

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

IGOR MAGNO NICURGO BORGES ROSA MARTINS

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES
OBTIDAS POR CULTIVO DE FUNGOS MESÓFILOS EM RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS

Uberlândia
Minas Gerais - Brasil
Dezembro/2019

IGOR MAGNO NICURGO BORGES ROSA MARTINS

Produção e caracterização de celulases e hemicelulases obtidas por cultivo de
fungos mesófilos em resíduos agroindustriais

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto de Ciências
Agrárias, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Milla Alves
Baffi

Uberlândia
Minas Gerais - Brasil
Dezembro/2019

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo o amor, incentivo e enorme esforço para sempre me proporcionar condições favoráveis de estudo, deixando claro desde cedo a importância da educação na formação de pessoas e profissionais melhores.

À Luanna, a qual serei eternamente grato por ter sido meu alicerce durante todos esses anos, por ser essa pessoa doce, companheira e de fácil convivência.

À minha orientadora Milla Baffi, que sempre foi muito prestativa, dedicando seu tempo a me ensinar e aconselhar. Sou muito grato pelo seu respeito, sua confiança e sua sabedoria.

À toda família LAMIC, pelo acolhimento e por toda a ajuda e orientação, em especial à Patrícia, Kênia, Beatriz, Júlia e Luciana. Foram todas muito importantes para a execução desse trabalho.

A todos os bons professores que tive durante essa jornada, que mesmo diante tantas dificuldades se mostraram firmes e apaixonados pelas suas profissões, me motivando sempre a continuar buscando conhecimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (ProPP) da UFU por permitir que pessoas como eu desenvolvam pesquisas de qualidade, contribuindo para o desenvolvimento nacional.

À secretaria e coordenação do curso, que sempre prestaram um bom serviço e me trataram com educação.

A todos responsáveis pelo funcionamento e manutenção da Universidade Federal de Uberlândia, que de forma direta ou indireta tornaram possível a realização desse trabalho.

*“The sea throws rock together
But time leaves us polished stones*

*We can't fall any further
If we can't feel ordinary love
And we cannot reach any higher
If we can't deal with ordinary love”*

(U2 – Ordinary Love)

RESUMO

A produção de enzimas a partir do reaproveitamento de resíduos agroindustriais por fermentação em estado sólido (FES) bem como o estudo das suas propriedades físico-químicas, é de indubitável importância para melhorar o desempenho de processos de sacarificação e aumentar a viabilidade do etanol 2G. Entre essas enzimas, β -glicosidases e β -xilosidases são fundamentais para uma boa eficiência hidrolítica por atuarem sobre os oligossacarídeos oriundos da despolimerização da celulose e hemiceluloses por outros tipos de celulases e hemicelulases. Neste trabalho, realizou-se a produção e a quantificação de enzimas do complexo hemi- e celulolítico (β -xilosidase, xilanase, β -glicosidase, avicelase, CMCCase e FPase), por FES utilizando as linhagens fúngicas *Pleurotus ostreatus* PLO6 e *Aspergillus niger* SCBM1, isoladas e em consórcio. Em seguida, as condições ótimas e estabilidade frente a variações de pH e temperatura para β -glicosidase e β -xilosidase foram determinadas. Os picos de atividade de β -glicosidase, β -xilosidase, FPase, xilanase, avicelase e CMCCase foram de 2,95, 0,54, 3,72, 4,15, 7,86 e 4,95 U/g, respectivamente, para *P. ostreatus* isolado e 98,51, 62,92, 3,77, 12,40, 13,37 e 20,19 U/g quando em consórcio com *A. niger*. A β -glicosidase foi a enzima que mais se destacou, com pico de produção no quinto dia (98,51 U/g) de cultivo do consórcio fúngico, com pH ótimo de 4,0 e temperatura ótima de 45 °C. A enzima β -xilosidase foi a segunda com maior produção, com pico no 14º dia (62,92 U/g), pH ótimo de 3,5 e temperatura ótima de 55 °C. Ambas as enzimas apresentaram estabilidade em faixas mais ácidas de pH (3,0 a 7,0) e a β -xilosidase demonstrou termoestabilidade até 55 °C. Os dados apresentados indicam que o extrato enzimático produzido por consórcio características adequadas para futuras aplicações industriais em processos de sacarificação de biomassa.

Palavras-chave: consórcio fúngico, fermentação em estado sólido, reaproveitamento de resíduos, etanol 2G, hidrólise enzimática, basidiomiceto, β -glicosidase, β -xilosidase, avicelase, xilanase, CMCCase, FPase.

ABSTRACT

The enzyme production using agroindustrial wastes by solid state fermentation (SSF) and the study of their physicochemical properties are of undoubted importance to improve the performance of saccharification processes and increase economic viability of 2G ethanol. Among them, β -glycosidases and β -xylosidases are essentials for the good hydrolytic efficiency by acting on oligosaccharides from cellulose and hemicellulose despolymerizations from previous kinds of cellulases and hemicellulases. Thus, this work produced and quantified hemicellulolytic complex enzymes (β -xylosidase, xylanase, β -glycosidase, avicelase, CMCase and FPase), by SSF using *Pleurotus ostreatus* PLO6 isolated and in consortium with *Aspergillus niger* SCBM1. Then, the optimal conditions and stability against pH and temperature variations were determined for β -glycosidase and β -xylosidase.

The activity spikes of β -glycosidase, β -xylosidase, FPase, xylanase, avicelase and CMCase were 2.95, 0.54, 3.72, 4.15, 7.86 and 4.95 U/g, respectively, for *P. ostreatus* isolated and 98.51, 62.92, 3.77, 12.40, 13.37 e 20.19 U/g when on consortium with *A. niger*. β -glycosidase was highlighted with peak of production on fifth day (98.518 U/g) of fungal growth, optimum pH of 4.0 and optimal temperature of 45 °C. β -xylosidase was the second highest production, with peak of production on fourteenth day (62.92 U/g), optimum pH of 3.5 and optimal temperature of 55 °C. Both enzymes were stable in acid pH range (3.0 to 7.0) and β -xylosidase showed thermostability up to 55 °C. The presented data indicated that the enzymatic extract produced by consortium demonstrated suitable characteristics for future industrial applications in biomass saccharification processes.

Key-words: fungal consortium, solid state fermentation, waste reuse, 2G ethanol, enzymatic hydrolysis, basidiomycete, β -glycosidase, β -xylosidase, avicelase, xylanase, CMCase, FPase.

Sumário

1. INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivo Geral	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Substrato para fermentação em estado sólido (FES)	10
3.2. Solução nutriente	10
3.3. Microorganismos	10
3.4. Fermentação em estado sólido (FES)	10
3.5. Dosagens enzimáticas	11
3.5.1. Atividades de β -glicosidase	11
3.5.2. Atividade de β -xilosidase	11
3.5.3. Atividade de avicelase	12
3.5.4. Atividade de xilanase	12
3.5.5. Atividade de carboximetilcelulase (CMCase)	12
3.5.6. Atividade celulase total (FPase)	12
3.6. Caracterização Enzimática	13
3.6.1. Condições ótimas da β -glicosidase	13
3.6.2. Condições ótimas da β -xilosidase	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1. Sobre as Produções Enzimáticas	15
4.2. Sobre as Caracterizações Enzimáticas	18
4.2.1. β -glicosidase	19
4.2.2. β -xilosidase	21
5. CONCLUSões	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nos últimos anos, a crescente dependência energética, o esgotamento das reservas de petróleo e problemas ambientais têm estimulado a substituição dos combustíveis fósseis por biocombustíveis a partir de fontes renováveis (BUCKERIDGE *et al.*, 2010; KARAGÖZ *et al.*, 2012). Resíduos agroindustriais contendo biomassa lignocelulósica fornecem matéria-prima de grande potencial, cuja reutilização pode ser uma alternativa viável e de baixo custo para a produção de biocombustíveis (TRAVAINI *et al.*, 2013). Desta forma, o máximo aproveitamento de resíduos surge como uma alternativa promissora para minimizar os impactos negativos no ambiente. Neste contexto, o etanol de segunda geração (2G) produzido a partir de subprodutos agrícolas é uma opção vantajosa, visto que tais resíduos são gerados em grande quantidade no Brasil e sua reutilização ainda contribui para a diminuição do efeito estufa. O etanol 2G é um dos biocombustíveis com potencial para substituir a gasolina e pode ser sintetizado a partir da despolimerização da lignocelulose em açúcares fermentescíveis (PETROU *et al.*, 2009; TOQUERO e BOLADO, 2014). Dessa maneira, o país se destaca na liderança do aproveitamento integral de biomassas, uma vez que além de apresentar extenso parque agroindustrial, possui características favoráveis como intensa radiação solar e diversidade de clima (CGEE, 2010).

Neste contexto, estudos sobre a eficiência de catálises enzimáticas de biomassas lignocelulósicas têm sido desenvolvidos com o intuito de obter materiais com elevado rendimento em açúcares fermentescíveis para produção de etanol 2G (CANILHA *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2013). Entretanto, uma das principais limitações do processo é a utilização de enzimas comerciais que apresentam um custo elevado. Dessa forma, o uso de enzimas produzidas por fermentação em estado sólido (FES) a partir do reaproveitamento de resíduos agroindustriais, como o bagaço de cana-de-açúcar e o farelo de trigo, representa uma alternativa interessante e de menor custo. Por definição, FES é uma fermentação envolvendo sólidos sem ou com quase nenhuma água livre. Entretanto, o substrato deve possuir umidade suficiente para suportar o crescimento e metabolismo microbiano. Esse tipo de fermentação se assemelha ao habitat natural dos microrganismos, sendo uma ótima escolha para crescimento desses microrganismos, principalmente para fungos filamentosos (SINGHANIA *et al.*, 2009). Além disso, é uma alternativa sustentável pois permite utilizar resíduos agrícolas de baixo custo, o que aumenta a viabilidade econômica do processo e também minimiza a poluição causada pela geração desse tipo de resíduo.

O bagaço de cana-de-açúcar e o farelo de trigo são largamente disponíveis e podem ser

aproveitados para produção de etanol 2G, sendo as vias termoquímica e bioquímica as rotas tecnológicas mais utilizadas atualmente. Na via termoquímica, utiliza-se altas temperaturas e catalisadores químicos, como ácidos e bases fortes, que transformam o substrato em açúcares fermentescíveis e produzem compostos químicos que são incompatíveis com o ambiente de fermentação, sendo necessário etapas de purificação. Na rota bioquímica, utiliza-se enzimas que promovem a quebra da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis com baixa formação de subprodutos (LEITE, 2004; DA-SILVA, 1992).

A hidrólise da celulose ocorre através da ação sinérgica de enzimas conhecidas como celulasas, envolvendo: endoglucanases ou endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases ou exo- β -1,4-glucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e β -1,4-glicosidases ou celobiasas (EC 3.2.1.21) (GOMES *et al.*, 2016). Para a hidrólise da xilana, o principal polissacarídeo do grupo das hemiceluloses e o segundo mais abundante na parede celular da planta, enzimas como a xilanase e β -xilosidase são utilizadas com ampla aplicação comercial, incluindo a transformação de materiais lignocelulósicos em hexoses e pentoses (GOMES *et al.*, 2016).

Neste cenário, linhagens fúngicas podem ser cultivadas em resíduos agroindustriais por FES para a produção de enzimas fibrolíticas, sendo interessante tanto economicamente quanto ambientalmente, visto que além da aplicação na produção do biocombustível, esse processo dará uma destinação bastante útil para um material que até então seria considerado um passivo ambiental (MORETTI *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2017). Dentre essas linhagens, Basidiomicetos do gênero *Pleurotus* são macrofungos naturalmente encontrados em florestas úmidas tropicais e subtropicais, decompositores de madeira e de resíduos vegetais possuindo coloração clara e também conhecido como cogumelo gigante ou “Hiratake” (BONATTI *et al.*, 2004). As espécies desse gênero possuem ampla distribuição mundial e muitas espécies são comestíveis, tais como: *P. ostreatus*, *P. ostreatoroseus*, *P. pulmonarius* e *P. sajor-caju* (EIRA & MINHONI, 1997). Fungos do gênero *Pleurotus* possuem um complexo enzimático capaz de degradar materiais lignocelulósicos. Dentre eles, *P. ostreatus* é um fungo bastante promissor para a utilização em experimentos de FES utilizando resíduos agrícolas por utilizar lignina, hemicelulose e celulose, como fontes de carbono e de energia (da LUZ *et al.*, 2012).

Fungos do gênero *Aspergillus* são excelentes produtores de exo e endoglucanases e são reconhecidos pelas elevadas concentrações de β -glicosidases em seus extratos, o que representa uma vantagem no processo de sacarificação da biomassa (RODRÍGUEZ-ZUÑIGA *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2018). Essa vantagem se dá principalmente pelo fato que a β -glicosidase representa a enzima chave na bioconversão de biomassa em monossacarídeos livres, visto que ela hidrolisa

a ligação glicosídica do dímero de celobiose em duas moléculas de glicose, aumentando assim a eficiência da produção de etanol (RANI *et al.*, 2014). Nesse gênero, a espécie *A. niger* é conhecida por ser boa produtora dessas enzimas (GOMES *et al.*, 2016; DOS SANTOS *et al.*, 2015).

Para aumentar a produção de etanol 2G, é necessário o desenvolvimento de novas estratégias. Uma delas é o consórcio de enzimas de forma sinérgica sobre a biomassa. Neste sistema, dificuldades encontradas por uma enzima seriam contornadas pela ação de outra, aumentando a eficiência do processo (WATSON *et al.*, 2002). Outra alternativa é o consórcio de microorganismos para a produção maximizada de enzimas por FES, para posterior utilização em processos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica dos hidrolisados. RODRIGUES *et al.*, (2020) avaliaram a eficiência de consórcios fúngicos na produção de enzimas por FES e observaram que, os consórcios fúngicos contendo *A. niger* SCBM1 entre os inóculos, quando comparado com outros consórcios se destacaram na produção de enzimas, demonstrando a importância dessa espécie no co-cultivo fúngico para síntese de enzimas hidrolíticas.

Dentro desse contexto, no presente estudo foram realizados experimentos de FES, utilizando dois resíduos lignocelulósicos como fontes de carbono (bagaço de cana-de- açúcar e farelo de trigo) e duas linhagens fúngicas (*Aspergillus niger* SCBM1 e *Pleurotus ostreatus* PLO6), cultivadas isoladamente ou em consórcio, para a produção de celulases e hemicelulases. A curva de produção em função do tempo foi determinada para as enzimas avicelase, CMCase, β -glicosidase e FPase (celulases) e para xilanase e β -xilosidase (hemicelulases). Após a determinação da melhor condição de cultivo para produção de β -glicosidase e β -xilosidase, realizou-se a caracterização físico-química dessas enzimas, em relação às condições ótimas de pH e temperatura, pH de estabilidade e termoestabilidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Produzir e caracterizar celulasas e hemicelulasas obtidas pelo cultivo de fungos mesófilos em consórcio utilizando resíduos agroindustriais.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar o crescimento fúngico em resíduos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo);
- Produzir enzimas por FES;
- Quantificar a produção de avicelase, CMCase, β -glicosidase e FPase (celulasas), assim como xilanase e β -xilosidase (hemicelulasas);
- Comparar a produção de enzimas entre *P. ostreatus* isolado e em consórcio com *A. niger*;
- Avaliar a eficiência de ambas as fermentações para a produção das enzimas desejadas com outros trabalhos anteriores que utilizaram a mesma metodologia.
- Caracterizar a atividade das enzimas β -glicosidase e β -xilosidase quanto a pH e temperatura;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Substrato para fermentação em estado sólido (FES)

Para a FES, utilizou-se extrato bruto composto por bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farelo de trigo (FT). O BC, obtido na Usina Vale do Tijuco (Uberaba-MG), foi lavado com água destilada, seco em estufa a 50 °C por 48 horas e posteriormente, moído e peneirado (aproximadamente 0,6-1 cm de diâmetro). A amostra de (FT) foi comprada em um cerealista da cidade de Uberlândia e submetida ao mesmo processo de lavagem e secagem.

3.2. Solução nutriente

Foi utilizada como solução nutriente durante a fermentação uma solução contendo 3,5 g/L de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), 3,0 g/L de fosfato monopotássico (KH₂PO₄), 0,5 g/L de sulfato de magnésio (MgSO₄), e 0,5 g/L de cloreto de cálcio (CaCl₂), esterilizada em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 20 minutos.

3.3. Microorganismos

A linhagem de *P. ostreatus* PLO6 foi obtida de shimeji comercial e gentilmente cedida pela Dra. Maria Catarina Megumi Kasuya (Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Brasil). Já a linhagem de *A. niger* SCBM1 foi obtida na Coleção de Microorganismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMIC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Brasil. Essa linhagem foi previamente isolada de pilhas de bagaço de cana-de-açúcar bruto (DOS SANTOS *et al.*, 2015) e preservada em água destilada estéril em frascos de vidro Castellani e também em placas de Petri contendo meio de cultura de batata, dextrose e ágar (BDA).

3.4. Fermentação em estado sólido (FES)

Para a FES, foram utilizados 5 g de substrato seco (2,5 g de BC e 2,5 g de FT) acrescidos de 5 mL de solução nutriente por erlenmeyer de 250 mL, os quais foram esterilizados em autoclave por 20 minutos. As linhagens fúngicas *P. ostreatus* PLO6 e *A. niger* SCBM1 foram inoculadas em placas contendo meio de cultura BDA a 28 °C durante sete dias. Foram retirados cinco discos miceliais de cada linhagem com cerca de 0,5-1,0 cm² de diâmetro, com auxílio da

parte traseira de uma ponteira estéril de 1000 µL. Em seguida, os discos foram ressuspensos e homogeneizados em 5 mL de solução nutriente com a ajuda de uma baqueta de vidro estéril. A suspensão foi inoculada em frascos tipo erlenmeyers contendo os meios de fermentação e o volume final foi completado com solução nutriente para 20 mL.

Os erlenmeyers contendo os substratos já inoculados foram incubados em duplicata a 28 °C por 14 dias. A cada 24 horas, foram obtidos os extratos enzimáticos brutos através da adição de 50 mL de água destilada e homogeneização suave com baqueta de vidro, seguido de agitação orbital a 200 rpm por 30 minutos.

As amostras foram então filtradas em tecido “vual” e o filtrado foi centrifugado a 5000 rpm por 1 hora para a separação do micélio. Posteriormente, realizou-se nova filtração em papel de filtro, seguida de nova centrifugação a 10000 rpm durante 10 minutos. O extrato enzimático bruto foi imediatamente alíquotado e estocado a -20 °C para posteriores ensaios. Este processo foi repetido até o final da FES.

Foram realizados dois experimentos de FES, variando-se as linhagens fúngicas, sendo a fermentação 1 com apenas *P. ostreatus* e a fermentação 2 com um consórcio entre *P. ostreatus* e *A. niger*. A produção de enzimas utilizando a linhagem *A. niger* isolada foi realizada em um trabalho anterior por nosso grupo de pesquisa (DOS SANTOS *et al.*, 2015).

3.5. Dosagens enzimáticas

3.5.1. Atividades de β-glicosidase

A atividade de β-glicosidase foi quantificada em duplicata, utilizando 50 µL do extrato enzimático bruto, 250 µL de tampão acetato 0,1 M e 250 µL de p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (PNPG) 4 mM, por 10 minutos em banho maria a 40 °C. A reação foi interrompida com 2 mL de carbonato de sódio (NaCO₃) 2M e o p-nitrofenol (pNP) liberado foi quantificado em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de pNP por minuto de reação a partir da curva padrão de pNP (DOS SANTOS *et al.*, 2015).

3.5.2. Atividade de β-xilosidase

A atividade de β-xilosidase foi determinada conforme item 3.5.1. Entretanto, utilizou-se p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (PNPX, Sigma) como substrato.

3.5.3. *Atividade de avicelase*

A atividade de avicelase foi determinada em duplicata, utilizando 0,3 mL do extrato enzimático, 2,7 mL de avicel 1,0% em tampão acetato 0,1 M, por 10 minutos em banho maria a 40 °C. A reação foi interrompida após 10 minutos pela adição de 3 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). O volume resultante foi colocado em banho de ebulição por 10 minutos e, em seguida, acrescido de 2,4 mL de água destilada (DOS SANTOS *et al.*, 2015). A quantidade de glicose liberada foi medida por espectrofotometria a 540 nm (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose por minuto de reação, determinado a partir de curva padrão de glicose.

3.5.4. *Atividade de xilanase*

A atividade de xilanase foi determinada conforme item 3.5.3. Entretanto utilizou-se xilana (Sigma) como substrato.

3.5.5. *Atividade de carboximetilcelulase (CMCase)*

A atividade de CMCase foi determinada conforme item 3.5.3. Entretanto utilizou-se carboximetilcelulose (CMC, Sigma) como substrato.

3.5.6. *Atividade celulase total (FPase)*

A atividade de celulases total por unidades de papel de filtro (FPU) foi determinada a 50 °C em uma mistura de reação contendo 1 mL de tampão citrato 0,05 mol/L, pH 4,8, 0,5 mL de extrato enzimático e uma fita de papel de filtro de 1 cm de largura por 6 cm de comprimento, pesando aproximadamente 50 mg (GHOSE, 1987). A reação ocorreu por 60 minutos e foi interrompida pela adição de 3 mL de DNS e o volume final foi homogeneizado e levado ao banho de ebulição por 5 minutos. Após esse período, os tubos contendo as amostras foram levados ao banho de gelo e adicionados de 20 mL de água destilada e homogeneizados. A quantidade de glicose liberada foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm.

3.6. Caracterização Enzimática

3.6.1. Condições ótimas da β -glicosidase

A caracterização físico-química da β -glicosidase (pH ótimo, temperatura ótima, pH de estabilidade e termoestabilidade) foi examinada em ampla faixa de pHs e temperaturas.

3.6.1.1. pH ótimo

O pH ótimo foi determinado incubando-se 50 μ L de enzima bruta em 250 μ L do substrato PNPG, em diferentes faixas de pH, entre 3,5 e 7,5, variando de 0,5 em 0,5. Os tampões utilizados foram: tampão citrato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ (3,5 a 6,0) e tampão tris-HCl 0,1 M (7,0 e 7,5). A atividade enzimática foi quantificada de acordo com DOS SANTOS *et al.* (2015).

3.6.1.2. Temperatura ótima

A temperatura ótima foi avaliada incubando-se 50 μ L de extrato bruto, nas mesmas condições para a determinação do pH ótimo, porém, em diferentes temperaturas, variando entre 30 e 70 °C, variando de 5 em 5° C.

3.6.1.3. pH de estabilidade

A estabilidade referente à variação da escala de pH foi analisada através da incubação dos extratos enzimáticos durante 24 horas à temperatura ambiente em tampão, variando o pH de 3,5 a 7,5, com os mesmos tampões já descritos. A atividade residual (%) foi determinada nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura.

3.6.1.4. Termoestabilidade

A termoestabilidade foi investigada incubando os extratos enzimáticos brutos em tampão no pH ótimo de cada enzima, por 1 hora em diferentes temperaturas de 30 a 70 °C. Posteriormente, a atividade enzimática residual foi quantificada nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura. Os ensaios foram realizados em duplicata (BAFFI *et al.*, 2011).

3.6.2. Condições ótimas da β -xilosidase

A caracterização de β -xilosidase foi determinada da mesma forma ao da β -glicosidase,

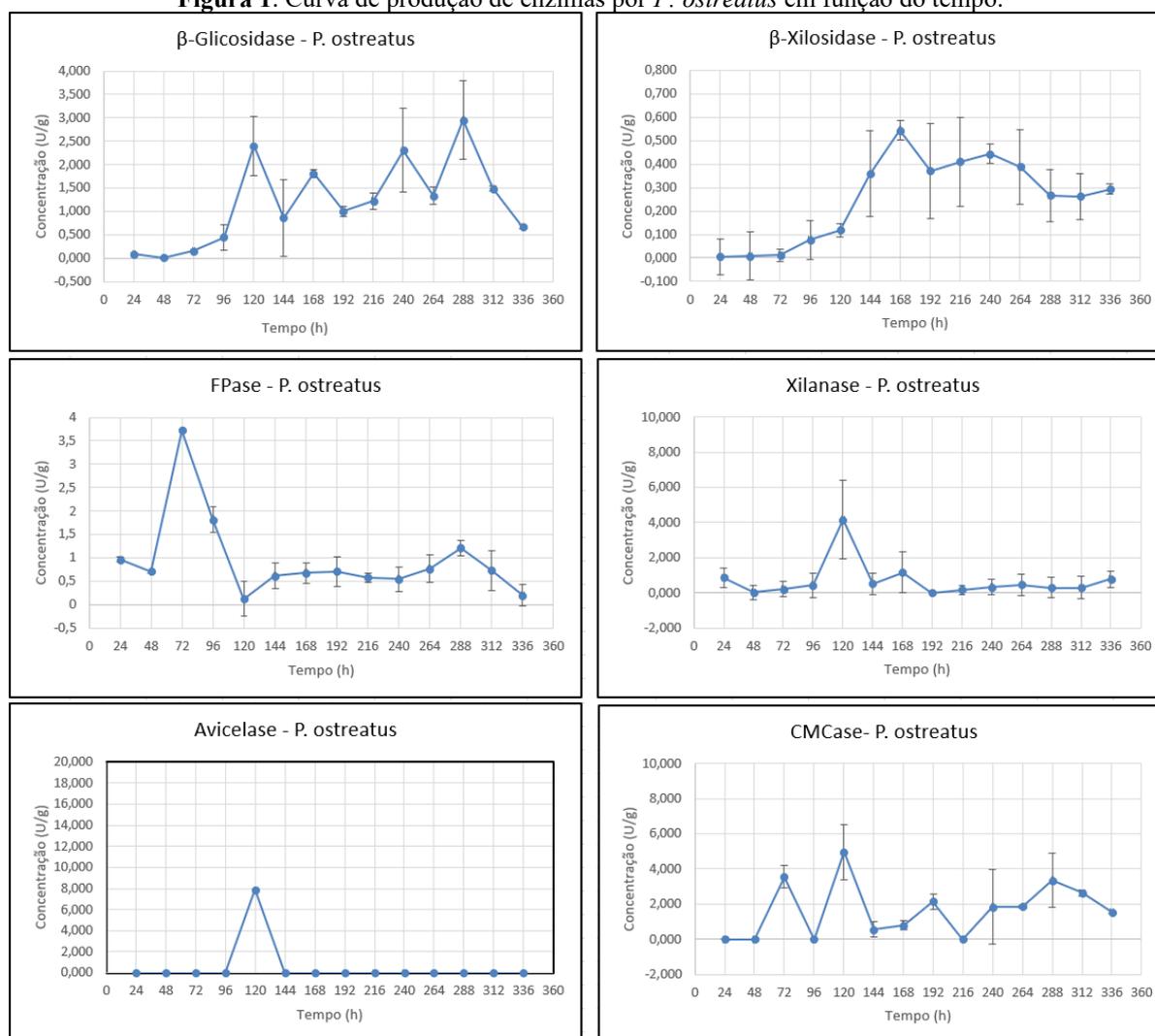
porém, utilizando p-nitrofenil- β D-xilopiranosídeo (PNPX, Sigma) como substrato.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sobre as Produções Enzimáticas

Após a FES, foram dosadas as atividades de diferentes enzimas produzidas, variando a linhagem fúngica empregada. Para *P. ostreatus* isolado, as enzimas apresentaram baixa produção nas condições avaliadas, com picos de atividade de β -glicosidase, β -xilosidase, FPase, xilanase, avicelase e CMCase de 2,95, 0,54, 3,72, 4,15, 7,86 e 4,95 U/g, respectivamente (Figura 1).

Figura 1. Curva de produção de enzimas por *P. ostreatus* em função do tempo.



Fonte: autor, 2019

Dessa maneira, observou-se que a produção de enzimas por *P. ostreatus* isolado, utilizando bagaço de cana e farelo de trigo como substrato, foi baixa. A produção de enzimas por *P. ostreatus* pode variar em função do substrato utilizado. Conforme a Tabela 1, estes

resultados foram similares aos encontrados utilizando palha de arroz como substrato (KHALIL *et al.*, 2011) e inferiores aos obtidos por ZAMORA (2017) que utilizou resíduos de flores (*Alstroemeria sp.*) como fonte de carbono na FES.

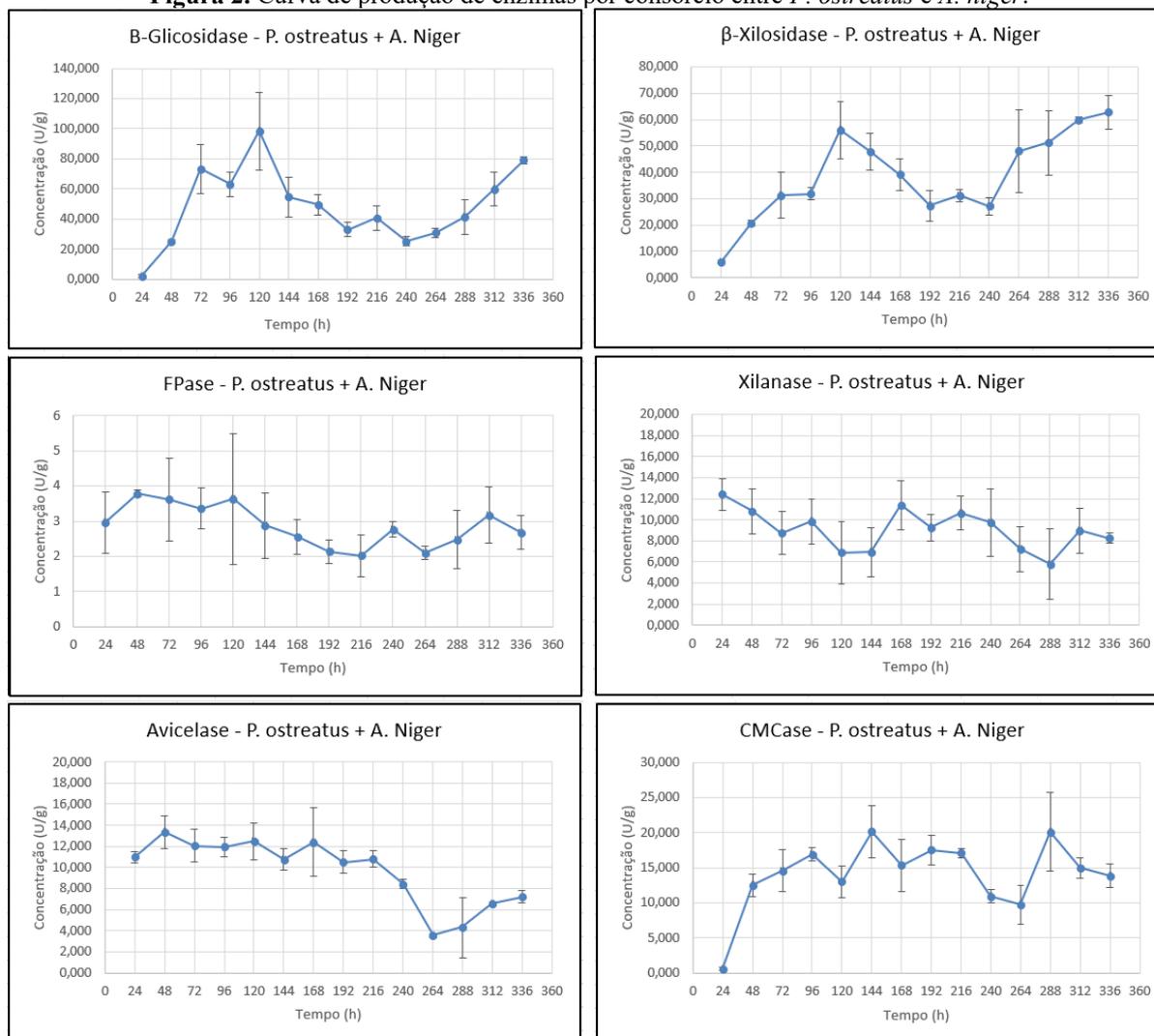
Tabela 1. Comparação com outros estudos utilizando *P. ostreatus* isolado.

Atividades (U/g)	Bagaço de Cana + Farelo de Trigo	Palha de Arroz	Resíduo de Flores
β -glicosidase	2,95	3,60	94,9
CMCase	4,95	7,08	20,5
Avicelase	7,86	7,35	10,3
Fontes:	Trabalho atual	Khalil (2011)	Zamora (2017)

Fonte: autor, 2019

Porém, de forma geral, quando em consórcio com *A. niger*, obteve-se uma produção enzimática considerável após a FES, merecendo alguns destaques. As enzimas β -glicosidase, β -xilosidase, FPase, xilanase, avicelase e CMCase apresentaram picos de produção de 98,51, 62,92, 3,77, 12,40, 13,37 e 20,19 U/g, respectivamente (Figura 2).

Figura 2. Curva de produção de enzimas por consórcio entre *P. ostreatus* e *A. niger*.



Fonte: autor, 2019

Conforme figura 2, a produção de β -glicosidase foi a mais expressiva, tendo seu pico de 98,51 U/g no quinto dia (120 horas). Comparando este dado com estudos anteriores, observou-se níveis menores de produção de β -glicosidase, com por exemplo no trabalho de DOS SANTOS *et al.* (2015) no qual foram obtidos 54 U/g por *A. niger* cultivado de forma isolada utilizando os mesmos substratos (farelo de trigo e bagaço de cana) e 80 U/g por *A. niger* e *A. fumigatus* cultivados em consórcio também nos mesmos substratos (DOS SANTOS *et al.*, 2019).

A enzima β -xilosidase foi a segunda com maior produção, com pico de atividade (62,92 U/g) no décimo quarto dia (336 horas). Valores superiores foram observados por RODRIGUES *et al.* (2017) com pico de 78,00 U/g por *A. niger* SCBM1 isolado, após 144 horas de FES, também utilizando os mesmos resíduos como fontes de carbono. Por outro lado, DOS SANTOS *et al.* (2019) obtiveram resultados mais expressivos cultivando *A. niger* SCBM1 e *A. fumigatus*

SCBM6 em consórcio, com pico de produção de 180 U/g após 48 horas de FES. Esses dados demonstram o enorme potencial ao se trabalhar com consórcio fúngico, no lugar de culturas isoladas, tendo o co-cultivo de *A. niger* e *P. ostreatus* por FES no presente estudo aumentado a produção de β -glicosidase quando comparado com as culturas cultivadas isoladamente.

Estudos prévios corroboram a premissa de que culturas puras (isoladas) apresentam menor potencial em produzir enzimas que hidrolisem eficientemente polímeros complexos da biomassa em monômeros fermentescíveis (HAN & CHEN, 2007; KIM *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2011). Por outro lado, as fermentações que utilizam consórcio tendem a obter maiores rendimentos, maior taxa de crescimento, a utilizar substratos mais pobres e superar limitações nutricionais quando comparadas com fermentações convencionais com culturas isoladas (GUEVARA & ZAMBRANO, 2006; FENG *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2011). Quando em consórcio, os microorganismos trabalham de forma sinérgica sobre substratos complexos, degradando-os mais facilmente em monômeros mais simples (SOWMYA *et al.*, 2015). Dessa maneira, ao cultivar fungos em consórcio, o processo como um todo fica mais dinâmico, sendo preenchidas algumas das lacunas que limitam o desempenho dos fungos isolados. RODRIGUES *et al.* (2020) avaliaram a eficiência de consórcios fúngicos na produção de enzimas por FES e obtiveram 34,04 e 35,39 U/g de β -glicosidase e β -xilosidase, respectivamente, utilizando consórcio fúngico entre *A. fumigatus* SCBM6, *P. ostreatus* PLO6 e *Ganoderma lucidum* 601. Ao realizar o consórcio entre *A. niger* SCBM1, *P. ostreatus* PLO6 e *Ganoderma lucidum* 601, os valores obtidos para as mesmas enzimas foram 106,10 e 121,02 U/g, respectivamente, observando que consórcios contendo *A. niger* entre os inóculos demonstraram produção superior de enzimas, corroborando a importância dessa espécie na biossíntese de celulasas e hemicelulasas.

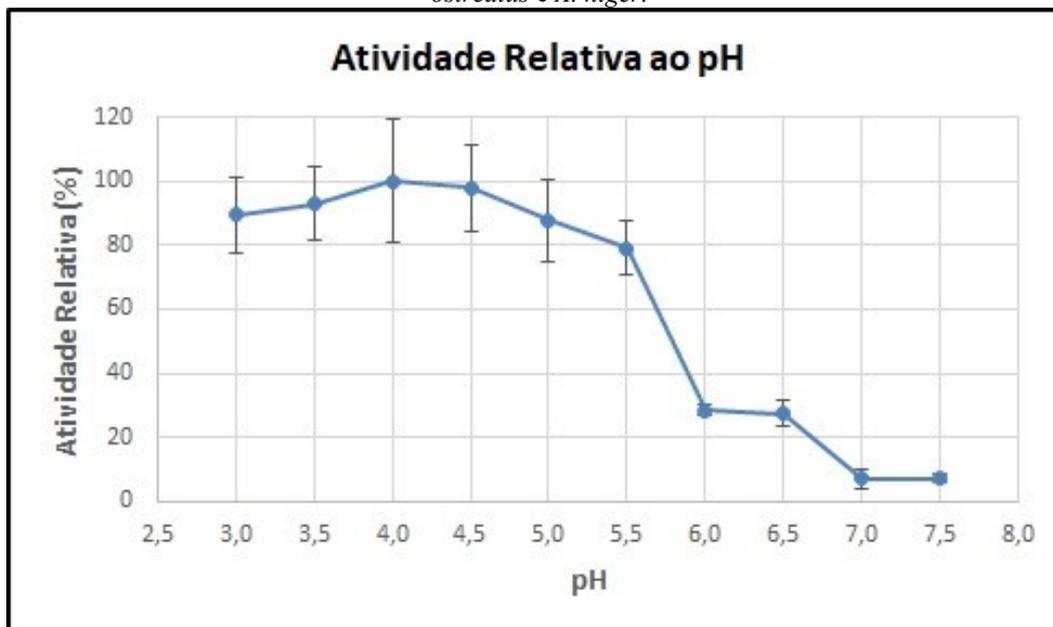
4.2. Sobre as Caracterizações Enzimáticas

A fim de potencializar a atividade das enzimas mais promissoras, estudou-se vários fatores que alteram suas eficiências, tais como temperatura e pH ótimos e estabilidade em relação a variações de pH e temperatura. Para tal estudo, utilizou-se o extrato de 120 horas produzido por *P. ostreatus* e *A. niger* para analisar mais profundamente as enzimas β -glicosidase e β -xilosidase.

4.2.1. β -glicosidase

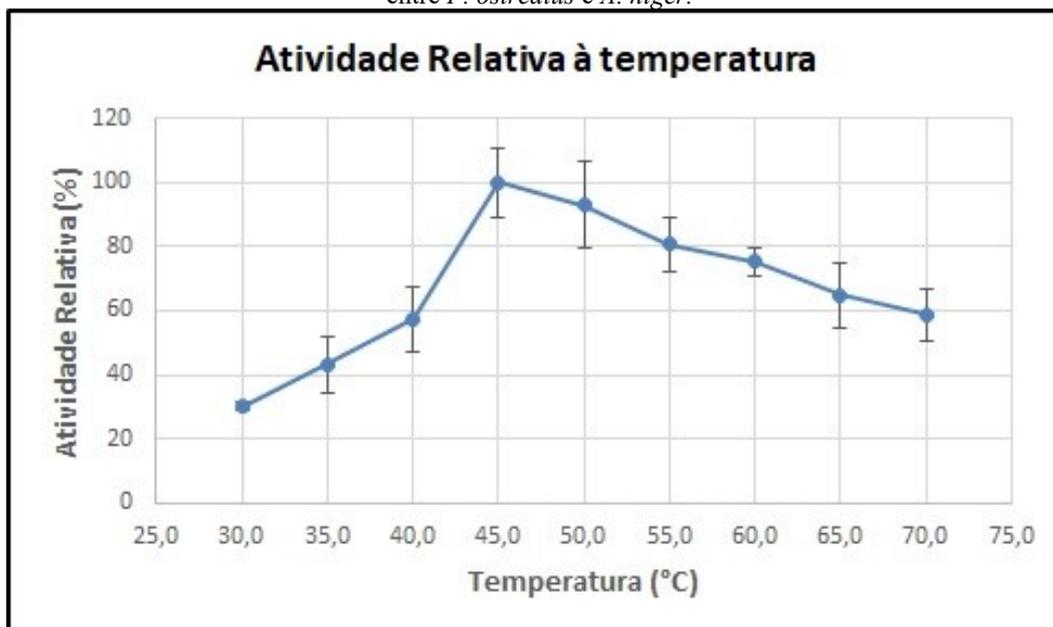
Os resultados obtidos na caracterização da enzima β -glicosidase estão ilustrados nas Figuras 3, 4, 5 e 6.

Figura 3. Determinação do pH ótimo da β -glicosidase do extrato enzimático produzido pelo consórcio entre *P. ostreatus* e *A. niger*.



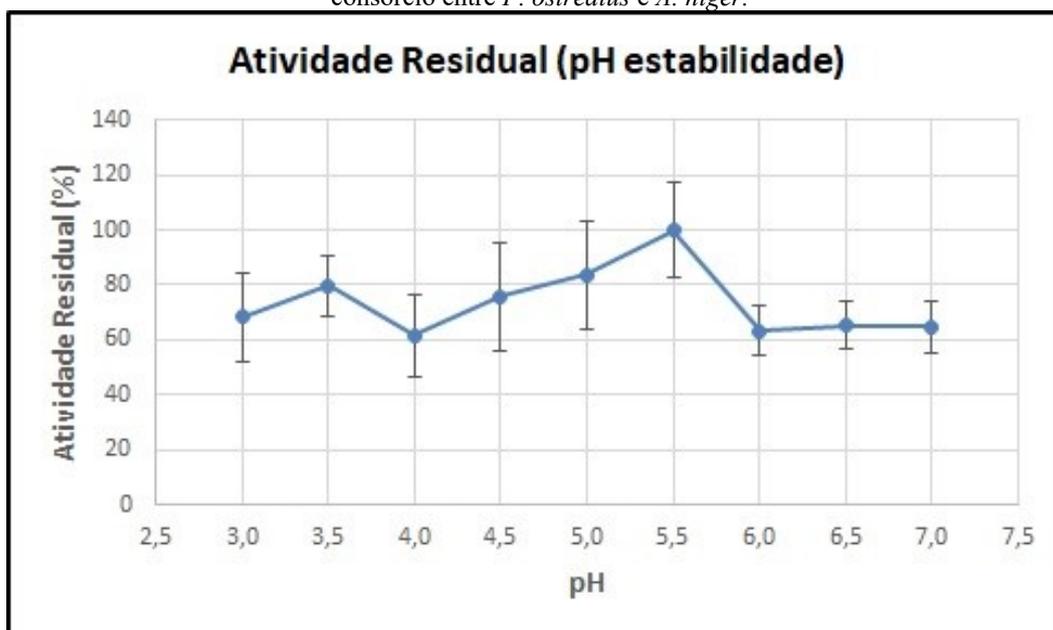
Fonte: autor, 2019

Figura 4. Determinação da temperatura ótima da β -glicosidase do extrato enzimático produzido pelo consórcio entre *P. ostreatus* e *A. niger*.



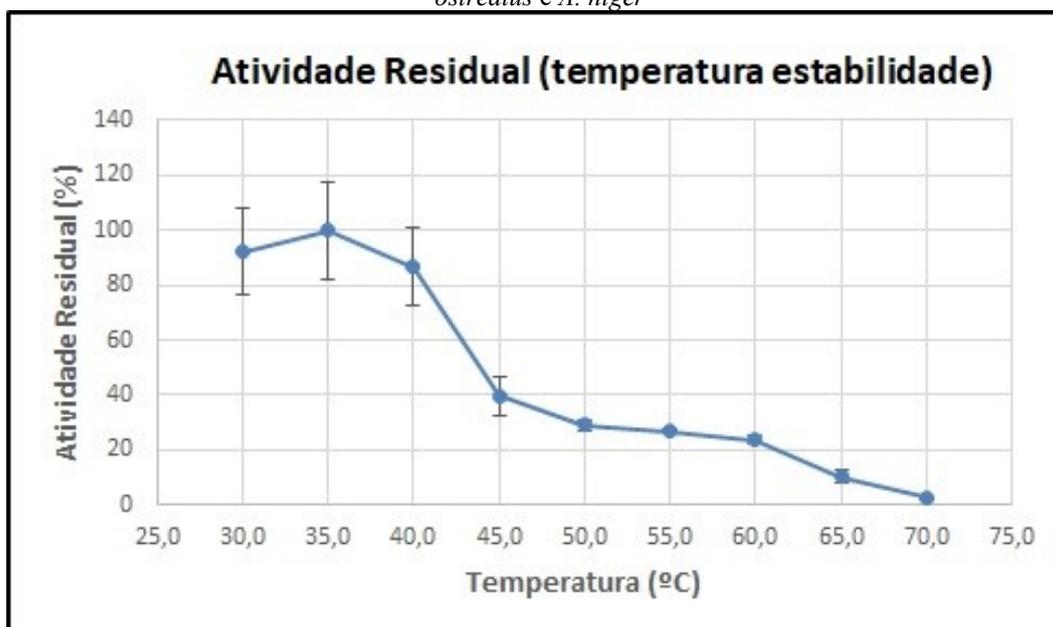
Fonte: autor, 2019

Figura 5. Determinação do pH de estabilidade da enzima β -glicosidase do extrato enzimático produzido pelo consórcio entre *P. ostreatus* e *A. niger*.



Fonte: autor, 2019

Figura 6. Determinação da termoestabilidade da β -glicosidase do extrato produzido pelo consórcio entre *P. ostreatus* e *A. niger*



Fonte: autor, 2019

De acordo com as Figuras 3 e 4, o pH ótimo da β -glicosidase foi 4,0 e a temperatura ótima a 45 °C. DOS SANTOS *et al.* (2015) observaram atividades ótimas no pH 3,5 e a 50 °C para a enzima β -glicosidase produzida por *A. niger* SCBM3 isolado, enquanto RODRIGUES *et al.* (2017) observaram atividades ótimas no pH 4,5 e a 65 °C. De acordo com estudos anteriores, a maioria das β -glicosidases fúngicas apresentaram faixas ótimas entre valores de

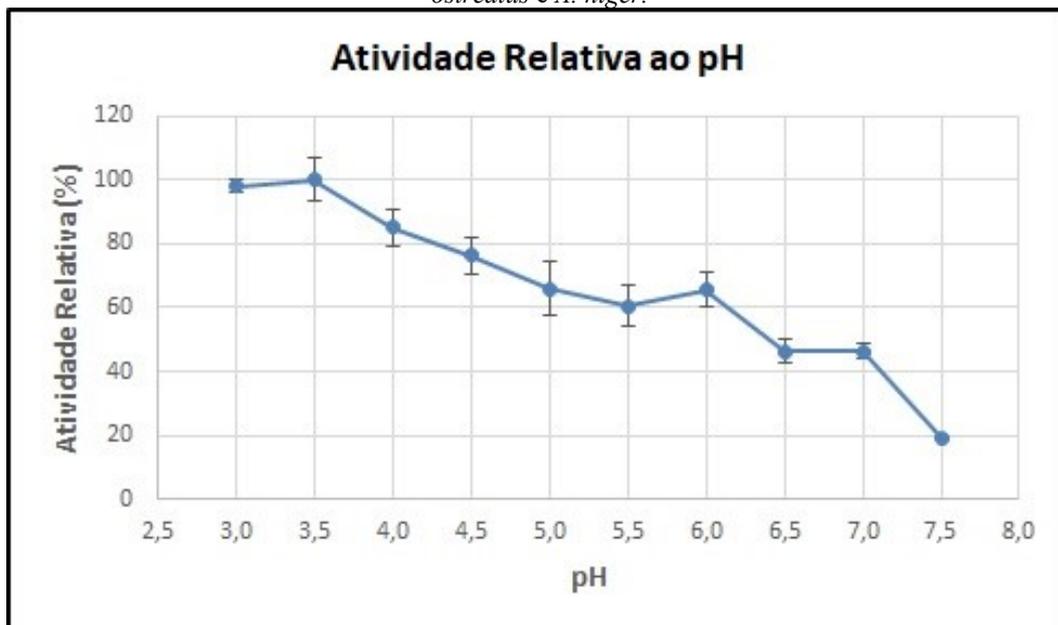
pH de 4,0 a 6,0 (SARRY & GÜNATA, 2004; DOS SANTOS *et al.*, 2015).

Observou-se ainda que a atividade enzimática manteve-se estável na faixa de pH de 3,5 até 5,5 (Figura 5). RODRIGUES *et al.* (2017) observaram estabilidade na faixa de pH entre 3,5 e 7,0. Essa ampla faixa de pH de estabilidade pode proporcionar uma boa aplicação industrial, visto que a enzima consegue manter-se ativa mesmo com possíveis oscilações físico-químicas. Em relação à temperatura, a atividade relativa manteve-se acima de 80% entre 30 e 40 °C. A partir de 45 °C, a atividade residual caiu drasticamente, indicando que as enzimas não resistiram ao aumento de temperatura, em função do início do processo de desnaturação térmica das proteínas (Figura 6). Esses dados indicam que temperaturas mais amenas devem ser utilizadas em futuros processos de hidrólise. DOS SANTOS *et al.* (2015) também observaram estabilidade de pH entre 3,0 e 6,5 e termoestabilidade entre 30 e 40 °C para β -glicosidase produzida por *A. niger* SCBM1 e *A. fumigatus* SCBM6 em consórcio.

4.2.2. β -xilosidase

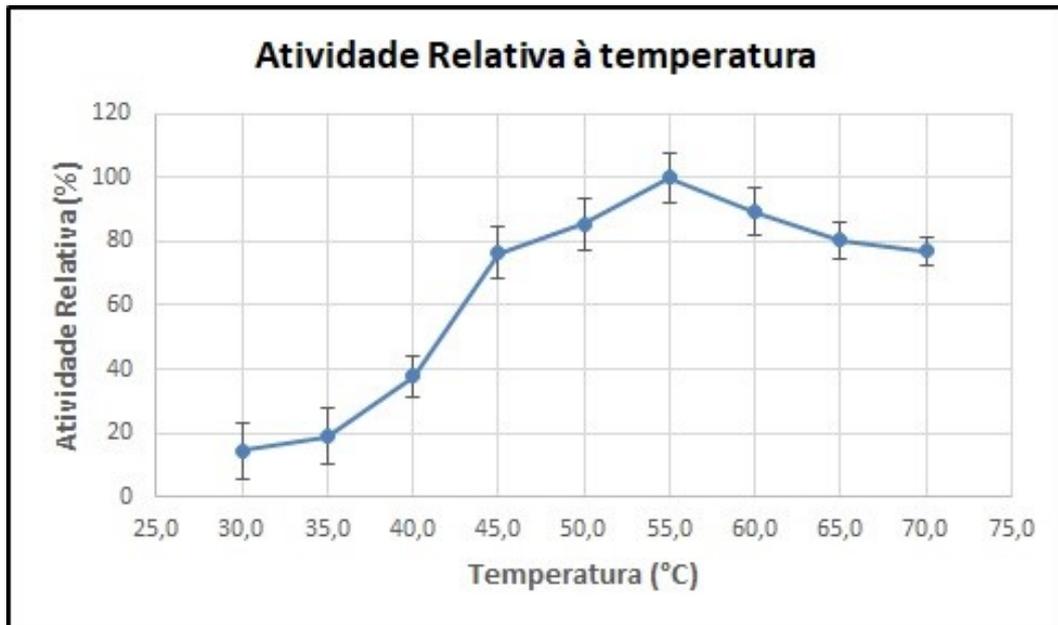
Os resultados obtidos na caracterização da enzima β -xilosidase estão ilustrados nas figuras 7, 8, 9 e 10.

Figura 7. Determinação do pH ótimo da β -xilosidase do extrato enzimático produzido pelo consórcio entre *P. ostreatus* e *A. niger*.



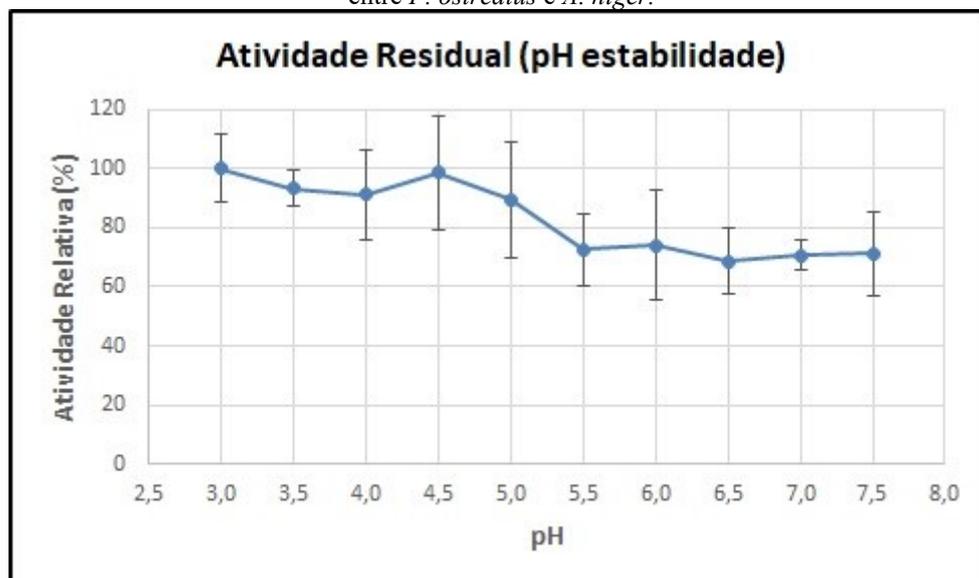
Fonte: autor, 2019

Figura 8. Determinação da temperatura ótima da β -xilosidase do extrato enzimático produzido pelo consórcio entre *P. ostreatus* e *A. niger*.



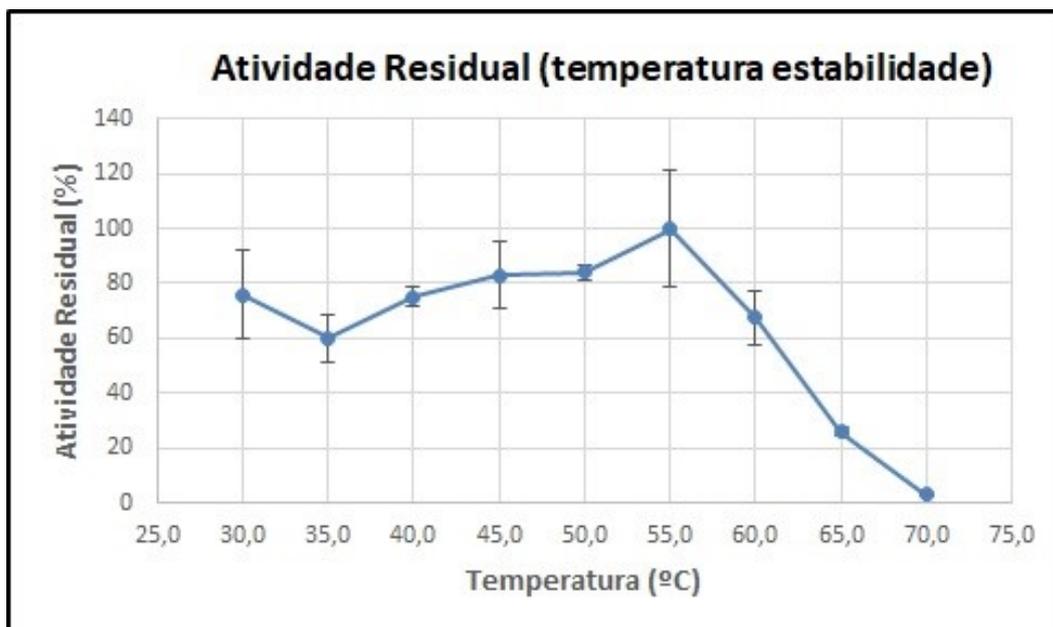
Fonte: autor, 2019

Figura 9. Determinação do pH de estabilidade da β -xilosidase do extrato enzimático produzido pelo consórcio entre *P. ostreatus* e *A. niger*.



Fonte: autor, 2019

Figura 10. Determinação da termoestabilidade da β -xilosidase do extrato enzimático produzido pelo consórcio entre *P. ostreatus* e *A. niger*.



Fonte: autor, 2019

De acordo com o experimento realizado, pôde-se determinar o pH ótimo da β -xilosidase (pH 3,5), assim como sua temperatura ótima (55 °C). Além disso, observou-se que a atividade enzimática se manteve estável na faixa de pH de 3,0 até 7,5. Em relação à temperatura, a atividade foi estável entre 30 e 55 °C. Estudos anteriores apontaram 3,0 como pH ótimo e 55 °C como temperatura ótima para a enzima β -xilosidase produzida por *A. niger* SCBM3 isolado, observando estabilidade de pH entre 4,0 e 7,0 e estabilidade térmica entre 30 e 60 °C (DOS SANTOS *et al.*, 2015). Dessa forma, observou-se que o coquetel enzimático produzido por *P. ostreatus* e *A. niger* em consórcio manteve características físico-químicas semelhantes ao extrato de *A. niger* isolado. Esses dados, em conjunto com os dados levantados para β -glicosidase, demonstram o potencial do coquetel enzimático produzido por *P. ostreatus* e *A. niger* em consórcio para futuras aplicações em processos de sacarificação enzimática. Estes resultados são bastante interessantes e estimulam novos estudos sobre a produção e aplicação de celulases e hemicelulases por consórcio fúngico.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que o cultivo das espécies fúngicas *A. niger* SCBM1 e *P. ostreatus* PLO6 em consórcio utilizando bagaço de cana e farelo de trigo brutos como substratos foi eficiente na produção de enzimas do complexo hemicelulolítico. Além disso, todas as enzimas avaliadas obtiveram maior rendimento na FES em consórcio do que com os fungos em monoculturas, tendo a β -glicosidase aumentado 33,40x, a β -xilosidase 116,52x, a xilanase 2,99x, a avicelase 1,7x e a CMCase 4,08x. A enzima que apresentou maior produção foi a β -glicosidase com pH ótimo de 4,0 e temperatura ótima de 45 °C. A enzima β -xilosidase, por sua vez, apresentou pH ótimo de 3,5 e temperatura ótima de 55 °C. Ambas as enzimas apresentaram estabilidade em faixas mais ácidas de pH. No entanto, β -xilosidase se destacou em relação à termoestabilidade, sugerindo que este extrato enzimático bruto pode ser futuramente aplicado em reações de hidrólise enzimática de biomassas lignocelulósicas, visando diferentes aplicações industriais, dentre elas a produção de etanol 2G.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram o potencial da aplicação de consórcios fúngicos na produção de enzimas e abrem perspectivas para a continuidade de pesquisas na área de reaproveitamento de resíduos e produção de enzimas para aplicações em biotecnologia ambiental e biocombustíveis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, Camila Reis de *et al.* Estudo das rotas de hidrólise química e biológica para a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos. **Seminário Estudantil de Produção Acadêmica**, v. 12, n. 1, 2013.

BAFFI, Milla A. *et al.* A Novel β -Glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: Characterization and Application in Winemaking. **Journal of food science**, v. 76, n. 7, p. C997-C1002, 2011.

BONATTI, M. *et al.* Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food chemistry**, v. 88, n. 3, p. 425-428, 2004.

BUCKERIDGE, Marcos S.; SANTOS, WD dos; SOUZA, AP de. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. **Bioetanol da cana-deaçúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**, p. 365-380, 2010.

CANILHA, Larissa *et al.* Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS DE ESTRATÉGIAS (CGEE). **Química verde no Brasil: 2010-2030**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - Brasília, 2010.

DA-SILVA, R. **Produção, purificação e caracterização de enzimas celulolíticas termoestáveis de *Hemicola sp.* 179-5 e aplicação destas enzimas**. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

DIAS, Lídia Manfrin *et al.* Biomass sorghum as a novel substrate in solid-state fermentation for the production of hemicellulases and cellulases by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus*. **Journal of applied microbiology**, v. 124, n. 3, p. 708-718, 2018.

DOS SANTOS, Bruna Silveira Lamanes dos *et al.* Thermotolerant and mesophylic fungi from sugarcane bagasse and their prospection for biomass-degrading enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 903-910, 2015.

DOS SANTOS, Beatriz Vieira *et al.* Use of an (Hemi) Cellulolytic Enzymatic Extract Produced by *Aspergilli* Species Consortium in the Saccharification of Biomass Sorghum. **Applied biochemistry and biotechnology**, p. 1-12, 2019.

EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. Manual de cultivo do hiratake e shimeji (*Pleurotus spp.*). **UNESP/FEPAF, Botucatu, S. Paulo, Brasil**, 1997.

FENG, Xin Mei *et al.* *Rhizopus oligosporus* and yeast co-cultivation during barley tempoh fermentation—nutritional impact and real-time PCR quantification of fungal growth dynamics. **Food microbiology**, v. 24, n. 4, p. 393-402, 2007.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOMES, Arthur Filipe Sousa *et al.* Substrate and temperature effect on xylanase production by *Aspergillus fumigatus* using low cost agricultural wastes. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 4, 2016.

GUEVARA, Claudia; ZAMBRANO, María Mercedes. Sugarcane cellulose utilization by a defined microbial consortium. **FEMS microbiology letters**, v. 255, n. 1, p. 52-58, 2006.

HAN, YeJun; CHEN, HongZhang. Synergism between corn stover protein and cellulase. **Enzyme and microbial technology**, v. 41, n. 5, p. 638-645, 2007.

KARAGÖZ, P. *et al.* Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and co-fermentation. **Bioresource technology**, v. 104, p. 349-357, 2012.

KIM, Eun Sil *et al.* Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1342-1353, 2009.

KHALIL, Md Ibrahim *et al.* Production of cellulase by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* in solid state fermentation of lignocellulosic biomass. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 35, n. 4, p. 333–341, ago. 2011.

LEITE, S.R.L. **Produção, propriedades e purificação de β -glicosidase dos microorganismos *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus aurantiacus*: Comparação das características térmicas das duas enzimas brutas.** Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências – Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2004.

LIN, Hui *et al.* Artificial construction and characterization of a fungal consortium that produces cellulolytic enzyme system with strong wheat straw saccharification. **Bioresource technology**, v. 102, n. 22, p. 10569-10576, 2011.

LUZ, José Maria Rodrigues da *et al.* Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1508-1515, 2012.

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORETTI, Marcia *et al.* Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1062-1071, 2012.

PETROU, E. C.; PAPPIS, C. P. Biofuels: a survey on pros and cons. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 2, p. 1055-1066, 2009.

RANI, Vijaya *et al.* Beta-glucosidase: key enzyme in determining efficiency of cellulase and biomass hydrolysis. **J Bioprocess Biotech**, v. 5, n. 197, p. 2, 2014.

RODRIGUES, Patrisia de Oliveira. *et al.* Synergistic action of an *Aspergillus* (hemi-) cellulolytic consortium on sugarcane bagasse saccharification. **Industrial crops and products**, v. 109, p. 173-181, 2017.

RODRIGUES, Patrisia de Oliveira *et al.* Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. **Renewable Energy**, v. 145, p. 2683-2693, 2020.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, Ursula Fabiola *et al.* Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.

SARRY, J. E.; GÜNATA, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. **Food Chemistry**, Oxford, v. 87, n. 4, p. 509-521, 2004.

SINGHANIA, R. R. *et al.* Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SOWMYA, H. V. *et al.* Polyethylene degradation by fungal consortium. **International Journal of Environmental Research**, v. 9, n. 3, p. 823-830, 2015.

TOQUERO, Cristina; BOLADO, Silvia. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. **Bioresource technology**, v. 157, p. 68-76, 2014.

TRAVAINI, Rodolfo *et al.* Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. **Bioresource technology**, v. 133, p. 332-339, 2013.

WATSON, Donna L.; WILSON, David B.; WALKER, Larry P. Synergism in binary mixtures of *Thermobifida fusca* cellulases Cel6B, Cel9A, and Cel5A on BMCC and Avicel. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 97-111, 2002.

ZAMORA ZAMORA, Hernán Darío. **Produção simultânea de hemi(celulases) e açúcares redutores por *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos de *Alstroemeria sp.*** 2017. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biocombustíveis) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.