



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

RUBÉN DARÍO ROMERO PELÁEZ

**ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTIICAS DE BASIDIOMICETOS CULTIVADOS
EM BIOMASSAS VEGETAIS ORIUNDAS DA AGROINDÚSTRIA DO
DENDÊ E OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS**

GURUPI -TO

2017



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

RUBÉN DARÍO ROMERO PELÁEZ

**ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTIICAS DE BASIDIOMICETOS CULTIVADOS
EM BIOMASSAS VEGETAIS ORIUNDAS DA AGROINDÚSTRIA DO
DENDÊ E OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira,
Embrapa Agroenergia
Co-orientadora: Profa. Dra. Simone Mendonça,
Embrapa Agroenergia

GURUPI – TO

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi

Romero-Peláez, Ruben

Título: ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS DE BASIDIOMICETOS CULTIVADOS EM BIOMASSAS VEGETAIS ORIUNDAS DA AGROINDÚSTRIA DO DENDÊ E OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS / Ruben Dario Romero Pelaez - Gurupi, TO 2017. 145f.

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.

Linha de pesquisa: Microbiologia industrial.

Orientador: Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira. Co-orientadora Profa. Dra. Simone Mendonça

1. Pré-tratamento biológico. 2. cocultivos. 3. Lacases. 4. Planejamento experimental *Simplex lattice* Nome. Félix Gonçalves de Siqueira II. Universidade Federal do Tocantins. III. Título.

Bibliotecária: Emanuele Santos
CRB-2 / 1309

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

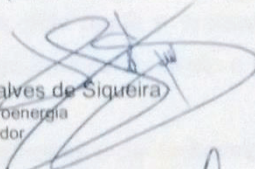
Rua Badejós, Chácaras 69 e 72 - CEP: 77402-970 - Caixa Postal 66 | Gurupi/TO
(63) 3311-3549 | www.uft.edu.br/biotecnologia | ppgbiotec@uft.edu.br

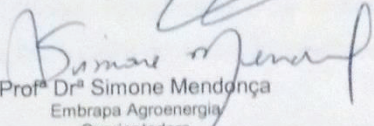


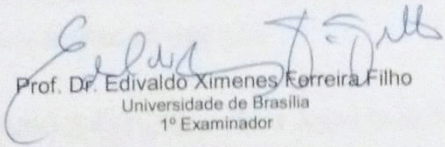
Ata de Defesa nº 32/2017

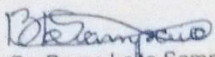
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE RÚBEN DARIO ROMERO PELÁEZ DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS.

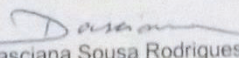
Aos 31 dias do mês de maio do ano de 2017, às 09 horas da manhã, no auditório Macaúba, Embrapa Agroenergia, Brasília - DF, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. FELIX GONÇALVES DE SIQUEIRA da Embrapa Agroenergia, Profª. Coorientadora Drª. SIMONE MENDONÇA da Embrapa Agroenergia, Prof Dr. EDIVALDO XIMENES FERREIRA FILHO da Universidade de Brasília, Dr. BRUNO LEITE SAMPAIO da Embrapa Agroenergia e Dra. DASCIANA SOUSA RODRIGUES da Embrapa Agroenergia, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de RÚBEN DARIO ROMERO PELÁEZ, intitulada "Enzimas lignocelulolíticas de basidiomicetos cultivados em biomassas vegetais oriundas da agroindústria do dendê e obtenção de açúcares fermentescíveis". Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, com as devidas correções apontadas pela banca, habilitando-o ao título de Mestre em Biotecnologia. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira
Embrapa Agroenergia
Orientador

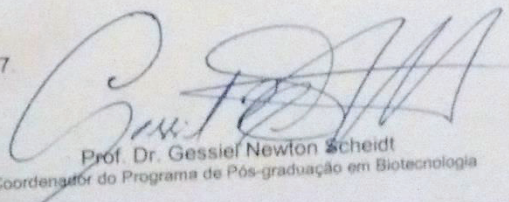

Profª Drª Simone Mendonça
Embrapa Agroenergia
Coorientadora


Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho
Universidade de Brasília
1º Examinador


Dr. Bruno Leite Sampaio
Embrapa Agroenergia
2º Examinador


Drª. Dasciana Sousa Rodrigues
Embrapa Agroenergia
3º Examinadora

Gurupi, 31 de maio de 2017.


Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

AGRADECIMENTO

Primeiramente, a minha família e amigos, por acreditarem em mim, me apoiarem nesta etapa da minha vida e me por me lembrarem, dia a dia, que eu poderia alcançar qualquer meta.

Ao professor Félix Gonçalves de Siqueira. Honestamente, jamais cessarei em agradecer profundamente pela oportunidade e por acreditar nas minhas capacidades. Pela confiança, a compreensão, os conselhos, as lições de vida, as críticas, o apoio, e sobre tudo, o incentivo a me tornar uma pessoa e um profissional melhor.

Ao grupo Macrofungos e Enzimas da Embrapa Agroenergia, especialmente a Joice, Ana Paula, Alexandra, Carla, Hetiene, Márcio e Marivane pela continua colaboração. Aos meus colegas Taisa, Maiara e Rodrigo, pela ajuda e amizade. Aos analistas Thaís, Thállyta, Felipe, Diogo e Agenor pela enorme colaboração e parceria.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins, pela oportunidade de fazer parte do curso de mestrado.

A CAPES pelo apoio financeiro, e à Embrapa Agroenergia por oferecer a estrutura necessária para o desenvolvimento da pesquisa.

À empresa DENPASA (Belém/PA) pelos resíduos vegetais de dendê.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, Dra. Simone Mendonça, Dr. Bruno Sampaio e Dra. Dasciana Rodrigues, por terem aceitado o convite.

RESUMO

Três resíduos vegetais da agroindústria do dendê foram usados como substrato para o cultivo de distintas linhagens de fungos da podridão-branca (basidiomicetos). Foram avaliados o crescimento e produção de enzimas lignocelulolíticas por fermentação em estado sólido e submerso. Os extratos enzimáticos obtidos das fermentações foram utilizados no processo de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar e cacho vazio do dendê previamente pré-tratados. Um total de 54 linhagens de macrofungos foram cultivadas em três formulações de biomassa de dendê em placas Petri, onde foram escolhidas 5 linhagens com crescimento mais rápido e denso. Estas cinco linhagens de macrofungos foram cultivadas em fermentação em estado sólido e avaliados pelas atividades enzimáticas dos extratos obtidos. Nestes extratos, houve predominância das atividades de lacase, peroxidase, manganês peroxidase e protease. Das cinco linhagens foram selecionadas três linhagens com predominância nas atividades oxidativas nos cultivos em fermentação em estado sólido, para serem avaliadas em fermentação submersa (monocultivos) usando meio sintético suplementado com biomassa vegetal do dendê. As atividades enzimáticas das três espécies de basidiomicetos foram comparadas com cinco linhagens fúngicas usadas frequentemente na literatura. Houve diferenças significativas em função das atividades oxidativas (lacase e peroxidases) e hidrolíticas (FPase e β -glicosidasas) entre as linhagens testadas. Estas diferenças foram usadas para estabelecer subgrupos, os quais foram avaliados através da interação em placa e cocultivos em fermentação submersa. As atividades enzimáticas dos extratos obtidos de monocultivos e cocultivos apresentaram diferenças com interações predominantemente positivas entre os três basidiomicetos e *T. reesei* ATCC® 60787. Os monocultivos e cocultivos foram comparados em função da liberação de glicose após da hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por auto-hidrólise. As hidrólises enzimáticas aplicando os extratos dos cocultivos obtiveram rendimento 44,7% superior quando comparadas com os monocultivos. Foi feita uma análise de misturas *simplex lattice*, usando como componentes os extratos dos monocultivos para a obtenção de um coquetel enzimático a fim de otimizar a liberação de glicose do bagaço de cana pré-tratado. Os resultados demonstraram que os extratos com maiores atividades hidrolíticas estão correlacionadas com a maior liberação de glicose, e que os extratos com enzimas oxidativas podem melhorar o rendimento,

tendo assim uma mistura ou coquetel caracterizado com enzimas hidrolíticas e oxidativas com potencial para obtenção de açúcares. Finalmente, este coquetel foi utilizado na hidrólise de cacho vazio de dendê pré-tratado fisicamente, biologicamente e biológica-fisicamente (combinado) obtendo um rendimento máximo de 11,8 g.L⁻¹ de glicose a partir de biomassa vegetal de dendê quando pré-tratada biológica-fisicamente, o que correspondeu entre 40 - 60% do rendimento do rendimento obtido quando empregadas as enzimas comerciais Cellic® Ctec3 e Cellic® Ctec2.

Palavras-chave: Pré-tratamento biológico, cocultivos, lacases, planejamento experimental *simplex lattice*

ABSTRACT

Three vegetable residues from the palm oil industry were used as substrate for cultivation of different white rot fungi strains (basidiomycetes). The growth and production of lignocellulolytic enzymes were evaluated by solid and submerged fermentation. The enzymatic extracts obtained from fermentations were used in enzymatic hydrolysis process of pretreated sugarcane bagasse and oil palm empty bunch. Fifty-four macrofungal strains were cultivated in three formulations of oil palm biomass on Petri dishes, where 5 strains with faster and dense growth were chosen. These five macrofungal strains were cultivated in solid state fermentation and evaluated by the enzymatic activities of the extracts obtained. In these extracts, activities of laccase, peroxidase, manganese peroxidase and protease were found to be predominant. Three of the five strains were selected with predominance in oxidative activities on solid state fermentation cultures to be evaluated in submerged fermentation (monocultures) using synthetic medium supplemented with oil palm biomass. The enzymatic activities of the three basidiomycetes strains were compared with five fungal strains frequently used in the literature. There were significant differences in function of the oxidative activities (laccase and peroxidases) and hydrolytic activities (PFase and β -glucosidases) among the tested strains. These differences were used to establish subgroups which were evaluated through the interaction in plates and cocultures in submerged fermentation. The enzymatic activities of the extracts obtained from monocultures and cocultures presented differences, with predominantly positive interactions between the three basidiomycetes and *T. reesei* ATCC® 60787. Monocultures and cocultures were compared as a function of the glucose release after the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis. The enzymatic hydrolysis of the coculture extracts obtained higher percentages (maximum value 44.7%) when compared to monocultures. An analysis of simplex lattice mixtures was made using the monoculture extracts as components to obtain an enzymatic cocktail in order to optimize the glucose release of the pretreated sugarcane bagasse. The results showed that extracts with higher hydrolytic activities are correlated with the higher glucose release and extracts with oxidative enzymes can improve the sugar yield, thus having a mixture or cocktail characterized by hydrolytic and oxidative enzymes with the potential to obtain sugars.

Finally, this cocktail was used in the hydrolysis of untreated, physically, biologically and biologically-physically (combined) pretreated oil palm empty bunch, obtaining a maximum yield of 11.8 gL⁻¹ of glucose in the biomass of palm oil when pretreated biological-physically, which corresponded between 40-60% of the yield of the commercial enzymes Cellic® Ctec3 and Cellic® Ctec2.

Keywords: Biological pretreatment, cocultures, laccases, simplex lattice experimental design.