas (MG). **Caminhos de Geografia**, v. 13, n. 43, out, 2012.

MERCK KGaA. AZIDA DE SÓDIO. Disponível em http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Sodium-azide,MDA_CHEM-822335. Acesso em dezembro de 2018.

MILLER, G. L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, **Analytical Chemistry** 31: 426-428.

PEREIRA, S. G. e AMARAL, A. F. Fenologia das espécies arbóreas do bosque do Parque Municipal do Mocambo, Patos de Minas – MG. **Perquirêre- Revista Eletrônica da Pesquisa – ISSN 1806-6399**. Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão (NIPE) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

Perquirêre. Edição 5, Ano 5, jun 2008. Disponível em http://perquirere.unipam.edu.br/documents/23456/34929/artigo_saulo.pdf. Acesso em 30 de novembro de 2018

PEREIRA-JR, N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA-ANNA, L. M. M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. Series on Biotechnology, Rio de Janeiro, RJ: Ed. Amiga Digital UFRJ, v. 2, 2008, p. 2- 45.

QIN, L. et al. Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase. **Biotechnology For Biofuels**, [s.l.], v. 9, n. 1,. 2016.

ROSSOL, C. D. et at. Caracterização, classificação e destinação de resíduos da agricultura. **Scientia Agraria Paranaensis** Volume 11, número 4, p.33-43, 2012.

SANDRI, I. G. et al. Clarification of fruit juices by fungal pectinases. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 44, n. 10, p.2217-2222, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.02.008>.

SILVA, E.m.; MACHUCA, A.; MILAGRES, A.m.f.. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. **Letters In Applied Microbiology**, [s.l.], v. 40, n. 4, p.283-288, abr. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.2005.01669.x>.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA (2014). Produção sustentável: resíduos agrícolas viram autopeças e telas de TV. Disponível em <https://www.sna.agr.br/producao-sustentavel-residuos-agricolas-viram-autopecas-e-telas-de-tv/>. Acesso em dezembro de 2018.

SOUZA, O.; FEDERIZZI, M.; COELHO, B.; WAGNER, T. M.; WISBECK, E. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos gerados na bananicultura e sua valorização para a produção de biogás. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.14, n.4, p.438–443, 2010.

STAMETS P. Psilocybin mushrooms of the world. **Berkeley: Ten Speed Press**, 1996.

SULAIMAN, M. Z. SULAIMAN, N. M. YIH, L. S. Limiting permeate flux in the clarification of untreated starfruit juice by membrane ultrafiltration. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 69, n. 2, p.145-148, mar. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1385-8947\(98\)00062-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1385-8947(98)00062-x).

TORTORA, G.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. Microbiologia. 8ª Ed. – **São Paulo: Editora**

UPDEGRAFF DM. Semimicro determination of cellulose in biological materials. **Analytical Biochemistry**. 32 (3): 420–424. doi:10.1016/S0003-2697(69)80009-6. PMID 5361396. 1969.

VAILLANT, F., MILLAN, A., DORNIER, M., DECLoux, M., & REYNES, M. Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. **Journal of Food Engineering**, 48, 83e90. 2001.

VAN DEN BRINK, J., MAITAN-ALFENAS, G. P., ZOU, G., WANG, C., ZHOU, Z., GUIMARÃES, V. M. AND DE VRIES, R. P. (2014), Synergistic effect of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* enzyme sets on the saccharification of wheat straw and sugarcane bagasse. **Biotechnology Journal**, 9: 1329–1338. doi:10.1002/biot.201400317.

VAN DEN BRINK, J., VAN MUISWINKEL, G. C. J., THEELEN, B., HINZ, S. W. A., & DE VRIES, R. P. (2013). Efficient Plant Biomass Degradation by Thermophilic Fungus *Myceliophthora heterothallica*. **Applied and Environmental Microbiology**, 79(4), 1316–1324. <http://doi.org/10.1128/AEM.02865-12>.

VISSER, E. M. et al. Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 144, p.587-594, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.015>.

XU, H. et al. Glucose Measurement in the Presence of Tea Polyphenols. **Food Analytical Methods**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.1027-1032, 2011.

ANEXOS

Anexo 1: Certidão de cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado.



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Certidão
Cadastro nº A4C7CC7**

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A4C7CC7**
 Usuário: **Gilvan Caetano Duarte**
 CPF/CNPJ: **981.483.626-53**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Impossibilidade de identificação

Título da Atividade: **Desconstrução fúngica da matéria orgânica vegetal: cultivo em resíduos agroindustriais e produção de enzimas lignocelulolíticas aplicadas à biotecnologia**

Equipe

| | |
|--|------------|
| Gilvan Caetano Duarte | UFU |
| Ana Carolina Costa | UFU |
| Francisco Manoel Ferreira Paula | UFU |
| Matheus Carvalho de Matos | UFU |
| Luis Fernando Rocha Oliveira | UFU |

Data do Cadastro: **01/07/2018 22:03:10**
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **22:28 de 13/12/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**