



UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA B-GLICOSIDASE POR *Aspergillus* sp. EM CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

EDUARDO DA SILVA MARTINS; HEYTOR LEMOS MARTINS

RESUMO

As β -glicosidases são enzimas celulolíticas que apresentam diversas aplicações industriais, como nas indústrias de sucos, vinhos e na produção de biocombustíveis. Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de β -glicosidase pelo fungo *Aspergillus* sp. e determinar parâmetros de cultivo visando aumentar a atividade enzimática. Foram avaliados os seguintes parâmetros: tipo de substrato, tempo de cultivo, solução nutriente suplementar, pH da solução nutriente, umidade inicial do substrato e temperatura de incubação do fungo. Na melhor condição encontrada, a enzima foi caracterizada em relação ao pH e temperatura ótimos, bem como à estabilidade a estes fatores. Os valores de atividade da β -glicosidase apresentaram diferença significativa com o fungo cultivado nos substratos compostos por farelo de trigo e bagaço de cana (1:1 p/p), farelo de trigo e bagaço de malte (1:1 p/p) e na mistura dos três substratos (1:1:1 p/p), em relação ao cultivo em farelo de trigo e na mistura de bagaço de cana e bagaço de malte (1:1 p/p). A atividade enzimática foi mais elevada nas seguintes condições de cultivo: solução nutriente composta por NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1%) com pH 4,5 e 5,5, temperatura de incubação do fungo a 35 °C, com umidade inicial do substrato em 65%. A enzima apresentou maior atividade na faixa de pH entre 4,5 e 5,5, e estabilidade em uma ampla faixa de pH (3,0 a 8,0). A temperatura ótima foi de 65 °C e a enzima apresentou de estabilidade superior a 70% por 1h, até 55 °C. A utilização de resíduos agroindustriais proporcionou elevada produção de β -glicosidase pelo fungo, com a enzima apresentando características com potencial de aplicação industrial.

Palavras-chave: material lignocelulósico; enzima; celulase; fungo; biodegradação.

1 INTRODUÇÃO

As β -glicosidases são celulasas que desempenham funções bioquímicas, fisiológicas e nutricionais em diversos organismos. A partir do conhecimento dos seus mecanismos de ação, diversas aplicações industriais com estas enzimas vêm sendo feitas, tais como a hidrólise de lignocelulose para produção de biocombustíveis; hidrólise de glicosídeos em sucos de frutas e vinhos para melhorar aroma; síntese de agliconas bioativas a partir de conjugados de glicosídeo; e produção de alquilglicosídeos, que são ingredientes úteis de cosméticos e detergentes (Godse *et al.*, 2021).

A redução no custo de produção e melhoria no rendimento de celulasas pode ser alcançado usando fontes de carbono e nitrogênio apropriadas e de baixo custo na formulação de meio de cultivo. Portanto, o uso de resíduos agrícolas disponíveis na obtenção de enzimas permite a redução do seu custo global de produção. Além disso, a aplicação destes resíduos em bioprocessos tornou-se importante sob o ponto de vista ambiental, reduzindo problemas relacionados ao seu manejo inadequado e consequentes danos ambientais (Santos *et al.*, 2016; Devi *et al.*, 2022).

Além do substrato, a produção de β -glicosidase é influenciada pelas condições de cultivo, como tempo de incubação, pH, temperatura de incubação e fontes suplementares de nutrientes. Portanto, a otimização das condições de cultivo é crucial para garantir a produção máxima de enzimas (Singh *et al.*, 2023).

Diante deste contexto, o trabalho visou avaliar o potencial produção de β -glicosidase pelo fungo *Aspergillus* sp. em estado sólido de resíduos agroindustriais sob diferentes condições de cultivo, bem como caracterizar a enzima.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo e meios de cultivo

Foi estudado o fungo *Aspergillus* sp., isolado de solo de uma horta agroecológica, na Fazenda Horta Rio Grande, localizada no município de Fronteira/MG. Para repiques periódicos e conservação da cultura pura, foi utilizado meio de cultura composto por 3% de farinha de aveia (Quaker[□]) e 1% de agar bacteriológico. As culturas puras foram mantidas em criotubos, sob solução de glicerol a 20%, em freezer a -80 °C.

Para cada cultivo, foi feito um pré-inóculo, em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio composto por farinha de aveia (Quaker[□]) a 3% e Agar (1%), com pH ajustado com HCl para 5,5. O fungo foi inoculado na superfície deste meio, por estrias, e incubado a 30°C até completo crescimento. Após este período, foi feita uma suspensão com 150 mL de água destilada, sendo utilizado 2,0 mL da suspensão como inóculo e água destilada em quantidade que cada substrato ficasse inicialmente com umidade de 70%.

Produção da enzima por cultivo em estado sólido e parâmetros de cultivo

Os cultivos em estado sólido foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, utilizando-se 5g dos seguintes substratos: farelo de trigo (FT); farelo de trigo + bagaço de cana-de-açúcar (FT BC) (1:1 p/p); farelo de trigo + bagaço de malte (FT BM) (1:1 p/p); bagaço cana + bagaço de malte (BC BM) (1:1 p/p); e em uma mistura destes três materiais (FT BC BM) (1:1:1 p/p). Inicialmente foi utilizado água destilada esterilizada para hidratação do meio, a pH 5,0 e o fungo foi cultivado a 30 °C. A cada 24h, amostras (em triplicata) foram retiradas até 120 horas.

Para cada amostra, foram adicionados 50 mL de água destilada, sendo a mistura homogeneizada manualmente e posteriormente mantida sob agitação em shaker (140 rpm), por 20 minutos. Após este período, o material foi filtrado em disco de tecido nylon, centrifugado a 10000.g por 15 min, a 5 °C, e o sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

Para avaliar o efeito da suplementação do substrato sobre a produção da enzima, foram utilizadas as seguintes soluções nutrientes: 1- água destilada; 2- NH₄NO₃, MgSO₄.7H₂O e (NH₄)₂SO₄ (todos a 0,1%); 3- extrato de levedura a 0,1%, adicionados inicialmente de modo que a umidade inicial fosse de 70%. Cada solução teve seu pH ajustado de 4,0 a 6,0 (com variação de 0,5 em 0,5), em planejamento fatorial 3x5, com o experimento sendo feito em triplicata.

Na avaliação do efeito da umidade inicial do substrato, foram adicionados volumes da solução nutriente (escolhida na etapa anterior), junto ao inóculo, de modo que a umidade inicial ficasse em 60%, 65%, 70%, 75% e 80%. As temperaturas de cultivo avaliadas foram de 30 °C, 35 °C, 40 °C e 45 °C, em planejamento fatorial 5x4, também em triplicata.

Caracterização da β -glicosidase

O efeito do pH sobre a atividade de β -glicosidase foi determinado incubando 50 μ L de solução enzimática em 250 μ L do substrato p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo (Sigma) (4mM),

nos seguintes tampões (0,2 M): citrato de sódio (pH 3,0), acetato de sódio (3,5-5,5), MES (pH 6,0-6,5), HEPES (pH 7,0-7,5), glicina-NaOH (pH 8,0-10,0). Para determinar a estabilidade da enzima frente a variações de pH, um volume final de 1,0 mL (extrato bruto devidamente diluído em tampão acetato pH 5,0), foi incubado a 8 °C durante 24 horas. Após o período de incubação, a atividade enzimática foi mensurada na temperatura e pH ótimos da enzima.

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi determinado variando-se a temperatura entre 40 e 80 °C (de 5 em 5 °C). A termoestabilidade foi avaliada incubando-se o extrato enzimático, por uma hora, em temperaturas variando de 10 a 80 °C, seguida da determinação da atividade residual, nas condições ótimas de pH e temperatura.

Determinação da atividade de β -glicosidase

A determinação da atividade de β -glicosidase foi feita com nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo, conforme Garcia *et al.* (2015).

Análise estatística dos dados

Com os dados gerais obtidos com os diferentes tratamentos aplicados, foi feita a análise de variância dos experimentos e aplicação do teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, para as médias obtidas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado que os substratos que proporcionaram produção significativamente maior de β -glicosidase pelo fungo foram o farelo de trigo + bagaço de cana (48h a 96h de cultivo), farelo de trigo e bagaço de malte (48h e 72h de cultivo) e a mistura de farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e palha de cana-de-açúcar (em 48h, 72h e 120h de cultivo) (Tabela 1).

Tabela 1. Produção de β -glicosidase por *Aspergillus* sp. em diferentes substratos e tempos de cultivo.

Substrato	Atividade enzimática (U.g ⁻¹)				
	Tempo de cultivo (h)				
	24	48	72	96	120
FT	0 Ac	9,3 Ba	9,9 Ba	7,6 Bb	6,5 Bb
FT BC	0 Ab	12,7 Aa	12,5 Aa	12,5 Aa	12,1 Aa
FT BM	0 Ac	13,2 Aa	11,2 Ba	8,9 Bb	8,9 Bb
BC BM	0 Ab	4,1 Ca	4,5 Ca	6,5 Ba	6,3 Ba
FT BC BM	0 Ad	12,5 Aa	14,1 Aa	11,0 Ab	13,4 Aa

FT: farelo de trigo; FT BC: farelo de trigo + bagaço de cana (1:1 p/p); FT BM: farelo de trigo + bagaço de malte (1:1 p/p); BC BM: bagaço de cana + bagaço de malte (1:1 p/p); FT BC BM: farelo de trigo + bagaço de cana + bagaço de malte (1:1:1 p/p).

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5%).

Diante destes resultados, o substrato FT BC BM, no tempo de cultivo de 48h., foi selecionado para os experimentos posteriores, uma vez que propiciou o aproveitamento dos três resíduos avaliados, e a produção da enzima ocorreu num curto espaço de tempo. Vários estudos relatam o farelo de trigo como um substrato eficiente para a produção de celulases fúngicas tanto de maneira isolada quanto fazendo parte de misturas com outros substratos (Leite *et al.*, 2008; Garcia *et al.* 2015; Martins; Martins; Martins, 2020). De acordo com

Magwaza; Amobonye; Pillai (2024), a mistura de farelo de trigo com outros substratos pode aumentar a produção de BGL em níveis significativos.

Na avaliação do efeito de diferentes soluções nutrientes suplementares ao substrato FT BC BM, observou-se que a suplementação com solução de sais em pH 4,5 ou 5,5, ou com extrato de levedura a pH 5,0 aumentou significativamente a produção da enzima, em relação à quando utilizou-se apenas água (Tabela 2). Assim, foi escolhido para os experimentos posteriores o cultivo com suplementação de sais, em pH 4,5, uma vez que neste pH, o risco de contaminação do cultivo fúngico por bactérias torna-se menor. Este resultado é similar ao encontrado por Martins; Martins; Martins (2020), que relataram que a produção de β -glicosidase por *Myceliophthora heterothallica* foi significativamente maior quando o substrato foi suplementado com a mesma solução de sais, com pH 4,5.

Tabela 2. Produção de β -glicosidase por *Aspergillus* sp. em substrato composto por farelo trigo, bagaço de cana e palha de cana (1:1:1), suplementado com diferentes soluções nutrientes, em diferentes valores de pH, em 4 dias de cultivo. 1- água; 2- NH_4NO_3 a 0,1%; 3- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%; 4- NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (todos a 0,1%); 5- extrato de levedura a 0,1%; 5- água (controle).

Atividade enzimática ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$) Solução nutriente	pH			
	4,5	5,0	5,5	6,0
Água (controle)	18,4 Ba	16,0 Ba	16,7 Ca	16,5 Aa
Solução de sais	28,7 Aa	23,0 Ab	27,3 Aa	16,2 Ac
Extrato de levedura	18,8 Bb	22,7 Aa	20,1 Bb	15,8 Ac

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (5%).

A utilização de fontes suplementares de nutrientes ao substrato é importante para o crescimento fúngico e produção de enzimas. Gottschalk *et al.* (2013) relatam a importância da suplementação de Nitrogênio ao substrato, indicando que geralmente fontes inorgânicas de Nitrogênio geralmente são mais facilmente assimiláveis por fungos do que as fontes orgânicas. O pH inicial do meio tem um grande efeito sobre o crescimento e produção de β -glicosidasas microbianas, pois pode afetar a permeabilidade das células e outras atividades fisiológicas. Em cultivo em estado sólido, a maioria dos fungos filamentosos são conhecidos por sua capacidade de crescer sob uma ampla faixa de pH, devido à capacidade de tamponamento desses substratos sólidos (El-Ghonemy, 2021).

Nas melhores condições estabelecidas nos experimentos anteriores, foi determinado o efeito da umidade inicial do substrato (FT BC BM) e da temperatura de incubação do fungo, sobre a atividade da β -glicosidase. A condição que proporcionou maior atividade da enzima, com diferença estatística significativa, foi com incubação do fungo a 35 °C, em umidade de 65% (Tabela 3).

Tabela 3. Produção de β -glicosidase por *Aspergillus* sp. em substrato composto por farelo trigo, bagaço de cana e palha de cana (1:1:1), suplementado com NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1%), pH 4,5, em 48h de cultivo, sob diferentes condições de umidade e temperatura de incubação do fungo.

Atividade enzimática ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)

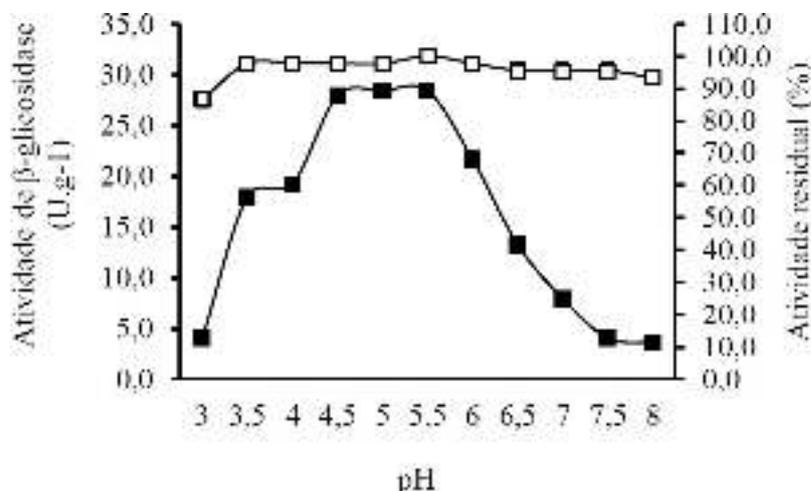
Temperatura de incubação (°C)	Umidade inicial do substrato (%)				
	60	65	70	75	80
30	4,8 Bb	7,2 Cb	8,5 Cb	13,1 Ba	14,9 Ba
35	21,9 Ac	31,6 Aa	25,8 Ab	17,4 Ac	19,8 Ac
40	24,5 Aa	20,3 Ba	11,9 Cb	10,2 Bb	12,1 Bb
45	19,5 Aa	18,5 Ba	17,4 Ba	11,6 Bb	12,1 Bb

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott (5%).

A temperatura de cultivo mais apropriada para a obtenção de β -glicosidase pelo *Aspergillus* sp. (35 °C) é similar aos valores encontrados por Elyas *et al.* (2010) e Pirota *et al.* (2016) β -glicosidasas de fungos do gênero *Aspergillus*. No cultivo em estado sólido, a determinação da umidade inicial do substrato também é um fator essencial para o crescimento fúngico e produção enzimática (Rodríguez-Zúñiga *et al.*, 2011).

O pH ótimo da β -glicosidase foi entre 4,5 e 5,5, quando incubada a 60° C (Figura 1). Observou-se que a enzima mantém mais de 85% de sua atividade em uma ampla faixa de pH (3,0 a 8,0). Na faixa de pH ótimo (4,5 a 5,5), manteve mais de 97,0% de sua atividade após 24h (Figura 01), mostrando elevada estabilidade a variações de pH.

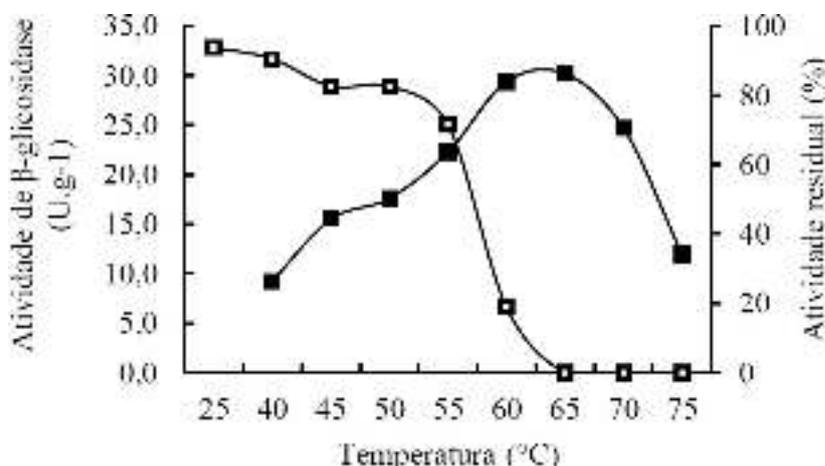
Figura 1. Efeito do pH sobre a atividade da β -glicosidase do fungo *Aspergillus* sp. -■- pH ótimo; - - - estabilidade ao pH, durante 24h, a 8°C.



O valor de pH ótimo da enzima do fungo *Aspergillus* sp. é similar aos descritos na literatura para β -glicosidasas fúngicas. Baffi *et al.* (2011) relatam que a maioria das β -glicosidasas apresentam pH ótimo entre 4,0 e 6,0. Com relação à estabilidade frente a variações de pH, a enzima apresentou elevada estabilidade (mais de 90%) em uma ampla faixa de pH (3,5 a 8,0), sendo que na faixa de pH ótimo, a enzima manteve mais de 97% da atividade.

A atividade da β -glicosidase foi maior nas temperaturas de 60°C e 65°C. A partir desta temperatura, a atividade diminuiu, especialmente a 75 °C (Figura 2). Quanto à termoestabilidade, os resultados mostraram que a β -glicosidase apresenta estabilidade superior a 90%, 80% e 70% quando exposta por 1h a temperaturas de 40° C, 50° C e 55° C, respectivamente (Figura 02).

Figura 02: Efeito da temperatura sobre a atividade da β -glicosidase do fungo *Aspergillus* sp. -■- temperatura ótima; - - estabilidade a diferentes temperaturas, por 1 hora.



A temperatura ótima da β -glicosidase do fungo *Aspergillus* sp. está acima da faixa de temperatura ótima destas enzimas produzidas por diferentes fungos mesofílicos. Quanto à termoestabilidade, os resultados apresentados são similares aos encontrados para outros fungos mesofílicos (Baffi *et al.*, 2011; El-Ghonemy, 2021).

4 CONCLUSÃO

A utilização de resíduos agroindustriais como substrato proporcionou boa produção de β -glicosidase pelo fungo *Aspergillus* sp., com a enzima apresentando características desejáveis do ponto de vista de sua aplicação industrial, tais como boa termoestabilidade e estabilidade em uma ampla faixa de pH. A otimização de parâmetros fermentativos mostrou-se fundamental para a maior produção da enzima.

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida (Bolsa PQ, edital 10/2022) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)- Programa de Apoio à Pós-graduação (PROAP), pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

BAFFI, M. A.; TOBAL, T. M.; HENRIQUE, J.; LAGO, G.; LEITE, R. S. R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; DA SILVA, R. A novel β -glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: Characterization and application in winemaking. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 997-1002, 2011.

DEVI, S.; SUHAG, M.; SINGH, J.; DHAKA, A. Highly efficient conversion biomass of *Saccharum munja* for cellulases and xylanase production to ethanol repression by newly isolated *Trichoderma atroviride* AD-130. **Journal of Agriculture Research and Technology**, v. 1, p. 94-100, 2022.

EL-GHONEMY, D. H. Optimization of extracellular ethanol-tolerant β -glucosidase production from a newly isolated *Aspergillus* sp. DHE7 via solid state fermentation using jojoba meal as substrate: purification and biochemical characterization for biofuel preparation.

Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, v. 1, p. 19-45, 2021.

ELYAS, K. K.; MATHEW, A.; SUKUMARAN, R. K.; ALI, P. P.; SAPNA, K.; KUMAR, S. R.; MOL, K. R. Production optimization and properties of beta glucosidases from a marine fungus *Aspergillus SA 58*. **New Biotechnology**, v. 27, p. 347-351, 2010.

GARCIA, N. F. L.; SANTOS, F. R. S.; GONÇALVES, F. A.; DA PAZ, M. F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R. S. R. Production of β -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 314-319, 2015.

GODSE, R.; BAWANE, H.; TRIPATHI, J.; KULKARNI, R. Unconventional b-glucosidases: a promising biocatalyst for industrial biotechnology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 193, n. 9, p. 2993-3016, 2021.

GOTTSCHALK, L. M. F.; PAREDES, R. D. S.; TEIXEIRA, R. S. S.; SILVA, A. S. A. D.; BON, E. P. D. S. Efficient production of lignocellulolytic enzymes xylanase, β -xylosidase, ferulic acid esterase and β -glucosidase by the mutant strain *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 569-576, 2013.

LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E.; SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391-395, 2008.

MAGWASA, B.; AMOBONYE, A; PILLAI, S. Microbial b-glucosidases: Recent advances and applications. **Biochimie**, v. 225, p. 49-67, 2024.

MARTINS, M. E. M.; MARTINS, E. S.; MARTINS, H. L. Production and characterization of a thermostable β -glucosidase from *Myceliophthora heterothallica*. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 1. p. 212-222, 2020.

PIROTA, R. D. P. B.; TONELLOTTO, M.; DELABONA, P. S.; FONSECA, R. F.; PAIXÃO, D. A. A.; BALEEIRO, F. C. F.; BERTUCCI NETO, V.; FARINAS, C. S. Bioprocess developments for celulase production by *Aspergillus oryzae* cultivated under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 1, p. 21-31, 2016.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p.912-919, 2011.

SANTOS, F. R. S.; GARCIA, N. F. L.; DA PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production and characterization of β -glucosidase from *Gongronella butleri* by solid-state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 16, p. 633-641, 2016.

SINGH, N.; SITHOLE, B.; KUMAR, A.; GOVINDEN, R. A glucose tolerant β -glucosidase from a newly isolated *Neofusicoccum parvum* strain F7: production, purification, and characterization. **Scientific Reports**, v. 13, p. 5134-5147, 2023.