



RENATA DANIELLE DE SOUZA BARTOLOMEU

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SORGO SACARINO POR
ENZIMAS PRODUZIDAS EM MONO E COCULTIVO ENTRE
FUNGOS E ACTINOBACTÉRIAS**

**LAVRAS-MG
2022**

RENATA DANIELLE DE SOUZA BARTOLOMEU

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SORGO SACARINO POR ENZIMAS PRODUZIDAS
EM MONO E COCULTIVO ENTRE FUNGOS E ACTINOBACTÉRIAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Ederson da Conceição Jesus
Orientador
Dr. Ivanildo Evódio Marriel
Dra. Maria Lúcia Ferreira Simeone
Dr. Félix Gonçalves de Siqueira
Coorientador (a)

**LAVRAS-MG
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Bartolomeu, Renata Danielle de Souza.

Hidrólise enzimática de sorgo sacarino por enzimas produzidas em mono e cocultivo entre fungos e actinobactérias / Renata Danielle de Souza Bartolomeu. - 2022.

140 p.

Orientador(a): Ederson da Conceição Jesus.

Coorientador(a): Ivanildo Evódio Marriel, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Félix Gonçalves de Siqueira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Sacarificação. 2. Coquetel enzimático. 3. Substratos hemice-lulósicos. I. Jesus, Ederson da Conceição. II. Marriel, Ivanildo Evódio. III. Simeone, Maria Lúcia Ferreira. IV. Siqueira, Félix Gonçalves.

RENATA DANIELLE DE SOUZA BARTOLOMEU

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SORGO SACARINO POR ENZIMAS
PRODUZIDAS EM MONO E COCULTIVO ENTRE FUNGOS E
ACTINOBACTÉRIAS**

**ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SWEET SORGHUM BY ENZYMES
PRODUCED IN MONO AND COCULTURE BETWEEN FUNGI AND
ACTINOBACTERIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 19 de dezembro de 2022.

Dra. Rosane Freitas Shaw, UFLA

Dra. Maria Lúcia Ferreira Simeone, Embrapa Milho e Sorgo

Dr. Ederson da Conceição Jesus

Prof. Dr. Ederson da Conceição Jesus
Orientador(a)

Dr. Ivanildo Evódio Marriel

Dra. Maria Lúcia Ferreira Simeone

Dr. Félix Gonçalves de Siqueira

Coorientador(a)

**LAVRAS-MG
2022**

*Ao Senhor de todas as obras, as conhecidas e as desconhecidas. O qual ensina a sabedoria
àqueles que cooperam naquilo que Ele opera.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pois sei quem Ele é, e sei quem eu sou.

Agradeço ao meu amado esposo sem o qual, não subiria tantos degraus na minha vida. Eu te amo.

Agradeço aos meus pais, irmãos e familiares por acreditarem em mim.

Agradeço, com imenso carinho a Joice, que sem me conhecer abriu as portas da sua casa e da sua vida para me receber e foi a pessoa mais nobre que o Mestrado me deu.

Agradeço ao Rubén Dario Gomes, por ser sempre solícito e dedicado.

Agradeço as minhas colegas de turma, Renata, Stefany e Mayara. Obrigada por tornar a jornada mais leve e alegre.

Agradeço aos amigos, Carlos Godinho, Cibelli Castro, Lucas Camargo, Tatiane Junqueira, Matheus, Mayara e ao Técnico Carlinhos, por serem resposta de oração na minha vida, e deixarem a pandemia menos fria e solitária. Só Deus sabe como foi importante ter vocês por perto.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos Solos da Embrapa Milho e Sorgo Gisele Diniz, Tales, Vitória, Fernanda, Camila, Denise, Vitor, Alexson, Carol e as analistas Fabiane e Cristiane por sua dedicação com minha vida.

Agradeço aos colegas da Embrapa Agroenergia, Guilherme, Aparecido, Maria, Jéssica e a Analista Thais Demarchi que contribuíram para que esse trabalho fosse realidade. Só Deus para recompensá-los como eu gostaria.

Agradeço aos professores Wasley, Gabriela e Victor Pylro por me inspirarem, muito além da disciplina.

Agradeço, em especial, aos professores Eustáquio Dias e Rosane Schaw por sua amizade, carinho e dedicação.

Agradeço as amigas Ana Paula, Mikaely, Simone e Lucy pelo teto, a comida quentinha, as longas conversas de madrugada e pelo carinho com que sempre me receberam.

Agradeço a Universidade Federal de Lavras por serem uma instituição comprometida com a qualidade de ensino.

Agradeço ao Programa de Microbiologia Agrícola por tornar real o sonho do Mestrado.

Agradeço a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Milho e Sorgo e Agroenergia por oferecem estrutura necessária ao desenvolvimento da pesquisa e receberem um peixe em um tanque de tubarões.

Agradeço a Capes pelo apoio financeiro concedido.

Agradeço ao meu orientador e coorientadores, Ederson da Conceição Jesus, Ivanildo Evódio Marriel, Maria Lúcia Ferreira Simeone e Félix Gonçalves de Siqueira. As figuras mais generosas e competentes que conheci, motivo de inspiração e orgulho para mim.

RESUMO GERAL

O presente estudo avaliou a eficácia de enzimas produzidas por microrganismos em mono e cocultivo entre fungos e actinobactérias na hidrólise da biomassa de sorgo sacarino cultivar CMSXS5021 pré-tratada quimicamente por ácido e base diluídos visando a produção de etanol de segunda geração. Além disso, objetivou-se caracterizar a biomassa de sorgo para obter o rendimento na conversão de açúcares. Cinquenta e quatro actinobactérias foram testadas para produção da xilanase em meio sólido. Destas, dezessete produziram xilanase e foram testadas em sua capacidade de produção de xilanase, FPase e endoglicanase em cultivo submerso. A melhor cepa produtora de xilanase foi *S. copoamus*, produzindo 24 UI. mL⁻¹. Para FPase, *Streptomyces* sp. apresentou a maior produção, com 1,12 UI. mL⁻¹ e, para a endoglicanase, a melhor produtora foi *S. ossamyceticus* com 0,99 UI. mL⁻¹. Ao utilizar-se o sorgo sacarino como substrato, *S. curacoi*, *S. ossamyceticus* e *S. copoamus* apresentaram atividades da xilanase de 4,5 UI. mL⁻¹, 4,4 UI. mL⁻¹ e 0,8 UI. mL⁻¹, respectivamente. Não foi detectada a atividade de FPase nas condições do ensaio para nenhuma das actinobactérias. Seis actinobactérias foram selecionadas para o cocultivo, a saber: *Streptomyces* sp., *S. curacoi*, *S. ossamyceticus*, *S. copoamus*, *S. chiangmaiensis*, *S. thiolutheus* entre as actinobactérias. Os fungos utilizados foram: *Aspergillus terreus*, *Aspergillus acculeatus*, *Trichoderma reesei*, *Panus lecomtei*, *Fistulina hepatica* e *Flavodon flavus*. Os microrganismos foram cultivados em sistema de mono e cocultivo em placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA). *S. curacoi* foi a actinobactéria que apresentou melhor sinergismo com os fungos. O extrato bruto apresentou atividade de 0,48 UI. mL⁻¹ para FPase no cocultivo entre *S. curacoi* e *T. reesei*. Para endoglicanase, a maior produção ocorreu no cocultivo entre *S. curacoi* e *T. reesei*, com 0,95 UI. mL⁻¹. Para a β-glicosidase, a maior produção ocorreu no cocultivo entre *S. curacoi* e *A. acculeatus* com 0,85 UI. mL⁻¹. A maior atividade de endo-xilanase foi observada no monocultivo de *T. reesei* com 2,06 UI. mL⁻¹. Por fim, as atividades de lacase, peroxidases totais e proteases foram inferiores a 1 UI. mL⁻¹. Na comparação dos extratos em co-cultivo com os coquetéis comerciais Accellerase® 1500, Cellic CTec3®, Celumax C e Celluclast®, não houve diferença estatística para Accellerase® 1500 com 22 g. L⁻¹ representando um rendimento de 48% de glicose liberada no ensaio, seguido de Cellic CTec3® com 19 g. L⁻¹ e 40% de rendimento e o extrato bruto do cocultivo entre *S. curacoi* (AMSJ45) e *T. reesei* com 18 g. L⁻¹ e 39% de rendimento de glicose. Concluímos que (1) actinobactérias têm potencial para a produção de xilanases para uso na indústria agrícola; (2) a cocultura entre fungos e actinobactérias mostrou ser promissora para processos que necessitam de enzimas hidrolíticas; e (3) a biomassa de sorgo sacarino pode ser usada como substrato para a obtenção de enzimas e açúcares para fermentação quando sacarificada por extratos brutos enzimáticos e coquetéis comerciais.

Palavras chave: Sacarificação. Coquetel enzimático. Substratos hemicelulósicos. Etanol 2G. Enzimas.

GENERAL ABSTRACT

The present study evaluated the effectiveness of enzymes produced by microorganisms in mono and co-cultures between fungi and actinobacteria to hydrolyze the biomass of sweet sorghum cultivar CMSXS5021 chemically pre-treated with diluted acid and base aiming at the production of second-generation ethanol. In addition, the sorghum biomass was characterized to obtain the yield in the conversion of sugars. Fifty-four actinobacteria were tested for xylanase production in solid media. Seventeen produced xylanase and were tested for their ability to produce xylanase, FPase, and endoglycanase in submerged culture. The best xylanase-producing strain was *S. copoamus*, producing 24 IU. ml⁻¹. *Streptomyces* sp. had the highest FPase production, with 1.12 IU. mL⁻¹ and *S. ossamyceticus* was the best endoglycanase producer, with 0.99 IU. mL⁻¹. When using sweet sorghum as substrate, *S. curacoii*, *S. ossamyceticus*, and *S. copoamus* showed xylanase activities of 4.5 IU. mL⁻¹, 4.4 IU. mL⁻¹ and 0.8 IU. mL⁻¹, respectively. No FPase activity was detected under assay conditions for any actinobacteria. Six actinobacteria were selected in co-cultivation, namely: *Streptomyces* sp., *S. curacoii*, *S. ossamyceticus*, *S. capoamus*, *S. Chiangmaiensis*, and *S. thiolutheus*. The fungi used were: *Aspergillus terreus*, *Aspergillus acculeatus*, *Trichoderma reesei*, *Panus lecomtei*, *Fistulina hepatica* and *Flavodon flavus*. The microorganisms were cultivated in a mono and co-culture system in Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) medium. *S. curacoii* showed the best synergism with fungi. The crude extract of the co-culture between *S. curacoii* and *T. reesei* showed an FPase activity of 0.48 IU. mL⁻¹. The highest endoglycanase production occurred in the co-culture between *S. curacoii* and *T. reesei*, with 0.95 IU. mL⁻¹. For β -glucosidase, the highest production occurred in the co-culture between *S. curacoii* and *A. acculeatus*, with 0.85 IU. mL⁻¹. The highest endo-xylanase activity was observed in *T. reesei* monoculture, with 2.06 IU. mL⁻¹. Finally, the activities of laccase, total peroxidases, and proteases were less than 1 IU. mL⁻¹. When comparing the extracts in co-culture with the commercial cocktails Accellerase® 1500, Cellic CTec3®, Celumax C, and Cellumax®, no statistical difference was observed for Accellerase® 1500, with 22 g. L⁻¹, representing a 48% yield of glucose. Cellic CTec3® followed it with 19 g. L⁻¹ and 40% yield, and the crude extract of the co-cultivation between *S. curacoii* and *T. reesei* with 18 g. L⁻¹ and 39% glucose yield. We conclude that (1) actinobacteria have the potential to produce xylanases for use in the agricultural industry; (2) co-culture between fungi and actinobacteria has shown to be promising for processes that require hydrolytic enzymes; and (3) sweet sorghum biomass can be used as a substrate for obtaining enzymes and sugars for fermentation when saccharified by crude enzymatic extracts and commercial cocktails.

Keywords: Saccharification. Enzymatic cocktail. Hemicellulosic substrates. 2G Ethanol. Enzymes.

LISTA DE SIGLAS

| | |
|----------------------|---|
| ABTS | Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino- 6sulfônico) |
| AIL | <i>Acid-insoluble lignin</i> - Lignina Insolúvel em Ácido |
| ANP | Agência Nacional do Petróleo |
| ASL | <i>Acid Soluble Lignin</i> - Lignina Solúvel em Ácido |
| BDA | Batata Dextrose Ágar |
| BPC | <i>Bioprocess Consolidated</i> - Bioprocesso consolidado |
| CAZymes | <i>Carbohydrate-Active enZymes</i> - Enzimas ativas no metabolismo de carboidratos |
| CBIO | Créditos de Descarbonização |
| CGEE | Centro de Gestão e Estudos Estratégicos |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| CMcase | Carboximetilcelulase |
| CMMAABio | Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias |
| CMMF – MS | Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo |
| CONAB | Companhia Nacional de Abastecimento |
| COP | <i>Conference of the Parties</i> - Conferência das Partes |
| CTC | Centro de Tecnologia Canavieira |
| E1G | Etanol de primeira geração |
| E2G | Etanol de segunda geração |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| EPE | Empresa de Pesquisa Energética |
| FPU | <i>Filter Paper Units</i> - Unidades de Papel Filtro |
| GEE | Gases do efeito estufa |
| Gg CO ₂ e | Giga equivalente de CO ₂ |
| GH | Glicosil Hidrolases |
| IAC | Instituto Agronômico de Campinas |
| ICRISAT | <i>International Crops Research Institute For The Semi-arid Tropics</i> - Instituto Internacional de Pesquisa de Culturas para os Trópicos e Semi-árido |

| | |
|-----------|--|
| IE | Índice Enzimático |
| IUBMB | União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular |
| LiP | Lignina Peroxidases |
| MME | Ministério de Minas e Energia |
| MnP | Peroxidases de Manganês |
| NREL | <i>National Renewable Energy Laboratory</i> - Laboratório Nacional de Energia Renovável |
| ODS | Objetivo de Desenvolvimento Sustentável |
| RenovaBio | Política Nacional de Biocombustíveis |
| SHF | <i>Sequential Hydrolysis and Fermentation</i> - Hidrólise enzimática separada da fermentação |
| SmF | <i>Submerged fermentation</i> - Fermentação em estado submerso |
| SSCF | <i>Simultaneous Saccharification and co-fermentation</i> - Hidrólise enzimática e co-fermentação simultâneas |
| SSF | <i>Simultaneous Saccharification and Fermentation</i> - Fermentação e Sacarificação Simultâneas |
| SSF | <i>Solid State Fermentation</i> – Fermentação em estado sólido |
| UI | Unidade Internacional de Atividade Enzimática |
| US-EPA | <i>United States Environmental Protection Agency</i> - Agência Norte-Americana de Proteção Ambiental |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Conversão de material lignocelulósico em biocombustível. | 24 |
| Figura 2: Evolução da mecanização da colheita da cana de açúcar | 26 |
| Figura 3: Total de emissão de gases de efeito estufa (GgCO ₂ e) pela queima de resíduos agrícolas apresentados para o período de 1990 a 2016. | 27 |
| Figura 4: Exemplos de cultivos de cana de açúcar sem a manutenção da palha (A) e com a manutenção da palha (B). | 27 |
| Figura 5: Evolução da área colheita e produção de cana de açúcar nos estados do Brasil. | 29 |
| Figura 6: Crescimento total da produção de biocombustíveis por região, caso principal, 2021 | 30 |
| Figura 7: Fluxograma das possíveis opções de processamento do sorgo sacarino | 33 |
| Figura 8: Comparação entre a área potencialmente apta para o plantio de sorgo sacarino e as áreas estabelecidas de cultivo de cana-de-açúcar no Brasil. | 34 |
| Figura 9: Estrutura da Lignocelulose | 36 |
| Figura 10: Pré-tratamento da biomassa..... | 39 |
| Figura 11: Hidrólise enzimática separada da fermentação (SHF)..... | 42 |
| Figura 12: Hidrólise enzimática e fermentação simultâneas (SSF) | 43 |
| Figura 13: Hidrólise enzimática e co-fermentação simultâneas (SSCF)..... | 44 |
| Figura 14: Bioprocesso consolidado (BPC)..... | 45 |
| Figura 15: Expectativa relacionada ao custo relativo (%) de produção de E2G..... | 46 |
| Figura 16: Atividade enzimática na degradação da biomassa..... | 47 |
| Figura 17: Atividade de xilanase na cadeia hemicelulósica..... | 48 |
| Figura 18: Reativação dos isolados actinobacterianos..... | 72 |
| Figura 19: Halos de hidrólise em meio sólido contendo Xilano como única fonte de carbono | 73 |
| Figura 20: Atividade enzimática de xilanase em cultivo submerso contendo xilano como única fonte de carbono..... | 75 |
| Figura 21: Fermentação submersa de actinobactérias..... | 76 |
| Figura 22: Atividade enzimática para xilanase | 77 |
| Figura 23: Atividade de FPase por actinobactérias..... | 78 |

| | |
|---|-----|
| Figura 24: Atividade de endoglicanase por actinobactérias..... | 78 |
| Figura 25: Esquema de cocultivo microbiano em placa de Petri contendo meio sólido (BDA) | 92 |
| Figura 26: Representação gráfica das possíveis interações microbianas | 92 |
| Figura 27: Representação da linha do tempo do cocultivo entre fungos filamentosos e actinobactérias | 95 |
| Figura 28: Dinâmica de crescimento do cocultivo entre actinobactérias e fungos filamentosos | 97 |
| Figura 29: Interação do crescimento entre actinobactérias e fungos filamentosos em meio sólido BDA..... | 98 |
| Figura 30: Frequência quanto a ocorrência das interações entre actinobactérias e fungos filamentosos quando cocultivados em placa de Petri contendo meio BDA | 100 |
| Figura 31: Atividade enzimática de celulases totais ou FPase..... | 101 |
| Figura 32: Atividade enzimática de endoglicanase..... | 102 |
| Figura 33: Atividade enzimática de β -glicosidase | 103 |
| Figura 34: Atividade enzimática de lacase..... | 104 |
| Figura 35: Atividade enzimática de peroxidases totais | 105 |
| Figura 36: Atividade enzimática de protease | 105 |
| Figura 37: Atividade enzimática de xilanase | 106 |
| Figura 38: Esquema de pré-tratamento ácido da biomassa de sorgo sacarino | 117 |
| Figura 39: Esquema do pré-tratamento básico da biomassa de sorgo sacarino | 118 |
| Figura 40: Frações da biomassa de sorgo sacarino in natura após pré-tratamentos e sem pré-tratar..... | 119 |
| Figura 41: Hidrólise enzimática de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido/base).124 | |
| Figura 42: Concentração de glicose liberada durante a hidrólise enzimática utilizando os extratos brutos dos monocultivos e cocultivos dos fungos filamentosos e <i>S. curacoi</i> (AMSJ45), durante 48 horas..... | 127 |
| Figura 43: Correlação entre as atividades enzimáticas | 128 |
| Figura 44: Concentração de glicose liberada durante a hidrólise enzimática utilizando enzimas comerciais e extrato bruto enzimático de <i>T. reesei</i> (T.r) e <i>S. curacoi</i> , durante 48 horas. | 130 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1: Relação das actinobactérias utilizadas. | 68 |
| Tabela 2: Relação dos isolados de Actinobactérias da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF-MS) selecionados pelo índice enzimático (IE). | 74 |
| Tabela 3: Atividade enzimática de actinobactérias em meio contendo xilano como única fonte de carbono. | 77 |
| Tabela 4: Atividade de enzima xilanase produzida por actinobactérias utilizando sorgo sacarino como única fonte de carbono | 79 |
| Tabela 5: Microrganismos utilizados nos experimentos de mono e cocultivo para obtenção de extratos brutos enzimáticos. | 91 |
| Tabela 6: Modelos de interação entre microrganismos crescidos em placa..... | 93 |
| Tabela 7: Tipos de interação do cocultivo entre fungos filamentosos e actinobactérias..... | 99 |
| Tabela 8: Carga de enzimas comerciais utilizada nos ensaios de hidrólise enzimática de bagaço de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido/base). | 122 |
| Tabela 9: Carga de enzimas do extrato bruto enzimático utilizado nos ensaios de hidrólise do bagaço de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido/base). | 123 |
| Tabela 10: Composição química estrutural da biomassa de sorgo sacarino. | 126 |
| Tabela 11: Rendimento da concentração de glicose do hidrolisado de biomassa de sorgo sacarino..... | 129 |
| Tabela 12: Rendimento de glicose liberada da sacarificação enzimática da biomassa de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido/base) utilizando enzimas comerciais e extrato bruto enzimático..... | 130 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 17 |
| 2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO | 20 |
| 3 CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA..... | 21 |
| 3.1 Cenário bioenergético no Brasil..... | 21 |
| 3.2 Etanol de segunda geração | 23 |
| 3.2.1 Biomassa – matéria prima do E2G | 24 |
| 3.2.2 Composição lignocelulósica | 35 |
| 3.2.3 Degradação lignocelulósica..... | 37 |
| 3.2.4 Pré-tratamentos..... | 38 |
| 3.2.5 Sacarificação da biomassa..... | 40 |
| 3.2.6 Enzimas para hidrólise de material lignocelulósico | 45 |
| 3.3 Microrganismos e a produção enzimática | 49 |
| 3.3.1 Obtenção de enzimas por fermentação em estado sólido e submerso..... | 53 |
| 4 OBJETIVO GERAL | 54 |
| 4.1 Objetivos específicos..... | 54 |
| REFERÊNCIAS | 55 |
| 4 CAPÍTULO II: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS PARA PRODUÇÃO DE XILANASES E CELULASES..... | 66 |
| 6.1 INTRODUÇÃO | 66 |
| 6.2 MATERIAL E MÉTODOS | 68 |
| 6.2.1 Microrganismos utilizados | 68 |
| 6.2.2 Reativação e teste de pureza dos isolados | 69 |
| 6.2.3 Teste da capacidade de uso de xilano como fonte de carbono..... | 70 |
| 6.2.4 Avaliação da atividade enzimática em meio líquido..... | 70 |
| 6.2.5 Determinação enzimática | 71 |
| 6.3 Análise de dados | 71 |

| | |
|--|-----------|
| 6.4 RESULTADOS | 72 |
| 6.4.1 Reativação e teste de pureza dos isolados. | 72 |
| 6.4.2 Avaliação da atividade enzimática em meio sólido | 72 |
| 6.4.3 Atividade enzimática em cultivo submerso utilizando xilano como única fonte de carbono | 74 |
| 6.4.4 Atividade enzimática em cultivo submerso utilizando biomassa de sorgo sacarino como única fonte de carbono..... | 76 |
| 6.5.1 Produção de xilanase em meio sólido e submerso utilizando xilano como única fonte de carbono. | 80 |
| 6.5.2 Avaliação da atividade enzimática de actinobactérias utilizando biomassa de sorgo sacarino como única fonte de carbono | 81 |
| 6.6 CONCLUSÕES | 85 |
| REFERÊNCIAS | 86 |
| 5 CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM MONO E COCULTIVO DE FUNGOS E ACTINOBACTÉRIAS | 90 |
| 7.1 INTRODUÇÃO | 90 |
| 7.2 METODOLOGIA | 91 |
| 7.2.1 Microrganismos utilizados | 91 |
| 7.2.2 Interação de crescimento dos fungos filamentosos e actinobactérias em placas de Petri | 91 |
| 7.2.3 Mono e cocultivos entre fungos filamentosos e actinobactérias em fermentação submersa. | 93 |
| 7.2.4 Enzimas holocelulolíticas | 94 |
| 7.2.5 Enzimas Ligninolíticas | 95 |
| 7.2.6 Atividade de protease | 96 |
| 7.3 Análise de dados. | 96 |
| 7.4 RESULTADOS | 96 |
| 7.4.1 Avaliação de interação do crescimento entre fungos filamentosos e actinobactérias. | 96 |
| 7.4.2 Actinobactérias e fungos filamentosos: mono e cocultivo submerso e atividades enzimáticas | 100 |

| | |
|---|------------|
| 7.5 DISCUSSÃO | 106 |
| 7.6 CONCLUSÕES..... | 110 |
| REFERÊNCIAS | 111 |
| 6 CAPÍTULO IV. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SORGO SACARINO PRÉ TRATADO QUIMICAMENTE USANDO ENZIMAS COMERCIAIS E EXTRATO BRUTO DE <i>S. curacoi</i> E FUNGOS FILAMENTOSOS..... | 114 |
| 8.1 INTRODUÇÃO | 114 |
| 8.2 METODOLOGIA..... | 116 |
| 8.2.1 Biomassa vegetal | 116 |
| 8.2.2 Pré-tratamento químico da biomassa (Ácido e básico) | 116 |
| 8.2.3 Catalizadores biológicos: extratos brutos enzimáticos e comerciais..... | 119 |
| 8.2.4 Hidrólise enzimática da biomassa de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido e básico)..... | 120 |
| 8.2.5 Quantificação de glicose por HPLC | 125 |
| 8.2.6 Determinação do rendimento de glicose no ensaio. | 125 |
| 8.2.7 Análise de dados | 125 |
| 8.3 RESULTADOS | 126 |
| 8.3.1 Caracterização química da biomassa de sorgo sacarino | 126 |
| 8.3.2 Hidrólise enzimática da biomassa do sorgo sacarino pré-tratado..... | 127 |
| 8.5 CONCLUSÕES..... | 136 |
| 8.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 137 |
| REFERÊNCIAS | 138 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil assumiu uma série de compromissos para mitigação e redução das emissões de gases de efeito estufa (GEE) no âmbito da Conferência das Partes (COP-21), realizada entre os dias 30 de novembro e 11 de dezembro de 2015 na cidade de Paris, França, entre os quais merece destaque a participação de 18% de biocombustíveis na matriz energética nacional até 2030 (LORENZI, 2019).

Para o alcance de tais metas, o Ministério de Minas e Energia instituiu a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) pela Lei nº 13.576/2017. O principal instrumento do RenovaBio é o estabelecimento de metas nacionais anuais de descarbonização para o setor de combustíveis, de forma a incentivar o aumento da produção e da participação de biocombustíveis na matriz energética de transportes do país (BRASIL, 2022).

O Brasil está na vanguarda da utilização de fontes renováveis de energia, sendo o etanol obtido a partir da cana de açúcar considerado pela Agência Norte-Americana de Proteção Ambiental (US-EPA, na sigla em inglês) como “combustível avançado”. Tal denominação se refere ao fato de a produção e o uso do etanol reduzirem as emissões de gases do efeito estufa (GEE) em mais de 80% em relação às emissões provocadas pelo uso da gasolina que ele substitui (ESTADOS UNIDOS, 2010).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos. Sua produção é majoritariamente proveniente da cana de açúcar (GORREN, 2009). Porém, outras matérias primas, como o milho, estão em crescente uso. Em seu mais recente plano decenal, a Empresa de Pesquisa Energética (EPE) projeta que, até 2031, o Brasil terá 40 novas usinas de etanol instaladas. Destas, nove utilizariam apenas cana-de-açúcar e 23 apenas milho, com oito usinas adotando ambas as matérias-primas (DA SILVA, 2022).

Há uma tendência na literatura de classificar os combustíveis em primeira, segunda ou terceira geração de acordo com sua matéria prima de obtenção e tecnologia de produção. O etanol obtido por meio da fermentação de caldo de cana, chamado de etanol de primeira geração (E1G), pode ser aumentado em até 40% quando sua biomassa é hidrolisada e processada para obtenção do então chamado etanol de segunda geração (E2G). Já o etanol de terceira geração (E3G) está relacionado à produção a partir de matéria prima modificada geneticamente (microrganismos e algas) e ainda está em desenvolvimento no país (BRASIL, 2014; MACHADO, 2013).

Os biocombustíveis de segunda geração são obtidos por meio da hidrólise da biomassa de matéria prima não alimentar como resíduo agroindustrial (bagaço de cana-de-açúcar, palhada

de culturas agrônômicas como cana, trigo, cevada e algodão, entre outras) ou culturas de alta produção de biomassa, podendo citar cana energia (CARVALHO-NETTO, 2014; SILVA, 2020), agave (VELOSO, 2018) e o sorgo energia (PARRELLA, 2021).

As políticas ambientais atuais foram decisivas para a implementação da produção industrial de E2G no Brasil, visto que sua produção é mais complexa quando comparada a produção de biocombustíveis de primeira geração (RAJ, 2022).

Para obter o caldo fermentescível na produção de E2G, a biomassa passa por um processo de liquefação química ou enzimática. No segundo caso, o grupo de enzimas utilizadas no processo são as CAZYmes (enzimas ativas no metabolismo de carboidratos) (GARRON, HENRISSAT, 2019). CAZymes são classificadas em cinco classes de acordo com o banco de dados CAZy (CANTAREL *et al.*, 2009): glicosídeo hidrolases (GH), glicosiltransferases (GT), polissacarídeo liases (PL), carboidrato esterases (CE) e atividades auxiliares (AA). Tais enzimas são produzidas por microrganismos e, seu alto custo, é um dos principais entraves para a produção de E2G (JUNQUEIRA, 2017). A hidrólise enzimática é um método sustentável que promove a liberação de açúcares da biomassa sem gerar subprodutos indesejáveis durante a reação devido à especificidade da enzima ao substrato (SARAVANAN, 2022).

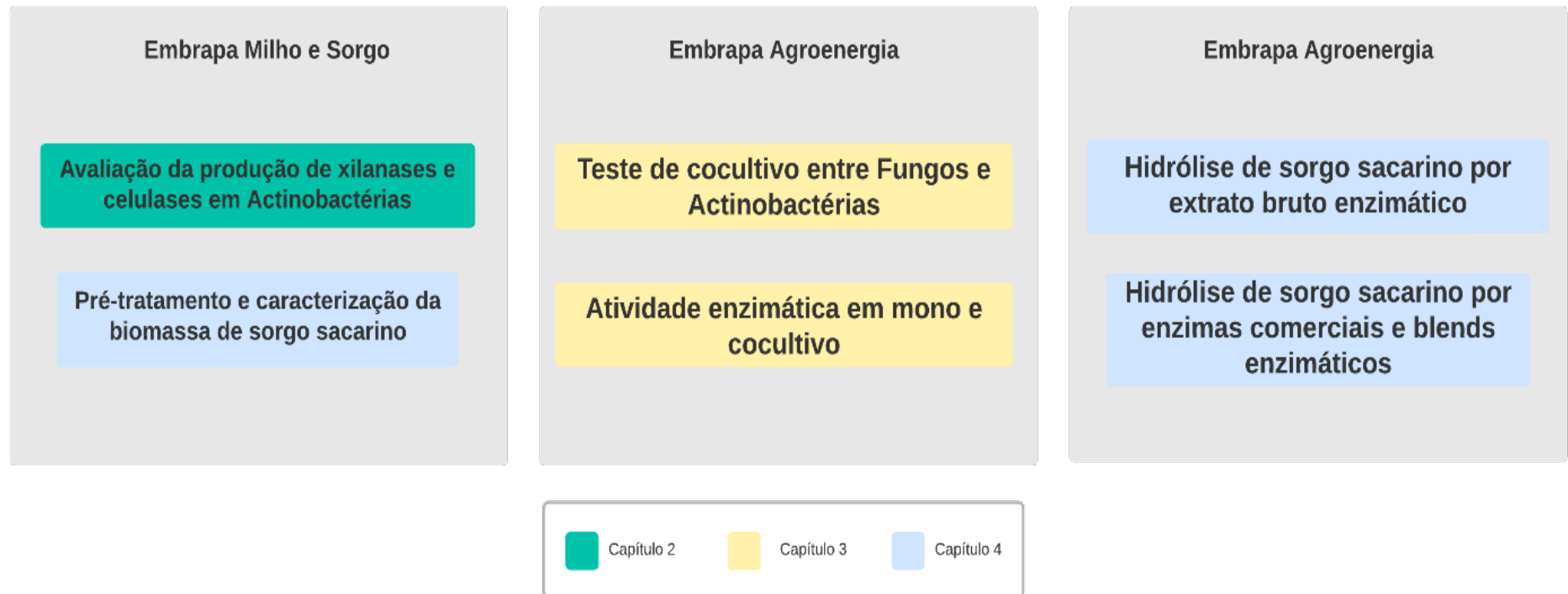
Microrganismos são amplamente estudados como produtores de enzimas e moléculas de interesse biotecnológico. Embora enzimas obtidas de fontes vegetais e animais sejam muito utilizadas, as de origem microbiana apresentam vantagens por várias razões como, por exemplo: independência de fatores sazonais na sua obtenção, possibilidade da utilização de substratos baratos como os resíduos agrícolas na sua obtenção e a otimização da produção a partir de processos fermentativos por mutações ou a partir da tecnologia do DNA recombinante (MONTEIRO, 2009).

Na pesquisa, um microrganismo para ser utilizado na produção de enzimas deve ser, preferencialmente, seguro sob o ponto de vista biológico (status GRAS – *generally recognized as safe*); oferecer alta capacidade de síntese e excreção da enzima; ser tolerante às condições ambientais adversas como temperatura, força iônica e pressão osmótica; e ser tolerante à presença de substâncias tóxicas, que podem eventualmente fazer parte do processo de interesse ou serem produzidas pelo próprio metabolismo celular (BASTOS, 2015). A aplicação de enzimas é uma alternativa aos processos químicos convencionais. Trata-se de uma tecnologia mais limpa que consome pouca energia, gerando mínimo impacto ambiental (SILVA, 2015). Em processos naturais de degradação de biomassa, inúmeros microrganismos contribuem com a excreção de enzimas que atuam em sinergia em seu habitat natural. Estudos demonstram que

diferentes enzimas com a mesma atividade provenientes de diferentes microrganismos possuem características diferentes em relação a robustez, tolerância a temperatura e pH, o que torna desejável a diversidade taxonômica, fisiológica e ecológica dos microrganismos estudados (HU, ARANTES, SADDLER, 2011; TAKENAKA, 2019s). A produção de enzimas por microrganismos tem relação direta com o substrato utilizado por eles como fonte de carbono. Além disso, microrganismos diferentes respondem de forma diferente a este estímulo (ALMEIDA, 2019).

A completa degradação da biomassa depende de um grupo grande de enzimas hidrolíticas e acessórias. Os ataques de tais enzimas aos componentes da biomassa também dependem da composição da parede celular vegetal, que varia entre as cultivares devido a diferença entre os genótipos, fenótipos e tratos culturais (DIAS, 2013). Existe, ainda, a necessidade de promover o acesso das enzimas aos componentes da parede celular vegetal por meio de uma intervenção que pode ser química, física ou biológica, denominada pré-tratamento. A etapa de pré-tratamento visa modificar as propriedades reológicas da biomassa lignocelulósica facilitando o acesso das enzimas (LI, 2014). Os esforços para encontrar microrganismos produtores de tais enzimas é a chave para o desenvolvimento de processos econômicos para a obtenção de açúcares fermentescíveis provenientes de biomassa vegetal.

2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO



3 CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cenário bioenergético no Brasil

O Brasil possui cerca de 48% de energia proveniente de recursos renováveis em sua matriz energética, o que o coloca em destaque em relação ao mundo, já que a matriz energética mundial é composta de apenas 18% de energia renovável. Atualmente, esforços internacionais se somaram com o propósito de mitigar os efeitos das mudanças climáticas, reduzindo as emissões de gases do efeito estufa (GEE) e promovendo ações para descarbonização atmosférica (EPE, 2021).

O Brasil está na segunda posição em produção de etanol no mundo, atrás apenas dos Estados Unidos (KOHLHEPP, 2010). Dados apresentados pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) revelam a produção total de 30,35 bilhões de litros de etanol, o que representa um aumento de 1,6% em relação ao período passado (BRASIL, 2022).

O etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) ou álcool etílico, é produzido pelo processamento e fermentação de açúcares provenientes de plantas como milho e beterraba, além de matérias primas amiláceas. No Brasil, de acordo com boletim técnico da Agência Nacional do Petróleo (ANP), a cana-de-açúcar é a matéria prima utilizada em 97,1% das refinarias de etanol autorizadas (MME, 2019).

Diversos países, incluindo o Brasil, têm se posicionado quanto a políticas públicas para fomentar a produção de bioenergia, um termo que diz respeito à energia renovável da transformação química da biomassa. Nesse contexto, o etanol está passando por uma nova etapa no país: a produção industrial de etanol de 2ª geração (E2G). O uso de combustíveis fósseis não renováveis necessita de alternativas, assim como o acúmulo de resíduos agroindustriais no ambiente (EPE, 2020). Visando reduzir o impacto ambiental provocado por setores produtivos, pesquisadores de todo país têm se empenhado em produzir soluções práticas para sistematizar novas alternativas biotecnológicas e sua aplicação no mercado, como a utilização de tais resíduos para geração de energia limpa e renovável como o E2G (RAJ, 2022).

Um estudo do Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE) demonstrou que a bioeconomia Brasileira foi alvo de publicações científicas no âmbito de bioenergia com aumento significativo de publicações entre os anos de 2008 e 2021 para palavras-chave como: biomassa, sustentabilidade, etanol, fermentação, performance, bagaço de cana, biodiesel, pré-tratamento, energia e gestão (BRASIL, 2022). Tais estudos demonstram o engajamento

científico e político para fomentar as estratégias de produção sustentável de energia limpa e comprometimento com as ações de descarbonização assumidas pelo país.

Segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP), biocombustíveis podem substituir, em parte ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural. Os dois principais biocombustíveis líquidos usados no Brasil são o etanol e o biodiesel. Cerca de 45% da energia e 18% dos combustíveis consumidos no Brasil são renováveis, o que coloca o Brasil como pioneiro mundial no uso de biocombustíveis em alternativa ao uso de petróleo (MME, 2019).

A indústria sucroalcooleira brasileira produz etanol de primeira geração (E1G) e de segunda geração (E2G). O país conta com o incremento de tecnologias de produção de E2G, desde 2014 quando as plantas precursoras da Granbio e Raízen começaram a produzir seus primeiros litros de etanol além de uma planta experimental do Centro de Tecnologia Canavieira - CTC, com capacidade de produção nominal de 82, 42 e 3 milhões de litros por ano, respectivamente (EPE, 2021).

Com o intuito de fomentar a implementação de tecnologias de produção de biocombustíveis nas plantas existentes e novos projetos de E2G, o Ministério de Minas e Energia (MME) criou a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio), instituída pela Lei nº 13.576/2017 para o estabelecimento de metas nacionais anuais de descarbonização do setor de combustíveis, que fornece contribuição significativa para o cumprimento dos compromissos firmados pelo Brasil na 21ª Conferência das Partes da Convenção Quadro das Nações Unidas sobre Mudança no Clima (COP-21) em Paris no ano de 2015 (MME, 2020).

Uma das estratégias para ampliar a adesão à produção dos biocombustíveis na matriz energética e manter o abastecimento desses combustíveis foi atribuir nota para cada produtor. Isso com base nos termos da Resolução ANP nº 791/2019, de 12 de junho de 2019, que visa a mitigação de uma quantidade específica de gases de efeito estufa em relação ao seu substituto fóssil. Tal valoração é definida em mercados organizados para negociar os Créditos de Descarbonização (CBIO), emitidos com base nos Certificados da Produção Eficiente de Biocombustíveis (DA SILVA, 2022).

O CBIO é um ativo ambiental com negociação permitida desde dezembro de 2019. Ele foi criado como parte do RenovaBio, programa que prevê iniciativas como a criação de instrumentos financeiros que contribuam para atrair investimentos com foco na expansão da produção de biocombustíveis. Cada CBIO emitido por produtores e importadores de biocombustíveis corresponde a uma tonelada de carbono que deixa de ser emitida para a atmosfera (BRASIL, 2022).

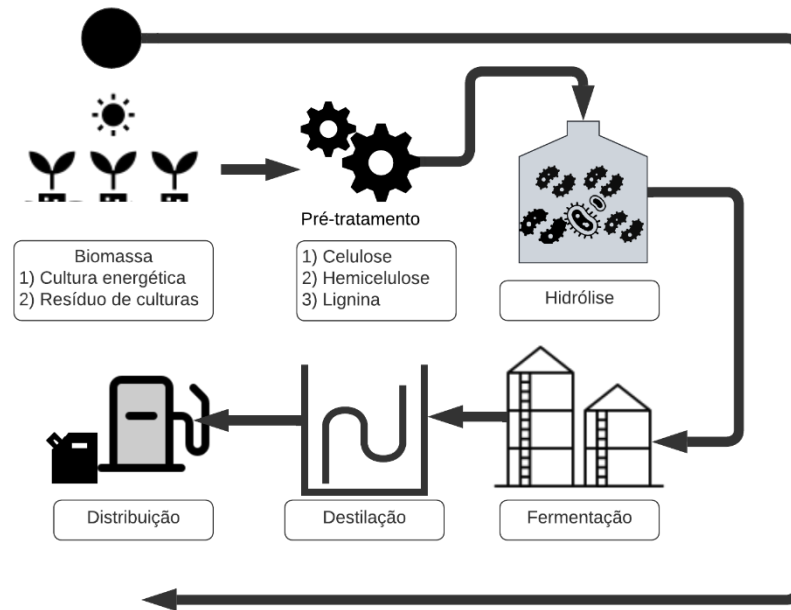
De acordo com a Empresa de Pesquisa Energética do Ministério de Minas e Energia (EPE - MME) dois termos, que definem o perfil de investimentos futuros na implantação de tecnologias para produção de E2G, tem sido estudado. O primeiro, *Greenfield* se refere à implantação de novas plataformas exclusivas de biocombustíveis - àqueles cujo projeto é a implantação de um novo sistema para obtenção de E2G, podendo as etapas serem otimizadas segundo o substrato lignocelulósico disponível. O segundo, *Brownfield* se refere às alterações necessárias para empresas ativas que já produzem E1G, àqueles cujos projetos se adaptariam a utilização de resíduo de bagaço de cana de açúcar já utilizado da produção de E1G. Em tais levantamentos, modelos avaliam projeções das relações custo benefício a curto, médio e longo prazo. Há ainda o conceito de biorrefinarias onde vários subprodutos, entre os principais componentes energéticos, podem ser extraídos das rotas escolhidas para obtenção de biomoléculas de interesse, agregando valor ao novo processo (NYKO, 2010; MILANEZ, 2015; VAZ, 2016; JUNQUEIRA, 2017).

Com incentivo das políticas nacionais de descarbonização e um grande esforço científico, para trazer inovação e tecnologia aos processos atuais, o Brasil segue se consolidando como o país que, não só demonstrou competência para a produção de E1G como alcançará o mesmo protagonismo tecnológico na eficiência produtiva do etanol celulósico ou de segunda geração (CGEE, 2022).

3.2 Etanol de segunda geração

A indústria sucroalcooleira brasileira obtém E1G, majoritariamente, da fermentação direta do caldo da cana de açúcar, composto quase que em sua totalidade por sacarose. A principal diferença entre as usinas produtoras de E1G e as usinas produtoras E2G é a utilização da biomassa em seu processo produtivo, que inclui etapas de hidrólise da celulose química ou enzimática (biológica) (CGEE, 2018). Esta última é normalmente precedida de pré-tratamento físico ou químico para ruptura da matriz lignocelulósica, antes de iniciada a fermentação, como apresentado na Figura 1.

Figura 1: Conversão de material lignocelulósico em biocombustível.



Fonte: Da autora (2023).

O E2G é o álcool obtido por meio da fermentação do hidrolisado das fibras lignocelulósicas de um vegetal. No caso da cana-de-açúcar, ele é obtido a partir do bagaço utilizado na produção de E1G após a extração do caldo ou da palha colhida nas lavouras. O material (bagaço ou palha) passa por um pré-tratamento físico e químico para limpar o material e expor suas fibras (LEITE, 2008). Em seguida, a biomassa limpa e moída passa por uma hidrólise que, de forma simplificada, corresponde à liquefação dos componentes estruturais da fibra da parede celular vegetal, através do uso de ácidos ou enzimas específicas, transformando o material sólido num caldo. Por fim, o material hidrolisado é submetido à fermentação por meio da ação de leveduras específicas, gerando etanol a partir dos açúcares ali presentes (ALMEIDA JR, 2012).

3.2.1 Biomassa – matéria prima do E2G

Um dos aspectos mais importantes na obtenção de E2G é a matéria prima. A biomassa utilizada para sacarificação ocupa o segundo lugar no custo total de obtenção do etanol (JUNQUEIRA, 2017) e tem ligação direta com os processos que serão aplicados durante a hidrólise (WANG, 2013).

A seleção de matéria prima afeta diretamente a viabilidade do processo no que diz respeito ao custo da biomassa e, indiretamente, no que tange ao desenvolvimento de métodos de processamento (HIMMEL *et al.*, 2007). Basicamente, existem três categorias de matéria

prima para bioprocessamento de fermentação: à base de açúcar (caldo de cana, beterraba e caldo do sorgo sacarino) à base de amido (milho, mandioca e grãos de sorgo) e à base de celulose (biomassa de cana e sorgo e outros resíduos vegetais) (WHITFIELD, 2012).

O presente trabalho se limitou a abordar um panorama da biomassa de cana-de-açúcar, como cultura consolidada na obtenção de etanol no Brasil, e o sorgo sacarino como cultura promissora na obtenção de etanol com resultados expressivos a nível internacional.

3.2.1.1 A biomassa de cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. De acordo com a primeira estimativa da safra de cana-de-açúcar 2022/23, divulgada pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o Brasil deve produzir 596,1 milhões de toneladas, com produtividade média de 70,48 kg/ha, 1,6% superior a 2021/22 gerando aproximadamente 160 milhões de toneladas de bagaço e 10 a 20 ton/ha de palha (CONAB, 2022).

O uso histórico do bagaço da cana, como insumo energético para produção de vapor e eletricidade mediante a queima em caldeiras, parecia inviabilizar seu uso para obtenção de E2G. Maluf (2014) testou modelos matemáticos para prever uma possível competição entre o E2G e a produção de eletricidade pelo uso do bagaço. Em seu estudo, Maluf apresentou a necessidade de inclusão do palhicho e sugeriu a inserção de novas cultivares como o sorgo sacarino para suprir a demanda de biomassa na geração de etanol 2G já que, para alcançar produção economicamente viável, a usina precisaria gerar a energia que consome.

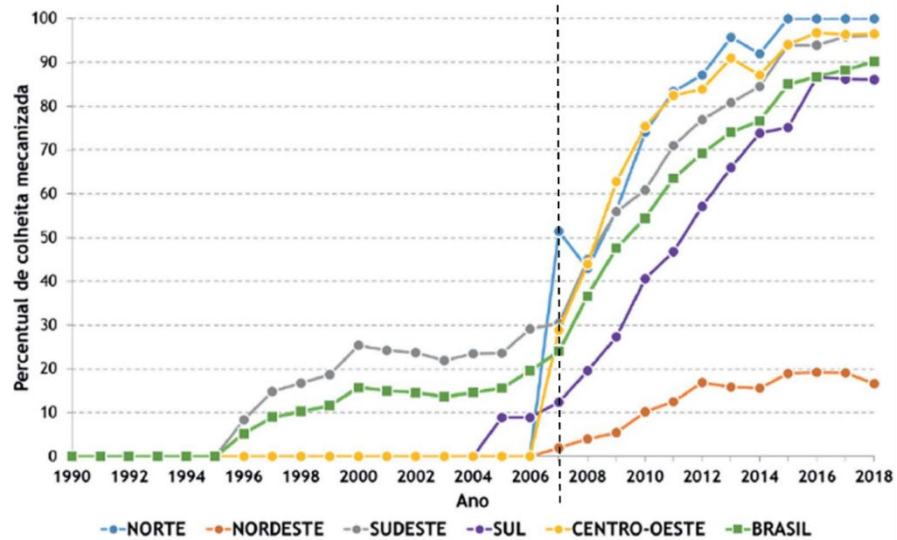
A adequação das tecnologias de obtenção de energia por meio da queima do bagaço de cana-de-açúcar, em que os equipamentos utilizados para produção de energia requerem uma quantidade menor de bagaço e produzem maior quantidade de vapor, possibilitou um aumento na quantidade de bagaço disponível para E2G (DA CRUZ, 2008).

O uso da palha da cana-de-açúcar era inviabilizado, pois o canavial passava por um processo de queima, antes da colheita manual visando a proteção dos colhedores e aumento na produtividade. O uso da cana crua - termo usado para caracterizar a cana não queimada - foi fortemente impulsionado pela assinatura do Protocolo Agroambiental do Setor Sucroenergético no estado de São Paulo em 2007 (período hachurado na Figura 2) ação que se estendeu para outros estados da federação nos anos seguintes (FONTANA, 2021).

Com o advento das mudanças climáticas, e as metas de redução de (GEE) a procura por rotas sustentáveis de bioenergia promoveu alterações significativas no manejo da palha nos canaviais brasileiros (CARVALHO, *et al.*, 2017), abordagens que só foram possíveis, graças

ao salto da tecnologia de mecanização de plantio e colheita da cultura da cana e o fim das práticas de queima do canavial que ocorriam antes da colheita manual (FIGURA 2).

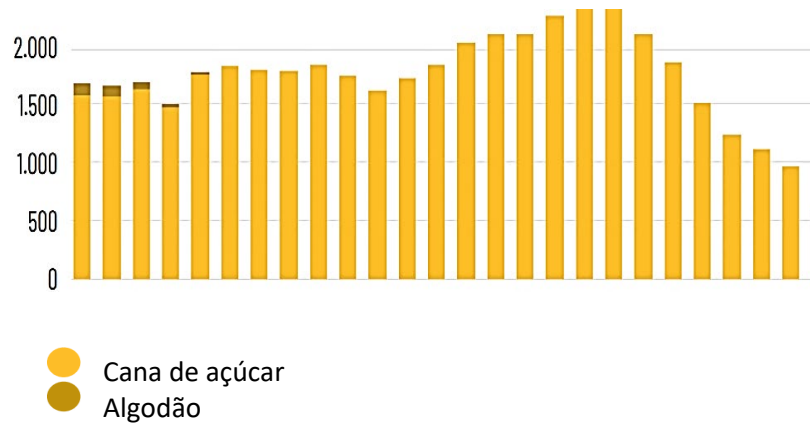
Figura 2: Evolução da mecanização da colheita da cana de açúcar



Fonte: Conab (2019). Adaptado.

Atualmente, o uso de fogo é restrito a áreas não mecanizáveis e corresponde a menos de 20% de toda a área plantada (CONAB, 2022). A lei estipula que o uso do fogo para colheita da cana deve se extinguir até 2031 (GAROFALO *et al.*, 2020). A redução do uso do fogo, a partir de 2007, refletiu na queda constante das emissões de gases de efeito estufa (GEE) como mostra a Figura 3, além de contribuir com a oferta da palha na obtenção de E2G.

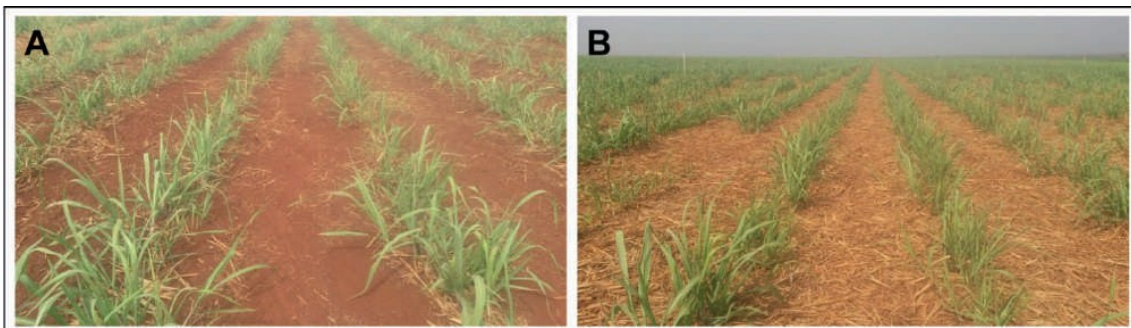
Figura 3: Total de emissão de gases de efeito estufa (GgCO₂e) pela queima de resíduos agrícolas apresentados para o período de 1990 a 2016.



Fonte: Conab (2022)

Com a mudança progressiva do sistema de colheita queimado para o não queimado, palha, agora disponível, tornou-se matéria prima economicamente viável para a produção de E2G. A palha da cana sobre o solo promove serviços ecossistêmicos como armazenamento de água (HUNKE *et al.*, 2015), controle de erosão, reciclagem de nutrientes e biodiversidade do solo (CARVALHO *et al.*, 2017), porém alguns estudos sugerem que a palha pode comprometer a produção de biomassa em regiões frias e sob algumas condições de solo (LOPES *et al.*, 2017) favorecendo também o aparecimento de pragas (DINARDO-MIRANDA, 2013). A retirada da palha nos campos tem sido extensivamente estudada para obtenção da melhor relação entre a quantidade que fica no solo e a quantidade a ser retirada (GAROFALO *et al.*, 2020; SILVA 2020) (FIGURA 4).

Figura 4: Exemplos de cultivos de cana de açúcar sem a manutenção da palha (A) e com a manutenção da palha (B).



Fonte: GAROFALO *et al.*, (2020) foto de Nilza Patrícia Ramos.

Os dados mostram que uma recomendação adequada deve basear-se na manutenção contínua de serviços ecossistêmicos e diversos autores têm assumido esse valor como entre

50% e 40% da palha para a produção de E2G (DIAS, 2013; HUNKE *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2017; DINARDO-MIRANDA, 2013).

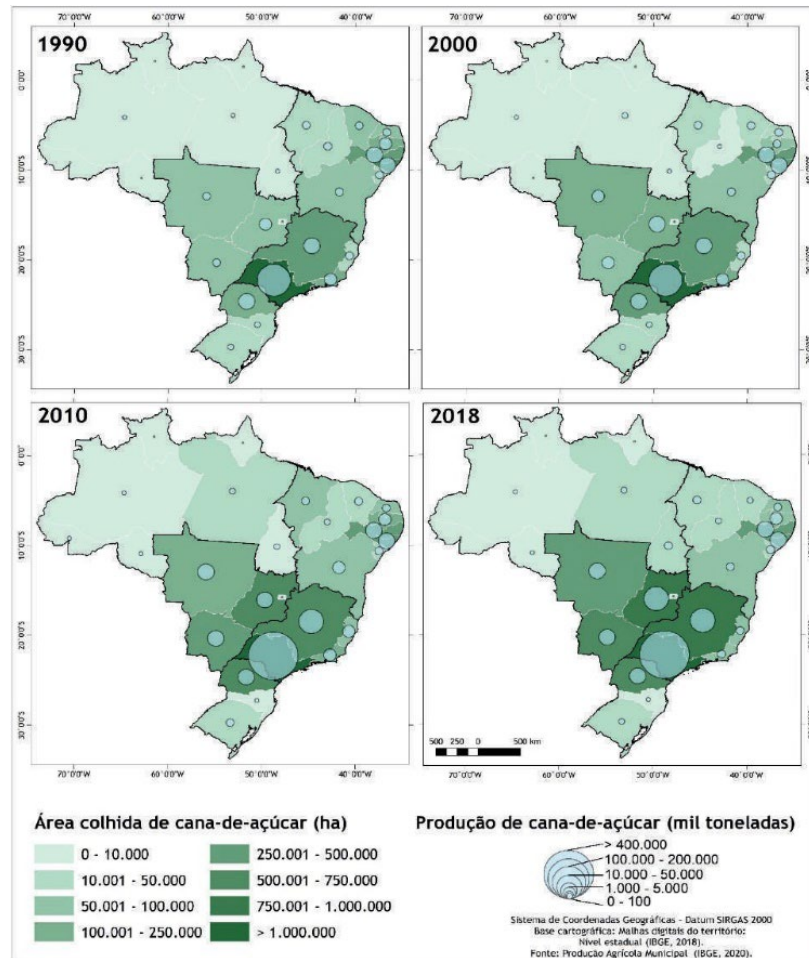
A diferença entre a composição da biomassa também é fonte de variação dentro do processo de obtenção de E2G e tem sido discutido amplamente na literatura (SANTOS, FRANCO, & BERNI, 2015). Essa desigualdade na composição não ocorre somente entre as distintas culturas disponíveis, mas entre as partes da mesma planta. Um exemplo, é como a palha difere em composição entre folhas secas e as ponteiros da cana. Objetivando dar melhor fim ao uso das frações de acordo com a composição estrutural, alguns estudos sugerem que as ponteiros sejam destinadas ao recobrimento do solo por possuir maior umidade e nutrientes e as folhas secas inseridas no processo de cogeração de energia e obtenção de E2G (MENANDRO, 2016).

Para suprir a oferta de biomassa e em consequência a produção de bioetanol, cultivares cada vez mais desenhadas para esse fim têm sido implantadas (LORENZI, 2019). A cana-energia (ou “supercana”) é um conjunto de variedades de cana em desenvolvimento com um grau mais elevado de energia primária por tonelada ou por hectare comparado às variedades comuns. Seus componentes (açúcares e fibras) são mais adequados para o processamento de tecnologias de segunda geração devido a maiores concentrações de fibra, o que representa mais celulose e hemicelulose para produção de E2G e lignina para uso nas caldeiras (LEAL, 2010). Essa variedade produz menos sacarose que as espécies tradicionais (cerca de 40% menos), mas produz muito mais fibras (aproximadamente 80% a mais por tonelada do colmo), não sendo, portanto, ideal para a produção de açúcar, mas sim para a produção de energia elétrica e E2G devido a maior quantidade de bagaço (MILANEZ *et al.*, 2014). Porém, apesar da expectativa que materiais genéticos ricos em fibras sejam mais tolerantes às condições de seca, o maior limitante do avanço da cultura se dá pelo estresse hídrico. DOS ANJOS, *et al.*, (2018) avaliando diferentes genótipos de cana-energia, observou que esses materiais, quando submetidos ao efeito de estresse hídrico, apresentaram redução no crescimento e acúmulo de biomassa.

Diante disso, podemos inferir que o incremento de produtividade atual para a cana, pode ser limitado em curto prazo, pela questão do uso da água, que interfere diretamente no zoneamento climático da cultura.

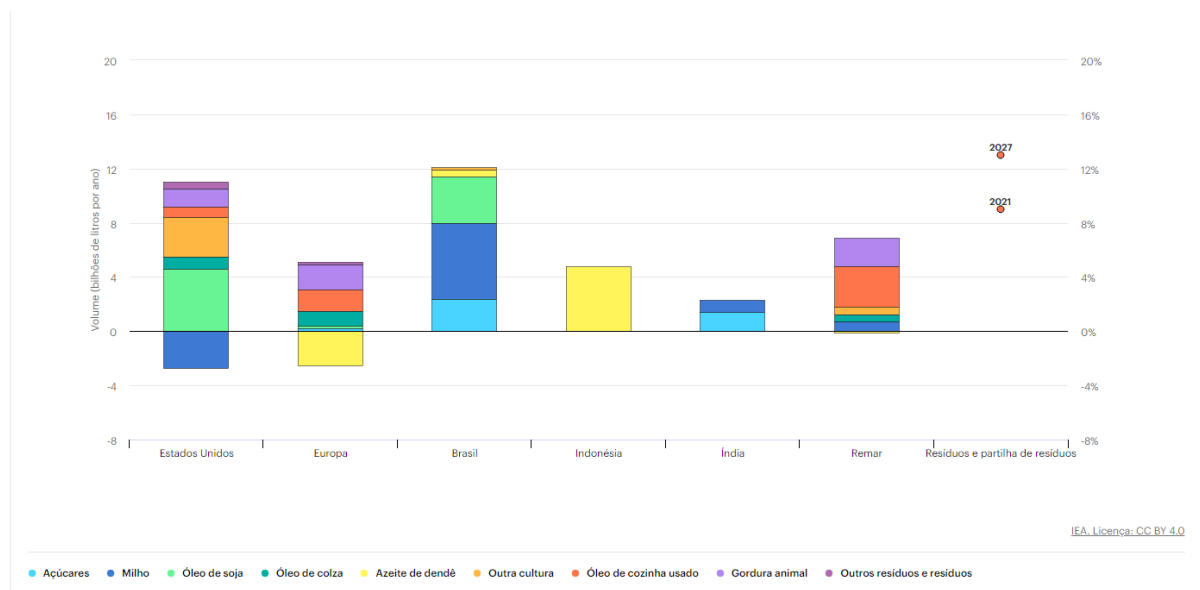
As áreas de plantio da cana no Brasil são bem definidas (Figura 5), mas sua expressão depende da resposta das cultivares adaptadas à cada região produtora.

Figura 5: Evolução da área colhida e produção de cana de açúcar nos estados do Brasil.



Fonte: GAROFALO *et al.*, (2020).

De acordo com relatório da Agência Internacional de Energia dos EUA (*International Energy Agency – IEA*), a demanda por matéria prima na produção de biocombustíveis pode sofrer uma crise de abastecimento se levarmos em consideração as projeções de produção de biocombustíveis no país, como demonstrado na Figura 6:

Figura 6: Crescimento total da produção de biocombustíveis por região, caso principal, 2021¹

Legenda: Projeção da produção de biocombustíveis e o tipo de matéria prima utilizada para obtê-lo.

Fonte: IEA (2022) Adaptado.

A solução prevista, é a busca por culturas que se estabeleçam em terras degradadas ou plantadas durante o que, antes, eram períodos de pousio, aumentando assim, a área cultivada sem suprimir área de produção de alimentos e rações. No Brasil, por exemplo, 75% da produção de etanol de milho vem da produção de segunda safra em campos existentes. Na Europa, alguns produtores de biocombustíveis estão adquirindo oleaginosas cultivadas em terrenos degradados para atender critérios de sustentabilidade (ESTADOS UNIDOS, 2010). Além disso, melhorias no aproveitamento de resíduos de produtores adjacentes as áreas de produção das usinas, incluindo produtores de agricultura familiar é necessário visto que essas ações responderiam aos objetivos e de desenvolvimento sustentável (ODS) propostos na COP-21 sendo elas: ODS 7: Assegurar o acesso confiável, sustentável, moderno e a preço acessível à energia para todos e ODS 13: Tomar medidas urgentes para combater a mudança do clima e seus impactos.

3.2.1.2 A biomassa do sorgo sacarino

O sorgo (*Sorghum bicolor*) é considerado o quinto cereal mais importante do mundo em área cultivada sendo superado apenas pelo trigo, arroz, milho e cevada. É uma gramínea originária do continente africano, pertencente à família Poaceae, sendo bem estabelecido em

¹ Expectativas de crescimento agrícola com base nas Perspectivas Agrícolas da OCDE-FAO 2022-2031.

regiões de clima quente (DURÃES, 2012). No Brasil, seu cultivo pode ser encontrado em regiões de temperaturas com médias acima de 20°C, se adaptando a vários tipos de solos necessitando apenas de correção para acidez e alumínio. Apresenta, atualmente cinco tipos diferentes: sorgo granífero (utilizado para produção de grãos), sorgo forrageiro (fornecendo biomassa para alimentação animal e silagem), sorgo sacarino (bioenergia), sorgo vassoura (para a produção de vassouras) e o sorgo lignocelulósico ou sorgo biomassa (bioenergia) (DUARTE, 2021).

A cultura do sorgo sacarino foi idealizada como opção para pequenas destilarias incentivadas pelo ProÁcool na década de 1970. Com sua introdução no país, vários institutos se dedicaram à cultura em seu programa de melhoramento, podendo destacar a Embrapa Milho e Sorgo, Instituto Pernambuco de Pesquisas Agropecuárias (Instituto Agrônomo de Pernambuco - atualmente), Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Rio Grande do Sul e centros de pesquisas Universitários como as Escolas superiores de Agronomia de Lavras, Viçosa e Piracicaba.

O sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) apresenta colmos com caldo semelhante ao da cana, rico em açúcares fermentescíveis e atende a demanda da produção de etanol de primeira geração na mesma instalação utilizada pela cana-de-açúcar. O caldo do colmo do sorgo é diferente do caldo da cana em composição. O caldo da cana de açúcar é largamente utilizado na obtenção de açúcar cristal por ser constituído majoritariamente de sacarose. Já o caldo do sorgo possui além da sacarose, açúcares redutores como glicose e frutose sendo que a proporção de cada um destes componentes varia conforme o genótipo (ALMODARES; HADI, 2009). Considerando a extração de açúcares, o caldo do sorgo sacarino pode ser utilizado na fabricação de melaço, como é amplamente utilizado nos Estados Unidos (KIBALNIK, 2022) por conter altos teores de açúcares invertidos em relação à cana-de-açúcar sua cristalização é prejudicada e a aptidão para produção de açúcar cristal é baixa (TEIXEIRA, 1997).

O sorgo sacarino possui ciclo rápido (quatro meses) é uma cultura totalmente mecanizável (plantio por sementes, tratos culturais e colheita), alta produtividade de biomassa verde (60 a 80 t. ha⁻¹), com altos rendimentos de etanol (3.000 a 6.000 L. ha⁻¹) (MAY, 2012).

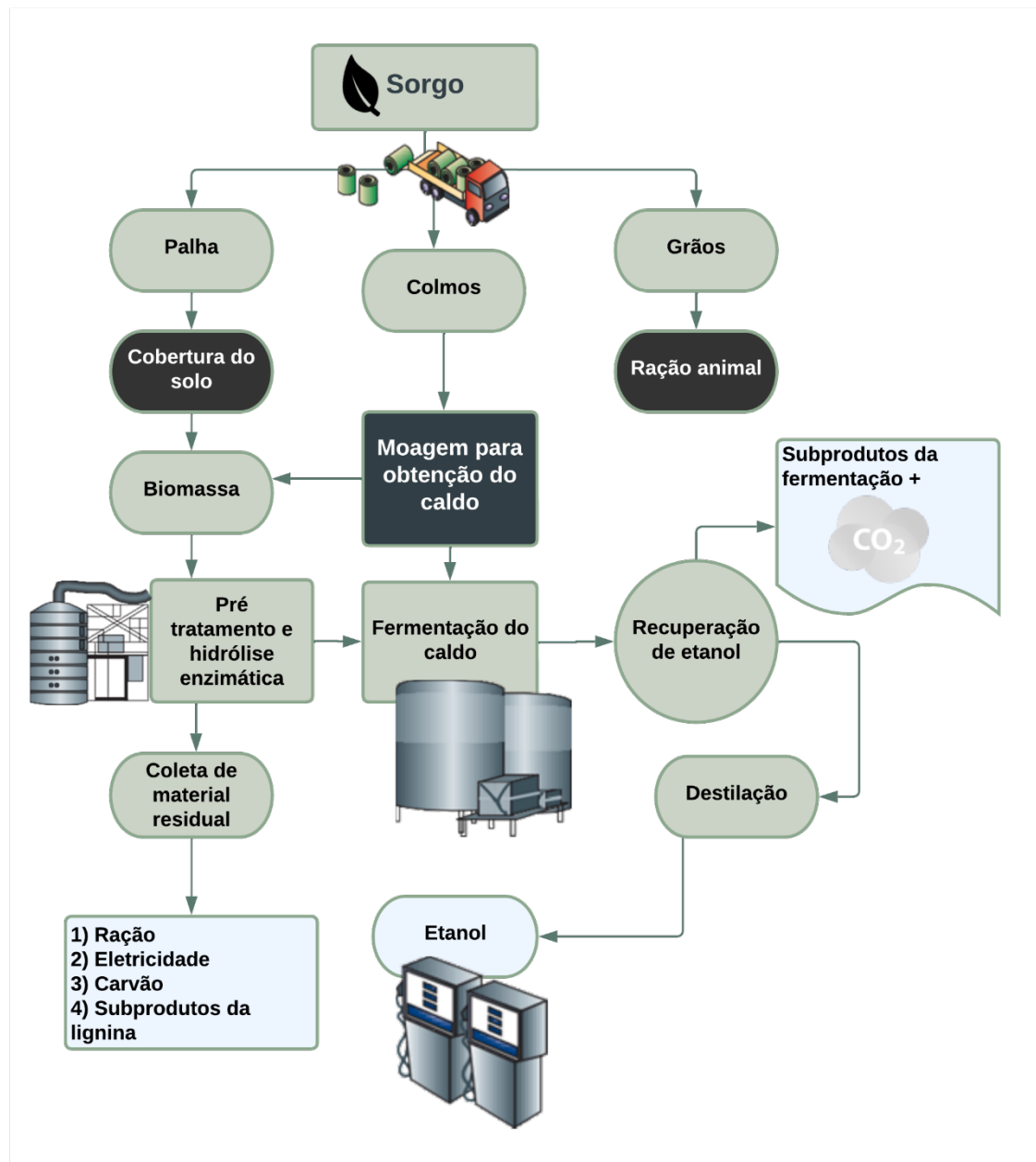
Não há dados de produção de etanol a partir de sorgo sacarino na indústria Brasileira, apesar de seu uso ser conhecido em escala piloto e na avaliação de qualidade agroindustrial (DUTRA *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013), porém, no mundo, o sorgo sacarino é matéria prima

na produção de etanol em países como Índia, China, Austrália e África do Sul segundo o Instituto Internacional de Pesquisa de Culturas para os Trópicos Semiáridos - ICRISAT (REDDY, 2004).

Nesses países, o uso do sorgo sacarino é apresentado em diversos fins como o uso do caldo para fermentação direta a etanol ou produção de xarope de sorgo e melado de sorgo (LAOPAIBOON *et al.* 2007) e também para produção de outros produtos químicos de base biológica (SIPOS *et al.*, 2009). Folhas, bagaço e grãos do sorgo sacarino se apresentam como coprodutos e podem ser usados para produção de etanol (fermentação do amido do grão e do caldo hidrolisado da palha e bagaço) ou para alimentação animal. O bagaço também pode ser usado para geração de calor, energia, celulose e produtos derivados (SOMANI e TAYLOR, 2003).

No âmbito de biorrefinarias, onde uma grande variedade de moléculas biológicas é obtida, o sorgo sacarino também se destaca. O bagaço do sorgo tem valor biológico maior do que o bagaço de cana de açúcar para alimentação animal e seu uso ainda é uma opção mesmo após a obtenção de E2G. Além disso, podemos destacar a obtenção de coprodutos como acetona, butanol, ácido láctico, ácido butírico, hidrogênio e metano que podem ser aproveitados pois são produtos da fermentação (UMAKANTH, 2019). O sorgo sacarino produz vários produtos naturais em potencial como ceras, proteínas e compostos alelopáticos como a sorgoleona (WHITFIELD *et al.*, 2012; SANTOS, 2012) esse último, biomolécula estudada como herbicida natural (GIMSING, *et al.*, 2009; NIMBAL *et al.*, 1996) e algicida (UDDIN, 2012). Há uma grande variedade de informações sobre cultivares de sorgo sacarino e sua utilização em sistemas de produção na obtenção de E1G na literatura internacional, e seu potencial uso de biomassa. A Figura 7 mostra um fluxograma representativo com várias opções de processamento de sorgo sacarino, proposto por Umakanth (2019).

Figura 7: Fluxograma das possíveis opções de processamento do sorgo sacarino

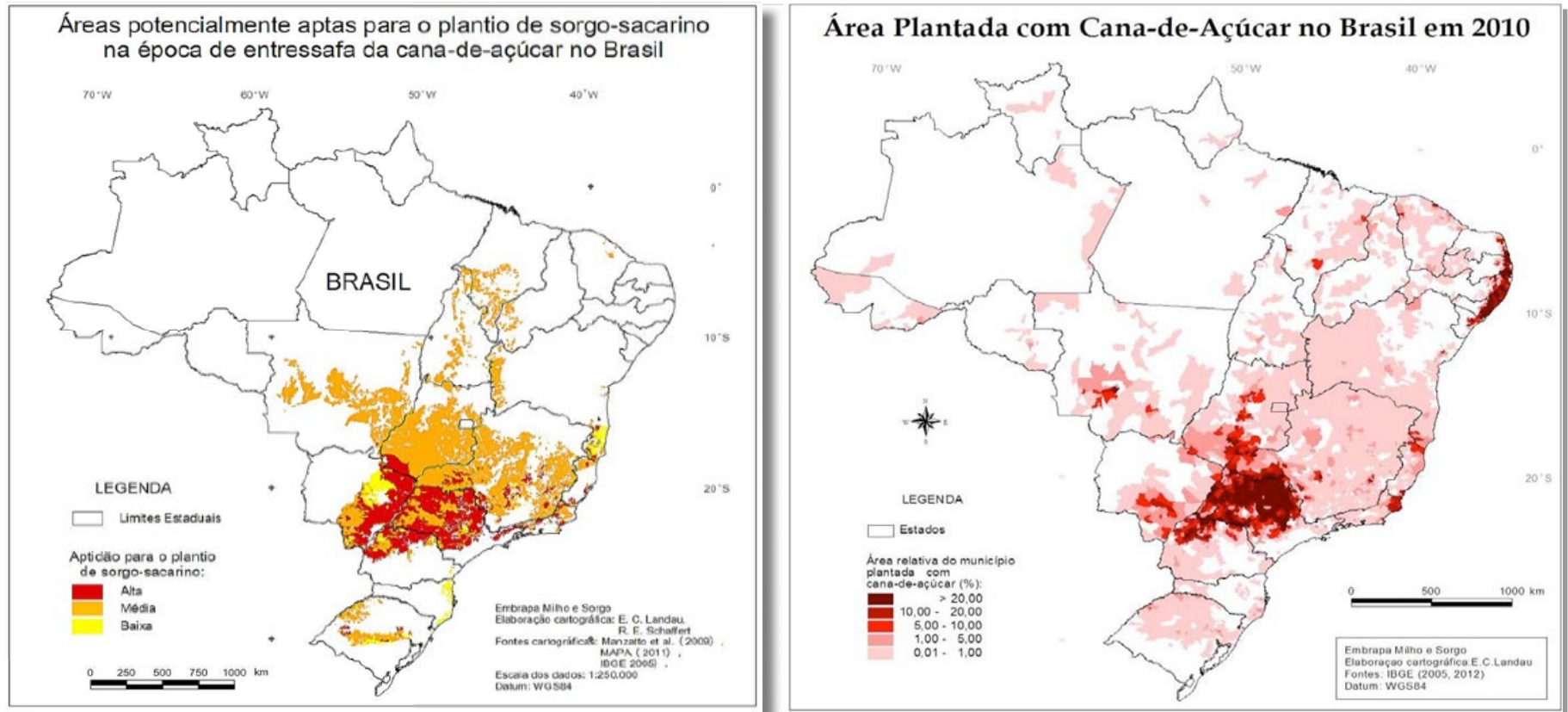


Fonte: Da autora (2023). Baseado nos trabalhos de UMAKANTH (2019) e STICKLEN (2008).

O cultivo do sorgo sacarino pode também ser uma alternativa técnica e economicamente viável para fornecimento de matéria-prima à microdestilaria. No âmbito de agricultura familiar, ele também se adequa em sistemas integrados de exploração da propriedade rural, objetivando a autossuficiências de energia, forragem e outras atividades voltadas para a produção agropecuária (TABOSA *et al.*, 2021).

Landau e Schaffert (2012) apresentaram um estudo onde as áreas aptas para o plantio de sorgo sacarino na época da entressafra da cana foram demonstradas considerando três classes de aptidão: alta, média e baixa apresentados na Figura 8.

Figura 8: Comparação entre a área potencialmente apta para o plantio de sorgo sacarino e as áreas estabelecidas de cultivo de cana-de-açúcar no Brasil.



Legenda: À esquerda, mapa de áreas potencialmente aptas para o plantio de sorgo sacarino na entressafra da cana-de-açúcar no Brasil. À direita, mapa de áreas plantadas com cana-de-açúcar no Brasil no ano de 2010.

Fonte: LANDAU & SCHAFFERT (2012).

O desenvolvimento de cultivares e parcerias com o setor privado e público na pesquisa tem fomentado a inserção do sorgo sacarino. Porém sua adesão ainda é tímida diante de áreas já estabelecidas de cana (DUARTE, 2021). Os fatores que afetam a adequação de potenciais novas culturas de matérias-primas em todo o mundo para a produção de bioetanol são complexos e estão relacionados a práticas agrícolas específicas do país e da região, além de forças de mercado e políticas, bem como desenvolvimento tecnológico (MACHADO, 2013). Para o sucesso da implantação da cultura do sorgo, um manejo técnico e bem monitorado precisa ser observado com atenção as etapas de plantio, de acordo com as máquinas disponíveis na propriedade, manejo de pragas e doenças e cuidados com residuais de herbicidas. Uma dificuldade relatada é o plantio direto de sorgo sobre palhada de cana, pois a plântula de sorgo é frágil em estágio de emergência e a palha da cana densa, o que requer implementos bem regulados (MAY,2012).

Diante do exposto, a cultura do sorgo sacarino segue como alternativa as áreas de reforma de canaviais, utilização em período de entressafra da cana e novas áreas em que a restrição hídrica inviabilize economicamente o estabelecimento de canaviais, proporcionando assim incremento na oferta de biomassa para E2G.

3.2.2 Composição lignocelulósica

Os três principais componentes da lignocelulose são celulose, hemicelulose e lignina e suas proporções são dependentes da fonte do material.

A celulose, principal componente estrutural e polissacarídeo mais abundante encontrado na parede das plantas, é constituída por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 e é também, das classes de oligômeros da parede celular vegetal, a mais conhecida (SCHELLER, 2010).

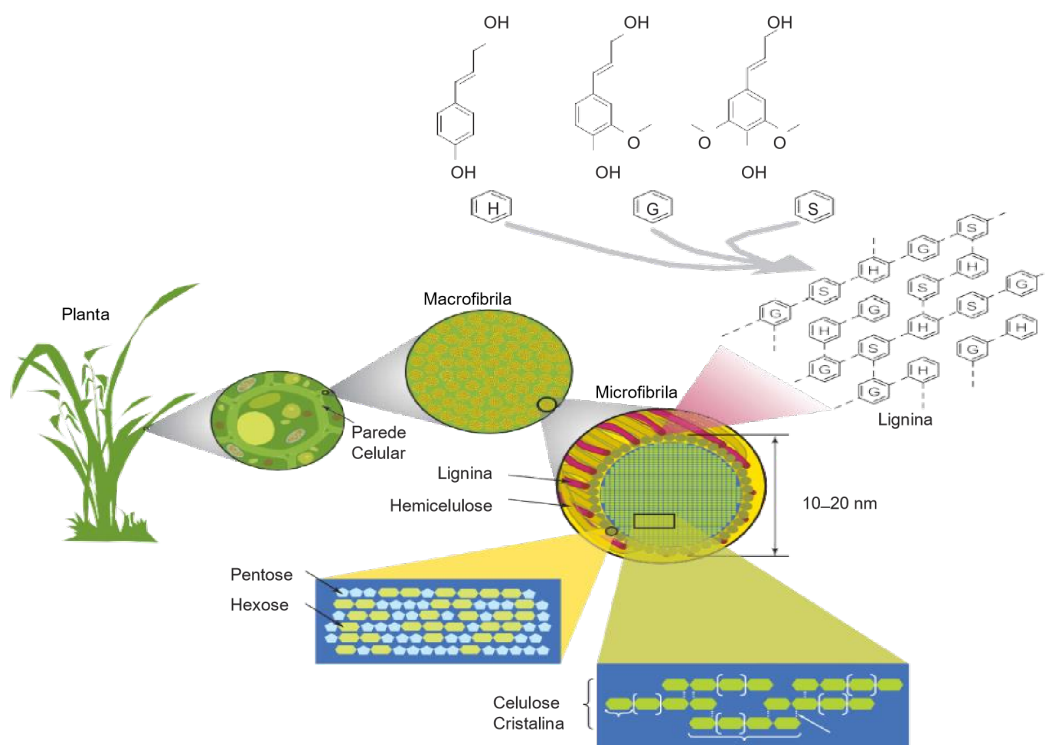
A hemicelulose, segundo maior componente do material em questão, possui estrutura variável de acordo com a espécie vegetal, apresentando hexoses como glicose, galactose, manose e ácido glicurônico. A composição heterogênea das hemiceluloses faz com que haja diversas classificações para esse composto na natureza, porém a maior classe de hemiceluloses, são as xilanas. As xilanas são caracterizadas pela presença de resíduos de arabinose ligados lateralmente à uma cadeia principal de monômeros de xilose, majoritariamente, unidos entre si por ligações glicosídicas β -1,4. Está presente em grande quantidade, nas gramíneas, sendo a

xilose, a pentose predominantemente encontrada no bagaço e na palha da cana-de-açúcar (POLIZELI *et al.*, 2005).

Já a lignina, terceiro maior componente, é constituída por uma complexa cadeia de unidades polimerizadas de fenil-propano que exercem rigidez e proteção para a parede celular vegetal conferindo resistência à planta. Outros componentes, como proteínas e compostos fenólicos estão presentes, porém em menor quantidade (SCHELLER, 2010).

Em processos de obtenção de E2G, as frações da parede celular precisam ser decompostas para que haja a liberação de polissacarídeos de cadeia longa para hidrólise subsequente (RUBIN, *et al.*, 2008). As fibras de celulose estão ligadas entre si pela hemicelulose, e recoberta pela lignina (Figura 8). As microfibras de celulose que estão presentes na matriz de hemicelulose-lignina estão associadas em forma de feixes ou macrofibrilas. Esta disposição espacial oferece a natureza cristalina e altamente recalcitrante do material vegetal (GUPTA, VIJAIK. *et al.*, 2016).

Figura 9: Estrutura da Lignocelulose



Fonte: Rubin (2008). Adaptado.

A composição da parede celular vegetal varia consideravelmente de acordo com sua genética e manejo produtivo (WIERZBICKI, 2019; FONSECA, 2014). Isso pode ser observado em muitos estudos que visam elucidar os mecanismos de formação de polímeros na parede vegetal para melhoramento de cultivares (SHEN, 2009; MUTWIL, 2009; RUPRECHT, 2011) não só de cana, mas de outras plantas sacarinas como gramíneas C4, que fazem parte da extensa gama tecnológica que envolve o setor produtivo agrônomo do país, podendo citar o milho e o sorgo (EMYDIO, 2010; MAGALHÃES, 2016).

3.2.3 Degradação lignocelulósica

Pode-se dizer de maneira simples que a obtenção de etanol a partir de biomassa envolve duas etapas. A primeira corresponde à desconstrução da parede celular na hidrólise dos polissacarídeos estruturais, gerando monossacarídeos e dissacarídeos. A segunda etapa é a fermentação dos monossacarídeos e dissacarídeos em etanol.

A otimização do processo de obtenção de etanol a partir de biomassa está intimamente ligada à composição do material lignocelulósico. Tanto para a etapa de obtenção do etanol quanto para a etapa de destinação do resíduo final (com a queima do resíduo da biomassa como opção de cogeração de energia), existe uma alta correlação e dependência do componente que será degradado com os compostos gerados a partir do processamento desse resíduo. Estudos relatam que a composição da biomassa e sua fração de cinzas possuem grande relevância no processo, mesmo sendo extrativos minoritários. Isso ocorre porque possuem compostos como Si, Ca, K, Na, Mg, S, P, Fe, Mn e Al na forma de óxidos, silicatos, carbonatos, sulfatos, cloretos e fosfatos. Esses componentes podem reagir com a parede interna dos dutos onde ocorre a destinação final da biomassa, gerando componentes residuais não desejáveis, incrustações e danos de corrosão ao sistema (OBERNBERGER, 1997; RAVEENDRAN, GANESH & KHILAR, 1995).

Durante a etapa de pré-tratamento da biomassa, também foram observados problemas com a corrosão do sistema quando o processo de explosão a vapor (steam-explosion) foi utilizado. O pré-tratamento consiste em submeter a biomassa a condições de temperatura e pressão muito elevadas. Ao sofrer uma descompressão repentina, o choque do material com as paredes dos equipamentos do pré-tratamento provoca avarias quase diárias devido à alta concentração de sílica na parede vegetal da cana-de-açúcar, o que interrompe a produção (MARQUES, Pesquisa FAPESP, 2018).

O processo de hidrólise não é trivial, envolvendo interações complexas entre a hemicelulose e celulose, a natureza cristalina da celulose e a barreira física formada pelas ligninas ao redor das fibras celulósicas. Por essa razão, a biomassa precisa passar por um pré-tratamento para separar a matriz de lignina dos demais componentes, reduzir a cristalinidade da celulose e hidrolisar a hemicelulose (WANG, 2013).

Os pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica podem ser físicos, químicos ou biológicos. Já a etapa de hidrólise pode ocorrer de forma química ou enzimática, sendo esta última desejável devido à redução de inibidores para a etapa de fermentação subsequente e à redução nos custos de recuperação dos componentes residuais do tratamento (SHIMIZU, 2018).

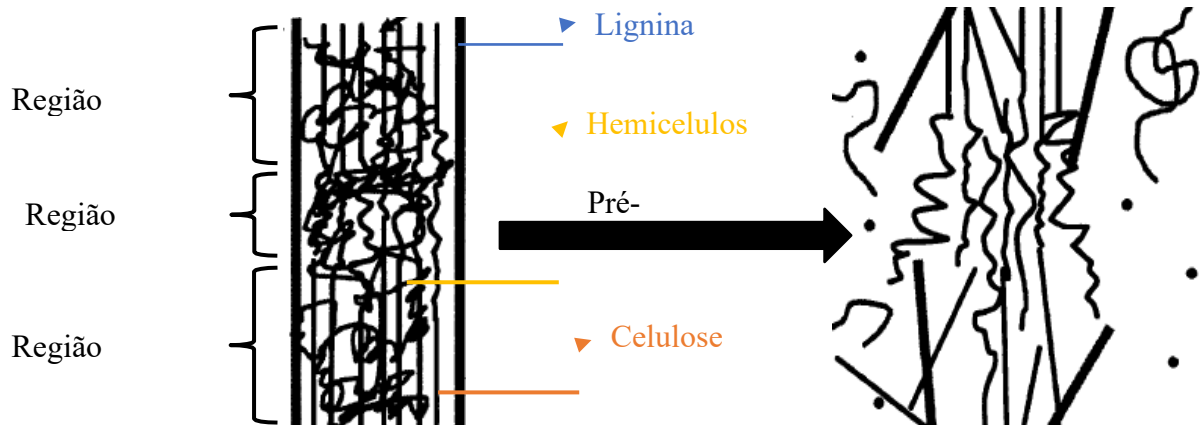
Estruturalmente, a lignocelulose apresenta um aspecto recalcitrante, causado pelas interações polímero-polímero associadas ao domínio da hemicelulose. A recalcitrância, que é a resistência intrínseca à decomposição, provoca limitações inerentes em seus três domínios. Eles consistem em: (I) porosidade, associada a uma matriz de pectina que prejudica o tráfego através da parede; (II) o código glicêmico, exclusivo de células, tecidos e espécies; e (III) cristalinidade da celulose, que se refere à organização em micro e/ou microfibrilas. A conformação entre diferentes polissacarídeos e polímeros determina o quão aptas tais moléculas estruturais e não estruturais estão para serem enzimaticamente hidrolisadas (TAVARES et al., 2015).

Tal característica, dificulta a efetiva utilização das frações da parede celular vegetal, uma vez que impossibilita o acesso das moléculas de hidrólise aos componentes estruturais da parede vegetal. Para resolver esse problema, métodos de pré-tratamento são utilizados visando melhor aproveitamento da biomassa. Atualmente, existem diversos métodos para o pré-tratamento destes materiais, categorizados como mecânicos, químicos, biológicos e físico-químicos (ZHAO, ZHANG, LIU; 2012).

3.2.4 Pré-tratamentos

O pré-tratamento da biomassa consiste em uma etapa anterior à sacarificação. Seu objetivo é retirar a lignina e alterar as características da parede melhorando o acesso as frações hemicelulósicas e celulósicas para ação enzimática. Os polímeros de carboidratos liberados da parede celular pelo processo de pré-tratamento servirão como substrato para enzima obter açúcares fermentescíveis, como demonstrados no esquema da Figura 10.

Figura 10: Pré-tratamento da biomassa



Fonte: ZHAO, ZHANG, LIU; (2012). Adaptado.

3.2.4.1 Pré-tratamento mecânico

O princípio do pré-tratamento mecânico é reduzir o tamanho de partículas do material vegetal para facilitar a manipulação, aumentando sua superfície de contato. Os processos mecânicos são a raspagem, trituração, moagem, esmerilhamento e prensagem. O tamanho do particulado varia dependendo do processo, do tipo de material vegetal e das etapas após o pré-tratamento. É de natureza física e seus fatores determinantes são custo, escalonamento e depreciação de equipamentos (SILVA, 2019).

3.2.4.2 Pré-tratamento químico

O pré-tratamento químico consiste na adição de compostos na biomassa, inorgânicos ou orgânicos, condicionados em temperatura ideal para ocorrência da reação. Possui a finalidade de reduzir ou eliminar os componentes de hemicelulose e lignina. O pré-tratamento ácido usa a adição de ácidos concentrados ou diluídos na biomassa e aquecimento contínuo. O pré-tratamento alcalino normalmente é feito utilizando-se soluções alcalinas tais como NaOH, Ca(OH)₂, KOH e NH₄OH com a temperatura adequada. Existem ainda os líquidos iônicos adicionados à biomassa, modificando a lignina e possibilitando a liberação da celulose. Opções como agentes oxidantes tais como ozônio, peróxido de hidrogênio ou solventes orgânicos como etanol, metanol, acetona e etilenoglicol podem ser utilizados porém, o pré-tratamento químico pode resultar em residuais indesejáveis a etapa de hidrólise subsequente (BADIEL *et al.*, 2014).

3.2.4.3 Pré-tratamento físico-químico

Princípios físicos como pressão e temperatura, somados a agentes químicos, funcionam como catalisadores. Podemos citar aqui exemplos como a explosão a vapor, auto-hidrólise (água quente líquida), oxidação úmida, uso de amônia para expansão da fibra e explosão a vapor com dióxido de carbono como práticas de pré-tratamento físico-químico amplamente utilizadas (SILVA, 2019).

3.2.4.4 Pré-tratamento biológico

O pré-tratamento biológico consiste na ação de microrganismos, principalmente fungos e actinobactérias, que são capazes de degradar biomassa lignocelulósica por meio da secreção de diversos tipos de enzimas extracelulares. Essas enzimas são liberadas para degradar as frações de celulose, hemicelulose e lignina. As enzimas responsáveis por degradar tais frações são, respectivamente, celulases, xilanases e enzimas oxidativas tais como lacases, manganês peroxidase e lignina peroxidase (UMMALYMA *et al.*, 2019).

3.2.5 Sacarificação da biomassa

Com o passar dos anos, a pesquisa fomentou vários métodos para hidrólise do material lignocelulósico. Comum a todos os métodos, está a etapa prévia de pré-tratamento que visa particular o material aumentando a área de contato da parede celular vegetal, como citado anteriormente (SHIMIZU, 2018).

As hidrólises ácida e enzimática são frequentemente citadas como as principais opções. A hidrólise enzimática, ou sacarificação, apresenta vantagem sobre a hidrólise ácida por não gerar inibidores da etapa subsequente de fermentação (SANTOS, 2019).

Em ambos os casos, há várias rotas de operação. A escolha dessa rota, deve ser baseada em questões como: qual produto bruto será usado, quais organismos serão utilizados para fermentação de açúcares liberados, quais frações se deseja separar e em qual momento. Isso porque existem diversas conformações possíveis, já que o produto vai depender do nível tecnológico disponível para obtê-lo. Um exemplo é a remoção da hemicelulose na etapa de pré-tratamento (ZHAO, ZHANG, LIU 2012).

A opção de remover ou não a hemicelulose está ligada ao fato de sua hidrólise liberar açúcares de cinco carbonos, que não são fermentados por leveduras comerciais. Então, a hidrólise e a fermentação poderiam ocorrer de forma simultânea apenas se o processo de

fermentação subsequente à hidrólise de celulose e hemicelulose fosse feito por uma levedura modificada que conseguisse fermentar os dois tipos de açúcares (pentoses e hexoses), (DIEN *et al.*,2003).

Atualmente a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o principal microrganismo utilizado para produção de etanol de primeira geração devido ao seu alto desempenho fermentativo. No caso do etanol de segunda geração, é necessária a completa hidrólise da xilana com fermentação da xilose, o que não pode ser feito por *S. cerevisiae* por não ser capaz de utilizá-la como fonte de carbono. O atual cenário tecnológico, onde os custos com transformações genéticas foram reduzidos, permite engenheirar leveduras que expressem de forma heteróloga enzimas que metabolizem açúcares de cinco e seis carbonos. Porém, dados que performem o resultado de tais trabalhos muitas vezes possuem proteção de patentes e se limitam à área industrial internacional (SINGH, 2016).

3.2.5.1 Rotas de produção para hidrólise enzimática e fermentação da biomassa

Após o pré-tratamento do material lignocelulósico, as etapas seguintes são a hidrólise e fermentação. Suas configurações dependem da tecnologia disponível para obtenção dos produtos e viabilidade econômica, sendo que, cada combinação, possui vantagens e desvantagens em relação às demais (SIPOS, 2009).

A vantagem do processo em separado (SHF) é que as temperaturas da hidrólise enzimática e da fermentação podem ser otimizadas, já que as temperaturas ótimas de cada etapa são diferentes. A hidrólise enzimática é realizada por celulases (endoglucanase e exoglucanase), que quebram a celulose em celobiose, sendo essa, subsequentemente convertida em duas moléculas de glicose pela β -glucosidase. Entretanto, a atividade da endoglucanase é inibida pela celobiose e a da β -glucosidase pela glicose. A sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) é uma forma de evitar a inibição enzimática, uma vez que à medida que a glicose está sendo formada, também está sendo consumida para a produção de etanol, levando a uma maior conversão de celulose (SANTOS, 2010).

Atualmente, a rota mais utilizada e desenvolvida é a rota enzimática, na qual enzimas específicas são utilizadas para hidrolisar o material após o pré-tratamento (MURAKAMI, BOMBABA, AFONSO, 2016).

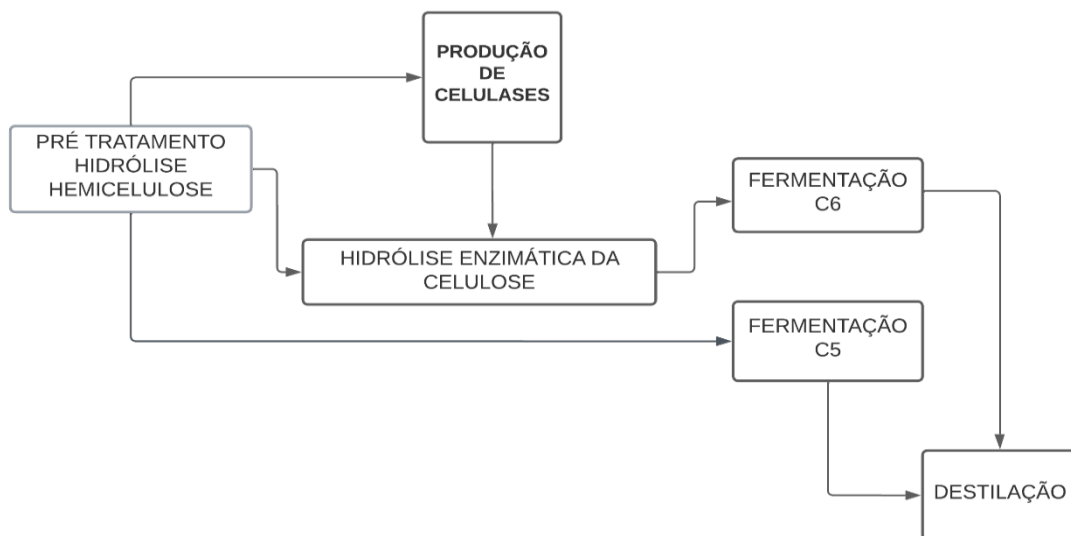
As configurações atuais possíveis são: hidrólise enzimática separada da fermentação (do inglês *Separated Hydrolysis and Fermentation* - SHF), hidrólise enzimática e fermentação simultâneas (do inglês *Simultaneous Saccharification and Fermentation* - SSF), hidrólise

enzimática e co-fermentação simultâneas (do inglês *Simultaneous Saccharification and co-fermentation* - SSCF) e uma configuração prevista, que é o bioprocesso consolidado (do inglês *Bioprocess Consolidated* - BPC).

- Hidrólise enzimática separada da fermentação (SHF)

A configuração (SHF) é composta de etapas onde o pré-tratamento da biomassa ocorre em locais diferentes para hidrólise da fração hemicelulósica e celulósica para obtenção de açúcares fermentescíveis. Os eventos acontecem em unidades separadas fisicamente como mostrado na Figura 11. Apresenta como vantagem a possibilidade de se trabalhar em condições ótimas para cada etapa. A maior desvantagem é ter a enzima de fermentação inibida por seu produto de hidrólise (SANTOS, 2010).

Figura 11: Hidrólise enzimática separada da fermentação (SHF)



Legenda: Fluxograma etapas de hidrólise enzimática separada da fermentação SHF.

Fonte: Da autora (2023). Baseado nos trabalhos de Castro e Pereira Junior (2010).

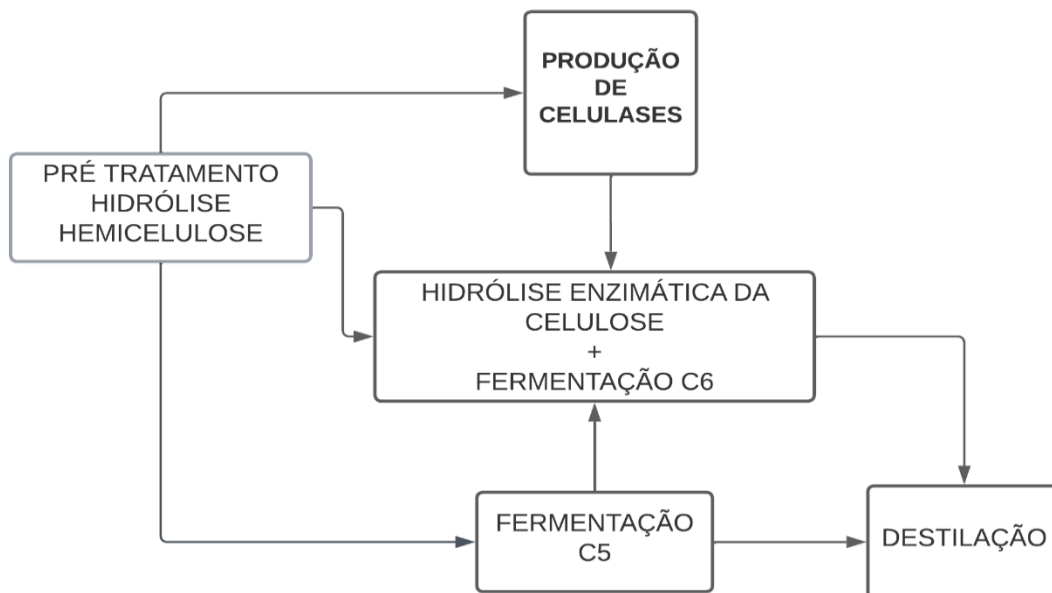
- Hidrólise enzimática e fermentação simultâneas (SSF)

A SSF é um arranjo produtivo que combina a hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados e a fermentação dos açúcares em um único evento (FIGURA 12). Como vantagem, apresenta a hidrólise do material lignocelulósico e a fermentação do açúcar produzido pelo

mesmo microrganismo, minimizando efeitos inibitórios da atividade enzimática (McMILLAN *et al.*, 1999).

Apresenta como desvantagem, rendimento pois é conduzido fora das condições ótimas de operação das enzimas. Microrganismos termotolerantes têm sido propostos para serem usados neste processo para aproximação da temperatura de atividade ótima enzimática. Como no processo anterior, os açúcares provenientes da hemicelulose após o pré-tratamento podem ser convertidos a etanol em um fermentador separado (TAHERZADEH & KARIMI, 2007).

Figura 12: Hidrólise enzimática e fermentação simultâneas (SSF)



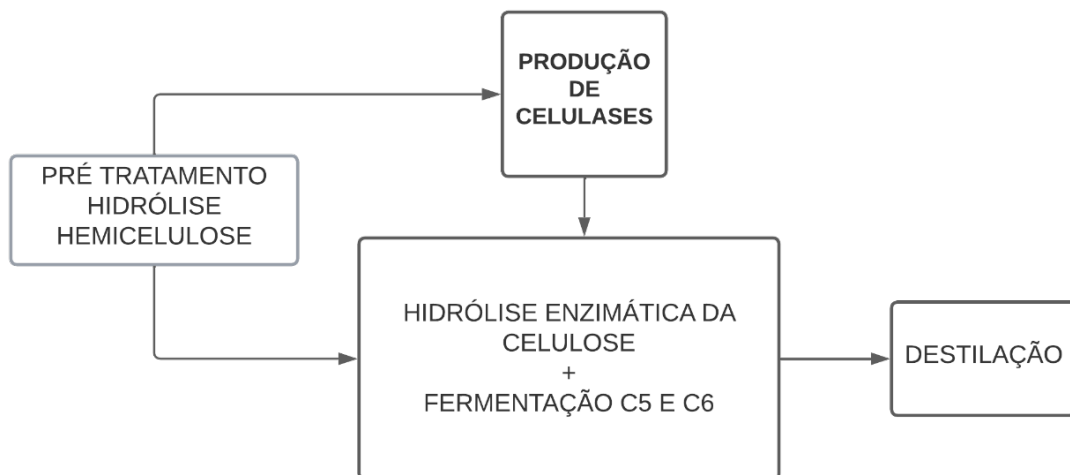
Legenda: Fluxograma etapas de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas.

Fonte: Da autora (2023). Baseado nos trabalhos de Castro e Pereira Junior (2010).

- Hidrólise enzimática e co-fermentação simultâneas (SSCF)

A configuração do tipo SSCF é uma variação da SSF e refere-se à possibilidade de fermentação de ambos os açúcares pentoses (C5) e hexoses (C6), em uma mesma etapa (FIGURA 13). O hidrolisado hemicelulósico e a celulose não são separados após a etapa de pré-tratamento, permitindo que os açúcares da hemicelulose sejam convertidos a etanol juntamente com a sacarificação da celulose e fermentação da glicose (TEIXEIRA, 2009). Para que um mesmo microrganismo seja capaz de fermentar ambos os açúcares, é necessária a intervenção da biologia molecular, visando conferir a um único microrganismo as características necessárias para tal (MACHADO, 2013).

Figura 13: Hidrólise enzimática e co-fermentação simultâneas (SSCF)



Legenda: Fluxograma etapas de hidrólise enzimática e co-fermentação simultâneas

Fonte: Da autora (2023). Baseado nos trabalhos de Castro e Pereira Junior (2010).

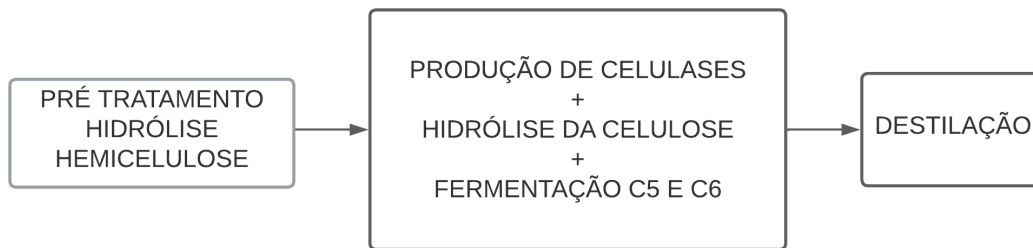
- Bioprocesso consolidado (BPC)

O bioprocesso consolidado, apresenta uma configuração (Figura 14) onde a produção de celulasas, a hidrólise enzimática de celulose e a fermentação de pentoses e hexoses é feita por um mesmo microrganismo mesmo diante de altas concentrações de etanol (MELO,2020).

Existem duas estratégias utilizadas para o BPC no que diz respeito a produção de

linhagens: a Categoria I se presta a modificar estirpes naturalmente produtoras de celulases tornando-as etanologênicas e a Categoria II visa a modificação de estirpes naturalmente produtoras de etanol para ser também celulolíticas (XU *et al.*, 2009).

Figura 14: Bioprocesso consolidado (BPC)



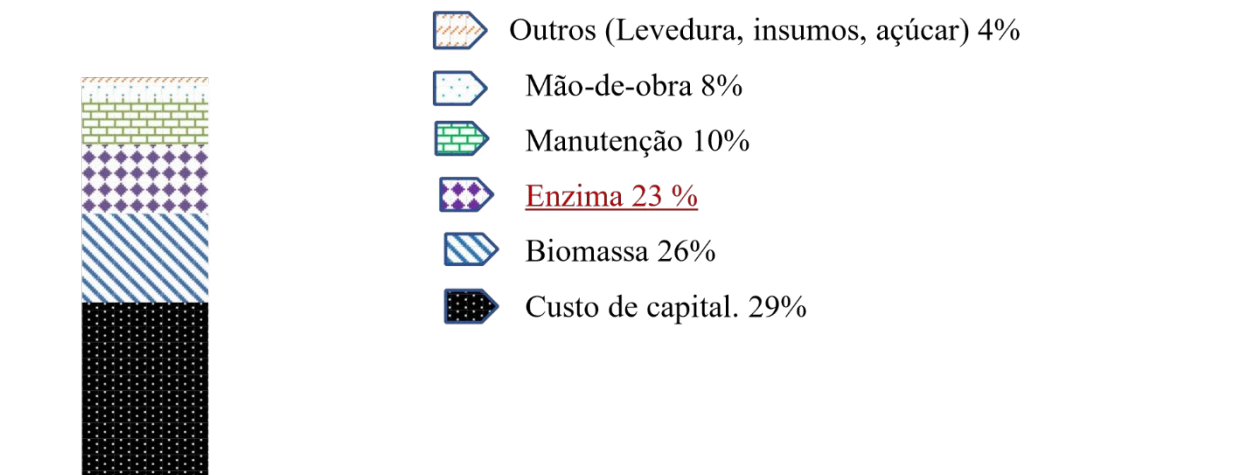
Legenda: Fluxograma etapas do bioprocesso consolidado

Fonte: Da autora. Baseado nos trabalhos de Castro e Pereira Junior (2010).

3.2.6 Enzimas para hidrólise de material lignocelulósico

As enzimas utilizadas para a hidrólise podem ser divididas em dois grupos: sistema hidrolítico e sistema oxidativo. O primeiro tipo faz a degradação hidrolítica de polissacarídeos, celulases e hemicelulases e o segundo promove a degradação da lignina. Um complexo enzimático proveniente de microrganismos é necessário para que haja a degradação da biomassa e formação do etanol (DAMASO, 2014). O isolamento e as técnicas de *screening* de tais microrganismos é de suma importância para que suas aplicações tecnológicas sejam viabilizadas economicamente, pois as enzimas industriais chegam a custar atualmente de 20 a 40% do total de despesas (Figura 15) com a produção de E2G (JUNQUEIRA *et al.*, 2017).

Figura 15: Expectativa relacionada ao custo relativo (%) de produção de E2G.

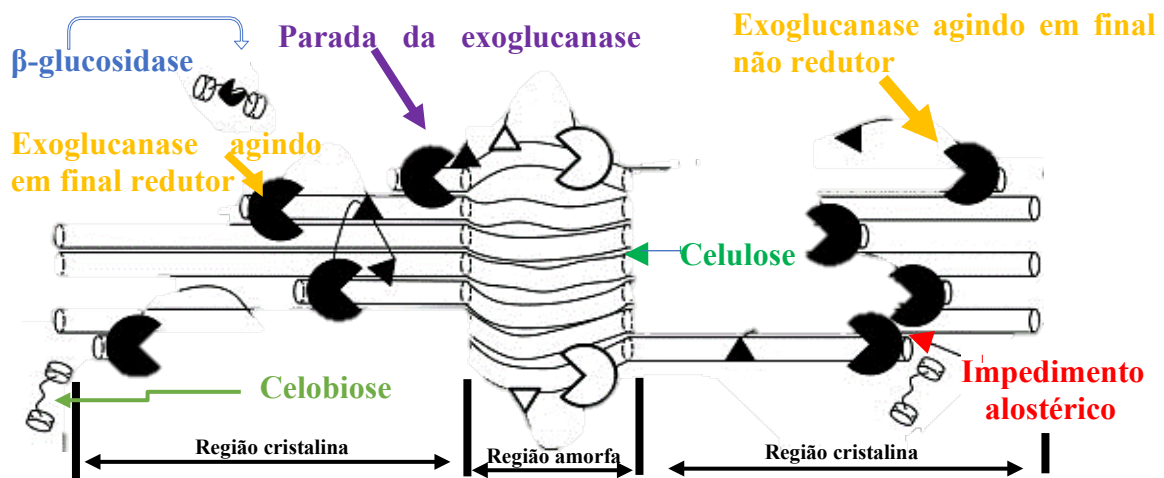


Fonte: Junqueira (2017). Adaptado

3.2.6.1 Hidrolíticas

As celulases e xilanases são enzimas hidrolíticas que agem em sinergia para desconstruir a parede celular vegetal. As celulases fazem parte de um complexo enzimático que age nas regiões amorfas e cristalinas da celulose (FIGURA 16). Elas atuam sinergicamente e estão subdivididas em três classes: endo-1,4- β -D-glucanases ou endoglicanases, que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose, criando novos terminais; exo-1,4- β -D-glucanases ou celobio-hidrolases, responsáveis pela ação nos terminais levando à celobiose; e 1,4- β -D-glucosidades, que hidrolisam a celobiose à glicose. As endo-1,4- β -glucanases ou 1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolases (EC 3.2.1.4) atuam randomicamente nas regiões amorfas da celulose e de seus derivados, hidrolisando ligações glicosídicas β -(1,4) (NAGAR *et al.*, 2010).

Figura 16: Atividade enzimática na degradação da biomassa

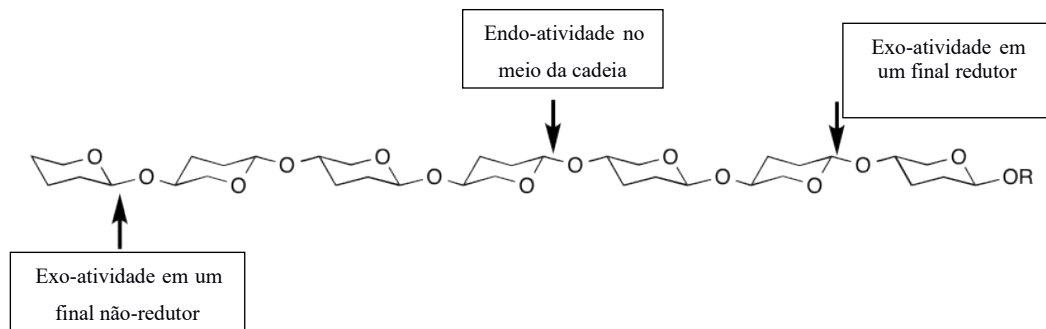


Legenda: Esquema de atividade enzimática agindo em biomassa lignocelulósica.

Fonte: Wang (2013). Adaptado.

As celobio-hidrolases (exo-1,4- β -D-glucanases, EC 3.2.1.91) atuam nos terminais redutores das cadeias de celulose, liberando D-celobiose. As β -D-glucosidases ou β -D-glucoside (gluco-hidrolases EC 3.2.1.21) catalisam a liberação de unidades monoméricas de D-glicose a partir da celobiose e celodextrinas solúveis (JEFFRIES, 1996).

As xilanases pertencem à família glicosil- hidrolases (GH) 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16,26, 30, 43, 44, 51 e 62. Estas enzimas foram reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) em 1961 e receberam o código enzimático de EC3.2.1.8. O nome oficial é endo- β -1,4-xilanase e os seguintes sinônimos são comumente utilizados: xilanase, endoxilanase, β -1,4-D-xilana-xilanohidrolase, endo- β -1,4-D-xilanase, β - 1,4-xilanase e β -xilanase (COLLINS *et al.*, 2005; MOTTA *et al.*, 2013). As xilanases são capazes de catalisar a hidrólise de glicosídeos (β -1,4), formando açúcares hemiacetais. Elas são classificadas de acordo com suas características de peso molecular, ponto isoelétrico, estrutura cristalina, parâmetros cinéticos, especificidade do substrato e produto final (JEFFRIES, 1996; MOTTA *et al.*, 2013). Assim como as celulasas, as xilanases atuam de forma sinérgica e coordenada em posições axiais e equatoriais da cadeia hemicelulósica como demonstrado na Figura 17.

Figura 17: Atividade de xilanase na cadeia hemicelulósica

Fonte: <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>

As endoxilanases podem ser classificadas em dois tipos de acordo com o produto final da reação: as que catalisam a hidrólise nos pontos de ramificação 1,3- α -1- arabinofuranosil em arabinoxilanos como adição às ligações de hidrólise da cadeia principal; e aquelas que não hidrolisam estes pontos de ramificação (RIZZATTI, 2004).

A enzima β -1,4-endoxilanase (1,4- β -D-xilana-xilohidrolase, E.C. 3.2.1.8) provoca a quebra das ligações glicosídicas do esqueleto heterogêneo da xilana, diminuindo seu grau de polimerização. O ataque ao substrato não é feito ao acaso e as ligações a serem hidrolisadas dependem da natureza do substrato como, por exemplo, o comprimento e o grau de ramificação do composto e a presença de substituintes, sendo que os principais compostos formados no início da hidrólise da xilana são os xilo-oligossacarídeos (NAGAR *et al.*, 2010).

3.2.6.2 Oxidativas

Enzimas oxidativas catalisam a degradação da lignina por meio da formação de radicais promovendo reações de oxido-redução. Podem ser divididas em oxidases, que tem por acceptor final de elétrons o oxigênio, e as peroxidases, que utilizam o peróxido de hidrogênio como co-substrato (BALDRIAN, 2006).

Lacases e peroxidases atuam principalmente sobre a lignina, porém fornecem antioxidantes que contribuem com a redução de elétrons livres em solução. A lacase (benzenodiol: oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2) pertence a um grupo de polifenóis oxidases contendo átomos de cobre no centro catalítico. A ação da lacase sobre a lignina é, em princípio, restringida às unidades fenólicas, que representam uma porcentagem pequena de todo

o polímero. As porções não fenólicas da lignina, entretanto, só são degradadas na presença de mediadores sintéticos como o ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino- 6-sulfônico), o 1-hidroxibenzotriazole e o ácido violúrico (LI *et al.*, 1999) e compostos produzidos naturalmente por fungos como o 3-hidroxiantranilato. A função de deslignificação por lacases é atualmente entendida como um processo sinérgico onde outras enzimas oxidativas com maior potencial redox estão envolvidas tais como a lignina peroxidase e manganês peroxidase (RICO *et al.*, 2014).

As peroxidases são enzimas oxidoreduções que catalisam diversas reações na presença de peróxidos, tais como peróxido de hidrogênio. Estas enzimas são produzidas por determinados microrganismos e plantas, apresentando inúmeras aplicações. As peroxidases de lignina (LiP) e as peroxidases de manganês (MnP) podem ser utilizadas pela indústria do papel ou na degradação de corantes azóicos. Possuem massa molecular de ~40kDa e são capazes de despolimerizar muitas substâncias fenólicas (DASHTBAN *et al.*, 2010). Têm sido reportados diversos trabalhos que expõem a importância deste tipo de enzimas na degradação de biomassa vegetal, como por exemplo, de coníferas de madeira dura (HILDÉN *et al.*, 2006; MACDONALD *et al.*, 2016).

3.3 Microrganismos e a produção enzimática

Apesar da abundância de material vegetal disponível, apenas uma pequena porcentagem de microrganismos é capaz de degradá-lo completamente. Entre os microrganismos eficientes na capacidade de degradação da parede celular vegetal, estão os fungos e bactérias aeróbios e/ou anaeróbios facultativos, relatados na literatura como fonte de enzimas de degradação da biomassa. São importantes recicladores de nutrientes e essa característica é a base para seu uso na hidrólise da biomassa lignocelulósica (BETTACHE *et al.*, 2018).

As enzimas constituem um dos grupos mais importantes de biomoléculas produzidas por microrganismos que metabolizam o carbono, possibilitando promover a conversão do substrato onde estão aderidas em nutrientes, liberando açúcares essenciais ao metabolismo do microrganismo (DUNGAIT, 2011). A produção de enzimas extracelulares oriundas do metabolismo secundário de microrganismos também possibilita a prestação de serviço ecológico por esses microrganismos em seus nichos, promovendo a decomposição de matéria orgânica, o que faz deles um grupo alvo para a produção desses compostos de interesse não

apenas para o setor agrícola, mas também para as indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil e de papel (SELVARAJAN, 2018).

Segundo PAPADAKI *et al.*, (2020), o mercado global de enzimas foi avaliado em 7,1 bilhões de dólares em 2017 e deverá chegar a 10,5 bilhões tendo a Europa como principal produtor, responsável por 1/3 da produção global de enzimas, onde cerca de 70% da quota de mercado de enzimas foi produzida por microrganismos.

Os estudos envolvendo a produção enzimática de microrganismos passam por etapas que envolvem processos de triagem de microrganismos de alta produção, tipo de substrato indutor da expressão enzimática, avaliação estatística, estabilidade da enzima e triagem genética para possível melhoria de microrganismos já adaptados aos protocolos industriais (MACHADO, 2013). Atualmente, a expressão heteróloga de enzimas é possível graças aos avanços em biologia molecular e a redução de custo de processos de transformação genética que possibilita ao microrganismo adaptado a condições industriais receber o gene do microrganismo produtor recém-descoberto. Além disso, a inibição dessa expressão também precisa ser observada desde os primeiros ensaios para que possa ser desenvolvida uma engenharia metabólica de tolerância à inibição (SELVARAJAN, 2018).

Fungos e actinobactérias têm sido relatados na literatura como fonte de enzimas de degradação da biomassa. São importantes recicladores de nutrientes e essa característica é a base para seu uso na hidrólise da biomassa lignocelulósica.

Para os fungos, os microrganismos mais estudados para a produção de enzimas lignocelulolíticas, podemos destacar como mais importantes: *T. reesei*, *A. niger*, *A. nidulans*, pois já possuem linhagens melhoradas disponíveis comercialmente e foram amplamente estudadas para esse fim, além de: *Fusarium oxysporum*, *Geotrichum candidum*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium purpurogenum*, *Cephalosporium* sp., e *Trichoderma harzianum* (BEG *et al.*, 2001). Fungos do gênero *Aspergillus* já foram observados com potencial máximo para degradação da lignina e atividade da lacase (STRONG & CLAUS, 2011). Lin *et al.* (2010), estudando a população de *Neurospora crassa* e *Fusarium oxysporum* observou-se que as espécies apresentam simultaneamente alta produção de celulase e de etanol celulósico, esse é um feito raro entre as espécies produtoras. Ambas as espécies foram recentemente aprovadas para utilização em experimentos com conversão direta de lignocelulose a etanol.

Actinobactérias também são amplamente reportadas na literatura como produtoras de enzimas lignocelulolíticas e o gênero mais estudado na obtenção de enzimas e moléculas de interesse são os *Streptomyces*. Sua morfologia permite a adesão em superfícies com baixa

atividade de água, assim como os fungos, o que possibilita a colonização de diferentes tipos de substratos ao contrário da maioria das bactérias e leveduras, que não proliferam nessas condições de cultura (BEG *et al.*, 2001).

Para as bactérias, observa-se uma diferença estratégica celulolítica entre os grupos aeróbios e anaeróbios. As bactérias aeróbias celulolíticas do gênero *Acidothermus*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* e *Micromonospora* degradam a celulose principalmente por sistemas de celulases - enzimas capazes de degradar a forma cristalina deste polissacarídeo – semelhante aos fungos filamentosos aeróbios. Já as bactérias anaeróbias celulolíticas do gênero *Anaerocellum*, *Clostridium*, *Fibrobacter*, *Butyrivibrio* e *Ruminococcus*, possuem complexos “celulossomas”, estruturas responsáveis por se ligarem a superfície do substrato, sendo esta adesão específica para a celulose (COUGHLAN; LJUNGDAHL, 1988; KARMAKAR, 2010).

A regulação da produção de celulase é controlada por mecanismos de ativação e repressão, portanto, as celulases são conhecidas como enzimas induzíveis (SUKUMARAN RK, (2005). Análises genômicas demonstram que quase todas as *Streptomyces* contêm genes que codificam enzimas ativas de carboidratos (CAZy) e proteínas acessórias (BERLEMONT R, 2013).

A capacidade de cada microrganismo expressar tais enzimas, tem relação direta com o tipo de material a ser degradado, visto que os componentes da parede celular vegetal podem induzir a expressão enzimática e a composição dessa parede difere drasticamente de acordo com a espécie e manejo produtivo da cultura. Halliwell (1995), em estudo com a cepa ATCC 27405, observou que a atividade enzimática foi mais efetiva no metabolismo de celulose em papel filtro e menor atividade em celulose CFII (o substrato mais resistente).

A presença de açúcares é outro fator que pode afetar negativamente a expressão enzimática microbiana, chamada de repressão catabólica. Sua forma de ação pode variar entre espécies. Em um estudo avaliando a atividade enzimática da bactéria *Bacillus pumilus*, Amani (2007) observou que adicionar 0,6% de concentração de açúcar em meio de cultura não inativava a expressão enzimática, pelo contrário, a presença da glicose aumentou a atividade se comparado com os meios que não possuíam a glicose. No entanto, quando aumentada a concentração para 1,9%, a atividade enzimática foi drasticamente reduzida. O que indica que uma baixa concentração de glicose é necessária para ativar a expressão de xilanases, porém sua expressão é reprimida quando a disponibilidade de glicose é aumentada.

Além da indução ou inibição da expressão enzimática por substâncias difusíveis no

meio, outro fenômeno essencial pode ser observado quanto à atividade de hidrólise, o sinergismo entre enzimas. O sinergismo é um fenômeno essencial durante a hidrólise enzimática da celulose. Ocorre quando a ação combinada de duas ou mais enzimas leva a uma atividade maior do que a soma das atividades das enzimas separadas, podendo ocorrer com grupos de enzimas produzidos pelo mesmo microrganismo ou enzimas produzidas por microrganismos diferentes (BETTACHE *et al.*, 2018).

A literatura cita dois tipos de sinergias entre enzimas envolvidas no processo de hidrólise: A sinergia entre celobiohidrolases e endoglucanases chamada sinergia Exo-Endo e a sinergia entre duas celobiohidrolases chamada sinergia Exo-Exo. A sinergia Exo-Endo ocorre pelo ataque aleatório de endoglucanases levando à liberação de novas extremidades de cadeias de celulose tornando-as disponíveis para o ataque de celobiohidrolases. A sinergia Exo-Exo é também observada, mas seu mecanismo não é claramente estabelecido (ABRÃO *et al.*, 2017).

Para explicar esse fenômeno várias teorias são propostas como em trabalhos de Tomme *et al.*, (1990) e Kim *et al.*, (1998) apresentando a hipótese da formação em solução de um complexo enzimático que teria atividade catalítica significativa e permitiria o aumento da afinidade e adsorção das enzimas. Vários parâmetros parecem influenciar a sinergia: - A concentração total de enzimas: quando a saturação do substrato por enzimas é importante, mais o grau de sinergia é baixo (IGARASHI K. *et al.*, 2006); - A influência da razão de cada enzima: controverso, uma vez que alguns autores mostraram que a razão influencia a sinergia, enquanto Woodward, *et al.*, mostraram que o grau de sinergia foi independente dessa razão (IGARASHI K. *et al.*, 2006; TEERI TT, 1997). As propriedades morfológicas do substrato: o aumento da cristalinidade do substrato levaria ao aumento da sinergia (NIDETZKY B, 1994).

A atividade enzimática microbiana se deve à um grande reservatório de aglomerados de genes que têm o potencial para produzir novas moléculas secretadas. No entanto, muitos desses agrupamentos não são expressos sob condições culturais comuns. As culturas puras em meios ricos em nutrientes não imitam os ambientes complexos em que essas bactérias evoluíram (SEYEDSAYAMDOST *et al.*, 2012).

Sendo assim, é desejável explorar novos métodos de cultivo baseados em cocultura de múltiplas espécies para investigar os produtos desses aglomerados de genes. O presente trabalho implementou ensaios de interação binária interespecies para minerar produtores de enzimas lignocelulolíticas observando as interações entre fungos e actinobactérias baseados no fato de que novas linhas de evidência sugerem que a cocultura pode estimular a ativação de aglomerados genéticos silenciosos (SEYEDSAYAMDOST, 2012).

3.3.1 Obtenção de enzimas por fermentação em estado sólido e submerso.

A fermentação é a principal técnica de obtenção de várias enzimas. Tanto os fungos quanto as bactérias fornecem uma inestimável variedade de enzimas quando fermentados em substratos apropriados.

As siglas SSF (do inglês *Solid state fermentation*) e SmF (do inglês *Submerged fermentation*) que, traduzindo, significam respectivamente: Fermentação em estado sólido e Fermentação em estado submerso. Embora a maioria dos fabricantes de enzimas utilize técnicas de SmF, a produtividade enzimática por meio da SSF é normalmente maior (AGNIHOTRI *et al.*, 2010).

A SSF apresenta baixo custo de cultivo das enzimas em relação a SmF, menor risco de contaminação e melhor estabilidade enzimática. As condições do SSF são especialmente adequadas para o crescimento de microrganismos capazes de crescer em meio sólido, sua principal limitação é a dificuldade de controle dos parâmetros adequados ao cultivo, o que pode resultar em produtos indesejáveis em etapas distintas (LEITE, 2021).

Já a SmF permite melhor controle das condições durante a fermentação pois os parâmetros podem ser monitorados por sensores. É um método bem conhecido e amplamente utilizado para a produção de celulasas e xilanases (GRACIA-KIRCHNER, 2002). Em geral, a SmF é o método preferido de produção quando os preparativos exigem enzimas mais purificadas. O fato de a fermentação submersa ocorrer em reatores fechados, permite maior controle dos parâmetros como oxigênio dissolvido, pH, temperatura e biomassa. Já o SSF permite que substratos sólidos sejam utilizados testando meios complexos, geralmente utilizado com o objetivo de melhora da biomassa para alimentação animal (CORRAL, 2006).

4 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades de enzimas produzidas em mono e cocultivos de actinobactérias e fungos filamentosos para potencial aplicação na sacarificação de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente por reações ácido/base.

4.1 Objetivos específicos

- Avaliar e selecionar actinobactérias produtoras de xilanase em meio sólido e fermentação submersa utilizando xilano como única fonte de carbono;
- Quantificar a produção de enzimas hidrolíticas por actinobactérias em fermentação submersa utilizando sorgo como única fonte de carbono;
- Determinar a interação actinobactérias e fungos filamentosos em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) sólido;
- Avaliar a atividade enzimática de actinobactérias e fungos em mono e cocultivo em fermentação submersa;
- Pré-tratar a biomassa de sorgo sacarino quimicamente (ácido/base);
- Caracterizar a biomassa de sorgo sacarino quanto as frações de hemicelulose, celulose, lignina e extrativos em água e etanol;
- Obter o rendimento de açúcares na hidrólise;
- Comparar a liberação de açúcares fermentescíveis de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente quanto a aplicação de coquetéis enzimáticos comerciais e extratos brutos enzimáticos de cocultivo entre actinobactérias e fungos filamentosos durante a etapa de sacarificação.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, Flávia Oliveira *et al.* **Enzimas microbianas: potencial biotecnológico e efeitos modulatórios em ruminantes.** In: Colloq Agrar. 2017. p. 164-73.
- AGNIHOTRI, Swarnima *et al.* **Production and biochemical characterization of a novel cellulase-poor alkali-thermo-tolerant xylanase from Coprinellus disseminatus SW-1 NTCC 1165.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 26, n. 8, p. 1349-1359, 2010.
- ALMEIDA, J. R. **Anais do Simpósio Microrganismos em Agroenergia: da Prospecção aos Bioprocessos.** Documento 15 (2012: Brasília, DF)
<<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/980959>> Acesso em:23/11/2022
- ALMODARES, A.; HADI, M. R. **Production of bioethanol from sweet sorghum: A review.** African journal of agricultural research, v. 4, n. 9, p. 772-780, 2009.
- BADIEL, M. *et al.* **Comparison of Chemical Pretreatment Methods for Cellulosic Biomass** APCBEE Procedia v. 9, p. 170-174, 2014.
- BRASIL. Cgee - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. McTi - Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovações (org.). **BOLETIM TEMÁTICO DA BIOECONOMIA: Bioeconomia no Brasil e no mundo. Panorama da produção científica.** 2021. Disponível em: https://www.cgee.org.br/documents/10195/6917123/CGEE_OBio_bol-tem-bio.pdf. Acesso em: 10 set 2022.
- BALDRIAN, Petr. **Fungal laccases—occurrence and properties.** FEMS microbiology reviews, v. 30, n. 2, p. 215-242, 2006.
- BEG, Q. *et al.* **Microbial xylanases and their industrial applications: a review.** Applied microbiology and biotechnology, v. 56, n. 3-4, p. 326-338, 2001.
- BERLEMONT R, Martiny AC (2013) **Distribuição filogenética de celulasas potenciais em bactérias.** Appl Environ Microbiol 79: 1545-54.
- BETTACHE, A. *et al.* **Lignocellulosic biomass and cellulolytic enzymes of actinobacteria.** SAJ Biotechnol, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2018.
- BRASIL BOLSA BALCÃO – B3. **CBIO - Crédito de descarbonização - Volume Negociado.** São Paulo, 2022. Disponível em: http://estatisticas.cetip.com.br/astec/series_v05/paginas/lum_web_v05_series_introducao.asp?str_Modulo=Ativo&int_Idioma=1&int_Titulo=6&int_NivelBD=2/. Acesso em: 02/05/2022.
- CANTAREL, Brandi L. *et al.* **The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics.** Nucleic acids research, v. 37, n. suppl_1, p. D233-D238, 2009.

- CARVALHO, João Luís Nunes *et al.* **Agronomic and environmental implications of sugarcane straw removal: a major review.** *Gcb Bioenergy*, v. 9, n. 7, p. 1181-1195, 2017.
- CARVALHO-NETTO, O. V. *et al.* **The potential of the energy cane as the main biomass crop for the cellulosic industry.** *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 1, n. 1, p. 20, 2014.
- COUGHLAN, M. P.; LJUNGDAHL, L. G. **Biochemistry and Genetics of Cellulose degradation, Comparative Biochemistry of Fungal and Bacterial cellulolytic enzyme systems.** Academic Press Limited, v. 5, p. 11-24, 1988.
- CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. (2022), **Boletim temático da Bioeconomia.** Observatório de bioeconomia. Ano 2. Vol 2. 28 p. Brasília, CGEE. Disponível em: <[2º Boletim de Bioeconomia outro.indd \(cgee.org.br\)](#)> Acesso em 20/11/2022.
- CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Relatório prospecção etanol de segunda geração - E2G 2030. Panorama analítico prospectivo dos biocombustíveis e bioprodutos. Projeto Agenda Positiva da Mudança do Clima e do Desenvolvimento Sustentável.** Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2018. 116p.: il. Disponível em: <[191c1c5e-3395-4376-998f-d9a33b2a0a7e \(cgee.org.br\)](#)> Acesso em 22/11/2022.
- COLLINS, Tony; GERDAY, Charles; FELLER, Georges. **Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases.** *FEMS microbiology reviews*, v. 29, n. 1, p. 3-23, 2005.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**, Brasília, DF, v. 9, n. 2, agosto 2022.
- CORRAL, O L, VILLASEÑOR-ORTEGA F. **Xylanases. advances in agricultural and food bio- technology** 2006; 305-322.
- DA CRUZ, Sandra Helena. **Bagaço e palha da cana são fontes de celulose para gerar álcool.** 2008.
- DA SILVA, Jeniffer Léia Cardoso Teixeira; DA SILVA, Jaqueline Cardoso Teixeira; FERRARI, Sidney Carlos. **PROJEÇÃO DOS PREÇOS DO CRÉDITO DE DESCARBONIZAÇÃO (CBIO) DO PROGRAMA RENOVABIO.** *RETEC-Revista de Tecnologias*, v. 15, n. 1, p. 74-84, 2022.
- DAMASO, Monica Caramez Triches *et al.* **Bioprocesses for biofuels: an overview of the Brazilian case.** *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2014.
- DASHTBAN, M. *et al.* **Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin.** *Int J Biochem Mol Biol*, v. 1, n. 1, p. 36-50, 2010.
- DE PESQUISA ENERGÉTICA, EPE–Empresa. **Cenários de oferta de etanol e demanda ciclo Otto 2018–2030.** Rio de Janeiro. EPE, 2018. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br>>. Acesso em 23/11/2022.

DIAS, M.O.S. *et al.* **Cogeneration in integrated first and second generation ethanol from sugarcane.** *Chemical Engineering Research and Design*, v. 91, p. 1411–1417, 2013

DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; JEFFRIES, T. W. **Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status.** *Applied microbiology and biotechnology*, v. 63, n. 3, p. 258-266, 2003.

DINARDO-MIRANDA, Leila Luci *et al.* **Reação de cultivares de cana-de-açúcar à broca do colmo.** *Bragantia*, v. 72, p. 29-34, 2013.

DOS ANJOS, EDJANE ULISSES *et al.* **Análise De Crescimento De Genótipos Da Cana-De-Açúcar Sob Diferentes Regimes Hídricos.** (2018)

DUARTE, Naiara Lopes *et al.* **Cultura do sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench): uma revisão sobre sua versatilidade tecnológica, processamento e pós-colheita.** 2021.

DUNGAIT, J. A. J. *et al.* **Variable responses of the soil microbial biomass to trace concentrations of ¹³C-labelled glucose, using ¹³C-PLFA analysis.** *European Journal of Soil Science*, v. 62, n. 1, p. 117-126, 2011.

DUTRA, Emmanuel D. *et al.* **Ethanol production from the stem juice of different sweet sorghum cultivars in the state of Pernambuco, Northeast of Brazil.** *Sugar Tech*, v. 15, n. 3, p. 316-321, 2013.

EMYDIO, B.M. **Produção de etanol a partir de sorgo sacarino.** 2010. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/sorgo/index.htm>. Acesso em: 23/11/2022

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA – EPE. **Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis – Ano 2020.** Rio de Janeiro, 2021. Disponível em: <https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/analise-de-conjuntura-dos-biocombustiveis-2020>. Acesso em: 20/10/2022

BASTOS, Aline. **Enzimas: a chave da biotecnologia.** EMBRAPA, Brasília, 22 de dez, de 2015. *Biotechnology and biosafety*. Disponível em: < [Enzimas: a chave da biotecnologia - Portal Embrapa](#)>. Acesso em: 10 de jan. 2021.

FONSECA, Juliana Guimarães. **Caracterização do proteoma da parede celular de folhas e entrenós jovens e maduros de cana-de-açúcar.** 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FONTANA, A. *et al.* **Inventário nacional de emissões e remoções antrópicas de gases de efeito estufa.** 2021.

GARCIA-KIRCHNER O, Muñoz-Aguilar M, Pérez-Villalva R, Huitrón-Vargas C. **Mixed submerged fermentation with two filamentous fungi for cellulolytic and xylanolytic enzyme production.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2002;1105– 1114.

GARRON, Marie-Line; HENRISSAT, Bernard. **The continuing expansion of CAZymes and their families.** *Current opinion in chemical biology*, v. 53, p. 82-87, 2019.

GAROFALO, DFT *et al.* **Dinâmica na cultura da cana-de-açúcar no Brasil: 1990 a 2018.** Embrapa Meio Ambiente-Documents (INFOTECA-E), 2020.

GIMSING, Anne Louise *et al.* **Mineralization of the allelochemical sorgoleone in soil.** *Chemosphere*, v. 76, n. 8, p. 1041-1047, 2009.

GORREN, Regiane Catarina Ribeiro. **Biocombustíveis-Aspectos sociais e econômicos: comparação entre Brasil, Estados Unidos e Alemanha.** 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GUPTA, Vijai K. *et al.* **Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass.** *Trends in biochemical sciences*, v. 41, n. 7, p. 633-645, 2016.

HILDÉN, K. S. *et al.* **Expression on wood, molecular cloning and characterization of three lignin peroxidase (LiP) encoding genes of the white rot fungus *Phlebia radiata*.** *Current Genetics*, v. 49, n. 2, p. 97-105, 2006. ISSN 1432-0983. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00294-005-0045-y>> Acesso em 20/09/2022.

HIMMEL, Michael E. *et al.* **Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production.** *science*, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

HUNKE, Philip *et al.* **The Brazilian Cerrado: assessment of water and soil degradation in catchments under intensive agricultural use.** *Ecohydrology*, v. 8, n. 6, p. 1154-1180, 2015.

HU, Jinguang; ARANTES, Valdeir; SADDLER, Jack N. **The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect?** *Biotechnology for biofuels*, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2011.

IEA, **Crescimento total da produção de biocombustíveis por região, caso principal, 2021-2027**, IEA, Paris <https://www.iea.org/data-and-statistics/charts/total-biofuel-production-growth-by-region-main-case-2021-2027>, IEA. Licença: CC BY 4.0

IGARASHI K, Wada M, Hori R, Samejima M (2006). **Surface density of cellobiohydrolase on crystalline celluloses: A critical parameter to evaluate enzymatic kinetics at a solid-liquid interface.** *FEBS J* 273: 2869-78.

JEFFRIES T W. **Biochemistry and genetics of microbial xylanases.** *Current Opinion in Biotechnology*. 1996;7: 337-342.

JEFFRIES, T. W., ALEXANDER, M. A. **Production of ethanol from xylose by *Candida shehatae* grown under continuous or fed-batch conditions.** In: KIRK, T. K.; CHANG, H-M. *Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture*. Boston: Butterworth-Heinemann, 1990.

JUNQUEIRA, Tassia L. *et al.* **Techno-economic analysis and climate change impacts of sugarcane biorefineries considering different time horizons.** *Biotechnology for biofuels*, v.

10, n. 1, p. 50, 2017.

KARMAKAR, M.; RAY, R. R. **Current trends in research and application of microbial cellulases.** Research Journal of Microbiology. v. 6, p. 41-53. 2010.
<https://doi.org/10.3923/jm.2011.41.5>

KIBALNIK, O. P. *et al.* **A STUDY OF THE FRACTIONAL COMPOSITION OF SUGARS IN THE JUICE OF THE STEM OF SUGAR SORGHUM IN ARID CONDITIONS OF RUSSIA.** Journal of Agriculture and Environment, 2022.

KIM DW, Jang YH, Jeong YK (1998) **Adsorption kinetics and behaviour of two cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei* on microcrystalline cellulose.** Biotechnol Appl Biochem 27: 97-102.

KOHLHEPP, Gerd. **Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil.** Estudos avançados, v. 24, p. 223-253, 2010.

LANDAU, Elena Charlotte; SCHAFFERT, Robert Eugene. **Zoneamento agrícola.** 2012.

LAOPAIBOON, Lakkana *et al.* **Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 23, n. 10, p. 1497-1501, 2007.

LEAL, M. V. (2010), “Cana-energia”, in L. B. Cortez (org.), **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade,** São Paulo, Blucher.

LEITE, Paulina *et al.* **Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes.** Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, v. 27, p. 100407, 2021.

LEITE, R. C., & Cortez, L. A. B. (2008). **O etanol combustível no Brasil.** *Revista Biocombustíveis no Brasil: Realidades e Perspectivas, Ministério das Relações Exteriores.*

LI, J., Zhou, P., Liu, H., Xiong, C., Lin, J., Xiao, W., ... & Liu, Z. (2014). **Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies.** Bioresource technology, 155, 258-265.

LI, K.; XU, F.; ERIKSSON, K.-E. L. **Comparison of Fungal Laccases and Redox Mediators in Oxidation of a Nonphenolic Lignin Model Compound.** Applied and Environmental Microbiology, v. 65, n. 6, p. 2654 - 2660, 1999.

LIN H, Yin L, Xiao Z (2010) **Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1.** J Mar Sci Tech 18: 466-71.

LOPES, Jéssica Guimarães; DOS SANTOS, Kamila Cavalcante; COSTA, Andréia Alves. **Prospecção tecnológica do uso do bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de etanol de segunda geração.** Cadernos de Prospecção, v. 10, n. 3, p. 590-590, 2017.

LORENZI, Bruno Rossi; ANDRADE, Thales Haddad Novaes de. **O etanol de segunda geração no Brasil: políticas e redes sociotécnicas**. Revista Brasileira de Ciências Sociais, v. 34, 2019.

MACDONALD, J. *et al.* **Comparative analysis of lignin peroxidase and manganese peroxidase activity on coniferous and deciduous wood using ToF-SIMS**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 100, n. 18, p. 8013-8020, 2016. ISSN 1432- 0614. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7560-2> >. Acesso em 20/11/2022.

MACHADO, Cristina Maria Monteiro. **Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013.

MAGALHÃES, Paulo César *et al.* **Efeitos de diferentes níveis de estresse hídrico na caracterização ecofisiológica de genótipos de sorgo** (2016).

MALUF, Gabriel. **A competição entre o etanol de segunda geração e a produção de eletricidade pelo uso do bagaço**. 2014. Tese de Doutorado. FGV. 96 p. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10438/11528> > Acesso em: 10/02/2022.

MARQUES, Fabrício. Obstáculos no caminho. **Revista Pesquisa FAPESP, São Paulo**, 11 de dez. de 2018. Bioenergia. Disponível em: < [Obstáculos no caminho : Revista Pesquisa Fapesp](#) >. Acesso em: 10 de fev. de 2021.

MAY, André *et al.* **Sistema Embrapa de produção agroindustrial de sorgo sacarino para bioetanol sistema BRS1G–tecnologia qualidade Embrapa**. Sistema, v. 1, n. 3, p. 9, 2012.

MCMILLAN, James D. *et al.* **Simultaneous saccharification and cofermentation of dilute-acid pretreated yellow poplar hardwood to ethanol using xylose-fermenting *Zymomonas mobilis***. In: Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Humana Press, Totowa, NJ, 1999. p. 649-665.

MELO, Nicholas Rocha. **Etanol 2G: Processo produtivo e seu contexto atual no Brasil**. 2020.

MENANDRO, LAUREN MAINE SANTOS. **Caracterização e aproveitamento agrônômico e industrial de ponteiros e folhas secas da cana-de-açúcar**. Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), 2016.

MILANEZ, Artur Yabe; NYKO, Diego. **Panoramas setoriais 2015-2018: sucroenergético**. 2014.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA – MME. **Matriz Energética Nacional 2030**. Colaboração Empresa de Pesquisa Energética. Brasília: MME : EPE, 2007. P.254 : il. Disponível em : <[Matriz Energética Nacional 2030 - Matriz Energética Nacional 2030 - Ministério de Minas e Energia \(mme.gov.br\)](#)> Acesso 05/05/2022

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA – MME. **Portaria Nº 419 de 20 de novembro de 2019. Diário Oficial da União**, Brasília, 2019. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-n-419-de-20-de-novembro-de-2019->

[228863910](#)> Acesso em 08/09/2022.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA – MME. www.gov.br, (2020) Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, RenovaBio. Disponível em: < [RenovaBio — Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis \(www.gov.br\)](#)> Acesso em: 05 de Jan. de 2021.

MONTEIRO, Valdirene Neves; DO NASCIMENTO SILVA, Roberto. **Aplicações industriais da biotecnologia enzimática**. Revista processos químicos, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization**, v. 1, p. 251-276, 2013.

MURAKAMI, L. S.; BOMBABA, G.; AFONSO, G. **Processo produtivo do etanol de segunda geração usando bagaço de cana-de-açúcar**. X Encontro de Engenharia de produção Agroindustrial, 2016.

MUTWIL, Marek *et al.* **Transcriptional wiring of cell wall-related genes in Arabidopsis**. Molecular plant, v. 2, n. 5, p. 1015-1024, 2009.

NAGAR S, Gupta V K, Kumar D, Kumar L, Kuhad R C. **Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by Bacillus pumilus SV-85S in submerged fermentation**. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 2010;37: 71–83.

NIDETZKY B, Steiner W, Claeysens M (1994). **Cellulose hydrolysis by the cellulases from Trichoderma reesei: adsorptions of two cellobiohydrolases, two endocellulases and their core proteins on filter paper and their relation to hydrolysis**. Biochem J 303: 817-23.

NIMBAL, Chandrashekhar I. *et al.* **Phytotoxicity and distribution of sorgoleone in grain sorghum germplasm**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 44, n. 5, p. 1343-1347, 1996.

NYKO, Diego *et al.* **A corrida tecnológica pelos biocombustíveis de segunda geração: uma perspectiva comparada**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 32, p. 5-48, set. 2010.

OBERNBERGER, Ingwald *et al.* **Concentrations of inorganic elements in biomass fuels and recovery in the different ash fractions**. Biomass and bioenergy, v. 12, n. 3, p. 211-224, 1997.

PAPADAKI, Eugenia *et al.* **Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using Aspergillus niger in an integrated citric acid-enzymes production process**. Bioresource technology, v. 309, p. 123317, 2020.

PARRELLA, RA da C. *et al.* **Cultivares de sorgo para produção de bioenergia**. 2021.

POLIZELI, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes *et al.* **Xylanases from fungi: properties and industrial applications.** Applied microbiology and biotechnology, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

RAJ, Tirath *et al.* **Recent advances in commercial biorefineries for lignocellulosic ethanol production: Current status, challenges and future perspectives.** Bioresource technology, v. 344, p. 126292, 2022.

RAVEENDRAN, Karuppiah; GANESH, Anuradda; KHILAR, Kartic C. Influence of mineral matter on biomass pyrolysis characteristics. Fuel, v. 74, n. 12, p. 1812-1822, 1995.

REDDY, B. V. S.; RAMESH, S.; REDDY, P. S. **Sorghum breeding research at ICRISAT-goals, strategies, methods and accomplishments.** International Sorghum and Millets Newsletter, v. 45, p. 5-12, 2004.

RICO, A. *et al.* Pretreatment with laccase and a phenolic mediator degrades lignin and enhances saccharification of Eucalyptus feedstock. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 6, p. 2-14, 2014.

RIZZATTI, A.C.S. **Propriedades regulatórias e funcionais do sistema xilanolítico do fungo Aspergillus phoenicis.** 2004. 148 f. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

RUBIN, Edward M. **Genomics of cellulosic biofuels.** Nature, v. 454, n. 7206, p. 841-845, 2008.

RUPRECHT, Colin *et al.* **Large-scale co-expression approach to dissect secondary cell wall formation across plant species.** Frontiers in Plant Science, v. 2, p. 23, 2011.

SANTOS, Beatriz Vieira dos. **Caracterização, pré-tratamentos, hidrólises enzimáticas e fermentação alcoólica de sorgo biomassa [Sorghum bicolor (L.) Moench].** 2019. 103 f. Tese (Doutorado em Biocombustíveis) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. DOI <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2023>.

SANTOS, I. L. V. L. *et al.* **Sorgoleone: benzoquinona lipídica de sorgo com efeitos alelopáticos na agricultura como herbicida.** Arquivos do Instituto Biológico, v. 79, p. 135-144, 2012.

SANTOS, M. M.; FRANCO, T. T.; BERNI, M. D. **Caracterização físico-química da palha de cana de açúcar: uma revisão de literatura.** Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n. 3, p. 178-183, 2015.

SARAVANAN, A. *et al.* **Recent advances and sustainable development of biofuels production from lignocellulosic biomass.** Bioresource Technology, v. 344, p. 126203, 2022.

SHELLER, Henrik Vibe; ULVSKOV, Peter. **Hemicelluloses.** Annual review of plant biology, v. 61, p. 263-289, 2010.

SELVARAJAN, E.; SWATHI, S.; SINDHU, V. **Xylanases: For Sustainable Bioproduct Production**. In: *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development*. Springer, Singapore, 2018. p. 223-236.

SEYEDSAYAMDOST, Mohammad R. *et al.* **Old meets new: using interspecies interactions to detect secondary metabolite production in actinomycetes**. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, 2012. p. 89-109.

SHEN, Hui *et al.* **A bioinformatic analysis of NAC genes for plant cell wall development in relation to lignocellulosic bioenergy production**. *BioEnergy Research*, v. 2, n. 4, p. 217-232, 2009.

SHIMIZU, Felipe Lange. **Remoção de lignina e hemicelulose: influência na acessibilidade à celulose e sacarificação enzimática**. Dissertação de Mestrado 2018. Universidade Estadual Paulista - UNESP - São Paulo 2018. 76 p. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/153394>>. Acesso em 20/09/2022.

SILVA, Itallo Dirceu Costa *et al.* **Atributos do solo influenciados pela manutenção da palha em área de cana-de-açúcar sob diferentes tipos de solos**. 2020.

SILVA, Luciano Procópio; CARUSO, Cecília Sulzbacher; MAIA, Milena. **A metagenômica na busca de enzimas hidrolíticas bacterianas**. *Revista Eletrônica Estácio Saúde*, v. 4, n. 2, p. 193-210, 2015.

SINGH, Rajendra *et al.* **Microbial enzymes: industrial progress in 21st century**. *3 Biotech*, v. 6, n. 2, p. 174, 2016.

SIPOS, Bálint *et al.* **Sweet sorghum as feedstock for ethanol production: enzymatic hydrolysis of steam-pretreated bagasse**. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 153, n. 1, p. 151-162, 2009.

STICKLEN, Mariam B. **Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol**. *Nature reviews genetics*, v. 9, n. 6, p. 433-443, 2008.

STRONG, P. J.; CLAUS, H. **Laccase: a review of its past and its future in bioremediation**. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 41, n. 4, p. 373-434, 2011.

SUKUMARAN RK, Singhanian RR, Pandey A (2005) **Celulases microbianas - Produção, aplicações e desafios**. *J Sci Ind Res* 64: 832-44.

SOMANI, R. B.; TAYLOR, J. R. N. **Sorghum: a potential source of raw material for agro-industries**. *Alternative uses of sorghum and pearl millet in Asia*, p. 146, 2003.

SOUZA, V. F.; PARRELLA, R. A. da C.; TARDIN, F. D.; COSTA, M. R.; CARVALHO JÚNIOR, G. A.; SCHAFFERT, R. E. **Adaptability and stability of sweet sorghum cultivars**. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, Londrina, v. 13, n. 2, p. 144-151, 2013.

TABOSA, José Nildo *et al.* **Melhoramento genético do sorgo para o semiárido brasileiro**. 2021. Disponível em: <

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/229673/1/Melhoramento-genetico-do-sorgo-para-o-semiarido-2021.pdf>> Acesso em 21/11/2022.

TAHERZADEH, Mohammad J.; KARIMI, Keikhosro. **Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review**. *BioResources*, v. 2, n. 4, p. 707-738, 2007.

TAKENAKA, M., Lee, J. M., Kahar, P., Ogino, C., & Kondo, A. (2019). **Efficient and supplementary enzyme cocktail from Actinobacteria and plant biomass induction**. *Biotechnology Journal*, 14(3), 1700744.

TAVARES, E. Q. P.; DE SOUZA, A. P.; BUCKERIDGE, M. S. **How endogenous plant cell-wall degradation mechanisms can help achieve higher efficiency in saccharification of biomass**. *Journal of Experimental Botany*, v. 66, n. 14, p. 4133- 4143, 2015. ISSN 0022-0957. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erv171> >. Acesso em 21/11/2022.

TEERI TT (1997) **Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases**. *Trends Biotechnol* 15: 160-7.

TEIXEIRA, José A., **Desenvolvimento de processos fermentativos para a produção de bioetanol**. *Valorização de Resíduos*, 13, 17-19, 2009 Disponível em: <<https://hdl.handle.net/1822/56533>> Acesso em 21/09/2022.

TOMME P, Heriban V, Claeysens M (1990) **Adsorption of two cellobiohydrolases from Trichoderma reesei Avicel: Evidence for “exo-exo” synergism and possible “loose complex” formation**. 12: 525-30.

UDDIN, Md Romij *et al.* **Sorgoleone, a sorghum root exudate: algicidal activity and acute toxicity to the ricefish *Oryzias latipes***. *Aquatic botany*, v. 98, n. 1, p. 40-44, 2012.

UMAKANTH, A. V. *et al.* **Sweet sorghum for biofuel industry. In: Breeding sorghum for diverse end uses**. Woodhead Publishing, 2019. p. 255-270.

UMMALYMA, Sabeela Beevi *et al.* **Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—Current trends and future perspectives. In: Second and third generation of feedstocks**. Elsevier, 2019. p. 197-212.

US/EPA (Environmental Protection Agency) **EPA Finalizes Regulations for the National Renewable Fuel Standard Program for 2010 and Beyond**. 7p February 2010. Disponível em < 2022-12376.pdf (govinfo.gov)>. Acesso em 21/09/2022.

VAZ JUNIOR, S. *et al.* **Avaliação de cenários-base: determinação dos potenciais industrial e econômico de rotas de conversão a partir de xilose do bagaço de cana-de-açúcar**. Embrapa Agroenergia-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E), 2016.

VELOSO, R. P; OLIVEIRA, S. S; AZEVEDO, B; OLIVEIRA, L. S. C; **"Produção de etanol de segunda geração utilizando o licor do bagaço do sisal (agave sisalana) hidrolisado"**, p. 3590-3593. In: São Paulo: Blucher, 2018.

ISSN 2359-1757, DOI 10.5151/cobeq2018-PT.0946

WANG, Mingyu *et al.* **The structural and biochemical basis for cellulose biodegradation.** Journal of Chemical Technology & Biotechnology, v. 88, n. 4, p. 491-500, 2013.

WHITFIELD, Matthew B.; CHINN, Mari S.; VEAL, Matthew W. **Processing of materials derived from sweet sorghum for biobased products.** Industrial Crops and Products, v. 37, n. 1, p. 362-375, 2012.

WIERZBICKI, Martin P. *et al.* **Xylan in the middle: understanding xylan biosynthesis and its metabolic dependencies toward improving wood fiber for industrial processing.** Frontiers in Plant science, v. 10, p. 176, 2019.

WOODWARD J, Hayes MK, Lee NE (1998). **Hydrolysis of cellulose by saturating and non-saturating concentrations of cellulase: Implications for synergism.** BioTechnology 6: 301-4.

XU, Qi; SINGH, Arjun; HIMMEL, Michael E. **Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose.** Current opinion in biotechnology, v. 20, n. 3, p. 364-371, 2009.

ZHAO, Xuebing; ZHANG, Lihua; LIU, Dehua. **Biomass recalcitrance. Part II: fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose.** Biofuels, Bioproducts and Biorefining, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 561-579, 13 jun. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bbb.1350>.

4 CAPÍTULO II: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS PARA PRODUÇÃO DE XILANASES E CELULASES

6.1 INTRODUÇÃO

O processamento da biomassa lignocelulósica para obtenção de etanol de segunda geração (E2G) passa por uma etapa de catálise enzimática que degrada complexos polímeros à monômeros de interesse para fermentação subsequente. A identificação de novas moléculas e enzimas de alto desempenho, visando a degradação da biomassa, é a resposta para o desenvolvimento de processos econômicos na produção de etanol de segunda geração (E2G) (STICKLEN, 2008.). No âmbito da bioenergia, as enzimas hidrolíticas são estudadas para aplicação em pré-tratamento de biomassa ou para melhoria da sacarificação através da preparação de coquetéis enzimáticos otimizados. Isso porque a utilização de hemicelulases, principalmente as xilanases, podem auxiliar hidrolisando a xilana que não foi solubilizada no pré-tratamento, possibilitando um maior acesso das celulases à celulose (HU, ARANTES, SADDLER; 2011).

A triagem de cepas produtoras de enzimas xilanolíticas também se baseia na relação entre o microrganismo e o substrato utilizado como meio de cultivo. A fonte nutricional define a expressão das enzimas necessárias para obtenção de nutrientes, possibilitando conhecer as condições adequadas para cada microrganismo produtor (WIBBERG, 2016). A relação microrganismo X substrato é decisiva para uma boa ou má condição de expressão enzimática, não só pela composição da parede celular vegetal da cultura utilizada, mas também pela forma de cultivo. Um exemplo é a morfologia de fungos e actinobactérias que, por possuírem hifas, são capazes de colonizar substratos sólidos e extrair nutrientes em meio com baixas atividades de água, ao contrário da maioria das bactérias e leveduras, que não proliferam nessas condições de cultura (BEG *et al.*, 2001).

Actinobactérias são procariontes filamentosos Gram-positivos cujo coeficiente de Chargaff com alto índice G+C (entre 65-75%), possuindo ainda um genoma que varia entre 2,5 e 9,7 Mb (BETTACHE *et al.*, 2018). Enquadra-se na ordem *Actinomycetales* e compreende 14 subordens e 44 famílias de constante atualização de classificação. Compreendem o principal grupo produtor de compostos e moléculas bioativas devido à grande diversidade metabólica que possui, além de extensos arsenais de metabólitos primários e secundários que podem ser explorados como potenciais para biotecnologia (GOODFELLOW e FIEDLER, 2010). As

actinobactérias apresentam crescimento lento, com tempo médio de geração entre 2 a 3 horas e podem produzir filamentos ramificados de 0,5-1,0 µm de diâmetro, menores que aqueles dos fungos (HOSHINO E, *et al.*, 1997). São organismos geralmente quimioorganotróficos, usando uma grande variedade de fontes de energia, incluindo polímeros complexos ou quimioautotróficas e também utilizando a oxidação do hidrogênio como fonte de energia e o dióxido de carbono como fonte de carbono. As actinobactérias optam por um pH neutro ou ligeiramente alcalino, geralmente são mesófilas, outras termofílicas e toleram temperaturas de 50 °C à 60 °C (GRIGOREVSKI *et al.*, 2005).

Actinobactérias também são uma opção viável para produção de enzimas degradadoras de lignocelulose. Além de produzir diversos antibióticos, elas também produzem enzimas hidrolíticas como amilase, pectinase, celulase, lipase, protease, catalase e xilanase (DORNELAS *et al.*, 2017; TAKENAKA *et al.*, 2019; GOMES, 2016; HU, ARANTES, SADDLER, 2020; PORSUK, 2013).

A produção industrial de enzimas é normalmente limitada pelo alto custo dos substratos utilizados para o cultivo dos microrganismos (SINGH, 2018). Para tornar a produção de enzimas mais competitiva, a utilização de substratos de menor custo e facilmente disponíveis deve ser explorada (GRIGOREVSKI *et al.*, 2005).

O sorgo sacarino faz parte de um grupo de cultivares apropriadas para produção de silagem e/ou como alternativa para produção de etanol (BOLFE, 2011) e pode ser explorado como fornecedor de carbono para crescimento microbiano na produção de enzimas.

Diante do exposto, o presente Capítulo do trabalho avaliou a capacidade de actinobactérias, pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF-MS) Sete Lagoas-MG, de utilizarem o sorgo sacarino como substrato para produção de enzimas hidrolíticas, Xilanase, FPase e Endoglicanase.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Microrganismos utilizados

Um total de 53 isolados de actinobactérias, pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF-MS), Sete Lagoas-MG foram utilizados nessa etapa do trabalho (TABELA 1). Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos Solos da Embrapa Milho e Sorgo.

Tabela 1: Relação das actinobactérias utilizadas.

| LINHAGEM | CODIGO ALELOMICRO | ESPÉCIE |
|-------------------|----------------------|------------------------------------|
| AE3J64 | BRM 047877 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| A404 | BRM 047951 | <i>Streptomyces chartreusis</i> |
| AEPFSRII31 | BRM 047955 | <i>Streptomyces phaeopurpureus</i> |
| A505 | BRM 047875 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| ACJ1 | BRM 047719 | <i>Streptomyces ossamyceticus</i> |
| A402 | BRM 047981 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| LD16 | BRM 047960 | <i>Streptomyces galbus</i> |
| ACJ26 | BRM 047077 | <i>Streptomyces capoamus</i> |
| ARLJ55 | BRM 047078 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| K18A18 | BRM 047940 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| AMSJ45 | BRM 047499 | <i>Streptomyces curacoii</i> |
| A465 | BRM 047878 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| ACSL1 | BRM 047942 | <i>Streptomyces seymenliensis</i> |
| AEPFSRII29 | BRM 047723 | <i>Streptomyces scabiei</i> |
| A509 | BRM 047872 | <i>Streptomyces deserti</i> |
| ARLJ51 | BRM 047939 | <i>Streptomyces griseoruber</i> |
| ARLJ49 | BRM 047943 | <i>Amycolatopsis rhabdoformis</i> |
| ACT115 | BRM 047947 | <i>Streptomyces thioluteus</i> |
| ARLJ48 | BRM 047503 | <i>Streptomyces chiangmaiensis</i> |
| ACT83 | BRM 047938 | <i>Streptomyces longwooddensis</i> |
| A16 | BRM 047941 | <i>Streptomyces griseoruber</i> |
| A405 | BRM 047944 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| AE3J57 | BRM 047945 | <i>Streptomyces purpeofuscus</i> |
| K10A10 | BRM 047946 | <i>Streptomyces seymenliensis</i> |
| ACT641 | BRM 047948 | <i>Amycolatopsis rhabdoformis</i> |
| LD27 | BRM 047950 | <i>Streptomyces corchorusii</i> |
| LD18 | BRM 047953 | <i>Streptomyces phaeopurpureus</i> |
| ACSL2 | BRM 047954 | <i>Streptomyces chartreusis</i> |

| CONTINUAÇÃO DA TABELA. | | |
|-------------------------------|------------|--------------------------------------|
| A346 | BRM 047956 | <i>Streptomyces endophyticus</i> |
| A413 | BRM 047957 | <i>Streptomyces</i> sp |
| AE3J76 | BRM 047958 | <i>Streptomyces yunnanensis</i> |
| A403 | BRM 047959 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| A12 | BRM 047973 | <i>Kitasatospora atroaurantiaca</i> |
| LD1 | BRM 047974 | <i>Streptomyces massasporeus</i> |
| AC77 | BRM 047975 | <i>Kitasatospora phosalacinea</i> |
| ACJ27 | BRM 047976 | <i>Streptomyces</i> sp |
| AC54 | BRM 047977 | <i>Streptomyces sasae</i> |
| ACT645 | BRM 047978 | <i>Streptomyces</i> sp |
| AC25 | BRM 047979 | <i>Amycolatopsis rifamycinica</i> |
| ACT80 | BRM 047980 | <i>Streptomyces phaeochromogenes</i> |
| AC91 | BRM 047982 | <i>Streptomyces yunnanensis</i> |
| AC67 | BRM 047983 | <i>Streptomyces phaeopurpureus</i> |
| AC27 | BRM 047984 | <i>Streptomyces lydicus</i> |
| AC50 | BRM 047985 | <i>Streptomyces sampsonii</i> |
| AC18 | BRM 047986 | <i>Streptomyces longwoodensis</i> |
| A517 | BRM 047987 | <i>Streptomyces phaeochromogenes</i> |
| ACJ17 | BRM 047988 | <i>Streptomyces bangladeshensis</i> |
| ACT64 | BRM 047990 | <i>Streptomyces coacervatus</i> |
| ACT627 | BRM 047991 | <i>Streptomyces</i> sp |
| AEPFSRII5 | BRM 047992 | <i>Streptomyces olivochromogenes</i> |
| AC73 | BRM 048230 | <i>Streptomyces</i> sp |
| A450 | BRM 047937 | <i>Amycolatopsis bullii</i> |
| LD28 | BRM 047936 | <i>Streptomyces</i> sp. |

Fonte: Da autora (2023)

6.2.2 Reativação e teste de pureza dos isolados

Inicialmente, as actinobactérias conservadas em glicerol à temperatura de 20° C, foram reativadas através da transferência de fragmentos de cada cultura estoque para placas de Petri contendo meio de cultura sólido Ágar Glicerol Asparagina (AGA) contendo 1 g.L⁻¹ de L-asparagina, 10 g.L⁻¹ de glicerol, 1 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 15 g.L⁻¹ de ágar, 1 mL.L⁻¹ de solução de micronutrientes suplementado com 0,03 g.L⁻¹ do fungicida ciclohexamida, seguido de incubação por um período de 14 dias à temperatura de 30°C.

6.2.3 Teste da capacidade de uso de xilano como fonte de carbono.

A atividade da enzima xilanase em meio sólido foi efetuada através de Índice Enzimático (IE) de acordo com a metodologia preconizada por LOPES *et al.*, (2011). Colônias isoladas de cada estirpe de bactéria crescida em meio BDA foram ressuspensas em solução salina 0,85% estéril e alíquotas de 200 µL dessa suspensão foram distribuídas em poços de placas tipo Elisa contendo 96 cavidades. Em seguida, uma amostra de cada suspensão foi transferida para uma placa de Petri 150 x15mm contendo meio xilano 10 g L⁻¹ (*xilana beechwood* - Sigma-Aldrich; St. Louis, MO. USA), 0,6 g.L⁻¹ extrato de levedura, 7,0 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 2,0 g.L⁻¹ K₂HPO₄, 0,1 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 1,0 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 15 g.L⁻¹ ágar, pH 5.3 corrigido. Após o período de 72 h de incubação à temperatura de 30°C, efetuou-se a medida dos halos em torno de cada colônia, que representa a capacidade de degradação do xilano, para estimativa de seus respectivos índices enzimáticos (IE).

O halo de degradação foi revelado utilizando corante Vermelho Congo (1%), seguido de sucessivas lavagens de NaCl 1M e estabilização do crescimento com uma lavagem/inundação da placa com HCl 1M (TEATHER e WOOD,1983).

O IE foi calculado utilizando-se a equação 1:

$$IE = : \frac{\text{Diâmetro do halo de hidrólise}}{\text{Diâmetro da colônia}} \quad (1)$$

6.2.4 Avaliação da atividade enzimática em meio líquido

A atividade enzimática em cultivo submerso, foi avaliada somente para os seis primeiros colocados de um ranking que considerou potenciais produtores em meio sólido, aqueles que apresentaram índice enzimático superior a 2,5 (IE > 2,5), segundo a metodologia de LOPES *et al.* (2011).

Para iniciar os ensaios de atividade xilanólíticas, as culturas de actinobactérias selecionadas, foram inoculadas em dois meios diferentes.

O primeiro contendo xilano como fonte de carbono, incluindo 10,0 g.L⁻¹ de xilano (*xilana beechwood* - Sigma-Aldrich; St. Louis, MO. USA), 3,0 g.L⁻¹ extrato de levedura, 7,0 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 2,0 g.L⁻¹ K₂HPO₄, 0,1 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 1,0 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 5,0 g.L⁻¹ peptona, pH 6.0 corrigido (LOPES *et al.*, 2011), o segundo contendo biomassa de sorgo sacarino seca *in natura* (sem pré-tratamento) 1% p/v como única fonte de carbono, incluindo K₂HPO₄ 0,01 g.L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 0,01 g.L⁻¹, NaCl 0,01 g.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,01 g.L⁻¹ (SING *et al.*, 2012).

A esterilização dos meios foi realizada a 121 °C durante 20 min.

Um disco micelial totalmente colonizado foi transferido para Erlenmeyer (de 50 mL de capacidade) contendo 30 mL de meio de cultivo descrito acima.

O inóculo foi cultivado durante 48h a 150 rpm e 30 °C em agitação constante.

6.2.5 Determinação enzimática

Após o período de inoculação, o meio foi filtrado em papel-filtro qualitativo Whatman Nº1 (*GE Healthcare Life Sciences*; Piscataway, NJ. USA) e o sobrenadante utilizado como extrato bruto enzimático.

Para determinação da atividade de xilanase, adicionou-se 10 µL do extrato bruto enzimático em 20 µL de xilano (*xilana beechwood 2%* - Sigma-Aldrich; St. Louis, MO. USA) (m/v) (substrato). O branco do substrato foi feito substituindo o volume da enzima por tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1M pH 5.0 e o branco da enzima substituindo a xilana por tampão. A reação foi feita em termociclador por 30 minutos a 50 °C. Posteriormente, adicionou-se 60 µL de DNS (ácido 3,5 – Dinitrosalicílico) e incubou-se em termociclador a 95 °C por 10 min (MILLER, 1959). Foram diluídas, 45 µL da reação em 100 µL de água deionizada em placas Elisa, e a leitura feita em espectrofotômetro a 540 nm.

Para o cálculo de atividade enzimática, uma curva analítica de xilose foi relacionada com a leitura do ensaio. Para construção da curva, uma alíquota de 10 µL de cinco diluições de xilose, foi adicionada a uma placa de 96 poços contendo 20 µL de solução tampão e 60 µL de DNS incubados em termociclador por 10 minutos a 95°C. Uma alíquota de 45 µL foi diluída em 100 µL de água deionizada em placa Elisa para leitura em espectrofotômetro a 540 nm. O valor da absorbância de cada ponto corresponde ao valor absoluto de xilose a ser estimado no cálculo de atividade.

Uma unidade de xilanase (UI. mL⁻¹) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa o substrato para gerar 1 µmol de xilose por minuto.

6.3 Análise de dados

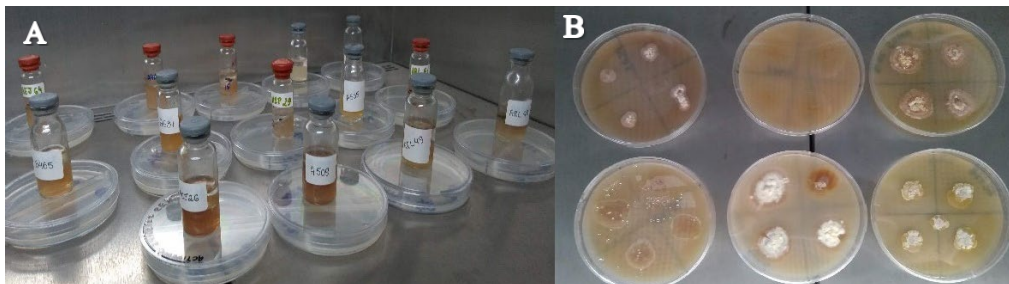
Todos os experimentos foram feitos em triplicata biológica. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste e médias de Scott-Knott ($p < 0,05$) no software R (R Core Team, 2022).

6.4 RESULTADOS

6.4.1 Reativação e teste de pureza dos isolados.

Todos os isolados reativados apresentaram bom crescimento em placa de Petri (FIGURA 18) contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA) demonstrando viabilidade das cepas.

Figura 18: Reativação dos isolados actinobacterianos



Legenda: (A) transferência dos isolados (B) actinobactérias crescidas em meio BDA.

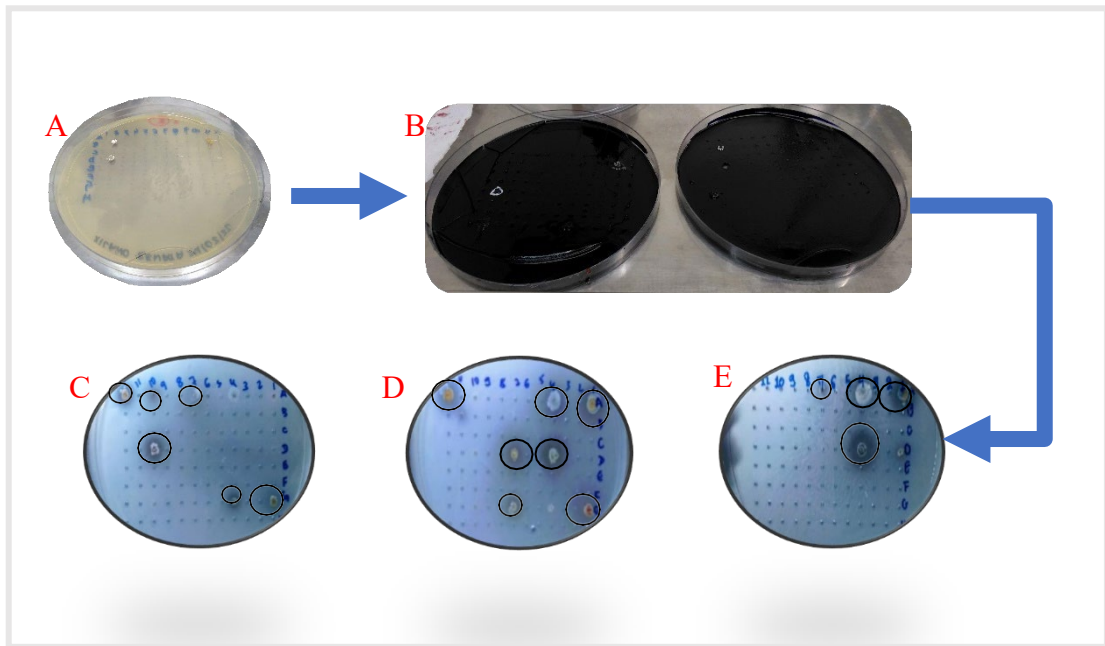
Fonte: Da autora (2023).

6.4.2 Avaliação da atividade enzimática em meio sólido

Das cinquenta e quatro cepas testadas na primeira fase (TABELA 1), apenas vinte e quatro (FIGURA 19) foram capazes de degradar xilana presente no meio. Entre elas, dezesseis preencheram o critério de seleção segundo LOPES *et al.*, (2011), apresentando IE superior a 2,5 conforme apresentado na Tabela 2. As dezesseis actinobactérias enquadradas nos critérios de seleção foram cultivadas em meio líquido contendo xilano como única fonte de carbono. As seis melhores produtoras de enzima xilanase em meio líquido foram selecionadas para a etapa de cultivo submerso utilizando o sorgo sacarino *in natura* como única fonte de carbono.

Os resultados do cultivo em placa de Petri contendo meio sólido com xilano como única fonte de carbono foram expressos em (mm) por halos de hidrólise e reveladas pela adição de corante Vermelho do Congo (1%) ao final de sete dias, mostrados na Figura 19.

Figura 19: Halos de hidrólise em meio sólido contendo Xilano como única fonte de carbono



Legenda: Actinobactérias crescidas em placa de Petri em meio sólido contendo xilano como única fonte de carbono. (B) Inundação da placa com corante Vermelho Congo (1%) para revelar halo de hidrólise. (C, D, E) Visualização de halos. Destaque em círculo preto para melhor visualização. As cepas (A505) *Streptomyces* sp., (AMSJ45) *Streptomyces curacoi*, (ARLJ49) *Amycolatopsis rhabdoformis*, (ACSL1) *Streptomyces seymenliensis*, (A404) *Streptomyces chartreusis*, (A465) *Streptomyces* sp., (ARLJ51) *Streptomyces griseoruber*, (ARLJ55) *Streptomyces* sp., (ACJ1) *Streptomyces ossamyceticus*, (ACJ26) *Streptomyces capoamus*, (ARLJ48) *Streptomyces chiangmaiensis*, (A509) *Streptomyces deserti*, (ACT115) *Streptomyces thioluteus*, (AE3J64) *Streptomyces* sp., (A402) *Streptomyces* sp., (AEPFSRII31) *Streptomyces phaeopurpureus*, (K18A18) *Streptomyces* sp. foram capazes de atender o critério de IE > 2,5.

Fonte: Da autora (2023).

O índice enzimático é um parâmetro semiquantitativo e tem sido muito utilizado para triagem, visto que sua metodologia simples permite observar com bastante reprodutibilidade em microrganismos produtores de enzimas de interesse (BEG *et al.*, 2000; ANGELICA *et al.*, 2013). O valor de índice enzimático pode não corresponder à maior produção da enzima em fermentação submersa, visto que a expressão enzimática microbiana é regulada por diversos fatores intrínsecos ao meio. Porém, permite a identificação de microrganismos produtores de enzimas de forma simples e rápida, sendo caracterizado como um método facilmente adaptável a qualquer microrganismo viável (TEATHER e WOOD,1983).

Neste estudo, 45% dos microrganismos mostraram resultados positivos frente à produção de xilanase. Trinta por cento deles atenderam o critério de seleção ficando acima

de 2,5 pelo método avaliado de LOPES *et al.*, (2011).

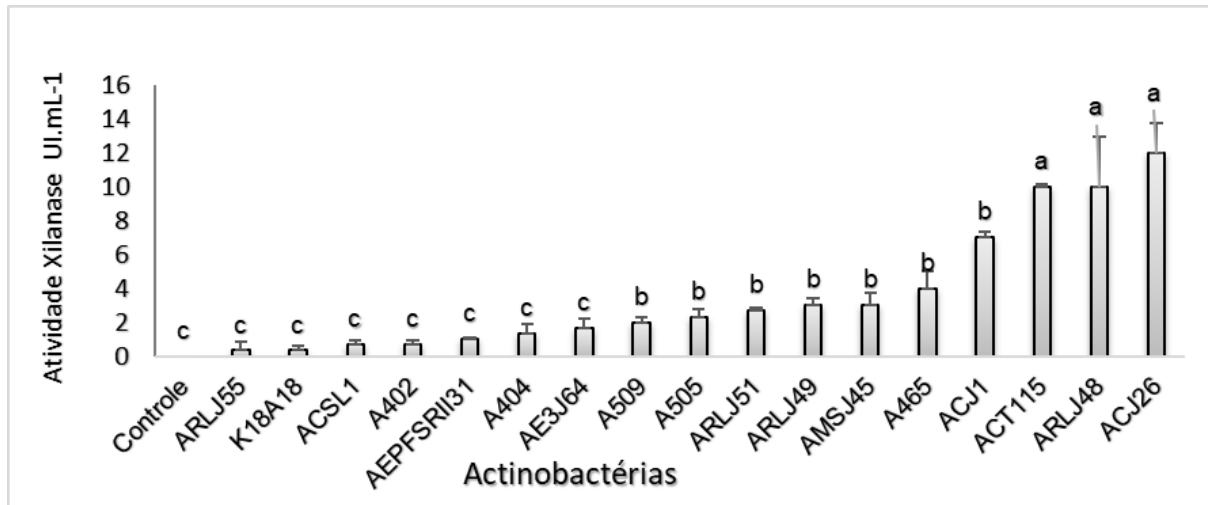
Tabela 2: Relação dos isolados de Actinobactérias da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF-MS) selecionados pelo índice enzimático (IE).

| ISOLADO | ESPÉCIE | ÍNDICE ENZIMÁTICO (IE) |
|------------|------------------------------------|------------------------|
| A505 | <i>Streptomyces</i> sp. | 6,5 |
| AMSJ45 | <i>Streptomyces curacoi</i> | 5,7 |
| ARLJ49 | <i>Amycolatopsis rhabdiformis</i> | 5,6 |
| ACSL1 | <i>Streptomyces seymenliensis</i> | 4,5 |
| A404 | <i>Streptomyces chartreusis</i> | 4 |
| A465 | <i>Streptomyces</i> sp. | 4 |
| ARLJ51 | <i>Streptomyces griseoruber</i> | 3,3 |
| ARLJ55 | <i>Streptomyces</i> sp. | 3,3 |
| ACJ1 | <i>Streptomyces ossamyceticus</i> | 3 |
| ACJ26 | <i>Streptomyces capoamus</i> | 3 |
| ARLJ48 | <i>Streptomyces chiangmaiensis</i> | 3 |
| A509 | <i>Streptomyces deserti</i> | 3 |
| ACT115 | <i>Streptomyces thioluteus</i> | 3 |
| AE3J64 | <i>Streptomyces</i> sp. | 2,5 |
| A402 | <i>Streptomyces</i> sp. | 2,5 |
| AEPFSRII31 | <i>Streptomyces phaeopurpureus</i> | 2,5 |
| K18A18 | <i>Streptomyces</i> sp. | 2,5 |

6.4.3 Atividade enzimática em cultivo submerso utilizando xilano como única fonte de carbono

Como dissemos, o IE não está diretamente ligado à produção enzimática em meio líquido. Diante disso, as dezesseis actinobactérias que atenderam ao critério $IE > 2,5$ (TABELA 2) foram inoculadas em meio líquido contendo xilano como única fonte de carbono para avaliação da atividade enzimática (FIGURA 20).

Figura 20: Atividade enzimática de xilanase em cultivo submerso contendo xilano como única fonte de carbono.



Legenda: Atividade de xilanase por actinobactérias *S. curacoii* (AMSJ45), *Streptomyces* sp. (A465), *S. ossamyceticus* (ACJ1), *S. capoamus* (ACJ26), *S. chiangmaiensis* (ARLJ48), *S. thiolutheus* (ACT115) em cultivo submerso contendo xilano como única fonte de carbono. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2023)

Para o teste de cultivo submerso em meio contendo xilano como única fonte de carbono, as actinobactérias *Streptomyces capoamus* (ACJ26), *Streptomyces chiangmaiensis* (ARLJ48), *Streptomyces thiolutheus* (ACT115) foram as melhores produtoras, apresentando respectivamente ($12 \pm 1,76$ UI. mL⁻¹), ($10 \pm 2,9$ UI. mL⁻¹) e ($10 \pm 0,11$ UI. mL⁻¹) sem diferença estatística entre elas, seguidas de *Streptomyces ossamyceticus* (ACJ1) com ($7 \pm 0,33$ UI. mL⁻¹) diferindo estatisticamente das demais. Houve produção enzimática para as actinobactérias *Streptomyces* sp. (A465) (4 ± 1 UI. mL⁻¹), *Streptomyces curacoii* (AMSJ45) ($3 \pm 0,75$ UI. mL⁻¹), *Amycolatopsis rhabdoformis* (ARLJ49) ($3 \pm 0,43$ UI. mL⁻¹), *Streptomyces griseoruber* (ARLJ51) ($3 \pm 0,11$ UI. mL⁻¹), *Streptomyces* sp. (A505) ($2 \pm 0,48$ UI. mL⁻¹) e *Streptomyces deserti* (A509) ($2 \pm 0,25$ UI. mL⁻¹) com diferença estatística do controle. As cepas (AE3J64) *Streptomyces* sp ($2 \pm 0,56$ UI. mL⁻¹), *Streptomyces chartreusis* (A404) ($1 \pm 0,52$ UI. mL⁻¹), *Streptomyces phaeopurpureus* (AEPFSRII31) ($1 \pm 0,06$ UI. mL⁻¹), *Streptomyces* sp. (A402) ($0,66 \pm 0,30$ UI. mL⁻¹), *Streptomyces seymenliensis* (ACSL1) ($0,66 \pm 0,25$ UI. mL⁻¹), *Streptomyces* sp. (K18A18) ($0,33 \pm 0,27$ UI. mL⁻¹), *Streptomyces* sp. (ARL55) ($0,33 \pm 0,48$ UI. mL⁻¹) não apresentaram diferença estatística entre elas e em relação ao controle.

Todas as dezessete actinobactérias selecionadas pelo IE na etapa de cultivo sólido, apresentaram produção enzimática em cultivo submerso. As seis melhores produtoras de

enzima xilanase em cultivo submerso, *Streptomyces capoamus* (ACJ26), *Streptomyces chiangmaiensis* (ARLJ48), *Streptomyces thiolutheus* (ACT115), *Streptomyces* sp. (A465), *Streptomyces curacoii* (AMSJ45), *Amycolatopsis rhabdoformis* (ARLJ49), foram selecionadas para etapa de fermentação submersa utilizando sorgo sacarino como única fonte de carbono.

6.4.4 Atividade enzimática em cultivo submerso utilizando biomassa de sorgo sacarino como única fonte de carbono

As actinobactérias selecionadas na etapa anterior foram inoculadas em dois meios distintos (FIGURA 21): o primeiro contendo biomassa de sorgo sacarino como única fonte de carbono, e o segundo contendo xilano como fonte única de carbono (controle positivo). Após a fermentação, o sobrenadante foi utilizado como extrato bruto enzimático para atividade de xilanase, FPase e endoglicanase (TABELA 3) (FIGURAS 22, 23 e 24). A fermentação foi realizada durante 48 horas, a 30°C, em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido.

Figura 21: Fermentação submersa de actinobactérias



Legenda: Fermentação submersa de actinobactérias *S. curacoii* (AMSJ45), *Streptomyces* sp. (A465), *S. ossamyceticus* (ACJ1), *S. capoamus* (ACJ26), *S. chiangmaiensis* (ARLJ48), *S. thiolutheus* (ACT115) em dois meios contendo sorgo sacarino e xilano como única fonte de carbono.

Fonte: Da autora (2023).

A atividade das enzimas xilanase, endoglicanase e FPase, foram mensuradas utilizando o extrato bruto enzimático obtido ao final de 48h de fermentação submersa. Os dois meios foram comparados com o objetivo de avaliar o sorgo sacarino como substrato indutor das enzimas Xilanase, FPase e Endoglicanase.

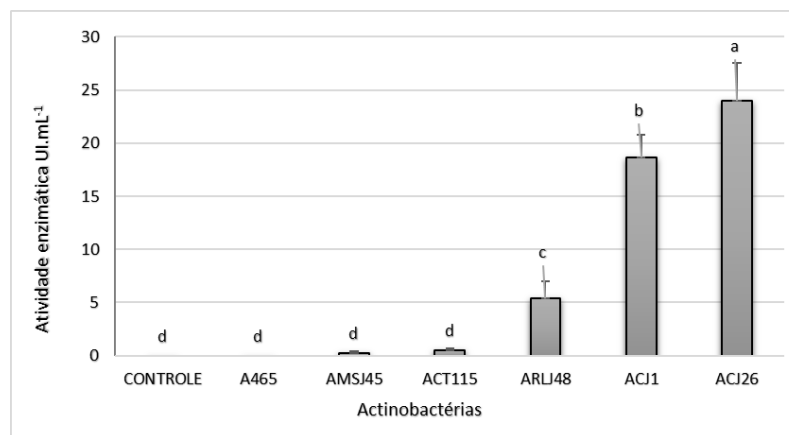
Tabela 3: Atividade enzimática de actinobactérias em meio contendo xilano como única fonte de carbono.

| Xilano de <i>Beechwood</i> (Sigma Aldrich) | | | | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|----------|
| Atividade enzimática (UI. mL ⁻¹) | | | | | | | |
| | ACJ1 | ACJ26 | AMSJ45 | A465 | ARLJ48 | ACT115 | Controle |
| Xilanase | 19 ± 2,16 | 24 ± 3,52 | 0,27 ± 0,14 | *ND | 5 ± 1,58 | 0,53 ± 0,15 | *ND |
| Fpase | *ND | 0,16 ± 0,07 | 0,1 ± 0,03 | 1,12 ± 0,37 | 0,64 ± 0,3 | 0,1 ± 0,03 | *ND |
| Endoglicanas | 0,99 ± 0,15 | 0,03 ± 0,01 | 0,18 ± 0,03 | 0,08 ± 0,01 | *ND | 0,21 ± 0,05 | *ND |

Legenda: *ND Não detectada

Fonte: Da autora (2023)

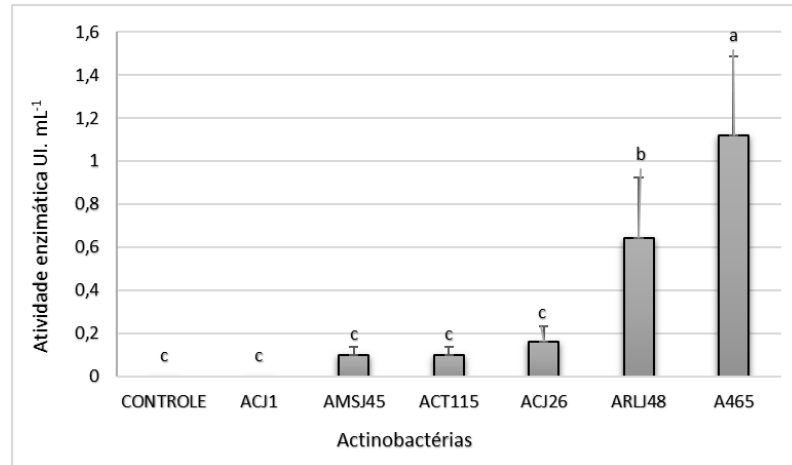
Figura 22: Atividade enzimática para xilanase



Legenda: Atividade de xilanase por actinobactérias *S. curacoii* (AMSJ45), *Streptomyces* sp. (A465), *S. ossamyceticus* (ACJ1), *S. capoamus* (ACJ26), *S. chiangmaiensis* (ARLJ48), *S. thiolutheus* (ACT115) em cultivo submerso contendo xilano como única fonte de carbono. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2023)

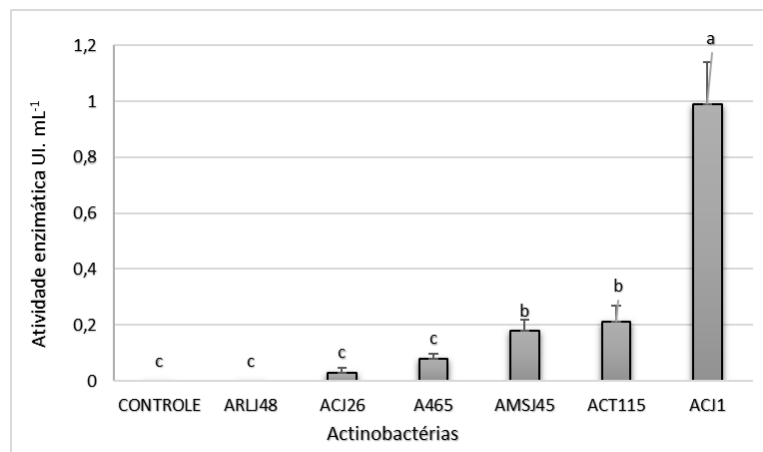
Para a enzima xilanase, *S. capoamus* ACJ26 ($24 \pm 3,52$ UI. mL⁻¹), *S. ossamyceticus* ACJ1 ($19 \pm 2,16$ UI. mL⁻¹) e *S. chiangmaiensis* ARLJ48 ($5 \pm 1,58$ UI. mL⁻¹) foram os melhores produtores, respectivamente, apresentando diferença estatística entre eles e os demais isolados. Não foi possível detectar atividade para *Streptomyces* sp. (A465) nas condições do ensaio. *S. thiolutheus* (ACT115) e *S. curacoii* (AMSJ45) não apresentaram diferença estatística em relação ao controle.

Figura 23: Atividade de FPase por actinobactérias

Legenda: Atividade de FPase por actinobactérias *S. curacoi* (AMSJ45), *Streptomyces* sp. (A465), *S. ossamyceticus* (ACJ1), *S. capoamus* (ACJ26), *S. chiangmaiensis* (ARLJ48), *S. thiolutheus* (ACT115) em cultivo submerso contendo xilano como única fonte de carbono. Letras diferentes indicam diferença estatística para os valores apresentados ($p < 0,05$) pelo teste de Scott knott.

Fonte: Da autora (2023)

Para a enzima FPase, a maior atividade foi detectada para *Streptomyces* sp. A465 ($1,12 \pm 0,37$ UI. mL⁻¹) e *S. chiangmaiensis* ARLJ48 ($0,64 \pm 0,3$ UI. mL⁻¹) com diferença estatística entre eles. Não foi possível detectar atividade para *S. ossamyceticus* ACJ1 nas condições do ensaio e *S. capoamus* (ACJ26), *S. thiolutheus* (ACT115) e *S. curacoi* (AMSJ45) não apresentaram diferença estatística em relação ao controle.

Figura 24: Atividade de endoglicanase por actinobactérias

Legenda: Atividade de endoglicanase por actinobactérias *S. curacoi* (AMSJ45), *Streptomyces* sp. (A465), *S. ossamyceticus* (ACJ1), *S. capoamus* (ACJ26), *S. chiangmaiensis* (ARLJ48), *S. thiolutheus* (ACT115) em cultivo submerso contendo xilano como única fonte de carbono. Letras diferentes indicam diferença estatística para os valores apresentados ($p < 0,05$) pelo teste de Scott knott.

Fonte: Da autora (2023)

A maior atividade enzimática de endoglicanase (FIGURA 24) foi expressa em *S. ossamyceticus* (ACJ1) ($0,99 \pm 0,15$ UI. mL⁻¹) e diferiu estatisticamente dos demais, seguido de *S. thiolutheus* (ACT115) e *S. curacoii* (AMSJ45) não apresentando diferença estatística entre eles.

Para o ensaio de fermentação submersa utilizando a biomassa do sorgo sacarino como única fonte de carbono, realizada durante 48h a 30°C sob agitação de 150 rpm, não foi possível detectar a atividade enzimática das actinobactérias *S. curacoii* (AMSJ45), *Streptomyces* sp. (A465), *S. ossamyceticus* (ACJ1), *S. capoamus* (ACJ26), *S. chiangmaiensis* (ARLJ48), *S. thiolutheus* (ACT115) para xilanase, FPase ou endoglicanase.

Um novo experimento foi montado com intuito de investigar a resposta enzimática bacteriana em relação ao uso do sorgo sacarino como substrato. O novo ensaio foi feito nas mesmas condições de agitação (150 rpm) e temperatura (30 °C) porém o tempo de fermentação foi alterado, de modo que as atividades foram avaliadas a cada 24 horas, até completar 96 horas. Nesse ensaio, apenas as atividades de xilanase (TABELA 4) e FPase foram testadas.

Tabela 4: Atividade de enzima xilanase produzida por actinobactérias utilizando sorgo sacarino como única fonte de carbono

| Sorgo sacarino | | | | | | | |
|-------------------------------|------------|-------------|-----------|------|--------|--------|----------|
| Xilanase UI. mL ⁻¹ | | | | | | | |
| | ACJ1 | ACJ26 | AMSJ45 | A465 | ARLJ48 | ACT115 | Controle |
| 24h | *ND | *ND | *ND | *ND | *ND | *ND | *ND |
| 48h | 0,8 ± 0,06 | *ND | *ND | *ND | *ND | *ND | *ND |
| 72h | 3 ± 0,15 | 0,3 ± 0,005 | 3 ± 0,3 | *ND | *ND | *ND | *ND |
| 96h | 4,4 ± 0,9 | 0,8 ± 0,07 | 4,5 ± 0,3 | *ND | *ND | *ND | *ND |

Legenda: Atividade da enzima xilanase produzida por actinobactérias *S. curacoii* (AMSJ45), *Streptomyces* sp. (A465), *S. ossamyceticus* (ACJ1), *S. capoamus* (ACJ26), *S. chiangmaiensis* (ARLJ48), *S. thiolutheus* (ACT115) em meio contendo sorgo sacarino “*in natura*” como única fonte de carbono, avaliados à 24h, 48h, 72h e 96h.

*ND não detectada

Fonte: Da autora (2023)

Os maiores valores foram encontrados após 96 horas de fermentação, momento em que as três actinobactérias expressaram mais intensamente a enzima. *S. curacoii* (AMSJ45) apresentou a maior atividade ($4,5 \pm 0,3$ UI. mL⁻¹), seguida por *S. ossamyceticus* (ACJ1) ($4,4 \pm 0,9$ UI. mL⁻¹) e *S. capoamus* (ACJ26) ($0,8 \pm 0,07$ UI. mL⁻¹). Em relação à enzima FPase, não foi possível detectar atividade em nenhuma das actinobactérias testadas em nenhum dos tempos avaliados, de acordo com as condições do ensaio.

6.5 DISCUSSÃO

6.5.1 Produção de xilanase em meio sólido e submerso utilizando xilano como única fonte de carbono.

Entre os diversos metabólitos importantes que as actinobactérias podem produzir, estão as enzimas extracelulares responsáveis por viabilizar o metabolismo do carbono. O presente trabalho avaliou as atividades enzimáticas de celulases e xilanases de actinobactérias pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo e obteve 45% de um universo de cinquenta e quatro cepas avaliadas capazes de expressar a enzima xilanase em meio sólido (TABELA 2).

O *screening* inicial previa a atividade de xilanase como foco principal, com intuito de selecionar cepas capazes de expressar xilanase em meio sólido e, posteriormente, obter um extrato bruto enzimático produzido em meio líquido que contribuísse na desconstrução da fração hemicelulósica da biomassa vegetal.

Diversos autores já apresentaram o índice enzimático (IE) como uma solução simples e reprodutível para avaliar a atividade enzimática de microrganismos isolados de diferentes ambientes em meio sólido. Entre eles, podemos citar Dornelas *et al.* (2016), que em seu trabalho de caracterização de actinobactérias isoladas do solo de cerrado, encontrou atividade de amilase, celulase e lipase para a maioria dos isolados de seu ensaio. Entre esses, as cepas *S. ossamyceticus* (ACJ1) e *S. capoamus* (ACJ26) apresentaram IE de 4,42 e 3,83, respectivamente, para celulase, utilizando carboximetilcelulose como substrato. Omar *et al.* (2017) e Sanjivkumar *et al.* (2017) apresentaram IE máximo de 3,25 para as actinobactérias testadas na produção de xilanases, ou seja, resultados inferiores aos encontrados no presente trabalho. Marques (2022) encontrou, ao caracterizar actinobactérias de solos cultivados do cerrado, atividades enzimáticas de xilanase variando o IE de 1,58 a 6,03, o que demonstrou a grande variabilidade nas amostras analisadas pelos autores.

A escolha do meio sólido seguido do cultivo submerso está baseada no fato de que as actinobactérias apresentam grande heterogeneidade de desenvolvimento e metabolismo em diferentes superfícies de resposta. A grande maioria das actinobactérias não conclui seu ciclo de esporulação em meio líquido, e a fisiologia desse microrganismo está diretamente ligada à produção de metabólitos, como enzimas extracelulares (CHATER, 2016).

De fato, entre as dezessete actinobactérias testadas em meio sólido, as três cepas que apresentaram maior IE foram *Streptomyces* sp (A505), *S. curacoï* (AMSJ45) e *Amycolatopsis rhabdiformis* (ARJ49) com IE de 6,5, 5,7 e 5,6 respectivamente, quando testadas em cultivo submerso, indicando boa expressão enzimática em meio sólido. Os melhores produtores da enzima xilanase foram *Streptomyces capoamus* (ACJ26), com $12 \pm 1,76$ UI. mL⁻¹, *Streptomyces chiangmaiensis* (ARLJ48), com $(10 \pm 2,9$ UI. mL⁻¹), e *S. thiolutheus* (ACT115), com $10 \pm 0,11$ UI. mL⁻¹. Esses resultados evidenciam que o meio de cultivo interfere na expressão enzimática, não somente em relação à composição do substrato, mas também às condições físicas do meio de cultivo, de acordo com a resposta fisiológica do microrganismo testado.

Valores encontrados na literatura para a atividade de enzimas xilanolíticas produzidas por *Streptomyces* variam entre as espécies estudadas e as condições de cultivo. Tuncer *et al.* (2004) obtiveram 22,41 UI. mL⁻¹ em condições otimizadas de produção em meio contendo xilana de aveia após 4 dias de incubação a 30°C. Nascimento *et al.* (2002), trabalhando com actinobactéria isolada de solo de cerrado, observaram a valores de atividade xilanásica de 70 U mL⁻¹ com “*xilana de larchwood*” como substrato. Por sua vez, Danso (2022), em seu ensaio com uma actinobactéria isolada de cupim, obteve produção de celulase e xilanase com dez dias de cultivo em meio contendo 15 g. L⁻¹ de palha de trigo e extrato de levedura a 1,5%. As atividades foram estimadas em 6,560 e 0,866 U mL⁻¹, respectivamente. Como podemos observar, as atividades são menores em trabalhos de investigação do que em pesquisas de otimização. Isso significa que a atividade enzimática das actinobactérias testadas pode ser aumentada se parâmetros nutricionais, físicos e químicos forem ajustados segundo metodologia de otimização.

6.5.2 Avaliação da atividade enzimática de actinobactérias utilizando biomassa de sorgo sacarino como única fonte de carbono

A eficiência na produção de enzimas lignocelulolíticas dos cultivos submersos de actinobactérias foi avaliada em função de dois tipos de substrato indutor: a biomassa de sorgo sacarino e xilano de Beech Wood (Sigma Aldrich®). O segundo foi usado como controle positivo visto que, no teste anterior, todas as actinobactérias testadas foram capazes de produzir xilanase quando inoculadas em meio contendo o xilano como única fonte de carbono.

Para os ensaios de 48 horas, não foram detectadas as produções enzimáticas de

xilanase, FPase e endoglicanase quando o sorgo foi usado como única fonte de carbono. Já as atividades foram identificadas para xilanase utilizando o xilano. *S. capoamus* (ACJ26) foi a melhor produtora, chegando a 24 UI. mL⁻¹. Para FPase, a maior atividade ocorreu em *Streptomyces* sp. (A465), com 1,12 UI mL⁻¹. Para atividade de endoglicanase, *S. ossamyceticus* (ACJ1) apresentou uma atividade de 0,99 U. mL⁻¹. Em trabalhos anteriores DORNELAS *et al* (2016) avaliaram a produção de endoglicanase (CMcase) por *S. ossamyceticus* (ACJ1) e *S. capoamus* (ACJ26) em testes de cultivo em meio sólido usando (CMC). A hipótese foi corroborada no presente trabalho, agora em meio líquido, porém com produções muito baixas. Além disso, *S. ossamyceticus* (ACJ1) não apresentou atividade de FPase em nenhum dos testes feitos e a atividade de FPase de *S. capoamus* (ACJ26) também foi considerada baixa (0,16 U mL⁻¹). Isso sugere que ambas as actinobactérias são promissoras no uso de enzimas xilanolíticas em processos em que as enzimas celulolíticas devem estar ausentes (MOURA, 2021).

Em trabalhos avaliando a produção de xilanases livres de celulases por *Streptomyces* sp., TECHAPUN *et al.*, (2002) e PRADEEP G.C. *et al.*, (2013) observaram atividades enzimáticas de 12,5 U. mL⁻¹ e 4197,1 U. mL⁻¹ utilizando bagaço de cana moído e farelo de trigo como fontes de carbono, respectivamente. O primeiro apresentou resultados inferiores àqueles do presente trabalho e o segundo apresentou valores muito superiores, devendo-se ao fato de que a metodologia utilizada possui uma etapa de purificação da enzima. O uso de tais microrganismos é indicado para a indústria de branqueamento de papel, já que é considerado um método de branqueamento ecológico que reduz significativamente a carga de resíduos tóxicos proveniente da cloração da lignina (MOURA, 2021).

Em seu trabalho com actinobactérias isoladas de solo, HAMEDI (2020) apresentou um branqueamento de polpa para produção de papel que reduziu em 25% o uso de clorados quando utilizado apenas o caldo da fermentação, sem métodos de purificação enzimática. Os resultados foram comparáveis à utilização de moléculas obtidas de caldo purificado, reforçando a ideia de que abordagens biotecnológicas são ambientalmente amigáveis e alternativas aos métodos químicos tradicionais. PORSUK (2013) chegou a valores de 255 U mL⁻¹ em ensaio otimizado com temperatura de 60°C e meio suplementado com extrato de levedura e “*xilana spelt*” sob fermentação submersa em pH alcalino.

Foi montada uma nova batelada para obter uma resposta mais aprofundada quanto ao uso do sorgo como indutor de atividade enzimática. O novo ensaio incluiu avaliações durante cinco dias a cada vinte e quatro horas, levando em consideração que um dos parâmetros que

influenciam a produção enzimática é o tempo de cultivo. As enzimas avaliadas neste novo ensaio foram xilanase e FPase.

As actinobactérias *S. ossamyceticus* (ACJ1), *S. capoamus* (ACJ26) e *S. curacoi* (AMSJ45) foram capazes de produzir xilanase utilizando o sorgo sacarino como única fonte de carbono. Os maiores valores foram encontrados após 96 horas de fermentação, quando as três actinobactérias tiveram a maior expressão da enzima, sendo *S. ossamyceticus* (ACJ1) ($4,4 \pm 0,9$ UI. mL⁻¹), *S. capoamus* (ACJ26) ($0,8 \pm 0,07$ UI mL⁻¹) e *S. curacoi* (AMSJ45) ($4,5 \pm 0,3$ UI mL⁻¹). Isso indica que o sorgo é uma opção para os microrganismos citados.

Nascimento *et al.* (2020) avaliaram a atividade enzimática de um isolado de *Streptomyces* sp. obtido de solo de cerrado, tendo como resultado valores de 70,0 U. mL⁻¹ de xilanase utilizando “*xilana de larchwood*” a 1% (p/v) como substrato. Já em resíduos agroindustriais como farelo de trigo, gérmen de trigo, grãos gastos de cerveja, espigas de milho e lodo de reciclagem de papel, foram obtidos valores de 28,4 U. mL⁻¹, 20,4 U. mL⁻¹, 16,0 U. mL⁻¹, 9,1 U. mL⁻¹ e 7,9 U. mL⁻¹, respectivamente. Assim como no presente trabalho, os autores demonstraram como as xilanas comerciais ajudam a entender melhor a ação das enzimas, quando comparadas a substratos complexos como biomassas, já que a degradação desses materiais depende de uma gama de enzimas e moléculas acessórias. Essas enzimas se ligam à parede celular vegetal e acessam as frações hidrolisáveis disponíveis na biomassa (BAO, 2021).

Silva (2020), ao avaliar a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas pelo fungo *Trichoderma reesei* a partir do bagaço do sorgo sacarino em fermentação semissólida e submersa, obteve picos de produção de xilanase, CMCase e FPase de 548,7 U g⁻¹, 19,6 U g⁻¹ e 2,1 U g⁻¹ em 48, 72 e 96 horas, respectivamente, com meio suplementado com farelo de trigo. Esse resultado demonstra que o uso do sorgo pode ser otimizado, visto que o sorgo tem baixa concentração de nitrogênio em sua composição em relação à palha de trigo (FIGUEIRÓ E GRACIOLLI, 2011). O nitrogênio é requerido para biossíntese de enzimas e outras moléculas biológicas, e seu déficit pode subestimar a produção microbiana. Dias (2017), ao utilizar o sorgo como substrato indutor de enzimas lignocelulolíticas por fungos filamentosos (*A. niger*) em cultivo sólido, destacou o sorgo suplementado com 0,5% de peptona como fonte de nitrogênio. A melhor condição de fermentação para atividade de xilanase foi de 300 U/g.

Tais resultados demonstram que as atividades enzimáticas das actinobactérias testadas utilizando a biomassa de sorgo sacarino como única fonte de carbono foram promissoras, já que podem ser otimizadas em trabalhos futuros. Quanto à FPase, não foi possível detectar

atividade enzimática para nenhuma das actinobactérias testadas em nenhum dos tempos avaliados, utilizando a biomassa de sorgo sacarino seca "*in natura*" como única fonte de carbono. Embora uma vasta gama de moléculas produzidas por actinobactérias seja conhecida, ainda há uma diversidade metabólica que pode ser estudada quando exploramos diferentes condições de cultivo.

6.6 CONCLUSÕES

- Dentre as 54 actinobactérias testadas, 17 espécies apresentaram halo de degradação de hidrólise de xilana acima de 2,5, demonstrando bom potencial enzimático para a produção de enzimas do complexo xilanolítico em meio sólido.
- Em testes de fermentação submersa, as espécies *S. capoamus* (ACJ26) e *Streptomyces ossamyceticus* (ACJ1) destacaram-se na produção da enzima endoxilanase em meio de cultivo contendo substrato de xilana de Beechwood como fonte de carbono, indicando potencial biotecnológico para processos que necessitam de enzimas xilanolíticas. Suas atividades atingiram 24 UI. mL⁻¹ e 19 UI. mL⁻¹, respectivamente.
- Foi observada diferença intraespecífica em *Streptomyces* para a produção de enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico.
- O sorgo sacarino mostrou-se como uma fonte de carbono capaz de induzir a produção de enzima xilanase para as cepas *S. curacoi* (AMSJ45), *S. ossamyceticus* (ACJ1) e *S. capoamus* (ACJ26), com resultados de 4,5 UI. mL⁻¹, 4,4 UI. mL⁻¹ e 0,8 UI. mL⁻¹, respectivamente.
- As actinobactérias *S. curacoi* (AMSJ45), *Streptomyces* sp. (A465), *S. ossamyceticus* (ACJ1), *S. capoamus* (ACJ26), *S. chiangmaiensis* (ARLJ48), *S. thiolutheus* (ACT115) não apresentaram atividade de FPase utilizando o sorgo sacarino como única fonte de carbono.

REFERÊNCIAS

- ANGELICA, Cristina de Souza *et al.* **Yeasts diversity in Brazilian Cerrado soils: study of the enzymatic activities.** African Journal of Microbiology Research, v. 7, n. 32, p. 4176-4190, 2013.
- BAO, Yuanyuan *et al.* **Important ecophysiological roles of non-dominant Actinobacteria in plant residue decomposition, especially in less fertile soils.** Microbiome, v. 9, n. 1, p. 1-17, 2021.
- BEG, Q. *et al.* **Microbial xylanases and their industrial applications: a review.** Applied microbiology and biotechnology, v. 56, n. 3, p. 326-338, 2001.
- BEG, Q. K. *et al.* **Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from Streptomyces sp. QG-11-3.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 24, n. 6, p. 396-402, 2000.
- BETTACHE, A. *et al.* **Lignocellulosic biomass and cellulolytic enzymes of actinobacteria.**
- BOLFE, E. L. **Informação geoespacial aplicada ao mapeamento e monitoramento da cultura da cana-de-açúcar: potencial para expansão do sorgo sacarino em áreas selecionadas.** 2011.
- CHATER, Keith F. **Recent advances in understanding Streptomyces.** F1000Research, v. 5, 2016.
- DANSO, Blessing *et al.* **Valorisation of wheat straw and bioethanol production by a novel xylanase-and cellulase-producing Streptomyces strain isolated from the wood-feeding termite, Microcerotermes species.** Fuel, v. 310, p. 122333, 2022.
- DIAS, Lídia Manfrin. **Produção de celulases e hemicelulases por Aspergillus fumigatus e A. niger utilizando sorgo biomassa como principal fonte de carbono.** 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biocombustíveis) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017. DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2017.427>
- DORNELAS, J. C. M. *et al.* **Characterization and phylogenetic affiliation of Actinobacteria from tropical soils with potential uses for agro-industrial processes.** 2017.
- FIGUEIRÓ, Gláucia Garcia; GRACIOLLI, Luiz Antônio. Influence of the chemical composition of the substrate in the cultivation of Pleurotus florida. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 924-930, 2011.
- GOODFELLOW, Michael; FIEDLER, Hans-Peter. **A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics.** Antonie Van Leeuwenhoek, v. 98, p. 119-142, 2010.
- GOMES, E. A. *et al.* **Microrganismos promotores do crescimento de plantas.** Embrapa Milho e Sorgo-Docmentos (INFOTECA-E), 2016.

GRIGOREVSKI De Lima AL, Pires Do Nascimento R, Da Silva Bon EP, Coelho RRR (2005) **Streptomyces drozdowiczii cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries.** *Enzyme Microb Technol* 37: 272-7.

HAMEDI, Javad; VAEZ FAKHRI, A.; MAHDAVI, S. **Biobleaching of mechanical paper pulp using Streptomyces rutgersensis UTMC 2445 isolated from a lignocellulose-rich soil.** *Journal of applied microbiology*, v. 128, n. 1, p. 161-170, 2020.

HOSHINO E, Shiroishi M, Amano Y, Nomura M, Kanda T (1997) **Synergistic actions of exo-type cellulases in the hydrolysis of cellulose with different crystallinities.** *J Ferment Bioeng* 84: 300-6.

HU, Jinguang; ARANTES, Valdeir; SADDLER, Jack N. **The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect?** *Biotechnology for biofuels*, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2011.

LOPES, F.; MOTTA, F.; ANDRADE, C.C.P.; RODRIGUES, M.I.; MAUGERI-FILHO, F. **Thermo-stable xylanases from non-conventional yeasts.** *Journal of Microbiology and Biochemical Technology*, v.3, p. 36-42, 2011.

MARQUES, Jéssyca da Silva. **Caracterização cultural, morfológica e enzimática de actinobactérias de áreas cultivadas de Ubajara.** 2022.

MENEZES, Cicero Beserra, **Melhoramento genético de sorgo** – Brasília, DF : Embrapa, 2021. ISBN: 978-65-87380-58-2 Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/229446/1/Melhoramento-genetico-de-sorgo.pdf> Acesso em: 18 Jun 2022

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

MOURA, S. C. et al. **Xilanases microbianas e suas aplicações industriais.** 2021. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia 2021. PDF (52 p.) – Documentos / Embrapa Agroenergia, ISSN 2177-4439, 38 Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1134008> Acesso em: 20/02/2022.

NASCIMENTO, R. P. *et al.* **Production and partial characterisation of xylanase from Streptomyces sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, n. 4, p. 549-555, 2002.

NASCIMENTO, Rodrigo Pires do *et al.* **A thermotolerant xylan-degrading enzyme is produced by Streptomyces malaysiensis AMT-3 using by-products from the food industry.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 63, 2020.

OMAR, Suhaila Mohd *et al.* **Verrucosipora sp. K2-04, potential xylanase producer from Kuantan Mangrove Forest sediment.** *International Journal of Food Engineering*, v. 3, n. 2,

p. 165-168, 2017

PORSUK, Ilknur *et al.* **A cellulase-free, thermoactive, and alkali xylanase production by terrestrial *Streptomyces* sp. CA24.** Turkish Journal of Biology, v. 37, n. 3, p. 370-375, 2013.

PRADEEP, G. C. *et al.* **A novel thermostable cellulase free xylanase stable in broad range of pH from *Streptomyces* sp. CS428.** Process Biochemistry, v. 48, n. 8, p. 1188-1196, 2013.

R Core Team (2022). **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: < <https://www.R-project.org/>.> Acesso em: 10 jan 2022

SANJIVKUMAR, Muthusamy *et al.* **Biosynthesis, purification and characterization of β -1, 4-xylanase from a novel mangrove associated actinobacterium *Streptomyces olivaceus* (MSU3) and its applications.** Protein Expression and Purification, v. 130, p. 1-12, 2017.

SILVA, Rebeca de Almeida *et al.* **Produção de enzimas celulolíticas e xilanolítica a partir do bagaço do sorgo sacarino por fermentação semissólida e submersa.** Campina Grande, 2020. Tese. Doutorado em Engenharia de Processos – Universidade Federal de Campina Grande. 109 f. Disponível em: < [REBECA DE ALMEIDA SILVA - TESE \(PPGEP\) 2019.pdf \(ufcg.edu.br\)](#)> Acesso em: 20 jan 2022.

SINGH, Davender *et al.* **Utility of acidic xylanase of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* JJBS250 in improving the nutritional value of poultry feed.** 3 Biotech, v. 8, n. 12, p. 1-7, 2018.

SINGH, Renu; KAPOOR, Vishal; KUMAR, Vijay. **Utilization of agro-industrial wastes for the simultaneous production of amylase and xylanase by thermophilic actinomycetes.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 43, n. 4, p. 1545-1552, 2012.

SOUSA, Juliani *et al.* **EFEITO DA ANTROPIZAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DA ENZIMA XILANASE EM ACTINOBATÉRIAS.** ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, v. 15, n. 28, 2018.

STICKLEN, Mariam B. **Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol.** Nature reviews genetics, v. 9, n. 6, p. 433-443, 2008.

TAKENAKA, M., Lee, J. M., Kahar, P., Ogino, C., & Kondo, A. (2019). **Efficient and supplementary enzyme cocktail from Actinobacteria and plant biomass induction.** Biotechnology Journal, 14(3), 1700744.

TEATHER, Ronald M.; WOOD, Peter J. **Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen.** Appl. Environ. Microbiol., v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.

TECHAPUN, Charin *et al.* **Production of cellulase-free xylanase by a thermotolerant *Streptomyces* sp. grown on agricultural waste and media optimization using mixture design and Plackett–Burman experimental design methods.** Biotechnology letters, v. 24,

n. 17, p. 1437-1442, 2002.

WIBBERG, Daniel *et al.* **Complete genome sequence of *Streptomyces reticuli*, an efficient degrader of crystalline cellulose.** *Journal of Biotechnology*, v. 222, p. 13-14, 2016.

5 CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM MONO E COCULTIVO DE FUNGOS E ACTINOBACTÉRIAS

7.1 INTRODUÇÃO

Na natureza, microrganismos coexistem de maneira que algumas populações interagem de forma atemporal ou em sucessão ecológica graças às suas interações sintróficas (STANIER,1969). Há também aquela interação dita simbiótica, onde as populações podem prover complementariedade de moléculas ou agir como sinalizador para expressão de enzimas e outros componentes benéficos (BENNDORF *et al.*, 2018). O cocultivo ou fermentação de cultura mista tem sido investigado como um complemento à cultura pura, já que os sistemas enzimáticos produzidos podem ser complementares uns aos outros e expressados por meio de sinais difusíveis no meio ou ativados por contato físico (KNOWLES *et al.*,2022).

Algumas dessas enzimas, produzidas por microrganismos, são utilizadas em larga escala em plantas industriais como, por exemplo, a indústria sucroalcooleira que produz etanol de segunda geração (SARAVANAN *et al.*, 2022). O etanol de segunda geração é um combustível obtido por meio da hidrólise e fermentação de biomassa vegetal. A hidrólise de biomassa vegetal permite que a estrutura de polímeros carbônicos da planta se transforme em pequenos monômeros por meio da ação de um grupo amplo de enzimas denominadas CAZYmes (GARRON, HENRISSAT, 2019).

Os sistemas utilizados para as etapas de hidrólise e fermentação são complementares e os componentes dessa biomassa precisam passar por um pré-tratamento físico, químico ou biológico antes da hidrólise para que as enzimas celulolíticas acessem os componentes hidrolisáveis da biomassa e os libere em forma de açúcares para a etapa de fermentação (RAJ *et al.*, 2022). No entanto, a composição da biomassa vegetal varia de espécie para espécie, e essas enzimas poderão liberar maior ou menor quantidade de açúcares de acordo com a composição da parede celular vegetal e a capacidade de as enzimas se ligarem a ela (BAY, 2022).

Por ser a biomassa, um dos fatores da eficiência de hidrólise, é necessário explorar material vegetal de considerado potencial energético passível de ser hidrolisado utilizando a tecnologia atual. O sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* L. Moench), gramínea C4 similar à cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) com alta conversão de energia solar em energia química, é uma opção e tem sido objeto de estudo de melhoristas para produção de bioetanol. Porém, ainda não

há dados sobre a produção etanólica a partir de celulose de sorgo sacarino produzido no Brasil (JOY, 2022).

Diante disso, o presente trabalho investigou a interação entre fungos filamentosos e actinobactérias e a produção de enzimas do complexo lignocelulolítico por meio de cocultivo para obtenção de extratos brutos enzimáticos para aplicação na etapa de hidrólise de biomassa de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente com ácido/base diluído.

7.2 METODOLOGIA

7.2.1 Microrganismos utilizados

Nesse estudo foram utilizados doze microrganismos sendo, seis actinobactérias, pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF-MS) Sete Lagoas-MG selecionados no Capítulo II, e seis fungos filamentosos, pertencentes à Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias (CMMAABio) da Embrapa Agroenergia, Brasília-DF (TABELA 5).

Tabela 5: Microrganismos utilizados nos experimentos de mono e cocultivo para obtenção de extratos brutos enzimáticos.

| FUNGOS FILAMENTOSOS | | ACTINOBACTÉRIAS | |
|-------------------------------------|-------------------|---|-------------------|
| Embrapa Agroenergia - CMMAABio | Codigo ALELOMICRO | Embrapa Milho e Sorgo - CMMF-MS | Codigo ALELOMICRO |
| <i>Aspergillus terreus</i> (A.t) | ATCC 20542 | <i>Streptomyces curacoi</i> (AMSJ45) | BRM 047499 |
| <i>Aspergillus acculeatus</i> (A.a) | ATCC 60787 | <i>Streptomyces</i> sp. (A465) | BRM 047878 |
| <i>Trichoderma reesei</i> (T.r) | BRM 058850 | <i>Streptomyces ossamyceticus</i> (ACJ1) | BRM 047719 |
| <i>Panus lecomtei</i> (CC40) | BRM 047114 | <i>Streptomyces capoamus</i> (ACJ26) | BRM 047077 |
| <i>Fistulina hepatica</i> (CC102) | BRM 044603 | <i>Streptomyces chiangmaiensis</i> (ARLJ48) | BRM 047503 |
| <i>Flavodon flavus</i> (FPB04) | BRM 055676 | <i>Streptomyces thiolutheus</i> (ACT115) | BRM 047947 |

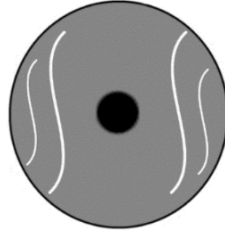
Fonte: Da autora (2023)

7.2.2 Interação de crescimento dos fungos filamentosos e actinobactérias em placas de Petri

Para entender a compatibilidade *in vitro* dos microrganismos, as actinobactérias foram estriadas nas margens de placas de Petri contendo meio estéril batata dextrose ágar (BDA) distando cerca de 4 cm entre elas. No centro da placa, foi colocado um disco de 7 mm de micélio dos fungos filamentosos avaliados (FIGURA 25). Foram realizados registros fotográficos e descrição dos cocultivos durante nove dias. A análise do tipo de interação foi feita baseado nos

critérios usados em Molla *et al.* (2001) e Mohammad *et al.* (2011) ora sumarizados na Figura 26 e Tabela 6.

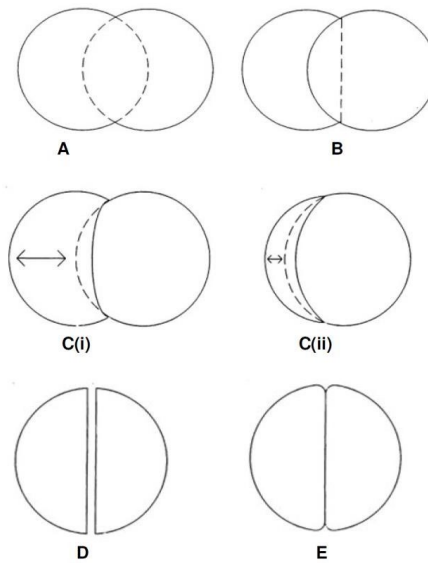
Figura 25: Esquema de cocultivo microbiano em placa de Petri contendo meio sólido (BDA)



Legenda: Representação espacial do teste de interação em placa de Petri do crescimento entre fungo filamentososo e actinobactéria. Legenda: disco micelial de 7mm foi posicionado ao centro (representado pelo ponto preto); actinobactéria estriada nas extremidades da placa (representado pelas linhas brancas).

Fonte: Da autora (2023).

Figura 26: Representação gráfica das possíveis interações microbianas



Legenda: Representação gráfica das possíveis interações. **A.** Entrelaçamento mútuo; **B.** Entrelaçamento mútuo parcial; **C. (i)** invasão/substituição (estado inicial) e **(ii)** invasão/substituição (estado final); **D.** Inibição/impasse (no ponto de contato); **E.** Inibição/impasse.

Fonte: Molla *et al.*, 2001 Adaptado.

Tabela 6: Modelos de interação entre microrganismos crescidos em placa

| Tipo de interação | Definição |
|----------------------------------|--|
| Entrelaçamento mútuo (1) | Os fungos entram em contato um sobre o outro, sem sinais macroscópicos de interconexões. |
| Entrelaçamento mútuo parcial (2) | Um fungo cresce sobre fungo oposto tocando um ao outro sem fazer qualquer zona de inibição. |
| Invasão/substituição (3) | Um fungo cresce para o outro e começa a consumi-lo, até ser totalmente substituído. |
| Inibição no ponto de contato (4) | Os fungos aproximam-se mutuamente até quase entrar em contato, formando uma estreita linha de demarcação, entre as quais as duas colônias são claramente visíveis. |
| Inibição à distância (5) | Inibição em uma distância >2 mm |

Legenda: Os números foram associados ao tipo de interação: Entrelaçamento mútuo/1; Entrelaçamento mútuo parcial/2; Invasão/substituição/3; Inibição no ponto de contato/4 e Inibição à distância/5 com a finalidade de avaliar quantitativamente.

Fonte: Mohammad *et al.* (2011). Adaptado.

7.2.3 Mono e cocultivos entre fungos filamentosos e actinobactérias em fermentação submersa.

Os microrganismos selecionados da etapa anterior foram utilizados para obtenção de extrato bruto enzimático para aplicação na hidrólise do sorgo sacarino pré-tratado quimicamente por ácido/base. Em Erlenmeyer de 250 mL, foram adicionadas 1,25 g de biomassa de dendê (borra de decantador- BD), previamente trituradas (diâmetro ≤ 2 mm) e secas a 65°C por dois dias, 50 mL de meio Mandels e Weber (1969) de composição (g.L⁻¹): ureia 0,3 g, extrato de levedura 0,25 g, peptona bacteriológica 0,75 g, (NH₄)₂SO₄ 2g, MgSO₄.7H₂O 0,3g, CaCl₂.2H₂O 0,4 g, ZnSO₄.7H₂O 1,4 mg, FeSO₄.7H₂O 5,0 mg, CoCl₂.6H₂O 2,0 mg, MnSO₄.H₂O 1,04 mg e PEG6000 0,1% (m/v).

Para os monocultivos dos fungos filamentosos foram utilizados cinco discos miceliais (8 mm de diâmetro) cultivados em BDA, transferidos para o meio de cultivo e incubados em agitador a 150 rpm e 28°C. A inoculação das culturas em cocultivo se deu com inóculo de

fungos no tempo zero (T0) com cinco discos miceliais (8 mm de diâmetro) e inóculos da actinobactéria, com dois discos miceliais (8mm de diâmetro) ao quinto dia de incubação (T5) até o oitavo dia (Tf), como mostrado na Figura 27 nas mesmas condições do monocultivo. O sobrenadante foi centrifugado a 10000 rpm por 15 min a 4°C e utilizado como extrato bruto enzimático. O extrato bruto foi armazenado sob refrigeração até o momento da etapa de hidrólise enzimática do sorgo sacarino, como também para dosagem das atividades enzimáticas.

7.2.4 Enzimas holocelulolíticas

Para a determinação da atividade de FPase utilizou-se o método miniaturizado proposto por Xiao *et al.*, (2004). Utilizando placas de PCR 96 poços, adicionou-se discos de 7 mm de papel de filtro Whatman N° 1 (*GE Healthcare Life Sciences*; Piscataway, NJ. USA) juntamente com 40 µL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0 e 20 µL do extrato bruto enzimático obtido do ensaio de mono e cocultivo. Em termociclador (*Applied Biosystems*®) a placa vedada foi incubada a 50°C durante 60 min. Após o período reacional, adicionou-se 120 µL de DNS (ácido 3,5- DinitroSalicílico), com posterior incubação por 10 min a 95°C (MILLER, 1959). Uma alíquota de 36 µL foi transferida para uma placa de Elisa previamente preparada com 160 µL de água deionizada e a leitura realizada a 540 nm.

Para a determinação das atividades de endoglicanase (CMCase) foram realizados microensaios incubando-se 20 µL do extrato bruto enzimático e 20 µL dos substratos (CMC – CarboxiMetilCelulose 2%, - Sigma-Aldrich; St. Louis, MO. USA) e tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0 a 50°C por 30 min. A atividade de Xilanase foi determinada utilizando 40 µL de substrato (xilana *beechwood* 2% - Sigma-Aldrich; St. Louis, MO. USA) e 10 µL do extrato bruto enzimático (FILHO; PULS; COUGHLAN, 1993 com modificações). Ao término deste período, as reações enzimáticas foram interrompidas pela adição de 120 µL de solução DNS e incubação a 95°C por 15 min e uma etapa de resfriamento de 10 min a 4°C (MILLER, 1959). Em seguida, foram transferidas alíquotas de 100 µL para uma placa de Elisa e adicionados 100 µL de água destilada, sendo realizada a leitura da absorbância a 540 nm.

A atividade de β-glicosidase foi determinada em placa de PCR 96 poços onde foram adicionados 100 µL do extrato bruto enzimático juntamente com 100 µL do substrato (Celobiose 15 mM - Sigma-Aldrich) e tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0. A placa foi vedada e incubada em termociclador a 50°C durante 30 min. Ao programar o equipamento, adicionou-se uma etapa de aquecimento a 95°C por 10 min para inativação da

enzima (GHOSE, 1987) a glicose liberada foi quantificada em placa de Elisa com a transferência de 10 μ L do ensaio e 250 μ L do reagente enzimático GOD-POD (Bioclin[®]), incubação a 37°C por 10 min e leitura da absorbância a 505 nm.

As atividades enzimáticas foram expressas em UI. mL⁻¹, sendo UI definido como a quantidade de açúcar redutor (μ mol) liberado por minuto nas condições do ensaio. As curvas padrões de calibração foram determinadas com soluções de D-glicose, e D-xilose, variando-se as concentrações de 2 a 10,0 mg. mL⁻¹ (CMCase e Xilanase), respectivamente e, de 0,0 a 2,50 mg. mL⁻¹ de D-glicose para β -glicosidase. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os desvios padrões foram menores que 10 % da média.

Figura 27: Representação da linha do tempo do cocultivo entre fungos filamentosos e actinobactérias



Fonte: Da autora (2023)

7.2.5 Enzimas Ligninolíticas

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação do ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico – Sigma-Aldrich) (WOLFENDEN e WILLSON, 1982) com modificações. O ensaio realizado em placas de Elisa 96 poços, foi composto de 180 μ L de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,0 onde adicionou-se 180 μ L de extrato bruto enzimático. Imediatamente antes da leitura em espectrofotômetro, adicionou-se 40 μ L de solução de ABTS 5 mM e realizou-se a cinética da reação em 90 segundos a 25 °C. Foram realizadas leituras de absorbância a 420 nm a cada 5 segundos de reação (ϵ ABTS = 36000).

Para determinar a atividade de peroxidases totais, o meio reacional em placas de Elisa 96 poços, consistiu em adição de 140 μ L de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,0 juntamente com 180 μ L do extrato bruto enzimático obtido da fermentação dos mono e cocultivos e 40 μ L de H₂O₂ 2 mM (Sigma-Aldrich); antes da leitura foram adicionados 40 μ L de solução de ABTS 5 mM; foi realizada a cinética da reação em 90 segundos a 25 °C, realizando leituras de

absorbância a 420 nm a cada 15 segundos de reação (HEINZKILL *et al.*, 1998) modificado (ϵ ABTS = 36000).

Estas atividades enzimáticas foram expressas em UI. mL⁻¹, sendo UI definido como a unidade catalítica internacional que se refere à quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 μ mol de substrato por minuto. A atividade de peroxidases totais foi expressa subtraindo-se o valor de atividade obtido no ensaio do valor obtido para atividade de lacase. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

7.2.6 Atividade de protease

Para determinar a atividade de protease, utilizou-se azocaseína como substrato da enzima. A mistura reacional foi preparada com 100 μ L do extrato bruto enzimático e azocaseína 0,5% (Sigma-Aldrich) em placas de PCR 96 poços; a incubação ocorreu em termociclador durante 40 min a 37°C; adicionou-se 100 μ L de TCA 10% (Sigma-Aldrich) para parar a reação e a placa foi centrifugada a 6000 rpm durante 10 min. Uma alíquota de 150 μ L do sobrenadante foi recolhida e adicionada a 150 μ L de KOH 0,5M previamente adicionado em placas de Elisa 96 poços; realizou-se a leitura a 430 nm em espectrofotômetro.

A atividade enzimática foi expressa em UI. mL⁻¹, sendo UI definido como a unidade catalítica internacional que se refere à quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 μ mol de azocaseína por minuto.

7.3 Análise de dados.

Todos os experimentos foram feitos em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste e médias de Scott-Knott ($p < 0,05$) no software R (R Core Team, 2022).

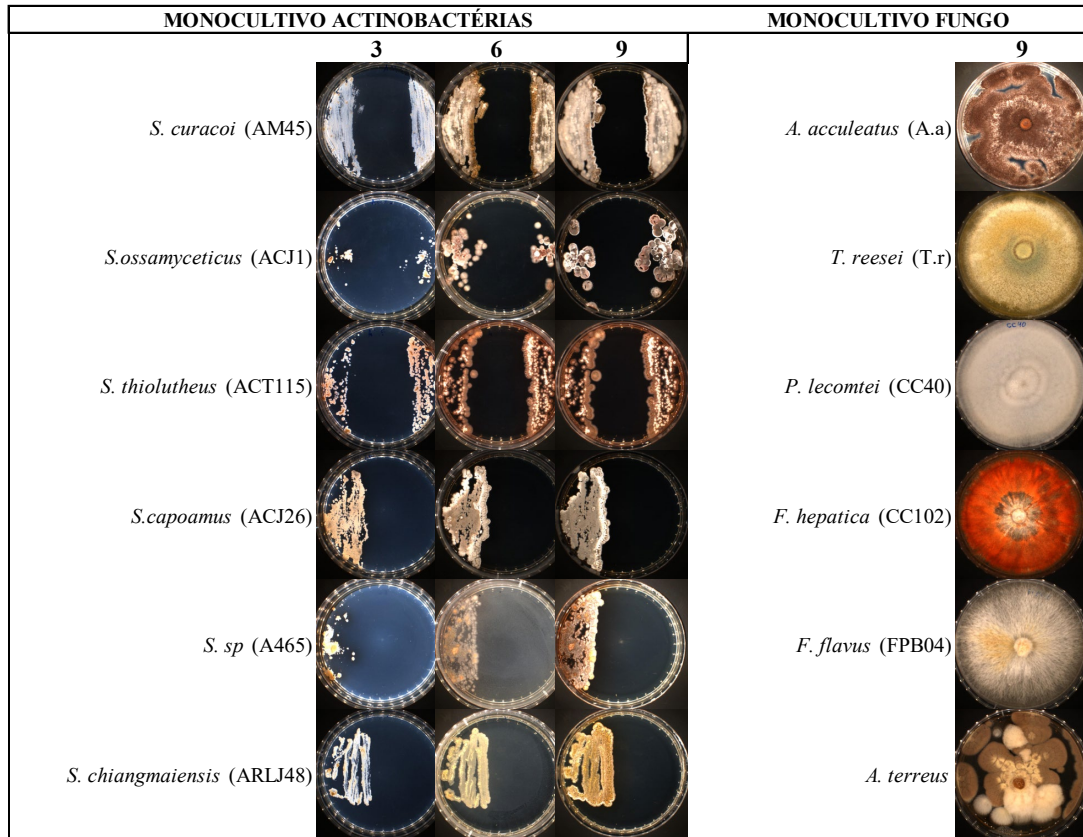
7.4 RESULTADOS

7.4.1 Avaliação de interação do crescimento entre fungos filamentosos e actinobactérias.

Essa etapa do trabalho foi executada para observar o efeito das trinta e seis possíveis interações entre os seis fungos e seis actinobactérias combinadas. Para isso, observou-se o

crescimento das cepas em monocultivo em placas de Petri contendo meio BDA como controle (FIGURA 28) e as interações em cocultivo nas mesmas condições (FIGURA 29).

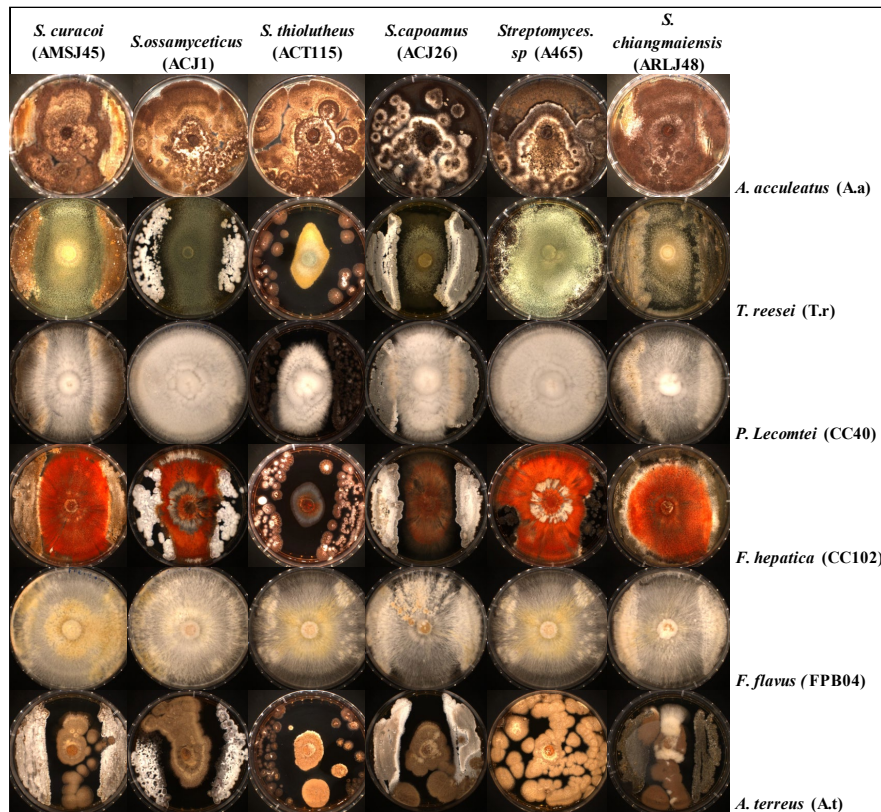
Figura 28: Dinâmica de crescimento do cocultivo entre actinobactérias e fungos filamentosos



Legenda: Dinâmica de crescimento observada aos 3, 6 e 9 dias para monocultivo das actinobactérias *S. curacoi* (AMSJ45), *Streptomyces* sp. (A465), *S. ossamyceticus* (ACJ1), *S. capoamus* (ACJ26), *S. chiangmaiensis* (ARLJ48), *S. thiolutheus* (ACT115) e 9 dias para o monocultivo de fungos filamentosos *A. terreus* (A.t) *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04), ambos inoculados em placas de Petri contendo meio BDA.

Fonte: Da autora (2023).

Figura 29: Interação do crescimento entre actinobactérias e fungos filamentosos em meio sólido BDA



Legenda: Dinâmica de crescimento entre actinobactérias e fungos filamentosos em placa de Petri contendo meio BDA sólido, observados ao nono dia de cultivo. Os cocultivos entre a actinobactéria *Streptomyces curacoii* (AMSJ45) e os fungos *A. terreus* (A.t) *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04) estão selecionados em verde. Os cocultivos do fungo *Aspergillus acculeatus* (A.a) com as actinobactérias *S. curacoii* (AMSJ45), *Streptomyces* sp. (A465), *S. ossamyceticus* (ACJ1), *S. capoamus* (ACJ26), *S. chiangmaiensis* (ARLJ48) e *S. thioluthus* (ACT115) estão demarcados em vermelho. Esse fungo foi excluído da seleção por apresentar interação inibitória com todas as actinobactérias testadas.

Fonte: Da autora (2023).

Para o cocultivo entre as actinobactérias e os fungos filamentosos (FIGURA 29) foram observadas algumas interações, conforme descrito na Tabela 6. As interações observadas foram: entrelaçamento mútuo (1); entrelaçamento mútuo parcial (2); invasão/substituição (3); inibição no ponto de contato (4); e inibição à distância (5) como apresentado na Tabela 7.

Tabela 7: Tipos de interação do cocultivo entre fungos filamentosos e actinobactérias

| Cocultivo | | | Cocultivo | | | Cocultivo | | | | | |
|----------------------|---|--------|-----------|----------------------|---|-----------|---|----------------------|---|--------|---|
| <i>A. terreus</i> | + | ACT115 | 5 | <i>F. hepatica</i> | + | A465 | 4 | <i>P. lecomtei</i> | + | ARLJ48 | 2 |
| <i>A. terreus</i> | + | ACJ1 | 5 | <i>F. hepatica</i> | + | ACJ1 | 4 | <i>F. hepatica</i> | + | ARLJ48 | 2 |
| <i>A. acculeatus</i> | + | ACT115 | 5 | <i>F. hepatica</i> | + | AMSJ45 | 4 | <i>F. flavus</i> | + | ACJ26 | 2 |
| <i>T. reesei</i> | + | ACT115 | 5 | <i>F. flavus</i> | + | ACT115 | 4 | <i>A. acculeatus</i> | + | A465 | 1 |
| <i>F. hepatica</i> | + | ACT115 | 5 | <i>A. terreus</i> | + | ARLJ48 | 2 | <i>A. acculeatus</i> | + | ACJ1 | 1 |
| <i>F. hepatica</i> | + | ACJ26 | 5 | <i>A. acculeatus</i> | + | ARLJ48 | 2 | <i>A. acculeatus</i> | + | ACJ26 | 1 |
| <i>A. acculeatus</i> | + | AMSJ45 | 5 | <i>T. reesei</i> | + | A465 | 2 | <i>P. lecomtei</i> | + | A465 | 1 |
| <i>A. terreus</i> | + | A465 | 4 | <i>T. reesei</i> | + | ACJ1 | 2 | <i>P. lecomtei</i> | + | ACJ1 | 1 |
| <i>A. terreus</i> | + | ACJ26 | 4 | <i>T. reesei</i> | + | AMSJ45 | 2 | <i>F. flavus</i> | + | A465 | 1 |
| <i>A. terreus</i> | + | AMSJ45 | 4 | <i>T. reesei</i> | + | ARLJ48 | 2 | <i>F. flavus</i> | + | ACJ1 | 1 |
| <i>T. reesei</i> | + | ACJ26 | 4 | <i>P. lecomtei</i> | + | ACJ26 | 2 | <i>F. flavus</i> | + | AMSJ45 | 1 |
| <i>P. lecomtei</i> | + | ACT115 | 4 | <i>P. lecomtei</i> | + | AMSJ45 | 2 | <i>F. flavus</i> | + | ARLJ48 | 1 |

Legenda: Cocultivo em placa de Petri contendo meio BDA sólido entre a actinobactéria *Streptomyces curacoi* (AMSJ45) e os fungos *A. terreus* (A.t) *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04) observada ao nono dia de cultivo e classificada de acordo com Mohammad *et al.* (2011). Entrelaçamento mútuo (1) Entrelaçamento mútuo parcial (2) Invasão/substituição (3) Inibição no ponto de contato (4) Inibição à distância (5). Conforme Tabela 6.

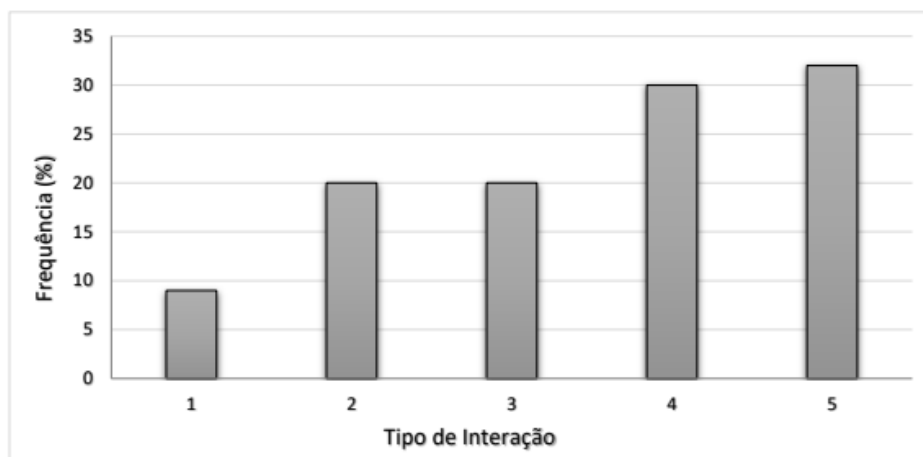
Fonte: Da autora (2023).

A interação entre microrganismos é um teste semiquantitativo que, embora não resulte necessariamente em maior produção de enzimas em fermentação submersa, permite a identificação de potenciais produtores. O teste possibilita observar se a presença de um microrganismo pode inibir ou não o crescimento do outro (TABELA 7). Além disso, o filo Actinobacteria demonstra alta atividade inibitória em fungos, produzindo moléculas amplamente estudadas e discutidas na literatura, o que também foi observado neste estudo. *S. thiolutheus* (ACT115) apresentou a maior taxa de inibição, com ocorrência em cinco das seis interações em placas observadas. Da mesma forma, o fungo *Aspergillus terreus* (A.t) foi inibido ou inibiu, em algum grau, todas as seis actinobactérias. Por esse motivo, esse fungo foi excluído da etapa seguinte de cultivo submerso (FIGURA 29).

Foram observados cinco tipos de interações após nove dias de cultivo, quando a placa foi totalmente colonizada (FIGURA 26 e TABELA 6). Trinta e um por cento das interações apresentaram inibição à distância (Tipo 5 ou E); 28% apresentaram inibição no ponto de contato (Tipo 4 ou D); 20% foram do tipo invasão/substituição (Tipo 3 ou C); 20% foram de

entrelaçamento mútuo parcial (Tipo 2 ou B); e 9% apresentaram entrelaçamento mútuo (Tipo 1 ou A) (FIGURA 30).

Figura 30: Frequência quanto a ocorrência das interações entre actinobactérias e fungos filamentosos quando cocultivados em placa de Petri contendo meio BDA



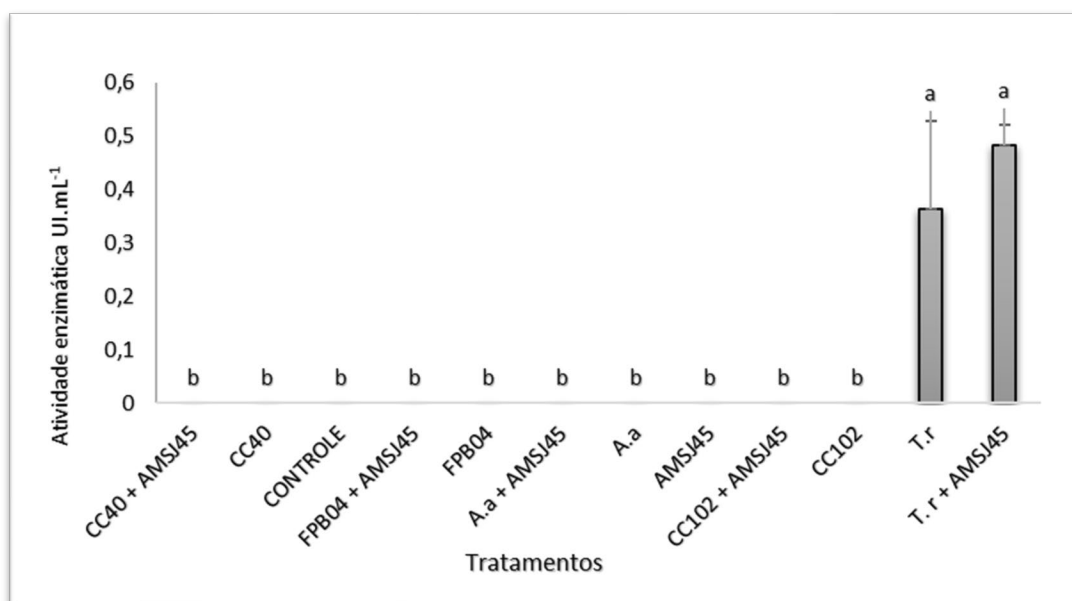
Legenda: Entrelaçamento mútuo (1), Entrelaçamento mútuo parcial (2), Invasão/substituição (3), Inibição no ponto de contato (4), Inibição à distância (5).

Fonte: Da autora (2023).

A actinobactéria que teve melhor interação com os fungos foi *S. curacoi* (AMSJ45) (destaque feito com linha verde na Figura 29). Os cocultivos entre *S. curacoi* (AMSJ45) e os fungos filamentosos *A. acculeatus* (A.a.), *T. reesei* (T.r.), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102) e *F. flavus* (FPB04) foram selecionados para a etapa de cocultivo em fermentação submersa e obtenção dos extratos brutos enzimáticos, uma vez que as interações foram predominantemente do tipo 1/A.

7.4.2 Actinobactérias e fungos filamentosos: mono e cocultivo submerso e atividades enzimáticas

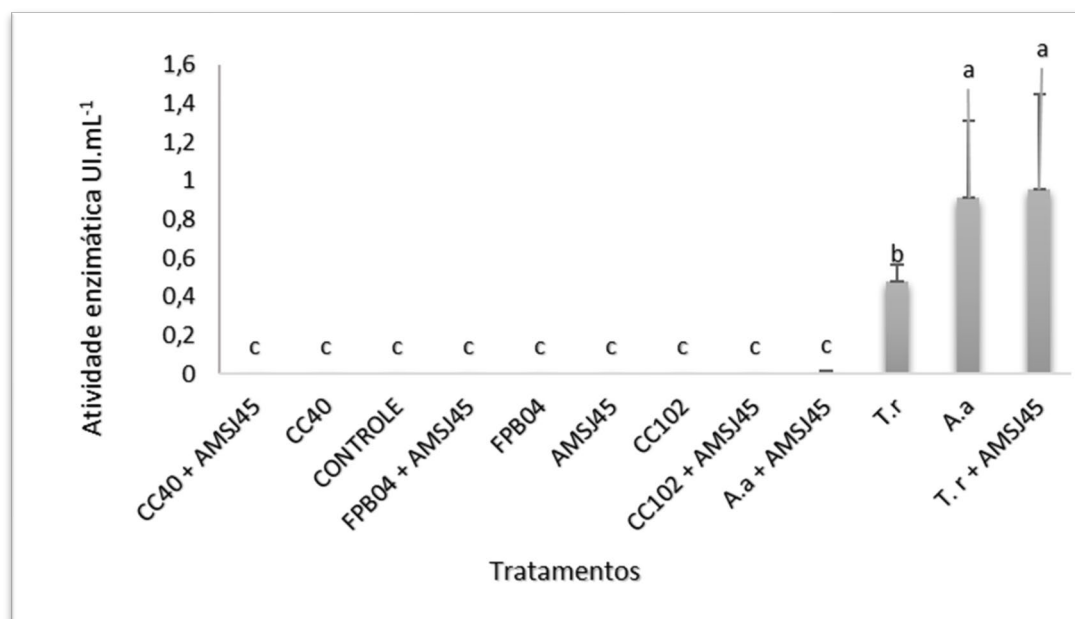
Os extratos brutos obtidos dos mono e cocultivos submersos de *S. curacoi* (AMSJ45) com os fungos *A. acculeatus* (A.a.), *T. reesei* (T.r.), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04) foram utilizados para determinação das seguintes enzimas: celulases totais (FPase) (FIGURA 31), endoglicanase (FIGURA 32), β -glicosidase (FIGURA 33), lacase (FIGURA 34), peroxidases totais (FIGURA 35), proteases (FIGURA 36) e xilanases (FIGURA 37). Alguns extratos brutos não apresentaram atividades de algumas enzimas no monocultivo da actinobactéria *S. curacoi* (AMSJ45) ou no monocultivo dos fungos filamentosos. Porém, apresentaram no sistema de estresse biológico provocado por meio do cocultivo.

Figura 31: Atividade enzimática de celulases totais ou FPase

Legenda: Atividade enzimática para celulases totais ou FPase nos extratos brutos do mono e cocultivo de actinobactéria *Streptomyces curacoii* (AMSJ45) e os fungos *A. terreus* (A.t) *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04). Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2023).

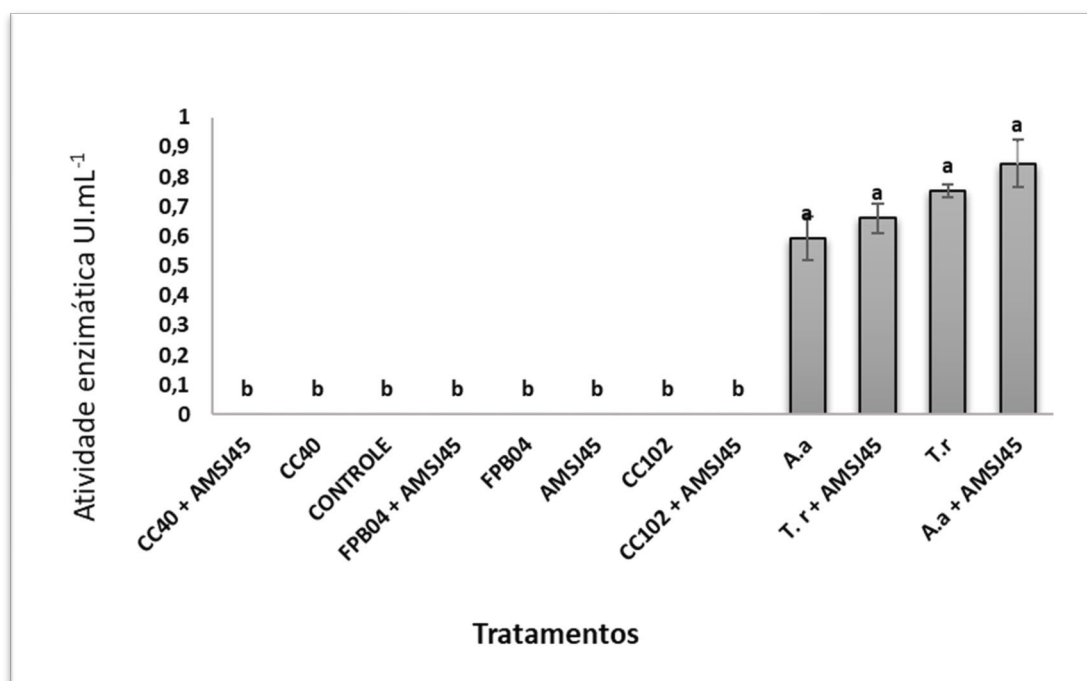
A atividade de FPase ou celulases totais (exo, endo e β -glicosidase) foi observada apenas no cocultivo de *T. reesei* (T.r) com *S. curacoii* (AMSJ45) ($0,48 \pm 0,04$ UI. mL⁻¹) e no monocultivo de *T. reesei* (T.r) ($0,36 \pm 0,16$ UI. mL⁻¹) com diferença significativa entre eles. Para o cocultivo, houve um incremento na produção enzimática de 25% para FPase quando comparada ao monocultivo de *T. reesei* (T.r). Por sua vez, não foi observada atividade de celulases totais (FPase) no monocultivo de *S. curacoii* (AMSJ45). Deste modo, o cocultivo entre *S. curacoii* (AMSJ45) e *T. reesei* (T.r) poderá servir de base para mais investigações sobre a potencialidade de indução para produção de celulases totais, uma vez que o *T. reesei* (T.r) é um dos fungos mais utilizados para obtenção deste tipo de enzimas desconstrutoras de parede celular vegetal.

Figura 32: Atividade enzimática de endoglicanase

Legenda: Atividade enzimática de endoglicanase nos extratos do mono e cocultivo de actinobactéria *S. curacoi* (AMSJ45) e os fungos *A. terreus* (A.t) *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04). Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2023).

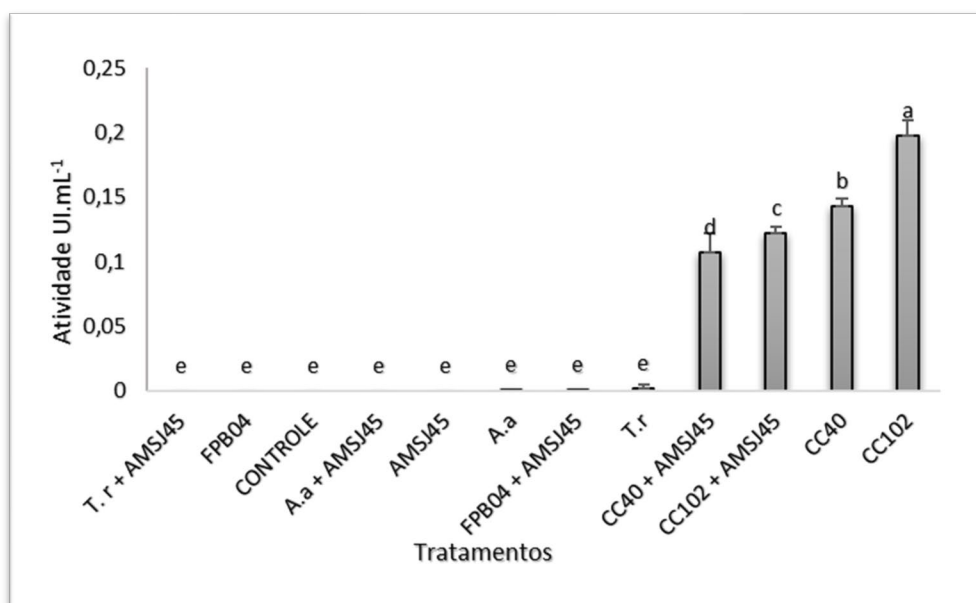
Observou-se atividade de endoglicanase apenas nos extratos de *T. reesei* (T.r) e *A. acculeatus* (A.a), em monocultivo, e nos extratos de cocultivo com de *S. curacoi* (AMSJ45). A atividade de endoglicanase para os mono e cocultivos utilizando *T. reesei* (T.r) e *S. curacoi* (AMSJ45) respectivamente, já eram esperadas, uma vez que a atividade de FPase já havia sido observada (Figura 30). Houve diferença significativa entre a atividade enzimática do cocultivo de *T. reesei* (T.r) com *S. curacoi* (AMSJ45) ($0,95 \pm 0,49$ UI. mL⁻¹) quando comparado ao monocultivo do fungo *T. reesei* (T.r) ($0,48 \pm 0,091$ UI. mL⁻¹), promovendo um incremento de 102%. Já para o extrato do *A. acculeatus* (A.a) em cocultivo com *S. curacoi* (AMSJ45), a atividade foi menor em cerca de 90% ($0,006 \pm 0,009$ UI. mL⁻¹) quando comparada ao monocultivo do fungo *A. Acculeatus* (A.a) ($0,91 \pm 0,39$ UI. mL⁻¹). Não foi observada atividade de endoglicanase para *S. curacoi* (AMSJ45) em monocultivo, da mesma forma que não foi observada atividade de FPase (FIGURA 31).

Figura 33: Atividade enzimática de β -glicosidase

Legenda: Atividade enzimática de β -glicosidase nos extratos brutos dos monocultivos e cocultivos de actinobactéria *Streptomyces curacoi* (AMSJ45) e dos fungos *A. terreus* (A.t) *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04). Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2023).

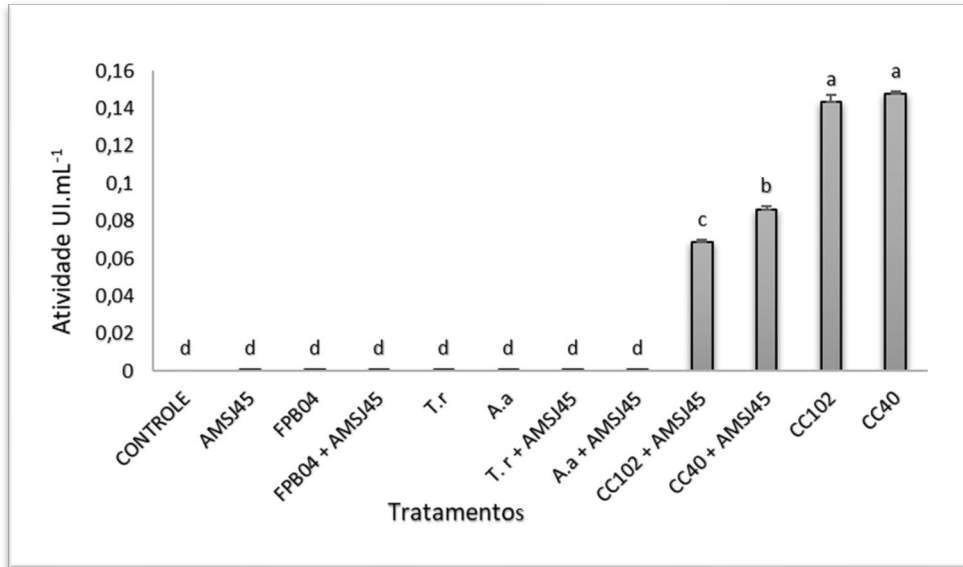
A atividade de β -glicosidase foi observada apenas em *T. reesei* (T.r) e *A. acculeatus* (A.a) para os extratos de monocultivo dos fungos filamentosos e extratos dos cocultivos desses fungos com *S. curacoi* (AMSJ45) (FIGURA 33). Os resultados das atividades de β -glicosidase desses extratos não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos. Os valores de atividade detectados foram maiores para o cocultivo entre *A. acculeatus* (A.a) e *S. curacoi* (AMSJ45) ($0,85 \pm 0,08$ UI. mL⁻¹) seguidos do monocultivo de *T. reesei* (T.r) ($0,75 \pm 0,02$ UI. mL⁻¹) e cocultivo de *T. reesei* (T.r) com *Streptomyces curacoi* (AMSJ45) ($0,66 \pm 0,05$ UI. mL⁻¹). Para a atividade de β -glicosidase, o cocultivo entre *T. reesei* (T.r) e *S. curacoi* (AMSJ45) apresentou um decréscimo na atividade em relação ao monocultivo do fungo *T. reesei* (T.r) em cerca de 22%. Já no cocultivo entre *A. acculeatus* (A.a) e *S. curacoi* (AMSJ45), observou-se um incremento de 30% em relação ao monocultivo de *A. acculeatus* (A.a) ($0,60 \pm 0,07$ UI. mL⁻¹). Não foi observada atividade de β -glicosidase para *S. curacoi* (AMSJ45) em monocultivo, da mesma forma que não se observou atividade de FPase (FIGURA 31).

Figura 34: Atividade enzimática de lacase

Legenda: Atividade enzimática da lacase em mono e cocultivos com a actinobactéria *Streptomyces curacoi* (AMSJ45) e os fungos *A. terreus* (A.t), *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102) e *F. flavus* (FPB04). Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

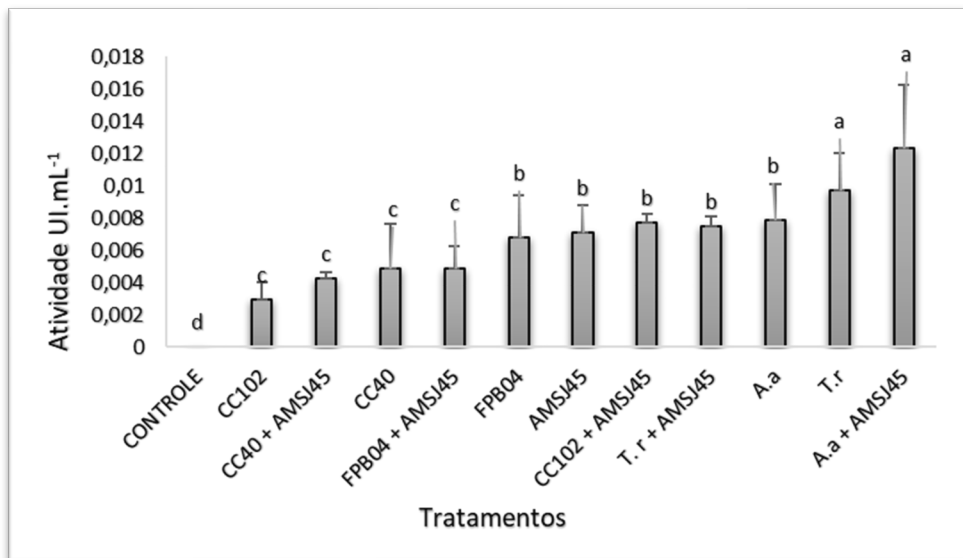
Fonte: Da autora (2023).

De modo geral, não foram observadas atividades significativas para lacase nas condições de cultivo e obtenção dos extratos brutos, tanto para mono ou cocultivos, entre fungos filamentosos e *S. curacoi* (AMSJ45) (Figura 34). Foram observadas algumas atividades basais de lacase para os extratos brutos do mono cultivo de *F. hepatica* (CC102) e *P. lecomtei* (CC40) como também para os cocultivos desses fungos com *S. curacoi* (AMSJ45). Apesar desses macrofungos serem conhecidos com exímios produtores de lacases, o meio de cultivo e as respectivas condições do ensaio não favoreceram a produção de lacase tanto para mono como para cocultivo. O mesmo tipo de resultado foi observado para a atividade de outras enzimas oxidativas, como peroxidases totais, nos extratos brutos obtidos (FIGURA 35).

Figura 35: Atividade enzimática de peroxidases totais

Legenda: Atividade enzimática de peroxidases totais em mono e cocultivo de actinobactéria *S. curacoi* (AMSJ45) e os fungos *A. terreus* (A.t) *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04). Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2023).

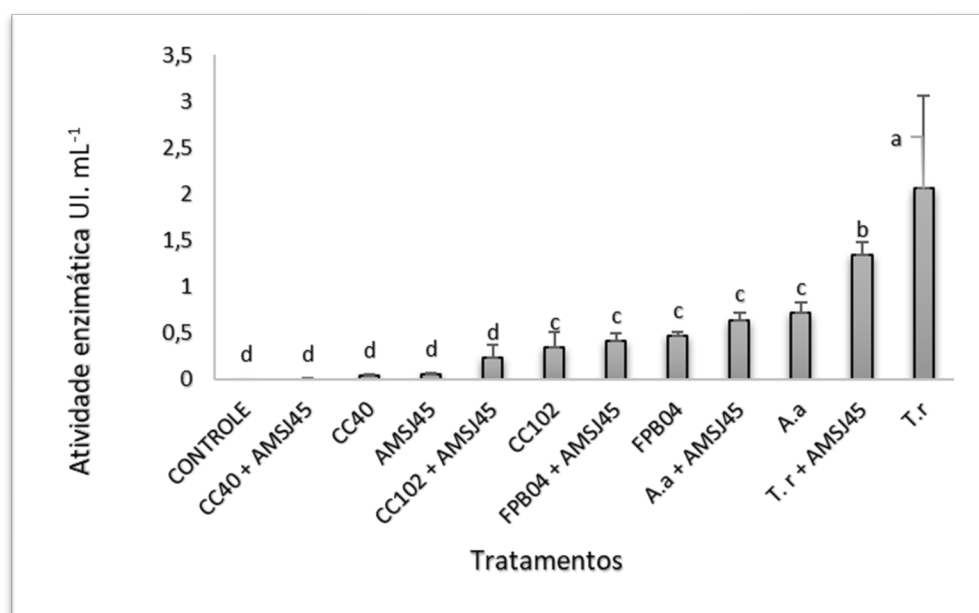
Figura 36: Atividade enzimática de protease

Legenda: Atividade enzimática de protease em mono e cocultivo de actinobactéria *S. curacoi* (AMSJ45) e os fungos *A. terreus* (A.t) *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04). Letras seguidas de números diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2023).

As atividades de proteases (FIGURA 36) em todos os extratos brutos obtidos nos 6 mono ou cocultivos foram basais para condições avaliadas.

Figura 37: Atividade enzimática de xilanase



Legenda: Atividade enzimática de xilanase nos extratos brutos dos monos e cocultivos de actinobactéria *S. curacoi* (AMSJ45) e os fungos *A. terreus* (A.t) *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04). Letras diferentes indicam diferença estatística para os valores apresentados ($p < 0,05$) pelo teste de Scott knott.

Fonte: Da autora (2023).

A maior atividade de xilanase foi detectada no monocultivo de *T. reesei* (T.r) ($2,06 \pm 1$ UI. mL⁻¹) (FIGURA 37). O cocultivo de *T. reesei* (T.r) com *S. curacoi* (AMSJ45) ($1,35 \pm 0,14$ UI. mL⁻¹) promoveu uma redução de um terço se comparado com o monocultivo do fungo. Não houve diferença significativa entre a atividade enzimática do cocultivo de *A. acculeatus* (A.a) e *S. curacoi* (AMSJ45) ($0,64 \pm 0,08$ UI. mL⁻¹) quando comparada com a do monocultivo do fungo *A. acculeatus* (A.a) ($0,72 \pm 0,1$ UI. mL⁻¹), assim como no monocultivo de *F. flavus* (FPB04) ($0,46 \pm 0,04$ UI. mL⁻¹) e *P. lecomtei* (CC40) ($0,72 \pm 0,1$ UI. mL⁻¹).

7.5 DISCUSSÃO

A interação entre microrganismos distintos quando cultivados em meio sólido demonstrou que existe interações antagônicas e sinérgicas entre as actinobactérias e os fungos filamentosos avaliados nesse trabalho. A primeira análise permitiu selecionar preliminarmente algumas interações potenciais entre esses organismos quanto à produção de enzimas

lignocelulolíticas por meio do estresse biológico causado pelo cocultivo. O fungo filamentoso *A. terreus* (A.t) teve seu crescimento inibido, em algum grau, pelas actinobactérias *S. curacoii* (AMSJ45), *S. ossamyceticus* (ACJ1), *S. capoamus* (ACJ26), *S. chiangmaiensis* (ARLJ48), *S. thiolutheus* (ACT115) em cocultivo e inibiu completamente o crescimento de *Streptomyces* sp. (A465). Da mesma forma, a actinobactéria *S. thiolutheus* (ACT115) promoveu inibição, em algum grau, em *A. terreus* (A.t), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102) e *F. flavus* (FPB04) e foi totalmente inibida por *A. acculeatus* (A.a). Tal seletividade interespecífica, também foi observada nos trabalhos de Benndorf *et al.* (2018) quando analisaram a produção de metabólitos secundários em cocultivo de fungos e actinobactérias isoladas de macerado de cupim. Os autores isolaram actinobactérias do corpo, do sistema digestivo e do jardim de fungos e identificaram a presença de metabólitos produzidos pelas actinobactérias que protegiam os cupins de se contaminarem com outros fungos capazes de predação seus fungos cultivados. Isso comprovou a hipótese do trabalho de que as actinobactérias agem como simbioses defensivas produzindo substâncias ativas contra fungos concorrentes com aqueles cultivados pelos cupins. Já a interação entre a actinobactéria *S. curacoii* (AMSJ45) e os fungos filamentosos *A. terreus* (A.t), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04) e *A. acculeatus* (A.a) promoveu o crescimento de ambos mutualisticamente. A caracterização química das interações binárias entre fungos filamentosos e actinobactérias não foi investigada aqui, mas o cocultivo em placas forneceu um panorama para a investigação das atividades enzimáticas em cultivo submerso.

As actinobactérias são capazes de produzir uma ampla gama de metabólitos secundários, os quais interferem no crescimento e atividade de outros microrganismos (SEYEDSAYAMDOST *et al.*, 2012). Os mais conhecidos dentre eles são os antibióticos que, embora geralmente tratados como substâncias de defesa, foram postulados como sendo moléculas sinalizadoras mediando a comunicação entre microrganismos (LINARES *et al.*, 2006). Essas bactérias também são capazes de produzir enzimas com diferentes atividades como as CAZymes (GARRON, HENRISSAT, 2019). Esse perfil metabólico pode ser alterado na presença de outros organismos (TRAXLER *et al.*, 2013), mostrando o dinamismo nas interações entre diferentes espécies ou diferentes organismos da mesma espécie. Essas interações podem ser utilizadas para estimular outros microrganismos e aumentar a eficiência de produção de determinados metabólitos, o que é o caso das enzimas. Já os fungos, são excelentes degradadores de biomassa vegetal. São heterotróficos e prestam importante serviço ecológico além de terem atividade antimicrobiana importante amplamente conhecida. Pode-se

dizer que actinobactérias e fungos apresentam adaptação enzimática aos requerimentos de seus nichos ecológicos, podendo, na presença de outros microrganismos, causar um estresse que estimula ou inibe a expressão gênica de tais enzimas. Detain *et al.* (2022) observaram a cocultura entre três actinobactérias e o fungo *A. niger*, identificando uma diferenciação na expressão de enzimas lignocelulolíticas. Esses autores observaram o aumento da atividade de algumas enzimas e redução da atividade de outras sob as condições de mono e cocultivo. Assim como no presente trabalho, o potencial da interação entre actinobactérias e fungos se mostrou positivo quando a capacidade de aumentar a atividade de enzimas foi investigada.

As alterações mais importantes observadas no cocultivo foram o aumento da atividade das enzimas FPase (FIGURA 31), endoglicanase (FIGURA 32), β -glicosidase (FIGURA 33) e a redução na expressão da xilanase (FIGURA 37) no cocultivo entre *T. reesei* (*T.r*) e *A. acculeatus* (*A.a*). A maior atividade de xilanase foi detectada no monocultivo de *T. reesei* seguido do cocultivo de *T. reesei* (*T.r*) com *S. curacoii* (AMSJ45). Porém, o cocultivo promoveu uma redução de um terço se comparado com o monocultivo do fungo filamentosos. De modo similar, Detain *et al.* (2022), observaram um decréscimo na atividade da enzima xilanase no cocultivo entre *A. niger* e *S. griseorubens* ($365,5 \pm 112,3$ mUI. mg^{-1} de proteína). Contudo, esses mesmos autores observaram um acréscimo na atividade da enzima xilanase no cocultivo entre *S. avermitilis* e *S. coelicolor* com o fungo, demonstrando que os resultados podem variar conforme as diferentes combinações de microrganismos.

Conceição (2018) avaliando a produção de lovastatina por consórcio de fungos filamentosos *F. hepatica* (CC102) e *A. terreus* (A.T), observou aumento na produção enzimática de xilanase quando os fungos foram cultivados juntos em relação ao monocultivo, com atividades menores que 2 UI. mL^{-1} . O autor também observou atividade de endoglicanase e β -glicosidase, obtendo valores basais para tais enzimas com valores próximos aos encontrados nesse trabalho para o monocultivo do fungo *F. hepatica* (CC102). Para a atividade de lacase também houve aumento na produção da enzima no cocultivo se comparado ao monocultivo dos fungos, com atividade máxima de 900 UI. mL^{-1} , demonstrando um sinergismo entre as espécies de fungos.

Não só a atividade enzimática é afetada na cocultura entre microrganismos, mas também a natureza das moléculas presentes no meio de cultivo, conforme descrito por Schroeckh *et al.* (2018). Estes autores estudaram a expressão induzida de novos metabólitos por meio de análise de microarray quando o fungo *A. nidulans* foi cultivado com com a

actinobactéria *S. hygrosopicus*. Além disso, os autores observaram, por meio de diálise e microscopia eletrônica, que uma interação física dos micélios bacterianos e fúngicos é necessária para provocar uma resposta específica. Isso sugere que não apenas sinais difusíveis, mas interações de contato íntimo contribuem para a comunicação entre microrganismos e indução de genes de biossíntese não expressados na ausência do contato.

Em estudo avaliando a expressão de enzimas por meio de análise metagenômica, Wang *et al.* (2016) observaram que os genes para codificar endoxilânase e β -xilosidase, em inóculo de arroz, eram bem menos representados do que diversificados para a população actinobacteriana. Isso significa que menos carga enzimática estava presente no meio, com maior diferenciação taxonômica, sugerindo que a expressão enzimática de grupos decompositores pode ser interdependente de suas comunidades.

A expressão das enzimas oxidativas foram basais para todos os mono e cocultivos avaliados nesse trabalho (Figuras 34 e 35). Romero-Peláez (2017), utilizando fibra de mesocarpo e cachos de fruto dendê como fonte de carbono, chegou a atividades de lacases de $383,11 \pm 13,30$ U. mL⁻¹ e peroxidases de $106,22 \pm 42,73$ U. mL⁻¹ para o monocultivo de *P. lecomtei* CC40. Esses valores são muito superiores aos encontrados nesse trabalho, o que demonstra que diferentes fontes de carbono promovem respostas distintas no metabolismo enzimático. A julgar pela diversidade de espécies vegetais e a heterogeneidade estrutural das plantas e seus componentes de parede celular (BURTON; GIDLEY; FINCHER, 2010; SOMERVILLE *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2021), é de se esperar que as populações microbianas responsáveis pela degradação da biomassa tenham coevoluído de forma que as múltiplas origens independentes contribuam com a expressão de classes de enzimas com funções iguais, porém que atuam em condições ótimas distintas complementando diferentes estágios de degradação (WANG *et al.*, 2013). Portanto, a expressão de enzimas de microrganismos que ocupam o mesmo nicho ecológico pode ser induzida por estresse ou pela sinalização de complementariedade às ações de degradação pelas enzimas.

O presente estudo não objetivou identificar outros metabólitos sinalizadores ou vias de expressão genética de tais microrganismos, porém elucidou a interação intraespecífica que se mostrou variada dependendo da espécie observada.

7.6 CONCLUSÕES

- A actinobactéria *S. Curacoi* (AMSJ45), apresentou maior interação simbiótica com a maioria dos fungos filamentosos avaliados *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04) sendo a maior interação tipo 1/A e 2/B.
- Os extratos brutos enzimáticos obtidos do mono e cocultivos entre *S. curacoi* (AMSJ45) e *T. Reesei* (T.r) apresentaram os melhores resultados para atividades de FPases e Endoglicanases sem diferenças estatísticas entre eles.
- O fungo filamentoso *A. terreus* (A.a) foi aquele com maior interação de inibição/antagonismos em relação a todas as seis espécies de actinobactérias avaliadas. Enquanto que a actinobactéria que apresentou melhor sinergismo com maioria dos fungos filamentosos foi *S. curacoi* (AMSJ45), exceto com *A. Terreus* (Aa), quando avaliados em placa de Petri contendo meio sólido BDA.
- Os extratos brutos obtidos por meio da condição de cocultivo por fermentação submersa entre *T. reesei* (T.r) e *S. curacoi* (AMSJ45) apresentaram incremento de atividade de enzimas celulolíticas, principalmente para FPase e endoglicanase.
- O cocultivo entre *A. acculeatus* (A.a) e *S. curacoi* (AMSJ45) também apresentou incremento para a enzima β -glicosidase em fermentação submersa.
- O sistema de cocultivo entre *S. curacoi* (AMSJ45) e *T. reesei* (T. r) e o cocultivo entre *S. curacoi* (AMSJ45) e *A. acculeatus* (A.a) apresentam potencial para ser otimizado quanto às condições de cultivo, tais como meio de cultura, agitação e tempo ideal para o início da cocultura, entre outras variáveis, visando à obtenção de extratos brutos com melhores atividades de celulasas totais.
- Esses extratos brutos podem ser utilizados como catalisadores biológicos no processo de sacarificação de biomassas vegetais, como sorgo sacarino e bagaço de cana, para obtenção de monômeros de açúcares fermentescíveis, como o etanol.

REFERÊNCIAS

- BAY, Mohammad Saber; ESLAMI, Fatemeh; KARIMI, Keikhosro. **The Relationship between Structural Features of Lignocellulosic Materials and Ethanol Production Yield.** Designs, v. 6, n. 6, p. 119, 2022.
- BENNDORF, René *et al.* **Natural products from Actinobacteria associated with fungus-growing termites.** Antibiotics, v. 7, n. 3, p. 83, 2018.
- BURTON, Rachel A.; GIDLEY, Michael J.; FINCHER, Geoffrey B. **Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls.** Nature chemical biology, v. 6, n. 10, p. 724-732, 2010.
- CONCEIÇÃO, Aparecido Almeida *et al.* **Bioconversion and biotransformation efficiencies of wild macrofungi.** Biology of macrofungi, p. 361-377, 2018.
- DETAİN, Julian *et al.* **Co-elicitation of lignocellulolytic enzymatic activities and metabolites production in an Aspergillus-Streptomyces co-culture during lignocellulose fractionation.** Current research in microbial sciences, v. 3, p. 100108, 2022.
- FILHO, Edivaldo XF; PULS, Jürgen; COUGHLAN, Michael P. **Biochemical characteristics of two endo- β -1, 4-xylanases produced by Penicillium capsulatum.** Journal of industrial microbiology and biotechnology, v. 11, n. 3, p. 171-180, 1993.
- GARRON, Marie-Line; HENRISSAT, Bernard. **The continuing expansion of CAZymes and their families.** Current opinion in chemical biology, v. 53, p. 82-87, 2019.
- GHOSE, T. K. **Measurement of cellulase activities.** Pure and Applied Chemistry. 59: 257 p. 1987.
- HEINZKILL, M. *et al.* **Characterization of Laccases and Peroxidases from Wood-Rotting Fungi (Family Coprinaceae).** Applied and Environmental Microbiology, v. 64, n. 5, p. 1601-1606, 1998. ISSN 0099-2240-1098-5336. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106202/>>. Acesso em 20 jan 2022.
- JOY, Shereena P.; KRISHNAN, Chandraraj. **Modified organosolv pretreatment for improved cellulosic ethanol production from sorghum biomass.** Industrial Crops and Products, v. 177, p. 114409, 2022.
- KNOWLES, Sonja L. *et al.* **Fungal–fungal co-culture: a primer for generating chemical diversity.** Natural Product Reports, 2022.
- LINARES, Juan Francisco *et al.* **Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 103, n. 51, p. 19484-19489, 2006.
- MANDELS, M.; WEBER, J. **The Production of Cellulases.** In: (Ed.). Cellulases and Their Applications: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, v.95, 1969. cap. 23, p.391- and 414. (Advances in Chemistry). ISBN 0-8412-0095-5.

MILLER, G. L. **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.** Anal. Chem., v. 31, n. 3, p. 426-428, 03/01/ 1959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030> >.

MOHAMMAD, N. *et al.* **Development of compatible fungal mixed culture for composting process of oil palm industrial waste.** African Journal of Biotechnology, v. 10, n. 81, p. 18657-18665, 2011. ISSN 1684-5315.

MOLLA, A. H. *et al.* **In-vitro compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 17, n. 9, p. 849-856, 2001. ISSN 1573-0972. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/A:1013844306960> >.

R Core Team (2022). **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em:< <https://www.R-project.org/>> Acesso em 14 nov 2021.

RAJ, Tirath *et al.* **Recent advances in commercial biorefineries for lignocellulosic ethanol production: Current status, challenges and future perspectives.** Bioresource technology, v. 344, p. 126292, 2022.

ROMERO-PELÁEZ, Ruben Darío *et al.* **Obtenção de enzimas lignocelulolíticas de monocultivos e cocultivos de fungos filamentosos em fermentação submersa usando biomassas vegetais da agroindústria do dendê.** 2017. DF – Brasília. Disponível em: < <2017AACCrishVEnPIObtencao.pdf> (embrapa.br)> Acesso em 14 mar 2022.

SARAVANAN, A. *et al.* **Recent advances and sustainable development of biofuels production from lignocellulosic biomass.** Bioresource Technology, v. 344, p. 126203, 2022.

SCHROECKH, Volker *et al.* **Intimate bacterial–fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 106, n. 34, p. 14558-14563, 2009.

SEYEDSAYAMDOST, Mohammad R. *et al.* **Old meets new: using interspecies interactions to detect secondary metabolite production in actinomycetes.** In: Methods in enzymology. Academic Press, 2012. p. 89-109.

SOMERVILLE, Chris *et al.* **Toward a systems approach to understanding plant cell walls.** Science, v. 306, n. 5705, p. 2206-2211, 2004.

STANIER, Roger Y. *et al.* **Mundo dos micróbios.** In: Mundo dos micróbios. 1969. p. 741-741.

TRAXLER, Matthew F. *et al.* **Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome.** MBio, v. 4, n. 4, p. e00459-13, 2013.

WANG, Cheng et al. **Metagenomic analysis of microbial consortia enriched from compost: new insights into the role of Actinobacteria in lignocellulose decomposition.** *Biotechnology for biofuels*, v. 9, p. 1-17, 2016.

WANG, Mingyu *et al.* **The structural and biochemical basis for cellulose biodegradation.** *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 88, n. 4, p. 491-500, 2013.

WOLFENDEN, B. S.; WILLSON, R. L. **Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2[prime or minute]-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate).** *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, n. 7, p. 805-812, 1982. ISSN 0300-9580. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1039/P29820000805> >.

XIAO, Zhizhuang et al. **Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates.** In: *Proceedings of the twenty-fifth symposium on biotechnology for fuels and chemicals held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO.* Humana Press, 2004. p. 1115-1126.

ZHANG, Yao *et al.* **Molecular insights into the complex mechanics of plant epidermal cell walls.** *Science*, v. 372, n. 6543, p. 706-711, 2021.

6 CAPÍTULO IV. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SORGO SACARINO PRÉ TRATADO QUIMICAMENTE USANDO ENZIMAS COMERCIAIS E EXTRATO BRUTO DE *S. curacoi* E FUNGOS FILAMENTOSOS.

8.1 INTRODUÇÃO

No Brasil o processamento da biomassa lignocelulósica para obtenção de etanol de segunda geração (E2G) já é uma realidade industrial. Contudo, como toda tecnologia precursora, ainda há muitos desafios a serem vencidos. Para que o custo de operação seja reduzido e o aumento de produção seja compatível com a demanda do mercado, é necessário adequar toda uma cadeia de produção às tecnologias disponíveis (MARQUES, Pesquisa FAPESP, 2018).

O processamento da biomassa lignocelulósica passa por diferentes tomadas de decisões e operações unitárias. Entre elas, podemos citar a decisão sobre quais biomassas lignocelulósicas serão utilizadas nos processos físico-químicos - biológicos até a obtenção do produto final: o etanol. A depender do país e/ou região do país, existem diferentes tipos de biomassas que podem ser utilizadas na geração do E2G. Tais biomassas podem ser oriundas de resíduos agroindustriais como bagaço de cana, palha de trigo, palha de arroz, palha de milho etc, mas também biomassas cultivadas especificamente para este fim, como é o caso do sorgo biomassa (PARRELLA *et al.*, 2021). As operações unitárias no processo também dependem do tipo de biomassa escolhida, mas, de modo geral, se faz necessário colhê-la, transportá-la, armazená-la, secá-la e triturá-la previamente.

Além dessas ações, a biomassa precisa ser pré-tratada para reduzir a recalcitrância da parede celular vegetal. Esses pré-tratamentos podem ser: físico (explosão a vapor, entre outros), químico (diluição em ácido/base) ou biológico (fermentação por microrganismos) (SARAVANAN *et al.*, 2022). A escolha do pré-tratamento deve ser cautelosa, visto que produtos de degradação, como fragmentos de furfural e lignina além de compostos de biomassa solubilizada, como ácido acético, devem ser removidos por serem inibitórios para ação das enzimas. Um exemplo é a adsorção de celulasas pela lignina (WANG *et al.*, 2013).

O processo de sacarificação corresponde à biotransformação de celulose à glicose preferencialmente feito por catalisadores biológicos (enzimas microbianas). Em função da complexidade da parede celular vegetal, se faz necessário o conjunto de enzimas para obter o maior rendimento possível de hexoses (glicose) e pentoses (a depender da rota tecnológica utilizada) a partir da biomassa vegetal previamente pré-tratada (AB RASID, 2021). O melhor

conjunto de enzimas (coquetel) para hidrólise enzimática deve conter enzimas celulolíticas (celulases), hemicelulolíticas (xilanase), lignolíticas (lacases) entre outras enzimas auxiliares no processo de desconstrução da holocelulose (celulose e hemicelulose) (WANG *et al.*, 2013). Tais enzimas são produzidas por microrganismos e a busca por linhagens eficientes visa obter um processo fermentativo economicamente viável (MORETTI *et al.*, 2012). Além disso, o coquetel tem relação direta de eficiência quando relacionado à alta ou baixa especificidade para biomassa selecionada, como o sorgo sacarino neste projeto.

O sorgo sacarino é uma biomassa vegetal que vem sendo discutida como alternativa de produção agrícola para geração de etanol. O programa de melhoramento genético da Embrapa Milho e Sorgo vem desenvolvendo híbridos de sorgo desde 2008, quando a Embrapa iniciou o desenvolvimento de linhagens estéreis masculinas de sorgo sacarino (DE OLIVEIRA RIBEIRO, 2020). O sorgo sacarino possui plasticidade fenotípica e atende a algumas demandas tais como resistência a escassez hídrica (EMYDIO, 2010; MAGALHÃES, 2016), possui ciclo curto (6 meses) e produtividade estimada entre 120 a 150 toneladas de matéria fresca por hectare e elevado teor de fibras e açúcares fermentescíveis. Além de fornecer o caldo para produção de E1G, o bagaço pode ser utilizado para produção de E2G em processo semelhante à cana-de-açúcar (DE ALMEIDA *et al.*, 2019).

Considerando o exposto, o presente capítulo deste trabalho teve como objetivo caracterizar a biomassa de sorgo sacarino pré-tratada quimicamente por ácido e base e avaliar a eficiência de extratos brutos enzimáticos obtidos do mono e cocultivo entre a actinobactéria *S.curacoi* com fungos filamentosos *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04), como também de coquetéis enzimáticos comerciais, no processo de sacarificação.

8.2 METODOLOGIA

8.2.1 Biomassa vegetal

A biomassa de sorgo sacarino utilizada nos experimentos deste trabalho, foi obtida junto a Embrapa Milho e Sorgo. Foi utilizada a cultivar Sorgo CMSXS5021 colhida em período de maturação fisiológica. O sorgo foi desfolhado e os colmos triturados e secos em estufa de ventilação forçada. Após a secagem, a biomassa de sorgo sacarino foi moída em moinho de facas Willey em partículas de 2mm. Essa biomassa foi pré tratada quimicamente (ácido/básico) e teve sua composição determinada pelo método descrito pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (*National Renewable Energy Laboratory* – NREL) em relação aos seus componentes de extrativos em água, etanol (SLUITER, A. *et al.*, 2005), matéria seca, cinzas, lignina e açúcares estruturais (SLUITER, A. *et al.*, 2008a; 2008b).

8.2.2 Pré-tratamento químico da biomassa (Ácido e básico)

Para o pré tratamento da biomassa de sorgo uma solução de H₂SO₄ a 2,25% (p/v) foi preparada e adicionada a biomassa em uma proporção de sólido/ líquido de 25% em Erlenmeyer e levados para autoclave a 120 °C por 40 min conforme demonstrado na Figura 38. Após o tratamento ácido as amostras foram lavadas em água quente até pH neutro e secas em estufa de ventilação forçada a 65°C por 24 h.

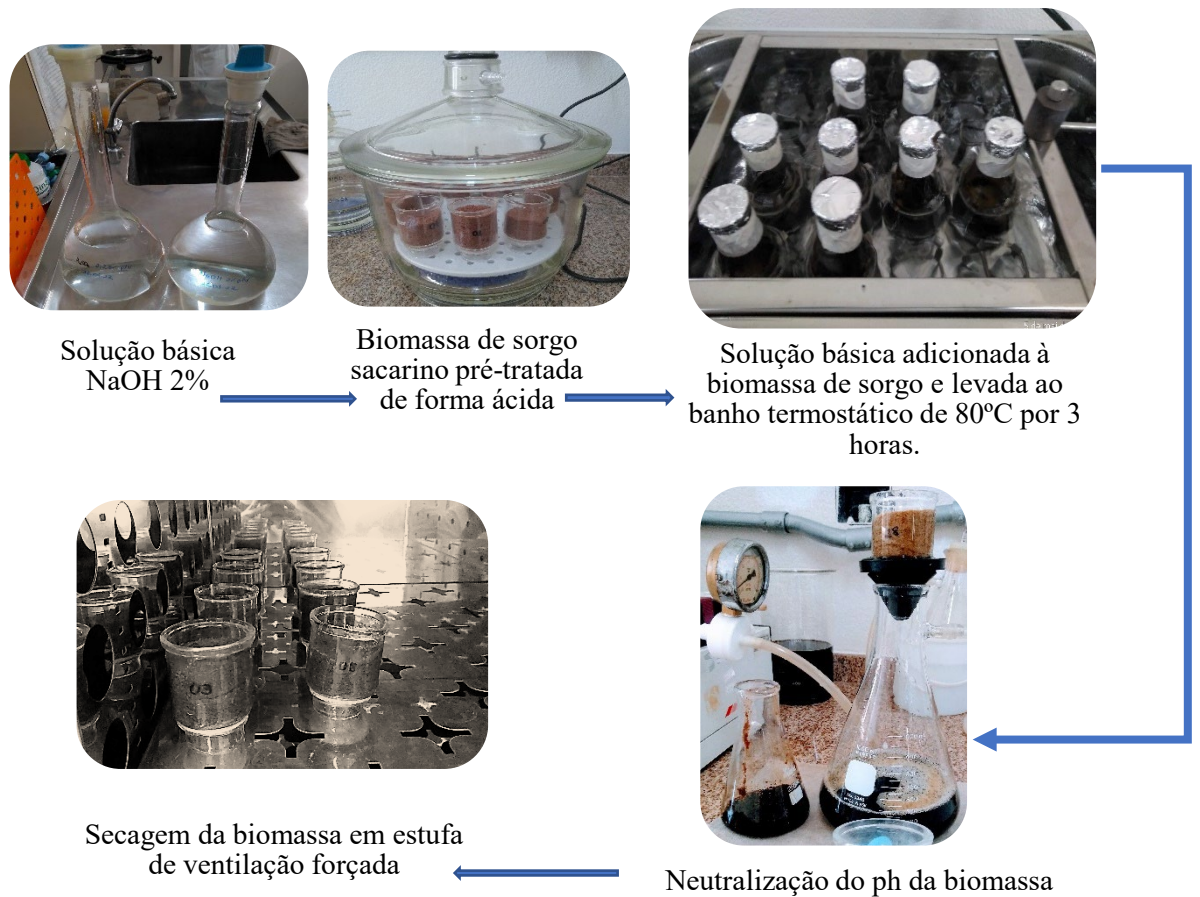
Figura 38: Esquema de pré-tratamento ácido da biomassa de sorgo sacarino



Fonte: Da autora (2023).

Para o tratamento básico, uma solução de NaOH foi preparada a uma concentração de 2% e uma relação sólido/ líquido de 10%. A biomassa pré tratada quimicamente de forma ácida, foi então misturada a essa solução e levada para um banho termostático durante 3h a 80° conforme demonstrado na Figura 39. Após o tratamento básico as amostras foram lavadas em água quente até pH neutro e secas em estufa de ventilação forçada a 65°C por 24 h (FIGURA 39).

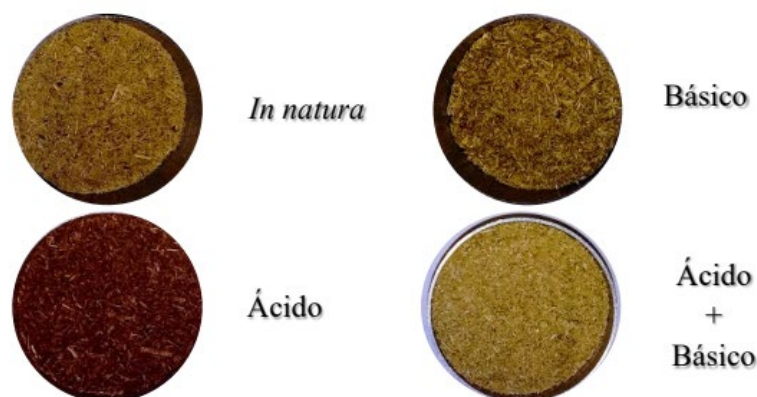
Figura 39: Esquema do pré-tratamento básico da biomassa de sorgo sacarino



Fonte: Da autora (2023).

As frações da biomassa de sorgo sacarino *in natura* (sem pré-tratamento), pré-tratada de forma ácida, pré-tratada de forma básica e pré-tratada de forma ácido/básica (FIGURA 40) foram separadas para obtenção dos seus componentes de extrativos em água, extrativos em etanol, matéria seca (sólidos totais), cinzas, lignina e açúcares estruturais seguindo a metodologia descrita pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (*National Renewable Energy Laboratory* – NREL) (SLUITER, A. *et al.*, 2008a; 2008b).

Figura 40: Frações da biomassa de sorgo sacarino in natura após pré-tratamentos e sem pré-tratar



Fonte: Da autora (2023).

8.2.3 Catalizadores biológicos: extratos brutos enzimáticos e comerciais

Para hidrólise da biomassa de sorgo sacarino pré-tratada quimicamente (ácido/básico) foram utilizados os extratos brutos enzimáticos obtidos no mono e cocultivo de *S. curacoi* (AMSJ45) e os fungos *A. terreus* (A.t), *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04).

Os extratos brutos enzimáticos foram obtidos nas mesmas condições do mono e cocultivo entre a actinobactéria e os fungos filamentosos em fermentação submersa, demonstrados no Capítulo III.

As enzimas comerciais utilizadas para hidrólise do sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido/básico) foram: Celluclast® (Cellulase from *Trichoderma reesei* - Sigma Aldrich C2730), Accellerase® 1500 (Genencor/Du Pont), Celumax C (Prozyn 004759) e Cellic CTec3® (Novozymes).

8.2.4 Hidrólise enzimática da biomassa de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido e básico).

8.2.4.1 Padronização enzimática

Os experimentos de hidrólise enzimática foram padronizados pela atividade de FPase (celulases totais) para as enzimas comerciais e para os extratos brutos enzimáticos obtidos de mono e cocultivo entre a actinobactéria e os fungos filamentosos conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8: Carga de enzimas comerciais utilizada nos ensaios de hidrólise enzimática de bagaço de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido/base).

| Comerciais 10 FPU/g; 5% de biomassa; 50 °C; PH 5; 280 rpm; 48h | | | | | | | | |
|--|------------|-----------------------|---------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------------------|----------------|---|
| Amostra / Diluição | FPU/m L | Biomassa úmida (g) | Amostra seca (g) | Volume reacional (mL) | Água Substrato (mL) | Volume total a adicionar (mL) | Enzima (mL) | Tampão (citrato de sódio/ácido citríco) 0,1 M (mL) |
| Cellic Ctec3® (1:10) | 17,84 | 0,30 | 0,2923 | 5,8452 | 0,0077 | 5,837 | 0,168 | 5,669 |
| Accellerase® 1500 | 24,37 | 0,30 | 0,2923 | 5,8452 | 0,0077 | 5,837 | 0,123 | 5,714 |
| Celluclast® (1:10) | 4,84 | 0,30 | 0,2923 | 5,8452 | 0,0077 | 5,837 | 0,620 | 5,218 |
| Celumax C 20 % | 0,91 | 0,30 | 0,2923 | 5,8452 | 0,0077 | 5,837 | 3,297 | 2,541 |

Fonte: Da autora (2023).

Tabela 9: Carga de enzimas do extrato bruto enzimático utilizado nos ensaios de hidrólise do bagaço de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido/base).

| Extrato Bruto Enzimático; 5% de biomassa; 50 °C; PH 5; 280 rpm; 48h | | | | | | |
|--|-----------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--|---|---|
| Biomassa úmida (g) | Amostra seca (g) | Volume reacional (mL) | Água Substrato (mL) | Volume total a adicionar (mL) | Volume extrato bruto enzimático (mL) | Tampão (citrato de sódio/ácido cítrico) 0,1 M (mL) |
| 0,30 | 0,2923 | 5,8452 | 0,0077 | 5,837 | 5,000 | 0,837 |

Fonte: Da autora (2023).

Para a hidrólise utilizando enzimas comerciais (TABELA 8), foi ajustado o volume suficiente para obter a concentração enzimática de 10 FPU.g^{-1} (GHOSE, 1987).

Para a hidrólise utilizando os extratos brutos enzimáticos do mono e cocultivo entre actinobactéria *S. curacoi* (AMSJ45) e os fungos filamentosos *A. terreus* (A.t) *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04), obtidos nos experimentos do Capítulo III, a padronização se deu por meio de volume reacional nas condições do ensaio (TABELA 9) visto que as atividades máximas de FPase dos extratos, se deu em monocultivo de *T. reesei* (T.r) ($0,36 \pm 0,16 \text{ UI. mL}^{-1}$) e cocultivo de *S. curacoi* (AMSJ45) + *T. reesei* (T.r) ($0,48 \pm 0,04 \text{ UI. mL}^{-1}$) (FIGURA 31).

8.2.4.2 Condições do ensaio

A hidrólise foi feita em placas “DeepWell” de 24 poços (FIGURA 41). Em cada um dos poços, foi colocado 0,3 g de sorgo sacarino pré-tratado (5% - massa seca), solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio 0,1 M pH 5,0 em volume suficiente para ajustar a concentração enzimática (extratos de monocultivo ou cocultivo ou comerciais) na concentração de 10 FPU.g^{-1} (TABELAS 8 E 9).

Figura 41: Hidrólise enzimática de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido/base).



Placa DeepWell de 24 poços contendo biomassa de sorgo sacarino e volume reacional enzimático



Placa DeepWell de 24 poços vedada para reação de hidrólise

Fonte: Da autora (2023).

As placas foram imediatamente vedadas com filme plástico e transferidas para incubação durante 48 horas, a 50°C e 280 rpm de agitação. Ao final da reação, as placas foram

centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante/hidrolisado obtido foi usado para determinação de açúcares solúveis (glicose) em HPLC. A liberação de açúcares dos extratos obtidos nos monocultivos foi comparada entre os tratamentos e um controle negativo, com tampão ácido cítrico/citrato de sódio 0,1 M pH 5,0.

8.2.5 Quantificação de glicose por HPLC

Para determinação dos teores de glicose nos hidrolisados obtidos, as amostras previamente diluídas, foram injetadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) (*Agilent Technologies*), com as seguintes condições cromatográficas: Coluna Aminex® HPX-87H (300 x 7,8 mm, *Bio-Rad*). Como fase móvel, foi utilizada uma solução de H₂SO₄ 5 mM; a temperatura da coluna foi de 45°C, tempo de corrida de 11 minutos e vazão da fase móvel 0,6 mL.min⁻¹. A concentração dos açúcares foi determinada por meio de equação linear gerada por uma curva de calibração com pontos correspondentes a diluições seriadas de uma solução de glicose de 5mg. mL⁻¹.

8.2.6 Determinação do rendimento de glicose no ensaio.

Os rendimentos das hidrólises realizadas foram determinados em comparação com máximo teórico, segundo a equação (2) (BAY, 2022):

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{glicose liberada na hidrólise} \times 0,9 \times 100}{\text{teor de glucana no material}} \quad (\text{eq.2})$$

As frações de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido/base) foram determinadas como descrito no item **8.2.2**.

8.2.7 Análise de dados

Todos os experimentos foram feitos em triplicata biológica. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste e médias de Scott-Knott ($p < 0,05$) no software R (R Core Team, 2022).

8.3 RESULTADOS

8.3.1 Caracterização química da biomassa de sorgo sacarino

A composição química da biomassa de sorgo sacarino foi descrita na Tabela 10 em relação aos extrativos em água, extrativos em etanol, matéria seca (sólidos totais), lignina insolúvel em ácido (LIA), lignina solúvel em ácido (LSA) e açúcares estruturais livre de extrativos (ALE). Os valores foram descritos para o pré-tratamento ácido (H_2SO_4 a 2,25% (p/v)), pré-tratamento básico (NaOH 2%), pré-tratamento ácido/básico (H_2SO_4 a 2,25% (p/v) seguido de NaOH 2%) e para a biomassa não pré-tratada.

Tabela 10: Composição química estrutural da biomassa de sorgo sacarino.

| | ALE (%) | | | LSA (%) | LIA (%) | Extrativos em etanol (%) | Extrativos em água (%) | Sólidos totais (%) |
|---------------------|----------|---------|------------|---------|---------|--------------------------|------------------------|--------------------|
| | Glicanos | Xilanos | Arabinanos | | | | | |
| Natura | 42,02 | 24,05 | 2 | 4,58 | 19,09 | 3,07 | 34,13 | 93,38 |
| Ácido | 55,69 | 9,04 | 0 | 2,45 | 28,04 | 5,48 | 4,18 | 97,01 |
| Base | 56,62 | 23,91 | 2,07 | 3,4 | 6,2 | 0,71 | 2,99 | 87,15 |
| Ácido + Base | 83,21 | 5,09 | 1,59 | 1,59 | 6,96 | 1,67 | 2,09 | 97,41 |

Legenda: Composição química estrutural da biomassa de sorgo sacarino. Natura (sem pré-tratamento), Ácido (pré-tratado com H_2SO_4 a 2,25% (p/v)), Base (pré-tratado com NaOH 2%) Ácido + Base (pré-tratado quimicamente por Ácido/Base), LSA (%) lignina solúvel em ácido, LIA (%) lignina insolúvel em ácido, ALE (%) Açúcares livres de extrativos em água e etanol.

Fonte: Da autora (2023).

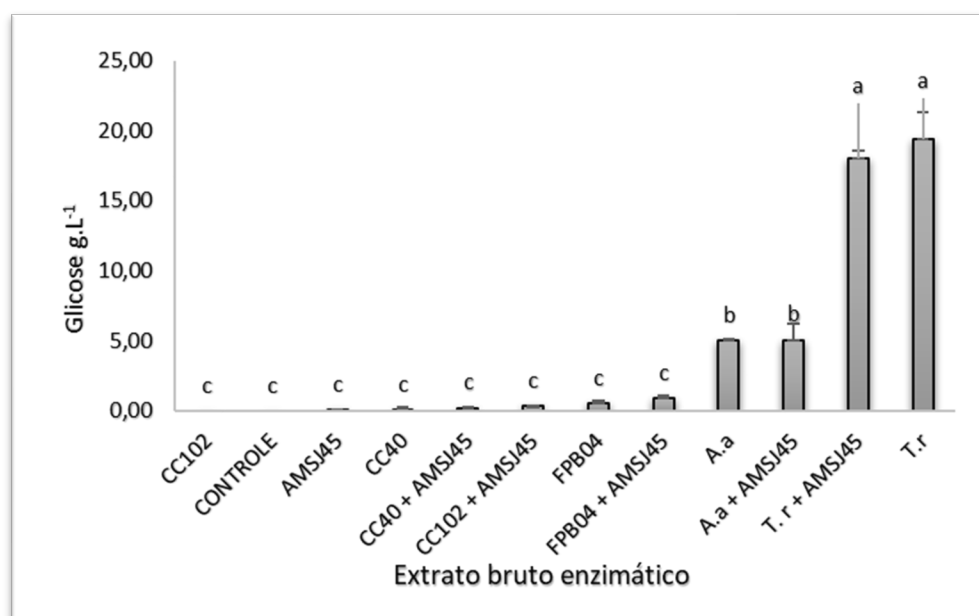
O teor de umidade não é componente estrutural da biomassa e pode mudar dependendo do tipo de armazenamento. Sua determinação é necessária para calcular os valores dos componentes estruturais em base seca, principalmente quando consideramos o cálculo da carga enzimática para sacarificação da biomassa. O teor de cinzas corresponde à quantidade de silicatos, sulfatos e carbonatos. Os extrativos representam a quantidade de taninos, alcaloides, resinas e graxas presentes na biomassa, sendo alguns solúveis em água, outros em álcool. A lignina é separada em lignina solúvel e insolúvel. A lignina solúvel é a que permanece no filtrado após a hidrólise ácida e a lignina insolúvel é o resíduo sólido que fica retido no papel de filtro.

8.3.2 Hidrólise enzimática da biomassa do sorgo sacarino pré-tratado

8.3.2.1 Extrato bruto dos mono e cocultivo de fungos filamentosos e actinobactéria

Os extratos brutos enzimáticos obtidos do mono e cocultivos entre a actinobactéria *S. curacoi* (AMSJ45) e os fungos filamentosos *A. terreus* (A.t), *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04) foram utilizados como catalisadores biológicos na hidrólise enzimática da biomassa de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido/base). O extrato bruto enzimático foi obtido dos experimentos apresentados no Capítulo III. A liberação de glicose durante a hidrólise enzimática do sorgo sacarino pré-tratado quimicamente está apresentada na Figura 42.

Figura 42: Concentração de glicose liberada durante a hidrólise enzimática utilizando os extratos brutos dos monocultivos e cocultivos dos fungos filamentosos e *S. curacoi* (AMSJ45), durante 48 horas.



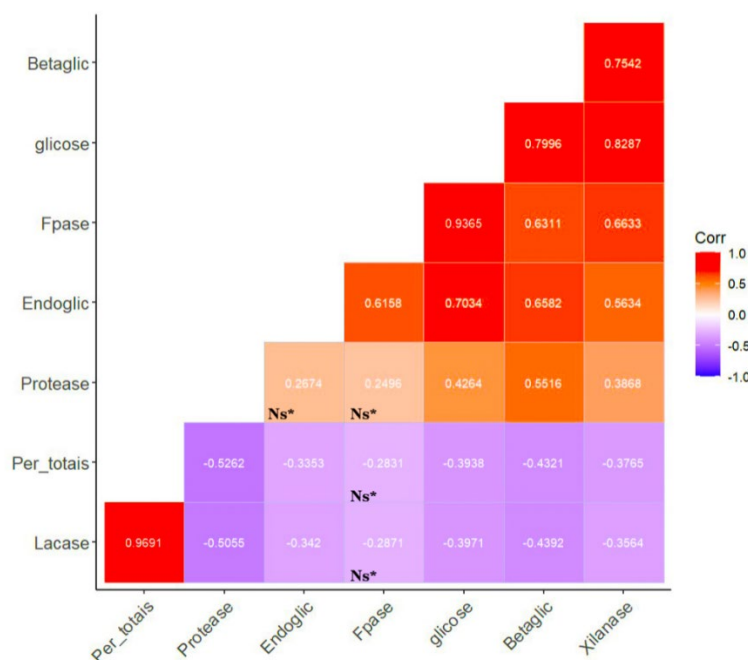
Legenda: Concentração de açúcar do hidrolisado de sorgo sacarino obtido por meio da sacarificação utilizando os extratos brutos enzimáticos do monocultivo da actinobactéria *Streptomyces curacoi* (AMSJ45) e do monocultivo dos fungos *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04). O cocultivo entre a actinobactéria *Streptomyces curacoi* (AMSJ45) e os fungos *A. terreus* (A.t) *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04) também estão representados.

Fonte: Da autora (2023).

Os extratos brutos que apresentaram melhores resultados na liberação de glicose (FIGURA 42) foram aqueles oriundos do monocultivo de *T. reesei* (T.r) e do cocultivo entre *T. reesei* (T.r) com *S. curacoii* (AMSJ45), não havendo diferença estatística entre esses extratos. Os extratos brutos do monocultivo de *A. acculeatus* (A.a) e cocultivo entre esse fungo com *S. curacoii* (AMSJ45) também apresentaram liberação de glicose, porém com valores cerca de três vezes inferiores aos citados anteriormente. A liberação de glicose por esses extratos brutos já era esperada, uma vez que foram os extratos brutos que apresentaram atividades enzimáticas para FPase e Endoglicanase (FIGURAS 31 e 32). Os demais extratos brutos, oriundos do mono e cocultivos (FIGURA 42), não apresentaram valores significativos para liberação de glicose.

Como foi observado no Capítulo III, as atividades de FPase e β -glicosidades foram maiores nos extratos brutos obtidos dos monocultivos de *T. reesei* (T.r) e *A. acculeatus* (A.a). Este resultado sugere potencial correlação entre as atividades enzimáticas desses extratos brutos, com o rendimento de glicose liberada na hidrólise ($\rho=0,84$ para FPases e $\rho=0,73$ para β -glicosidades). As correlações entre as atividades enzimáticas e liberação de glicose são apresentadas na Figura 43.

Figura 43: Correlação entre as atividades enzimáticas



Legenda: Correlação entre as atividades enzimáticas dos extratos brutos do mono e cocultivo entre *Streptomyces curacoii* (AMSJ45) e os fungos filamentosos *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04) e sua liberação de glicose no hidrolisado de sorgo sacarino.

*Ns: dados não significativos.

Fonte: Da autora (2023).

Observou-se uma alta correlação positiva entre a liberação de glicose e as atividades de FPase, β -glicosidase, xilanases e endoglicanase, com $\rho=0,94$, $\rho=0,80$, $\rho=0,75$ e $\rho=0,70$, respectivamente.

8.3.2.2 Rendimento de glicose da biomassa pela atividade enzimática

Como já era esperado, o maior rendimento de glicose na hidrólise do sorgo sacarino ocorreu no mono cultivo de *T. reesei* (T.r) ($19,40 \pm 3,38$ g. L⁻¹) (TABELA 11), em função da maior atividade enzimática de FPase, β -glicosidase e xilanases, as quais permitem a ruptura de parede celular vegetal.

Tabela 11: Rendimento da concentração de glicose do hidrolisado de biomassa de sorgo sacarino

| Monocultivo | | | Co-cultivo | | |
|---------------|---------------------------------|-------------------|-----------------------|---------------------------------|-------------------|
| | Glicose (g.L ⁻¹) | Rendimento (%) | | Glicose (g.L ⁻¹) | Rendimento (%) |
| T.r | 19,40 | 41,97 a | T. r + AMSJ45 | 18,04 | 39,04 a |
| A.a | 5,01 | 10,83 b | A.a + AMSJ45 | 5,03 | 10,89 b |
| FPB04 | 0,49 | 1,05 c | FPB04 + AMSJ45 | 0,87 | 1,89 c |
| CC102 | 0,00 | 0,0 c | CC102 + AMSJ45 | 0,45 | 0,98 c |
| AMSJ45 | 0,08 | 0,18 c | CC40 + AMSJ45 | 0,19 | 0,41 c |
| CC40 | 0,06 | 0,14 c | Controle | 0,00 | 0,0 c |

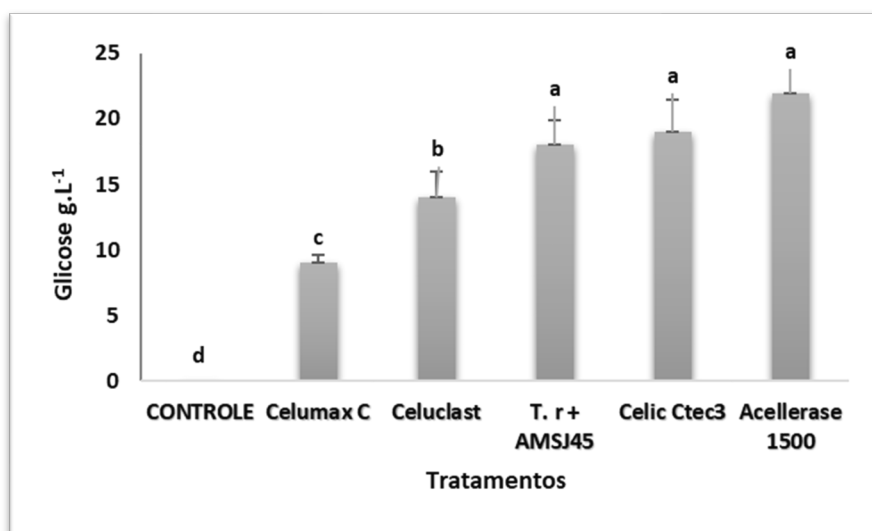
Legenda: Rendimento de glicose liberada da sacarificação enzimática da biomassa de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido/base) utilizando os extratos brutos enzimáticos obtido dos monos e cocultivos entre a actinobactéria *S. curacoi* e os fungos filamentosos *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102), *F. flavus* (FPB04). Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$).

Fonte: Da autora (2023).

8.3.2.3 Enzimas comerciais: hidrólise enzimática da biomassa de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido/base)

A biomassa do sorgo sacarino pré-tratado quimicamente também foi submetida à sacarificação com as enzimas comerciais Celluclast®, Acellerase® 1500, Celumax C e Cellic® CTec3. Para esse ensaio, o extrato bruto enzimático do melhor cocultivo obtido no Capítulo III foi comparado com as formulações comerciais (FIGURA 44).

Figura 44: Concentração de glicose liberada durante a hidrólise enzimática utilizando enzimas comerciais e extrato bruto enzimático de *T. reesei* (T.r) e *S. curacoii*, durante 48 horas.



Legenda: Concentração de glicose obtida por meio da sacarificação enzimática da biomassa de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido/base) utilizando os extratos brutos enzimáticos obtido do cocultivos entre *T. reesei* (T.r) e *S. curacoii* comparado com formulações comerciais. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2023).

A enzima comercial Acellerase® 1500 apresentou o melhor resultado na liberação de glicose, não diferindo estatisticamente de Cellic® CTec3 e o extrato bruto de *T. reesei* (T.r) e *S. curacoii* (TABELA 12).

Tabela 12: Rendimento de glicose liberada da sacarificação enzimática da biomassa de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido/base) utilizando enzimas comerciais e extrato bruto enzimático.

| Enzimas Comerciais e Blend Enzimático | | |
|---------------------------------------|------------------------------|----------------|
| | Glucose (g.L ⁻¹) | Rendimento (%) |
| Acellerase® 1500 | 22 | 48 a |
| Cellic CTec3® | 19 | 40 a |
| T. r + AMSJ45 | 18 | 39 a |
| Celluclast® | 14 | 30 b |
| Celumax C® | 14 | 30 b |
| Controle | 0 | 0 c |

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2023).

A Tabela 12 mostra o rendimento de glicose liberada da biomassa de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido/básico) e submetido a sacarificação por enzimas comerciais. Em valores absolutos, a sacarificação com a Acellerase® 1500 apresentou maior rendimento de glicose, 48,44%, seguido pela sacarificação com a Cellic CTec3® apresentando 40,53% de rendimento, com 22 g.L-1 e 19 g.L-1 de glicose liberada no ensaio respectivamente.

8.4. DISCUSSÃO

A cultivar de sorgo sacarino CMSXS5021 é um híbrido de duplo propósito (biomassa e sacarino) e tem sido estudada na Embrapa Milho e Sorgo como opção para o mercado de bioenergia. Seu duplo propósito diz respeito à existência de caldo rico em açúcares fermentescíveis em seu colmo para E1G, e alto teor de celulose na composição de sua parede celular vegetal, para E2G.

Os valores encontrados para composição das frações *in natura*: hemicelulósica (xilanos e arabinanos) 26%, celulósica (glicanos) 42,02 % e lignina (LSA e LIA) 23,67 % foram comparados com alguns dados de literatura. O teor observado de extrativos totais (em água e em etanol) foi de 37,20 %, muito superior ao encontrado por NETO (2018), que obteve 4,76 %, trabalhando com o sorgo sacarino IPA EP17 e LINS (2017), trabalhando com o bagaço do sorgo sacarino IPA P222, com valores de extrativos totais de sorgo de 13,99 %. Este alto valor de extrativos totais pode ser atribuído a diversos componentes estruturais da parede celular do material como, por exemplo, alguns sais, açúcares e polissacarídeos (solúveis em água), ácidos ou ésteres graxos, álcoois de cadeia longa, ceras, resinas e compostos fenólicos e glicosídeos (solúveis em solventes orgânicos) (MORAIS *et al.*, 2010).

O teor de lignina total (LSA + LIA 23,67 %) foi maior do que o encontrado por Barcelos *et al.* (2016) e Yue *et al.* (2017) que obtiveram os valores de 19,80% e 19,94% de lignina, respectivamente, ao caracterizar o bagaço do sorgo sacarino. Este também foi maior do que aqueles descritos por Bi *et al.* (2017) e Batista (2016), que reportaram valores de 13,84% e 10,80%, respectivamente, demonstrando que a composição da biomassa lignocelulósica pode variar a depender da cultivar, do manejo e trato cultural.

O teor de celulose encontrado neste estudo foi similar ao obtido por Barcelos (2016) e Bi *et al.* (2017), que foram de 40,42% e 37,68%, respectivamente. Em um estudo anterior, Pacheco *et al.* (2014) trabalharam com quatro genótipos de sorgo sacarino para produção de etanol celulósico e encontraram valores de celulose variando entre 32,8% e 36,50%.

O teor de hemicelulose foi menor do que o encontrado por Batista (2016), o qual foi 30,46% para a cultivar BD 5404. NETO (2018) encontrou teor de 32,05 %, para IPA EP17 e PRATHYUSHA *et al.* (2016) utilizando sorgo sacarino para ensaios de sacarificação obteve 44,83 % de hemicelulose.

O pré-tratamento químico (ácido/básico) da biomassa de sorgo sacarino tem o objetivo de modificar as características reológicas da biomassa, reduzindo a recalcitrância da mesma que dificulta o ataque das enzimas hidrolíticas. Para a biomassa pré-tratada, observou-se uma redução da fração hemicelulósica em 21%. Isso significa uma maior superfície de contato entre as enzimas hidrolíticas de celulose em relação a biomassa disponível, o que melhora consideravelmente a ação das enzimas. Salvi *et al.* (2010) apresentaram em seu trabalho redução de 90% de hemicelulose quando pré-trataram a biomassa de sorgo com amônia diluída. O pré-tratamento ácido/básico da biomassa de sorgo sacarino investigado no presente trabalho apresentou uma redução de 78,83% de xilanos (hemicelulose) nas condições testadas, sendo inferior ao apresentado pelos autores.

O teor de celulose aumentou de 42% para 83%, indicando alto potencial de rendimento da hidrólise. Joy (2022) avaliando a sacarificação de biomassa de sorgo após pré-tratamento *organossolv* com glicerol amoniacal reportou teor de celulose em seu trabalho de 72%, valor inferior ao do presente trabalho. Já a lignina foi reduzida de 23,67 % para 6,96 %, o que reduz significativamente a inibição enzimática por adsorção. Atualmente um dos maiores desafios da indústria produtora de etanol de segunda geração é a etapa de pré-tratamento, visto que determinados resíduos oriundos da degradação dos açúcares e da lignina são frequentemente citados como possíveis inibidores da hidrólise ou fermentação subsequente. Dentre esses resíduos, pode-se citar: ácido succínico, ácido acético, ácido levulínico, etanol, hidroximetilfurfural e furfural (OGEDA, PETRI, 2010).

Quatro processos de pré-tratamento, incluindo líquidos iônicos, explosão à vapor, cal e ácido diluído, foram utilizados para hidrólise enzimática de bagaço de sorgo sacarino por Zhang, *et al.* (2011). Esses autores obtiveram conversão máxima de glicose quando pré-trataram a biomassa por explosão a vapor, atingindo 70% (25 g.L⁻¹). No presente trabalho, a maior conversão se deu com 22 g.L⁻¹ de glicose e rendimento de 48%. Os autores trabalharam com a hipótese de que a redução da cristalinidade, por meio da alteração da forma, tornou a celulose mais acessível para a hidrólise enzimática em relação aos outros pré-tratamentos avaliados no trabalho. O pré-tratamento ácido seguido de base, utilizado no presente trabalho, liquefaz as frações de lignina e hemicelulose assim como a explosão a vapor. Porém, ele não

modifica a estrutura cristalina da celulose de forma expressiva (WADA, TOKUYASU, 2010), demonstrando que a eficiência da etapa de sacarificação pode envolver vários fatores prévios a ela (WANG, 2013).

Outro ponto a ser considerado na hidrólise da biomassa pré-tratada quimicamente por ácido e base, em relação a outros pré-tratamentos, é o fato de que esse pode gerar inibidores enzimáticos. Um deles, é a lignina residual que pode gerar um efeito de adsorção improdutivo, provocando menor rendimento de hidrólise, o que, no presente trabalho, apresentou residual de 6,96 % após o pré-tratamento químico (ácido/base). Estudos demonstram que seu efeito pode ser minimizado se forem acrescentadas proteínas não catalíticas, polímeros e surfactantes não-iônicos ao meio, comumente encontrados na literatura para reduzir tal adsorção improdutivo enzimática da lignina e, além disso, proteger as enzimas celulolíticas da desnaturação térmica durante o processo de hidrólise (FLORENCIO, BADINO FARINAS, 2017).

Houve uma alta correlação positiva da liberação de glicose com a atividade de FPase, β -glicosidase, xilanases e endoglicanase dos experimentos do Capítulo III, que elucidaram as atividades enzimáticas dos extratos brutos utilizados nessa etapa do trabalho. Através da análise de correlação de Pearson, verificou-se que a concentração de glicose se correlacionou de forma significativa e positiva com as enzimas FPase ($\rho=0,94$), β -glicosidase ($\rho=0,8$), xilanases ($\rho=0,75$) e endoglicanase ($\rho=0,70$) sugerindo que quanto maior a produção dessas enzimas, maior o conteúdo de glicose no hidrolisado. Além disso, as correlações demonstraram alta magnitude, pois segundo Skinner *et al.*, (1999) apenas coeficientes de correlação com valores absolutos superiores a 0,71 devem ser considerados biologicamente significativos. De acordo com os autores, somente nessas situações mais do que 50% da variância de uma característica é predita pela outra. Assim, nestas condições o aumento de glicose observado no hidrolisado está possivelmente associado a expressão dessas enzimas.

Em relação à sacarificação da biomassa de sorgo sacarino por enzimas obtidas em mono e cocultivo entre a actinobactéria *S. curacoii* (AMSJ45) e os fungos filamentosos *A. terreus* (A.t), *A. acculeatus* (A.a), *T. reesei* (T.r), *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102) e *F. flavus* (FPB04), os extratos que apresentaram maior eficiência na conversão de biomassa de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido/base) foram o do monocultivo de *T. reesei* (T.r) e o do cocultivo entre *S. curacoii* (AMSJ45) e *T. reesei* (T.r), com uma concentração de glicose liberada no hidrolisado de 19,4 g.L⁻¹ e 18,04 g.L⁻¹, respectivamente, e um rendimento de 41,97% e 39,04% de conversão de celulose em glicose.

Em estudos avaliando a hidrólise de biomassa de sorgo sacarino *in natura*, Lins (2017) encontrou valores de 0,9 g. L⁻¹ ao utilizar um extrato bruto enzimático obtido da fermentação submersa de *T. reesei*, utilizando biomassa de sorgo sacarino suplementada de farelo de trigo como fonte indutora da atividade enzimática. Para a autora, a baixa liberação de açúcares se deu por baixa atividade de FPase do extrato (0,09 U.mL⁻¹). No presente trabalho, a liberação de açúcares também foi maior onde a maior atividade da enzima foi identificada: no monocultivo de *T. reesei* (19,40 g. L⁻¹) com atividade enzimática de FPase: 0,36 ± 0,16 UI. mL⁻¹, demonstrada no Capítulo III, e no cocultivo de *S. curacoii* (AMSJ45) + *T. reesei* (T.r) (18,04 g. L⁻¹), apresentando atividade da enzima de 0,48 ± 0,04 UI. mL⁻¹ sem diferença estatística entre elas.

Curiosamente, a liberação de glicose na hidrólise feita com extrato do monocultivo de *A. acculeatus* (A.a) (5,01 g. L⁻¹) e o cocultivo de *A. acculeatus* (A.a) + *S. curacoii* (AMSJ45) (5,03 g. L⁻¹) não foi acompanhada da atividade de FPase como em *T. reesei* (T.r). O resultado pode ser devido à produção enzimática de β-glicosidase (0,60 ± 0,07 UI. mL⁻¹ para o monocultivo e 0,85 ± 0,08 UI. mL⁻¹ para o cocultivo) e xilanase (0,72 ± 0,1 UI. mL⁻¹ para o monocultivo e 0,64 ± 0,08 UI. mL⁻¹ para o cocultivo), já que essas enzimas atuam na desconstrução da parede celular, sendo a presença delas extremamente desejável em um coquetel enzimático para bioetanol. O monocultivo e o cocultivo não apresentaram diferenças significativas. Quando comparados, os perfis enzimáticos de ambos os cultivos apresentaram diferenças mínimas, considerando-se, então, que a interação entre as linhagens no cocultivo foi aumentada para β-glicosidase e reduzida para xilanase, o que não interferiu na similaridade da liberação de açúcares entre os dois extratos.

A concentração de glicose na hidrólise do monocultivo de *P. lecomtei* (CC40), *F. hepatica* (CC102) e *F. flavus* (FPB04) foi inferior a 1,0 g. L⁻¹, assim como no cocultivo entre esses fungos e *S. curacoii* (AMSJ45). Apesar de os extratos apresentarem baixa concentração de glicose liberada na hidrólise, vale a observação de que o cocultivo com a actinobactéria promoveu um incremento de 53% para *P. lecomtei* (CC40), 350% para *F. hepatica* (CC102) e 44% para *F. flavus* (FPB04), podendo-se considerar que houve interação positiva entre os fungos e a actinobactéria que permitisse estimular a liberação de enzimas hidrolíticas. Estes resultados de aumento nas atividades enzimáticas do sistema de cocultivo simulam, de forma parcial, um ambiente selvagem onde actinobactérias e fungos interagem de forma sinérgica na bioconversão de biomassas lignocelulósicas, gerando benefícios mútuos.

O efeito positivo de cocultivos em função da maior liberação de açúcares já foi constatado na literatura. Kumar *et al.*, (2016) obtiveram um aumento na produção de enzimas hidrolíticas quando cocultivaram *Penicillium* sp. AKB-24 e *Aspergillus nidulans* AKB-25 sendo: endoglucanase, FPase e exoglucanase aumentadas em 34%, 18% e 11%, respectivamente, em comparação com *Aspergillus nidulans* AKB-25 sozinho. Wang *et al.* (2006) também relataram o aumento da produção de celulase, hemicelulase, glucoamilase e pectinase quando a cultura mista de *Aspergillus niger* foi utilizada sob o processo SSF utilizando farelo como substrato principal. Rehman *et al.* (2014) observaram um aumento na produção de pectinase quando cocultivaram *Aspergillus terreus* (MS105) e *A. niger* (MS23). Peláez, (2017) concluiu que as hidrólises enzimáticas aplicando os extratos dos cocultivos de três basidiomicetos e *T. reesei* resultaram num rendimento 44,7% superior quando comparadas com os monocultivos. Mesmo nestes casos é preciso verificar proteínas expressas em estudos de proteômica e transcriptômica para conhecer quais enzimas estão interagindo no processo, visto que várias enzimas acessórias e módulos de carboidratos estão envolvidos na degradação da biomassa. No presente trabalho, a avaliação enzimática permitiu-nos visualizar um parâmetro geral detectado no Capítulo III.

Ao comparar o hidrolisado obtido por meio da sacarificação da biomassa, utilizando o extrato bruto enzimático do cocultivo entre *S. curacoii* (AMSJ45) e *T. reesei* (T.r) com diferentes enzimas comerciais, o produto que apresentou melhor rendimento teórico de hidrólise foi Acellerase® 1500, com 22 g.L⁻¹ de glicose liberada, alcançando o rendimento de 48,44 % em conversão de celulose em glicose. Este não apresentou diferença estatística com o Cellic CTec3® 19 g.L⁻¹ 40,53% e o extrato bruto (T.r + AMSJ45) com 18 g.L⁻¹ 39,04%. O resultado se mostrou promissor para o extrato bruto enzimático do cocultivo entre *S. curacoii* (AMSJ45) e *T. reesei* (T.r) já que apresentou maior concentração de glicose do que algumas formulações comerciais, mesmo sem nenhum processo de purificação da enzima, o que aumentaria sua eficiência.

As atividades enzimáticas actinobacterianas e fúngicas e o seu cocultivo podem ser critérios interessantes para o uso na hidrólise de biomassas lignocelulósicas em açúcares fermentescíveis. O rendimento em liberação de glicose na hidrólise com o extrato da actinobactéria *S. curacoii* (AMSJ45) e o fungo filamentosos *T. reesei* (T.r) foi apenas 19% menor em relação ao melhor coquetel comercial (Acellerase® 1500) avaliado no presente trabalho, indicando que este extrato pode ser otimizado com potencial para obtenção de açúcares fermentescíveis na hidrólise de biomassa pré-tratada.

Esse resultado também demonstra como as características de enzimas distintas estão diretamente relacionadas com a composição estrutural da biomassa, já que a composição das formulações comerciais é diferente no que diz respeito às características enzimáticas e os resultados foram distintos para diferentes tipos de coquetéis comerciais. O que nos dá um panorama da necessidade de se pesquisar novos catalizadores biológicos buscando seus produtores na natureza e otimizando sua expressão.

8.5 CONCLUSÕES

- O sorgo sacarino pré-tratado quimicamente apresentou o rendimento de celulose (glucana) de 83,21 % para a condição de pré-tratamento ácido/base.
- Os extratos brutos enzimáticos do monocultivo de *T. Reesei* (Tr) e cocultivo com *S. curacoii* (AMSJ45) apresentaram o rendimento de 41,97 e 39,04% de celulose disponível na biomassa de sorgo pré-tratado quimicamente por ácido/base, liberando no cocultivo 18,04 g. L⁻¹ e 19,04 g. L⁻¹ respectivamente, de glicose no ensaio de 48 h.
- As enzimas comerciais Accellerase® 1500 e Cellic CTec3® apresentaram rendimento de 48 e 40% da celulose disponível na biomassa de sorgo pré-tratado quimicamente por ácido/base liberando 22 g. L⁻¹ e 19 g. L⁻¹ respectivamente, de glicose no ensaio de 48 h.
- Os resultados da sacarificação demonstraram que o sorgo sacarino é uma biomassa adequada para obtenção de açúcares fermentescíveis por meio da hidrólise da biomassa visando a obtenção de etanol de segunda geração.
- Os extratos brutos enzimáticos do monocultivo de *T. Reesei* (Tr) e cocultivo com *S. curacoii* (AMSJ45) apresentaram-se promissores para obtenção de açúcares da biomassa.

8.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biomassa lignocelulósica de sorgo sacarino têm grande potencial para o uso como substrato indutor de xilanase no cultivo de actinobactérias. Porém, é desejável testes com suplementação de nutrientes, tais como o nitrogênio, para otimizar o processo.

As enzimas lignocelulolíticas de algumas actinobactérias cultivadas por fermentação submersa utilizando a biomassa de sorgo sacarino foram predominantemente xilanases.

Os cocultivos entre espécies de actinobactérias e fungos filamentosos que mostraram interações positivas quando da triagem em cultivo em placa de Petri contendo meio BDA, apresentaram extratos enzimáticos com atividades lignocelulolíticas variadas durante o cultivo submerso.

Neste trabalho, pode-se observar que o cocultivo entre *T. Reesei* (Tr) com *S. curacoii* por exemplo, apresentou um dos melhores perfis de atividades lignocelulolíticas, tanto que foi utilizado como um dos extratos enzimáticos no processo de hidrólise da biomassa de sorgo sacarino em comparação a coquetéis enzimáticos comerciais.

O coquetel comercial que liberou a maior concentração de glicose da biomassa de sorgo sacarino pré-tratado quimicamente (ácido/base) foi o Acellerase® 1500 seguido de Celic Ctec3® e em terceiro lugar do extrato bruto enzimático *T. Reesei* (Tr) em cocultivo com *S. curacoii* sem diferença significativa entre eles.

Para trabalhos futuros, indica-se o uso de extratos obtidos em monocultivos e misturados em diferentes proporções e otimização do meio de cultivo para aumentar a produção enzimática.

REFERÊNCIAS

- AB RASID, Nurul Suhada et al. **Recent advances in green pre-treatment methods of lignocellulosic biomass for enhanced biofuel production.** Journal of Cleaner Production, v. 321, p. 129038, 2021.
- BARCELOS, C. A. et al. **Sweet sorghum as a whole-crop feedstock for ethanol production.** Biomass and Bioenergy, n. 94, p. 46-56, 2016.
- BATISTA, V. A. P. **Avaliação Bioenergética de Sorgos Biomassa, Sacarino e Forrageiro.** Dissertação de Mestrado. Viçosa/MG, 2016.
- BAY, Mohammad Saber; ESLAMI, Fatemeh; KARIMI, Keikhosro. **The Relationship between Structural Features of Lignocellulosic Materials and Ethanol Production Yield.** Designs, v. 6, n. 6, p. 119, 2022.
- BI, Z.; ZHANG, J.; PETERSON, E.; ZHU, Z.; XIA, CHUNJIE.; LIANG, Y.; WILTOWSKI, T. **Biocrude from pretreated sorghum bagasse through catalytic hydrothermal liquefaction.** Fuel, v.188, p. 112-120, 2017.
- DE ALMEIDA, Luciana Gomes Fonseca et al. **Characterization of cell wall polysaccharides and cellulosic ethanol potential in genotypes of sorghum biomass.** Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2019.
- DE OLIVEIRA RIBEIRO, Pedro Cesar *et al.* **Insight into genetic potential of male sterile sweet sorghum A-lines for agroindustrial traits using tester R-lines.** Industrial crops and products, v. 153, p. 112577, 2020
- EMYDIO, B.M. **Produção de etanol a partir de sorgo sacarino. 2010.** Artigo em Hypertexto. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/sorgo/index.htm
Acesso em: 23/11/2022.
- FLORENCIO, Camila; BADINO, Alberto Colli; FARINAS, Cristiane Sanchez. **Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica.** Química Nova, v. 40, p. 1082-1093, 2017.
- GHOSE, T. K. **Measurement of cellulase activities.** Pure and applied Chemistry, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- JOY, Shereena P.; KRISHNAN, Chandraraj. **Modified organosolv pretreatment for improved cellulosic ethanol production from sorghum biomass.** Industrial Crops and Products, v. 177, p. 114409, 2022.
- KUMAR, A.; GAUTAM, A.; DUTT, D. **Co-Cultivation of Penicillium sp. AKB-24 and Aspergillus nidulans AKB-25 as a Cost-Effective Method to Produce Cellulases for the Hydrolysis of Pearl Millet Stover.** Fermentation, v. 2, n. 2, p. 12, 2016. ISSN 2311- 5637. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2311-5637/2/2/12> >.

LINS, S. A. da S. **Produção de celulases e hemicelulases a partir do sorgo sacarino**. 2017. 125f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2017. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/1479>. Acesso em: 20 jan 2021.

MAGALHÃES, P. C. et al. **Respostas anatômicas, fisiológicas e enzimáticas em linhagens de sorgo contrastantes a seca sob estresse hídrico**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2016. 31 p. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 135).

MARQUES, Fabrício. **Obstáculos no caminho**. Revista Pesquisa FAPESP, São Paulo, 11 de dez. de 2018. Bioenergia. Disponível em: < Obstáculos no caminho: Revista Pesquisa Fapesp >. Acesso em: 10 fev 2021.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para análise lignocelulósica**. Documento 236, Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010.
MORETTI, Marcia *et al.* **Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 43, p. 1062-1071, 2012.

NETO, J. M. S. **Isolamento de Frações Celulolíticas e Hemicelulolíticas do Bagaço do Sorgo Sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e Síntese de Acetato de Celulose**. Dissertação de Mestrado, Campina Grande/PB, 2018.

OGEDA, Thais Lucy; PETRI, Denise FS. **Hidrólise enzimática de biomassa**. Química nova, v. 33, p. 1549-1558, 2010.

PACHECO, T., GONCALVES, S., MACHADO, C., & PARRELLA, R. D. C. (2014). **Avaliação do bagaço de biomassa de genótipos de sorgo sacarino para a produção de etanol celulósico**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA-COBEQ, 20.; ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE O ENSINO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 15., 2014, Florianópolis-SC. [Anais...]. Florianópolis: UFSC, 2014.

PARRELLA, RA da C. et al. **Cultivares de sorgo para produção de bioenergia**. 2021.

PELÁEZ, Rubén Darío Romero. **Enzimas lignocelulolíticas de basidiomicetos cultivados em biomassas vegetais oriundas da agroindústria do dendê e obtenção de açúcares fermentescíveis**. 2017.145f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Gurupi, 2017.

PRATHYUSHA, N. *et al.* **Modelling of pretreatment and saccharification with different feedstocks and kinetic modeling of sorghum saccharification**. Bioresource Technology, v. 221, p. 550-559, 2016.

R Core Team (2022). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Disponível em: < <https://www.R-project.org/> > Acesso em: 10 jan 2022

REHMAN, S. *et al.* **Production of plant cell wall degrading enzymes by monoculture and co-culture of *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus* under SSF of banana peels.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 45, p. 1485-1492, 2014. ISSN 1517-8382.

SALVI, D. A. *et al.* **Ethanol production from sorghum by a dilute ammonia pretreatment.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 37, n. 1, p. 27, 2010.

SARAVANAN, A. *et al.* **Recent advances and sustainable development of biofuels production from lignocellulosic biomass.** Bioresource Technology, v. 344, p. 126203, 2022.

SKINNER, D. Z.; BAUCHAN, G. R.; AURICHT, G.; HUGHES, S. **A method for the efficient management and utilization of large germplasm collections.** Crop science, v. 39, n. 4, p. 1237– 1242, 1999.

SLUITER, A. *et al.* **Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples.** National Renewable Energy Laboratory, v. 9, p. 1-6, 2008. Disponível em: < Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (nrel.gov)> Acesso em: 10 nov 2021. (2008a)

SLUITER, A. *et al.*, **Determination of extractives in biomass.** Laboratory analytical procedure (LAP), v. 1617, n. 4, p. 1-16, 2005. Disponível em: < Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); (nrel.gov)> Acesso em: 10 nov 2021

SLUITER, Amie *et al.* **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass.** Laboratory analytical procedure, v. 1617, n. 1, p. 1-16, 2008. Disponível em:< Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised July 2011) (nrel.gov)> Acesso em: 22 nov 2021 (2008b)

WADA, Masahisa; IKE, Masakazu; TOKUYASU, Ken. **Enzymatic hydrolysis of cellulose I is greatly accelerated via its conversion to the cellulose II hydrate form.** Polymer Degradation and Stability, v. 95, n. 4, p. 543-548, 2010.

WANG XJ, Bai JG, Liang YX (2006) **Optimization of multienzyme production by two mixed strains in solid state fermentation.** Appl Microbial Biotechnol 73:533-540.

WANG, Mingyu *et al.* **The structural and biochemical basis for cellulose biodegradation.** Journal of Chemical Technology & Biotechnology, v. 88, n. 4, p. 491-500, 2013.

YUE, Y.; SINGH, H.; SINGH, B.; MANI, S. **Torrefaction os sorghum biomass to improve fuel properties.** Bioresource Techonology, v. 232, p. 372-379, 2017.

ZHANG, Jingzhi *et al.* **The effects of four different pretreatments on enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse.** Bioresource technology, v. 102, n. 6, p. 4585-4589, 2011.