



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO UTILIZANDO
FUNGOS FILAMENTOSOS AMAZÔNICOS, VISANDO APLICAÇÃO
NO PRÉ- TRATAMENTO BIOLÓGICO DE BIOMASSAS VEGETAIS
LIGNOCELULÓSICAS**

Manaus - AM

2023

Jéssica Batista de Oliveira

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO UTILIZANDO
FUNGOS FILAMENTOSOS AMAZÔNICOS, VISANDO APLICAÇÃO
NO PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO DE BIOMASSAS VEGETAIS
LIGNOCELULÓSICAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC da Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Agroflorestral.

Manaus – AM

2023

Desenvolvimento de bioprocesso utilizando fungos filamentosos amazônicos, visando aplicação no pré-tratamento biológico de biomassas vegetais lignocelulósicas

Jéssica Batista de Oliveira

jessicabatista15@gmail.com

Orientadora

Dra. Ceci Sales da Gama Campos

Coorientadora

Dra. Pamella Suely Santa Rosa Pimentel

Unidades executoras

Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Prazo de execução

24 meses

Fonte financiadora

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

FAPEAM - Fundação de Amparo à Pesquisa no Amazonas

Manaus - AM

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Oliveira, Jéssica Batista de
O48d Desenvolvimento de bioprocesso utilizando fungos filamentosos amazônicos, visando aplicação no pré-tratamento biológico de biomassas vegetais lignocelulósicas / Jéssica Batista de Oliveira . 2023
107 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Ceci Sales da Gama Campos
Coorientadora: Pamella Suely Santa Rosa Pimentel
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Bprocesso. 2. Fermentação sólida. 3. Fungos amazônicos. 4. Enzimas lignocelulolíticas. 5. Hidrólise enzimática. I. Campos, Ceci Sales da Gama. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

À Deus, por estar presente em todos os momentos e me dar forças para continuar.

À minha mãezinha pelo amor, paciência e educação que me foi dada.

À minha irmãzinha por cada gesto de amor que melhorava meu dia.

Ao meu pai do coração pela dedicação e paciência.

Ao meu esposo por ser ombro amigo, porto seguro, por seu apoio, compreensão e amor durante o desenvolvimento dessa dissertação.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por todas as graças alcançadas, pela sua compaixão que nos cerca diariamente.

Agradeço também as amigas de infância (Amanda, Dayane, Ketlen, Mikaelly, Thaís) que estiveram presente em todos os momentos importantes, apoiando e incentivando cada nova decisão tomada. Obrigada por esses quase 20 anos de amizade.

À minha orientadora, Dra. Ceci Sales Campos, pela oportunidade, orientação e suporte.

À minha coorientadora, Dra. Pamella Suelly Santa Rosa Pimentel, pela paciência, ensinamentos, sugestões e confiança em mim depositada.

Aos professores da pós graduação que contribuíram com seus conhecimentos para que eu pudesse desenvolver este projeto.

À professora Dra. Maria Francisca Simas Teixeira pela gentileza, ensinamento e suporte em algumas etapas deste trabalho.

Ao Professor Dr. José Renato Pereira Cavallazzi pelo direcionamento em algumas etapas deste trabalho.

Ao programa Mulheres e Meninas na Ciência pela oportunidade. Agradeço também à FAPEAM que por meio do programa Mulheres e Meninas na Ciência viabilizou financeiramente o desenvolvimento desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento da pesquisa por meio da bolsa de estudo de mestrado recebida.

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), em especial ao Laboratório de Microbiologia Industrial e Fermentação pelo espaço concedido.

Ao Laboratório da empresa Amazonzyme pelo espaço concedido e pelos momentos de descontração.

Aos colegas de laboratório pelos momentos divertidos, pelos desabafos, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados: Adrya Cordeiro, Karoline Araújo, Matheus Lôbo, Samanta Souza e Suelen Dias. Meu muito obrigada à vocês por muitas vezes tornarem esse processo mais leve e divertido.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em especial ao Laboratório de Cultivo de Fungos Cosméticos pelo suporte e espaço concedido. À equipe do laboratório: Jocélia, Danielle, Lorena e em especial à Giovanna, Vitor, Larissa Batista, Alderona, a Dra. Larissa Chevreuil e ao Dr. Sérgio Dantas por todo apoio, ensinamento e dedicação em me

auxiliar no desenvolvimento de parte do trabalho.

Agradeço também ao Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos da Universidade do Estado do Amazonas (CMABio-UEA) por disponibilizar a infraestrutura de microscopia necessária para a execução de parte desse trabalho.

Agradeço também à CAPES e FAPEAM por disponibilizarem recursos para a execução desse trabalho.

Ao Samuel, técnico do laboratório de química, por toda ajuda com os perrengues do dia a dia.

Ao Alexandre Barai e ao Diego pela ajuda com o uso da Mufla, me salvaram muitas vezes. Gratidão.

À Dona Elza, Carmem e Patrícia por todas as vezes que estenderam a mão e me acudiram em meio ao desespero com o uso da estufa.

À todos que de alguma forma contribuíram para execução desse trabalho, gratidão!

“Que as dificuldades encontradas pelo caminho jamais fragilizem a força que habita nossa alma”

Nicole Miranda

RESUMO

Diversos microrganismos são conhecidos como bons produtores de enzimas com a capacidade de hidrolisar a biomassa vegetal. Fungos do Filo basidiomicetos como o fungo *Trametes sp.* e fungos do Filo ascomicetos como *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* são tidos na literatura como bons produtores de enzimas lignocelulolíticas. Essas enzimas possuem grande interesse industrial, tendo em vista que podem ser empregadas nos mais diversos processos. Logo, o objetivo deste trabalho foi realizar pré-tratamento do resíduo do cultivo de milho (palha) utilizando fungos amazônicos, para aumento da eficiência hidrolítica. O resíduo *in natura* e após o pré-tratamento foi caracterizado quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina, bem como avaliação de modificações estruturais após o pré-tratamento. Foi determinada a presença das enzimas celulasas, hemicelulasas (xilanases) e ligninases (lacases, lignina peroxidases e manganês peroxidases) em cada pré-tratamento. A melhor atividade de celulasas detectada foi a de Fpase com uma atividade de 6,6 U/mg após 5 dias de fermentação utilizando o co-cultivo de *Aspergillus oryzae* mais *Trametes versicolor*. Já a melhor produção de xilanase apresentou uma atividade de 1,74 U/mg utilizando o mono cultivo de *Penicillium citrinum* e a melhor produção de ligninases foi a de Lacases com uma atividade de 29,4 U/mg utilizando o fungo *Trametes versicolor* em mono cultivo. Quanto ao teor de lignina, o cultivo que apresentou melhor remoção deste componente foi os mono cultivos de *Trametes versicolor* e *Aspergillus oryzae*, com remoção de 36 e 22%, respectivamente. Em contra partida o cultivo que apresentou melhor modificação na estrutura da parede celular da palha de milho foram os co-cultivos contendo *Penicillium citrinum* mais *Trametes versicolor* e o co-cultivo onde há a presença dos três fungos (*Aspergillus oryzae*, *Penicillium citrinum* e *Trametes versicolor*). De forma geral, o consórcio microbiano mostrou resultados promissores para agregar valor aos resíduos provenientes da agroindústria. O resíduo *in natura* e após o pré-tratamento biológico com os fungos *A. oryzae*, *P. citrinum* e *T. versicolor* em mono e co-cultivo foram avaliados quanto a eficiência hidrolítica, apresentando 7,3% de eficiência hidrolítica na biomassa *in natura* e 90% de eficiência hidrolítica após pré-tratamento com *T. versicolor* em monocultivo, demonstrando que o pré-tratamento biológico foi capaz converter os açúcares presente na palha de milho, sendo uma etapa fundamental para o processo de sacarificação da biomassa.

Palavras-chave: Fungos filamentosos, Basidiomicetos, Ascomicetos, Biomassa vegetal, Celulasas, Ligninases.

ABSTRACT

Several microorganisms are known as good producers of enzymes with the ability to hydrolyze plant biomass. Fungi of the phylum Basidiomycetes such as *Trametes sp.* are considered to be excellent producers of ligninolytic enzymes and fungi of the phylum Ascomycetes such as *Aspergillus sp.* and *Penicillium sp.* are considered in the literature to be good producers of cellulolytic enzymes. These enzymes are of great industrial interest as they can be used in a wide variety of processes. Therefore, the aim of this study was to pre-treat corn crop residue (straw) using Amazonian fungi in order to increase hydrolytic efficiency. The residue in natura and after pre-treatment was characterized in terms of cellulose, hemicellulose and lignin content, as well as assessing structural changes after pre-treatment. The presence of the enzymes cellulases, hemicellulases (xylanases) and ligninases (lacases, lignin peroxidases and manganese peroxidases) was determined in each pre-treatment. The best cellulase activity detected was that of Fpase with an activity of 6.6 U/mg after 5 days of fermentation using the co-cultivation of *Aspergillus oryzae* plus *Trametes versicolor*. The best xylanase production showed an activity of 1.74 U/mg using the mono-culture of *Penicillium citrinum* and the best ligninase production was lacases with an activity of 29.4 U/mg using the fungus *Trametes versicolor* in mono-culture. In terms of lignin content, the cultures that showed the best removal of this component were the mono-cultures of *Trametes versicolor* and *Aspergillus oryzae*, with 36% and 22% removal, respectively. On the other hand, the cultures that showed the best changes in the structure of the corn straw cell wall were the co-cultures containing *Penicillium citrinum* plus *Trametes versicolor* and the co-culture where all three fungi were present (*Aspergillus oryzae*, *Penicillium citrinum* and *Trametes versicolor*). In general, the microbial consortium showed promising results for adding value to waste from the agro-industry. The waste in natura and after biological pre-treatment with the fungi *A. oryzae*, *P. citrinum* and *T. versicolor* in mono and co-cultivation were evaluated for hydrolytic efficiency, showing 7.3% hydrolytic efficiency in the biomass in natura and 90% hydrolytic efficiency after pre-treatment with *T. versicolor* in mono and co-cultivation. *T. versicolor* in monoculture, demonstrating that the biological pre-treatment was able to convert the sugars present in the corn straw, which is a fundamental stage in the biomass saccharification process.

Keywords: Filamentous fungi, basidiomycetes, ascomycetes, plant biomass, cellulases, ligninases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema da estrutura lignocelulósica da biomassa vegetal	20
Figura 2 – Esquema representativo dos componentes presentes na biomassa lignocelulósica	21
Figura 3 – Produção de milho nas cinco regiões do Brasil no ano de 2022	22
Figura 4 – Esquema da estrutura de celulose	24
Figura 5 – Esquema da região cristalina e amorfa presente na celulose	24
Figura 6 – Esquema da estrutura de hemicelulose	25
Figura 7 – Estrutura do polímero de Lignina	26
Figura 8 - Estrutura química dos principais precursores da molécula de lignina	26
Figura 9 – Mecanismo de ação das celulases	28
Figura 10 – Atuação das enzimas hemicelulolíticas	29
Figura 11 – Ciclo catalítico da oxidação realizada por lacase	30
Figura 12 – Ciclo catalítico da lignina peroxidase	30
Figura 13 – Ciclo catalítico da manganês peroxidase	31
Figura 14 – Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica	36
Figura 15 – Preservação dos fungos utilizados	42
Figura 16 – Padronização do inóculo por meio da contagem de esporos em câmara de Neubauer dos fungos <i>A. oryzae</i> e <i>P. citrinum</i>	43
Figura 17 – Padronização do inóculo de <i>T. versicolor</i>	44
Figura 18 – Determinação da umidade da palha de milho em analisador de umidade infravermelho	47

Figura 19 – Preparo da palha de milho para utilização na FES	48
Figura 20 – Fermentação em estado sólido e crescimento após 120h	49
Figura 21 – Características morfológicas dos fungos <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Penicillium citrinum</i> e <i>Trametes versicolor</i>	55
Figura 22 – Co-cultivo fúngico em placa de Petri contendo meio malte	56
Figura 23 – Curvas de calibração	59
Figura 24 – Produção enzimática de endoglucanase em palha de milho em diferentes tipos de cultivo	60
Figura 25 - Produção enzimática de exoglucanase em casca de milho em cultivo singular e co-cultivo	61
Figura 26 – Produção enzimática de betaglucosidade em fermentação em estado sólido com diferentes tipos de cultivo	63
Figura 27 – Atividade de Fpases (celulases totais) sobre papel de filtro a partir da fermentação em estado sólido de diferentes fungos em palha de milho	64
Figura 28 – Atividade enzimática e atividade específica da xilanase em fermentação em estado sólido em cultivo singular e co-cultivo	65
Figura 29 – Atividades específicas das celulases nas diferentes fermentações em estado sólido em palha de milho	66
Figura 30 – Atividade enzimática de lacases a partir da fermentação em estado sólido de diferentes fungos em palha de milho	68
Figura 31 – Atividade de manganês peroxidase (MnP) a partir da fermentação em estado sólido de diferentes fungos em palha de milho	69
Figura 32 – Atividade de lignina peroxidase a partir da fermentação em estado sólido de diferentes fungos em palha de milho	70
Figura 33 - Atividade específica ligninolítica nos diferentes tipos de cultivo	71

Figura 34 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da palha de milho <i>in natura</i> e nos diferentes cultivos do pré-tratamento biológico no aumento de 1000x	74
Figura 35 – Eficiência hidrolítica após o pré-tratamento biológico da biomassa em mono e co-cultivo com diferentes fungos utilizando o blend AMZ2	75
Figura 36 –Eficiência hidrolítica após o pré-tratamento biológico da biomassa em mono e co-cultivo com diferentes fungos utilizando o blend Celic Cetec2	76
Figura 37 – Gráfico de Pareto com os efeitos estimados	78
Figura 38 – Superfície de resposta para eficiência hidrolítica (%) da quantidade de biomassa g/L e quantidade de enzima FPU/g	79
Figura 39 – Superfície de contorno para eficiência hidrolítica (%) da quantidade de biomassa g/L e quantidade de enzima FPU/g	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da biomassa lignocelulósica de diferentes fontes de biomassas vegetais	21
Tabela 2 – Classificação dos tipos de degradação realizada por fungos	33
Tabela 3 – Aplicações industriais de lacases	38
Tabela 4 – Aplicações industriais das celulasas e xilanases	39
Tabela 5 –Tabela de níveis do DCCR para otimização do carregamento de biomassa e quantidade de enzima	54
Tabela 6 –Matriz do DCCR com os valores codificados e os valores reais	54
Tabela 7 – Componentes da palha de milho <i>in natura</i> e após pré-tratamento biológico	58
Tabela 8 – Matriz com variável de resposta obtida	77
Tabela 9 – ANOVA do DCCR realizado	78
Tabela 10 – Valores de predição feitos pela função Desirability	80
Tabela 11 – Valores codificados e valores reais preditos	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

ABTS: (ácido 2,2'-azino – bis (ácido 3-etilbenzoatiazolina-6-sulfônico))

AFEX – Ammonia fiber expansion (Explosão de fibra com amônia)

BDA: batata dextrose ágar

BG: betaglucosidase

B.O.D: Biochemical oxygen demand (Demanda biológica de oxigênio)

BSA: bovine serum albumin (albumina de soro bovino)

C: carbono

$C_6H_{10}O_5$: fórmula química da celulose

$CaCl_2$: cloreto de cálcio

CBH: celobiohidrolase

CMC: carboximetilcelulose

CMCASE: atividade enzimática em CMC

C/N: relação carbono:nitrogênio

CO_2 : dióxido de carbono

DCCR: delineamento composto central rotacional

DNS: ácido 3,5-Dinitrosalicílico

EC: enzyme comission

EG: endoglucanase

EH: Eficiência hidrolítica

FES: fermentação em estado sólido

Fe: Ferro

$FeSO_4$: Sulfato de ferro

FPase: filter paper-ase (celulases totais)

FPU: unidade de atividade de fpase

GOD: glicose oxidase

H_2O_2 : peróxido de hidrogênio

IUBMB: international union of biochemistry and molecular biology

U: unidade

KH_2PO_4 : fosfato monopotássico

Kv: kilovolt

LiP: lignina peroxidase

MEV: microscopia eletrônica de varredura

Mn: manganês

MnP: manganês peroxidase

MnSO_4 : sulfato de manganês

MgSO_4 : sulfato de magnésio

NaOH: hidróxido de sódio

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: sulfato de amônia

RCM: resíduo do cultivo de milho

1G: etanol de primeira geração

2G: etanol de segunda geração

LCB: lignocellulosic biomass (biomassa lignocelulósica)

ZnSO_4 : sulfato de zinco

Sumário

1	INTRODUÇÃO	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1	Biomassa vegetal	20
2.2	Constituição de biomassas lignocelulósicas recalcitrantes	20
2.3	Cultivo de milho no Brasil.....	23
2.4	Celulose	25
2.5	Hemicelulose	26
2.6	Lignina	27
2.7	Enzimas lignocelulolíticas e suas aplicações industriais	28
2.7.1	Celulases	32
2.7.2	Hemicelulases.....	33
2.7.3	Ligninases.....	34
2.8	Microrganismos lignocelulolíticos	36
2.9	Fermentação em Estado Sólido (FES).....	38
2.10	Produção de Etanol (Primeira e Segunda Geração)	39
2.11	Pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas	41
2.11.1	Pré-tratamento químico.....	42
2.11.2	Pré-tratamento físico.....	42
2.11.3	Pré-tratamento físico-químico.....	43
2.11.4	Pré-tratamento Biológico.....	43
3	JUSTIFICATIVA	44
4	OBJETIVOS	45
4.2	Específicos.....	45
5	MATERIAL E MÉTODOS	46
5.1	Microrganismos.....	46
5.2	Padronização do inóculo.....	47
5.3	Determinação da composição da biomassa <i>in natura</i>	48
5.4	Etapas do pré-tratamento biológico da casca de milho.....	50
5.4.1	Determinação da umidade na FES	50
5.4.2	Fermentação em Estado Sólido (FES).....	51
5.5	Determinação das atividades de ligninases	53
5.5.1	Lacase	53
5.5.2	Manganês peroxidases	54
5.6	Determinação das atividades celulolíticas e xilanolíticas.....	54
5.6.2	Exoglucanase (Avicelase)	55
5.6.3	β -glucosidase	55
5.6.5	Xilanases.....	56
5.7	Quantificação de proteínas totais	56
5.8	Hidrólise enzimática	57
5.9	Determinação do carregamento sólido/FPU para hidrólise da palha de	

milho pré- tratada biologicamente.....	58
5.10 Análises estatísticas	59
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
6.1 Características Morfológicas dos fungos utilizados.....	60
6.2 Interação entre os fungos em placa	61
6.3 Determinação da composição da biomassa.....	62
6.4 Enzimas produzidas durante a Fermentação em estado sólido em mono e co-cultivo dos fungos.....	64
6.5 Determinação das atividades celulolíticas.....	66
6.6 Atividades ligninolíticas.....	74
6.7 Análise Morfológica da casca de milho in natura e após a fermentação em estado sólido por MEV.....	80
6.8 Eficiência hidrolítica (%)	83
6.9 Determinação do carregamento sólido (palha de milho) / Enzima.....	85
7 CONCLUSÃO	89
7.1 PERSPECTIVAS.....	90
REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

A demanda mundial por energia têm crescido nos últimos anos e com isso espera-se que até 2040 tenha um aumento de 28%, o que seria aproximadamente 739 quatrilhões de Btus (CAPUANO, 2018). Com isso, têm se discutido com frequência a respeito do uso de recursos fósseis (petróleo, gás e carvão) para a produção de energia e combustíveis, tendo em vista o grande impacto ambiental que seu uso causa ao planeta e o fato de não serem recursos renováveis. Nesse contexto, a produção de etanol através da cana-de-açúcar surgiu como alternativa para a produção de biocombustíveis e energia limpa. Países como os Estados Unidos e o Brasil chegaram a produzir em 2019 15,8 bilhões de galões e 8,57 bilhões de galões, obtidos principalmente do milho e da cana-de-açúcar, respectivamente (KARP *et al.*, 2021).

Diferente do etanol de primeira geração que são feitos de matérias-primas ricas em amido e açúcar (por exemplo, cana-de-açúcar e milho), o etanol de segunda geração também chamado de etanol celulósico ou combustível avançado, é obtido a partir de biomassas vegetais ricas em celulose, que passam por um processo de sacarificação por via enzimática antes da fermentação (PISHVAEE *et al.*, 2021). A utilização do etanol celulósico emergiu com o objetivo de aumentar a produção de biocombustíveis sem gerar aumento da área cultivada, sem competir com a produção de alimentos, e diminuir os danos causados ao meio ambiente, apresentando assim vantagens econômicas e ambientais, utilizando nesse processo resíduos agroindustriais, agrofloretais, resíduos municipais, etc, além de ser uma fonte renovável, sustentável e de baixo custo (MONTES, 2017).

Os resíduos agrícolas (bagaço de cana, farelo de trigo, casca de arroz, casca de mandioca, palha de milho, entre outros), são resíduos ricos em celulose (40 a 50%), hemicelulose (20 a 30%) e lignina (15 a 20%), que são unidos por ligações intermoleculares. A celulose e a hemicelulose são polissacarídeos de grande interesse industrial, com produção anual de bilhões de toneladas de celulose, que podem ser convertidas em energia e outros subprodutos (GUPTA *et al.*, 2016; MANKAR *et al.*, 2021). Contudo, a conversão dessa biomassa em glicose possui alguns gargalos que tornam o processo oneroso, sendo necessário o pré-tratamento deste resíduo a fim de melhorar o seu aproveitamento (OGEDA e PETRI, 2010).

Nesse contexto, o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é uma etapa essencial na bioconversão da celulose em açúcares fermentáveis, pois atua sobre a parede celular rompendo-a e assim reduzindo a cristalinidade da celulose e, conseqüentemente, removendo

ou reduzindo a lignina para que facilite a ação das enzimas lignocelulósicas aumentando a eficiência da hidrólise, liberando assim, os açúcares necessários para a fermentação e produção do etanol de segunda geração ou outros subprodutos. Adicionalmente, o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica aumenta a recuperação de açúcares e diminui a liberação de substâncias tóxicas com poder inibitório ao metabolismo microbiano (MANKAR, *et al.*, 2021).

Assim, diferentes métodos de pré-tratamento, que sejam eficientes, de baixo custo e sustentáveis têm sido buscados exaustivamente, tendo em vista que a parede celular vegetal é rígida e complexa, altamente resistente à degradação por microrganismos, dificultando a ruptura das ligações químicas para a conversão em açúcares fermentecíveis e outros componentes.

O pré-tratamento biológico tem sido visto como um grande aliado nessa busca, pois evita a formação de produtos inibidores na etapa de conversão, além de não necessitar de produtos químicos, apresentar bom custo benefício e ser realizado em condições brandas de pressão e temperatura (KUMAR *et al.*, 2020). Muitos microrganismos são conhecidos como bons produtores de enzimas capazes de hidrolisar a biomassa vegetal. Dentre esses os fungos filamentosos têm sido destaque na indústria de fermentação devido à capacidade e facilidade de excretar enzimas hidrolíticas no meio de crescimento, além de apresentarem bom desempenho, alto potencial hidrolítico e baixo custo quando comparados com outros sistemas, sendo o *Trichoderma reesei* a principal fonte comercial de celulasas e xilanases (MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021).

A maioria das enzimas utilizadas nas indústrias brasileiras são produzidas fora do país. Contudo, a Amazônia possui grande vantagem no processo de desenvolvimento de bioprocessos, tendo em vista sua rica biodiversidade microbiana que pode ser detentora de enzimas com grande poder catalítico. O desenvolvimento de bioprocessos eficientes com fungos amazônicos pode trazer um grande potencial inovador para o Brasil, além de diminuir os custos de produção. Portanto, a busca por novas formas de pré-tratamento que sejam eficazes na “quebra” da parede celular dessas biomassas, tem sido um grande desafio para a indústria que almeja a alta eficiência hidrolítica de forma economicamente viável.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar pré-tratamento biológico do resíduo do cultivo de milho (palha) utilizando fungos amazônicos, visando aumentar a eficiência na etapa de hidrólise enzimática.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biomassa vegetal

Os materiais lignocelulósicos, também chamados de biomassa vegetal, são os componentes mais abundantes do planeta, participando de 50% da biomassa terrestre. Assim, a biomassa lignocelulósica é uma fonte abundante de energia renovável, também conhecida como energia verde, oriunda de resíduo agrícola como o cultivo de arroz, cana-de-açúcar, milho, soja, entre outros, de resíduo agroflorestral como a madeira e de rejeitos urbanos ou industriais (PEREIRA JR *et al.*, 2008). Estudos que visem o melhoramento do rendimento na produção de bioetanol têm despertado grande interesse na biotecnologia moderna mundial, com o intuito no desenvolvimento de biorrefinarias sustentáveis e como alternativa energética de baixo custo (KUMAR, *et al.*, 2020).

O Brasil possui grande vantagem quando se fala em biomassa lignocelulósica, devido à sua vasta biodiversidade vegetal, sendo um dos maiores produtores de biomassa lignocelulósica provenientes de atividades agrícolas bem estabelecidas, entretanto, há certa limitação na produção de bioetanol através dos processos tradicionais de moagem, devido ao baixo rendimento obtido (RODRIGUES *et al.*, 2016). Logo, as pesquisas voltadas para o desenvolvimento de bioprocessos, que visem a conversão dessa biomassa em produtos industriais e que aumente o rendimento na produção de bioetanol, podem trazer grande avanço tecnológico - inovador para o país (RODRIGUES *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2023) com o intuito no desenvolvimento de biorrefinarias sustentáveis e como alternativa energética de baixo custo.

2.2 Constituição de biomassas lignocelulósicas recalcitrantes

A biomassa lignocelulósica, também chamada de biomassa vegetal, possui uma estrutura complexa, sendo composta de 3 frações poliméricas principais, correspondendo à celulose, hemicelulose e lignina, unidas covalentemente formando um complexo que a torna resistente à ataques biológicos (figura 1), dificultando assim, o seu uso em processos industriais de larga escala (HIMMEL *et al.*, 2007).

O constituinte principal da biomassa vegetal é a celulose, compreendendo cerca de 40 a

50% da massa seca, sendo um homopolissacarídeo linear não ramificado com grande parte da sua estrutura cristalina insolúvel em água e resistente à despolimerização, seguida da hemicelulose, que compõe de 25 a 30%, é um heteropolissacarídeo ramificado composto por polissacarídeos de baixa massa molecular, e a lignina que corresponde de 15 a 20% da biomassa vegetal, uma molécula hidrofóbica, amorfa com estrutura tridimensional e bastante ramificada, como apresentado no esquema representativo na figura 2 (GALBE e WALLBERG, 2019; GUPTA *et al.*, 2016). É importante ressaltar que, a proporção de celulose, hemicelulose e lignina presente na biomassa vegetal difere de acordo com a fonte da matéria-prima e parte da planta utilizada (tabela 1) (KHAIRE *et al.*, 2021; RAMOS, 2003). Além disso, é importante salientar que algumas propriedades como a acessibilidade da celulose, as enzimas e microrganismos utilizados, e teor de lignina determinam a aplicabilidade da biomassa e sua digestibilidade (CHEN, 2014).

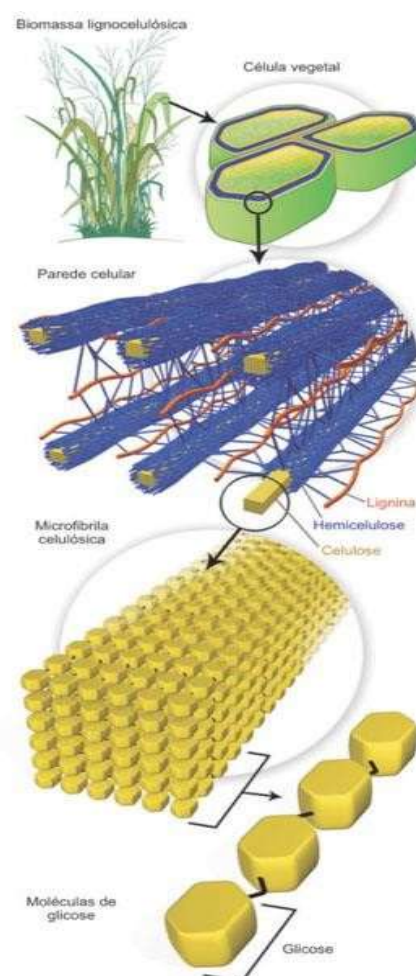
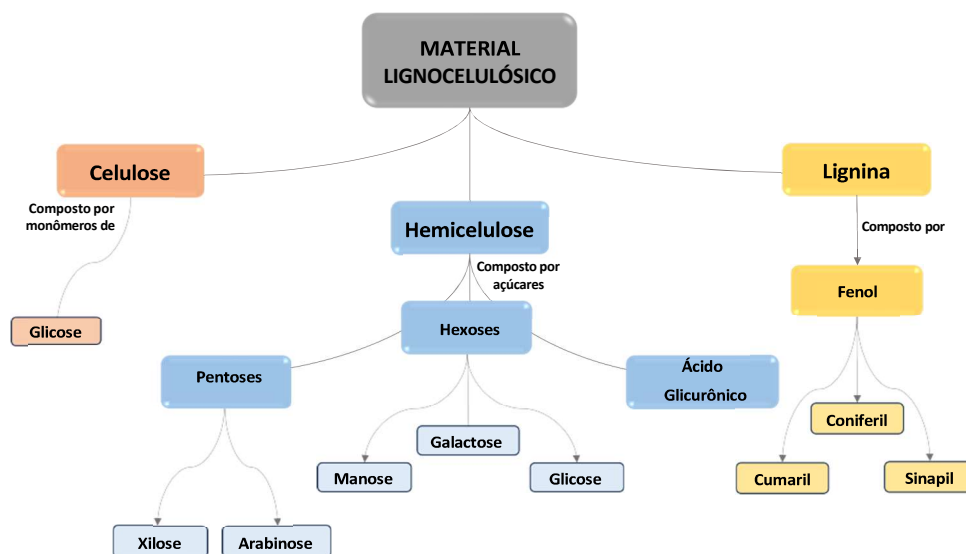


Figura 1: Esquema da estrutura lignocelulósica da biomassa vegetal

Fonte: Adaptado de Santos *et al.*, 2012.

Figura 2: Esquema representativo dos componentes presente na biomassa lignocelulósica

Fonte: Adaptado de Saldarriaga-Hernández *et al.*, 2020.

Tabela 1: Composição da biomassa lignocelulósica de diferentes fontes vegetais.

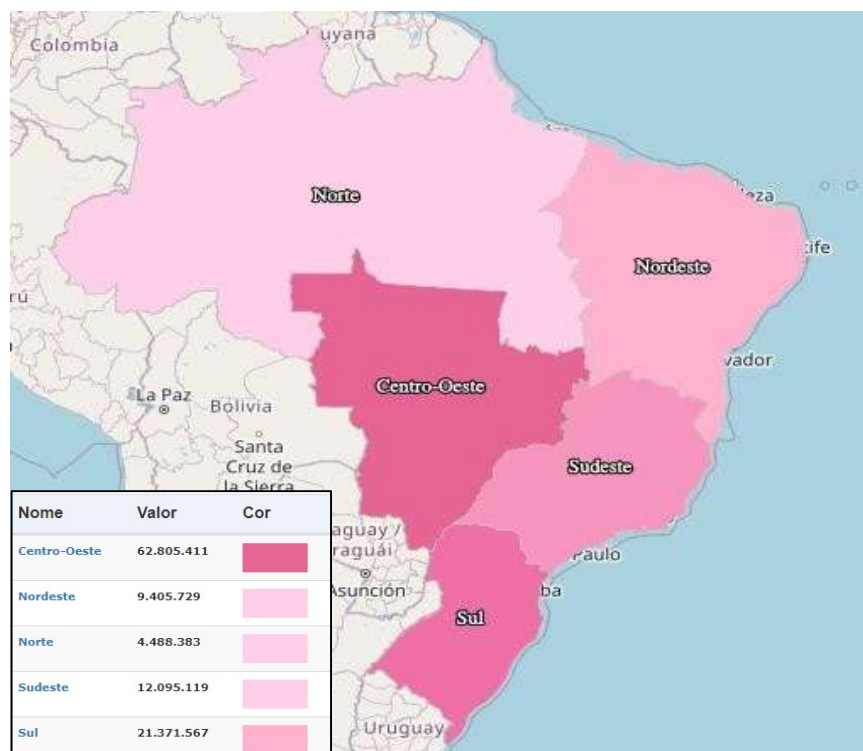
Tipo de LCB	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
Bambu	42	18	29	Ma <i>et al.</i> , 2020
Pontas de cana	43	27	17	Sindhu <i>et al.</i> , 2014
Bagaço de cana	39	22	19	Oliveira <i>et al.</i> , 2018
Palha de milho	38	23	20	Wan e Li, 2010
Casca de arroz	37	30	24	Kalita <i>et al.</i> , 2015
Palha de arroz	36	21	24	Imman <i>et al.</i> , 2015
Casca de coco	36	24	30	Oliveira <i>et al.</i> , 2018
Bagaço de caju	21	11	46	Oliveira <i>et al.</i> , 2018

Fonte: Mankar *et al.*, 2021(modificado)

2.3 Cultivo de milho no Brasil

O milho é um dos cereais mais produzidos no mundo e possui papel relevante no agronegócio brasileiro (Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil – CNA, 2023). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2018) o Brasil produziu cerca de 97,84 milhões de toneladas de milho em 2017, ocupando a terceira posição entre os países produtores de milho, ficando atrás apenas dos EUA e China. A produção de milho no país provém de várias regiões, seja de clima frio ou quente, sendo possível mais de um cultivo por ano chamado de 1ª e 2ª safra. Adicionalmente, com o desenvolvimento de novas tecnologias e processos de inovação, seu cultivo tem se expandido a cada ano juntamente com seu consumo, visto que há grande diversificação no seu uso e na sua lucratividade.

Segundo a Associação de Brasileira de Produtores de Milho – ABRAMILHO (2023) o etanol é uma das principais fontes de biocombustível no país, tendo o milho como uma das fontes mais promissoras para a sua produção. O Brasil conta com 18 usinas de etanol de milho, que juntas renderam em 2022/23 de 4,5 bilhões de litros de etanol, superando a produção de etanol de cana-de-açúcar. Estima-se que até 2030 o país atinja uma produção de 10 bilhões de litros de etanol (União Nacional do Etanol de Milho – UNEM, 2023). Esse aumento no setor possibilita o desenvolvimento de fontes de energia limpa e renovável como os biocombustíveis de segunda geração. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2023), as duas safras tiveram uma produção total superior a 100.000.000 de toneladas em 2022 (figura 3).

Figura 3: Produção de milho nas cinco regiões do Brasil no ano de 2022

Fonte: IBGE, 2023.

A região norte, em particular apresentou um desenvolvimento de 290%, a partir da década de 1980. Porém, quando comparada à outras regiões, é a região que menos produz, uma vez que a maior parte da produção é voltada para o consumo interno. A região centro-oeste a que detém a maior área cultivada de milho, seguida pela região Sul (ARTUZO et al., 2019). Estima-se que a cada 1 tonelada do grão produzida, são 2,3 toneladas de resíduos (KELLES e BISCARO, 2012). A casca/palha do milho é um importante subproduto para a indústria, não possuindo uma utilização definida, tornando-se um resíduo de grande valor agregado.

De acordo com o Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas - IDAM (2020), foram produzidos na safra de 2019/2020, 10,9 mil toneladas de milho em grão e 8,2 mil toneladas de milho verde, sendo os municípios de Nhamundá, Maués, Careiro da Várzea e Apuí os maiores produtores de milho verde. Os municípios de Boca do Acre, Humaitá e Manacapuru os maiores produtores de milho em grão, registrando um crescimento de 42% no ano de 2019, quando comparado ao ano anterior.

É importante ressaltar que os resíduos gerados do cultivo de milho servem de alimento para animais e insumos para a indústria, porém se descartados de maneira incorreta acabam trazendo danos ao meio ambiente. Parte desse resíduo é possível ser usado para produção de subprodutos de valor agregado como é o caso de açúcares fermentescíveis que podem ser

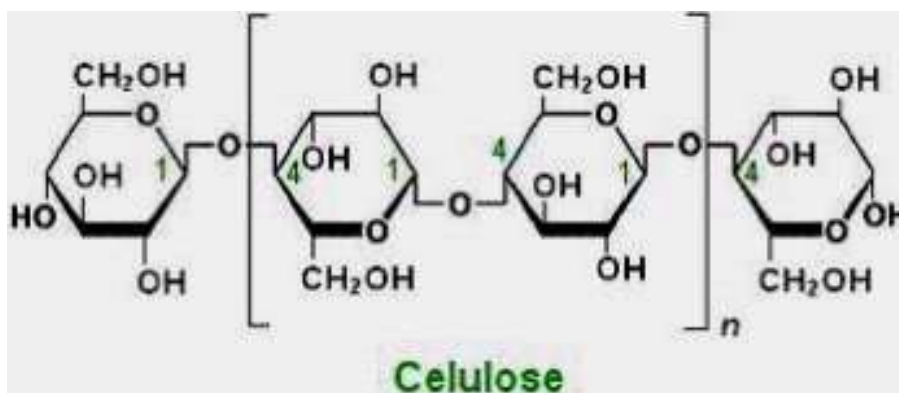
utilizados pela própria indústria, além de outros subprodutos, trazendo benefícios financeiros (EMBRAPA, 2019).

2.4 Celulose

A celulose, cuja fórmula química é $C_6H_{10}O_5$, é constituída por monômeros de glicose, unidos por ligações de hidrogênio com 10 a 15 mil unidades de glicose. Usualmente, é o homopolímero orgânico mais encontrado no mundo e tem como unidade de repetição a celobiose. Possui composição química simples com cadeias lineares de D-glicose unidas através de ligações β -1,4 e possui alto grau de polimerização, apresentado na figura 4 (SAJITH *et al.*, 2016).

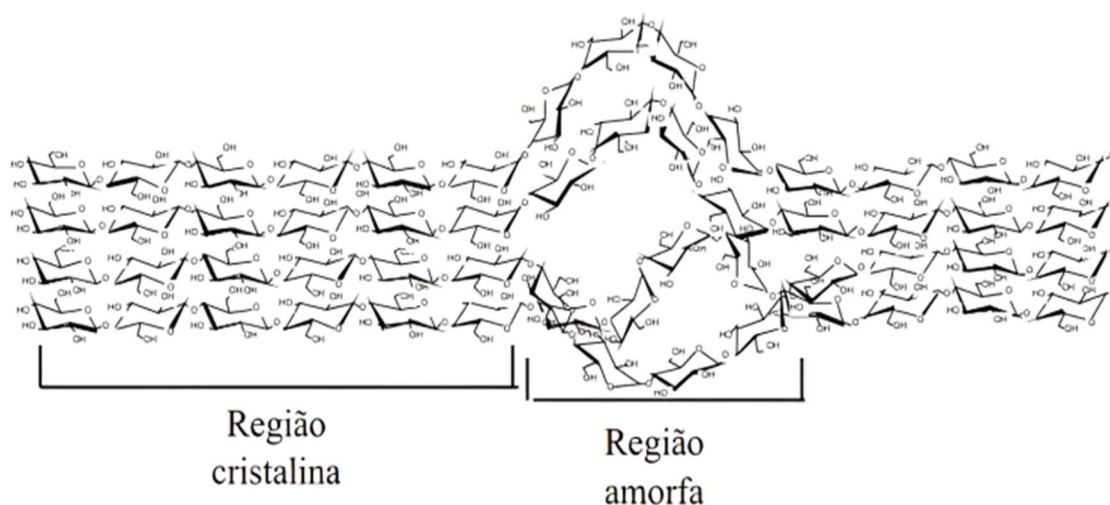
Essa macromolécula é constituída de regiões cristalinas e amorfas, sendo a forma cristalina mais ordenada e altamente resistente tornando-a insolúvel em água. Ao passo que as regiões amorfas são menos ordenadas e a sua presença na fibra de celulose faz com que ela seja susceptível à hidrólise (EICHHORN, 2011) (figura 5). Suas cadeias são unidas paralelamente em estruturas cristalinas chamadas de microfibrilas. Essas microfibrilas possuindo espessura média de 2 a 4 nm, são unidas por meio da hemicelulose. Sua unidade repetitiva é a celobiose, que são dímeros de glicose (BECKHAM, 2011). Devido à associação de diversos monômeros, obtém-se um material extremamente resistente à tensão e insolúvel em uma gama de solventes, o que o torna resistente à degradação microbiana (DING e HIMMEL, 2006).

Figura 4: Esquema da estrutura de celulose.



Fonte: Toda Matéria, 2023.

Figura 5: Esquema da região cristalina e amorfa presente na celulose.



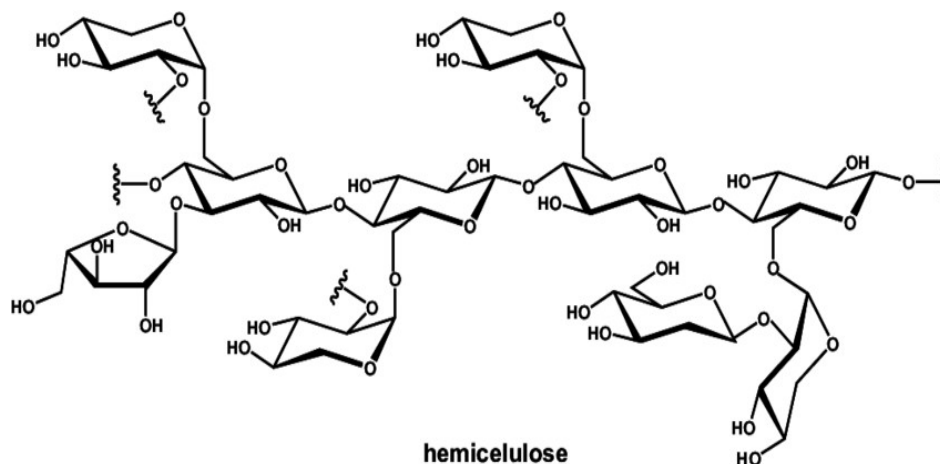
Fonte: Farinas, 2011.

2.5 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo complexo composto por D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metilglucurônico formadas por resíduos de pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, galactose e manose), ácidos urônicos e grupos acetilas (figura 6). Diferentemente da celulose apresenta maior susceptibilidade a hidrólise ácida (DONATE, 2014; SANTOS *et al.*, 2012).

Essa macromolécula é constituída de estruturas ramificadas e amorfas, associadas à celulose e à lignina, podendo ser classificada em cadeias não ramificadas, cadeias helicoidais, cadeias ramificadas e substâncias pécticas, com grau de polimerização de 500 a 3000 unidades monoméricas, sendo menor do que da celulose. É importante ressaltar que a xilana é o principal componente da cadeia hemicelulósica (PEREIRA Jr *et al.*, 2008).

Figura 6: Esquema da estrutura de hemicelulose



Fonte: Donate, 2014.

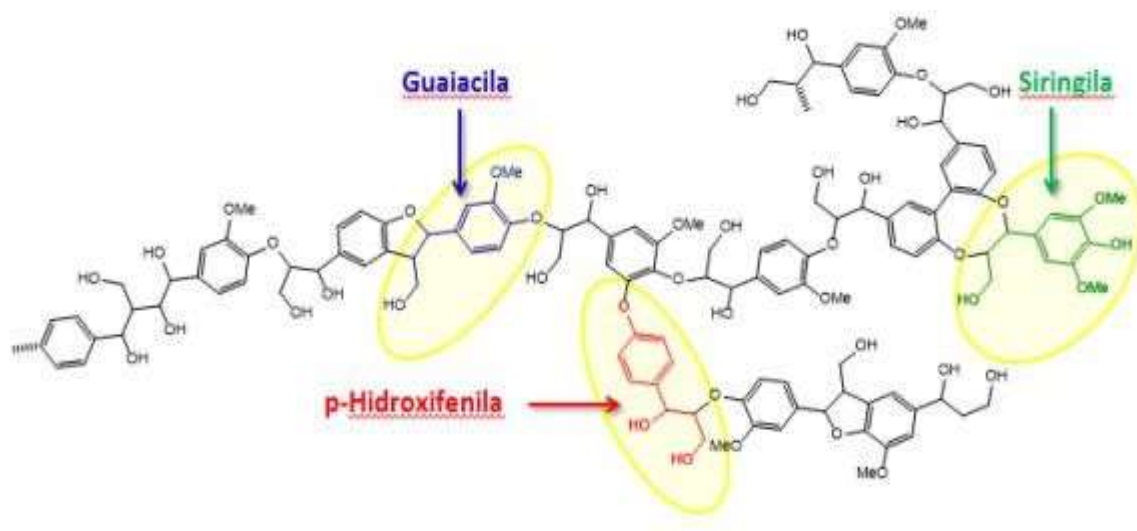
2.6 Lignina

As ligninas são redes poliméricas tridimensionais formadas por unidades de fenilpropano ligadas de forma não linear e aleatória, consistindo em um polímero aromático hidrofóbico, que se liga à substâncias de alto peso molecular por meio de ligações carbono-carbono ou ligações de éter (figura 7), é constituída por regiões amorfas e estruturas globulares (OGEDA e PETRI, 2010).

Essa macromolécula é composta por três álcoois aromáticos principais, o sinapílico, coniferílico e o p-cumarílico (figura 8) e, pode ser dividida em três tipos: de unidades de hidroxifenil lignina polimerizada por hidroxifenilpropano (H) derivada do álcool cumarílico, guaiacil lignina polimerizada por guaiacilpropano (G) derivado do álcool coniferílico e siringil lignina polimerizada por siringilpropano (S) derivado no álcool sinapílico (CHEN, 2014; SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ, et. al., 2020).

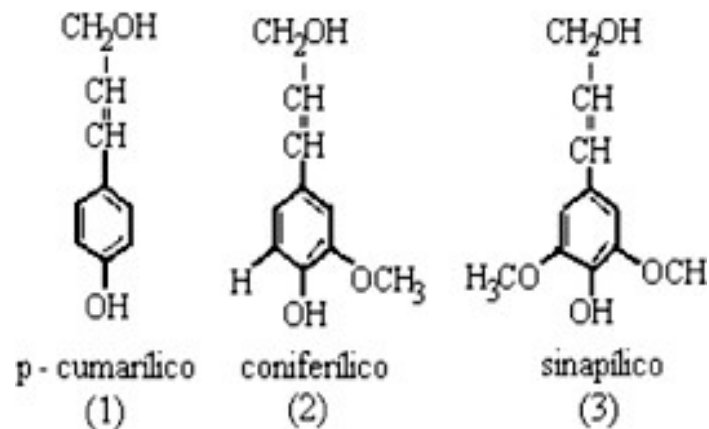
A lignina é o segundo polímero de maior quantidade presente na parede celular das plantas, conferindo rigidez, impermeabilidade e resistência à ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais. Adicionalmente, tem sido utilizada para produção de energia através da combustão ou na conversão para outros bioprodutos (WENG *et al.*, 2021).

Figura 7: Estrutura do polímero de lignina



Fonte: Oliveira, 2016.

Figura 8: Estrutura química dos principais precursores da molécula de lignina



Fonte: Saliba *et al.*, 2001.

2.7 Enzimas lignocelulolíticas e suas aplicações industriais

Durante a Segunda Guerra Mundial se observou que objetos que continham o algodão em sua composição como bolsas, fardas, etc., estavam se deteriorando rapidamente e isso chamou a atenção dos soldados. Foi então que o Dr. Elwyn T. Reese, juntamente com sua equipe, relataram a presença de fungos que eram capazes de excretar enzimas com a capacidade

de degradar o algodão (celulose). Essas enzimas, produzida por fungos, podem atuar diretamente sobre essas macromoléculas (celulose, hemicelulos e lignina) e ocasionarem a desestruturação da parede celular vegetal, aumentando sua porosidade e, conseqüentemente facilitando o processo de hidrólise da biomassa (AGUIAR e FERRAZ, 2011). Desse modo, muitas pesquisas foram e vêm sendo realizadas com o objetivo de se conhecer melhor a respeito dessas moléculas e elucidar seu funcionamento e seus benefícios para a sociedade (CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

Dentre as moléculas que atuam no processo de hidrólise da biomassa vegetal, as enzimas degradadoras de ligninas, principalmente lacases, têm despertado grande interesse industrial devido ao seu poder redox e seu uso como biobranqueador na indústria de polpa e celulose, além do seu emprego na indústria de biocombustível e na produção de alguns subprodutos da degradação da lignina (FARINAS, 2011; WENG *et al.*, 2021).

Nos últimos anos, as enzimas têm se destacado industrialmente, devido às suas funções catalíticas, podendo ser aplicadas desde a indústria alimentícia, farmacêutica, até a indústria de biocombustíveis com a capacidade de degradar uma variedade de substratos. As principais enzimas envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica são divididas em enzimas oxidativas (lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase) e em enzimas hidrolíticas (celulases e hemicelulases). As enzimas lignocelulolíticas são enzimas que possuem a capacidade de catalisar a degradação da biomassa lignocelulósica e convertê-la em glicose e xilose (AGUIAR e FERRAZ, 2011; CARVALHO, 2005).

As lacases apresentam ampla gama de especificidade de substratos e alta versatilidade, tornando-as assim interessantes para aplicação em diversos processos industriais, como indústria de papel e celulose, biorremediação, aplicações farmacêuticas, e têxteis, processamento de alimentos, indústria de cosméticos, biodegradação de compostos xenobióticos e biobranqueamento de corantes sintéticos (tabela 3) (SINGH e GUPTA, 2020).

Tabela 3: Aplicações industriais de lacases

Organismo	Aplicação	Referência
<i>Streptomyces cyaneus</i>	Descoloração e desintoxicação de corantes azo	Moya <i>et al.</i> , 2010
<i>Schizophyllum commune</i>	Descoloração das águas residuais descartadas da polpação à base de bagaço	Belsare e Prasad, 1988
<i>Trametes versicolor</i>	Degradação da lignocelulose em bioprocessos de decomposição da madeira	Oktem <i>et al.</i> , 2012
<i>Rhizoctonia praticola</i>	Remoção de composto fenólicos	Karam e Nicell, 1997
<i>Corioloopsis gallica</i>	Tratamento de águas residuais do tratamento de cerveja	Madhavi e Lele, 2009
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Degradação de lignina; unir os sistemas hidrolíticos e oxidativos; descarte manganês; redução do óxido de manganês	Henriksson <i>et al.</i> , 2000
<i>Trametes hirsuta</i>	Biossensor para monitorar lignina em águas residuais da indústria de celulose e papel	Shleev <i>et al.</i> , 2006
<i>Coriolus hirsutus</i>	Biossensor para determinação de compostos fenólicos de efluentes de fábricas de papel	Freire <i>et al.</i> , 2002
<i>Botrytis cinerea</i>	Processamento de comida	Li <i>et al.</i> , 1999
<i>Pleurotus eryngii</i>	Degradação de lignina e organopoluentes (PAHs) para aumentar o potencial de biorremediação	Gomez-Toribio <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus flavus</i>	Descoloração do corante verde malaquita	Ali <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus niger</i>	Biossensor para determinação de xenobióticos em esgoto	Timur <i>et al.</i> , 2004
<i>Bacillus licheniformis</i>	Descoloração de corantes sintéticos como antraquinona, azo e índigo	Lin <i>et al.</i> , 2010
<i>Bacillus tequilensis</i>	Bi branqueamento da polpa de madeira macia	Sondhi <i>et al.</i> , 2015

A lignina resultante da hidrólise da biomassa vem sendo utilizada como matéria prima na indústria para a produção de emulsificantes e vanilina, muito usada para aplicação em alimentos, perfumaria e na composição de produtos farmacêuticos, inseticidas, pesticidas, etc. A manganês peroxidase é empregada na indústria de papel e celulose para o branqueamento da polpa promovendo um alto nível de deslignificação e no tratamento de efluentes. Ela também pode ser utilizada na indústria têxtil na remoção do excesso de corantes

(RESENDE, 2017).

As celulasas e xilanases são usadas na indústria têxtil para dar melhor acabamento aos tecidos tornando-o macio e liso. Também são utilizadas na indústria de bebidas para produção de sucos de frutas e nos processos de vinificação. Na indústria animal são aplicadas para aumentar a digestibilidade das fibras da biomassa lignocelulósica e na conversão dos resíduos lignocelulósicos em glicose para a produção de biocombustíveis (tabela 4) (DAL MAGRO et al., 2018; SAJITH et al., 2016).

Tabela 4: Aplicações Industriais das celulasas e xilanases

Setor industrial	Enzima	Função	Referência
Têxtil	Celulasas (endoglucanases) ácidas e neutras	Biopulpação de jeans; biopolimento de fibras têxteis; melhoras da qualidade de tecidos; remoção do excesso de corantes dos tecidos; restauração do brilho e da cor	Kuhad <i>et al.</i> , 2011; Singh <i>et al.</i> , 2016
Polpa de celulose e papel	Celulasas (endoglucanases) xilanases	Biobranqueamento de polpas Kraft; destintamento enzimático; desidratação; biopolpação; melhoramento de drenagem em fábricas de papel	Singh <i>et al.</i> , 2016
Detergente	Celulasas alcalinas	Aditivos de detergentes - melhoramento da cor; Removem protuberâncias ásperas deixando o tecido mais suave e brilhoso	Kuhad <i>et al.</i> , 2011
Alimentos	Celulasas (Betaglucosidases)	Melhoria de rendimentos na extração de amido e proteínas; aumento de rendimento na extração de óleo de oliva; melhoria na maceração e extração de cores de frutas e legumes; clarificação de sucos de frutas, melhoria da textura, sabor, aroma e propriedades voláteis de frutas e verduras; controle de sabor amargo de frutas cítricas	Soares <i>et al.</i> , 2016
Bebidas	Celulasas (Betaglucosidases)	Melhoria do aroma de vinhos; maltagem de cereais - melhoria na fermentação primária e qualidade da cerveja; melhora na taxa de filtração e estabilidade do vinho	Chakraborty <i>et al.</i> , 2016

Biocombustíveis	Celulases	Conversão de materiais celulósicos em açúcares fermentáveis; produção de etanol de fontes renováveis	Castro <i>et al.</i> , 2010
	Xilanases		Carrigan, 2016

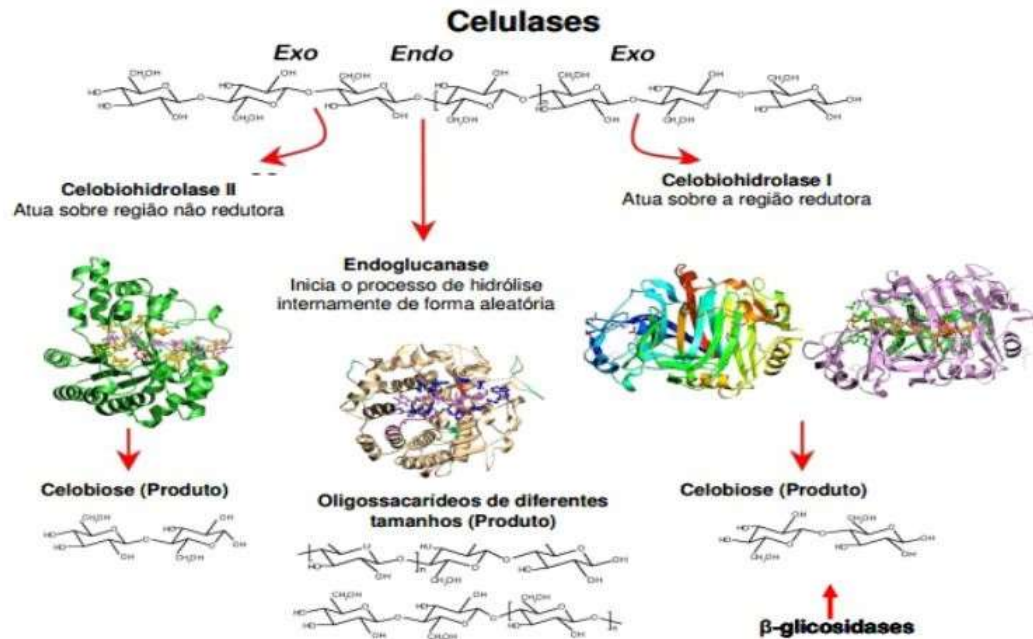
Fonte: Pimentel, 2019.

2.7.1 Celulases

As enzimas celulolíticas possuem grande importância biotecnológica, contribuindo com aproximadamente 20% do mercado global de enzimas (SILVA, 2021). As celulases compreendem um complexo multienzimático, que atuam de forma sinérgica sobre a fibra de celulose, sendo divididas em 3 classes: Endoglucanases (EG), Exoglucanases (CBH) e β -glicosidades (BG) (LYND *et al.*, 2002). De acordo com Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) que classifica as enzimas com um número EC (*Enzyme Commission Numbers*), essas enzimas fazem parte do grupo E.C 3.2.1, correspondendo às enzimas glicosilhidrolases, responsáveis pela hidrólise de ligações glicosídicas.

As enzimas endoglucanases classificadas como 1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolase (EC 3.2.1.4), atuam nas regiões amorfas da cadeia de celulose, quebrando as ligações β -1,4-glicosídicas gerando regiões redutoras e não redutoras (CASTRO e PEREIRA JR., 2010). As exoglucanases ou 1,4- β -D-glucanocelobiohidrolase (EC 3.2.1.91 e EC 3.2.1.176) atuam sobre os terminais redutores e não redutores gerados pela endoglucanase e liberam celodextrinas e celobiose. Segundo CAO e TAN (2002) as exoglucanases são enzimas que atuam sobre a celulose microcristalina e a hidrolisam com maior eficiência. Ao passo que as β -glicosidades, classificadas como β -D-glucosídeo glucohidrolase (EC 3.2.1.21) atuam sobre essas cadeias menores de oligossacarídeos e liberam a D-glicose (figura 9).

Figura 9: Mecanismo de ação das celulasas



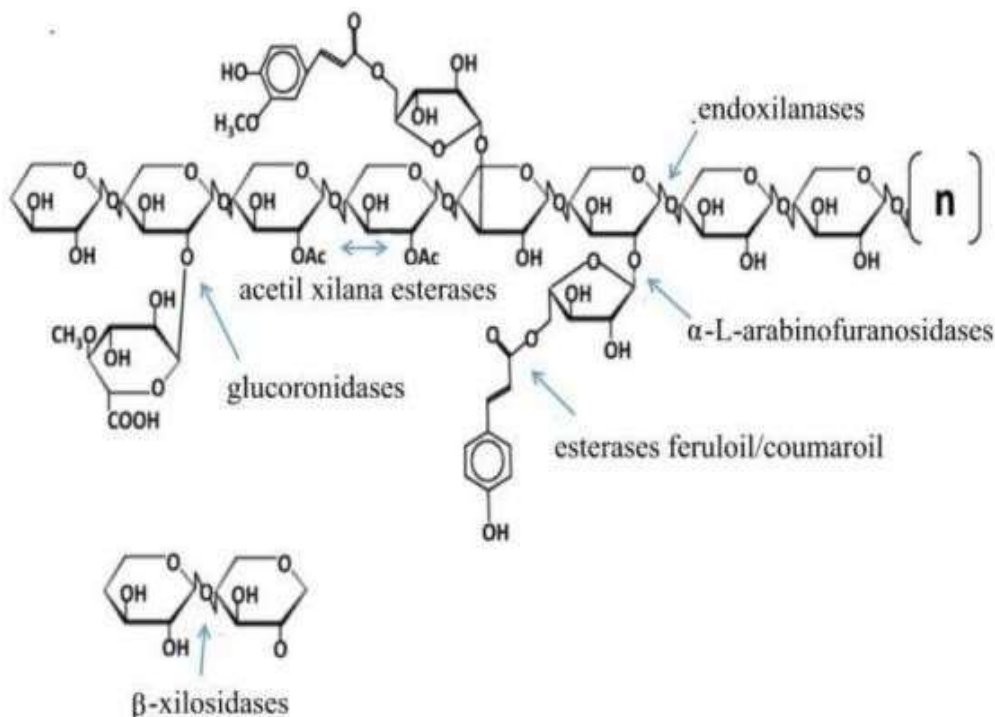
Fonte: Perim, 2014.

2.7.2 Hemicelulases

As hemicelulasas são classificadas em endoxilanases (1,4- β -D-xilano xilanohidrolase, EC 3.2.1.8), α -arabinofuranosídeses (α -L- arabinofuranosídeo, EC 3.2.1.55), β -D-xilosidases (1,4- β -D-xilano xilohidrolase, EC 3.2.1.37), β -manosidases (exo β -D-mananase, EC 3.2.1.25) e esterases (EC 3.1.1.72). As endoxilanases clivam a cadeia primária das xilanas, diminuindo a força de polimerização do substrato por hidrólise das ligações β -D-xilopiranosila, com a consequente liberação de xilo-oligossacarídeos, xilobiose e xilose.

Após essas clivagens, as β - xilosidases iniciam uma fragmentação gradual da hemicelulose, a partir dos extremos não redutores dos xilo- oligossacarídeos, liberando xilose como produto. As enzimas β -xilosidases e β -manosidases hidrolisam os dímeros de xilose e manose, respectivamente. Ao passo que as L-arabinofuranosídeses atuam sobre os resíduos de xilose e, outras enzimas como as α -glucuronídeses (EC 3.2.1.139) e acetil-esterases atuam sobre as ligações de ácido urônico e grupos acetila com moléculas de açúcares (AGUIAR e FERRAZ, 2011; BINOD *et al.*, 2018) (figura 10).

Figura 10: Atuação das enzimas hemicelulolíticas



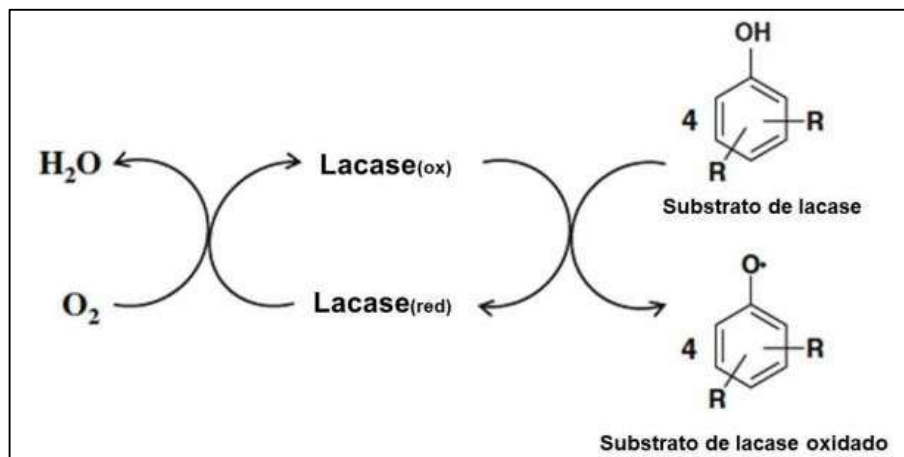
Fonte: Adaptado de Chen *et al.*, 2015.

2.7.3 Ligninases

As enzimas ligninolíticas são enzimas responsáveis pela hidrólise da lignina, compreendendo as lacases, ligninas peroxidases e manganês peroxidases. Essas enzimas, em especial, têm ganhado bastante atenção nos últimos anos, devido ao seu alto potencial de degradação da biomassa lignocelulósica, sendo a lignina peroxidase (E.C 1.11.1.14) uma das principais enzimas envolvidas na degradação da lignina (NGUYEN *et al.*, 2018).

A lacase (E.C 1.10.3.2) é uma fenol-oxidase que catalisa a oxidação de compostos aromáticos e substâncias inorgânicas. Possui em seu sítio ativo átomos de cobre que são classificados em T1, T2 e T3 (figura 11). Essa enzima é resistente à solventes orgânicos e remove fenil-propano presente na região mais externa à cadeia, gerando radicais fenoxil. Contudo, também podem oxidar compostos como: organofósforos, corantes fenólicos, difenilmetano, benzopireno e clorofenóis (DURAN *et al.*, 2002; SINGH e GUPTA, 2020).

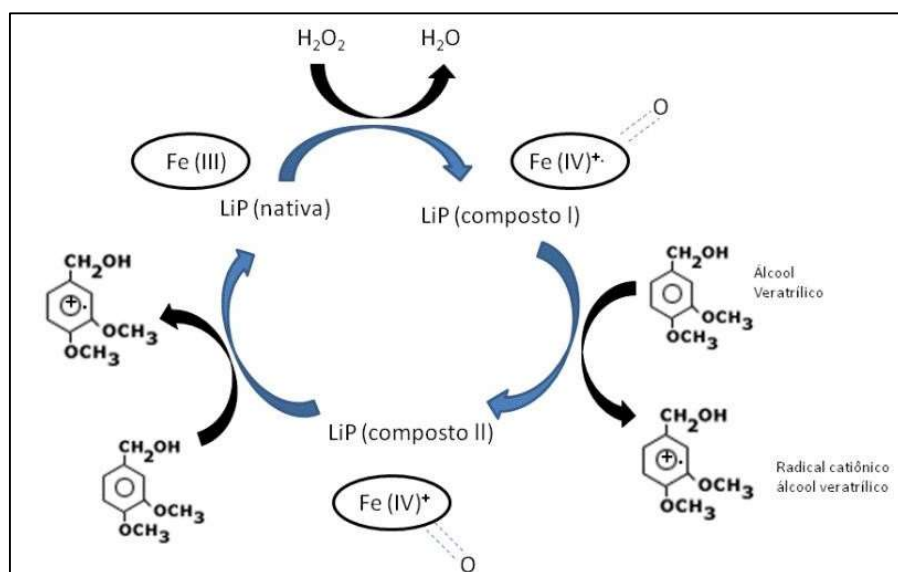
Figura 11: Ciclo catalítico da oxidação realizada por lacase



Fonte: Santos, 2020.

As ligninas peroxidases (LiP – EC 1.11.1.14) têm alto poder de oxidação de substratos aromáticos fenólicos e catalisam a clivagem oxidativa de C-C e C-O-C (figura 12), sendo enzimas não específicas com a presença do grupo heme em dois domínios: distal (C-terminal) e proximal (N-terminal). O Fe (Ferro) contido no grupo heme passa por oxirredução de Fe (III) para Fe (IV) pela ação do H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) gerando o composto I oxidado e, a partir da redução desse composto I, é formado o composto II. Essa enzima atua como um mediador redox, por meio da formação de radical catiônico, facilitando o processo de hidrólise (WONG, 2009; SALDARRIAGA-HERNANDEZ *et al.*, 2020).

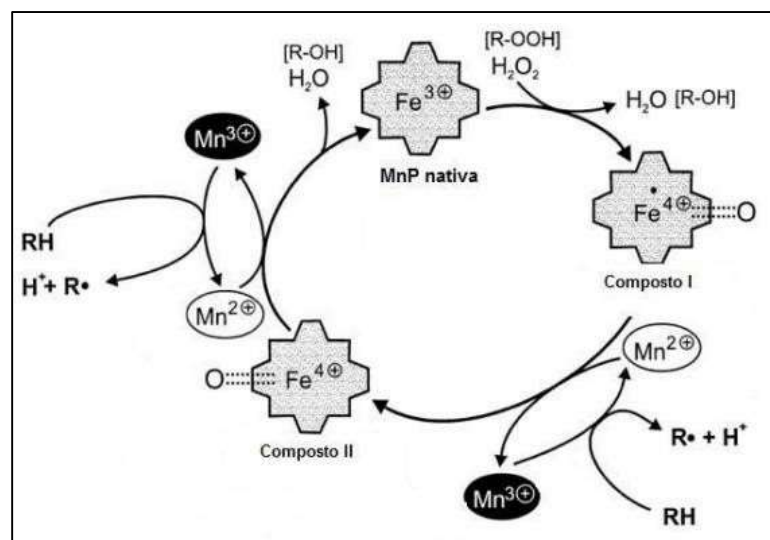
Figura 12: Ciclo catalítico da Lignina Peroxidase



Fonte: Moreira Neto, 2006.

As manganês peroxidases (MnP – EC 1.11.1.13), por sua vez, oxidam Mn II a Mn III, degradando estruturas aromáticas fenólicas, e na presença de mediadores, degradam estruturas aromáticas não fenólicas, resultando em radicais bastante reativos, com alto poder de redução, que atacam estruturas recalcitrantes (figura 13), tanto a MnP quanto a LiP necessitam de H_2O_2 para sua atividade (CARVALHO, 2005; CHEN *et al.*, 2020). Alguns fungos possuem a capacidade de produzir lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases, contudo, há fungos que produzem apenas uma ou duas dessas enzimas degradadoras de lignina (AGUIAR e FERRAZ, 2011).

Figura 13: Ciclo catalítico da Manganês Peroxidase



Fonte: Hofrichter, 2002.

2.8 Microrganismos lignocelulolíticos

Na região norte do Brasil, como o Amazonas, há uma grande diversidade de fungos com alto índice de endemismo a ser explorada, principalmente em área de mata nativa, tendo em vista que a região abriga parte da maior floresta tropical do mundo, abrigando expressiva diversidade de fungos degradadores de madeira. Esses fungos encontram nessas regiões as condições que garantem o melhor funcionamento de sua atividade fisiológica.

Em trabalho realizado por Santana *et al.*, (2022) se observou que 70% dos fungos encontrados são do Filo Basidiomycota e 30% ao Filo Ascomycota em sudoeste do

Amazonas. Adicionalmente, pouco se sabe sobre a grande diversidade biológica microbiana em relação aos microrganismos e suas interações com o ambiente e outros seres.

Os fungos filamentosos são seres multicelulares heterotróficos que desempenham um papel crucial na natureza, se alimentando através de absorção e excretando enzimas que degradam resíduos orgânicos como a biomassa vegetal. Devido à capacidade natural de secretar uma grande quantidade de enzimas no meio de crescimento, são considerados os principais produtores de enzimas lignocelulolíticas, sendo frequentemente utilizados em processos industriais (NEVALAINEN *et al.*, 2005; COUTURIER *et al.*, 2016).

Esses fungos têm sido amplamente utilizados na indústria para produção de compostos, como exemplo temos os ácidos orgânicos (fumárico e cítrico) e antibióticos (penicilina) produzidos por fungos filamentosos. Adicionalmente, os fungos *Trichoderma* e *Aspergillus* são os principais produtores industriais de enzimas lignocelulolíticas, devido à sua alta atividade enzimática em pH e temperaturas brandas, além da sua adaptação a uma ampla gama de fonte de carbono (TROIANO *et al.*, 2020).

Trichoderma reesei é descrito como um ótimo produtor de enzimas lignocelulolíticas, incluindo duas classes de celobiohidrolases, oito endoglucanases e sete β -glucosidases que atuam de forma sinérgica na degradação eficiente da biomassa vegetal. Esse fungo é um dos secretores de proteínas extracelulares mais poderosos, sendo muito utilizado para produção industrial de enzimas homólogas e heterólogas (VIKARI *et al.*, 2007).

Aspergillus oryzae é um microfungo filamentoso utilizado na alimentação há séculos em vários países pelo mundo. Adicionalmente, possui uma rica produção de metabólitos secundários bioativos, e graças ao seu sistema secretor excelente que lhe permite secretar altas concentrações de enzimas em seu meio de cultivo, vem sendo amplamente utilizado como ferramenta biotecnológica (DABA *et al.*, 2021).

Fungos pertencente ao gênero *Penicillium* também são descritos como excelentes produtores de enzimas lignocelulolíticas, fornecendo enzimas com melhor equilíbrio de atividades enzimáticas hemicelulolíticas quando comparados ao gênero *Trichoderma*. É importante ressaltar que a indústria chinesa utiliza fungos do gênero *Penicillium* para produção de enzimas lignocelulolíticas em escala industrial, utilizando-as para a degradação da biomassa lignocelulósica, pois estes segregam enzimas com melhor equilíbrio nas atividades hemicelulolíticas (MENDEZ-LÍTER *et al.*, 2021).

Os fungos de podridão branca pertencem à um grupo diverso de fungos que são do filo dos basidiomicetos divididos em 2 grupos de acordo com o tipo de degradação da biomassa,

correspondendo aos de podridão branca, como o *Pleurotus ostreatus* e *Trametes versicolor*, com capacidade de decompor todos os constituintes da biomassa lignocelulósica. Outro grupo são os de degradação parda, como o *Polyporus*, que despolimerizam a celulose de forma rápida e eficiente logo nos primeiros estágios de colonização, podendo ser usado para suplementar coquetéis enzimáticos (Tabela 2) (ANDLAR *et al.*, 2018).

Tabela 2: Classificação dos tipos de degradação realizada por fungos basidiomicetos

Tipo de degradação	Componente da madeira degradado	Características da degradação	Alguns gêneros
Degradação branca	Todos os componentes da parede da célula. Algumas espécies atacam preferencialmente a lignina.	Progressiva erosão de toda a parede da célula, incluindo lamela média.	<i>Phanerochaete</i> , <i>Phlebia</i> , <i>Trametes</i> e <i>Ceriporiopsis</i>
Degradação parda	Carboidratos e alguma modificação da lignina	Despolimerização difusa da celulose	<i>Poria</i> e <i>Polyporus</i>

Fonte: Modificado de FARIA, 2010.

O mecanismo de degradação da biomassa lignocelulósica é específico para cada grupo de fungos basidiomicetos. Dentre as espécies que atuam como podridão branca não seletiva, destaca-se *Trametes versicolor*, espécie essa que vem sendo bastante estudado quanto à aplicação de suas enzimas em biobranqueamento e biopolpação nas indústrias de papel (ZHANG, 2010). Adicionalmente, esse gênero fúngico tem ganhado destaque quanto às suas aplicações biotecnológicas devido à produção das enzimas ligninolíticas como as lacases e manganês peroxidases.

2.9 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A fermentação em estado sólido se caracteriza pela ausência de água livre no meio de cultivo. A água contida nesse sistema através da fase sólida, formando uma fina camada sobre a superfície das partículas de biomassa lignocelulósica, logo a determinação da umidade no processo é um parâmetro fundamental para o crescimento, desenvolvimento e produção de metabólitos secundários, como as enzimas, produzidas pelos microrganismos (PANDEY, 1992). Os fungos filamentosos mais utilizados neste tipo de fermentação são ascomicetos

(*Aspergillus* e *Penicillium*) e basidiomicetos (*Polyporus*).

Valores de umidade abaixo de 12% impossibilitam a atividade dos microrganismos, pois diminui a difusão de nutrientes, o inchaço do substrato, e a estabilidade enzimática. No entanto, quantidades excessivas de água também podem prejudicar o processo, tendo em vista que há a formação de uma espessa camada líquida que dificulta a passagem de ar e há aglomeração de partículas sobre o substrato (KRISHNA, 2005; ORZUA *et al.*, 2009; YOON *et al.*, 2014).

Dessa forma, os níveis ideais de umidade variam entre 30 a 85%, de acordo com o tipo de microrganismo e o tipo de substrato utilizados na FES. Além da umidade outros fatores biológicos, físico-químico e ambientais podem afetar diretamente o processo da FES, como pH, substrato, valores nutricionais, tempo de fermentação, e aeração são alguns desses fatores (KRISHNA *et al.*, 2005).

A temperatura é uma variável física importante para a fermentação em estado sólido, podendo afetar no metabolismo celular dos microrganismos, na produção das enzimas de interesse, pois alguns metabólitos são sensíveis a temperatura, influenciando na viabilidade celular e na produção do produto que se deseja obter, em geral a faixa ideal é entre 25°C e 30°C (COUBÉR *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2021; YOON *et al.*, 2014).

A grande vantagem em se utilizar essa técnica se dá em simular o habitat natural de microrganismos selvagens, além de apresentar maior produtividade dos extratos enzimáticos, maior estabilidade das enzimas, menor susceptibilidade à inibição, etc (SINGHANIA *et al.*, 2010; CASTRO *et al.*, 2015).

2.10 Produção de Etanol (Primeira e Segunda Geração)

Nesse contexto, a produção de biocombustíveis através da fermentação em estado sólido (FES) é uma alternativa economicamente viável, tendo em vista o baixo valor energético gasto e por ser considerado um processo ecologicamente correto gerando energia limpa e renovável, sem afetar a segurança alimentar.

O Etanol, também conhecido como etanol 1G, é uma fonte de energia renovável que surgiu como alternativa ao uso de combustíveis fósseis. Há diversos tipos de matérias-primas disponíveis para a produção de etanol, dentre elas a cana-de-açúcar e o milho são as mais utilizadas no Brasil, sendo produzido através do caldo da cana-de-açúcar e do grão de milho. Sua produção gera muitos resíduos como o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, que corresponde a 25 e 16 % do volume total da cana inteira, respectivamente (MENDES *et al.*, 2017).

Esses resíduos resultantes da produção de etanol 1G podem ser convertidos em bioprodutos, como o etanol 2G (CANILHA, *et al.*, 2011). Geralmente, a produção de etanol 1G ocorre em três etapas, a primeira é a obtenção de uma solução de açúcares fermentáveis, a segunda onde ocorre a fermentação desses açúcares em etanol e a terceira onde ocorre a separação e purificação do etanol (MUSSATTO *et al.*, 2010).

A produção de etanol 1G a partir de grãos, como o milho, envolve etapas de moagem e hidrólise do amido, que deve ser completamente convertido em glicose. Essa etapa de sacarificação é imprescindível antes de realizar a fermentação, sendo necessário um processo enzimático a altas temperaturas devido sua insolubilidade. Após a etapa inicial de sacarificação, as outras etapas são as mesmas empregadas na produção de etanol de cana-de-açúcar. Adicionalmente, a produção de etanol 2G a partir do resíduos do milho como a palha, sabugo e colmo se dá da mesma forma do processo produtivo empregado para o bagaço de cana-de-açúcar, seguindo as quatro etapas mencionadas anteriormente (SILVA *et al.*, 2020).

Diferentemente do processo de produção do etanol de primeira geração, onde o caldo e o melaço obtidos a partir da cana-de-açúcar e o amido do milho após cozimento vão diretamente para o processo de fermentação, o processo para produção de etanol de segunda geração também chamado bioetanol, etanol verde ou etanol celulósico, necessita de pré-processos que visem o aumento da exposição das fibras de celulose tornando os açúcares ainda presentes na palha e sabugo de milho e no bagaço e palha da cana-de-açúcar, facilitando o processo de extração desses açúcares e tornando o processo mais viável e rentável (BUORO, 2021; WANG, *et al.*, 2020).

A produção de etanol de segunda geração ocorre principalmente por meio de quatro etapas. A primeira etapa do processo consiste em romper ao máximo as fibras presente no bagaço de cana-de-açúcar, a fim de remover a hemicelulose e lignina, diminuindo o grau de polimerização da celulose para que as enzimas hidrolíticas possam acessar a celulose convertê-la em glicose, podendo ser feita de forma mecânica, química, termoquímica ou biológica. Após a etapa de pré-tratamento ocorre então a de hidrólise, onde duas técnicas são amplamente empregadas, a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática (SOUZA, 2011).

Após a liberação de açúcares como a glicose e a xilose na etapa de hidrólise, é realizada a etapa de fermentação, onde leveduras são adicionados ao meio açucarado para que ocorra a conversão desse açúcar em álcool e CO₂. Adicionalmente, a fim de se purificar essa mistura é realizado a última etapa, a destilação fracionada, onde um recipiente cilindro contendo vapor e líquido sofre transferência de massa e calor até que haja um equilíbrio entre as massas (LYND

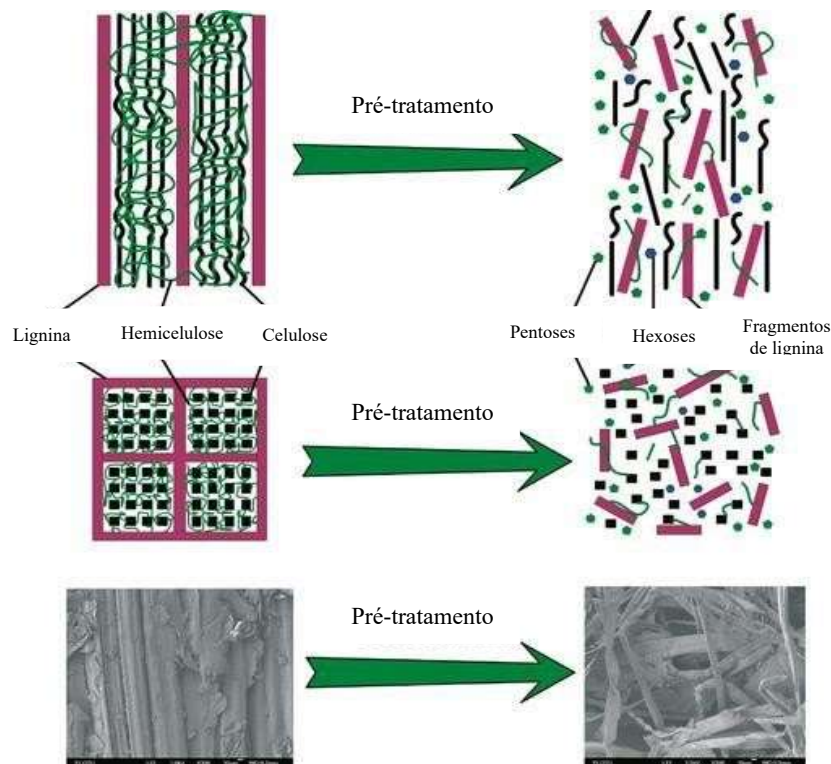
et al., 2005).

2.11 Pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas

A etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é o primeiro passo que deve ser realizado visando a produção de biocombustíveis de biomassa vegetal, a fim de reduzir a cristalinidade da celulose, remover parte da lignina e hemicelulose e aumentar a porosidade da biomassa para a melhor atuação das enzimas lignocelulolíticas, com o intuito de melhorar a acessibilidade e digestibilidade das enzimas na biomassa lignocelulósica (figura 14) (ZHAO *et al.*, 2012b). Assim, a etapa de pré-tratamento é utilizada para facilitar os processos de conversão da celulose em açúcares fermentáveis de interesse comercial, podendo ser realizada por método químicos, físico-químicos, físicos e biológicos (ALVIRA *et al.*, 2010)

É importante ressaltar que essa etapa é crucial para que se tenha uma hidrólise eficiente, cuja finalidade é a obtenção de uma polpa celulósica altamente digerível, sendo de suma importância que apresente uma abordagem ecologicamente correta, de baixo custo e que seja eficiente na conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis sem a geração de inibidores nos processos subsequentes (KASSAEY *et al.*, 2017). Contudo, o tipo de pré-tratamento que será adotado no processo depende do tipo de biomassa que será utilizada e do produto que se deseja obter.

Figura 14: Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica



Fonte: Zhao *et. al.*, 2012b.

2.11.1 Pré-tratamento químico

O método químico consiste em utilizar produtos químicos como peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio, sendo divididos em: ácido, alcalino, oxidativo e solventes orgânicos (organosolv) básico, agentes redutores. Essas substâncias químicas ocasionam o inchaço da biomassa, aumentando a superfície interna da celulose e diminuindo o grau de polimerização, resultando na ruptura da lignina (deslignificação) (TAHERZADEH e KARIMI, 2008). Dentre os métodos químicos mencionados, o pré-tratamento alcalino permite condições reacionais menos severas para a biomassa, promovendo uma menor degradação dos açúcares presentes e menor formação de inibidores após o pré-tratamento (MORAES, 2018).

2.11.2 Pré-tratamento físico

O pré-tratamento físico consiste em diminuir o grau de polimerização e aumentar a

área superficial e o tamanho dos poros da partícula lignocelulósica, convertendo a biomassa vegetal em pó, podendo ser realizado através de moagem, radiação, temperaturas elevadas e trituração (ALVIRA *et al.*, 2010). Adicionalmente, o método de radiação pode degradar a lignina, diminuindo a resistência da biomassa lignocelulósica. Ao passo que, reduz efetivamente a cristalinidade, o grau de polimerização e a estrutura molecular da celulose (FEI *et al.*, 2020).

2.11.3 Pré-tratamento físico-químico

No pré-tratamento físico-químico se utiliza agentes químicos em conjunto com processos físicos como o aumento da temperatura, pressão, etc, sendo os principais processos utilizados a explosão de vapor de SO₂ (dióxido de enxofre); água quente; micro-ondas, explosão de CO₂ (gás carbônico) e explosão de fibra de amônia (AFEX). Esses métodos têm como objetivo separar a fração hemicelulósica e hidrolisar parcialmente a biomassa (RODRIGUES *et al.*, 2016).

No método AFEX, por exemplo, ocorre a retirada dos grupos acetil da hemicelulose e descristalização da celulose. Nesse processo, é utilizado amônia líquida na biomassa e, juntamente a isto, há o controle de temperatura e pressão. Assim, a descompressão da amônia resulta na formação de poros na parede celular, aumentando a área de digestibilidade da celulose (KUMAR, 2020).

2.11.4 Pré-tratamento Biológico

No pré-tratamento biológico são utilizados microrganismos (fungos e bactérias) ou somente as enzimas oriundas desses microrganismos, com a capacidade de degradar ou modificar a estrutura da biomassa. Dentre os microrganismos que possuem capacidade de degradar a matéria lignocelulósica, destacam-se os fungos de podridão branca e parda.

Esse processo ocorre através da produção de enzimas lignocelulolíticas (peroxidases e lacases) que são excretadas pelos microrganismos através de seu metabolismo secundário, onde a lignina é mineralizada por meio de um processo oxidativo (KUMAR *et al.*, 2009a). Para que ocorra essa mineralização, há dois processos essenciais: (1) a quebra do polímero e a (2)

clivagem dos anéis aromáticos, abrangendo tanto conversões de oxidação e redução.

A deslignificação utilizando microrganismos lignocelulolíticos apresenta muitas vantagens frente aos outros métodos de pré-tratamento como: maior rendimento de produto, condições brandas no processo, sem o uso de reagentes corrosivos tóxicos, além de ter menor gasto energético (AGUIAR e FERRAZ, 2011).

De acordo com Mankar *et al.*, (2021), um pré-tratamento eficaz precisa ter a capacidade de deslignificar a biomassa lignocelulósica causando pouca alteração na lignina nativa; possuir baixo consumo de energia; ser econômico; diminuir o índice de cristalinidade da celulose; reduzir o tamanho da partícula de biomassa lignocelulósica a fim de aumentar a eficiência hidrolítica; evitar a produção de inibidores enzimáticos e ser ecologicamente correto.

3 JUSTIFICATIVA

A biomassa vegetal é o recurso renovável mais abundante na Terra, sendo uma alternativa ideal para a produção de biocombustíveis como o bioetanol, pois resolve problemas de segurança alimentar, uma vez que são utilizados resíduos agrícolas para a produção do etanol de segunda geração (etanol celulósico). Além disso, no conceito de biorrefinaria a biomassa pode ser convertida em uma ampla gama de produtos químicos e transportadores de energia. Entretanto, devido à composição da biomassa, esses processos possuem ainda alguns gargalos industriais e o maior deles está relacionado ao pré-tratamento, que para facilita o acesso à matéria-prima.

Os métodos de pré-tratamento comumente utilizados incluem processos físicos (moagem, trituração, irradiação, sonicação); químicos (álcalis, ácidos, agentes oxidantes, solventes orgânicos, líquidos iônicos e solventes eutéticos profundos); métodos físico-químicos (pré-tratamento com vapor, oxidação úmida e hidrotermólise); biológicos e/ou a combinação entre eles.

A literatura atual descreve maior eficiência de métodos biológicos de pré-tratamento utilizando fungos que degradam a lignina e a hemicelulose. Estirpes de fungos do gênero *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* e *Trametes sp.*, isolados no bioma amazônico, já foram avaliados e descritos com um excelente desempenho na hidrólise de biomassa vegetal com índices altos de lignina. Assim, estes microrganismos são promissores para o processo de pré-tratamento de importantes biomassas como a palha de milho. Além disso, a utilização de

linhagens fúngicas do bioma amazônico é promissor e de extrema importância para contribuir com o desenvolvimento de tecnologias nacionais e regionais.

Dessa maneira, frente ao desenvolvimento técnico-científico que o Brasil vem passando, encontrar técnicas e microrganismos promissores para o pré-tratamento eficiente da matéria lignocelulósica para resolver um dos gargalos do processo de produção de etanol celulósico trará grande impacto para a produção de energia a partir de fontes renováveis e para a produção de bioprodutos, como as enzimas, minimizando perdas e aumentando a produtividade nas indústrias brasileiras, além de agregar valor a esses resíduos agroindustriais e agroflorestais.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Realizar pré-tratamento biológico da palha de milho utilizando fungos amazônicos, visando aumentar a eficiência na etapa de hidrólise enzimática.

4.2 Específicos

- Determinar a composição de celulose, hemicelulose e lignina da palha do milho;
- Avaliar a fermentação em estado sólido (FES) em palha de milho pelos fungos filamentosos *Aspergillus oryzae*; *Penicillium citrinum* e *Trametes versicolor* em mono e co-cultivo;
- Determinar as atividades de ligninases (lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases) produzidas durante a FES e as atividades de celulases e xilosidases (endoglucanase, exoglucanase, β - glicosidase, FPase e xilanase);
- Aplicar a palha de milho fermentada como resíduo sólido na hidrólise enzimática utilizando coquetéis enzimáticos de celulases comerciais;

- Determinar o carregamento sólido/FPU para a hidrólise da palha de milho pré-tratada biologicamente;
- Determinar a eficiência hidrolítica após pré-tratamento biológico.

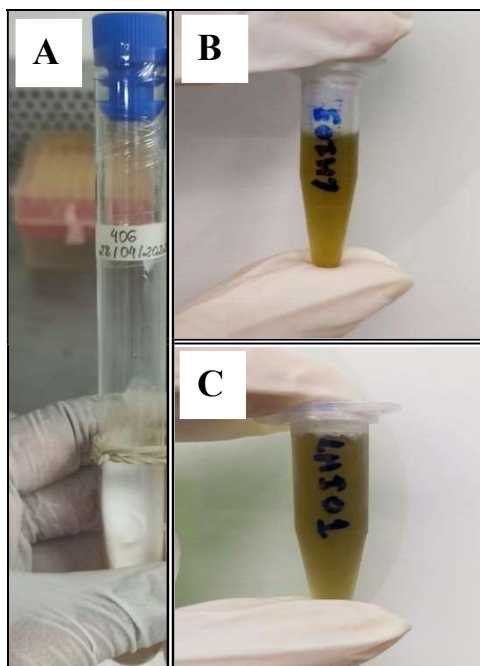
5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Microrganismos

Neste trabalho foram utilizados três fungos filamentosos, que já foram avaliados em trabalhos anteriores como degradadores de biomassa lignocelulósica recalcitrante. *Penicillium citrinum* (código de acesso NCBI: No. KU686951) e o *Aspergillus oryzae* (código de acesso NCBI:No. MT989354) foram isolados de decomposição de material vegetal e de polpa de celulose reciclada, respectivamente e estavam preservados em glicerol 5%, e armazenados no Laboratório de Microbiologia Industrial da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). *Trametes versicolor* (cód.406), foi cedido pelo Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), proveniente da Coleção de Microrganismos de interesse Agrossilvicultural e se encontrava preservado em tubo inclinado contendo meio BDA, como demonstrado na figura 15.

Os fungos foram reativados em placas de petri contendo o meio Batata Dextrose Ágar (BDA), a partir das culturas preservadas. As placas foram mantidas a 30 °C por até 10 dias para crescimento e esporulação.

Figura 15: Preservação dos fungos utilizados neste trabalho. Em tubo inclinado o fungo (a) *Trametes versicolor* e em tubos tipo eppendorf os fungos (b) *Penicillium citrinum* e (c) *Aspergillus oryzae*



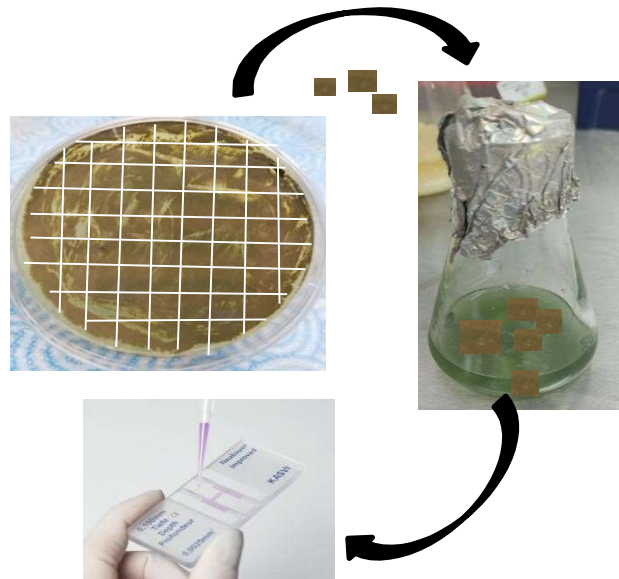
5.2 Padronização do inóculo

Para padronização dos experimentos e redução de riscos de alterações genéticas por repiques sucessivos, a cada experimento os microrganismos foram reativados a partir do preservado em glicerol, em novas placas de BDA, incubadas em estufa a 30°C por 7 dias.

Os inóculos dos fungos *Aspergillus oryzae* e *Penicillium citrinum* foram preparados por meio da suspensão de esporos feita por meio da raspagem do micélio crescido no meio contido na placa de Petri com esporulação, sendo transferidos para um erlenmeyer contendo 10 mL de água destilada estéril (figura 16).

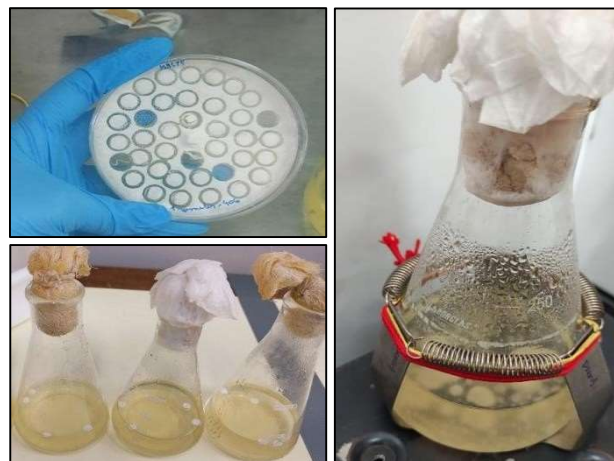
Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar a fim de se evitar contaminações. As amostras foram levadas ao vortex por cerca 30 segundos e, posteriormente, uma alíquota foi transferida para câmara de Neubauer para contagem dos esporos em microscópio óptico a um aumento de 100x. Um volume de 10% de solução de esporos foi inoculado com a concentração de 82×10^6 do fungo *Penicillium citrinum* e 79×10^6 de *Aspergillus oryzae*.

Figura 16: Padronização do inóculo por meio da contagem de esporos em câmara de Neubauer dos fungos *A. oryzae* e *P. citrinum*



Para padronização do inóculo do fungo *Trametes versicolor* foi realizado, primeiramente, o inóculo de 5 discos miceliais com aproximadamente 7 mm, em caldo de batata dextrose por 7 dias, a 160 rpm, a 30°C. Após esse período, foram retirados volumes de 10% para uso em experimentos posteriores (figura 17).

Figura 17: Padronização do inóculo de *T. versicolor*



5.3 Determinação da composição da biomassa *in natura*

O resíduo do cultivo de milho, especificamente, a palha que envolve a espiga do milho

foi utilizada como biomassa lignocelulósica, sendo adquirida na feira da Manaus Moderna, centro comercial de Manaus (Provenientes de cultivo de milho realizado na região oeste do estado Pará, Rodovia PA-370, Km 47, coordenadas geográficas: 2°43'32"S 54°30'15"W) . A biomassa foi caracterizada quanto ao seu teor de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, a partir da metodologia descrita pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável - NREL (SLUITER, 2005).

Inicialmente, as palhas foram separadas e secas ao sol por aproximadamente 5 dias, após a secagem foi cortada em pedaços menores para facilitar a trituração em liquificador. Antes da sua utilização na FES, foi submetida à um processo de descontaminação (autoclavagem sob a pressão de 1 atm, 121°C 40 minutos e secagem a 100°C, 24 horas) para remoção de possíveis contaminantes. Em seguida, em tubos de vidro contendo 300 mg da casca de milho descontaminada, triturada e seca, foram adicionados 3,0 mL de ácido sulfúrico 72% resfriado, previamente diluído em água deionizada. Essa mistura foi homogeneizada em vórtex e incubada a 30°C por 1 hora. Após esse período foi adicionado 84 mL de água deionizada para a diluição do ácido para 4% e, em seguida, foi autoclavado por 1 hora a 121°C. Após a autoclavagem e o resfriamento do hidrolisado, foi realizado a filtração em cadinhos de vidro tipo Gooch nº 1, 50 mL (previamente calcinado a 550 °C e pesado). Posteriormente, o hidrolisado foi neutralizado com hidróxido de sódio para pH 5.5 e 6.0 e então, filtrado em papel de filtro e avolumado para 200 mL, utilizando água destilada estéril. A partir do hidrolisado, foram determinadas as concentrações de glicose e de açúcares redutores utilizando os métodos de GOD (Glicose oxidase) e DNS (Ácido Dinitrosalicílico) GHOSE (1987) e EVELEIGH *et al.*, (2009).

O resíduo sólido presente no cadinho foi seco a 100 °C por 24 h e pesado (W1), seguido de calcinação em mufla por 5 h, a 550 °C. Após esse período, o material resfriado em dessecador foi pesado novamente (W2). Os ensaios foram realizados em triplicata, tanto da biomassa *in natura* (apenas seca e triturada) quanto da biomassa após a FES.

Para a determinação do percentual dos componentes se utilizou as seguintes

equações:

$$\text{Celulose (\% m / m)} = (0,9 \ 0,96) * C1 * (v \ m) * \alpha * 100$$

Onde,

0,90 = coeficiente que resulta da relação entre peso molecular do polímero e do monômero de glicose;

0,96 = rendimento de sacarificação C1 = concentração de glicose (g/L)

v = volume total da solução de açúcar (L) m = peso da amostra seca (g)

α = diluição da amostra (se houver)

Hemicelulose (% m/ m) = (0,88/ 0,93)*(C1–C2) * (v m)* α * 100 Onde,

0,88 = coeficiente que resulta da relação entre peso molecular do polímero e do monômero de glicose

0,93 = rendimento de sacarificação C1 = concentração de glicose (g/L)

C2 = concentração de açúcares redutores (g/L) v = volume total da solução de açúcar (L)

m = peso da amostra seca (g)

α = diluição da amostra (se houver)

Lignina (% m/m) = W1-W2 / m*100 Onde,

W1 = resíduo seco da filtragem (g)

W2 = peso do resíduo após calcinação (g) m = peso da amostra seca (g)

Cinza (% m/m) = W2 / m*100 Onde,

W2 = peso do resíduo após calcinação – Cinza (g) m = peso da amostra seca (g)

5.4 Etapas do pré-tratamento biológico da casca de milho

5.4.1 Determinação da umidade na FES

O resíduo de cultivo de milho (palha) foi triturado e seco, em seguida, foi quantificado através do determinador de umidade infravermelho sem a adição de água para que fosse

determinado a umidade inicial presente na biomassa, apresentando uma umidade inicial de 6,27%.

A umidade é um dos fatores que influenciam o crescimento de fungos filamentosos, o crescimento destes é favorecido em umidades acima de 70%, embora algumas espécies mais resistentes possam crescer em umidades baixas (SEDLBAUER, 2001). Portanto, determinou-se utilizar umidade de 80% para o cultivo dos fungos por FES.

Para a determinação do volume de líquido a ser acrescido para se atingir umidade de 80% se adicionou um volume de água sobre a palha de milho da seguinte maneira: após a determinação da umidade inicial do resíduo, foram adicionados 5 mL de água, homogeneizado e deixado em repouso por 10 minutos, seguido de uma nova medição da umidade. Este processo foi repetido várias vezes até que se obtivesse uma umidade de 80%, totalizando um volume de água de 40 mL. Para todos os experimentos da FES foi padronizado esse mesmo volume de água. A balança analisadora de umidade infravermelho utilizada foi a GEHAKA IV 3100 que permite até 100 g de sólidos (figura 18).

Figura 18: Determinação da umidade da palha de milho em analisador de umidade infravermelho



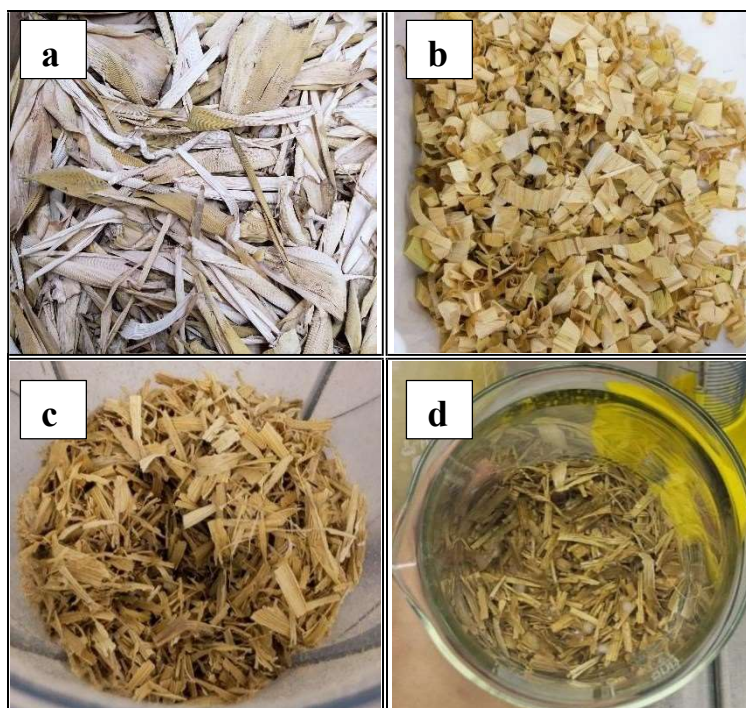
5.4.2 Fermentação em Estado Sólido (FES)

Após ser cortada, triturada e descontaminada por 40 minutos a 121°C sob a pressão de 1 atm, a palha de milho foi colocada para secar por 24 horas a 100°C, para perda da umidade resultante do processo de descontaminação (figura 19), o tamanho dos fragmentos da palha de milho após serem triturados, utilizada na FES foram de até 3 mm. Finalizado esse processo, foi realizado o inóculo dos microrganismos. A fermentação em estado sólido foi conduzida de

acordo com a metodologia de Boratyński (2018) com modificações. Frascos do tipo bércker (500 mL) foram utilizados como biorreatores, contendo 10 g de palha de milho. Após esse período foram hidratados (80%) com uma solução de micronutrientes previamente esterilizada composta por: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 g/L; KH_2PO_4 , 3 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L; CaCl_2 , 0,5 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005 g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0016 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0014 g/L (MANDELS e WEBER, 1969) e uma solução de esporos de 10%, com 10^6 (esporos por grama de substrato). Para obtenção de um processo eficiente, foram analisados 3 fungos em FES (*Aspergillus oryzae*, *Penicillium citrinum* e *Trametes versicolor*) em mono e em co-cultivo.

Para os co-cultivos foram utilizadas as seguintes combinações: *T. versicolor* + *A. oryzae*; *T. versicolor* + *P. citrinum*; *T. versicolor* + *A. oryzae* + *P. citrinum* e *A. oryzae* + *P. citrinum*. Todas as fermentações foram realizadas em 3 réplicas de cultivo (triplicata).

Figura 19: Preparo da palha de milho para utilização na FES (a) palha de milho seca, (b) palha de milho cortada em pedaços, (c) palha de milho triturada e (d) palha de milho em FES



Os béckers contendo a biomassa inoculada com os fungos foram incubados em BOD (Demanda Biológica de Oxigênio) a 30 °C por 120 h, sem agitação (figura 20). Ao final da fermentação, foi adicionado 100 mL de tampão citrato pH 5, 50 mM, na proporção de 1:10 (m/v), homogeneizado em um agitador rotativo a 120 rpm, 30 °C durante 90 minutos, seguido de posterior centrifugação (4000 rpm, 15min) e filtração utilizando lã de vidro. Os extratos

obtidos foram mantidos a -20°C até a avaliação das atividades lignocelulolíticas.

O material sólido resultante da filtração foi autoclavado por 40 min, a 121°C e seco a 100°C em estufa por 24 h. Após resfriamento a biomassa vegetal foi pesada a fim de se verificar o consumo pelos fungos. Essa biomassa resultante foi armazenada e utilizada nos experimentos posteriores de hidrólise enzimática e na determinação de celulose, hemicelulose e lignina resultantes.

Figura 20: Fermentação em estado sólido (FES) (a) e crescimento após 120h dos fungos (b) *A. oryzae*, (c) *P. citrinum* e (d) *T. versicolor* em mono cultivo e, (e) *P. citrinum* e *T. versicolor*, (f) *A. oryzae* e *T. versicolor*, (g) *T. versicolor*, *P. citrinum* e *A. oryzae* em co-cultivo



5.5 Determinação das atividades de ligninases

5.5.1 Lacase

A atividade de lacases foi determinada de acordo com o método de Wolfenden & Wilson (1982), por meio da quantificação do produto da oxidação do 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) utilizado como substrato. A análise foi realizada em placa de 96 poços, contendo 0,135 mL do extrato enzimático bruto e 0,135 mL de tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0; 0,030 mL de ABTS 5 mM.

A cinética foi realizada em um tempo total de 60 segundos a 25 °C, com leituras a cada 5 segundos em comprimento de onda de 420 nm. Para o branco da reação foi utilizado apenas o tampão e o ABTS. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima livre ou imobilizada necessária para oxidar 1 μ M de substrato por minuto.

5.5.2 Manganês peroxidases

A determinação da atividade da manganês peroxidase foi obtida a partir da metodologia de Kuwahara *et al.*, (1984), tendo como substrato o vermelho de fenol. Os teste enzimáticos foram realizados em tubos tipo eppendorf e a leitura foi realizada em placa de 96 poços a 610 nm. A mistura reacional foi constituída por 0,147 mL de tampão succinato de sódio 20 mM pH 4,5; 0,0735 mL de reagente (0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%; 0,1 mL de lactato de sódio 250 mM; 0,2 mL de albumina bovina 0,5%; 0,05 mL de MnSO₄ 2 mM e 0,05 mL de H₂O₂ 2 mM) e 0,0735 mL de extrato enzimático. Após incubação durante 5 minutos, a 30°C, em banho-maria, as reações foram interrompidas pela adição de 0,0059 mL de NaOH 2 M.

Para preparo do branco das amostras foi utilizado 0,195 mL de tampão succinato de sódio; 0,097 mL de amostra e 0,007 mL de NaOH 2M na mistura reacional antes de expor a mistura ao banho-maria a 30°C. Uma unidade de atividade foi considerada como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 μ mol de vermelho de fenol oxidado por minuto.

5.5.3 Lignina Peroxidase

A atividade de lignina peroxidase foi determinada de acordo com a metodologia de Tien e Kirk (1984) com leitura em placa de 96 poços. Para a mistura reacional foram utilizados 0,112 mL de extrato; 0,075 mL de H₂O₂ 2 mM; 0,112 mL de álcool veratrílico 4 mM em tampão tartarato de sódio 250 mM, pH 3,0. Os ensaios foram realizados em uma cinética de 5 minutos a 30°C, com leitura espectrofotométrica a cada 5 segundos em comprimento de onda de 310 nm. A atividade de LiP foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μ mol de álcool veratrílico por minuto. As atividades foram determinadas em unidades por grama.

5.6 Determinação das atividades celulolíticas e xilanolíticas

5.6.1 Endoglucanase (CMCase)

A atividade enzimática foi realizada em tubos tipo eppendorf de 2 mL, sendo composto por 0,05 mL do extrato enzimático previamente diluído em tampão citrato pH 5,0 e 0,05 mL do substrato carboximetilcelulose na concentração de 2%. As amostras foram pré-incubadas por 15 minutos a 50°C e, após esse período, foi adicionado 0,3 mL de DNS, prosseguindo a incubação a 100 °C, durante 5 minutos (GHOSE, 1987; EVELEIGH *et al.*, 2009). As leituras foram realizadas no comprimento de onda a 540 nm. A determinação dos açúcares redutores totais liberados nas reações enzimáticas de endoglucanase foi calculado em mg/mL, utilizando a glicose como padrão. Para determinação dos açúcares liberados foi utilizado as curvas padrões de glicose e xilose e a atividade foi determinada em unidades por grama.

5.6.2 Exoglucanase (Avicelase)

A determinação da atividade de exoglucanase foi realizada em tubos tipo eppendorf de 2 mL, contendo 0,05 mL do extrato enzimático previamente diluído em tampão citrato pH 5,0 e 0,05 mL do substrato avicel 2%. As amostras foram pré-incubadas por 15 minutos a 50°C, e após esse período, foi adicionado 0,3 mL de DNS, prosseguindo a incubação a 100°C por 5 minutos (GHOSE, 1987; EVELEIGH *et al.*, 2009). As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 540 nm.

5.6.3 β -glucosidase

A determinação da atividade de β -glucosidase foi realizada em tubos eppendorf de 2 mL, contendo 0,05 mL do extrato enzimático diluído e 0,05 mL do substrato celobiose na concentração de 2% . A reação foi pré-incubada por 15 minutos a 50 °C, após esse período, foi adicionado 1 mL do reagente glicose oxidase (kit GOD), prosseguindo para inbução a 37°C por 15 minutos, para determinação da glicose liberada.

Todos os testes de atividade enzimática foram realizados em triplicatas, e em cada ensaio foi realizado um controle de enzima (sem substrato) e um controle do substrato (sem enzima), de acordo com Ghose (1987) e Eveleigh *et al.*, (2009) para as celulases e xilanases.

5.6.4 FPase (Celulases totais)

A atividade da FPase foi determinada utilizando-se papel de filtro watman nº 1 (1 disco) como substrato da enzima, 0,02 mL de extrato enzimático e 0,04 mL de tampão citrato pH 5,0. As amostras foram incubadas por 1 h a 50°C. Após incubação foi acrescido 0,12 mL de DNS a reação, prosseguindo a incubação por 5 minutos a 100°C. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em placa de 96 poços em comprimento de onda de 540 nm.

5.6.5 Xilanases

Para determinar a atividade de xilanases, foi utilizado como substrato da enzima a xilana 2% (xylan birchwood). As amostras (0,05 mL) foram previamente diluídas em tampão citrato 50 mM, pH 5,0 e adicionadas aos tubos contendo o substrato (0,05 mL). Os tubos eppendorf foram incubados por 15 min a 50°C e posteriormente, foram adicionados 0,3 mL de DNS para dosagem dos açúcares liberados (MILLER, 1959; GHOSE, 1987; EVELEIGH *et al.*, 2009). A concentração de xilose (mg) foi determinada a partir de curva de calibração, construída utilizando o açúcar xilose.

As atividades enzimáticas lignocelulolíticas foram determinadas em UI (unidades internacionais), onde UI, corresponde a 1 μ mol de produto liberado por minuto.

5.7 Quantificação de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi obtida utilizando-se o método de Bradford (1976). O ensaio consistiu em 0,005 mL de extrato bruto e 0,12 mL de reagente bradford, em microplaca de leitura de 96 poços. A mistura reacional foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos, na ausência de luz. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 595 nm. Para o branco se utilizou água deionizada estéril e o reagente bradford. A concentração de proteína foi expressa em mg/mL, obtida a partir da curva padrão com albumina de soro bovino (BSA).

5.8 Hidrólise enzimática

Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados conforme as metodologias descritas por Barcelos *et al.* (2013) e Rocha *et al.* (2013) com modificações. A hidrólise foi realizada na proporção de 25 g/L de resíduo sólido (biomassa sólida composta de palha de milho após o pré-tratamento biológico) em um volume reacional de 1 mL, em tubos eppendorf de 2 mL. O experimento foi realizado em triplicata.

Os volumes das enzimas celulases comerciais AMZ e Celic Cetec 2 adquirida das empresas Amazonzyme e Novozymes, foram adicionados aos tubos de acordo com a concentração de Unidade enzimática FPU (Unidade de atividade de em papel de filtro - FPase) de cada uma, para que estivessem na concentração requerida (12 FPU / g de biomassa) , o volume final da reação de hidrólise foi completado com tampão citrato 50 mM em pH 5,0. A mistura reacional foi incubada a 50 °C por 72 h em shaker com agitação orbital, e após esse período foram feitas as dosagens de glicose liberada em solução, pelo método de glicose-oxidase utilizando o Kit glicose enzimática® (*In vitro* Diagnóstica). A determinação da concentração de glicose g/L foi realizada por meio de curva de calibração de glicose, preparada nas mesmas condições das amostras.

A eficiência hidrolítica foi calculada utilizando-se a equação abaixo:

$$E. H. (\%) = \frac{\text{Glicose (g/L)}}{\text{Substrato (g/L)} \times \text{Celulose (g/g)} \times 1,1} \times 100$$

Onde,

E.H (%): Eficiência da hidrólise enzimática;

Substrato (g/L): Concentração de substrato utilizado na hidrólise; Celulose (g/g): Concentração de celulose no substrato utilizado;

1,11: Fator de conversão, relacionado à adição de uma molécula de água para a

liberação de uma molécula de glicose, após o rompimento de cada ligação covalente durante a hidrólise.

5.9 Determinação do carregamento sólido/FPU para hidrólise da palha de milho pré- tratada biologicamente.

A determinação do carregamento ideal da proporção sólido/FPU da hidrólise foi realizada utilizando a biomassa pré-tratada biologicamente com o fungo, que apresentou o processo mais eficiente avaliado, utilizando-se o blend enzimático AMZ.

A quantidade de sólido (palha de milho) e a quantidade de enzima (FPU) utilizados na hidrólise foram estudados para se obter um processo que permita o carregamento eficiente de sólidos e quantidade ideal de unidades enzimáticas (FPU).

As proporções de sólido e enzima utilizadas variaram conforme a matriz do planejamento experimental composto rotacional (DCCR), com 2 fatores (variáveis independentes), 2 níveis mais os pontos axiais e 1 variável de resposta (variável dependente), correspondente à eficiência hidrolítica (%) (tabela 5).

O Software Statística® foi utilizado para gerar a matriz experimental, de acordo com a tabela de níveis e o planejamento experimental DCCR, compreendendo 8 experimentos diferentes, mais 3 repetições no ponto central (tabela 6) e valor de $p < 0,05$. A hidrólise foi conduzida nas condições da matriz, incubada a 50 °C por 72 horas. Após esse período foi realizada a dosagem de açúcares liberados durante a hidrólise, pelo método glicose oxidase (GOD) e método DNS.

Tabela 5: Tabela de níveis do DCCR para otimização do carregamento de biomassa e quantidade de enzima

Fatores	Níveis				
	- α (- 1,41)	-1	0	+1	+ α (+1,41)
Biomassa pré-tratada (g / L)	25	36	63	89	100
FPU / g de biomassa	2	5	12	18	21

Tabela 6: Matriz do DCCR com os valores codificados e os valores reais

Experimentos	Valores codificados		Valores reais	
	x1	x2	Biomassa g/L	FPU / g
1	-1,00	-1,00	36	5
2	-1,00	1,00	36	18
3	1,00	-1,00	89	5
4	1,00	1,00	89	18
5	-1,41	0,00	25	12
6	1,41	0,00	100	12
7	0,00	-1,41	63	2
8	0,00	1,41	63	21
9 (C)	0,00	0,00	63	12
10 (C)	0,00	0,00	63	12
11 (C)	0,00	0,00	63	12

5.10 Análises estatísticas

Os planejamentos experimentais, a análise de variância (ANOVA), cálculos de desvio-padrão e gráficos foram obtidos utilizando-se os softwares Statistica® versão 10.0, StatSoft, Inc.(2011).