

EFEITOS DA TEMPERATURA, CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO E TEMPO NA SÍNTESE DE CELULASES POR *Pleurotus ostreatus*.

Hernán D. Z. Zamora¹ (PQ), Jesús D. C. Medina¹ (PQ), Thiago A. L. Silva^{2*} (PG), Leandro H. R. Varão² (PG), Daniel Pasquini² (PQ), Milla A. Baffi² (PQ)

¹Universidad Mariana, *Campus* Maridiaz (Pasto – Colômbia); ²Universidade Federal de Uberlândia, *Campus* Santa Mônica.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas.

O trabalho teve como objetivo avaliar a influência da temperatura (T), concentração de substrato (CS) e tempo (t) sobre a síntese de endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidase sob condições de fermentação em estado sólido (FES) usando caules e folhas de *Alstroemeria* sp., através do crescimento do fungo *Pleurotus ostreatus* PLO6. Os experimentos foram conduzidos em erlenmeyers e em triplicata no Laboratório de Microbiologia do programa de Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Uberlândia. O estudo foi realizado através de um planejamento fatorial completo 2^3 , sendo as variáveis de resposta as atividades das enzimas celulolíticas mencionadas e os níveis dos fatores escolhidos foram T : 24 e 32 °C, CS : 20 e 30% e t : 8 e 15 dias. Os resíduos lignocelulósicos florais permitiram produzir enzimas celulolíticas, as quais têm aplicações biotecnológicas (biocombustíveis, biopolímeros, papel, etc.), uma vez que estas têm a função de desdobramento da celulose em moléculas mais simples. As atividades enzimáticas máximas foram atingidas na configuração $T = 24$ °C, $CS = 30\%$ e $t = 8$ dias para endoglucanases (18,6 U/g) e, $T = 24$ °C, $CS = 30\%$ e $t = 15$ dias para a β -glicosidase (18,5 U/g) e exoglucanases (11,0 U/g). Os resultados obtidos permitiram concluir que durante o crescimento do *P. ostreatus* sobre o substrato, que a variável com maior influência sobre a produção de celulases foi a temperatura, a qual teve um efeito positivo quando o nível se manteve em 24 °C. A pesquisa desenvolvida está relacionada com a busca de basidiomicetos que sintetizem celulases e com o aproveitamento de biomassas residuais de cadeias produtivas brasileiras a fim de propor novos substratos para serem usados na produção dessas enzimas.

Palavras-chave: Celulases; *Pleurotus ostreatus*; *Alstroemeria* sp.

Introdução

Os materiais vegetais residuais são classificados como um recurso limpo, abundante e renovável, sendo considerados fontes potenciais para obter diferentes tipos de produtos. Os principais componentes desses materiais lignocelulósicos (ou biomassa), são a celulose, as hemiceluloses e a lignina, os quais compõem grande parte da parede celular vegetal (SARKAR et al., 2012). Dentre todas as biomassas residuais disponíveis no Brasil, a proveniente da floricultura possui estrutura química lignocelulósica, o que permitiria contemplá-la como um potencial substrato para sintetizar diferentes tipos de enzimas, como as celulases (SARKAR et al., 2012).

No ano 2013, foram colhidos 13.500 ha de flores, dos quais gerou-se 1 tonelada de resíduos vegetais por hectare (ha) (SEBRAE, 2015). No Brasil, os resíduos florais são queimados, dispostos em aterros sanitários ou simplesmente destinados para compostagem de uma forma artesanal (JUNQUEIRA; DA SILVA, 2014). Nesse contexto, esta biomassa residual da floricultura brasileira pode ser, também, reaproveitada para produção de enzimas celulolíticas via fermentação em estado sólido (FES).

As enzimas celulolíticas denominadas celulases são enzimas que pertencem ao sistema hidrolítico responsável pela despolimerização da cadeia de celulose. A degradação desse polissacarídeo exige a participação sinérgica de três categorias de enzimas, sendo: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases ou celobiohidrolase (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases ou celobiasas (EC 3.2.1.21) (KHALIL et al. 2011). As endoglucanases são responsáveis da degradação da celulose amorfa formando novas extremidades redutoras e não redutoras, as

exoglucanases quebram as novas cadeias redutoras e não redutoras liberando celobiose e, por fim, a β -glicosidase desdobram a celobiose em glicose (QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2011).

Existem vários microrganismos capazes de produzir celulases, no entanto, o uso destas em escala industrial é restrito principalmente pelo custo de obtenção das mesmas, portanto a pesquisa de microrganismos com o potencial para produzir estas enzimas utilizando como substrato os resíduos agroindustriais mostra-se de extrema relevância, uma vez que tal ação pode promover a redução dos custos do processo, os quais são tidos como um dos principais gargalos tecnológicos em diferentes processos biotecnológicos, como na obtenção do etanol celulósico. Nessa perspectiva, este estudo objetivou avaliar a influência da temperatura, concentração de substrato e tempo sobre a produção de endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidase por FES usando o basidiomiceto *Pleorotus ostreatus* PLO6 e como substrato a flor *Alstroemeria* sp.

Materiais e Métodos

Os caules e as folhas de *Alstroemeria* sp. foram adquiridos da empresa UAI Flores, localizada a 15 km ao norte da cidade de Andradas, MG. Os resíduos florais foram secos ao sol e moídos até um tamanho de partícula inferior a 1,4 mm. Para o crescimento do microrganismo *P. ostreatus* PLO6, foram realizados repiques periódicos em Ágar Batata Dextrose (PDA), em pH 5,5 a 28 °C.

A capacidade do *P. ostreatus* PLO6 para sintetizar celulases a partir dos resíduos mencionados foi avaliada em dois níveis de temperaturas (T): 24 e 32 °C, duas concentrações de substrato (CS): 20 e 30% (m/m) e em dois tempos de fermentação (t): 8 e 15 dias. Um planejamento fatorial completo 2^3 foi realizado em triplicata, onde as variáveis de resposta foram as atividades enzimáticas em U/g. Cada experimento foi realizado em erlenmeyers de 250 mL pela técnica de fermentação em estado sólido (FES), em pH 5,5 e utilizando como inóculo 5 discos miceliais de 8 dias de crescimento (8 mm de diâmetro).

Para a extração das enzimas, em cada um dos frascos fermentados foram adicionados 50 mL de água destilada e homogeneizados durante 1 hora a 200 rpm e temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram filtradas em tecido tipo *vual*, centrifugadas a 2000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi filtrado novamente em papel filtro. As atividades da endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidase, foram determinadas pelo método espectrofotométrico usando, respectivamente, como substratos carboximetilcelulose, avicel e p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (PNPG) (TEIXEIRA; WENDLING, 2014).

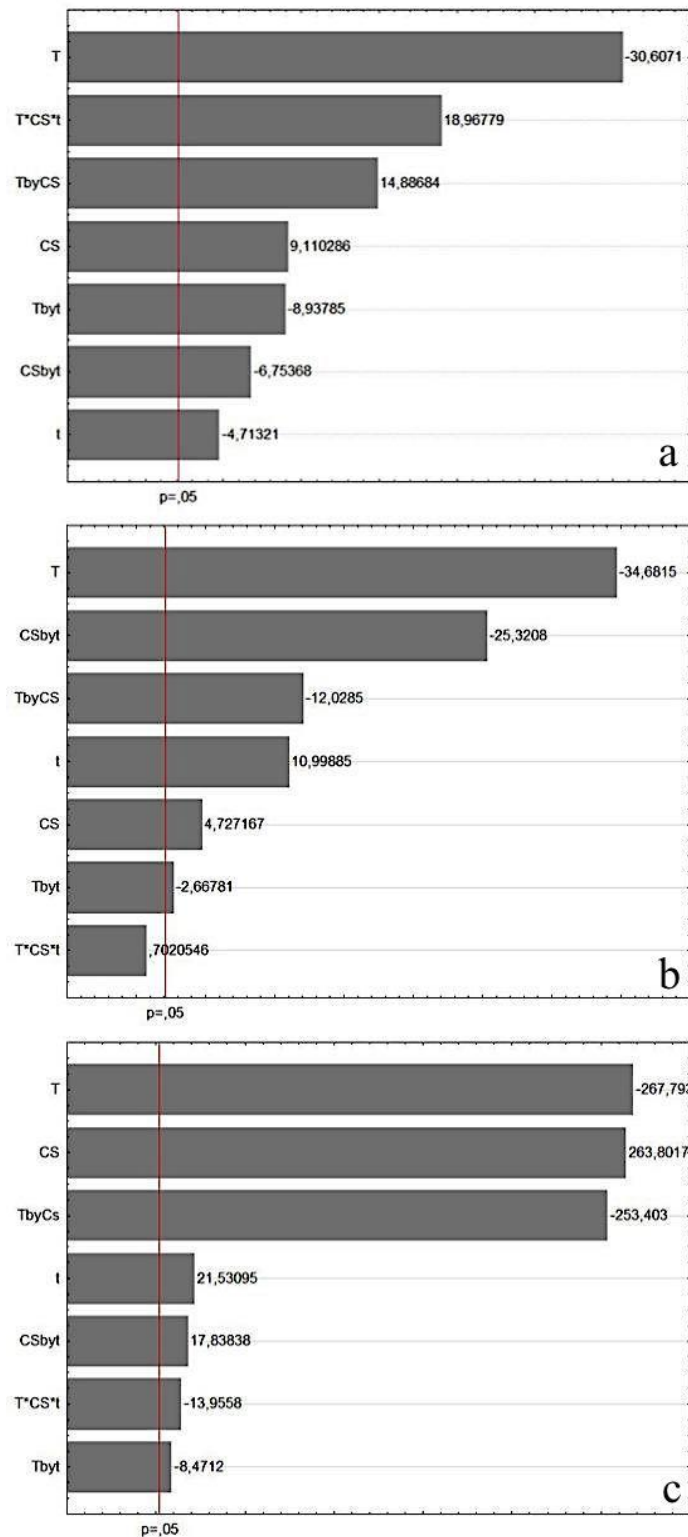
Resultados e Discussão

A Figura 1 evidencia a influência dos fatores temperatura (T: 24 e 32), tempo (t: 8 e 15 dias) e concentração de substrato (CS: 20 e 30%), sobre a síntese de endoglucanases (a), exoglucanases (b) e β -glicosidase (c). Observa-se que a variável com maior influência nas atividades celulolíticas foi a T, a qual tem um efeito positivo na obtenção das três celulases quando o nível do fator se mantém a 24 °C (barra com maior tamanho e valor negativo na Figura 1). Este resultado confere que o crescimento e a síntese de enzimas do *P. ostreatus*, durante FES são favoráveis a T próximas de 25 °C, enquanto que em T superiores de 35 °C o basidiomiceto tem baixo crescimento e acima de 40 °C o fungo não consegue crescer (KHALIL *et al.*, 2011).

Outro fator que influenciou de forma significativa a síntese de celulases foi a CS, a qual exibiu um efeito potencializador sobre a produção enzimática quando o nível foi mantido em 30% (valor positivo junto à barra de significância do fator). No trabalho de Koutrotsios *et al.* (2014) utilizou-se CS entre 30 e 35% em experimentos de FES com *P. ostreatus* (linhagem LGAM IK1123), e

observou-se a redução do teor de celulose, o que permite dizer que estas configurações experimentais de CS potencializam a produção de celulases por esse basidiomiceto. A variável tempo (t), mostrou efeito significativo sobre a produção de endoglucanases em nível baixo (8 dias). Já a produção de exoglucanases e β -glicosidase foi potencializada em maiores períodos de tempo (15 dias).

Figura 1 – Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores temperatura (T), tempo (t) e concentração de substrato (CS), sobre a síntese de endoglucanases (a), exoglucanases (b) e β -glicosidase (c) (nível de significância de $p=0,05$).



Fonte: Elaboração própria.

Considerando as análises estatísticas obtidas através dos gráficos de pareto, as atividades enzimáticas máximas foram atingidas na configuração $T = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{CS} = 30\%$ e $t = 8$ dias para endoglucanases (18,6 U/g) e $T = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{CS} = 30\%$ e $t = 15$ dias para a β -glicosidase (18,5 U/g) e exoglucanases (11,0 U/g).

Por outro lado, as interações de segunda e terceira ordem que têm valores negativos respondem teoricamente a um efeito antagônico sobre as variáveis de resposta quando os níveis dos efeitos de primeira ordem são mantidos conforme à configuração apresentada anteriormente. A este tipo de comportamento pertencem os efeitos dos fatores T e t , e , CS e t para endoglucanases; CS e t , CS e T , e , T e t para exoglucanases e T e CS , e , T e t e CS para β -glicosidase. Estes efeitos podem ser atribuídos à pouca significância exibida pelo fator t , a qual pode ser resultado da estreita faixa de tempo utilizada, neste estudo, para avaliar a produção das celulases.

Conclusões

Foram produzidas enzimas celulolíticas de forma simultânea a partir de resíduos da flor *Alstroemeria sp.* por meio do crescimento do basidiomiceto *P. ostreatus* PLO6 em fermentação em estado sólido. Sob as condições avaliadas, o fator com maior significância na síntese destas enzimas foi a temperatura, apresentando o maior nível de influência quando os experimentos foram conduzidos a baixa temperatura. A variável que teve a menor efeito significativo sobre a produção de celulases foi o tempo, isto ocorreu provavelmente porque a avaliação de produção das celulases foi realizada em um curto intervalo de tempo.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Catarina Megumi Kasuya do Laboratório de Associações Micorrízicas, Departamento de Microbiologia do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro) da Universidade Federal de Viçosa por ceder o *P. ostreatus* PLO6.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

À Organização dos Estados Americanos (OEA), pela bolsa de mestrado concedida ao autor principal deste trabalho.

Referências Bibliográficas.

JUNQUEIRA, A. H.; DA SILVA, M. P. O setor produtivo de flores e plantas ornamentais do Brasil, no período de 2008 a 2013. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 20, n. 2, p. 115-120, 2014.

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

KOUTROTSIOS, G. et al. Bioconversion of lignocellulosic residues by *Agrocybe cylindracea* and *Pleurotus ostreatus* mushroom fungi—Assessment of their effect on the final product and spent substrate properties. **Food Chemistry**, v. 161, p. 127-135, 2014.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; FOLCH-MALLOL, J. L. Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. **Biotecnologia Aplicada**, v. 28, n. 4, p. 205-215, 2011

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

SEBRAE. **Flores e Plantas Ornamentais do Brasil**. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas - SEBRAE. Brasília, 2015. v. 2, p. 100, Disponível em: < <http://bit.ly/2xVTq2M> >. Acesso em: 02 set. 2017.

TEIXEIRA, B. R.; WENDLING, B. **Solos nos biomas brasileiros: Sustentabilidade e mudanças climáticas** Uberlândia: Editora UFU (Universidade Federal de Uberlândia), 2014. 337 p..