



Produção de celulases por *Aspergillus japonicus* URM5620 e *Aspergillus niger* URM5741 por diferentes processos fermentativos utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato

Celulase production by Aspergillus japonicus URM5620 e Aspergillus niger UR5741 for different fermentative processes using sugarcane bagasse as substrate

Raniele Oliveira Alves¹, Rodrigo Lira de Oliveira¹, André Felipe de Melo Sales Santos², Tatiana Souza Porto¹

¹ Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE), Garanhuns, Pernambuco, Brasil

² Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco, Brasil

Todos autores contribuíram de forma igualitária

Contato: portots@yahoo.com.br

Palavras-Chave

celulase
bagaço de cana-de-açúcar
Aspergillus
fermentação sequencial
resíduos agroindustriais

Key-word

cellulase
sugarcane bagasse
Aspergillus
sequential fermentation
agro-industrial wastes

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo a produção de celulases por *Aspergillus japonicus* URM5620 e *Aspergillus niger* URM5741 através de diferentes processos fermentativos utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Para ambas linhagens avaliadas, a fermentação sequencial apresentou resultados superiores aos obtidos pela fermentação submersa sendo que *A. japonicus* URM5620 apresentou resultados superiores em ambos os cultivos, sendo esta escolhida para etapas posteriores do estudo. Foi realizado um planejamento fatorial completo 2³ para avaliar a influência das concentrações de glicose e inóculos e da proporção de meio líquido e substrato nas atividades celulolíticas. Verificou-se que os melhores resultados para as atividades de CMCase (2,569 U/mL) e FPase (1,241 U/mL) foram obtidas nas seguintes condições: glicose 40 g/L, 30 mL de meio líquido/g de substrato e 10⁸ esporos/mL. Sendo as variáveis independentes glicose e volume de meio líquido/g de substrato estatisticamente significativas, apresentaram estes efeitos positivo e negativo, respectivamente. A celulase apresentou atividade ótima numa faixa de 30 a 50°C e pH 4,0, mostrando-se estáveis numa faixa de temperatura de 50 a 70°C. A nova metodologia de fermentação sequencial, comparada à fermentações submersa, mostrou-se satisfatória e uma alternativa viável para produção de celulases para posteriores aplicações industriais e para um melhor aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

The present study aimed to produce cellulases by *Aspergillus japonicus* URM5620 and *Aspergillus niger* URM5741 through different fermentative processes using sugarcane bagasse as a substrate. For both strains evaluated, the sequential fermentation showed higher results than obtained by submerged fermentation, and *A. japonicus* URM5620 presented superior results in both cultivations, being this one chosen for later steps of the study. A 2³ full factorial design was carried out to assess the influence of glucose and inoculum concentrations and the proportion of liquid medium per g of dry substrate on cellulolytic activities. It was found that the best results for the activities of CMCCase (2.569 U/mL) and FPase (1.241 U/mL) were obtained under the following conditions: glucose 40g/L, 30 mL of liquid medium/g of substrate and 10⁸ spores/ml. The independent variables glucose and volume of liquid medium/g of substrate are statistically significant, with positive and negative effects, respectively. Cellulase showed optimal activity in a range of 30 to 50°C and pH 4.0, showing stability in a temperature range of 50 to 70°C. The new sequential fermentation methodology proved to be satisfactory and a viable alternative for cellulases production for later industrial applications and for a better use of sugarcane bagasse.

Informações do artigo

Recebido: 07 de janeiro, 2020

Aceito: 22 de abril, 2020

Publicado: 30 de abril, 2020

Introdução

A celulose é o biopolímero natural mais abundante na Terra, encontrado como um dos principais constituintes da parede celular vegetal, na maioria dos casos associado a hemiceluloses e lignina. Ao contrário de outros compostos, a celulose não é facilmente solúvel em água, portanto, a conversão enzimática da celulose tornou-se uma tecnologia fundamental para a biodegradação de materiais lignocelulósicos (BEHERA et al., 2017).

Os resíduos agroindustriais são ricos em materiais lignocelulósicos, possuem um grande potencial nutricional e valor biotecnológico, sendo utilizados como substrato para produção de metabólitos de interesse industrial. Dentre os resíduos agroindustriais destacam-se o farelo de arroz, de milho e trigo, e o bagaço de cana-de-açúcar (FLORES-MALTOS et al., 2014).

O Brasil é o maior produtor e exportador de cana-de-açúcar, com uma produção de 620 milhões de toneladas na safra de 2018/2019 e o segundo maior produtor de bioetanol do mundo (CONAB, 2019). No entanto, uma grande dificuldade para o aumento da eficiência de produção de etanol é o alto custo da hidrólise enzimática do material lignocelulósico, podendo ser reduzida através do desenvolvimento de novos bioprocessos para a produção de enzimas celulolíticas (CUNHA et al., 2012).

Os materiais lignocelulósicos são particularmente atraentes devido ao seu custo relativamente baixo e oferta abundante. A obtenção de enzimas por processos biotecnológicos é amplamente empregada, por oferecerem diversas vantagens, como o reaproveitamento de resíduos agroindústrias de baixo custo, por utilizar processos relativamente simples de serem empregados e desenvolvidos, além da possibilidade da obtenção de moléculas de alto valor agregado (SINGHANIA et al., 2015).

Celulases são um grupo de enzimas que incluem as endo e exo-glucanases e beta glicosidases que atuam sinergicamente e são necessárias para a hidrólise eficiente da celulose à oligossacarídeos solúveis (IDRIS et al., 2017). As celulases são atualmente a terceira maior classe de enzimas industriais do mundo, em volume de dólares, devido às suas aplicações na indústria de alimentos, na indústria de vinhos, cerveja, reciclagem de papel, aditivos para ração animal, papel e celulose (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016; SHER et al., 2017).

As celulases podem se tornar a enzima industrial de maior volume devido a sua aplicação enzimática na degradação de biomassa, como na indústria sucroalcooleira para produção de etanol de segunda geração e de biogás (IDRIS et al., 2017). Esta última aplicação é um processo de grande interesse devido as diversas aplicações do biogás, podendo ser utilizado em fogões a gás ou queimadores, energia mecânica ou luminosa (TANTAYOTAI et al., 2017; SILVA et al., 2019;).

A produção de celulases microbianas por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, têm sido bastante estudada devido à sua alta produtividade de celulase e seu uso seguro na indústria (ABDULLAH; GREETHAM, 2016).

Os processos fermentativos empregados para a produção de celulases são a Fermentação em Estado Sólido (FES), fermentação submersa (FS) e uma nova metodologia que consiste na combinação das duas anteriores, que é a fermentação sequencial (FSq) (CUNHA et al., 2014).

Substratos lignocelulósicos, especialmente o bagaço de cana-de-açúcar, para a utilização nestes processos fermentativos podem ser submetidos a pré-tratamentos hidrotérmicos, como explosão a vapor e hidrólise ácida (ácido diluído) podem ser aplicados para aumentar a digestibilidade do bagaço de cana-de-açúcar, facilitando o acesso da celulose pela enzima (VISSER et al., 2015; FOCKINK et al., 2017).

O presente trabalho teve como objetivo a produção de celulases de *A. japonicus* URM5620 e *A. niger* URM5741 por diferentes métodos fermentativos utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, avaliar das variáveis que mais influenciam na produção da enzima e caracterizar bioquimicamente a celulase em termos de pH e temperatura.

Material e Métodos

Micro-organismos

Foram utilizados os fungos filamentosos *Aspergillus japonicus* URM5620 e *Aspergillus niger* URM5741 provenientes da Micoteca URM situada no Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As linhagens fúngicas foram mantidas em meio Czapek imersas em óleo mineral a temperatura ambiente ($25\pm 1^\circ\text{C}$).

Obtenção e preparo do substrato

O bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado sem qualquer pré-tratamento, cedido pela Companhia Alcoolquímica S.A (Usina JB), localizada no município de Vitória de Santo Antão, Estado de Pernambuco.

A amostra foi coletada na saída da última sequência de tornos de moenda da Usina (bagaço bruto), acondicionada em sacos de polietileno de 5 litros, lacrada e levada, para análises e ensaios no Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG), da Universidade do Agreste de Pernambuco (UFAPE).

A amostra bruta foi seca em estufa com circulação de ar a 65°C por 24h, e após isso o resíduo seco foi triturado em moinho de facas e padronizado (amostra padronizada) utilizando peneiras de malhas 10 e 18 mesh para selecionar uma fração com tamanho de partículas entre 0,5 mm e 2 mm para fermentação sequencial e em estado sólido e, inferior a 0,5 mm para fermentação submersa.

Meio nutriente

O meio nutriente utilizado foi descrito por Sternberg; Mandels, (1979), contendo (p/v): 0,14% (NH₄)₂SO₄; 0,20% KH₂PO₄; 0,03% CaCl₂; 0,02% MgSO₄.7H₂O; 0,50% peptona; 0,20% extrato de levedura; 0,03% ureia; 0,10% Tween 80 e 0,10% de solução salina (5 mg/L FeSO₄.7H₂O; 1,6 mg/L MnSO₄.H₂O; 1,4 mg/L ZnSO₄.7H₂O e 2,0 mg/L CoCl₂).

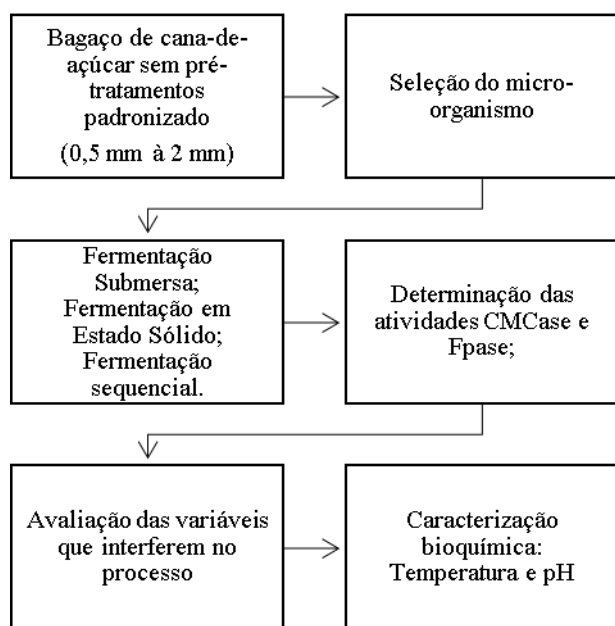
Fermentação submersa

Para a condução da Fermentação Submersa (FS) foi utilizado o meio nutriente descrito por Sternberg; Mandels, (1979), suplementado com 10 g/L de glicose e 1% (p/v) de bagaço de cana. O meio de cultivo teve o pH previamente ajustado para pH 5,0, em seguida foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 min.

Os cultivos foram realizados por 72 h em frascos Erlenmeyer de 250mL, com uma concentração de esporos 10⁵, a 30°C em uma incubadora orbital, sob agitação mecânica a 130 rpm

As etapas para produção da celulase por fermentação sequencial, fermentação submersa e fermentação em estado sólido estão descritas na Figura 1.

Figura 1. Fluxograma dos processos fermentativos utilizados para produção de Celulase por *Aspergillus japonicus* URM5620 e *Aspergillus niger* URM5741



Fonte: Autor (2020)

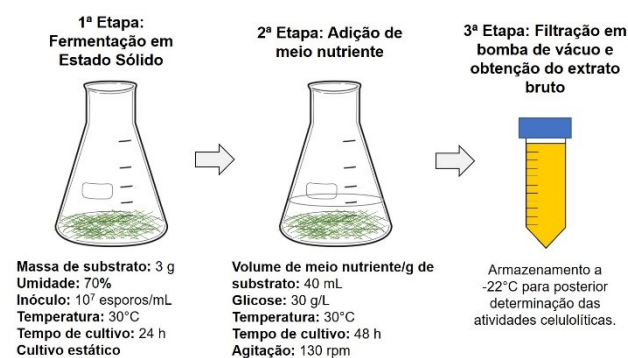
Fermentação sequencial

A Fermentação Sequencial (FSq) foi realizada inicialmente pelo crescimento do fungo em fase sólida (FES) e, posteriormente o processo segue como uma fermentação submersa (FS), pela adição do meio de cultura líquido ao cultivo do substrato sólido bagaço de cana-de-açúcar padronizado) (Figura 2).

O cultivo em estado sólido foi realizado em um frasco Erlenmeyer (250 mL) contendo 3 g de bagaço de cana-de-açúcar padronizado previamente esterilizados em autoclave a 121°C, por 15 min. O substrato teve sua umidade ajustada para 70% pela adição de meio nutriente e da suspensão de esporos (10⁷ esporos/mL). Esta etapa da fermentação foi conduzida sem agitação a 30°C, por 24 h (Etapa 2).

Posteriormente, 40 mL do meio nutriente por grama de fermentado sólido foi enriquecido com 30 g/L de glicose foi adicionado aos frascos Erlenmeyer e o cultivo foi continuado como fermentação submersa em incubadora orbital por 48 horas à 30°C, com agitação contínua a 130 rpm (Etapa 2). Em seguida foi realizada o processo de filtração com bomba à vácuo e obtenção do extrato bruto, armazenado e posteriormente analisado (Etapa 3).

Figura 2. Representação esquemática do processo de fermentação sequencial utilizado para produção de celulases por *Aspergillus japonicus* URM5620 e *Aspergillus niger* URM5741.



Fonte: Autor (2020)

Planejamento fatorial e análise estatística

Após a definição do melhor micro-organismo e tipo de processo fermentativo, foi selecionado o *A. japonicus* URM5620 e a fermentação sequencial para dar continuidade com os experimentos envolvendo planejamento fatorial.

Desta forma, foi realizado um planejamento fatorial completo 2³, com quatro pontos centrais, para avaliar a influência das variáveis independentes: glicose, volume de meio líquido por g de substrato e concentração do inóculo na produção de celulase por *A. japonicus* URM5620 através de fermentação sequencial.

Os níveis utilizados no planejamento encontram-se descritos na Tabela 1. Os resultados obtidos foram analisados pelo software Statistica 7.0® (Statsoft Inc.).

Tabela 1. Níveis do planejamento fatorial completo 2³ para produção de celulase por *Aspergillus japonicus* URM5620 através de fermentação sequencial utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato.

| Variáveis | Níveis | | |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Inferior | Central | Superior |
| Glicose (g/L) | 30 | 40 | 50 |
| Volme de meio por g de substrato (mL/g) | 20 | 30 | 40 |
| Inóculo (esporos/mL) | 10 ⁶ | 10 ⁷ | 10 ⁸ |

Fonte: Autor (2020)

Determinação das atividades celulolíticas

As atividades celulolíticas foram determinadas de acordo com Ghose (1987), sendo assim dividida em duas atividades: atividade de celulase total em papel (FPase) e endoglucanase (CMCase). Para determinação da atividade de FPase, foi utilizado como substrato o papel de filtro quantitativo (Whatman nº 1), cortado em tiras de 1 x 6 cm (50 mg). O substrato foi colocado enrolado em tubos de ensaio, onde foi adicionado 0,5 mL de acetato 0,1 M (pH 5,0) e 0,5 mL do extrato enzimático. A reação enzimática ocorreu a 50°C, durante 60 min. Em seguida, a quantidade de glicose liberada foi determinada, pela reação com ácido dinitrosalicílico (DNSA), conforme (MILLER, 1959).

Para determinação da atividade de endoglucanase (CMCase) foi utilizado como substrato a carboximetilcelulose de sódio a 1%, em tampão acetato 0,1 M (pH 5,0). O substrato (0,5 mL) foi colocado em tubos de ensaio, com posterior adição de 0,5 mL do extrato enzimático. A reação enzimática ocorreu a 50°C, durante 30 min. A seguir, a quantidade de glicose liberada foi dosada, também pela reação com DNSA. Para ambas atividades foram utilizados controles da reação colorimétrica (branco da enzima) e do substrato (branco da reação). As absorbâncias foram convertidas em glicose, mediante reta padrão previamente estabelecida. Uma unidade internacional (UI) de atividade de celulase foi definida como sendo equivalente a 1 µmol de glicose liberada por minuto.

Caracterização bioquímica

As análises envolvendo a caracterização bioquímica foram realizadas apenas para a atividade de CMCase, uma vez que por limitações técnicas não foi possível preparar o substrato para FPase em diferentes condições. O efeito do pH na atividade da celulase, foi avaliado pela determinação da atividade enzimática com o substrato específico, preparado em diferentes soluções tampões a 0,1 M: citrato de sódio (pH 3,0; 4,0), acetato (pH 4,0 e 5,0), citrato-fosfato (pH 5,0; 6,0 e 7,0) e Tris-HCl (pH 7,0; 8,0 e 9,0).

O efeito da temperatura na atividade da enzima foi determinado utilizando-se uma mistura reacional contendo o substrato específico (CMC) e a solução enzimática, incubada em diferentes temperaturas (30-80°C). Para a determinação da estabilidade térmica, a enzima foi pré-incubada em temperaturas entre 50°C e 80°C. O tempo de incubação foi de 180 minutos, retirando-se amostras a cada 60 min, para a realização da atividade enzimática, sendo os resultados expressos em atividade residual.

Resultados e Discussões

Os resultados obtidos da produção de celulase por FSq e FS e pelas duas linhagens de fungos *A. japonicus* URM5620 e *A. niger* URM5741 estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados da produção de celulase de *Aspergillus japonicus* URM5620 e *Aspergillus niger* URM5741 por diferentes processos fermentativos.

| Linhagem | Fermentação | CMCase (U/mL) | FPase(U/mL) |
|---------------------|-------------|---------------|-------------|
| <i>A. japonicus</i> | Submersa | 0,066 | 0,003 |
| URM5620 | Sequencial | 0,540 | 0,190 |
| <i>A. niger</i> | Submersa | 0,074 | 0,006 |
| URM5741 | Sequencial | 0,366 | 0,079 |

Fonte: Autor (2020)

Pode-se observar os valores das atividades para CMCase e FPase, bem como o desempenho de cada tipo de fermentação.

A FSq (combinação da FES e FS em um cultivo sequencial) para produção de celulase mostrou-se superior aos métodos convencionais (FES e FS) em separado. Também foi realizada a (FES), no entanto esta não apresentou atividade enzimática significativo, pois o fungo não foi capaz de hidrolisar o bagaço nas condições da FES.

A produção de celulase foi superior na fermentação sequencial para ambos os micro-organismos com valores de atividades CMCase de 0,540 U/mL para o *A. japonicus* e 0,366 U/mL para o *A. niger*, em comparação com FSm convencional, na qual a atividade FPase os valores obtidos foram 0,190 U/mL e 0,079 U/mL respectivamente, sugerindo o potencial da técnica como uma alternativa promissora para a produção de enzimas celulolíticas.

O método de cultivo sequencial melhorou tanto a assimilação do bagaço de cana-de-açúcar como substrato indutor, quanto a morfologia do crescimento fúngico conforme observado previamente por Cunha et al. (2012). A germinação do *A. japonicus* URM5620 e do *A. niger* URM5741 em meio sólido estimulou o desenvolvimento de uma forma com morfologia filamentososa dispersa, que resultou em interação célula-substrato superior e, conseqüentemente, na maior produção de celulase (FLORENCIO et al., 2016).

Uma possível explicação para o aumento na atividade celulolítica poderiam ser diferenças na morfologia dos fungos, como pode ser observado na Figura 2, pois, na FSq, houve uma predominância de micélios filamentosos dispersos, enquanto, no processo FSm convencional, houve formação precoce de pellets fúngicos. Cunha et al. (2014) relataram que *A. niger* também desenvolveu morfologia de crescimento filamentososo disperso sob cultivo FSq. Esta diferença na morfologia fúngica foi devido às condições de pré-cultura, pois, na FSq, o desenvolvimento celular começou em um meio sólido.

Outra possível razão para a maior atividade de celulase alcançada sob cultivo sequencial é que o meio sólido usado na etapa de pré-cultura de FES poderia atuar como um indutor para a produção de celulase durante o estágio inicial de desenvolvimento celular, contribuindo para a produção de enzimas (FLORENCIO et al., 2014).

No entanto, não é possível tirar conclusões mais precisas sobre a relação entre morfologia fúngica e produção de celulase, devido à existência de muitos outros fatores que podem influenciar o processo de cultivo.

Ahamed e Vermette (2009) quando avaliaram os efeitos da composição do meio de cultura sobre o crescimento, a morfologia dos micélios e a produção de celulase de *T. reesei* e encontraram uma correlação positiva entre o micélio total, o número de pontas e produtividade volumétrica da enzima.

Planejamento fatorial completo 2^3 para produção de celulase por fermentação sequencial

Os resultados obtidos no planejamento fatorial completo 2^3 para produção de celulase via fermentação sequencial utilizando a linhagem *A. japonicus* URM5620 encontram-se apresentados na Tabela 3. Os maiores valores para as atividades de CMCase e FPase foram 2,569 U/mL e 1,241 U/mL, respectivamente, ambas obtidas nas seguintes condições: 40 g/L glicose, 40 mL de meio líquido/g de substrato e uma concentração de inóculo de 10^8 esporos/mL.

Os resultados obtidos foram superiores aos obtidos por Cunha et al. (2012), utilizando fermentação sequencial com uma etapa adicional de um reator de coluna de bolhas para produção de endoglucanase por *A. niger* (1,052 U/mL). Os efeitos das variáveis independentes e das suas interações sobre a atividade CMCase podem ser observados a partir do gráfico de Pareto (Figura 3A). Verificou-se que as variáveis glicose e volume de meio/g de substrato foram as únicas variáveis independentes estatisticamente significativas, apresentando efeitos positivo e negativo, respectivamente.

A interação entre estas variáveis também foi significativa, apresentando efeito antagônico que pode ser visualizado a partir do diagrama de representação geométrica (Figure 3B). No qual pode ser observado que aumentos na concentração de glicose e diminuição no volume de meio líquido potencializaram a produção de CMCase. Além desta interação, observou-se que a concentração de inóculo e o volume de meio líquido/g de substrato (2×3) também foi estatisticamente significava com efeito antagônico.

O ensaio de atividade de papel filtro (FPase) é o método mais comum recomendado pela IUPAC. Esse ensaio da atividade difere da maioria dos ensaios enzimáticos baseados em substrato solúveis para as taxas de reações iniciais. Este ensaio é baseado em um grau fixo de conversão de glicose liberados a partir de 50 mg de papel de filtro, ou seja, as frações amorfas e cristalinas do substrato são hidrolisados dentro de um tempo fixo (DEMIREL, 2018).

Como pode ser observado no gráfico de Pareto para essa resposta (Figura 4), foi obtido um comportamento estatístico similar ao observado para a CMCase, no qual as mesmas variáveis independentes foram significativas bem como a sua interação, exceto a interação 2×3 .

Os resultados experimentais para a atividade CMCase e FPase foram estatisticamente analisadas obtendo as respostas dos efeitos das variáveis independentes.

A utilização de glicose como fonte de carbono favorece a respiração celular, as taxas de produção e melhoria no rendimento.

A concentração de glicose no meio exerce uma função regulamentadora importante no metabolismo do micro-organismo. Em um estudo da influência da glicose na produção de enzimas por *Aspergillus oryzae*, Fontana; Silveira (2012) observaram que o aumento da concentração de glicose de até 50 g/L em processos fermentativos favorecem a produção de enzimas.

Com relação ao volume de meio/g de substrato, não foram encontrados outros trabalhos que estudaram sua influência na produção de celulases.

Entretanto, os resultados obtidos e da análise estatística, para ambas as atividades, indicaram que, baixos volumes de meio líquido podem favorecer a produção da enzima, uma vez que evitam que esta seja diluída no próprio meio de cultivo.

A variável independente concentração de esporos, não se mostrou estatisticamente significativa em relação as atividades CMCase e FPase.

Quanto à estabilidade térmica da celulase, como pode ser observado na Figura 5B, verificou-se que nas temperaturas de 50°C e 70°C, mesmo após 180 min de incubação, a atividade enzimática se manteve com uma atividade residual superior a 90%, demonstrando a estabilidade da enzima quando submetida a altas temperaturas.

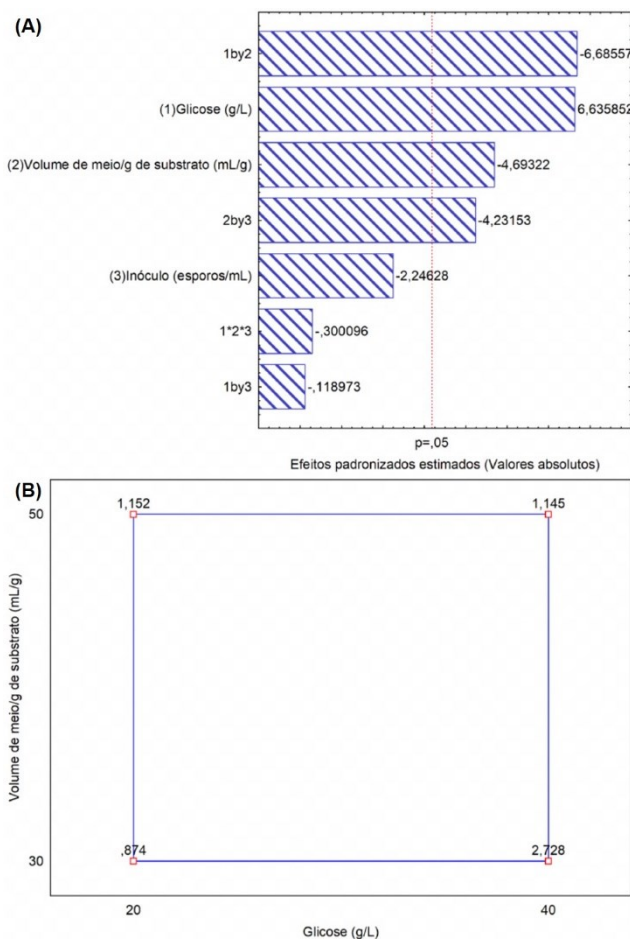
Esta alta termoestabilidade aliada com a alta atividade sob temperaturas brandas faz com que o biocatalisador obtido seja atrativo para utilizações por longos intervalos de tempo.

Prajapati et al. (2018) estudando a estabilidade térmica da celulase de *Aspergillus tubingensis* observou um comportamento qualitativo similar entre 50 e 70°C.

Tabela 3. Condições experimentais e resultados do planejamento fatorial completo 2^3 para produção de celulase por *Aspergillus japonicus* URM5620 através de fermentação sequencial utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato.

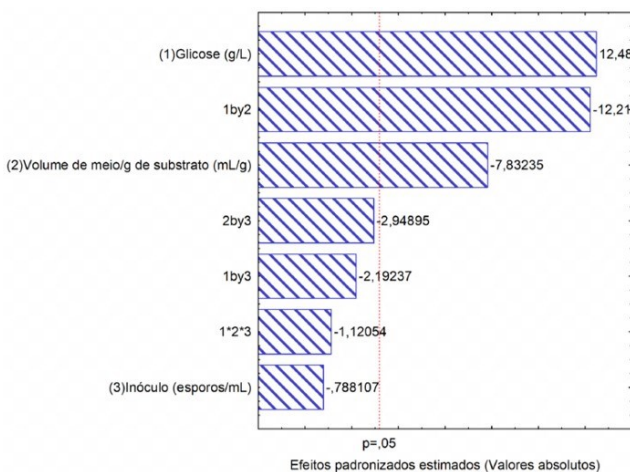
| Ensaio | Glicose (g/L) | Volume de meio/g de substrato (mL/g) | Inóculo (esporos/mL) | CMCase (U/mL) | FPase (U/mL) |
|--------|---------------|--------------------------------------|----------------------|---------------|--------------|
| 1 | 20 | 30 | 10^6 | 0,439 | 0,083 |
| 2 | 40 | 30 | 10^6 | 2,267 | 1,194 |
| 3 | 20 | 50 | 10^6 | 1,263 | 0,351 |
| 4 | 40 | 50 | 10^6 | 1,315 | 0,505 |
| 5 | 20 | 30 | 10^8 | 0,690 | 0,222 |
| 6 | 40 | 30 | 10^8 | 2,569 | 1,241 |
| 7 | 20 | 50 | 10^8 | 0,420 | 0,330 |
| 8 | 40 | 50 | 10^8 | 0,355 | 0,201 |
| 9 | 30 | 40 | 10^7 | 2,051 | 1,164 |
| 10 | 30 | 40 | 10^7 | 2,209 | 1,183 |
| 11 | 30 | 40 | 10^7 | 2,276 | 1,161 |
| 12 | 30 | 40 | 10^7 | 1,834 | 1,049 |

Figura 3. (A) Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis e (B) Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos da concentração de glicose e volume de meio líquido/g de substrato na atividade de CMCase da celulase produzidas por *Aspergillus japonicus* URM5620 por fermentação sequencial utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato.



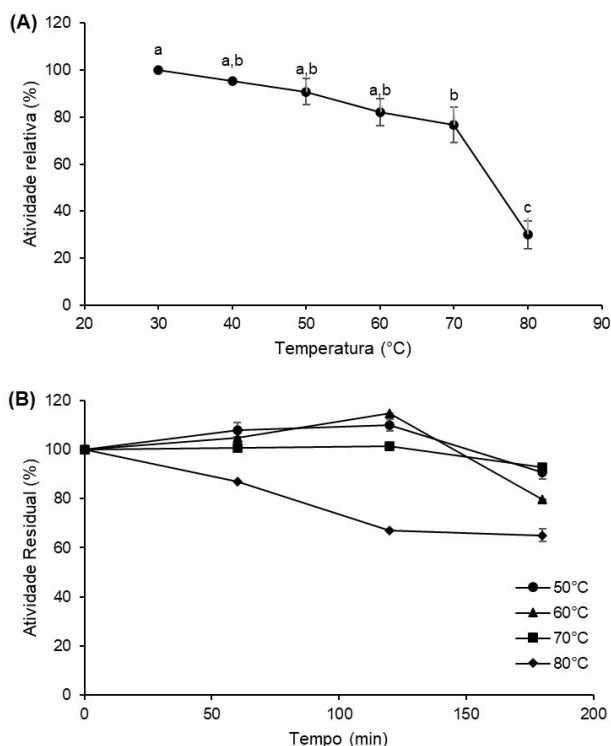
Fonte: Autor (2020)

Figura 4. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis na atividade de FPase da celulase produzidas por *Aspergillus japonicus* URM5620 por fermentação sequencial utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato.



Fonte: Autor (2020)

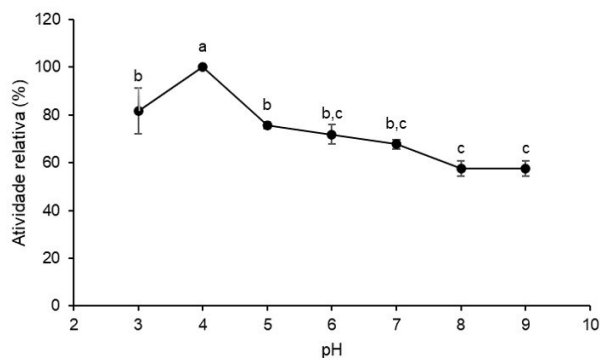
Figura 5. Efeito da temperatura na atividade (A) e estabilidade (B) da celulase produzidas por *Aspergillus japonicus* URM5620 através fermentação sequencial em termos da atividade de CMCCase. Diferentes letras (a-c) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os valores ($p < 0,05$).



Fonte: Autor (2020)

A definição do pH ótimo de uma enzima é muito importante, uma vez que valores de pH abaixo e/ou acima do valor ótimo requerido para a atividade enzimática, levam a sua inativação, influenciando os grupos ionizáveis das moléculas, alterando sua carga superficial (ROBINSON, 2015). O efeito do pH na atividade da celulase pode ser visualizado na Figura 6, sendo sua atividade máxima observada em pH 4,0. Estudos realizados por Florêncio et al. (2016) descreveram atividade máxima numa faixa de pH entre 3,5 e 5,5 para a celulases de *Trichoderma* sp. Semelhante comportamento foi descrito por Prajapati et al (2018) que apresentaram atividade ótima em pH 5,0 para a celulase de *A. tubingensis*.

Figura 6. Efeito do pH na atividade das celulases produzidas por *Aspergillus japonicus* URM5620 através fermentação sequencial em termos da atividade de CMCCase. Diferentes letras (a-c) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os valores ($p < 0,05$).



Fonte: Autor (2020)

Conclusão

A combinação da fermentação submersa (FS) e em estado sólido (FES) em um cultivo sequencial (FSq) para produção de celulase mostrou-se superior ao método de fermentação submersa convencional. Ao avaliar as variáveis envolvidas na produção de celulases por *A. japonicus* através de fermentação sequencial foi observada uma melhoria nas condições do processo fermentativo obtendo 1,241 U/mL e 2,569 U/mL das atividades de FPase e CMCase, respectivamente. Com relação às características das celulases produzidas, foi observada temperatura ótima numa faixa de 30-50°C e pH ótimo em 4,0. Além disso, a enzima apresentou-se estável entre 50°C a 70°C. Diante disso, pode-se concluir que a FSq apresentou grande potencial para produção de enzimas celulolíticas, melhorando a interação do bagaço de cana-de-açúcar com o inóculo, favorecendo a produção de celulase e possibilitando um melhor aproveitamento do resíduo. Além disso, a celulase termoestável obtida apresenta potencial para diversas aplicações industriais tais como para indústria de papel e celulose, de cosméticos, alimentos, bem como no aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais de natureza lignocelulósica, para a produção de biodiesel e bioetanol e biogás.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE/UAG) ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil) (471773/2013-1) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) (código financeiro: 23038.003634/2013-15), pelo o apoio financeiro que possibilitou a viabilidade desta pesquisa.

Referências

- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5979–5987, 2009.
- BEHERA, B. C. et al. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. Academy of Scientific Research & Technology, jun. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001>>
- CONAB. Cana-de- açúcar: Acompanhamento da safra brasileira 2018/2019. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 5, n. 4, p. 75, 2019.
- CUNHA, F. M. et al. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 270–274, 2012.
- CUNHA, F. M. et al. Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production. **Bioresource Technology**, v. 172, p. 249–252, 2014.
- DEMIREL, Y. Biofuels. **Comprehensive Energy Systems**, v. 1–5, p. 875–908, 2018.
- FLORENCIO, C. et al. Validation of a Novel Sequential Cultivation Method for the Production of Enzymatic Cocktails from *Trichoderma* Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 3, p. 1389–1402, 2014.
- FLORENCIO, C. et al. Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: Enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 90, p. 53–60, 2016.
- FLORES-MALTOS, D. A. et al. Typical mexican agroindustrial residues as supports for solid-state fermentation. v. 9, n. 3, p. 289–293, 2014.
- FOCKINK, D. H. et al. Enzymatic Hydrolysis of Steam-Treated Sugarcane Bagasse: Effect of Enzyme Loading and Substrate Total Solids on Its Fractal Kinetic Modeling and Rheological Properties. **Energy & Fuels**, v. 31, n. 6, p. 6211–6220, 15 jun. 2017.
- IDRIS, A. S. O. et al. Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 265–271, 2017.
- J. ABDULLAH, J.; GREETHAM, D. Optimizing Cellulase Production from Municipal Solid Waste (MSW) using Solid State Fermentation (SSF). **Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications**, v. 06, n. 03, 2016.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. Bioresource Technology A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste : Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 92–102, 2016.
- SAMANTA, S. et al. Characterization of *Trichoderma reesei* endoglucanase ii expressed heterologously in *Pichia pastoris* for better biofinishing and biostoning. **Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 518–525, 2012.
- SHER, H. et al. Optimization of cellulase enzyme production from *Aspergillus oryzae* for industrial applications. v. 2, p. 155–158, 2017.
- SILVA, A. F. V. et al. Cellulase production to obtain biogas from passion fruit (*Passiflora edulis*) peel waste hydrolysate. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 6, p. 103510, 2019.
- SINGHANIA, R. R. et al. **Industrial Enzymes**. In: ASHOK, P. et al. (Eds.). *Industrial Biorefineries & White Biotechnology*. 1. ed. Elsevier, 2015. p. 473–497.
- STERNBERG, D.; MANDELS, G. R. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. **Journal of Bacteriology**, v. 139, n. 3, p. 761–769, 1979.
- TANTAYOTAI, P. et al. Effect of Cellulase-producing Microbial Consortium on Biogas Production from Lignocellulosic Biomass. **Energy Procedia**, v. 141, p. 180–183, 2017.
- VISSER, E. M. et al. Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse from enzyme recycling. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2015.