

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL INDUSTRIAL DE CELULASES E  
HEMICELULASES PRODUZIDAS POR LINHAGENS MESÓFILAS ISOLADAS DO  
CERRADO SUL-MATO-GROSSENSE

FLÁVIA REGINA DA SILVA SANTOS

DOURADOS/MS  
NOVEMBRO DE 2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

FLÁVIA REGINA DA SILVA SANTOS

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL INDUSTRIAL DE CELULASES E  
HEMICELULASES PRODUZIDAS POR LINHAGENS MESÓFILAS ISOLADAS DO  
CERRADO SUL-MATO-GROSSENSE

Tese de doutorado apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia Ambiental, Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia pela Universidade Federal da Grande Dourados.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

DOURADOS/MS  
NOVEMBRO DE 2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

S237p	<p>Santos, Flávia Regina da Silva. Produção, caracterização e potencial industrial de celulases e hemicelulases produzidas por linhagens mesófilas isoladas do cerrado sul-mato-grossense. / Flávia Regina da Silva Santos. – Dourados, MS : UFGD, 2017. 82f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Enzimas microbianas. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Potencial biotecnológico. I. Título.</p>
-------	--

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**



## Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a tese intitulada: **“Produção, caracterização e potencial industrial de celulases e hemicelulases produzidas por linhagens mesófilas isoladas do cerrado sul-mato-grossense”**, de autoria de **Flávia Regina da Silva Santos**, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

*Rodrigo Simões Ribeiro Leite*

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite  
Presidente da banca examinadora

*Marcelo Fossa da Paz*

Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz  
Membro Examinador (UFGD)

*Gustavo Graciano Fonseca*

Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca  
Membro Examinador (UFGD)

*Alessandro Minillo*

Prof. Dr. Alessandro Minillo  
Membro Examinador (UEMS)

*Margareth Batistote*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Margareth Batistote  
Membro Examinador (UEMS)

Dourados/MS, 18 de outubro de 2017.

## AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos:

À DEUS por estar comigo em todos os momentos.

Aos meus PAIS por sempre me apoiarem, por todo amor e dedicação.

Aos meus amigos sinceros, estarão sempre em meu coração.

Ao meu orientador, prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, que foi ao longo desses anos muito mais que um orientador, um amigo. Obrigada por todo o conhecimento, apoio, dedicação e amizade.

A todos os colegas e amigos que passaram pelo LEPPER. À Nayara, companheira de todos esses anos, sempre disposta a ajudar e ensinar, muito obrigada. A todos os amigos, Gabi Finoto, Carol, Vinicius, Isa, Lais, Gabi Ulian, obrigada pela companhia no laboratório, as conversas e risadas, sempre estarão em meu coração.

Aos professores que sempre colaboram com nossos trabalhos: Marcelo Fossa da Paz, Gustavo Graciano Fonseca, Margareth Batistote, Alessandro Minillo, Kelly Mari Pires de Oliveira, Eliana Janet Sanjinez Argandona, Gisele Jane de Jesus.

À prof. Dra. Daniela Alonso Bocchini Martins por ter cedido espaço em seu laboratório e pela contribuição na realização desse trabalho.

À CAPES, FUNDECT e CNPq pelo apoio financeiro.

À UFGD e a coordenação do programa de pós graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, à todos os professores do programa, obrigada por todos os ensinamentos.

Enfim, obrigada a todas as pessoas que estiveram comigo nesses anos de caminhada, que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, muito obrigada!

## RESUMO

As enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas podem ser utilizadas pelas indústrias de alimentos e bebidas, têxtil, farmacêutica, biotecnológica, papel e celulose, e pela indústria de bicomcombustíveis. Essas enzimas podem ser obtidas através da Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando resíduos agroindustriais como matéria-prima de baixo custo, tornando-se uma alternativa atraente tanto pelo ponto de vista ambiental como econômico. O objetivo do trabalho foi avaliar a produção e caracterização dessas enzimas, obtidas por duas linhagens de fungos filamentosos isoladas do solo do Cerrado sul-mato-grossense, para possíveis aplicações industriais. As enzimas produzidas pelo *Penicillium* sp. apresentaram melhores atividades quando cultivadas em farelo de trigo: a melhor produção de xilanase foi em cultivo contendo 60% de umidade inicial a 25°C após 72 horas (1.094,8 U/g), a melhor atividade de CMCase foi em 55% de umidade inicial a 30°C após 96 e 120 horas (213,4 U/g) e a melhor atividade de  $\beta$ -glicosidase foi em 55% a 35°C após 144 horas de cultivo (69,4 U/g). As enzimas apresentaram pH ótimo de 4,0 - 4,5 e temperatura ótima de 55°C (xilanase) e 65°C (CMCase e  $\beta$ -glicosidase), apresentaram ampla faixa de estabilidade térmica e estabilidade ao pH. A  $\beta$ -glicosidase teve sua atividade catalítica aumentada quando exposta a 10% de etanol e a inibição por glicose foi revertida. Em 48 horas, cerca de 3,7% da celulose contida no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com glicerol foi convertida em glicose, enquanto que na hidrólise do bagaço *in natura*, nas mesmas condições, somente 0,7%. A xilanase produzida por *Gongronella butleri* apresentou melhor atividade enzimática em cultivos contendo farelo de trigo com 60% de umidade inicial a 25°C por 96 horas de cultivo (4.303,96 U/g). A enzima apresentou pH ótimo 4,0 e temperatura ótima a 50°C, e apresentou estabilidade quanto ao pH (3,0 - 10,0) e temperatura (25 - 50°C). Apresentou 60% da atividade original quando incubada em 10% de etanol. Análises em cromatografia em camada delgada (sílica gel P60) revelaram a liberação predominantemente de monossacarídeos (xilose), caracterizando a ocorrência de hidrólise total do substrato. É possível concluir, que essas enzimas apresentaram potencial para aplicações em processos industriais, principalmente na sacarificação do bagaço da cana-de-açúcar, visando à obtenção de açúcares fermentescíveis e em processos de branqueamento de polpa de celulose. Pode-se considerar ainda, a descrição de uma linhagem (*G. butleri*) ainda pouco estudada, com potencial para produção de enzimas de interesse industrial.

**Palavras-chave:** Enzimas microbianas, resíduos agroindustriais, potencial biotecnológico.

## ABSTRACT

Cellulolytic and hemicellulolytic enzymes can be used by the food and beverage, textile, pharmaceutical, biotechnology, paper and cellulose industries, and by the biofuels industry. These enzymes can be obtained through Solid State Fermentation (SSF) using agroindustrial waste as a low cost raw material, making it an attractive alternative both from an environmental and an economic point of view. The objective of this work was to evaluate the production and characterization of these enzymes, obtained by two filamentous fungi strains isolated from the soil of the Cerrado sul-mato-grossense, for possible industrial applications. The enzymes produced by *Penicillium* sp. presented the best activities when grown in wheat bran: the best xylanase production was in a culture containing 60% initial moisture at 25°C after 72 hours (1,094.8 U/g), the best CMCase activity was at 55% initial moisture at 30°C after 96 and 120 hours (213.4 U/g) and the best  $\beta$ -glucosidase activity was 55% at 35°C after 144 hours of culture (69.4 U/g). The enzymes presented optimum pH of 4.0 - 4.5 and optimum temperature of 55°C (xylanase) and 65°C (CMCase and  $\beta$ -glucosidase), presented a wide range of thermal stability and pH stability.  $\beta$ -glucosidase had its catalytic activity increased when exposed to 10% ethanol and inhibition by glucose was reversed. In 48 hours, about 3.7% of the cellulose contained in the sugarcane bagasse pretreated with glycerol was converted to glucose, while in the hydrolysis of the bagasse in the same conditions, only 0.7%. The xylanase produced by *Gongronella butleri* presented better enzymatic activity in cultures containing wheat bran with 60% initial moisture at 25°C for 96 hours of culture (4,303.96 U/g). The enzyme presented optimum pH 4.0 and optimum temperature at 50°C, and showed stability to pH (3.0 - 10.0) and temperature (25 - 50°C). It presented 60% of the original activity when incubated in 10% ethanol. Analyzes in thin layer chromatography (silica gel P60) revealed the predominance of monosaccharides (xylose), characterizing the occurrence of total hydrolysis of the substrate. It is possible to conclude that these enzymes presented potential for applications in industrial processes, especially saccharification of sugarcane bagasse, in order to obtain fermentable sugars and in pulp bleaching processes. We can also consider the description of a lineage (*G. butleri*) that has not yet been studied, with potential for the production of enzymes of industrial interest.

**Keywords:** Microbial enzymes, agroindustrial residues, biotechnological potential.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1	Representação da fibra de celulose e seus componentes, celulose, microfibrilas, hemicelulose e lignina (Adaptado por GRAMINHA et al., 2008).....	16
Figura 2	Polímero de celulose (SANDGREN et al., 2005).....	16
Figura 3	Estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e amorfas (FARINAS, 2011).....	17
Figura 4	Representação dos monossacarídeos constituintes das hemiceluloses: (1) D-glicose; (2) D-galactose; (3) L-arabinose; (4) D-xilose; (5) D-manose; (6) 4-O-metil-D-glucurônico; (7) L-ramnose (SJÖSTRÖM; WESTERMARK, 1999).....	18
Figura 5	Representação da lignina (Adaptado de GRAMINHA et al., 2008).....	19
Figura 6	Sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e $\beta$ -glicosidase na degradação da estrutura da celulose (FARINAS, 2011).....	20
Figura 7	Esquema da estrutura hipotética da xilana e as enzimas envolvidas em sua degradação (COLLINS et al., 2005).....	23

### CAPÍTULO II

Figura 1	Árvore filogenética demonstrando as relações filogenéticas entre a sequência parcial do gene da $\beta$ -tubulina da amostra CPQBA 1279/16 DRM-01 e sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e Genbank.....	44
Figura 2	Produção de (A) xilanase, (B) CMCase e (C) $\beta$ -glicosidase por Fermentação em Estado Sólido em farelo de trigo, em função da temperatura, contendo 60% de umidade inicial por 96 horas de cultivo pelo fungo <i>Penicillium</i> sp.....	46
Figura 3	Produção de (A) xilanase, (B) CMCase e (C) $\beta$ -glicosidase por Fermentação em Estado Sólido em farelo de trigo, em função da umidade inicial do meio, por 96 horas de cultivo pelo fungo <i>Penicillium</i> sp.....	47



Figura 4	Produção de (A) xilanase, (B) CMCCase e (C) $\beta$ -glicosidase por Fermentação em Estado Sólido em farelo de trigo em função do tempo de cultivo pelo fungo <i>Penicillium</i> sp. (A) 25°C em 60% de umidade, (B) 35°C em 55% de umidade e (C) 30°C em 55% de umidade.....	48
Figura 5	Efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática. (A) pH ótimo das enzimas. (B) Temperatura ótima das enzimas. (C) pH de estabilidade das enzimas após 24 horas de incubação a 25°C. (D) Estabilidade enzimática em função da temperatura após 1 hora de incubação.....	52
Figura 6	Efeito de etanol sobre a atividade das enzimas a 55°C.....	53
Figura 7	(A) Efeito da concentração de glicose sobre a atividade da $\beta$ -glicosidase. (B) Reversão da inibição à glicose demonstrada pela equação de Lineweaver-Burk.....	54
Figura 8	Rendimento em glicose após sacarificação enzimática do bagaço da cana-de-açúcar (A) Em relação ao tempo. (B) Utilizando bagaço <i>in natura</i> e pré-tratado com glicerol após 48 horas.....	56

### CAPITULO III

Figura 1	Produção de xilanase pelo fungo <i>Gongronellabutleri</i> em farelo de trigo por FES após 96 horas de cultivo. (A) Influência da umidade inicial do meio. (B) Influência da temperatura de cultivo. (C) Em relação ao tempo de cultivo.....	72
Figura 2	Efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática. (A) pH ótimo de atividade (B) Temperatura ótima de atividade. (C) pH de estabilidade da enzima após 24 horas de incubação a 25°C. (D) Estabilidade enzimática em função da temperatura após 1 hora de incubação. (E) Tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) em 50°C.....	75
Figura 3	Cromatografia em Sílica Gel P60 do produto de hidrólise da xilana da por ação da xilanase do fungo <i>Gongronella butleri</i> . 1- xilose; 2- xilana, 3- 10 minutos; 4 -20 minutos. 1 e 2 foram utilizados como padrões.....	77
Figura 4	Efeito de etanol sobre a atividade da enzima a 50°C.....	78

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO II

Tabela 1	Produção de xilanase, CMCCase e $\beta$ -glicosidase pelo fungo <i>Penicillium</i> sp. em diferentes substratos por Fermentação em Estado Sólido, contendo 60% de umidade inicial, temperatura de 28°C por 96 horas de cultivo.....	45
Tabela 2	Produção de xilanase, CMCCase e $\beta$ -glicosidase por diferentes microrganismos em Fermentação em Estado Sólido utilizando farelo de trigo como substrato.....	49

### CAPITULO III

Tabela 1	Produção de xilanase por <i>Gongronella butleri</i> em diferentes substratos por FES, contendo 60% de umidade inicial, temperatura de 28°C por 96 horas de cultivo.....	71
Tabela 2	Produção de xilanase por diferentes microrganismos em FES utilizando farelo de trigo como substrato.....	73
Tabela 3	Potencial catalítico do extrato enzimático produzido por <i>Gongronella butleri</i> .....	76

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
CAPITULO I.....	14
1. REVISÃO.....	14
1.1. TECNOLOGIA ENZIMÁTICA.....	14
1.2. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	14
1.3. ESTRUTURA E COMPONENTES DA PAREDE CELULAR VEGETAL.....	15
1.3.1. CELULOSE.....	15
1.3.2. HEMICELULOSE.....	17
1.3.3. LIGNINA.....	18
1.4. ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL.....	20
1.4.1. ENZIMAS CELULOLÍTICAS.....	20
1.4.1.1. <i>Endoglucanase</i> .....	21
1.4.1.2. <i>Exoglucanase</i> .....	21
1.4.1.3. <i>β-glicosidase</i> .....	22
1.4.2. ENZIMAS HEMICELULOLÍTICAS.....	22
1.5. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES) NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS.....	23
1.6. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS CELULASES E XILANASES.....	24
1.7. PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	27
2. REFERÊNCIAS.....	28
CAPITULO II.....	35
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES PRODUZIDAS POR <i>Penicillium</i> sp. PARA APLICAÇÃO EM SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	35
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. METODOLOGIA.....	39
2.1. Microrganismo utilizado.....	39
2.2. Identificação do microrganismo.....	39
2.3. Produção de celulasas e hemicelulasas por Fermentação em Estado Sólido (FES).....	40
2.3.1. <i>Inóculo</i> .....	40
2.3.2. <i>Fermentação em Estado Sólido (FES)</i> .....	40
2.3.3. <i>Extração das enzimas</i> .....	40
2.4. Determinação da atividade enzimática.....	41
2.4.1. <i>Xilanase</i> .....	41
2.4.2. <i>CMCase</i> .....	41
2.4.3. <i>β-glicosidase</i> .....	41
2.5. Caracterização físico-química.....	42
2.5.1. <i>Efeito do pH e temperatura</i> .....	42
2.5.2. <i>Efeito de etanol e glicose</i> .....	42

2.6. Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratamentocom micro-ondas e glicerol.....	42
2.7. Sacarificação enzimática do bagaço de cana.....	43
2.8. Análise estatística.....	43
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
3.1. Identificação do microrganismo.....	43
3.2. Produção de celulasas e hemicelulasas por Fermentação em Estado Sólido (FES).....	45
3.3. Efeito de pH e temperatura sobre as atividades enzimáticas.....	49
3.4. Efeito de etanol sobre a atividade das enzimas.....	52
3.5. Efeito de glicose sobre a atividade da $\beta$ -glicosidase.....	54
3.6. Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.....	55
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>5. REFERENCIAS.....</b>	<b>57</b>
<b>CAPITULO III</b>	<b>64</b>
<b>XILANASE DE <i>Gongronella butleri</i>: PRODUÇÃO, PROPRIEDADES CATALÍTICAS E POTENCIAL INDUSTRIAL</b>	<b>64</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>64</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>65</b>
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>2. METODOLOGIA.....</b>	<b>67</b>
2.1. Microrganismo utilizado.....	67
2.2. Produção de xilanase por Fermentação em Estado Sólido (FES).....	67
2.2.1. Inóculo.....	67
2.2.2. Fermentação em Estado Sólido (FES).....	68
2.2.3. Extração da enzima.....	68
2.3. Determinação da atividade de xilanase.....	68
2.4. Efeito do pH e temperatura.....	69
2.5. Potencial catalítico do extrato enzimático .....	69
2.6. Cromatografia em Camada Delgada Sílica-Gel P60.....	70
2.7. Efeito de etanol.....	70
2.8. Análise estatística.....	70
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
3.1. Produção de xilanase por Fermentação em Estado Sólido (FES).....	70
3.2. Caracterização físico-química da xilanase.....	73
3.2.1. Efeito do pH e temperatura.....	73
3.3. Potencial catalítico do extrato enzimático.....	76
3.4. Efeito de etanol sobre a atividade da enzima.....	77
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>5. REFERENCIAS.....</b>	<b>79</b>

## INTRODUÇÃO

A Fermentação em Estado Sólido (FES) é considerada um método atraente para a produção de enzimas microbianas, especialmente por apresentar vantagens, como boa produtividade e menor custo de operação, além de reduzir problemas ambientais, pois os resíduos agroindustriais utilizados nesse processo podem ficar acumulados no meio ambiente sem a destinação correta (PANDEY, 2003; DHILLON et al., 2012; RANI; GHOSH 2011).

A estrutura da parede celular vegetal é representada principalmente pelas interações físicas e químicas da celulose, um polímero constituído por cadeias lineares de glicose formada por uma estrutura cristalina e amorfa; pela hemicelulose, um polissacárido ramificado que contém resíduos de açúcar, tais como xilose, manose, galactose, glicose, arabinose e ácidos urônicos; e a lignina, polímero amorfo constituído por derivados aromáticos (GOTTSCHALK, et al., 2010; CHEN et al., 2012).

A hidrólise eficiente de celulose requer a ação cooperativa de endoglucanases (EC. 3.2.1.4) que hidrolisam a celulose internamente, expondo extremidades redutoras e não-redutoras, exoglucanases (EC. 3.2.1.91) que atuam nas extremidades redutoras e não-redutoras, liberando celobiose e celo-oligossacarídeos; e as  $\beta$ -glicosidasas (EC. 3.2.1.21), que finalizam o processo, hidrolisando oligossacarídeos solúveis em glicose (GOTTSCHALK et al., 2010; NARRA et al., 2012).

A xilana representa a principal classe das hemiceluloses, não possui regiões cristalinas e apresenta baixo grau de polimerização. Apesar disso, é necessário um sistema de enzimas específicas para degradação completa, dada a sua composição variável e ramificada (SHALLOM; SHOHAM, 2003; ADHYARU et al., 2014). A hidrólise enzimática da cadeia principal da hemicelulose envolve a ação de pelo menos dois grupos de enzimas: endo 1,4- $\beta$ -D-xilanases (EC 3.2.1.8) e  $\beta$ -D-xilosidase (EC 3.2.1.37). As ramificações da cadeia são hidrolisadas pelas enzimas auxiliares, como  $\alpha$ -D-glucuronidase (EC 3.2.1.131) e acetil-xilana-esterase (EC 3.1.1.72), entre outras (LAOTHANACHAREON et al., 2015).

Essas enzimas desempenham papel fundamental na conversão eficiente da biomassa lignocelulósica na obtenção de açúcares fermentescíveis para produção viável de bioetanol (DHILLON et al., 2012), para isso é necessário o desarranjo da parede celular vegetal (ZHANG et al., 2016). A lignina e hemicelulose atuam como barreiras físicas para ação das celulases, além da estrutura da celulose apresentar elevado grau de polimerização e cristalinidade, tornando-a resistente à degradação (HUANG et al., 2015). Dessa forma, o pré-

tratamento da biomassa com agentes físicos e químicos anteriormente a hidrólise enzimática é essencial para a eficiente ação enzimática (PEREIRA et al., 2015).

O principal interesse nas celulases está na possibilidade de conversão da biomassa lignocelulósica em etanol (NARRA et al., 2012), mas dentre outras aplicações, pode-se destacar, a clarificação de sucos de frutas e vinhos; processos de biopolimento e bioestonagem; em aditivos para ração animal e em processos na indústria de polpa e papel (CASTRO; PEREIRA JR, 2010). A principal aplicação das xilanases está no biobranqueamento da polpa, pela indústria de papel e celulose, além da conversão de materiais lignocelulósicos em produtos químicos e biocombustíveis; na panificação, melhorando o volume da massa e na elaboração de ração animal, a fim de aumentar a digestibilidade (SHEN et al., 2011; XIN, HE, 2013).

O trabalho visou determinar os parâmetros fermentativos para a produção de celulases e hemicelulases em FES por dois fungos filamentosos mesófilos isolados do solo do Cerrado sul-mato-grossense, variando alguns parâmetros de cultivo, como diferentes substratos, umidade, temperatura e tempo de cultivo. As enzimas foram caracterizadas quanto ao pH e temperatura, tolerância ao etanol e inibição pela glicose. O extrato enzimático produzido pelo *Penicillium sp.* foi usado para sacarificação com o bagaço de cana *in natura* e pré-tratado com glicerol. O produto de hidrólise da xilana produzida por *Gongronella butleri* foi verificado por cromatografia em camada delgada.

## **1. REVISÃO**

### **1.1. TECNOLOGIA ENZIMÁTICA**

As alterações climáticas e as reservas limitadas de combustíveis fósseis estimulam o interesse em encontrar fontes alternativas de energia, o que só será possível com o melhor aproveitamento dos polissacarídeos que constituem a biomassa vegetal. A biomassa lignocelulósica, rica em celulose, é uma fonte potencial para produção de biocombustíveis e produtos químicos de valor agregado (XU et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016).

A biotecnologia permitiu à indústria desenvolver processos industriais com uma tecnologia mais limpa a um custo reduzido, utilizando menos energia e diminuindo o impacto ambiental, sendo mais vantajosos em relação aos processos químicos convencionais, que demandam utilização de produtos químicos e geram resíduos de difícil tratamento. As enzimas podem ser caracterizadas e utilizadas em processos industriais específicos, se necessário podem ser aperfeiçoadas com técnicas de biotecnologia para melhorar as propriedades catalíticas e serem mais compatíveis com os processos industriais existentes (ERICKSON et al., 2012).

As características que as enzimas apresentam potencializam suas aplicações em diversos processos industriais e agregam valor sobre a área da biotecnologia, além de estimular a exploração da biodiversidade microbiana, com o isolamento e seleção de novas cepas produtoras de enzimas e no desenvolvimento de complexos enzimáticos eficientes para a hidrólise de polímeros de origem vegetal (BARATTO et al., 2011).

As enzimas microbianas podem ser produzidas em grandes quantidades por Fermentação em Estado Sólido (FES). Para melhor produtividade enzimática, esse processo pode ser otimizado variando alguns fatores como temperatura, umidade e tempo. O aumento da produtividade e a redução dos custos da produção são cruciais para aplicações industriais futuras (GAUTAM et al., 2011).

### **1.2. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**

Os materiais lignocelulósicos são os biopolímeros mais abundantes encontrados na Terra (DOGARIS et al., 2013). A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por celulose (40-60%), hemicelulose (20-30%) e lignina (15-30%) (ASHA et al., 2016).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos para a produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos. No entanto, o principal fator limitante está relacionado com a composição e estrutura complexa da biomassa lignocelulósica. De maneira geral, a celulose está presente em maior quantidade, seguida da hemicelulose e lignina (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; DOGARIS et al., 2013). A proporção entre os componentes da parede celular depende da espécie vegetal e varia de camada para camada (CARVALHO et al., 2009).

### **1.3. ESTRUTURA E COMPONENTES DA PAREDE CELULAR VEGETAL**

A célula vegetal apresenta uma fina, porém resistente parede celular, dividida em parede primária e parede secundária. É formada por diversos polissacarídeos e outros compostos secretados pela célula, sendo formados e unidos através de ligações covalentes e não covalentes. A distribuição de celulose, hemicelulose e lignina varia entre as camadas (TAIZ; ZIEGER, 2004).

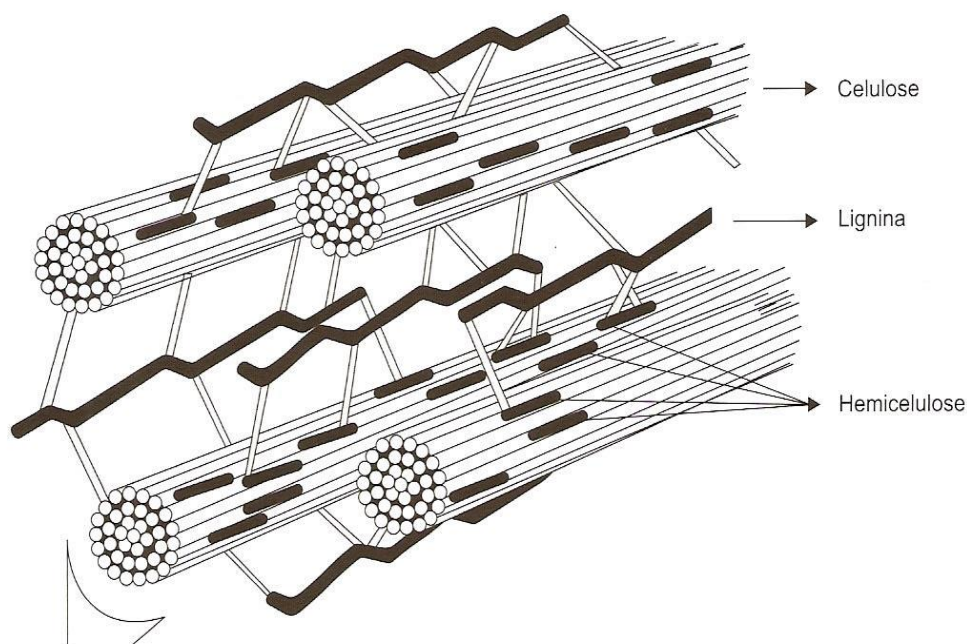
A parede primária é depositada durante o crescimento celular, ela deve ser mecanicamente estável e satisfatoriamente flexível para permitir a expansão das células e não ocorrer ruptura, consiste principalmente de celulose, hemicelulose e pectina. Após cessar o crescimento celular, inicia-se o processo de diferenciação celular, com início da formação da parede secundária, que confere estabilidade mecânica à planta, apresentando celulose, hemicelulose e lignina. A transição da parede celular primária para a formação da parede celular secundária é caracterizada pela diminuição da síntese de pectina e um grande aumento na síntese de celulose, hemicelulose e lignina (TAIZ; ZIEGER, 2004; RAVEN et al., 2001).

A complexidade dos componentes da parede celular vegetal a torna resistente ao ataque químico e bioquímico, dificultando o acesso das várias enzimas envolvidas em sua degradação, por isso o entendimento da sua estrutura e como agem essas enzimas é fundamental para a viabilização do uso da biomassa vegetal como fonte de energia renovável (CHEN et al., 2010).

#### **1.3.1. CELULOSE**

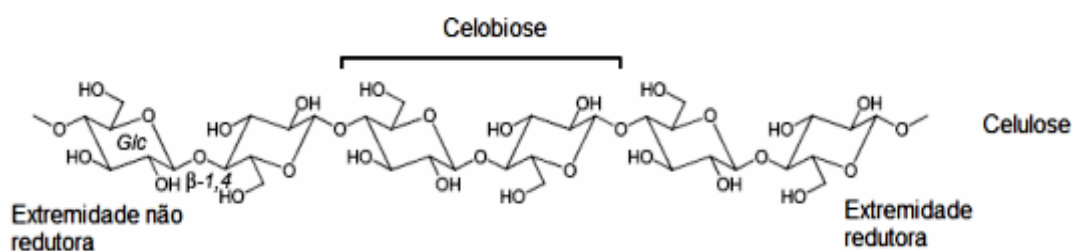
Dentre os materiais naturais, a celulose é o polissacarídeo lignocelulósico mais abundante na biosfera e o principal constituinte da biomassa vegetal (BALAT 2011), sua estrutura está ligada à hemicelulose e à lignina (Figura 1) (COLLINS et al., 2005).





**Figura 1** - Representação da fibra de celulose e seus componentes, celulose, microfibrilas, hemicelulose e lignina (Adaptado por GRAMINHA et al., 2008).

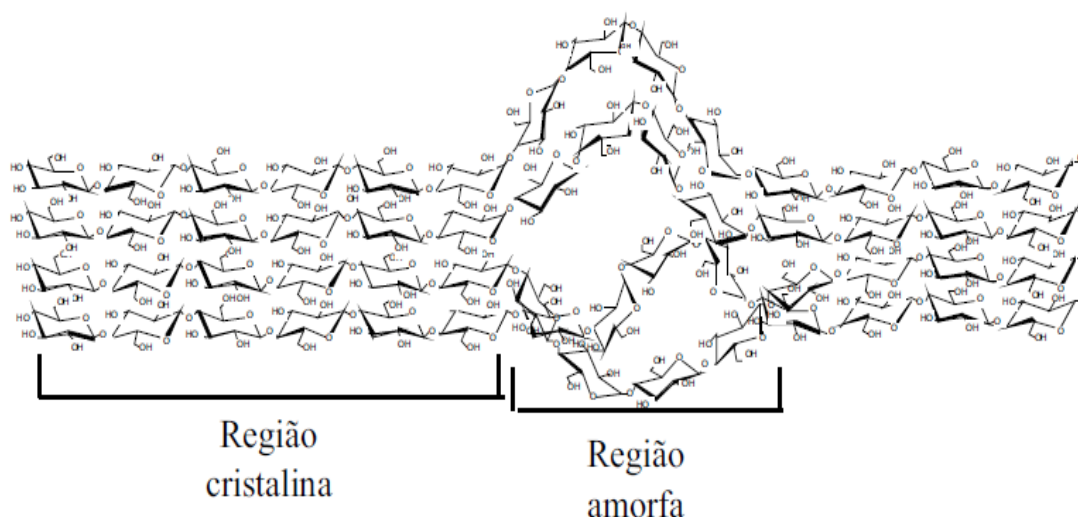
A celulose é um homopolissacarídeo linear constituído por moléculas de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Duas unidades de glicose adjacentes formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água. A celobiose é um dissacarídeo composto por duas moléculas de glicose (Figura 2) (DOGARIS et al., 2013).



**Figura 2** - Polímero de celulose (SANDGREN et al., 2005)

As cadeias de celulose são agrupadas para formar microfibrilas, que são agrupadas para formar fibras de celulose. As microfibrilas de celulose são na sua maioria independentes, mas a ultraestrutura da celulose é em grande parte devido à presença de ligações covalentes, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. A ligação de hidrogênio dentro de uma microfibrilha de celulose determina a "retidão" da cadeia, mas as ligações de hidrogênio entre

cadeias podem introduzir ordem ou desordem na estrutura da celulose. Na região cristalina as fibras se encontram ordenadas, apresentando alto grau de cristalinidade e na região amorfa as fibras estão mais distantes entre si, apresentando-se menos compactadas, como visto na figura 3 (AGBOR et al., 2011).



**Figura 3** - Estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e amorfas (FARINAS, 2011).

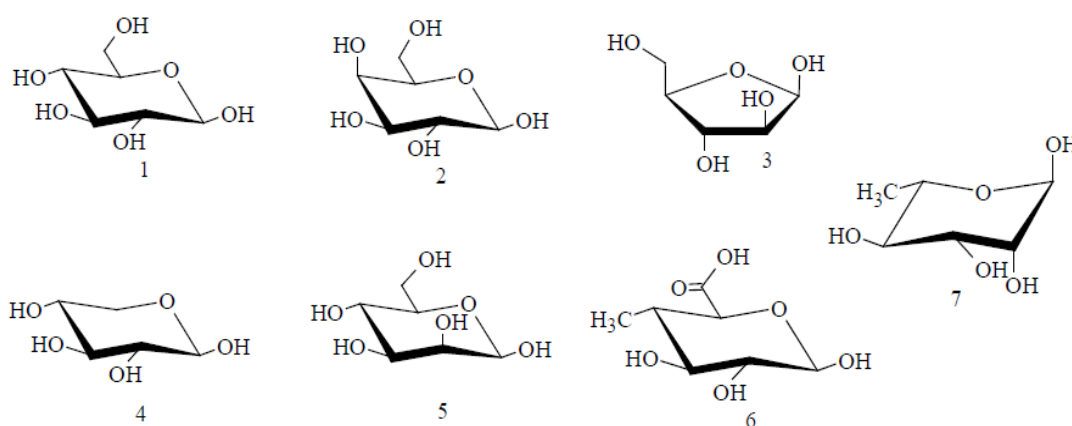
A natureza cristalina da celulose implica uma ordem estrutural na qual todos os átomos são altamente ordenados e o empacotamento das cadeias impede não só a penetração por enzimas, mas também de moléculas pequenas, como água, para o interior da microfibrila. A celulose cristalina confere rigidez à parede celular vegetal, dificultando sua degradação por microrganismos. Nas regiões não cristalinas a água e enzimas têm maior acesso, sendo mais facilmente hidrolisada, e primeiramente atacada e degradada. Além de regiões amorfas, as fibras de celulose apresentam irregularidades, falhas e microporos que aumentam a superfície de contato da celulose com outras moléculas, como a água e enzimas (LYND et al., 2002).

### 1.3.2. HEMICELULOSE

O principal constituinte da hemicelulose é a xilana, um heteropolissacarídeo cuja cadeia principal é formada por resíduos de xilose unidos por ligações  $\beta$ -(1,4) contendo ramificações laterais de pentoses (D-xilose e D-arabinose), hexoses (D-manose, D-glucose e D-galactose) e por seus ácidos urônicos, como visto na figura 4 (DOGARIS et al., 2013; COSTA et al., 2016). Em geral, a qualidade e a quantidade de açúcares presentes nas

hemiceluloses dependem do tipo de parede celular e varia de espécie para espécie (POLIZELI et al., 2005).

A estrutura da hemicelulose é linear, semelhante à da celulose, porém, devido à variedade de açúcares nas ramificações, no qual impede a formação de grandes regiões cristalinas, e seu baixo grau de polimerização, a torna mais suscetível à hidrólise. Apesar disso, é necessário um sistema de enzimas específicas para degradação completa dada a sua estrutura variável e ramificada (SHALLOM; SHOHAM, 2003; JOVANOVIC et al., 2009).



**Figura 4** - Representação dos monossacarídeos constituintes das hemiceluloses: (1) D-glicose; (2) D-galactose; (3) L-arabinose; (4) D-xilose; (5) D-manose; (6) 4-O-metil-D-glucurônico; (7) L-ramnose (SJÖSTRÖM; WESTERMARK, 1999).

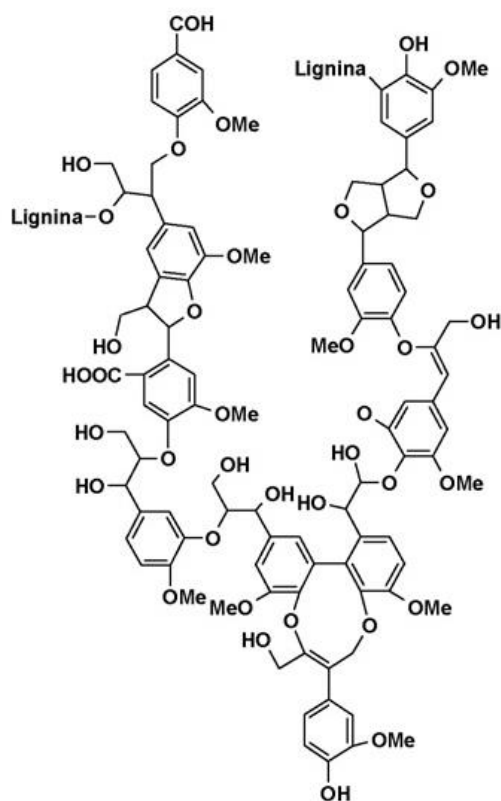
Na parede celular a xilana está intimamente relacionada com a celulose, revestindo as microfibrilas e dificultando a ação das celulases, além de ser covalentemente ligada à lignina. Deste modo, a xilana é importante na conexão entre celulose e lignina (COLLINS et al., 2005).

### 1.3.3. LIGNINA

A lignina é um polímero aromático complexo, diferente da celulose e da hemicelulose que formam cadeia, o mecanismo de polimerização da lignina resulta em uma rede tridimensional complexa de compostos aromáticos que envolvem os outros componentes da parede celular, como visto na figura 5. O papel principal da lignina é proteger a celulose contra a ação de enzimas produzidas por microrganismos patogênicos e saprófitos. A remoção da lignina representa um passo fundamental para a utilização industrial da biomassa. É o

componente mais recalcitrante da parede celular da planta, e quanto maior a proporção de lignina, maior a resistência à degradação química e enzimática (RUIZ-DUEÑAS; MARTÍNEZ, 2009; DOGARIS et al., 2013).

Na parede celular da planta a lignina se concentra na lamela média, sua camada mais externa atua como agente de fixação entre as fibras. Embora em menor concentração do que a celulose e hemicelulose, a lignina também está presente na parede secundária, a camada de parede celular mais espessa, onde está intimamente associada à carboidratos, atribuindo limitação suficiente para retardar ou evitar completamente a ação enzimática, dificultando a hidrólise do material lignocelulósico (RUIZ-DUEÑAS; MARTÍNEZ, 2009; CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

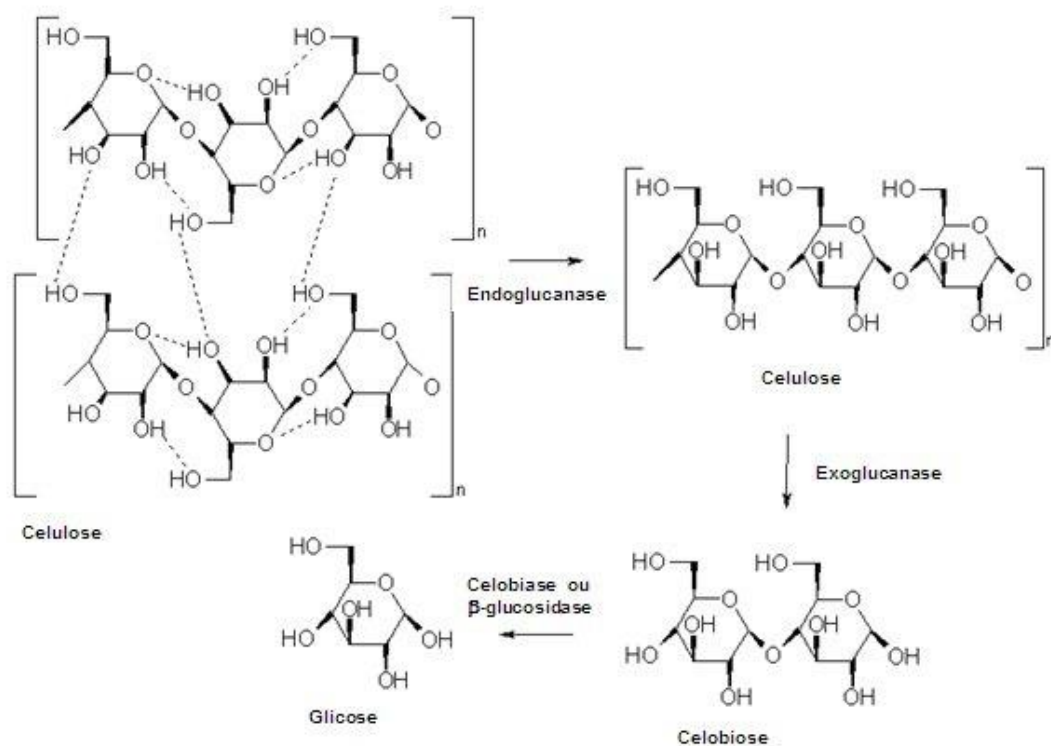


**Figura 5** - Representação da lignina (Adaptado por GRAMINHA et al., 2008).

## 1.4. ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL

### 1.4.1. ENZIMAS CELULOLÍTICAS

As celulases são as enzimas responsáveis pela hidrólise dos materiais celulósicos. Para liberação de açúcares fermentescíveis a partir da celulose é necessário um sistema enzimático celulolítico que consiste em pelo menos três grandes grupos de enzimas: a endoglucanase (EC 3.2.1.4) hidrolisa as cadeias de celulose internamente, principalmente nas regiões amorfas, resultando em uma rápida redução grau de polimerização da cadeia, a exoglucanase (EC 3.2.1.91) hidrolisa ligações glicosídicas nas extremidades da cadeia, liberando dímeros de glicose (celbiose) e a  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) tem propriedade de hidrolisar celbiose e oligossacarídeos solúveis a glicose (CASTRO et al., 2010; ASHA et al 2016). As endoglucanases disponibilizam extremidades de cadeia livres na superfície da celulose para as exoglucanases atuarem (VIAKARI et al., 2012). O processo de hidrólise acontece simultaneamente, como ilustrado na figura 6.



**Figura 6** - Sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glucosidase na degradação da estrutura da celulose (FARINAS, 2011).

A hidrólise primária que ocorre na superfície de substratos sólidos libera açúcares solúveis para a fase líquida por hidrólise pelas endoglucanases e exoglucanases. A etapa de despolimerização enzimática realizada pelas endoglucanases e exoglucanases é o passo limitante da taxa para todo o processo de hidrólise da celulose. A hidrólise secundária que ocorre na fase líquida envolve principalmente a hidrólise da celobiose em glicose por  $\beta$ -glicosidases, embora algumas  $\beta$ -glicosidases também hidrolisem celodextrinas. As ações combinadas de endoglucanases e exoglucanases modificam as características superficiais da celulose ao longo do tempo, resultando em rápidas mudanças nas taxas de hidrólise (ZHANG et al., 2006).

*1.4.1.1. Endoglucanase:* As endoglucanases ou endo- $\beta$ -1,4-glucanases são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose. Elas hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, clivando ligações  $\beta$ -(1,4) na região central da molécula, liberando açúcares e oligossacarídeos e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor. Resulta em uma rápida redução no tamanho da cadeia ou grau de polimerização, devido à sua fragmentação em oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (ZHANG et al., 2006; YENNAMALLI et al., 2013).

*1.4.1.2. Exoglucanase:* O grupo das exoglucanases é constituído por celobiohidrolase (CBH) e glucano-hidrolase (GH). A 1,4- $\beta$ -D-glucano-glucano-hidrolase (GH) (EC 3.2.1.74), é capaz de liberar glicose diretamente do polímero. Embora a IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) defina a 1,4- $\beta$ -D-glucano-celobio-hidrolase (CBH) (EC 3.2.1.91) como catalisadora da hidrólise apenas dos terminais não-redutores da fibra celulósica e oligossacarídeos com grau de polimerização maior que 3 em celobiose, há relatos do ataque de terminais redutores por essa enzima. As CBHs participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, um fenômeno ainda não esclarecido completamente. Entretanto, sabe-se que envolve uma ruptura física do substrato, causando desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulasas. As celobiohidrolases podem ser de dois tipos: a tipo I, que hidrolisa terminais redutores, e as do tipo II, que hidrolisa terminais não redutores. Elas sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose, por isso é de grande importância a

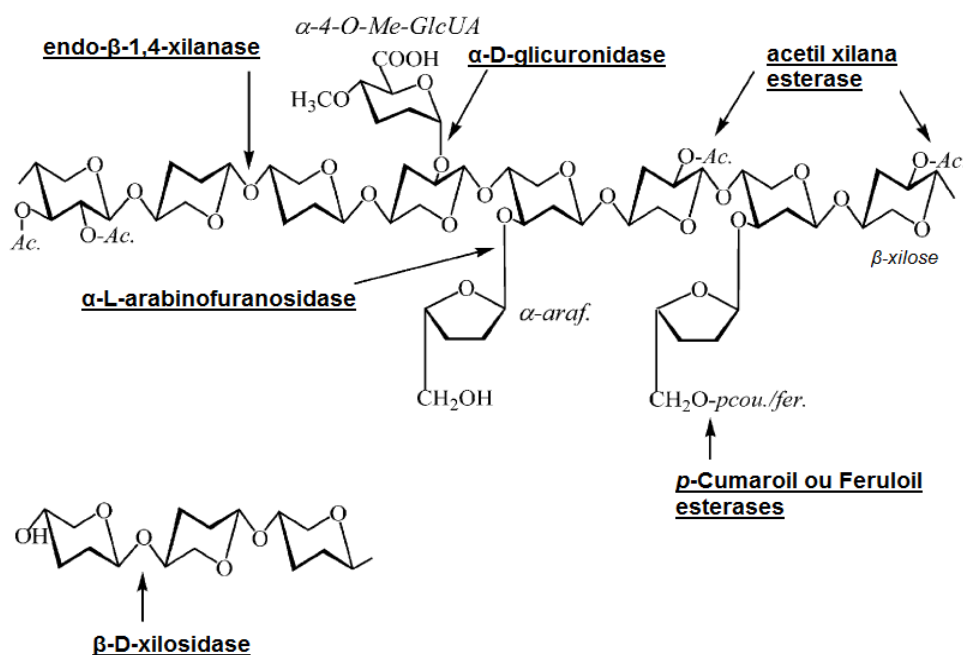
atuação de outra enzima do complexo celulolítico, a  $\beta$ -glicosidade (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

*1.4.1.3.  $\beta$ -glicosidase:* as  $\beta$ -glicosidases finalizam a hidrólise, convertendo a celobiose em glicose. Tem a capacidade de aumentar o rendimento global de açúcares fermentáveis, enquanto reduz o efeito inibidor da celobiose sobre outras enzimas celulolíticas, promovendo a continuidade do processo de hidrólise enzimática (SANTOS et al., 2016).

## 1.4.2. ENZIMAS HEMICELULOLÍTICAS

A hidrólise enzimática da hemicelulose ocorre pela ação sinérgica de diversas endoenzimas, exoenzimas e enzimas auxiliares para convertê-la em unidades de xilose. A hidrólise da cadeia principal da xilana envolve a ação de pelo menos dois grupos de enzimas, endo 1,4- $\beta$ -D-xilanases (EC 3.2.1.8) e  $\beta$ -D-xilosidase (EC 3.2.1.37). As endoxilanases clivam ligações glicosídicas internas da cadeia principal da xilana, acarretando diminuição do grau de polimerização do substrato, produzindo xilooligômeros e xilobiose. Os xilooligômeros e xilobiose produzidos pela ação das endoxilanases são hidrolisados por  $\beta$ -xilosidases que liberam xilose (SAKTHISELVAN et al., 2014).

As cadeias laterais presentes na xilana são liberadas por  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), removendo ramificações de L-arabinose presentes em arabinoxilanas e glicuronoarabinoxilanas;  $\alpha$ -D-glucuronidases (EC 3.2.1.139) hidrolisam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,2) entre o ácido glucurônico ou ácido metil-glucurônico e resíduos de xilose em glucuronoxilano; acetil-xilana esterases (EC 3.1.1.72) que hidrolisam grupos acetil presentes em acetilxilanas, e os ácidos fenólicos esterases: o ácido ferrúlico esterase (3.1.1.73) e o ácido *p*-coumárico esterase (EC 3.1.1) que clivam na xilana as ligações ester entre resíduos de cadeia lateral de arabinose e ácido ferrúlico ou ácido *p*-coumárico, respectivamente (CAUFRIER et al., 2003; COLLINS et al., 2005; POLIZELI et al., 2005). O sinérgismo entre as enzimas xilanolíticas aumenta a susceptibilidade do polímero de xilana ao ataque enzimático (DE VRIES; VISSER, 2001), ilustrado na figura 7.



**Figura 7** - Esquema da estrutura hipotética da xilana e as enzimas envolvidas em sua degradação (COLLINS et al., 2005).

## 1.5. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES) NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS

Os resíduos agroindustriais representam uma importante fonte alternativa para produção de enzimas microbianas (SIQUEIRA et al., 2010). É crescente o interesse pela utilização de resíduos agrícolas para obtenção sustentável de combustíveis renováveis, como o etanol celulósico (RODRIGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011). No entanto, a produção de etanol de segunda geração em escala comercial é atualmente limitada pelo alto custo das celuloses (SIQUEIRA et al., 2010). Nesse sentido, os custos das celuloses podem ser reduzidos por meio de melhoramento genético dos microrganismos e do uso de resíduos como matéria-prima de baixo custo (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; MAEDA et al., 2011).

O processo de fermentação para a produção de enzimas pode ser conduzido em um meio líquido, conhecido como Fermentação Submersa (FSm), ou em um meio sólido, a Fermentação em Estado Sólido (FES). A FES é definida como o processo de crescimento de microrganismos em substrato sólido contendo umidade suficiente para manter o crescimento e o metabolismo do microrganismo, sem água livre. A maioria das enzimas industriais são produzidas pela FSm, muitas vezes usando microrganismos geneticamente modificados. No



entanto, muitas destas enzimas poderiam ser produzidas por FES utilizando microrganismos selvagens (FARINAS et al., 2011).

A FES apresenta algumas vantagens sobre a FSm, como ausência de formação de espuma, menor risco de contaminação devido ao baixo teor de água e, conseqüentemente, diminui o volume de efluentes. Outra vantagem é o uso de resíduos agroindustriais como substrato sólido, agindo como fontes de carbono e energia. Além disso, a utilização ajuda a reduzir os problemas de poluição ambiental, visto que muitas vezes esses resíduos são acumulados no meio ambiente. O uso da FES tem sido particularmente vantajoso para o crescimento de fungos filamentosos uma vez que simula o *habitat* natural destes microrganismos, e para a produção de enzimas, os custos desses processos são menores que as culturas submersas (EL-SHISHTAWY et al., 2014; RODRIGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011).

Como todo processo, a FES apresenta algumas desvantagens, enquanto em FSm o meio pode ser considerado homogêneo, em FES é difícil controlar essa homogeneidade, apresentando dificuldades de monitoramento e controle de diferentes variáveis, como umidade e temperatura. Entre as variáveis envolvidas no processo, a temperatura é particularmente importante, uma vez que o crescimento microbiano em condições aeróbicas resulta na libertação de calor, que pode produzir desnaturação das enzimas produzidas e outros efeitos nocivos ao crescimento de microrganismos (FARINAS et al., 2011).

A otimização deste processo se torna necessária para aumentar a produção enzimática e obtenção de produtos com características constantes e uniformes. Algumas variáveis operacionais são determinantes no processo de cultivo microbiano, como a escolha de um microrganismo específico, seleção do substrato, concentração de fontes de carbono, umidade, temperatura, pH e tempo de cultivo (PANDEY, 2003; SINGHANIA et al., 2010). Reduzir os custos de produção por meio da otimização é o objetivo da pesquisa básica para aplicações industriais (SCHEUFELE et al., 2012)

## **1.6. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS CELULASES E XILANASES**

Estudos básicos e aplicados sobre enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas demonstraram seu potencial biotecnológico em diversos setores, incluindo alimentos, ração animal, cervejaria e vinificação, agricultura, biocombustíveis, têxtil, lavanderia e na indústria de papel e celulose (KUHAD et al., 2011; BIBI et al., 2014; SHEN et al., 2011; XIN; HE, 2013).

As celulases podem ser aplicadas na agricultura para o controle de doenças, na germinação de sementes e aumento do crescimento e floração das plantas; melhoria da qualidade do solo; e diminuição da dependência de fertilizantes minerais. Para a indústria de cerveja, melhoria na fermentação primária, viscosidade, filtrabilidade do mosto e na qualidade da cerveja. Para a indústria de alimentos, liberação dos antioxidantes do bagaço de frutas e vegetais; melhoria dos rendimentos na extração de amido e proteínas; maceração melhorada, prensagem e extração de cor de frutas e legumes; melhoria da textura e da qualidade dos produtos de panificação; e clarificação de sucos de frutas e amargor controlado dos citrinos.

Na indústria têxtil, em processos de biopolimento e na bioestonagem de jeans; melhoria da qualidade dos tecidos; remoção do excesso de corante dos tecidos (KUHAD et al., 2011) e em lavanderia, de forma a aumentar o brilho, a remoção de sujeiras e a maciez dos tecidos, além de amenizar o desgaste das peças (CASTRO; PEREIRA JR, 2010). As celulases também podem ser utilizadas no tratamento de lixo orgânico e de águas residuais (BHAT, 2000).

As  $\beta$ -glicosidases desempenham um papel importante na produção de vinhos, melhorando a extração de cor, maceração, clarificação, filtração, estabilidade, qualidade e aroma do vinho (KUHAD et al., 2011; AGRAWAL et al., 2016).

As isoflavonas são constituintes importantes da soja e possuem excelentes propriedades nutricionais e características promotoras da saúde. Na soja, as isoflavonas são predominantemente encontradas na forma glicosilada, as  $\beta$ -glicosidases são capazes de desglicosilar estes compostos, melhorando a absorção destes pelo intestino humano (PARK et al., 2001). Consumo de alimentos ricos em isoflavonas podem contribuir para o controle e prevenção de doenças, como osteoporose, sintomas de menopausa, diabetes, doenças cardiovasculares, câncer de mama, próstata e colón (CHUN et al., 2008; FANG et al., 2016).

Outra utilidade da  $\beta$ -glicosidase é a sua capacidade de degradar antocianinas produzindo antocianidinas e açúcar livre. A aglicona resultante tem pouca cor e é menos solúvel que a antocianina, sendo facilmente removível durante a filtração. Isto é importante na indústria de sucos porque evita a alteração na cor que ocorreria com a presença de antocianinas durante o processo de pasteurização do suco (LEITE et al., 2007).

As  $\beta$ -glicosidases despertam grande interesse para as indústrias de biocombustíveis, pois finalizam o processo de hidrólise dos materiais lignocelulósicos, convertendo a celobiose em glicose, no qual pode ser convertida em etanol via fermentação por microrganismos (SANTOS et al., 2016).

As aplicações de celulases e xilanases na indústria de alimentos para animais têm recebido considerável atenção devido ao seu potencial para melhorar o valor nutricional e o desempenho dos animais. O pré-tratamento da silagem agrícola e da alimentação de grãos por celulases ou xilanases pode melhorar seu valor nutricional, assim aumenta a digestão e a absorção dos nutrientes por esses animais (KUHAD et al., 2011; XIN; HE, 2013; ZHANG et al., 2010).

As xilanases desempenham importante papel na hidrólise da xilana, além de aumentar a eficiência das celulases na hidrólise enzimática da biomassa vegetal. A remoção da hemicelulose altera substancialmente a estrutura e a acessibilidade da fibra às outras enzimas participantes do processo. A xilose obtida pela ação das xilanases pode ser convertida a etanol e xilitol. O xilitol é um adoçante natural semelhante à sacarose, possui baixo teor calórico e não cariogênico, podendo ser utilizado pela indústria de alimentos e pela indústria farmacêutica na formulação de medicamentos para tratar problemas digestivos (YANG et al., 2006; MERINO; CHERRY, 2007; POLIZELI et al., 2005).

Xilanases podem ser aplicadas na extração, clarificação e estabilização de sucos de frutas e vegetais, na redução da viscosidade e recuperação de aromas, óleos essenciais, sais minerais e vitaminas (POLIZELI et al., 2005). A aplicação conjunta com outras enzimas em cervejarias e vinícolas pode reduzir a concentração de  $\beta$ -glicanas, pois estas aumentam a viscosidade dos mostos e afetam a etapa da filtração, dificultando a clarificação dos vinhos (KULKARNI et al., 1999). Na panificação as xilanases vêm sendo empregadas para aumentar o volume do pão, determinando a textura do miolo e seu sabor final (CAMACHO; AGUIAR, 2003). Esta enzima também tem sido utilizada para a preparação de xilossacarídeos que são usados como prebióticos e também para a produção de xilitol (BIBI et al., 2014).

Uma das maiores aplicações do complexo xilanolítico está relacionada às indústrias de celulose e papel. A utilização da xilanase no branqueamento das polpas leva à diminuição do consumo de branqueadores químicos sem comprometer a alvura do papel. Assim, as xilanases auxiliam na redução da poluição ambiental causada por esses compostos químicos residuais, além de reduzirem os custos com reagentes organoclorados. No entanto, deve-se ressaltar que, para maior eficiência desta aplicação específica, deve-se trabalhar com extratos enzimáticos resistentes à alcalinidade, altas temperaturas e totalmente livre de celulases, para não comprometer o resultado final do papel (BOKHARI et al., 2010; ZHANG et al., 2010; XIN; HE, 2013; BIBI et al., 2014).

## 1.7. PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A conversão da biomassa lignocelulósica para etanol de segunda geração tem sido considerada como via promissora para o desenvolvimento de biocombustíveis a partir de matérias-primas não alimentares, devido às crescentes demandas de energia, poluição ambiental e emissão de gases de efeito estufa. A biomassa lignocelulósica é vista como matéria-prima abundante e considerada como a vantajosa para a biorrefinaria. No entanto, sua bioconversão continua sendo um desafio tanto a nível técnico como econômico. Isto ocorre principalmente devido à recalcitrância dos componentes da parede celular vegetal. Portanto, o pré-tratamento é um pré-requisito a eficácia da conversão em etanol (AKIMKULOVA et al., 2016; BALAT et al., 2011).

De modo geral, o processo de conversão de material lignocelulósico em etanol consiste em quatro operações principais: o pré-tratamento, a hidrólise, a fermentação e a separação/purificação do produto (MONSIER et al., 2005). Além de ser considerado um passo crucial na conversão biológica ao etanol, o pré-tratamento da biomassa representa um dos principais custos econômicos no processo. Devido os materiais lignocelulósicos possuírem diferentes propriedades físicas e químicas, é necessário adotar técnicas de pré-tratamento baseadas nas características de cada matéria-prima. Além disso, a escolha do pré-tratamento tem impacto nas etapas subsequentes do processo de conversão (ALVIRA et al., 2010).

Para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos podem ser empregados processos como: mecânicos (moagem e trituração), térmicos (explosão/auto-hidrólise de vapor, hidrotermólise e oxidação úmida), químicos (álcali, ácido diluído, oxidantes e solventes orgânicos) e biológicos (enzimas) (ALVIRA et al., 2010; LIONG et al., 2012). No entanto, nem todos estes métodos desenvolveram o suficiente para ser viável tecnicamente ou economicamente para processos em grande escala (BALAT et al., 2011). No pré-tratamento catalisado por ácido, a camada de hemicelulose é hidrolisada, enquanto que no pré-tratamento catalisado por álcali, principalmente, uma parte da lignina é removida e a hemicelulose tem de ser hidrolisada pelo uso de hemicelulases (DOGARIS et al., 2013).

A hidrólise é usualmente catalisada por celulasas, e a fermentação é realizada por leveduras, bactérias ou fungos filamentosos. Fatores que podem afetar a hidrólise incluem porosidade dos materiais resíduais, cristalinidade da fibra de celulose, lignina e hemicelulose.

A presença de lignina e hemicelulose torna o acesso das celulases à celulose difícil, reduzindo a eficiência da hidrólise. O objetivo do pré-tratamento é remover a lignina e hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais. O pré-tratamento devem ter os seguintes requisitos: (1) aumentar a obtenção de açúcares ou a capacidade de formar subsequentemente açúcares por hidrólise enzimática; (2) evitar a degradação ou perda de hidratos de carbono; (3) evitar a formação de subprodutos e inibidores para subsequentes processos de hidrólise e fermentação; e (4) ser rentável (SUN; CHENG, 2002; LIONG et al., 2012; DOGARIS et al., 2013).

Contrariamente à produção de etanol à base de sacarose e amido, a produção à base de lignocelulose é uma fermentação de vários açúcares na presença de compostos inibidores (ácidos orgânicos de baixo peso molecular, derivados de furano e compostos fenólicos e inorgânicos) liberados e formados durante o pré-tratamento e/ou a hidrólise da matéria-prima. Após purificação final (por destilação e peneiras moleculares ou outras técnicas de separação), o etanol está pronto para ser utilizado como combustível. uma parte da lignina, a principal parte sólida da biomassa, pode ser queimada para fornecer calor e eletricidade para o processo (DOGARIS et al., 2013).

## 2. REFERÊNCIAS

ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A. Enhanced production of cellulase-free, thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8, its characterization and application in sorghum straw saccharification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, 182-190, 2014.

AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29. p. 675-685, 2011.

AGRAWAL, R.; VERMA, A. K.; SATLEWAL, A. Application of nanoparticle-immobilized thermostable  $\beta$ -glucosidase for improving the sugarcane juice properties. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 472-482, 2016.

AKIMKULOVA, A.; ZHOU, Y.; ZHAO, X.; LIU, D. Improving the enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated wheat straw by metal ion blocking of non-productive cellulase adsorption on lignin. **Bioresource Technology**, v. 208, p. 110-116, 2016.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101. p. 4851-4861, 2010.

ASHA, P.; JOSE, D.; SINGH, I. S. B. Purification and characterisation of processive-type endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810 through saccharification of delignified coir pith to glucose. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 245-248, 2016.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858-875, 2011.

BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, v. 11, p. 15-28, 2011.

BHAT, M. K. Cellulase and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355-383, 2000.

BIBI, Z.; ANSARI, A.; ZOHRA, R. R.; AMAN, A.; QADER, S. A. U. Production of xylan degrading endo-1,4- $\beta$ -xylanase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* KIBGE-IB29. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, p. 478-485, 2014.

BOKHARI, S. A. I.; RAJOKA, M. I.; JAVAID, A.; REHMAN, S.; REHMAN, I.; LATIF, F. Novel thermodynamics of xylanase formation by a 2-deoxy-D-glucose resistant mutant of *Thermomyces lanuginosus* and its xylanase potential for biobleachability. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2800-2808, 2010.

CAMACHO, N. A.; AGUILAR, O. G. Production, purification and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in baking. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 104, p. 159-172, 2003.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, p. 2191-2195, 2009.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CAUFRIER, F.; MERTINO, A.; DUPONT, C.; BOURIOTIS, V. Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 687-692, 2003.

CHEN, X.; ISHIDA, N.; TODAKA, N.; NAKAMURA, R.; MARUYAMA, J.; TAKAHASHI, H.; KITAMOTO, K. Promotion of efficient saccharification of crystalline cellulose by *Aspergillus fumigatus* Swol. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2556-2561, 2010.

CHEN, W. H.; YE, S. C.; SHEEN, H. K. Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment. **Applied Energy**, v. 93, p. 237-244, 2012.

CHUN, J.; KIM, J.S.; KIM, J.H. Enrichment of isoflavone aglycones in soy milk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weissella* sp. **Food Chemistry**, v. 109, p. 278-284, 2008.

COLLINS, T.; GERDAY C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p.3-23, 2005.

COSTA, A. C.; SCALABRINI, R. P.; SILVESTRE, M. A.; RODRIGUES, A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production of xylanase by a new strain of *Thermoascus aurantiacus*: obtainment of enzymatic extract with reduced cellulolytic activity for application in pulp and paper industries. **Bioscience Journal**, v. 32, p. 1040-1048, 2016.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 497-522, 2001.

DHILLON, G. S.; KAUR, S.; BRAR, S. K.; VERMA, M. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through Solid-state Fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 6-13, 2012.

DOGARIS, I.; MAMMA, D.; KEKOS, D. Biotechnological production of ethanol from renewable resources by *Neurospora crassa*: an alternative to conventional yeast fermentations. **Applied Microbiology**. v. 97, p. 1457-1473, 2013.

EL-SHISHTAWY, R. M.; MOHAMED, S. A.; ASIRI, A. M.; GOMAA, A. M.; IBRAHIM, I. H.; AL-TALHI, H. A. Solid fermentation of wheat bran for hydrolytic enzymes production and saccharification content by a local isolate *Bacillus megatherium*. **BMC Biotechnology**, v. 14, p. 1-8, 2014.

ERICKSON, B.; NELSON, J. E.; WINTERS, P. Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. **Biotechnology Journal**, v.7, p. 176-185, 2012.

FANG, W.; YANGA, Y.; ZHANGA, X.; YINA, Q.; ZHANGA, X.; WANG, X.; FANGA, Z.; XIAO, Y. Improve ethanol tolerance of  $\beta$ -glucosidase Bgl1A by semi-rational engineering for the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. **Journal of Biotechnology**, v. 227, p. 64-71, 2016.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa Instrumentação Agropecuária**, p. 1-13, 2011.

FARINAS, C. S.; VITCOSQUE, G. L.; FONSECA R. F.; BERTUCCI-NETO, V.; COURI, S. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor industrial. **Crops and Products**, v. 34, p. 1186-1192, 2011.

GAUTAM, S. P.; BUNDELA, P. S.; PANDEY, A. K.; KHAN, J.; AWASTHI, M. K.; SARSAIYA, S. Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. **Biotechnology Research International**, p. 1-10, 2011.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. D. S. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, p. 72-78, 2010.

GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; DA-SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1-22, 2008.

HUANG, Y.; QIN, X.; LUO, X. M.; NONG, Q.; YANG, Q.; ZHANG, Z.; GAO, Y.; LV, F.; CHEN, Y.; YU, Z.; LIU, J. L.; FENG, J. X. Efficient enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse pulp for ethanol production by cellulase from *Penicillium oxalicum* EU2106 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* ZM1-5. **Biomass & Bioenergy**, v. 77, p. 53-63, 2015.

JOVANOVIC, I.; MAGNUSON, J. K.; COLLART, F.; ROBBERTSE, B.; ADNEY, W. S.; HIMMEL, M. E.; BAKER, S. E. Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies. **Cellulose**, v. 16, p. 687-697, 2009.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, p.1-10, 2011.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology**, v.23, p.411-456, 1999.

LAOTHANACHAREON, T.; BUNTERNGSOOK, B.; SUWANNARANGSEE, S.; EURWILAICHITR, L.; CHAMPREDA, V. Synergistic action of recombinant accessory hemicellulolytic and pectinolytic enzymes to *Trichoderma reesei* cellulase on rice straw degradation. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 682-690, 2015.

LEITE, R. S. R., BOCCHINI, D. A., MARTINS, E. S., SILVA, D., GOMES, E., SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pulluans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.137, p. 281-288, 2007.

LIONG, Y. Y.; HALIS, R.; LAI, O. M.; MOHAMED, R. Conversion of lignocellulosic biomass from grass to bioethanol using materials pretreated with alkali and the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. **BioResources**, v. 7, p. 5500-5513, 2012.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

MAEDA, R. N.; SERPA, V. I.; ROCHA, V. A. L.; MESQUITA, R. A. A.; SANTA ANNA, L. M. M.; CASTRO, A. M. de; DRIEMEIER, C. E.; PEREIRA JR, N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v.46, p. 1196-1201, 2011.

MERINO, S. T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p. 95-120, 2007.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96.p. 673-686, 2005.



NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. R. Production of cellulases by Solid State Fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 355-361, 2012.

OLIVEIRA, A. P. A.; SILVESTRE, M. A.; GARCIA, N. F. L.; ALVES-PRADO, H. F.; RODRIGUES, A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production and catalytic properties of amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by solid-state fermentation. **The Scientific World Journal**, p. 1-10, 2016.

PANDEY, A. Solid-State fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PARK, J.; LAPPE, M.; TEICHMANN, A. Mapping protein family interactions: Intramolecular and intermolecular protein family interaction repertoires in the PDB and yeast. **The Journal of Molecular Biology**, v. 307, p. 929-938, 2001.

PEREIRA, J. C.; MARQUES, N. P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, T. B.; BOSCOLO, M.; DA-SILVA, R.; GOMES, E.; BOCCHINI-MARTINS, D. A. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 928-939, 2015.

POLIZELLI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCE, H.; JORGE, J. AMORIM, D. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.

RANI, R.; GHOSH, S. Production of phytase under Solid-State Fermentation using *Rhizopus oryzae*: Novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10641-10649, 2011.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6ª edição. Editora Guanabara Hoogan, Rio de Janeiro, 2001.

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

RUIZ-DUEÑAS, F.J.; MARTÍNEZ, A.T. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. **Microbial Biotechnology**, v. 2, p. 164-177, 2009.

SAKTHISELVAN, P.; NAVEENA,B.; PARTHA, N. Molecular characterization of a Xylanase-producing fungus isolated from fouled soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 1293-1302, 2014.

SANDGREN, M.; SAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 89, p. 246-291, 2005.

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

SCHEUFELE, F. B.; BUTZKE, A. S.; MARRA, I. F.; HASAN, S. D M.; FIORESE, M. L. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Engevista**, v. 14, p. 310-321, 2012.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 219-228, 2003.

SHEN, F.; KUMAR, L.; HU, J.; SADDLER, J. N. Evaluation of hemicellulose removal by xylanase and delignification on SHF and SSF for bioethanol production with steam-pretreated substrates. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8945-8951, 2011.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, 2010.

SIQUEIRA, F. G. de; SIQUEIRA, L. G. de; JARAMILLO, P. M. D.; SILVEIRA, M. H. L.; ANDREAUS, J.; COUTO, F. A.; BATISTA, L. R.; FERREIRA FILHO, E. X. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, p. 20-26, 2010.

SJÖSTRÖM, E.; WESTERMARK, U. Chemical composition of wood and pulps: basic constituent and their distribution. In: SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. (Ed.). Analytical methods in wood chemistry, pulping and papermaking. **Springer**, p. 1-19, 1999.

SUN, F.; CHEN, H. Organosolv pretreatment by crude glycerol from oleochemicals industry for enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5474-5479, 2008.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 719, 2004. VIKARI, L.; VEHEMAANPERA, J.; KOIVULA, A. Lignocellulosic ethanol: From science to industry. **Biomass & Bioenergy**, v. 46, p. 13-24, 2012.

XIN, F.; HE, J. Characterization of a thermostable xylanase from a newly isolated *Kluyvera* species and its application for biobutanol production. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 309-315, 2013.

XU, J.; HE, B.; WU, B.; WANG, B.; WANG, C.; HU, L. An ionic liquid tolerant cellulase derived from chemically polluted microhabitats and its application in in situ saccharification of rice straw. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 166-173, 2014.

YANG, Y. Z.; YANG, S. Q.; YAN, Q. J. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1794-1800, 2006.

YENNAMALLI, R. M.; RADER, A. J.; KENNY, A. J.; WOLT, J. D.; SEN, T. Z. Endoglucanases: insights into thermostability for biofuel applications. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1-9, 2013.

ZHANG, M.; JIANG, Z.; YANG, S.; HUA, C.; LI, L. Cloning and expression of a *Paecilomyces thermophila* xylanase gene in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant xylanase. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 688-695, 2010.

ZHANG, W.; SATHITSUKSANO, N.; BARONE, J. R.; RENNECKAR, S. Enhanced enzymatic saccharification of pretreated biomass using glycerol thermal processing (GTP). **Bioresource Technology**, v. 199, p. 148-154, 2016.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.

## CAPITULO II

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES PRODUZIDAS POR *Penicillium* sp. PARA APLICAÇÃO EM SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR****RESUMO**

As celulases e hemicelulases são as enzimas capazes de converter a biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis. Para que essa conversão seja eficiente, se torna necessário a desorganização da parede celular vegetal para facilitar o ataque enzimático. Dessa forma, o pré-tratamento da biomassa com agentes físicos e químicos anteriormente à hidrólise enzimática é imprescindível. O objetivo do trabalho foi produzir e caracterizar enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas obtidas por fungo filamentosos mesófilo isolado do solo do Cerrado sul-mato-grossense utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a Fermentação em Estado Sólido. O extrato enzimático produzido pelo fungo foi utilizado para sacarificação com o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado com glicerol. Os resultados obtidos indicam que o farelo de trigo foi o melhor substrato na produção das enzimas. A melhor produção de xilanase foi em cultivo contendo 60% de umidade inicial a 25°C após 72 horas atingiu 1.094,8 U/g (109,48 U/mL), e melhores produções de CMCase e  $\beta$ -glicosidase foram com umidade inicial em 55% nas temperaturas de 30°C e 35°C, respectivamente, atingindo cerca de 213,4 U/g (21,34 U/mL) de CMCase (96 e 120 horas) e 69,4 U/g (6,94 U/mL) de  $\beta$ -glicosidase (144 horas). As enzimas apresentaram pH ótimo de 4,0-4,5 e temperatura ótima de 55°C para xilanase e 65°C para CMCase e  $\beta$ -glicosidase. As enzimas apresentaram ampla faixa de estabilidade térmica e estabilidade ao pH. A  $\beta$ -glicosidase teve sua atividade catalítica aumentada quando exposta a 10% de etanol e a inibição por glicose pode ser revertida. Em 48 horas, cerca de 3,7% da celulose contida no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com glicerol foi convertida em glicose, enquanto que na hidrólise do bagaço *in natura*, nas mesmas condições, somente 0,7%. Concluiu-se que as enzimas produzidas pelo fungo *Penicillium* sp. apresentaram potencial para aplicação em processos industriais, principalmente na sacarificação do bagaço da cana-de-açúcar, visando a obtenção de açúcares fermentescíveis.

**Palavras-chave:** Fermentação em Estado Sólido, pré-tratamento, hidrólise enzimática.

## ABSTRACT

Cellulases and hemicellulases are the enzymes capable of converting the lignocellulosic biomass to fermentable sugars. For this conversion to be efficient, it becomes necessary to disorganize the plant cell wall to facilitate the enzymatic attack. Thus, pretreatment of biomass with physical and chemical agents prior to enzymatic hydrolysis is essential. The objective of the work was to produce and characterize cellulolytic and hemicellulolytic enzymes obtained by mesophilic filamentous fungi isolated from the soil of region of the Cerrado sul-mato-grossense, using different agroindustrial residues as substrates for Solid State Fermentation. The enzymatic extract produced by the fungus was used for saccharification with the bagasse in natura and pretreated with glycerol. The results indicate that wheat bran was the best substrate in the production of the enzymes. The best xylanase production was in culture containing 60% initial moisture at 25°C after 72 hours reached 1094.8 U/g (109.48 U/mL), and better yields of CMCase and  $\beta$ -glucosidase were at initial moisture at 55% at temperatures of 30°C and 35°C, respectively, reaching about 213.4 U/g (21.34 U/mL) CMCase (96 and 120 hours) and 69.4 U/g (6.94 U/mL) of  $\beta$ -glucosidase (144 hours). The enzymes presented optimum pH of 4.0 - 4.5 and optimum temperature of 55°C for xylanase and 65°C for CMCase and  $\beta$ -glucosidase. The enzymes showed a wide range of thermal stability and pH stability.  $\beta$ -glucosidase had its catalytic activity increased when exposed to 10% ethanol and inhibition by glucose can be reversed. In 48 hours, about 3.7% of the cellulose contained in the sugarcane bagasse pretreated with glycerol was converted to glucose, while in the hydrolysis of the bagasse in the same conditions, only 0.7%. It is concluded that the enzymes produced by the fungus *Penicillium* sp. presented potential for application in industrial processes, mainly saccharification of sugarcane bagasse, in order to obtain fermentable sugars.

**Keywords:** Solid State Fermentation, pre-treatment, enzymatic hydrolysis.

## 1. INTRODUÇÃO

A Fermentação em Estado Sólido (FES) apresenta papel de destaque na produção de enzimas para aplicação industrial. A utilização de resíduos agroindustriais representa uma alternativa para reduzir os custos da produção, além de minimizar os problemas causados pelo acúmulo no meio ambiente. Os fungos filamentosos são os microrganismos mais promissores nesse processo, visto que necessitam de baixos níveis de água para o crescimento e o meio simula seu *habitat* natural (PANDEY, 2003; RANI; GHOSH 2011, DHILLON et al., 2012).

A biomassa lignocelulósica consiste principalmente em celulose, hemicelulose e lignina (CHEN et al., 2012). A celulose é o biopolímero renovável mais abundante disponível na Terra (SAELEE et al., 2016). É constituída por cadeias lineares de glicose formada por uma estrutura cristalina e amorfa. As hemiceluloses são polissacarídeos ramificados que contêm resíduos de açúcar; tais como xilose, manose, galactose, glicose, arabinose e ácido glucurônico. E a lignina é um polímero amorfo constituído por derivados aromáticos (CHEN et al., 2012).

As celulasas são enzimas que atuam em sinergia para a hidrólise da celulose em açúcares fermentescíveis. De acordo com a região de atuação no substrato, essas enzimas são divididas em três grandes grupos: as endoglucanases (EC. 3.2.1.4) que têm a propriedade de clivar ligações internas da fibra celulósica; as exoglucanases (EC. 3.2.1.91) que atuam na região externa da celulose e as  $\beta$ -glicosidases (EC. 3.2.1.21) que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose, sendo indispensável para a completa hidrólise enzimática (GOTTSCHALK et al., 2010; NARRA et al., 2012).

A xilana é o principal componente da hemicelulose, sendo mais suscetível à hidrólise que a celulose, pois não possui regiões cristalinas e apresenta baixo grau de polimerização. Apesar disso, é necessário um sistema de enzimas específicas para degradação completa, dada a sua composição variável e ramificada (SHALLOM; SHOHAM, 2003). A hidrólise enzimática da cadeia principal da hemicelulose envolve a ação de pelo menos dois grupos de enzimas: endo 1,4- $\beta$ -D-xilanases (EC 3.2.1.8) e  $\beta$ -D-xilosidase (EC 3.2.1.37), e as ramificações da cadeia são hidrolisadas pelas enzimas auxiliares, como  $\alpha$ -D-glucuronidase (EC 3.2.1.131) e acetil-xilana-esterase (EC 3.1.1.72), entre outras (LAOTHANACHAREON et al., 2015).

A conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis depende obrigatoriamente da desorganização da parede celular vegetal (ZHANG et al., 2016). A

lignina e hemicelulose atuam como barreiras físicas para ação das celulases, além disso, as enzimas podem ligar-se irreversivelmente aos componentes da lignina, o que resulta na perda de atividade enzimática. A própria estrutura da celulose apresenta elevado grau de polimerização e cristalinidade, tornando-a resistente à degradação (HUANG et al., 2015). Dessa forma, o pré-tratamento da biomassa com agentes físicos e químicos anteriormente à hidrólise enzimática é imprescindível para a eficiência da ação das enzimas celulolíticas, desorganizando a estrutura da parede celular vegetal e reduzindo a cristalinidade das fibras de celulose (CHEN et al., 2012, PEREIRA et al., 2015).

Uma das principais aplicações das celulases é a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica. No entanto, a viabilidade econômica desse processo depende do custo de produção dessas enzimas. O isolamento e seleção de novas cepas produtoras e o uso da FES utilizando resíduos agroindustriais de baixo custo contribuem para redução dos custos de produção (NARRA et al., 2012). Dentre outras aplicações, é possível destacar: na indústria de alimentos e bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos; na indústria têxtil, em processos de biopolimento e bioestonagem; indústria de polpa e papel e como aditivos em ração animal (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

As enzimas xilanolíticas apresentam aplicações na conversão de materiais lignocelulósicos em produtos químicos e combustíveis; na indústria de papel e celulose, para fins de branqueamento da polpa; na panificação, melhorando o volume da massa e na elaboração de ração animal, a fim de melhorar a digestibilidade (SHEN et al., 2011; XIN; HE, 2013).

O trabalho visou determinar os parâmetros fermentativos para a produção de celulases e hemicelulases em FES por um fungo filamentoso mesófilo isolado do solo do Cerrado sul-mato-grossense, identificado como *Penicillium* sp., variando alguns parâmetros de cultivo como, diferentes substratos, umidade, temperatura e tempo de cultivo. As enzimas foram caracterizadas quanto ao pH e temperatura. O extrato enzimático produzido foi usado para sacarificação com o bagaço de cana *in natura* e pré-tratado com glicerol.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Microrganismo utilizado

Neste trabalho foi utilizado o fungo filamentosso mesófilo isolado de amostras de solo coletadas do Bioma Cerrado, localizado na região de Dourados - MS (Centro-Oeste brasileiro - 22°10'49.2''S54°56'57.4W). Amostras do solo foram diluídas seriadamente ( $10^{-1}$  -  $10^{-4}$ ) em solução de cloreto de sódio (0,9%) e plaqueadas em meio Sabouraud Dextrose Agar (dextrose 4%, peptona 1% e agar 1,5%) para obtenção de culturas puras. A linhagem selecionada para produção das enzimas foi identificada pela Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) da Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas - SP. O microrganismo foi cultivado a 28°C em meio ágar Sabouraud Dextrose e mantido a 4°C.

### 2.2. Identificação do microrganismo

O DNA genômico da amostra foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Raeder e Broda (1985). A metodologia consistiu na amplificação de parte do gene da  $\beta$ -tubulina para as amostras CPQBA 1279/16 DRM – 01 pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram  $\beta$ t2a e  $\beta$ t2b referentes a um trecho do gene da  $\beta$ -tubulina. Os fragmentos amplificados foram purificados e submetidos diretamente ao sequenciamento em sequenciador automático ABI 3500 XL *Series* (Applied Biosystem). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram  $\beta$ t2a e  $\beta$ t2b. As sequências parciais obtidas com diferentes *primers* foram montadas em um *consensus* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparada com as sequências de organismos representados nas bases de dados do *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e CBS (<http://www.cbs.knaw.nl/>). As sequências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1994) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2007). As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o *software* de rotina incluído no MEGA 6.0.



### 2.3. Produção de celulases e hemicelulases por Fermentação em Estado Sólido (FES)

2.3.1. *Inóculo*: O microrganismo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio ágar Sabouraud Dextrose, mantido por 48 horas a 28°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% nitrato de cálcio m/v) (MERHEB-DINI et al., 2009). A inoculação do fungo nos resíduos agroindustriais se deu pela transferência de 5 mL desta suspensão ( $1 \times 10^6$  esporos por grama de substrato seco).

2.3.2. *Fermentação em Estado Sólido (FES)*: Diferentes resíduos agroindustriais foram testados para produção de celulases e hemicelulases: farelo de trigo, farelo de soja, casca de arroz, sabugo de milho e palha de milho. Anteriormente à inoculação do microrganismo, todos os substratos foram lavados com água destilada e posteriormente secos em estufa a 50°C por 48 horas. A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 5 g de substratos esterilizados a 121°C durante 20 minutos. Inicialmente, todos os substratos foram umedecidos a 60% com solução nutriente (descrita anteriormente). Após a inoculação do microrganismo, os frascos Erlenmeyer foram mantidos a 28°C por 96 horas. O substrato que apresentou melhor produção das enzimas foi adotado para a avaliação de outros parâmetros fermentativos (umidade, temperatura e tempo cultivo), sendo adotada a condição ótima de cada experimento, nos ensaios subsequentes. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados expressos como U/g referem-se a unidades de enzimas por grama de substrato seco (GARCIA et al., 2015).

2.3.3. *Extração das enzimas*: Para a extração das enzimas foram adicionados 50 mL de água destilada nos resíduos agroindustriais fermentados, sendo mantidos em agitação por 1 hora a 150 rpm. Posteriormente, todo conteúdo foi filtrado em tecido sintético (nylon) e centrifugado a  $1500 \times g$  por 5 minutos a 5°C. O sobrenadante foi denominado extrato enzimático e utilizados nos ensaios subsequentes (SANTOS et al., 2016).

## 2.4. Determinação da atividade enzimática

2.4.1. *Xilanase*: O substrato para quantificação de xilanase foi preparado a partir de xilana “*Beechwood*” a 0,5% em solução-tampão acetato de sódio a 0,1M, no pH 4,5. A atividade enzimática foi determinada pela adição de 900  $\mu$ L desse substrato com 100  $\mu$ L do filtrado enzimático, reagindo por 10 minutos na temperatura de 50°C. Foi adicionado 1 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) para paralisar a reação e colocado em banho de ebulição a 100°C por 10 minutos e posteriormente em banho de gelo. O açúcar redutor liberado foi quantificado a 540 nm pelo método de DNS (MILLER, 1959), usando curva padrão de xilose. A atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima que produz 1  $\mu$ mol de xilose por minuto de reação (ALVES-PRADO et al., 2010).

2.4.2. *CMCase*: O substrato para quantificação de CMCase foi preparado utilizando carboximetil-celulose (CMC-Sigma) a 3% em solução-tampão acetato de sódio a 0,1M, no pH 4,5. A atividade enzimática foi determinada pela adição de 900  $\mu$ L desse substrato com 100  $\mu$ L do filtrado enzimático, reagindo por 10 minutos na temperatura de 50°C, foi adicionado 1 mL de DNS para paralisar a reação e colocado em banho de ebulição a 100°C por 10 minutos e posteriormente em banho de gelo. O açúcar redutor liberado foi quantificado a 540 nm pelo método de DNS (MILLER, 1959), usando curva padrão de glicose. A atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima que produz 1  $\mu$ mol de glicose por minuto de reação (ALVES-PRADO et al., 2010).

2.4.3.  *$\beta$ -glicosidase*: A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi determinada pela adição de 50  $\mu$ L de extrato enzimático, 250  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4,5 e 250  $\mu$ L de p-nitrofenil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo 4mM (pNP $\beta$ G, Sigma), reagindo por 10 minutos a temperatura de 50°C. A reação enzimática foi paralisada com 2 mL de carbonato de sódio 2M. O p-nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm, usando uma curva de calibração padrão. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por minuto de reação (PALMA-FERNANDES et al., 2002).

## 2.5. Caracterização físico-química

2.5.1. *Efeito do pH e temperatura:* O pH ótimo foi determinado mensurando a atividade da enzima a 50°C em diferentes valores de pH (3,0 a 8,0), utilizando tampão McIlvine a 0,1M. A temperatura ótima foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em temperaturas de 30 a 80°C, no pH ótimo das enzimas. A estabilidade da enzima ao pH foi avaliada incubando-as por 24 horas a 25°C em diferentes valores de pH (3,0 a 11,0). Os tampões utilizados para o pH foram: McIlvine 0,1M (3,0 a 8,0), Tris-HCl 0,1M (8,0 a 8,5) e Glicina-NaOH 0,1M (8,5 a 11,0). A termoestabilidade foi avaliada incubando a enzima por 1 hora em diferentes valores de temperatura (30 a 80°C). As atividades residuais foram mensuradas nas condições ótimas de cada enzima (GARCIA et al., 2015).

2.5.2. *Efeito de etanol e glicose:* A atividade enzimática de xilanase, CMCase e  $\beta$ -glicosidase foram quantificadas com a adição de etanol em diferentes concentrações na mistura de reação (0 a 30% de etanol). Os ensaios foram realizados a 55°C, em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4,5. O efeito da glicose na atividade de  $\beta$ -glicosidase foi quantificada com adição de glicose em diferentes concentrações na mistura de reação (0 a 30 mM glicose), sob condições ótimas de pH e temperatura (PEREIRA et al., 2015).

## 2.6. Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com micro-ondas e glicerol

O bagaço de cana-de-açúcar foi lavado com água destilada e seco a 40°C, posteriormente foi triturado e utilizadas partículas retidas em peneira de 3mm. Para o pré-tratamento foram utilizados 10 g de bagaço que foram imersos em 30 mL de glicerol (100%) durante 24 horas. A seguir, o material foi transferido para um frasco Erlenmeyerde 250 mL, colocado no micro-ondas e ligado a um condensador de refluxo na parte superior do forno. As amostras foram irradiadas a 2450 MHz, durante 5 minutos. Foram adicionados 30 mL de água destilada, em seguida a amostra foi agitada e filtrada. O material sólido foi seco a 40°C e utilizado em ensaios de sacarificação enzimática (PEREIRA et al., 2015).

## 2.7. Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Os experimentos de sacarificação de bagaço de cana *in natura* e pré-tratado foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, selados com tampas de látex, utilizando o extrato enzimático produzido por *Penicillium* sp. nas melhores condições de cultivo, tampão de citrato (0,1 mol L, pH 4,5), para um volume final de 50 mL, e o bagaço foi em 3% (p/p). Os frascos foram incubados em shaker orbital a 300 rpm, a 50°C, por 48 horas. Após este tempo, o conteúdo foi filtrado. A quantificação de glicose na solução foi determinada pelo método glicose-oxidase (*Glicose-PP, Gold Analisa Diagnostica Ltda*, Brasil) (OLIVEIRA et al., 2016). Os experimentos foram realizados em triplicata. Rendimentos de glicose foram calculados pela seguinte equação:

$$\text{Rendimento de glicose} = \frac{\text{g de glicose no volume total do ensaio de sacarificação}}{\text{g de celulose presente na amostra de bagaço utilizado no ensaio de sacarificação}} \times 100$$

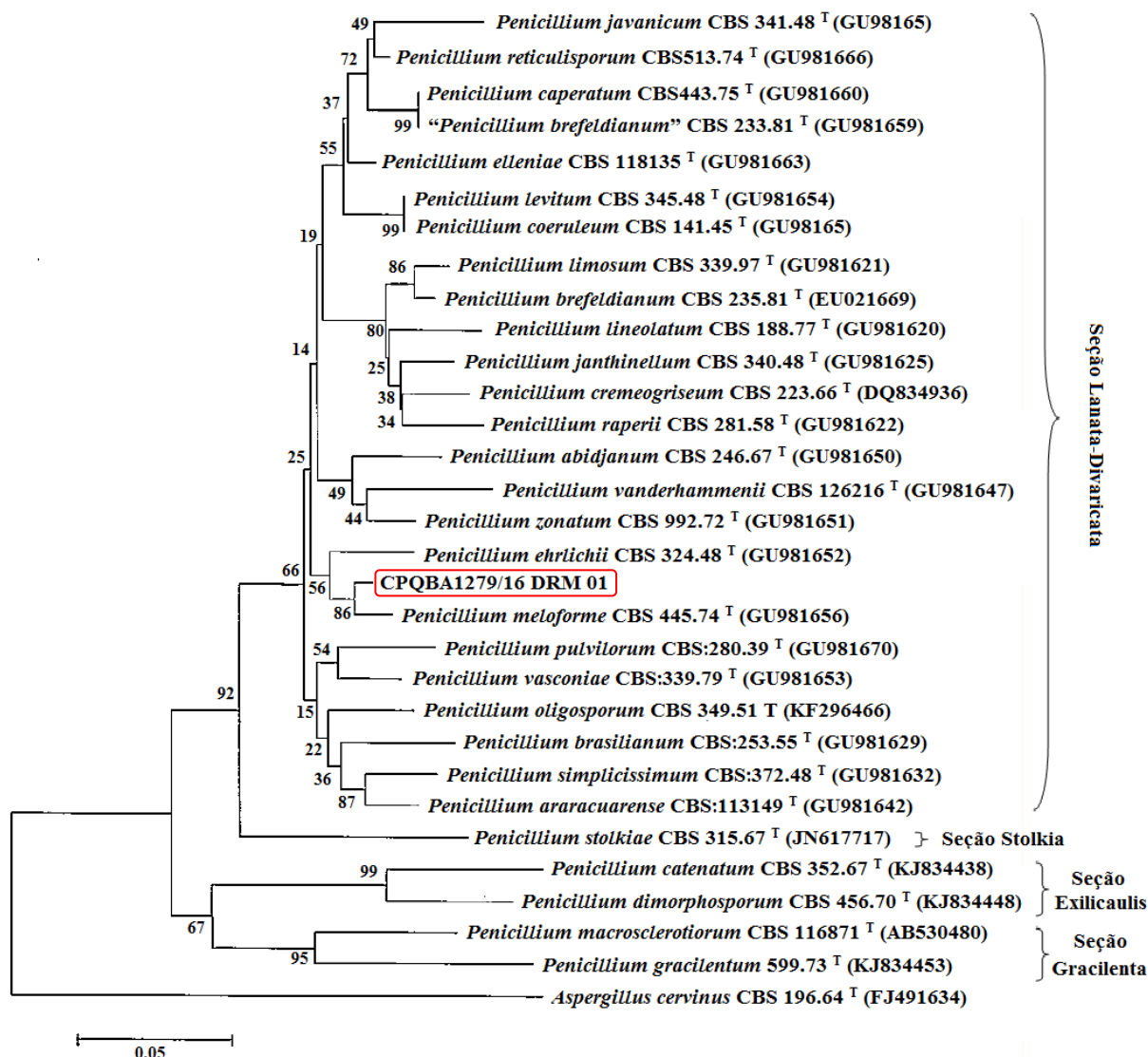
## 2.8. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sendo calculado o desvio padrão. A análise estatística dos dados dos experimentos incluiu uma ANOVA, seguida pelo teste Tukey ao nível de 1% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas no *software* Assistat 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009).

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1. Identificação do microrganismo

Dentre as linhagens fúngicas isoladas do solo do cerrado, um fungo mesófilo foi selecionado para produção de celulases e hemicelulases. A referida linhagem foi encaminhada para a Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) para sua identificação taxonômica, sendo codificada como CPQBA 1279/16 DRM-01. A árvore filogenética construída a partir da sequência da amostra e das sequências recuperadas no GenBank está apresentada na figura 1.



**Figura 1.** Árvore filogenética demonstrando as relações filogenéticas entre a sequência parcial do gene da  $\beta$ -tubulina da amostra CPQBA 1279/16 DRM-01 e sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e Genbank.

A sequência do fragmento da região do gene da  $\beta$ -tubulina da amostra CPQBA 1279/16 DRM-01 apresentou 99% de similaridade com as sequências da mesma região do operon ribossomal de representantes do gênero *Penicillium* depositadas no banco de dados GenBank e no banco de dados do CBS.

A análise filogenética recuperou a amostra em um agrupamento onde ficou evidenciado sua posição junto à seção Lanata-Divariata, 86% próximo à espécie *Penicillium meloforme* CBS 445.74<sup>T</sup>, portanto não houve identificação completamente satisfatória.

Considerando que o microrganismo foi isolado de uma região que apresenta rica diversidade biológica ainda pouco explorada cientificamente, pode se tratar de uma nova

espécie, não sendo ainda depositada nos bancos de dados conhecidos. Consequentemente, a linhagem foi identificada somente ao nível de gênero *Penicillium* sp. (Seção Lanata-Divaricata).

### 3.2. Produção de celulases e hemicelulases por Fermentação em Estado Sólido (FES)

Dentre as fontes de carbono testadas (resíduos agroindustriais) para produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas pelo fungo filamentoso *Penicillium* sp., o melhor substrato para produção das enzimas foi o farelo de trigo. As melhores atividades enzimáticas de xilanase, CMCase e  $\beta$ -glicosidase foram respectivamente de 676,33; 194,96 e 39,93 U/g de substrato seco, após 96 horas da inoculação. As demais fontes de carbono testadas induziram fracamente a produção das enzimas, quando comparadas ao farelo de trigo (Tabela 1). Considerando esses resultados, o farelo de trigo foi selecionado como substrato para os cultivos subsequentes.

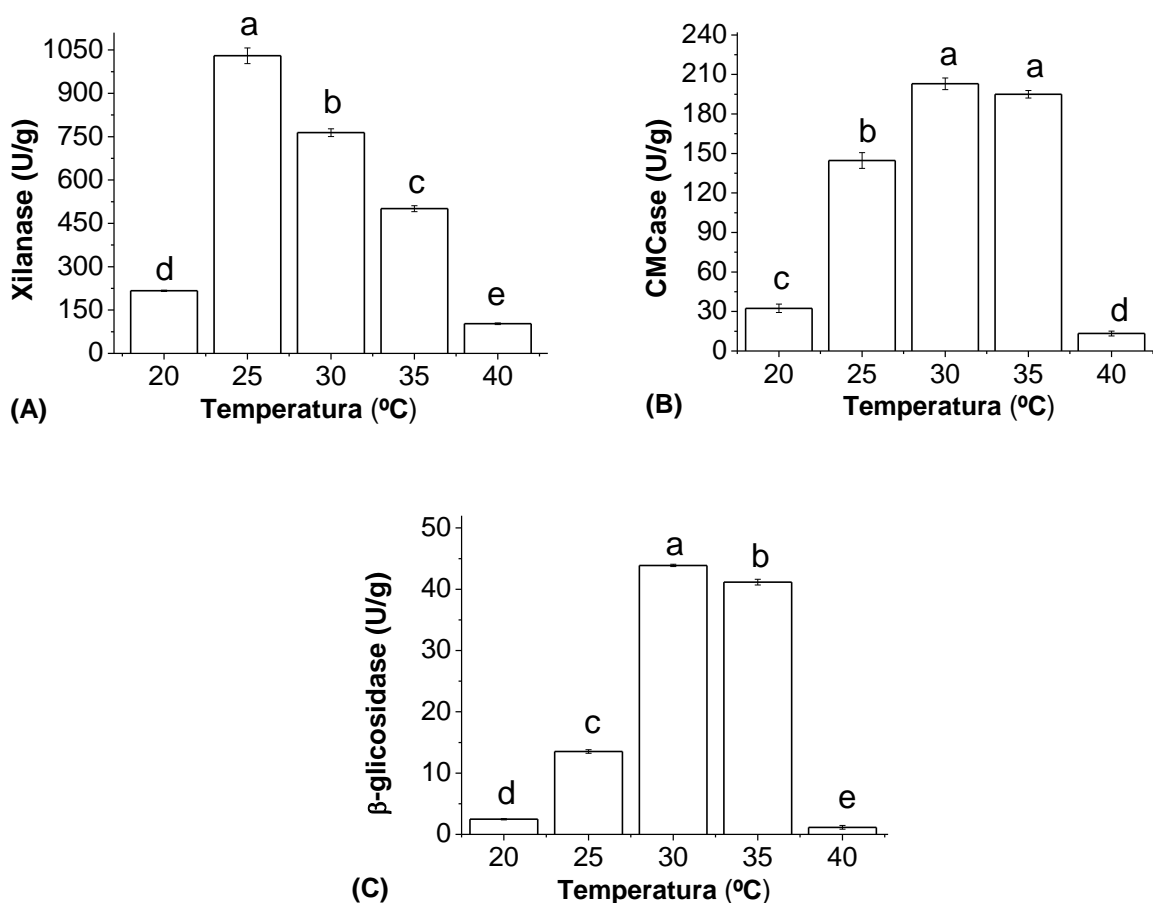
**Tabela 1.** Produção de xilanase, CMCase e  $\beta$ -glicosidase pelo fungo *Penicillium* sp. em diferentes substratos por Fermentação em Estado Sólido, contendo 60% de umidade inicial, temperatura de 28°C por 96 horas de cultivo.

Substratos	Xilanase (U/g)	CMCase (U/g)	$\beta$ -glicosidase (U/g)
Casca de arroz	109,60±5,10 <sup>c</sup>	15,67±0,87 <sup>c</sup>	4,88±0,04 <sup>c</sup>
Farelo de trigo	676,33±5,69 <sup>a</sup>	194,96±2,79 <sup>a</sup>	39,93±0,06 <sup>a</sup>
Farelo de soja	487,71±3,41 <sup>b</sup>	55,97±2,14 <sup>b</sup>	14,76±0,41 <sup>b</sup>
Palha de milho	59,60±3,98 <sup>d</sup>	4,90±0,35 <sup>e</sup>	0,50±0,03 <sup>d</sup>
Sabugo de milho	114,21±3,98 <sup>c</sup>	9,67±0,89 <sup>d</sup>	0,42±0,06 <sup>d</sup>

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,01$ ) de acordo com o teste de Tukey.

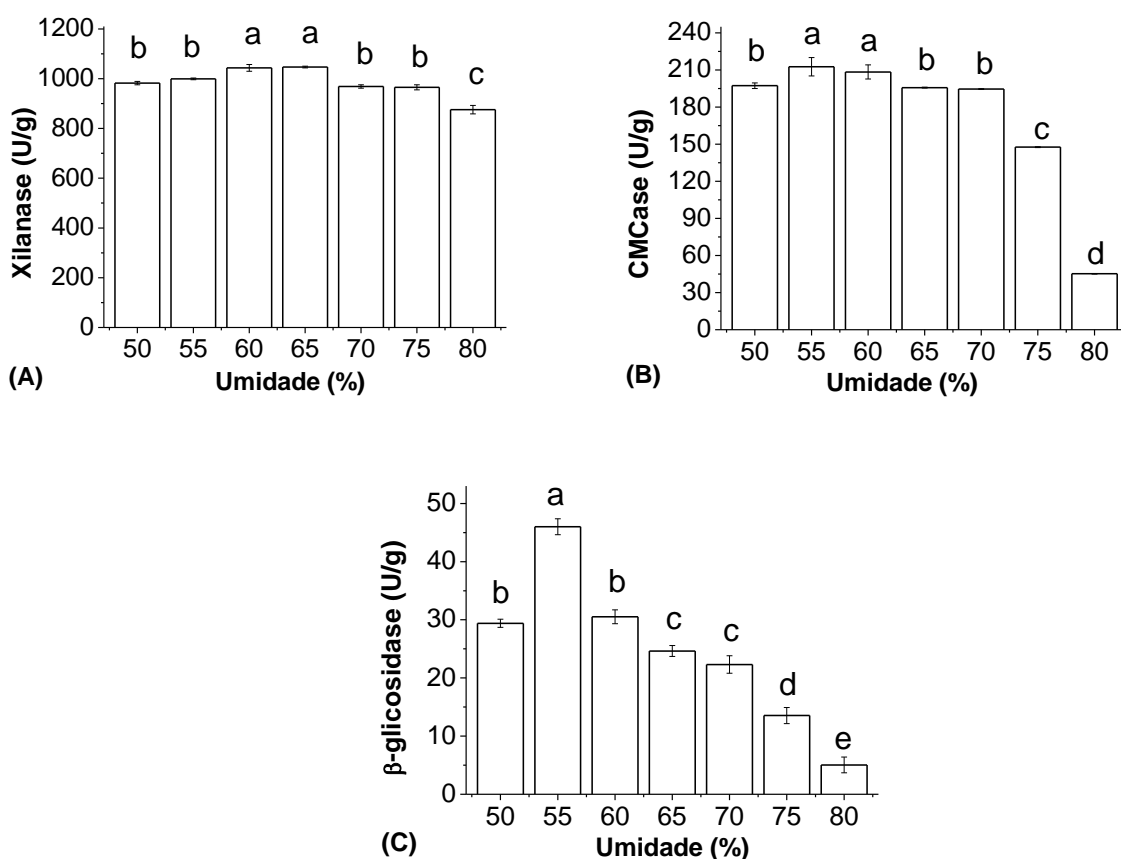
O farelo de trigo é um subproduto da agroindústria, considerado matéria-prima de baixo custo para a produção de enzimas industriais (DEMIR; TARI, 2016). Esse subproduto é utilizado para o cultivo microbiano por fornecer fonte de carbono, nitrogênio e possuir elevado valor nutricional. Além disso, apresenta grande área de superfície e circulação de ar, suporte para adesão miceliar de fungos filamentosos, sendo similar ao seu *habitat* natural. Provavelmente, por essas características demonstrou melhor eficiência para produção de celulases e xilanases (EL-SHISHTAWY et al., 2014, ABDELLA et al., 2014). Diversos autores relatam produções de celulases e xilanases utilizando farelo de trigo como substrato em FES (KALOGERIS et al., 2003; LEITE et al., 2008; ANTOINE et al., 2010, KRISCH et al., 2012; KAUSHIK et al., 2014; GARCIA et al., 2015; SANTOS et al., 2016).

Na avaliação da temperatura de cultivo, o fungo *Penicillium* sp. apresentou maiores produções enzimáticas quando cultivado em temperaturas entre 25°C a 35°C. Para xilanase a maior produção foi obtida nos cultivos a 25°C, atingindo cerca de 1.030 U/g (Figura 2A). A maior atividade de CMCase foi alcançada nos cultivos em temperatura de 30 e 35°C (202,9 U/g), onde não houve diferença estatística significativa (Figura 2B), e a melhor produção de  $\beta$ -glicosidase resultou de cultivos de 30°C e 35°C, que alcançou produção máxima de 43,8 U/g em 30°C (Figura 2C). O crescimento microbiano e a produção das enzimas foram reduzidos nos cultivos em temperatura de 40°C. A temperatura ótima para crescimento do microrganismo não é necessariamente a mesma exigida para a produção enzimática. Ao longo do processo é gerado grande quantidade de calor devido à atividade metabólica do microrganismo, que pode ser acumulado e interferir no rendimento final do produto (PANDEY, 2003; BHARGAV et al., 2008).



**Figura 2.** Produção de (A) xilanase, (B) CMCase e (C)  $\beta$ -glicosidase por Fermentação em Estado Sólido em farelo de trigo, em função da temperatura, contendo 60% de umidade inicial por 96 horas de cultivo pelo fungo *Penicillium* sp. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,01$ ) de acordo com o teste de Tukey.

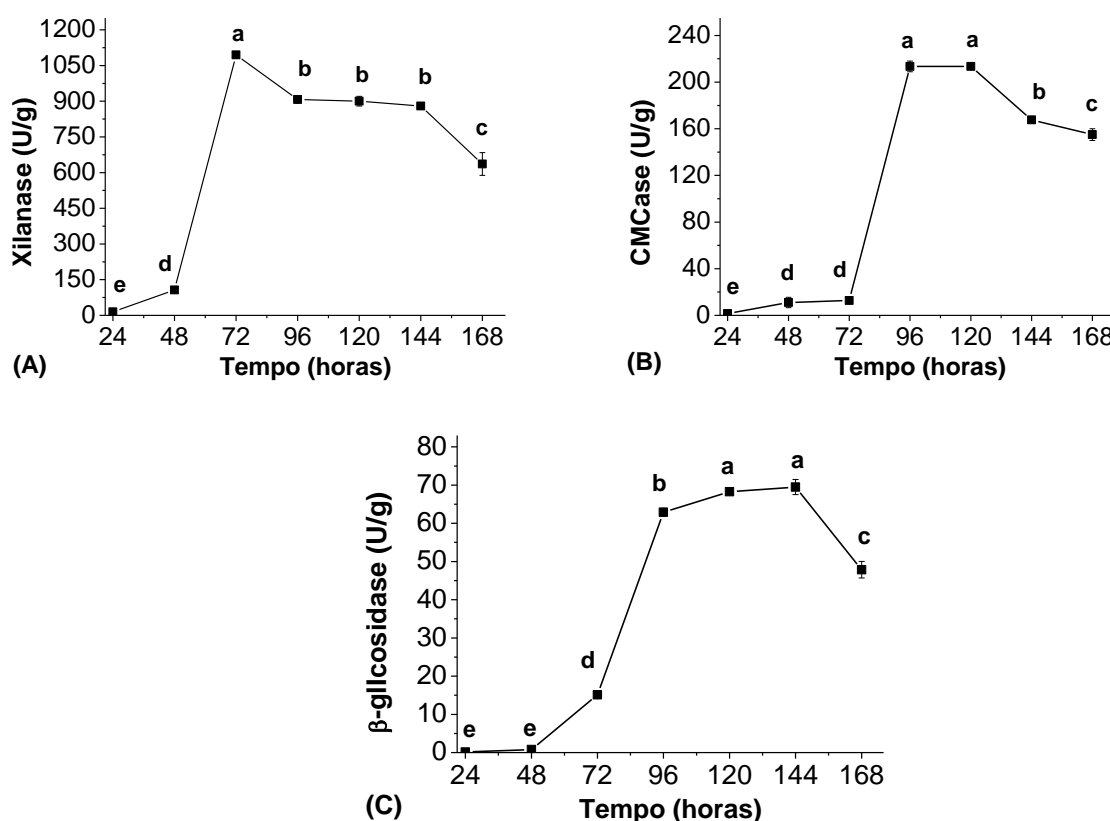
Na avaliação da umidade inicial do meio de cultivo, os resultados obtidos indicam que a umidade necessária para o crescimento do microrganismo e para produção enzimática variam entre 55 a 65%. A maior produção de xilanase ocorreu nos cultivos de 60 e 65% de umidade inicial, não havendo diferença estatística entre elas, alcançando a média de  $1.045,3 \pm 1,7$  U/g (Figura 3A). Os cultivos contendo 55 e 60% de umidade inicial não apresentaram diferenças, e teve pico de produção de CMCCase de 212,6 U/g (Figura 3B). A melhor umidade inicial para  $\beta$ -glicosidase foi em 55%, apresentando pico de produção de 46 U/g (Figura 3C). Os fungos geralmente necessitam de 40 a 60% de umidade, esses valores simulam as condições encontradas na natureza (SINGHANIA et al., 2009). A umidade elevada pode aumentar a contaminação por bactérias, interferir na porosidade do substrato e na penetração do oxigênio no meio. Por outro lado, baixo teor de umidade pode levar a um ineficiente acesso aos nutrientes, dificultando o crescimento microbiano (KUMAR; RAY, 2014).



**Figura 3.** Produção de (A) xilanase, (B) CMCCase e (C)  $\beta$ -glicosidase por Fermentação em Estado Sólido em farelo de trigo, em função da umidade inicial do meio, por 96 horas de cultivo pelo fungo *Penicillium* sp. (A) 25°C, (B) 35°C e (C) 30°C. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,01$ ) de acordo com o teste de Tukey.



Na avaliação do tempo de cultivo para produção das enzimas as amostras foram retiradas a cada 24 horas, perfazendo um total de 168 horas. A xilanase foi produzida em menor tempo de cultivo, com 72 horas de incubação foi obtido cerca de 1.094,8 U/g (109,48 U/mL), manteve-se constante de 96 a 144 horas e reduziu significativamente em 168 horas de cultivo (Figura 4A). A maior produção de CMCCase foi obtida em 96 horas, cerca de 213,4 U/g (21,34 U/mL), mantendo-se neste patamar até 120 horas, diminuindo sua atividade ao fim do cultivo (Figura 4B). A atividade de  $\beta$ -glicosidase se mostrou mais expressiva entre 120 e 144 horas de cultivo, 69,4 U/g (6,94 U/mL), reduzindo acentuadamente a produção após 144 horas de cultivo (Figura 4C).



**Figura 4.** Produção de (A) xilanase, (B) CMCCase e (C)  $\beta$ -glicosidase por Fermentação em Estado Sólido em farelo de trigo em função do tempo de cultivo pelo fungo *Penicillium* sp. (A) 25°C em 60% de umidade, (B) 35°C em 55% de umidade e (C) 30°C em 55% de umidade. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,01$ ) de acordo com o teste de Tukey.

A sequência de secreção enzimática observado nos dados apresentados ilustra a possível utilização dessas enzimas em processos industriais, onde primeiramente é almejada a desorganização da parede celular vegetal para posterior despolimerização e sacarificação da celulose. Os resultados obtidos permitem evidenciar que o microrganismo primeiramente

secretou xilanase no meio de cultivo (72 horas), provavelmente para desorganizar a estrutura da parede celular vegetal, visando favorecer a ação catalítica das enzimas celulolíticas. Posteriormente houve o pico de produção de CMCase (96 e 120 horas), enzima que reduz drasticamente o grau de polimerização da celulose, liberando oligossacarídeos de glicose. A última enzima a ser secretada pelo microrganismo foi a  $\beta$ -glicosidase (120 e 144 horas), enzima que catalisa a hidrólise de celobiose e celodextrinas a glicose, que por sua vez é fonte de carbono universal para todos os organismos celulares.

As enzimas xilanase, CMCase e  $\beta$ -glicosidase também foram estudadas por vários autores e produzidas por diversos microrganismos, como pode ser visto na Tabela 2.

**Tabela 2.** Produção de xilanase, CMCase e  $\beta$ -glicosidase por diferentes microrganismos em Fermentação em Estado Sólido utilizando farelo de trigo como substrato.

Microorganismo	Xilanase (U/g)	CMCase (U/g)	$\beta$ -glicosidase (U/g)	Autores
<i>Penicillium sp.</i>	1.094,8	213,4	69,4	Presente trabalho
<i>Aspergillus fischeri</i>	1.024			Senthilkumar et al.(2005)
<i>Aureobasidium pullulans</i>			13	Leite et al. (2008)
<i>Aspergillus lentulus</i>	158,4			Kaushik et al. (2014)
<i>Lichtheimia ramosa</i>			274	Garcia et al. (2015)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>		167,4		Leghlimi et al. (2017)
<i>Aspergillus terreus</i>		95,8		Leghlimi et al. (2017)

### 3.3. Efeito de pH e temperatura sobre as atividades enzimáticas

Os testes para a caracterização das enzimas produzidas foram realizados utilizando o extrato enzimático obtido pelo cultivo do fungo *Penicillium sp.* por FES nas condições otimizadas.

Todas as enzimas apresentaram pH ótimo de 4,0 - 4,5. A temperatura ótima para atuação da xilanase foi de 55°C e para CMCase e  $\beta$ -glicosidase foi de 65°C (Figura 5A e 5B). Os valores obtidos como pH ótimo para as enzimas estão de acordo com os descritos por trabalhos anteriores para celulasas e hemicelulasas produzidas por linhagens fúngicas (SAHA; GHOSH, 2014; SOHAIL et al., 2009; CHEN et al., 2010; SANTOS et al., 2016). No entanto, as temperaturas ótimas das enzimas produzidas pelo fungo *Penicillium sp.* foram superiores as comumente observadas para enzimas produzidas por espécies mesófilas.

Sohail et al. (2009) obtiveram com o fungo *Aspergillus niger* MS82 melhores produções de CMCCase em pH 4,0 nas temperaturas de 30 e 35°C, mas o aumento na temperatura de incubação afetou drasticamente a produção da enzima. Liu et al. (2011) estudaram uma CMCCase bruta produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, que apresentou pH 5,0 e 50°C como melhores condições para a atuação da enzima. Decker et al. (2000) avaliaram a produção de  $\beta$ -glicosidase de cinco espécies de *Aspergillus* (*A. aculeatus*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. japonicus* e *A. tubingens*). Somente *A. foetidus* obteve temperatura ótima de 60°C, para os demais a temperatura foi entre 35 a 50°C. Cao et al. (2015) produziram  $\beta$ -glicosidase a partir do fungo *Aspergillus fumigatus* WL002, a enzima purificada exibiu maior atividade na gama de pH alcalino (8,0 a 9,5), apresentou atividade máxima em pH 9,0 e temperatura ótima a 50°C.

Trabalhos anteriores confirmam a possibilidade de enzimas produzidas por microrganismos mesófilos atuarem em temperaturas elevadas (GOMES et al., 2007; LEITE et al., 2008; DOBREV; ZHEKOVA, 2012; GARCIA et al., 2015; SANTOS et al., 2016). As enzimas avaliadas neste estudo foram estáveis por 24 horas em ampla faixa de pH, apresentando considerável queda em suas atividades catalíticas em valores de pH superiores a 9,5 (Figura 5C). Quanto à estabilidade térmica, as enzimas mantiveram mais de 70% de suas atividades catalíticas após 1 hora a 60°C, sendo possível observar considerável queda quando a temperatura de incubação foi aumentada para 65°C por igual período (Figura 5D).

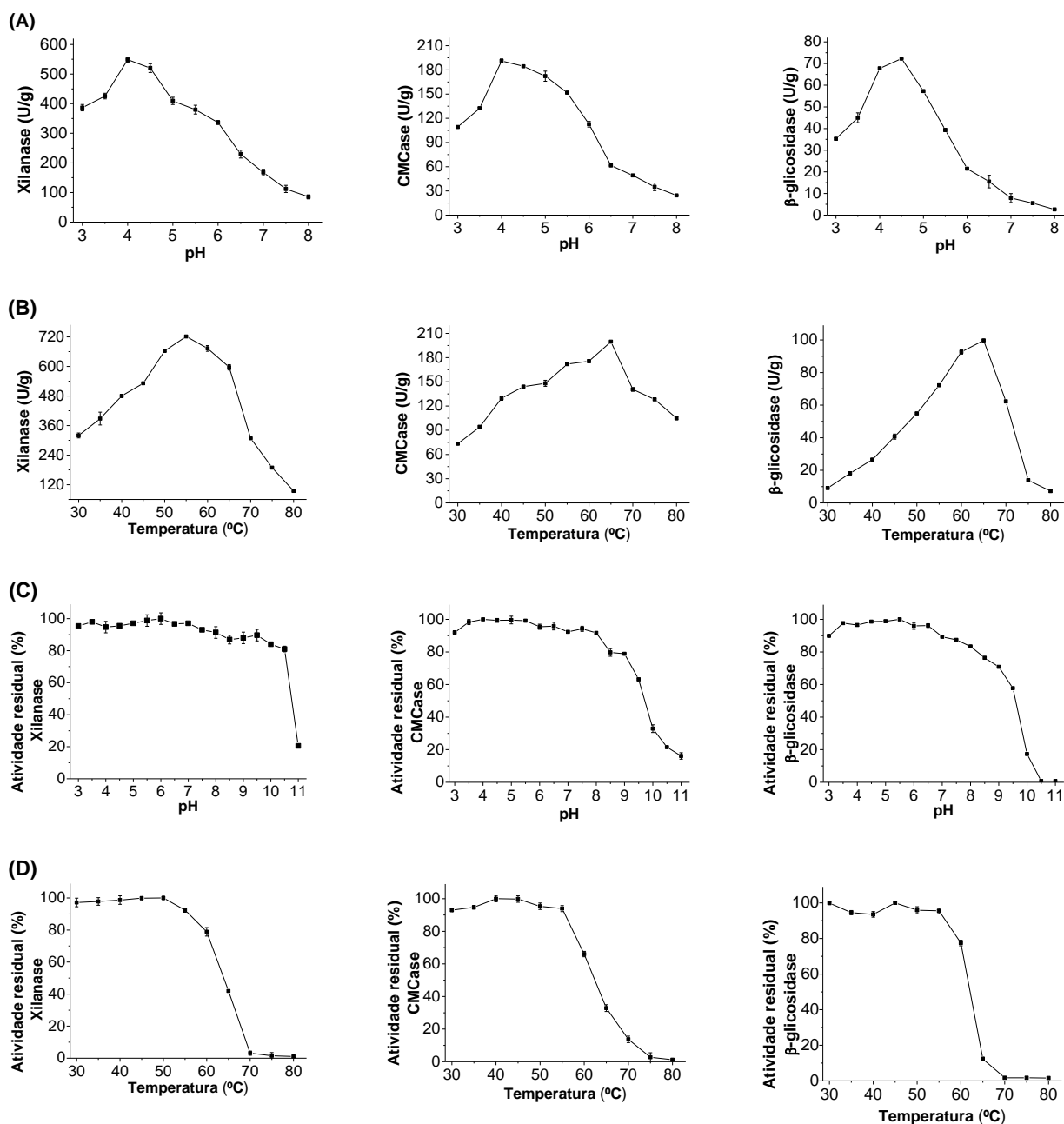
A estabilidade ao pH e à temperatura são características importantes para potenciais aplicações industriais das enzimas (PEREIRA et al., 2015). A estabilidade térmica elevada de celulasas é crucial, pois a hidrólise de celulose à temperaturas mais elevadas acontece de forma mais rápida (ROSENBERG 1975; PALMA-FERNANDEZ et al., 2002).

As xilanases de origem fúngica são mais ativas em pH entre 3,5 e 5,5 e são bastante estáveis numa faixa de pH de 3,0 a 10,0 (DEKKER, 1993), corroborando com os resultados obtidos neste estudo. Shah e Madamwar (2005) ao estudarem extrato produzido pelo fungo *Aspergillus foetidus*, observaram que a xilanase incubada a 60°C após 1 hora apresentou somente 20% da atividade original. Franco et al. (2004) estudaram o fungo *Trichoderma harzianum* T4, que produziu xilanase. Na avaliação da estabilidade térmica a enzima perdeu 50% da sua atividade original a 55°C após 45 minutos, enquanto que a 60°C sua meia-vida foi de 20 minutos. Querido et al. (2006) purificaram parcialmente uma xilanase produzida por *Penicillium expansum*, a xilanase foi estável em pH entre 5,5 e 6,5. A enzima manteve cerca de 78% em pH de 7,0, 50% em pH 9,0 e 30% em pH 4,0. Irfan e Syed (2012) purificaram

parcialmente uma xilanase produzida por *Trichoderma viride*-IR05. A estabilidade ao pH da enzima foi estudada através da incubação da enzima em diferentes pH à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após a incubação, a atividade da enzima foi verificada e os resultados mostraram que a enzima era estável no intervalo de pH 4,0 a 7,0 e estável na faixa de 30°C a 60°C após 30 minutos.

Dobrev e Zhekova (2012) estudaram a atividade de CMCase produzida pelo fungo *Aspergillus niger* B03. Quanto a estabilidade térmica, a enzima manteve 60% da atividade residual durante 45 minutos a 60°C em pH 3,0. Quanto ao pH, a atividade original de 80% foi detectada no intervalo de 2,5 a 4,5. Grigorevski-Lima et al. (2009) obtiveram o extrato enzimático bruto produzido por *Aspergillus niger*. A CMCase produzida manteve 100% da atividade original após 1 hora em temperatura entre 50 e 60°C. A CMCase bruta produzida por *Aspergillus fumigatus* manteve-se estável na faixa de pH 4,0 a 8,0 na temperatura de 50°C (LIU et al., 2011).

A  $\beta$ -glucosidase produzida por *Penicillium decumbens* foi purificada e caracterizada. A enzima foi estável em pH 5,0 mantendo 95% da atividade original após 18 horas. Na estabilidade térmica, reteve 96,3% da atividade original em 50°C durante 12 horas e em 70°C durante 4 horas manteve 50% da atividade original (CHEN et al., 2010). Kaur et al. (2007) purificaram uma  $\beta$ -glicosidase produzida a partir de *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. A enzima manteve 100% de sua atividade original em pH 5,0 e 6,0 em 200 minutos e 64% após 360 minutos de incubação a 50°C, ela foi menos estável a 60°C em pH 5,0 e perdeu atividade em mais de 80% após 30 minutos, já em pH 6,0 restou somente 55% da atividade original após 30 minutos. Cao et al. (2015) estudaram o fungo *Aspergillus fumigatus* WL002 que produziu  $\beta$ -glicosidase. A enzima purificada manteve 75 e 93% da atividade original durante 30 e 60 minutos em pH 8,0 e 9,5, respectivamente. Em relação a termoestabilidade, a enzima manteve cerca de 90 e 78% da sua atividade original durante 30 e 60 minutos a 50°C, respectivamente. No entanto, a atividade da enzima em temperaturas mais elevadas diminuiu rapidamente, 45,3% e 22,4% da sua atividade original após 30 e 60 minutos a 55°C, respectivamente.

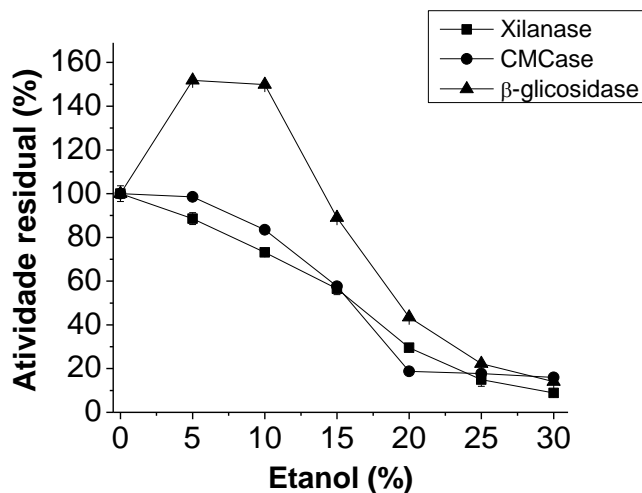


**Figura 5.** Efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática. (A) pH ótimo das enzimas. (B) Temperatura ótima das enzimas. (C) pH de estabilidade das enzimas após 24 horas de incubação a 25°C. (D) Estabilidade enzimática em função da temperatura após 1 hora de incubação.

### 3.4. Efeito de etanol sobre a atividade das enzimas

As enzimas avaliadas no presente estudo apresentaram considerável estabilidade na presença de etanol na mistura de reação, sendo obtido valores superiores a 70% da atividade catalítica inicial, para xilanase e CMCase, quando incubadas em concentrações de 10% de etanol. Concentrações de 5 e 10% de etanol potencializaram a atividade catalítica da enzima

$\beta$ -glicosidase, quando incubada em concentrações superiores, houve um decréscimo progressivo da atividade recuperada (Figura 6).



**Figura 6.** Efeito de etanol sobre a atividade das enzimas a 55°C.

A tolerância ao etanol é apreciável para celulasas e hemicelulasas, essas enzimas são importantes em diversos processos industriais que utilizam álcool, como por exemplo, a produção de biocombustíveis e bebidas (SUN; CHENG, 2002). De forma geral, as enzimas produzidas pela linhagem de *Penicillium* sp. apresentam potencial para esse tipo de aplicação, considerando que os processos tradicionais de fermentação alcoólica atinge até 10% de etanol nas etapas finais do processo, devido as limitações do próprio microrganismo fermentador (GU et al., 2001; GARCIA et al., 2015).

A ativação da  $\beta$ -glicosidase por etanol é comum e já foi citada por vários autores, como por exemplo, Kaur et al. (2007) com o fungo *Melanocarpus* sp., por Parry et al. (2001) com *Thermoascus aurantiacuse* por Santos et al. (2016) com a  $\beta$ -glicosidase de *Gongronella butleri*.

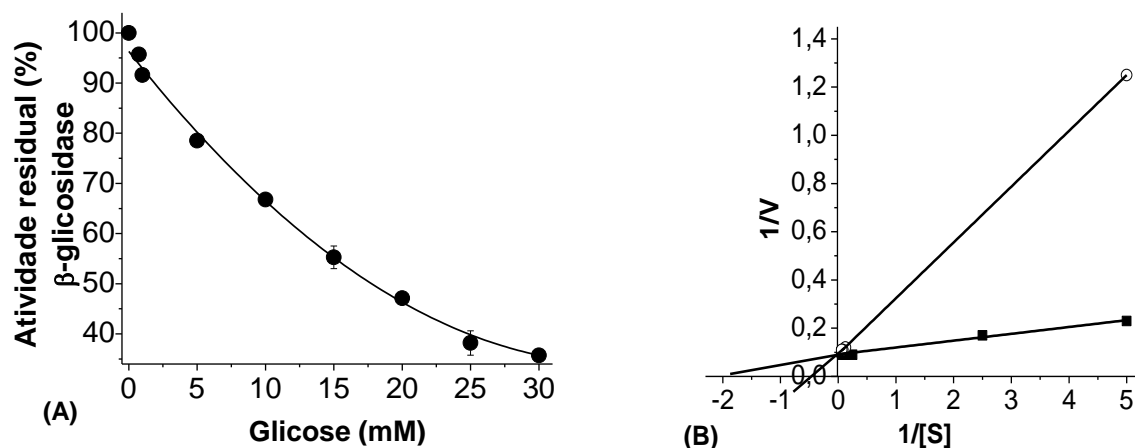
O aumento da atividade observado pode estar relacionada à atividade de transglicosilação ou glicosil-transferase. O etanol pode aumentar as taxas de reação atuando como aceptores preferenciais dos resíduos glicosil durante a catálise enzimática, substituindo a água na reação e dando origem a outros glicosídeos. A hidrólise e a transglicosilação ocorrem através de uma rota comum diferindo apenas na natureza doceptor final (água ou outra molécula), sendo que o etanol parece associar-se melhor ao sítio ativo dessas enzimas do que a água, o que explica o aumento da atividade da  $\beta$ -glicosidase. No entanto, em

elevadas concentrações, pode ocasionar desnaturação ou modificações conformacionais nas enzimas devido à alteração na polaridade do meio (PARRY et al., 2001; KAUR et al., 2007; BARBAGALLO et al., 2004; TAKÓ et al., 2010; KRISCH et al., 2012).

### 3.5. Efeito de glicose sobre a atividade da $\beta$ -glicosidase

A  $\beta$ -glicosidase foi exposta a diversas concentrações de glicose (0 a 30mM). A enzima foi fortemente inibida por glicose. Em soluções contendo 20mM de glicose foi recuperada apenas 49% da sua atividade catalítica original (Figura 7A). A maioria das  $\beta$ -glicosidases microbianas é inibida por glicose (inibidor), podendo ser classificada como competitiva ou não-competitiva (LEITE et al., 2008; SONIA et al., 2008; TAKÓ et al., 2010).

Sem inibidor	Com inibidor
$V_{m\acute{a}x} = 10,58$	$V_{m\acute{a}x} = 10,57$
$K_m = 0,28$	$K_m = 2,43$



**Figura 7.** (A) Efeito da concentração de glicose sobre a atividade da  $\beta$ -glicosidase. (B) Reversão da inibição à glicose demonstrada pela equação de Lineweaver-Burk.

O modelo cinético de Michaelis-Menten é um dos mais aceitos, seu objetivo é explicar a influência da concentração inicial de enzima e de substrato na velocidade inicial de reação enzimática, mas a mensuração da  $V_{m\acute{a}x}$  é complicada devido as altas concentrações de substrato. Desta forma, criou-se a equação de Lineweaver-Burk ou duplo-recíproco, uma derivação da equação de Michaelis-Menten, onde acontece a inversão da equação e a separação dos componentes do lado direito. E através da análise da cinética da reação pode-se descobrir qual o mecanismo de ação da reação com relação ao substrato (Figura 7B).

Com um inibidor competitivo, a reação irá atingir sua  $V_{max}$  normal, mas precisará de uma maior concentração de substrato, o  $V_{max}$  é constante na presença do inibidor devido à grande quantidade de substrato e o  $K_m$  aumenta. Os inibidores competitivos retardam o progresso da reação impedindo que o verdadeiro substrato se ligue ao sítio ativo da enzima. Apenas o inibidor competitivo ou o substrato pode estar ligado à enzima, ou seja, o inibidor e o substrato competem pela enzima.

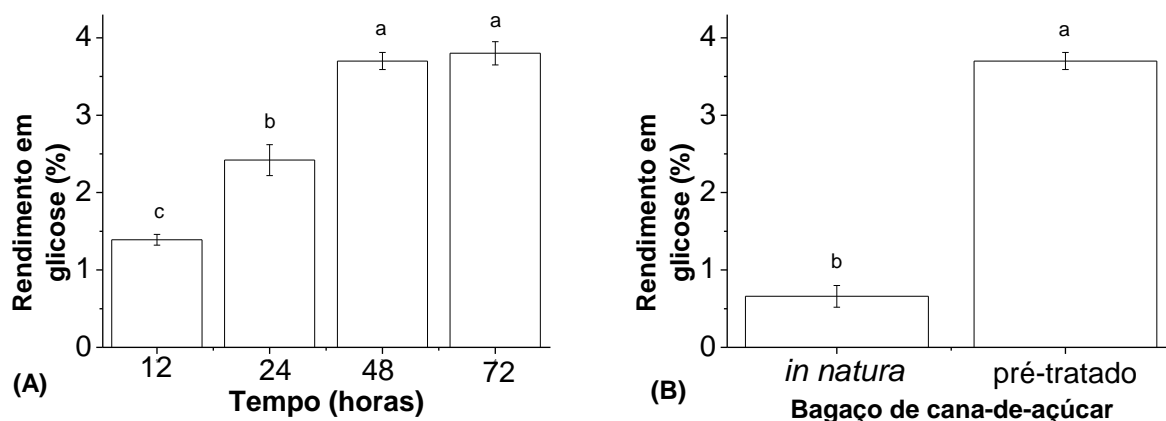
A inibição competitiva pode ser contornada pela adição periódica de substrato para mantê-lo em concentração superior aos níveis do inibidor (produto da ação enzimática), ou ainda, remover o produto formado pela ação da enzima (inibidor) mantendo-o em concentrações inferiores ao substrato (GARCIA et al., 2015).

As características descritas para a  $\beta$ -glicosidase do fungo *Penicillium* sp. (tolerância ao etanol e inibição competitiva por glicose) possibilitam sua aplicação em processo de sacarificação e fermentação simultâneas, visando obtenção de etanol a partir de biomassa vegetal. Neste tipo de processo, a glicose liberada pela hidrólise enzimática da celulose é simultaneamente convertida em etanol por microrganismos fermentadores, minimizando a inibição das enzimas do complexo celulolítico (SCOTT et al., 2013).

### **3.6. Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**

O extrato enzimático de *Penicillium* sp. foi utilizado para sacarificação do bagaço de cana devido às características discutidas anteriormente. Nessa etapa do estudo foram utilizados bagaço *in natura* e pré-tratado com glicerol previamente à sacarificação enzimática. O tempo da hidrólise foi variado de 0 a 72 horas. Em 48 horas, cerca de 3,7% da celulose contida no bagaço pré-tratado com glicerol foi convertida em glicose, em 72 horas 3,8% foi convertido em glicose, considerando o tempo, o melhor rendimento foi em 48 horas, visto que não há diferença significativa (Figura 8A). Já o rendimento obtido na hidrólise como o bagaço *in natura* nas mesmas condições, cerca de 0,7%, da celulose foi convertida em glicose, ressaltando a importância do tratamento químico anteriormente a aplicação do complexo enzimático (Figura 8B).





**Figura 8.** Rendimento em glicose após sacarificação enzimática do bagaço da cana-de-açúcar (A) Em relação ao tempo. (B) Utilizando bagaço *in natura* e pré-tratado com glicerol após 48 horas. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,01$ ) de acordo com o teste de Tukey.

De modo geral, a conversão de material lignocelulósico em etanol consiste em quatro operações principais: o pré-tratamento, a hidrólise, a fermentação e a separação/purificação do produto (MONSIER et al., 2005). Existem diferentes tecnologias de pré-tratamento devido à diversidade das fontes de biomassa. Eles podem ser classificados em biológicos, físicos, químicos e até mesmo a combinação desses métodos (ALVIRA et al., 2011).

No caso do bagaço de cana-de-açúcar, o pré-tratamento é necessário para promover o rompimento da matriz lignocelulósica, a desestruturação da lignina e hemicelulose é fundamental para facilitar o acesso das celulasas às fibras de celulose (PEREIRA et al., 2015).

O glicerol está entre os solventes orgânicos utilizados no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. Pode ser utilizado uma mistura de solventes orgânicos ou aquosos orgânicos com catalisadores de ácidos inorgânicos (HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para quebrar as ligações internas de lignina e hemicelulose (SUN, CHEN, 2002; AGBOR et al., 2011). Além do baixo custo, o glicerol é o principal subproduto da indústria de oleoquímicos, correspondem cerca 10% da produção total de biodiesel. Outra vantagem é que como solvente, reduz a viscosidade, penetra mais facilmente na biomassa e aumenta a remoção de lignina (SUN; CHENG 2008, PEREIRA et al., 2015).

Moretti et al. (2014) utilizaram extrato enzimático contendo celulasas produzidas por *Myceliophthora thermophila* M77 e um coquetel enzimático comercial para sacarificar bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado com micro-ondas e glicerol com rendimento em glicose de 4%. Seus resultados demonstram a proximidade aos obtidos no presente estudo e

confirmam a importância da etapa de pré-tratamento em bagaço de cana, visto que o rendimento em glicose é superior ao bagaço *in natura*.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que o fungo *Penicillium* sp. apresenta potencial para produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas em Fermentação em Estado Sólido tendo como substrato de baixo custo, o farelo de trigo. O tempo para produção das enzimas foi relativamente baixo, entre 72 e 120 horas, características apreciáveis para a redução do custo de produção. As características avaliadas demonstram que o conjunto de enzimas produzidas pelo fungo apresenta considerável potencial para aplicação em processos industriais, principalmente na sacarificação do bagaço da cana-de-açúcar, visando a obtenção de açúcares fermentescíveis.

#### 5. REFERENCIAS

ABDELLA, A.; MAZEED, T. E.S.; YANG, S. T.; EL-BAZ, A. F. Production of  $\beta$ -glucosidase by *Aspergillus niger* on wheat bran and glycerol in submerged culture: Factorial experimental design and process optimization. **Current Biotechnology**, v. 3, p. 197-206, 2014.

AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 675-685, 2011.

ALVES-PRADO, H. F.; LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D. A.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Cellulolytic enzymes isolated from Brazilian areas: production, characterization and applications. In: Adam E. Golan. (Org.). **Cellulase: Types and action, mechanism and uses**. 1ed, Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, Cap 6:178-206, 2011.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

ANTOINE, A. A.; JACQUELINE, D.; THONART, P. Xylanase production by *Penicillium canescens* on soya oil cake in Solid-state Fermentation. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 160, p. 50-62, 2010.

BARBAGALLO, R. N.; SPAGNA G.; PALMERI R.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, P. Selection, characterization and comparison of  $\beta$ -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 58-66, 2004.

BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state Fermentation: An overview. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 22, p. 49-70, 2008.

CAO, P.; WANG, L.; WANG, Y.; ZHOU, N.; CHEN, Y. Alkali-tolerant  $\beta$ -glucosidase produced by newly isolated *Aspergillus fumigatus* WL002 from rotten wood. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, p. 276-282, 2015.

CASTRO, A. M. de; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CHEN, M.; QIN, Y.; LIU, Z.; LIU, K.; WANG, F.; QU, Y. Isolation and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 444-449, 2010.

CHEN, W. H.; YE, S. C.; SHEEN, H. K. Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment. **Applied Energy**, v.93, p. 237-244, 2012.

DECKER, C. H.; VISSER, J.; SCHREIER, P.  $\beta$ -glucosidases from five black *Aspergillus* species: Study of their physic-chemical and biocatalytic properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4929-4946, 2000.

DEKKER, R. F. H. Bioconversion of hemicellulose: aspects of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymic saccharification of hemicellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 1127-1146, 1993.

DEMIR, H.; TARI, C. Bioconversion of wheat bran for polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* in tray type Solid-state Fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 106, p. 60-66, 2016.

DHILLON, G. S.; KAUR, S.; BRAR, S. K.; VERMA, M. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through Solid-state Fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 6-13, 2012.

DOBREV, G. T.; ZHEKOVA, B. Y. Biosynthesis, purification and characterization of endoglucanase from a xylanase producing strain *Aspergillus niger* B03. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 70-77, 2012.

EL-SHISHTAWY, R. M.; MOHAMED, S. A.; ASIRI, A. M.; GOMAA, A. M.; IBRAHIM, I. H.; AL-TALHI, H. A. Solid fermentation of wheat bran for hydrolytic enzymes production and saccharification content by a local isolate *Bacillus megatherium*. **BMC Biotechnology**, v. 14, p. 1-8, 2014.

FRANCO, P. F.; FERREIRA, H. M.; FILHO, E. X. F. Production and characterization of hemicellulase activities from *Trichoderma harzianum* strain T4. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 40, p. 255-259, 2004.

GARCIA, N. F. L.; SANTOS, F. R. S.; GONÇALVES, F. A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production of  $\beta$ -glucosidase on Solid State Fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial waste: Characterization and catalytic properties of the enzyme extract. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 314-319, 2015.

GOMES, E.; UMSZA-GUEZ, M. A.; MARTIN, N.; DA-SILVA, R. Enzimas termoestáveis: Fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, p.136-145, 2007.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. D. S. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, p. 72-78, 2010.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L.; DA VINHA, F. N. M.; SOUZA, D. T.; BISPO, A. S. R.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R.; NASCIMENTO, R. P. *Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglucanases. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 155, p. 321-329, 2009.

GU, Y.; QIAO, M.; ZHOU, Q.; ZHOU, Z.; CHEN, G. Hyperproduction of alcohol using yeast fermentation in highly concentrated molasses medium. **Tsinghua Science and Technology**, v. 3, p. 225-30, 2001.

HUANG, Y.; QIN, X., LUO, X. M.; NONG, Q.; YANG, Q.; ZHANG, Z.; GAO, Y.; LV, F.; CHEN, Y.; YU, Z.; LIU, J. L.; FENG, J. X. Efficient enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse pulp for ethanol production by cellulase from *Penicillium oxalicum* EU2106 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* ZM1-5. **Biomass & Bioenergy**, v. 77, p. 53-63, 2015.

IRFAN, M.; SYED, Q. Partial purification and characterization of xylanase from *Trichoderma viride* produced under SSF. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 5, p. 7-11, 2012.

KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for Solid-state Fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 207-213, 2003.

KAUR, J.; CHADHA, B. S.; KUMAR, B. A.; KAUR, G. S.; SAINI H. S. Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.10.p. 260-270, 2007.

KAUSHIK, P.; MISHRA, A.; MALIK, A. Dual application of agricultural residues for xylanase production and dye removal through Solid State Fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 96, p. 1-8, 2014.

KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KRISCH, J.; BENCSIK, O.; PAPP, T.; VÁGVÖLGYI, C.; TAKÓ, M. Characterization of a  $\beta$ -glucosidase with transgalactosylation capacity from the zygomycete *Rhizomucor miehei*. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 555-560, 2012.

KUMAR, D. S; RAY, S. Fungal lipase production by Solid State Fermentation- An overview. **Journal of Analytical Bioanalytical Techniques**, v. 6, p. 1-10, 2014.

LAOTHANACHAREON, T.; BUNTERNGSOOK, B.; SUWANNARANGSEE, S.; EURWILAICHITR, L.; CHAMPREDA, V. Synergistic action of recombinant accessory hemicellulolytic and pectinolytic enzymes to *Trichoderma reesei* cellulase on rice straw degradation. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 682-690, 2015.

LEGLIMI, H.; DJEZZAR-MIHOUBI, I.; BOUKHALFA-LEZZAR, H.; DAKHMOUCH, S.; BENNAMOUN, L.; MERAIHI, Z. Improvement of Fungal Cellulase Production by Solid State Fermentation. **International Journal of Sciences**, v. 6, p. 46-51, 2017.

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

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; WU, H.; XU, D.; TANG, Z.; SHEN, Q. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under Solid-state Fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p.717-725, 2011.

MERHEB-DINI, C.; CABRAL, H.; LEITE, R. S. R.; ZANPHORLIN, L. M.; OKAMOTO, D. N.; RODRIGUEZ, G. O. B.; JULIANO, L.; ARANTES, E. C.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9210-9217, 2009.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORETTI, M. M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; NUNES, C. C. C.; VILLENA, M. A.; PERRONE, O. M.; DA-SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. **Applied Energy**, v. 122, p. 189-195, 2014.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. R. Production of cellulases by Solid State Fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 355-361, 2012.

OLIVEIRA, A. P. A.; SILVESTRE, M. A.; GARCIA, N. F. L.; ALVES-PRADO, H. F.; RODRIGUES, A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production and catalytic properties of amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by Solid-State Fermentation. **The Scientific World Journal**, p. 1-10, 2016.

PALMA-FERNANDEZ, E. R.; GOMES, E.; DA-SILVA R. Purification and characterization of two  $\beta$ -glucosidases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Folia Microbiologica**, v. 47, p. 685-690, 2002.

PANDEY, A. Solid-State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PARRY, N. J.; BEEVER, D. E.; OWEN, E.; VANDENBERGHE, I.; VAN BEEUMEN J.; BHAT, M. K. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable  $\beta$ -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. **Biochemical Journal**, v. 353, p. 117-127, 2001.

PEREIRA, J. C.; MARQUES, N. P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, T. B.; BOSCOLO, M.; DA-SILVA, R.; GOMES, E.; BOCCHINI-MARTINS, D. A. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 928-939, 2015.

QUERIDO, A. L. S.; COELHO, J. L. C.; ARAÚJO, E. F.; CHAVES-ALVES, V. M. Partial purification and characterization of xylanase produced by *Penicillium expansum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 475-480, 2006.

RAEDER, J.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, p. 17-20, 1985.

RANI, R.; GHOSH, S. Production of phytase under Solid-State Fermentation using *Rhizopus oryzae*: Novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10641-10649, 2011.

ROSENBERG, S. L. Temperature and pH optima for 21 species of thermophilic and thermotolerant fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v.21, p. 1535-1540, 1975.

SAELEE, K.; YINGKAMHAENG, N.; NIMCHUA, T.; SUKYAI, P. An environmentally friendly xylanase-assisted pretreatment for cellulose nanofibrils isolation from sugarcane bagasse by high-pressure homogenization. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p.149-160, 2016.

SAHA, S. P.; GHOSH, S. Optimization of xylanase production by *Penicillium citrinum* xym2 and application in saccharification of agro-residues. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 88-196, 2014.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4.p. 406-425, 1987.

SANTOS, F. R. S.; GARCIA, N. F. L.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Gongronella butleri* by Solid-State Fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 633-641, 2016.

SCOTT, F.; QUINTERO, J.; MORALES, M.; CONEJEROS, R.; CARDONA, C.; AROCA, G. Process design and sustainability in the production of bioethanol from lignocellulosic materials. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 1-16, 2013.

SENTHILKUMAR, S.R.; ASHOKKUMAR, B.; CHANDRA-RAJ, K.; GUNASEKARAN, P. Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in Solid-State Fermentation using central composite rotary design. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1380-1386, 2005.

SHAH, A. R.; MADAMWAR, D. Xylanase production under Solid-State Fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 233-243, 2005.

SHALLOM, D.; Y, SHOHAM. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 219-228, 2003.

SHEN, F.; KUMAR, L.; HU, J.; SADDLER J. N. Evaluation of hemicellulose removal by xylanase and delignification on SHF and SSF for bioethanol production with steam-pretreated substrates. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8945-8951, 2011.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **World Congress on Computers in Agriculture**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SINGHANIAA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in Solid-State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SOHAIL, M.; SIDDIQI, R.; AHMAD, A.; KHAN, S. A. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: Effect of temperature and pH. **New Biotechnology**, v. 25, p. 437-441, 2009.

SONIA, K. G.; CHADHA, B. S.; BADHAN, A. K.; SAINI, H. S.; BHAT, M.K. Identification of glucose tolerant acid active  $\beta$ -glucosidases from thermophilic and thermotolerant fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 599-604, 2008.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

SUN, F.; CHEN, H. Organosolv pretreatment by crude glycerol from oleochemicals industry for enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5474-5479, 2008.

TAKÓ, M.; TÓTH, A.; NAGY L. G. ; KRISCH ,J.; VÁGVÖLGYI, C;. PAPP ,T. A new  $\beta$ -glucosidase gene from the zygomycete fungus *Rhizomucor miehei*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, p. 1-10, 2010.

TAMURA K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

XIN, F.; HE, J. Characterization of a thermostable xylanase from a newly isolated *Kluyvera* species and its application for biobutanol production. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 309-315, 2013.

ZHANG, W.; SATHITSUKSANO, N.; BARONE, J. R.; RENNECKAR, S. Enhanced enzymatic saccharification of pretreated biomass using glycerol thermal processing (GTP). **Bioresource Technology**, v. 199, p. 148-154, 2016.



## CAPITULO III

**XILANASE DE *Gongronella butleri*: PRODUÇÃO, PROPRIEDADES CATALÍTICAS E POTENCIAL INDUSTRIAL****RESUMO**

A xilana é o principal componente da hemicelulose. É caracterizada por apresentar composição variável e ramificada, sendo necessário um sistema de enzimas específicas para sua degradação completa. A hidrólise enzimática da cadeia principal da xilana envolve a ação de endoxilanases e  $\beta$ -xilosidases, as ramificações são hidrolisadas por enzimas auxiliares. Uma das principais aplicações das xilanases é como auxiliares no branqueamento da polpa *Kraft* pela indústria de papel e celulose. Essas enzimas podem ser obtidas através da Fermentação em Estado Sólido (FES). O presente estudo teve por objetivo avaliar a produção e caracterização de xilanase do fungo *Gongronella butleri* utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substrato. Os resultados obtidos indicam que o farelo de trigo foi o melhor substrato na produção da enzima em 60% de umidade inicial a 25°C por 96 horas de cultivo (4.303,96 U/g). A enzima exibiu pH ótimo 4,0 e temperatura ótima a 50°C, e ampla faixa de estabilidade quanto ao pH (3,0 a 10,0) e temperatura (25 a 50°C). Apresentou 60% da atividade original quando incubada em 10% de etanol. Análises em cromatografia em camada delgada (sílica gel P60) revelaram a liberação predominantemente de monossacarídeos (xilose), caracterizando a ocorrência de hidrólise total do substrato, provavelmente por ação sinérgica de endoxilanases e  $\beta$ -xilosidases.

**Palavras-chave:** Enzimas xilanólíticas, polpa *kraft*, biobranqueamento.

## ABSTRACT

Xylan is the major component of hemicellulose. It is characterized by variable and branched composition, and a specific enzyme system is required for its complete degradation. Enzymatic hydrolysis of the xylan backbone involves the action of endoxylanases and  $\beta$ -xylosidases, the branching is hydrolyzed by auxiliary enzymes. One of the main applications of xylanases is as auxiliaries in the bleaching of Kraft pulp by the pulp and paper industry. These enzymes can be obtained through Solid State Fermentation (SSF). The present study had as objective to evaluate the production and characterization of xylanase of the fungus *Gongronella butleri* using different agroindustrial residues as substrate. The results obtained indicate that wheat bran was the best substrate for enzyme production in 60% initial moisture at 25°C for 96 hours of cultivation (4,303.96 U/g). The enzyme presented optimum pH 4.0 and optimum temperature at 50°C, and presented stability to pH (3.0 to 10.0) and temperature (25 to 50°C). E presented 60% of the original activity when incubated in 10% ethanol. Analyzes in thin layer chromatography (silica gel P60) revealed the predominance of monosaccharides (xylose), characterizing the occurrence of total hydrolysis of the substrate, probably by synergistic action of endoxylanases and  $\beta$ -xylosidases.

**Keywords:** Xylanolytic enzymes, kraft pulp, bio-bleaching.

## 1. INTRODUÇÃO

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo cuja cadeia principal é formada por resíduos de xilose unidos por ligações  $\beta$ -1,4 (xilana), contendo ramificações laterais de pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose) e ácidos urônicos (DOGARIS et al., 2013; COSTA et al., 2016).

As hemiceluloses são classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. A hemicelulose se liga firmemente entre si e à superfície das microfibrilas de celulose, dificultando a ação das celulases durante o processo de sacarificação (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

A hidrólise enzimática da cadeia principal da hemicelulose envolve a ação de pelo menos dois grupos de enzimas: endo 1,4- $\beta$ -D-xilanase (EC 3.2.1.8) e  $\beta$ -D-xilosidase (EC 3.2.1.37). As endoxilanases clivam ligações glicosídicas internas da cadeia principal da xilana, acarretando na diminuição do grau de polimerização do substrato, produzindo xilooligômeros e xilobiose. Os xilooligômeros e xilobiose produzidos pela ação das endoxilanases são hidrolisados por  $\beta$ -xilosidases que liberam xilose (SAKTHISELVAN et al. 2014). As ramificações da cadeia são hidrolisadas pelas enzimas auxiliares, como  $\alpha$ -D-glucuronidase (EC 3.2.1.131),  $\alpha$ -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) e acetil-xilana-esterase (EC 3.1.1.72), esterases de ácido ferúlico (EC 3.2.1.73), p-cumaroilesterases (EC 3.2.1.73), entre outras (ADHYARU et al., 2014; SAKTHISELVAN et al., 2014; BENASSI et al., 2014).

Uma das maiores aplicações das xilanases é como auxiliares no branqueamento da polpa *Kraft* pela indústria de papel e celulose, reduzindo a utilização de agentes químicos que são empregados na remoção da lignina residual (SILVA et al., 2015). Essas enzimas podem ainda ser utilizadas em vários processos industriais, tais como, na produção de ração, na panificação e na clarificação de sucos. Em ação com outras enzimas podem ser empregadas na geração de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica, como etanol e xilitol (ADHYARU et al., 2014; ADHYARU et al., 2016; GUAN et al., 2016; GUIMARÃES et al., 2013).

A Fermentação em Estado Sólido (FES) é um método atraente para a produção de xilanase, especialmente para culturas fúngicas, apresentando vantagens, como boa produtividade e reduzido custo de operação. A formulação de meios sintéticos é muito onerosa, portanto é necessário explorar fontes mais baratas para a produção de enzimas, como os resíduos agroindustriais. Além disso, pode-se otimizar os parâmetros de produção para

cada microrganismo e conduzir a melhores produções enzimáticas (YANG et al., 2006; ADHYARU et al., 2014).

Recentemente nosso grupo de pesquisa isolou uma linhagem fúngica identificada como *Gongronella butleri* com elevado potencial para produção de xilanase e reduzida produção de enzimas celulolíticas, mesmo quando cultivado em resíduos agroindustriais como substrato (SANTOS et al., 2016). Tais características são extremamente desejáveis para aplicação de xilanases na indústria de papel e celulose, no qual estimulou o desenvolvimento do presente estudo, que teve como objetivo analisar os parâmetros fermentativos para a produção de xilanases em FES, variando parâmetros de cultivo como, diferentes substratos, umidade, temperatura e tempo de cultivo. As enzimas foram caracterizadas quanto ao pH, temperatura e tolerância ao etanol. O produto de hidrólise da xilana foi confirmado por cromatografia em camada delgada.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. Microrganismo utilizado**

Neste trabalho foi utilizado o fungo filamentosso mesófilo *Gongronella butleri* isolado de amostras de solo coletadas do Bioma Cerrado (Centro-Oeste brasileiro - 22°10'49.2''S 54°56'57.4W), localizado na região de Dourados/MS (SANTOS et al., 2016). A referida linhagem foi identificada pela Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) da Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas - SP. O microrganismo foi cultivado a 28°C em meio ágar Sabouraud Dextrose e mantido a 4°C.

### **2.2. Produção de xilanase por Fermentação em Estado Sólido (FES)**

**2.2.1. Inóculo:** O microrganismo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio, mantido por 48 horas a 28°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% nitrato de cálcio m/v) (MERHEB-DINI et al., 2009). A inoculação do fungo nos resíduos agroindustriais se deu pela transferência de 5 mL desta suspensão ( $1 \times 10^5$  esporos por grama de substrato seco) nos resíduos agroindustriais previamente autoclavados.

2.2.2. *Fermentação em Estado Sólido (FES)*: Diferentes resíduos agroindustriais foram avaliados para produção de hemicelulases: farelo de trigo, farelo de soja, casca de arroz, sabugo de milho e palha de milho. Anteriormente a inoculação do microrganismo, todos os substratos foram lavados com água destilada e posteriormente secos em estufa a 50°C por 48 horas. A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 5 g de substratos esterilizados a 121°C durante 20 minutos. Inicialmente, todos os substratos foram umedecidos a 60% com solução nutriente (descrita anteriormente). Após a inoculação do microrganismo, os frascos Erlenmeyer foram mantidos a 28°C por 96 horas. O substrato que apresentou melhor produção da enzima foi adotado para a avaliação de outros parâmetros fermentativos (umidade, temperatura e tempo cultivo), sendo adotada a condição ótima de cada experimento, nos ensaios subsequentes. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados expressos como U/g referem-se a unidade de enzima por grama de substrato seco (GARCIA et al., 2015).

2.2.3. *Extração da enzima*: Para a extração da enzima foram adicionados 50 mL de água destilada nos resíduos agroindustriais fermentados, sendo mantidos em agitação por 1 hora a 150 rpm. Posteriormente, todo conteúdo foi filtrado em tecido sintético (nylon) e centrifugado a 1500 x g por 5 minutos a 5°C. O sobrenadante foi denominado extrato enzimático e utilizados nos ensaios subsequentes (SANTOS et al., 2016).

### **2.3. Determinação da atividade de xilanase**

O substrato para quantificação de xilanase foi preparado a partir de xilana “*Beechwood*” a 0,5% em solução-tampão acetato de sódio a 0,1M, no pH 4,5. A atividade enzimática foi determinada pela adição de 900 µL desse substrato com 100 µL do filtrado enzimático, reagindo por 10 minutos na temperatura de 50°C, foi adicionado 1 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) para paralisar a reação e colocado em banho de ebulição a 100°C por 10 minutos, posteriormente em banho de gelo e adicionado 8 mL de água destilada. O açúcar redutor liberado foi quantificado a 540 nm pelo método de DNS (MILLER, 1959), usando curva padrão de xilose. A atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima que produz 1 µmol de xilose por minuto de reação (ALVES-PRADO et al., 2010).

#### 2.4. Efeito do pH e temperatura

O pH ótimo foi determinado através da atividade da enzima a 50°C em diferentes valores de pH (3,0 a 8,0), utilizando tampão McIlvine a 0,1M. A temperatura ótima foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em temperaturas de 30 a 80°C, no pH ótimo da enzima. A estabilidade da enzima ao pH foi avaliada incubando-a por 24 horas a 25°C em diferentes valores de pH (3,0 a 11,0). Os tampões utilizados para o pH foram: McIlvine 0,1M (3,0 a 8,0), Tris-HCl 0,1M (8,0 a 8,5) e Glicina-NaOH 0,1M (8,5 a 11,0). A termoestabilidade foi estudada incubando a enzima por 1 hora em diferentes valores de temperatura (30 a 80°C). O tempo de meia vida da enzima foi avaliado incubando a enzima em sua temperatura ótima e alíquotas foram removidas a cada 15 minutos. As atividades residuais foram mensuradas nas condições ótimas de pH e temperatura da enzima (GARCIA et al., 2015).

#### 2.5. Potencial catalítico do extrato enzimático

A atividade de CMCase foi quantificada utilizando 3% de carboximetilcelulose (Sigma C5678), seguindo a metodologia descrita no item 2.3. A atividade de  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase foram determinadas pela adição de 50  $\mu$ L do filtrado enzimático, 250  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4,5 e 250  $\mu$ L de p-nitrofenil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo 4mM (pNP $\beta$ G, Sigma) para  $\beta$ -glicosidase e p-nitrofenol- $\beta$ -D-xilopiranosídeo 4mM (PNPX, Sigma) para  $\beta$ -xilosidase, reagindo por 10 minutos a temperatura de 50°C. A reação enzimática foi paralisada com 2 mL de carbonato de sódio 2M. O p-nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. A atividade de celulase em papel de filtro (FPase) foi avaliada, como proposto por Ghose (1987), em mistura de reação composta por 1,0 mL de tampão acetato 0,1M, pH 4,5, fita de papel de filtro Whatman nº1 de 1,0 x 6,0 cm e 500  $\mu$ L de extrato enzimático, reagindo por 10 minutos na temperatura de 50°C, foi adicionado 3 mL de DNS para paralisar a reação e colocado em banho de ebulição a 100°C por 10 minutos, posteriormente em banho de gelo e adicionado 20 mL de água destilada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1  $\mu$ mol de produto por minuto de reação (PEREIRA et al., 2015; GARCIA et al., 2015).

## 2.6. Cromatografia em Camada Delgada Sílica-Gel P60

O produto de hidrólise da xilana “Beechwood” pela ação do extrato enzimático em diferentes tempos de reação foi confirmado por cromatografia em camada delgada de sílica-gel P60 (*Macherey-Nagel*). Foram coletadas frações das amostras através de capilar de 10 e 20 minutos de um ensaio enzimático conduzido em banho-maria a 50°C contendo 900 µL de xilana a 0,5% em solução-tampão acetato de sódio a 0,1M, no pH 4,0 com 100 µL do extrato enzimático. Estas frações foram aplicadas no cromatofolha juntamente com xilose a 0,1% e xilana a 0,1%, que foram utilizados como padrões. O sistema de solvente utilizado foi constituído de n-butanol/etanol/água destilada (5:3:2 v/v/v). A cromatografia foi revelada com orcinol 0,2 % em metanol e ácido sulfúrico (9:1 v/v) e exposto ao calor (100°C) por aproximadamente 2 minutos (SILVA et al., 2013).

## 2.7. Efeito de etanol

A atividade enzimática da xilanase foi quantificada com a adição de etanol em diferentes concentrações na mistura de reação (0 a 30% de etanol). Os ensaios foram realizados sob condições ótimas de pH e temperatura (PEREIRA et al., 2015).

## 2.8. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foi aplicado desvio padrão. A análise estatística dos dados dos experimentos incluiu uma ANOVA, seguida pelo teste Teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas no *software* Assistat 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009).

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

## 3.1. Produção de xilanase por Fermentação em Estado Sólido (FES)

Dentre os substratos avaliados (resíduos agroindustriais) para produção de xilanase pelo fungo filamentoso *Gongronella butleri*, o melhor substrato para produção da enzima foi o farelo de trigo, a melhor atividade enzimática foi 3.474,05 U/g de substrato seco, após 96

horas da incubação. Quando comparado ao farelo de trigo, os demais resíduos testados induziram fracamente a produção da enzima e não tiveram diferenças estatísticas significativas entre si (Tabela 1). Em razão desses resultados, o farelo de trigo foi selecionado como substrato para os cultivos subsequentes.

**Tabela 1.** Produção de xilanase por *Gongronella butleri* em diferentes substratos por FES, contendo 60% de umidade inicial, temperatura de 28°C por 96 horas de cultivo.

<b>Substrato (resíduo agroindustrial)</b>	<b>Xilanase (U/g substrato seco)</b>
<b>Casca de arroz</b>	39,51±7,34 <sup>b</sup>
<b>Farelo de trigo</b>	3.474,05±340,15 <sup>a</sup>
<b>Farelo de soja</b>	20,40±2,04 <sup>b</sup>
<b>Palha de milho</b>	252,56±2,855 <sup>b</sup>
<b>Sabugo de milho</b>	323,42±65,715 <sup>b</sup>

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,01$ ) de acordo com o teste de Tukey.

O farelo de trigo é considerado matéria-prima de baixo custo para a produção de enzimas industriais (DEMIR; TARI, 2016). Rico em fonte de carbono, nitrogênio (GOTTSCALK et al., 2013), carboidratos, proteínas, gorduras e vitaminas (GUAN et al., 2016; KAUR et al., 2011a). Diversos estudos relatam a produção de xilanase em cultivos utilizando farelo de trigo (AGNIHOTRI et al., 2010, KAUR et al., 2011b, NEOH et al., 2015, GUAN et al., 2016; EL-SHISHTAWY et al., 2014, ABDELLA et al., 2014). O farelo de trigo simula o *habitat* natural dos fungos filamentosos, sendo um suporte para adesão miceliar, além disso, apresenta grande área de superfície e circulação de ar. Por essas características se mostrou o melhor substrato para produção de xilanase.

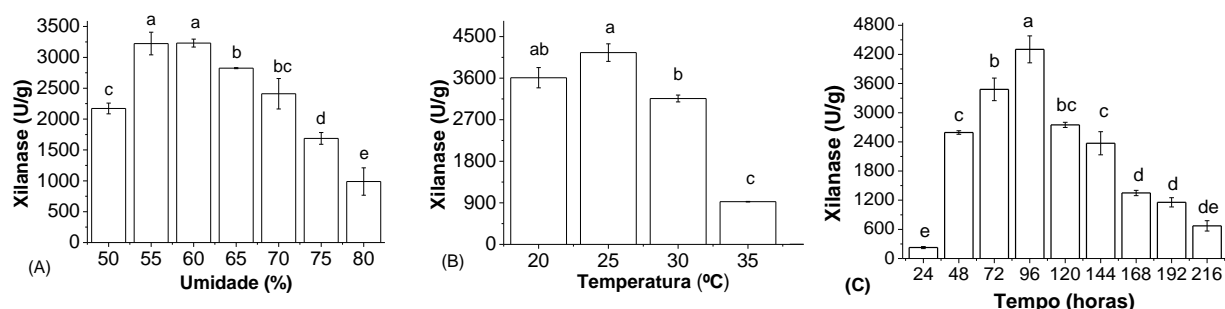
Na avaliação da umidade inicial do meio de cultivo, os resultados obtidos indicam que a umidade necessária para o crescimento do fungo *Gongronella butleri* para produção enzimática variam entre 55 e 60%, em valores absolutos, 3.223,66 e 3.231,62 U/g respectivamente, não apresentando diferença estatística significativa (Figura 1A).

O nível de umidade no meio é importante para o crescimento microbiano e para a biossíntese do produto, a umidade tem influência sobre as propriedades físicas do substrato sólido. O aumento do nível de umidade pode causar a diminuição da porosidade, menor transferência de oxigênio e alteração da estrutura das partículas do substrato, enquanto que um nível baixo de umidade pode acarretar o ineficiente acesso do microrganismo aos nutrientes, impedindo seu crescimento e formação de produtos (KAUR et al., 2011b).



Na avaliação da temperatura de cultivo, as maiores produções enzimáticas foram alcançadas quando o microrganismo foi cultivado em temperaturas entre 20°C e 30°C. O pico de produção da xilanase foi em 25°C, cerca de 4.151,45 U/g, diminuindo a produção enzimática com o aumento da temperatura, com uma produção desconsiderável a 40°C, 2,87 U/g (Figura 1B). Ao longo do processo a temperatura pode aumentar devido à atividade metabólica do microrganismo. Geralmente, os substratos utilizados em FES têm baixa condutibilidade térmica, o que causa a diminuição da remoção de calor no meio e aumenta sua acumulação, o que pode interferir no rendimento final do produto, mas esse perfil de curva de temperatura é o esperado para microrganismos mesófilos (BHARGAV et al., 2008).

Na avaliação do tempo de cultivo para produção de xilanase, as amostras foram retiradas a cada 24 horas, perfazendo um total de 216 horas. A maior produção de xilanase foi obtida em 96 horas de cultivo, 4.303,96 U/g (430,03 U/mL), reduzindo para quase metade da produção em 144 horas (2.370,75 U/g), decaindo significativamente a atividade ao longo do cultivo, que atingiu produção de 671,18 U/g em 216 horas de cultivo (Figura 1C).



**Figura 1.** Produção de xilanase pelo fungo *Gongronella butleri* em farelo de trigo por FES após 96 horas de cultivo. (A) Influência da umidade inicial do meio. (B) Influência da temperatura de cultivo. (C) Em relação ao tempo de cultivo. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,01$ ) de acordo com o teste de Tukey.

O declínio após atingir a máxima produção, pode ser devido ao esgotamento de nutrientes disponíveis no meio para o microrganismo, o que resulta na diminuição da produção enzimática (SIMÕES et al., 2009). Na Tabela 2 pode ser comparada a produção de xilanase por diversos microrganismos. Muitos autores têm relatado altas produções de xilanase em farelo de trigo, sendo economicamente mais vantajoso pelo reduzido tempo de cultivo.

**Tabela 2.** Produção de xilanase por diferentes microrganismos em FES utilizando farelo de trigo como substrato.

Microrganismo	Xilanase		Tempo (horas)	Autores
	U/g	U/mL		
<i>Gongronella butleri</i>	4.303,96	430,03	96	Este trabalho
<i>Aspergillus fischeri</i>	1.024		72	Senthilkumar et al.(2005)
<i>Neosartorya spinosa</i> P2D19		0,60	72	Alves-Prado et al. (2010)
<i>Coprinopsi scinerea</i> HK-1 NFCCI-2032		95,80	168	Kaur et al. (2010b)
<i>Coprinellus disseminatus</i> SW-1 NTCC 1165		69,45	168	Agnihotri et al. (2010)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.055		120	Delabona et al. (2012)
<i>Aspergillus japonicus</i>	1.004		72	Li et al. (2015)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	1.701		120	Costa et al. (2016)
<i>Cladosporium oxysporum</i>		2,94	120	Guan et al. (2016)

### 3.2. Caracterização físico-química da xilanase

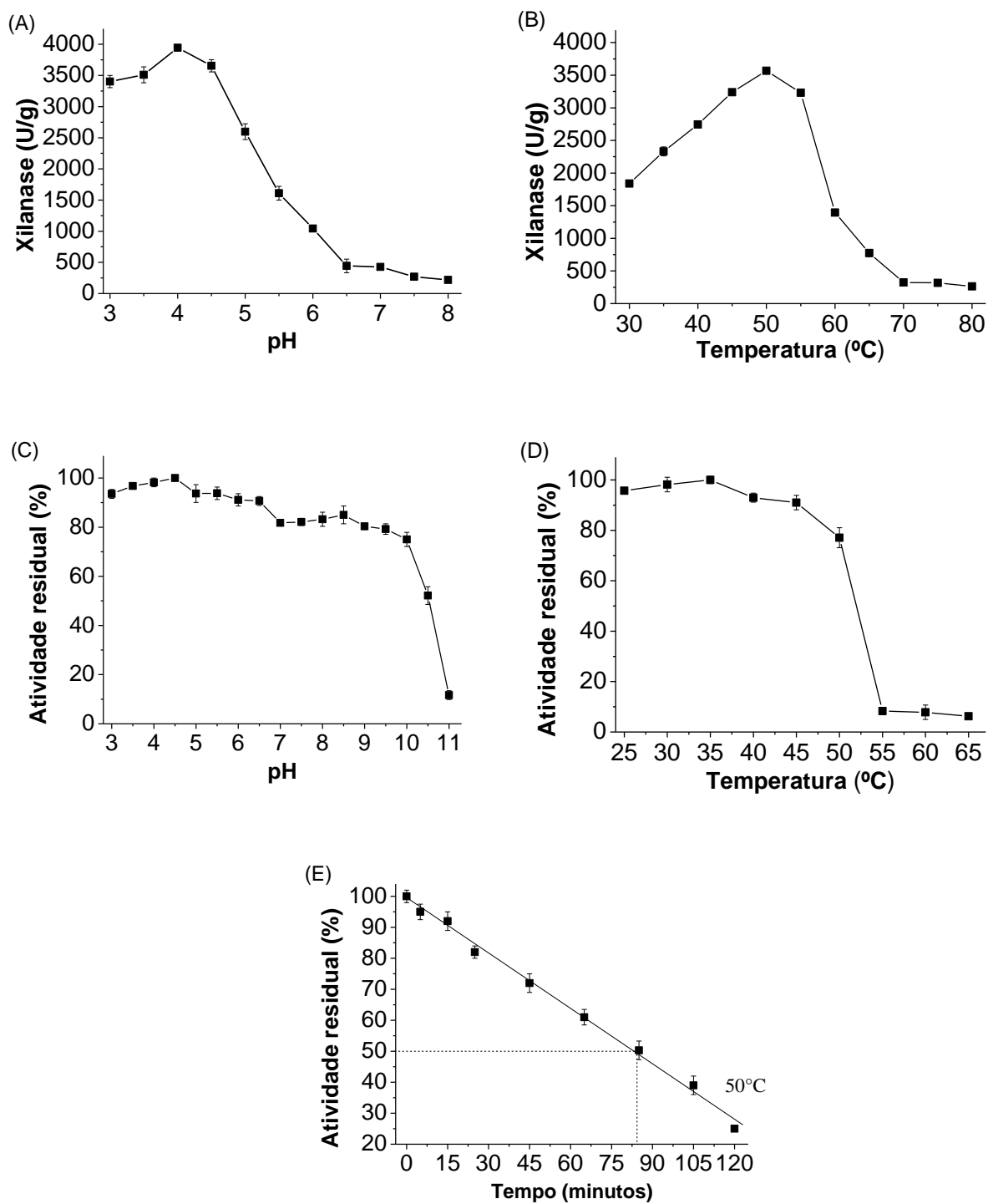
#### 3.2.1. Efeito do pH e temperatura

Os estudos para a caracterização da enzima produzida foram realizados utilizando o extrato enzimático obtido pelo cultivo do fungo *Gongronella butleri* em FES nas condições ótimas. A xilanase atuou melhor entre pH 3,0 e 4,5, apresentando pico de atividade em pH 4,0 (Figura 2A). Resultados semelhantes são encontrados na literatura; Bakir et al. (2001) relataram uma endoxilanase produzida por *Rhizopus oryzae* que mostrou pH ótimo em 4,5. Altaf et al. (2016) cultivaram o microrganismo *Pleurotus eryngii*, esse fungo produziu uma xilanase que mostrou maior atividade em pH 4,5. A xilanase produzida pelos microrganismos *Trichoderma harzianum* 1073 D3 (SEYIS; AKSOZ, 2005), *Fusarium heterosporum* (HEINEN et al.,2014) e *Trichoderma viride*-IR05 (IRFAN; SYED 2012) apresentaram atividade ótima em pH 5,0.

A temperatura ótima para atuação da xilanase foi de 50°C (Figura 2B). A mesma temperatura ótima foi encontrada na literatura para xilanases produzidas por outras espécies fúngicas, como: *Cladosporium oxysporum* GQ-3 (GUAN et al., 2016), *Fusarium heterosporum* (HEINEN et al., 2014), *Aspergillus awamori* (UMSZA-GUEZ et al., 2011) e *Trichoderma viride*-IR05 (IRFAN; SYED, 2012).

A xilanase exibiu estabilidade em ampla faixa de pH (3,0 a 10,0) após 24 horas de incubação a 25°C, mantendo 75% da atividade original em pH 10,0 e 52% em pH 10,5 (Figura 2C). A enzima se mostrou estável quanto ao pH em diversos trabalhos: a xilanase de *Pleurotus ostreatus* SYJ042 foi estável entre de pH 3,0 e 9,0 (QINNGHE et al., 2004), enquanto a xilanase de *Trichoderma harzianum* 1073 D3 foi estável na faixa de pH de 3,0 a 7,0 (SEYIS; AKSOZ, 2005). A xilanase produzida por *Coprinellus disseminatus* SW-1 NTCC 1165 foi ativa até pH 9,0 (AGNIHOTRI et al., 2010). Heinen et al. (2014) cultivaram o fungo *Fusarium heterosporum*, a xilanase produzida foi estável em pH 4,5 a 5,5. A estabilidade da xilanase produzida por *Trichoderma viride*-IR05 foi estudada incubando-a por 30 minutos em temperatura ambiente, sendo estável em pH 4,0 a 7,0 (IRFAN; SYED, 2012).

Em relação à estabilidade térmica, a enzima manteve-se estável após 1 hora a 50°C (Figura 2D). Em temperaturas superiores a 50°C houve a total desnaturação da enzima. Enzimas produzidas por linhagens mesófilas geralmente não suportam temperaturas muito elevadas. No entanto, a xilanase produzida por *G. butleri* apresentou meia vida de 83 minutos quando incubada a 50°C (Figura 3E). Os resultados obtidos quando comparados com xilanases mesófilas confirmam a elevada estabilidade térmica da enzima produzida por *G. butleri*. A xilanase de *Pleurotus ostreatus* SYJ042 foi estável até 40°C com período de incubação de 15 minutos (QINNGHE et al., 2004). A estabilidade térmica da xilanase produzida por *Trichoderma viride*-IR05 foi verificada por incubação da enzima durante 30 minutos, observou-se que a enzima era estável numa gama de temperatura de 30°C a 60°C (IRFAN; SYED, 2012). Querido et al. (2006) estudaram uma xilanase extracelular purificada produzida por *Penicillium expansum* que apresentou faixa de estabilidade de 20 a 40°C. Heinen et al. (2014) cultivaram o fungo *Fusarium heterosporum* que produziu xilanase, essa enzima apresentou uma meia-vida de 53 minutos a 45°C.



**Figura 2.** Efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática. (A) pH ótimo de atividade (B) Temperatura ótima de atividade. (C) pH de estabilidade da enzima após 24 horas de incubação a 25°C. (D) Estabilidade enzimática em função da temperatura após 1 hora de incubação. (E) Tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) em 50°C.

### 3.3. Potencial catalítico do extrato enzimático

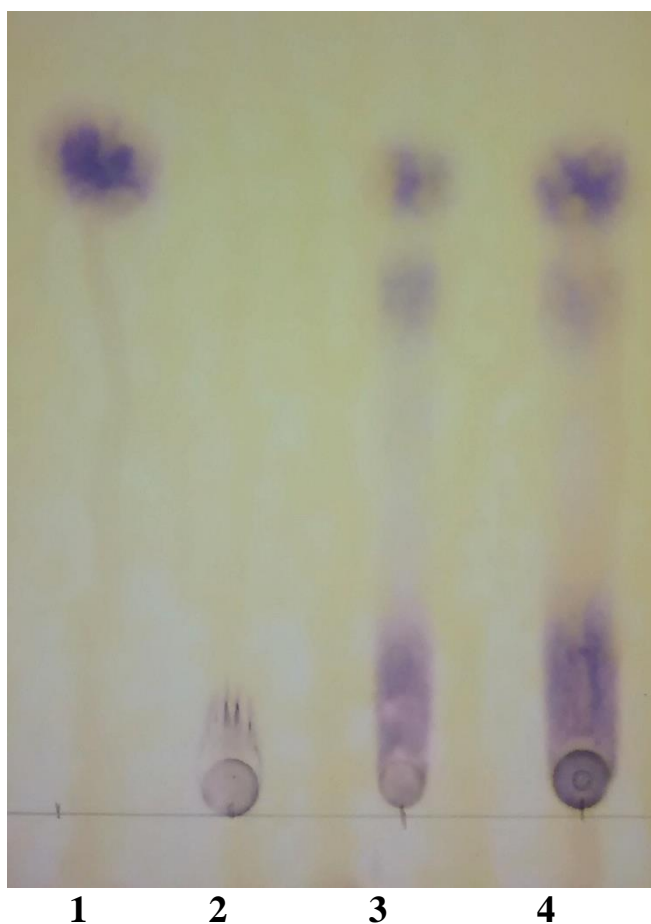
O potencial catalítico do extrato enzimático obtido em condições otimizadas de cultivo foi avaliado no presente estudo. Dentre as hemicelulases, foi observado elevada atividade de xilanase, como discutido anteriormente. A enzima  $\beta$ -xilosidase (2,81 U/mL) (Tabela 3) também apresentou boa atividade quando comparada a outras linhagens fúngicas: *Thermoascus aurantiacus* produziu 0,09 U/mL de  $\beta$ -xilosidase (COSTA et al., 2016) e os fungos *Aspergillus niger*, *A. phoenicis*, *P. variotii*, *A. ochraceus*, *A. niger* var. *awamori* que produziram por volta de 0,72 U/mL (BENASSI et al., 2014).

**Tabela 3.** Potencial catalítico do extrato enzimático produzido por *Gongronella butleri*.

Enzima	Substrato	U/mL	U/g
<b>Xilanase</b>	Xilana	430,396 $\pm$ 27,617	4.303,96 $\pm$ 276,17
<b><math>\beta</math>-xilosidase</b>	p-nitrofenil- $\beta$ -D xilopiranosídeo (pNPX)	2,813 $\pm$ 0,032	28,13 $\pm$ 0,32
<b>CMCase</b>	Carboximetilcelulose	1,390 $\pm$ 0,006	13,90 $\pm$ 0,06
<b><math>\beta</math>-glicosidase</b>	p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNP $\beta$ G)	18,131 $\pm$ 0,075	181,31 $\pm$ 0,75
<b>FPase</b>	Papel filtro	0,049 $\pm$ 0,002	0,49 $\pm$ 0,02

Outra característica que deve ser destacada no perfil catalítico do extrato enzimático é a reduzida atividade celulolítica (Tabela 3). O extrato enzimático apresentou quantidade desprezível de CMCase (13,90 U/g), comparando a produção dessa enzima por outras linhagens fúngicas, como o fungo *Fomitopsis* sp. RCK2010 que produziu 71,52 U/g em farelo de trigo (DESWAL et al., 2011) e o fungo *Aspergillus fumigatus* SK1 que produziu 54,27 U/g (ANG et al., 2013).

A ação sinérgica de endo-xilanases e  $\beta$ -xilosidases foi confirmada por cromatografia de camada delgada, sendo possível observar a formação predominante de xilose após o tratamento da xilana com o extrato enzimático produzido por *G. butleri* (Figura 3). A conversão de hemicelulose em xilose é uma característica extremamente desejável em processos de produção de biocombustíveis a partir de biomassa vegetal, considerando que esses monossacarídeos podem ser convertidos a etanol por microrganismos capazes de fermentar pentoses (ADHYARU et al., 2014; HUANG et al., 2015).

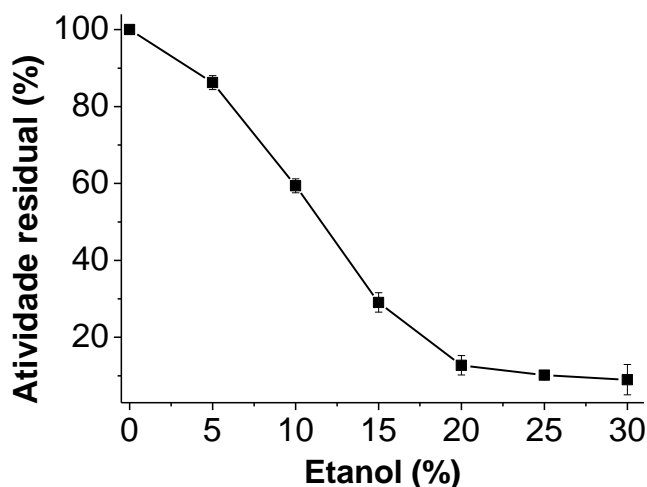


**Figura 3.** Cromatografia em Sílica Gel P60 do produto de hidrólise da xilana da por ação da xilanase do fungo *Gongronellabutleri*. 1- xilose; 2- xilana, 3- 10 minutos; 4 –20 minutos. 1 e 2 foram utilizados como padrões.

A reduzida atividade celulolítica foi confirmada com baixa eficiência em degradar papel filtro, cerca de 0,49 U/g de FPase. Essa característica habilita o emprego do extrato enzimático produzido pelo fungo *G. butleri* em processos de bi branqueamento da polpa de papel e celulose. Nesse tipo de processo é desejável extratos com elevada atividade de xilanase e reduzida atividade celulolítica, considerando que a ação de celulases sobre as fibras do papel, resulta em produtos de baixa qualidade (XIN; HE, 2013; ZHANG et al., 2010).

### 3.4. Efeito de etanol sobre a atividade da enzima

A xilanase foi estudada quanto à estabilidade na presença de etanol na mistura de reação em 50°C. Em 5% e 10% de etanol a enzima apresentou 86% e 60% da atividade catalítica original, respectivamente (Figura 4).



**Figura 4.** Efeito de etanol sobre a atividade da enzima a 50°C.

O etanol, assim como outras moléculas orgânicas, pode provocar alterações na forma da molécula da proteína, o que por sua vez afeta a atividade catalítica da enzima. O estudo do efeito do etanol sobre a atividade da enzima é de grande importância para a avaliação de um sistema enzimático que pode ser utilizado em processos de fermentação e sacarificação simultâneas (SSF), onde necessita suportar altas concentrações de etanol por até muitas horas (PASCHOS et al., 2015). Geralmente, os processos tradicionais de fermentação alcoólica atingem até 10% de etanol nas etapas finais do processo (GU et al., 2001; GARCIA et al., 2015).

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que o fungo *Gongronella butleri* apresentou alta produção de xilanase em farelo de trigo em pouco tempo de cultivo, características importantes para a redução dos custos de produção. As características quanto à estabilidade ao pH e temperatura são apreciáveis para aplicações biotecnológicas, além do extrato enzimático apresentar reduzida atividade de CMCase (celulase), o que estimula a continuidade do trabalho, visando sua aplicação em processos de branqueamento de polpa de celulose. A xilanase apresentou tolerância suficiente para ser aplicada em processos de obtenção de etanol a partir de polissacarídeos constituintes de parede celular vegetal. Considerando ainda, poucos relatos sobre produção de enzimas por fungos do gênero *Gongronella*, este estudo contribui para a descrição de uma nova linhagem microbiana com potencial biotecnológico, visando a produção de enzimas de interesse industrial.

## 5. REFERÊNCIAS

- ABDELLA, A.; MAZEED, T. E.S.; YANG, S. T.; EL-BAZ, A. F. Production of  $\beta$ -glucosidase by *Aspergillus niger* on wheat bran and glycerol in submerged culture: Factorial experimental design and process optimization. **Current Biotechnology**, v. 3, p. 197-206, 2014.
- ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A. Enhanced production of cellulase-free, thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8, its characterization and application in sorghum straw saccharification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 182-190, 2014.
- ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A.; DIVECHA, J. Insight on xylanase from *Aspergillus tubingensis* FDHN1: Production, high yielding recovery optimization through statistical approach and application. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 51-57, 2016.
- AGNIHOTRI, S.; DUTT, D.; TYAGI, C. H.; KUMAR, A.; UPADHYAYA, J. S. 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, p. 1349-1359, 2010.
- ALTAF, S. A.; SUGHRA, M. G.; NASREEN, T. K.; UMAR, D. M.; SHER, M. M.; NOOR-E-SABA, K. M.; FARIHA, R. K.; LU, C. Characterization of crude xylanase produced by edible mushroom *Pleurotus eryngii*. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 6, p. 1-6, 2016.
- ALVES-PRADO, H. F.; LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D. A.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Cellulolytic enzymes isolated from Brazilian areas: production, characterization and applications. In: Adam E. Golan. (Org.). **Cellulase: Types and Action, Mechanism and Uses**. 1ed. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, Cap 6:178-206, 2011.
- ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH, Y.; SURAINI, A. A.; MADIHAH, M. S. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1293-1302, 2013.
- BAKIR, U.; YAVASCAOGLU, S.; GUVENC, F.; ERSAYIN, A. An endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 328-334, 2001.
- BENASSI, V. M.; LUCAS, R. C.; JORGE, J. A.; POLIZELI M. L. T. M. Screening of thermotolerant and thermophilic fungi aiming  $\beta$ -xylosidase and arabinanase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 1459-1467, 2014.
- BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state Fermentation: An Overview. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 22, p. 49-70, 2008.



COSTA, A. C.; SCALABRINI, R. P.; SILVESTRE, M. A.; RODRIGUES, A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production of xylanase by a new strain of *Thermoascus aurantiacus*: obtainment of enzymatic extract with reduced cellulolytic activity for application in pulp and paper industries. **Bioscience Journal**, v. 32, p. 1040-1048, 2016.

DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Using amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012.

DEMIR, H.; TARI, C. Bioconversion of wheat bran for polygalacturonase production by *Aspergillussojajae* in tray type solid-state fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 106, p. 60-66, 2016.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6065-6072, 2011.

DOGARIS, I.; MAMMA, D.; KEKOS, D. Biotechnological production of ethanol from renewable resources by *Neurospora crassa*: an alternative to conventional yeast fermentations. **Applied Microbiology**, v. 97, p. 1457-1473, 2013.

EL-SHISHTAWY, R. M.; MOHAMED, S. A.; ASIRI, A. M.; GOMAA, A. M.; IBRAHIM, I. H.; AL-TALHI, H. A. Solid fermentation of wheat bran for hydrolytic enzymes production and saccharification content by a local isolate *Bacillus megatherium*. **BMC Biotechnology**, v. 14, p. 1-8, 2014.

GARCIA, N. F. L.; SANTOS, F. R. S.; GONÇALVES, F. A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production of  $\beta$ -glucosidase on solid state fermentation by *Lichtheimia ramosain* agroindustrial waste: characterization and catalytic properties of the enzyme extract. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 314-319, 2015.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

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

GU, Y.; QIAO, M.; ZHOU, Q.; ZHOU, Z.; CHEN, G. Hyperproduction of alcohol using yeast fermentation in highly concentrated molasses medium. **Tsinghua Science and Technology**, v. 3, p. 225-230, 2001.

GUAN, G. Q.; ZHAO, P. X.; ZHAO, J.; WANG, M. J.; HUO, S. H.; CUI, F. J.; JIANG, J. X. Production and partial characterization of an alkaline xylanase from a novel fungus *Cladosporium oxysporum*. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-7, 2016.

GUIMARÃES, N. C. A.; SORGATTO, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; BETINI, J. H. A.; ZANOELO, F. F.; MARQUES, M. R.; POLIZELI, M. L. T. M.; GIANNESI, G. C. Bioprocess and biotechnology: Effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate. **Springer Plus**, v. 2, p. 1-7, 2013.

HEINEN, P. R.; HENN, C.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A.; SIMÃO, R. C. G.; SILVA, J. L. C.; POLIZELI, M. L. T. M.; KADOWAKI, M. K. Xylanase from *Fusarium heterosporum*: Properties and influence of thiol compounds on xylanase activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 1047-1055, 2014.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10-18, 2009.

HUANG, Y.; BUSK, P. K.; LANGE, L. Cellulose and hemicellulose-degrading enzymes in *Fusarium commune* transcriptome and functional characterization of three identified xylanases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 73-74, p. 9-19, 2015.

IRFAN, M.; SYED, Q. Partial purification and characterization of Xylanase from *Trichoderma viride* produced under SSF. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 5, p. 7-11, 2012.

KAUR, A.; MAHAJAN, R.; SINGH, A.; GARG, G.; SHARMA, J. A novel and cost effective methodology for qualitative screening of alkalo-thermophilic cellulase free xylano-pectinolytic microorganisms using agricultural wastes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 459-463, 2011a.

KAUR, H.; DUTT, D.; TYAGI, C. H. Production of novel alkali-thermo-tolerant cellulase-poor xylanases from *Coprinopsis cinerea* HK-1 NFCCI-2032. **BioResources**, v. 6, p. 1376-1391, 2011b.

LI, P. J.; XIA, J. L.; SHAN, Y.; NIE, Z. Y. Comparative study of multi-enzyme production from typical agroindustrial residues and ultrasound-assisted extraction of crude enzyme in fermentation with *Aspergillus japonicus* PJ01. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, p. 2013-2022, 2015.

MERHEB-DINI, C.; CABRAL, H.; LEITE, R. S. R.; ZANPHORLIN, L. M.; OKAMOTO, D. N.; RODRIGUEZ, G. O. B.; JULIANO, L.; ARANTES, E. C.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9210-9217, 2009.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

NEOH, C. H.; LAM, C. Y.; YAHYA, A.; WARE, I.; IBRAHIM, Z. Utilization of agro-industrial residues from palm oil industry for production of lignocellulolytic enzymes by *Curvularia clavata*. **Waste Biomass Valorization**, v. 6, p. 385-390, 2015.

PASCHOS, T.; XIROS, C.; CHRISTAKOPOULOS, P. Ethanol effect on metabolic activity of the ethalogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **BMC Biotechnology**, v. 15, p. 1-12, 2015.

PEREIRA, J. C.; MARQUES, N. P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, T. B.; BOSCOLO, M.; DA-SILVA, R.; GOMES, E.; BOCCHINI-MARTINS, D. A. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 928-939, 2015.

QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N.; CHENG, J.; QIUGANG, M. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotusostreatus*. **Process Biochemistry**, v.39, p. 1561-1566, 2004.

QUERIDO, A. L. S.; COELHO, J. L. C.; ARAÚJO, E. F.; CHAVES-ALVES, V. M. Partial purification and characterization of xylanase produced by *Penicillium expansum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 475-480, 2006.

SAKTHISELVAN, P. N.; NAVEENA, B., PARTHA, N. Molecular characterization of a xylanase-producing fungus isolated from fouled soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 1293-1302, 2014.

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

SENTHILKUMAR, S.R.; ASHOKKUMAR, B.; CHANDRA-RAJ, K.; GUNASEKARAN, P. Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1380-1386, 2005.

SEYIS, I.; AKSOZ, N. Xylanase production from *Trichoderma harzianum* 1073 D3 with alternative carbon and nitrogen sources. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, p. 37-40, 2005.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **World Congress on Computers in Agriculture**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, P. O.; GUIMARÃES, N. C. A.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; BETINI, J. H.; MARCHETTI, C. R.; ZANOELO, F. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; MARQUES, M. R.; GIANNESI, G. C. Production of cellulase-free xylanase by *Aspergillus flavus*: Effect of polyols on the thermostability and its application on cellulose pulp biobleaching. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 3368-3373, 2015.

SILVA, T. M.; DAMÁSIO, A. R. L.; MALLER, A.; MICHELIN, M.; SQUINA, F. M.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification, partial characterization, and covalent immobilization–stabilization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus niveus*. **Folia Microbiologica**, v. 58, p. 495-502, 2013.

SIMÕES, M. L. G.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; TAPIA, D. M. T. Screening of culture condition for xylanase production by filamentous fungi. **African Journal of Biotechnology**, v. 22, p. 6317-6326, 2009.

UMSZA-GUEZ, M. A.; DÍAZ, A. B.; ORY, I.; BLANDINO, A.; GOMES, E.; CARO, I. Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1585-1597, 2011.

XIN, F.; HE, J. Characterization of a thermostable xylanase from a newly isolated *Kluyvera* species and its application for biobutanol production. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 309-315, 2013.

YANG, S. Q.; YAN, Q. J.; JIANG, Z. Q.; LI, L. T.; TIAN, H. M.; WANG, Y. Z. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1794-1800, 2006.

ZHANG, M.; JIANG, Z.; YANG, S.; HUA, C.; LI, L. Cloning and expression of a *Paecilomyces thermophila* xylanase gene in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant xylanase. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 688-695, 2010.