

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

**NAYARA FERNANDA LISBÔA GARCIA**

**CELULASES E HEMICELULASES DE *Lichtheimia ramosa* E  
*Thermoascus crustaceus*: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E  
POTENCIALIDADE INDUSTRIAL**

**Dourados - MS**

**2017**

**Nayara Fernanda Lisbôa Garcia**

**CELULASES E HEMICELULASES DE *Lichtheimia ramosa* E  
*Thermoascus crustaceus*: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E  
POTENCIALIDADE INDUSTRIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental.

**Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite**

**Dourados - MS**

**2017**

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

G216c	<p>Garcia, Nayara Fernanda Lisbôa. Celulases e hemicelulases de <i>Lichtheimia ramosa</i> e <i>Thermoascus crustaceus</i>: produção, caracterização e potencialidade industrial. / Nayara Fernanda Lisbôa Garcia. – Dourados, MS : UFGD, 2017. 67f.</p> <p>Orientador: Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Complexo celulolítico e hemicelulolítico. 2. Cultivo em estado sólido. 3. Sacarificação de biomassa vegetal. I. Título.</p>
-------	--

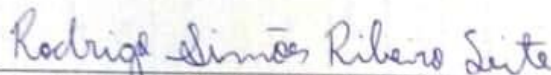
**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©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: "**Celulases e hemicelulases de *Lichtheimira ramosa* e *Thermoascus crustaceus*: produção, caracterização e potencialidade industrial**", de autoria de **Nayara Fernanda Lisboa Garcia**, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



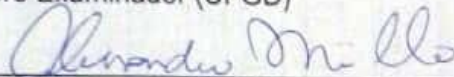
Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite  
Presidente da banca examinadora



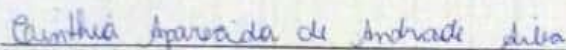
Prof.ª Dr.ª Eliana Janet Sanjinez-Argandoña  
Membro Examinador (UFGD)



Prof.ª Dr.ª Kelly Mari Pires de Oliveira  
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. Alessandro Minillo  
Membro Examinador (UEMS)



Prof.ª Dr.ª Cinthia Aparecida de Andrade Silva  
Membro Examinador (UEMS)

Dourados/MS, 11 de agosto de 2017.

À Deus, aos meus pais,  
Miguel e Neli e meu irmão, Nighel,  
por serem sempre o meu porto  
seguro.

Que foram é e serão fundamentais  
em todos os momentos da minha  
vida.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar meus passos e me iluminar.

Meus pais, Miguel Marques Garcia e Neli de Souza Lisbôa Garcia, e ao meu irmão, Nighel Fenando Lisbôa Garcia, com amor, admiração e gratidão por sua enorme compreensão, carinho, constante incentivo e incansável apoio. Devo a vocês tudo o que sou e não há nada maior que a educação moral, intelectual e física que recebi. Vocês são a razão maior da minha conquista. Amo-os infinitamente.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, pela paciência, receptividade, apoio, confiança depositada, incentivo, motivação a pesquisa, pelos oito anos de ensinamentos e por toda sua amizade. Este que me acompanha desde os primórdios de minha graduação e contribuiu de maneira excepcional à construção do meu conhecimento profissional e intelectual. A você minha admiração e gratidão.

Ao Prof. Dr. Marcelo Paz e Prof. Dr. Gustavo Fonseca, pelas valiosas contribuições.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e sugestões apresentadas ao trabalho.

Ao colegas do Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos pelos momentos de trabalho, ensinamentos, companheirismo, descontração, carinho, bate-papos e desabafos do dia-a-dia. Todas as pessoas que compartilharam dessa caminhada diária de oito anos no laboratório. É imensurável o quanto aprendi, cresci e vivi nesse lugar.

À Universidade Federal da Grande Dourados e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental pela oportunidade da realização deste estudo.

Aos técnicos da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais pela paciência e prontidão.

Aos técnicos da biblioteca central por toda solicitude, pelos bom dias e palavras amigas.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e ao CNPq e FUNDECT pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao meu amigo, parceiro e namorado, Manoel Garcia de Oliveira, por toda paciência, sinceridade, carinho e amor. Obrigada por me ouvir, pelo auxílio nos estudos e por sempre me tranquilizar dizendo: “calma, a tua hora vai chegar!”. Obrigada meu lindo.

Aos amigos todos, que, dividem comigo o dia-a-dia, os sonhos, anseios e coquistas e sei que participarão de forma intensa na comemoração do final desta etapa.

A todos que de alguma maneira colaboraram para o desenvolvimento deste estudo com sugestões, críticas e especialmente amizade. A todos que me apoiaram, rezaram e torceram, estão todos em meu coração.

**Muito obrigada!**

"Tudo tem o seu tempo determinado,  
e há tempo para todo propósito  
debaixo do céu."

Eclesiastes 3:1

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1.</b> Representação da fibra de celulose e os principais constituintes da parede celular lignocelulósica (Adaptado por GRAMINHA et al., 2007) .....	6
<b>Figura 2.</b> Estrutura representativa das cadeias de celulose .....	7
<b>Figura 3.</b> Estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e amorfas (SUN; CHENG, 2002)... ..	8
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática das hemiceluloses (SANTOS et al., 2012)...	9
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática da lignina (SANTOS et al., 2012).....	10
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática de um complexo celulolítico.....	11
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática de um sistema xilanolítico.....	13

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1.</b> Produção de celulases (A) e hemicelulases (B) por cultivo em estado sólido do fungo <i>L. ramosa</i> em farelo de trigo contendo valores de umidade distintos, incubados por 96 horas a 28°C .....	33
<b>Figura 2.</b> Produção de celulases (A) e hemicelulases (B) em diferentes temperaturas em cultivo em estado sólido pelo fungo <i>L. ramosa</i> em farelo de trigo contendo 60% de umidade inicial para CMCase e 65% para as demais enzimas por 96 horas.....	34
<b>Figura 3.</b> Produção de celulases (A) e hemicelulases (B) pelo fungo <i>L. ramosa</i> em função do tempo de cultivo em farelo de trigo a 35°C, contendo 60% de umidade inicial para CMCase e 65% para as demais enzimas.....	35
<b>Figura 4.</b> Atividade residual de celulases (A) e hemicelulases (B) produzida pelo fungo <i>L. ramosa</i> em função do tempo de incubação a 60°C.....	37
<b>Figura 5.</b> Efeito de etanol sobre a atividade de celulases e hemicelulases produzida pelo fungo <i>L. ramosa</i> .....	39
<b>Figura 6.</b> (A) Efeito da concentração de glicose sobre a atividade da $\beta$ -glicosidase; (B) Gráfico de Lineweaver-Burk para o extrato enzimático do fungo <i>L. ramosa</i> .....	40



**Figura 7.** Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando extrato enzimático de *L. ramosa* (A) Rendimentos de glicose obtido após a sacarificação de bagaço de cana *in natura* e pré-tratado com glicerol; (B) Rendimento de glicose em função do tempo de sacarificação enzimática de bagaço de cana pré-tratado com glicerol.... 41

### CAPÍTULO III

**Figura 1.** Produção de xilanase por cultivo em estado sólido do fungo *T. crustaceus* em farelo de trigo contendo 70% de umidade, incubado a 40°C .....56

**Figura 2.** pH ótimo (A), temperatura ótima (B), pH de estabilidade (C) e temperatura de estabilidade (D) da xilanase produzida pelo fungo *T. crustaceus* obtida por cultivo em estado sólido, a 40°C em 48 horas de cultivo, utilizando farelo de trigo como substrato.....57

**Figura 3.** Cromatografia de camada fina dos produtos de hidrólise da xilana pelo fungo *T. crustaceus*. (1) xilose; (2) xilana; (3, 4, 5, 6) 5 min, 10 min, 15 min e 20 min de hidrólise, respectivamente..... 60

**Figura 4.** Efeito de etanol sobre a atividade da xilanase produzida pelo fungo *T. crustaceus*..... 61

## LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Produção de celulases e hemicelulases em diferentes substratos agroindustriais por cultivo em estado sólido pelo fungo *L. ramosa* em 96 horas de cultivo, contendo 75% de umidade a 28°C .....32

**Tabela 2.** Propriedades bioquímicas das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas produzidas pelo fungo *L. ramosa*, obtidos por cultivo em estado sólido, a 35°C em 96 horas de cultivo, utilizando farelo de trigo como substrato .....36

## CAPÍTULO III

**Tabela 1.** Produção de xilanase em diferentes substratos agroindustriais por cultivo em estado sólido pelo fungo *T. crustaceus* em 96 horas de cultivo, contendo 70% de umidade a 40°C .....55

**Tabela 2.** Produção de xilanase por diferentes microrganismos.....57

**Tabela 3.** Potencial catalítico do extrato enzimático do fungo *T. crustaceus* obtido por cultivo em estado sólido, a 40°C em 48 horas, utilizando farelo de trigo como substrato .....59

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>4</b>
-------------------------------	----------

### **CAPÍTULO I**

<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>6</b>
1.1. Biomassa lignocelulósica .....	6
1.2. Enzimas celulolíticas .....	11
1.3. Enzimas hemicelulolíticas .....	12
1.4. Aplicações industriais de celulasas e hemicelulasas .....	13
1.5. Cultivo em estado sólido .....	15
1.6. Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar .....	16
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1. Objetivo geral .....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
<b>3. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>19</b>

### **CAPÍTULO II: Propriedades catalíticas de celulasas e hemicelulasas produzidas por *Lichtheimia ramosa*: aplicação dessas enzimas na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar**

Resumo .....	25
1. Introdução.....	26
2. Material e métodos .....	28
3. Resultados e discussão .....	31
4. Considerações finais.....	42
5. Referências .....	43

**CAPÍTULO III: Propriedades catalíticas de xilanase termoestável produzida pelo fungo *Thermoascus crustaceus* por cultivo em estado sólido livre de celulases**

Resumo .....	49
1. Introdução.....	50
2. Material e métodos .....	51
3. Resultados e discussão .....	54
4. Considerações finais.....	62
5. Referências .....	62

## APRESENTAÇÃO

Esta tese é fruto de trabalho de pesquisa, sendo requisito, para conclusão do curso de Doutorado em Tecnologia Ambiental de Nayara Fernanda Lisboa Garcia, que teve como orientador Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD. A definição do projeto de pesquisa se iniciou muito antes do ingresso no doutorado em 2009-2011 com iniciação científica, e foi nesse período em que houve o primeiro contato com a enzimologia e a formulação do trabalho de conclusão de curso. Em 2012-2013, ingressei no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção da Universidade Federal da Grande Dourados, onde foi estudada a enzima  $\beta$ -glicosidase produzida pelo fungo *Lichtheimia ramosa*, a produção, caracterização e potencial catalítico desta. Durante o mestrado obtivemos resultados relevantes, apresentando potencial para produção de enzimas envolvidas no complexo celulolítico e hemicelulolítico o que impulsionou a continuação ao estudo dessas enzimas. Em 2014 ingressei no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados com o projeto intitulado "Celulases e hemicelulases de *Lichtheimia ramosa* e *Thermoascus crustaceus*: produção, caracterização e potencialidade industrial" visando o estudo de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas de duas linhagens fúngicas da região Centro-Oeste, isoladas e mantidas pela equipe de pesquisa do Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos - LEPPER, município de Dourados, Mato Grosso do Sul. Os microrganismos isolados são mantidos em uma "Micoteca" organizada pelo LEPPER na Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD podendo ser utilizados como material biológico em trabalhos futuros. Esta tese é composta por três capítulos: Capítulo I. Revisão de Literatura; Capítulo II. Propriedades catalíticas de celulases e hemicelulases produzidas por *Lichtheimia ramosa*: Aplicação dessas enzimas na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar; Capítulo III. Propriedades catalíticas de xilanase termoestável produzida pelo fungo termófilo *Thermoascus crustaceus* por cultivo em estado sólido livre de celulases.

## RESUMO

Celulases e hemicelulases apresentam aplicabilidade em diversos processos biotecnológicos, tais como: decomposição de biomassa vegetal para produção de biocombustível, reaproveitamento de resíduos para ração animal, aditivos para silagem, redução do impacto ambiental pelas indústrias de papel e têxtil. No entanto, existem entraves a serem superados para viabilizar a aplicação industrial destas enzimas, dentre eles: elevado custo de produção e reduzida estabilidade estrutural das enzimas. Atualmente algumas alternativas são propostas para transpor esses problemas, entre elas a seleção de linhagens hiperprodutoras da enzima de interesse, a otimização do processo de cultivo em meios de baixo valor agregado e prospecção de linhagens termófilas ou termotolerantes com elevada estabilidade estrutural. No capítulo I é apresentado uma revisão bibliográfica do estudo, a importância das pesquisas envolvendo enzimas industriais e as aplicações biotecnológicas dessas enzimas. Em seguida, no capítulo II, é apresentado a otimização da produção de celulases e hemicelulases do fungo *Lichtheimia ramosa* por cultivo em estado sólido e a eficiência dessas enzimas na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. No capítulo III, é apresentado as propriedades catalíticas da xilanase termoestável produzida pelo fungo *Thermoascus crustaceus* por cultivo em estado sólido livre de celulases.

Palavras-chave: Cultivo em estado sólido, enzimas industriais, aplicações biotecnológicas.

## ABSTRACT

Cellulases and hemicellulases have applicability in several biotechnological processes, such as: decomposition of plant biomass for biofuel production, reuse of waste for animal feed, additives for silage, reduction of environmental impact by the paper and textile industries. However, there are obstacles to be overcome to enable the industrial application of these enzymes, among them: high production cost and reduced structural stability of enzymes. Actually some alternatives are proposed to overcome, these problems, among them the selection of hyperproductive strains of the enzyme of interest, the optimization of the cultivation process in low value media and the prospection of thermophilic or thermotolerant strains with high structural stability. Chapter I presents a bibliographic review of the study, the importance of research involving industrial enzymes and the biotechnological applications of these enzymes. In Chapter II, the optimization of cellulase and hemicellulase production of the fungus *Lichtheimia ramosa* by solid-state cultivation and the efficiency of these enzymes in the hydrolysis of sugarcane bagasse is presented. In Chapter III, the catalytic properties of thermostable xylanase produced by the fungus *Thermoascus crustaceus* are shown by cellulase-free solid state cultivation.

Keywords: Solid-state culture, industrial enzymes, biotechnological applications.

## INTRODUÇÃO GERAL

Com a escassez dos combustíveis fósseis e a decorrente necessidade em encontrar uma fonte alternativa de combustível e energia renovável, há um grande interesse na utilização de celulases e hemicelulases para bioconversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis (SINGHANIA et al., 2010).

A hidrólise enzimática desses materiais é conduzida por enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, sendo que os maiores grupos de celulases envolvidos no processo de hidrólise são: endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases (LEITE et al., 2008). As celulases clivam a celulose em celobiose e em seguida é clivada pela ação da  $\beta$ -glicosidase, liberando glicose (SANTOS et al., 2016).

As principais enzimas envolvidas na degradação da hemicelulose são as xilanases, estas enzimas atuam na cadeia central da hemicelulose, a xilana, reduzindo drasticamente o grau de polimerização deste polissacarídeo. As endo-xilanases atacam internamente o esqueleto estrutural da molécula e as  $\beta$ -xilosidades hidrolisam externamente a cadeia de xilana liberando xilose (KESHWANI; CHENG, 2009; KNOB et al., 2014).

Dentre as diversas aplicações industriais de celulases e hemicelulases, o potencial de hidrolisar biomassa vegetal em açúcares fermentescíveis tem se destacado. A biomassa é uma das maiores fontes de carbono suficiente para substituir o uso dos combustíveis fósseis e o uso de resíduos agroindustriais para essa finalidade é extremamente atrativo, devido seu baixo custo. Diversos investimentos têm sido realizados para possibilitar a degradação desses materiais complexos em açúcares simples e fermentáveis, visando à produção de etanol (BALAT, 2011). No entanto, o custo da aplicação desses biocatalisadores ainda representa um problema a ser superado (FERNANDES, 2010). Visando reduzir o custo de produção de enzimas industriais, o cultivo em estado sólido (CES) é considerado cada vez mais uma tecnologia ideal e rentável para a produção dessas enzimas.

O CES é um processo atraente devido a utilização de resíduos da agroindústria como substrato e devido a obtenção de produtividades maiores, fatores que contribuem para redução do custo de produção dessas enzimas (PIROTA et al., 2014) que somados a otimização das condições de cultivo pode melhorar a viabilidade econômica dos processos de CES.



O fungos filamentosos *Lichtheimia ramosa* e *Thermoascus crustaceus* foram recentemente isolados pelo nosso grupo de pesquisa e estudos preliminares realizados com essas linhagens, apresentaram considerável potencial para produção de Carboximetilcelulase (CMCase),  $\beta$ -glicosidase, xilanase e  $\beta$ -xilosidase por cultivo em estado sólido em meios de baixo custo (resíduos agroindustriais). Neste sentido o presente estudo visa a descoberta de novos biocatalisadores de baixo custo para aplicação industrial na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar e no biobranqueamento de polpa de papel e celulose.

# CAPÍTULO I

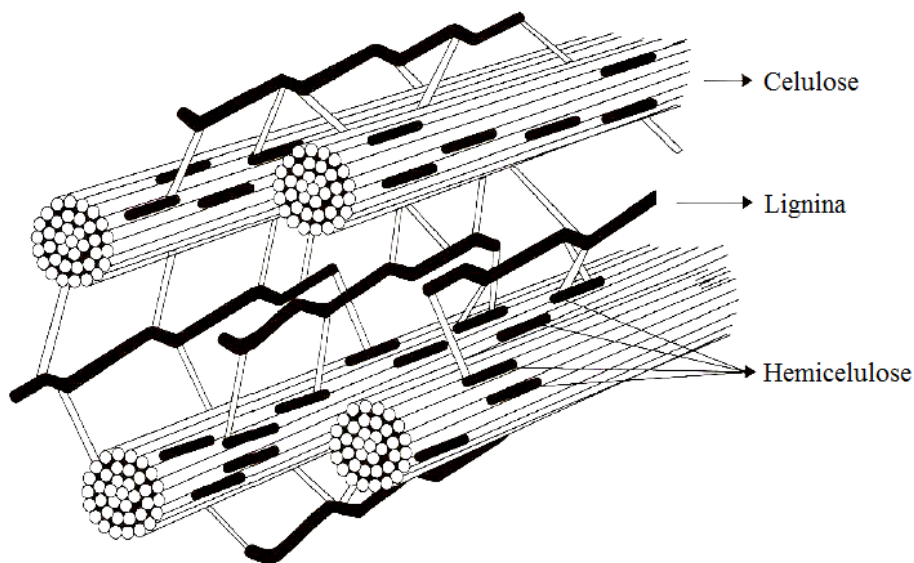
---

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

As matérias primas lignocelulósicas são fontes renováveis abundantemente encontradas na natureza e compõem mais de 60% de toda a biomassa produzida na Terra (SUKUMARAN et al., 2009).

A biomassa lignocelulósica é constituída por três principais frações poliméricas, celulose (20–50%), hemicelulose (15–35%) e lignina (10–30%) (Figura 1), além de outros componentes como proteínas (3–10%), lipídios (1–5%), açúcares solúveis (1–10%) e minerais (5–10%). Essa matriz é altamente ordenada e dinâmica podendo tornar-se mais rígida ou mais flexível conforme as necessidades da planta (FARINAS, 2011; ANWAR et al., 2014).



**Figura 1.** Representação da fibra de celulose e os principais constituintes da parede celular lignocelulósica (Adaptado por GRAMINHA et al., 2008).

Uma das características principais da célula vegetal é a presença de uma fina, porém muito resistente parede celular. A parede celular vegetal é formada por uma mistura complexa de polissacarídeos e outros compostos que são dispostos e unidos de

forma muito organizada por meio de ligações covalentes e não-covalentes (FARINAS, 2011).

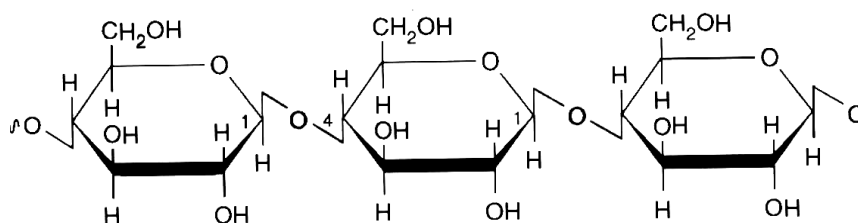
Os modelos de parede celular mostram microfibrilas de celulose envolvidas por hemicelulose e lignina. A hemicelulose não ramificada forma ligações de hidrogênio com a celulose, enquanto as cadeias laterais da hemicelulose interagem com a lignina podendo formar ligações covalentes. Essa trama lignocelulósica torna difícil a ruptura das microfibrilas de celulose (CHUNDAWAT et al., 2011). Entretanto, a elevada recalcitrância da biomassa vegetal, dificulta a hidrólise enzimática para a degradação de seus componentes à glicose (ZHOU et al., 2016).

Nesse contexto, o entendimento da estrutura da parede celular vegetal e da atuação das enzimas que degradam esses polissacarídeos em açúcares fermentescíveis é de fundamental importância na viabilização do uso da biomassa vegetal como fonte de energia.

### 1.1.1. Celulose

A parede celular vegetal é constituída principalmente por celulose, que constitui cerca de 40% da biomassa vegetal, sendo conseqüentemente o polímero natural mais abundante na Terra (YEOMAN et al., 2010).

A celulose é um homopolissacarídeo linear formado por unidades de glicose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, com orientações alternativas (Figura 2) (CHAMPAGNE; LI, 2009). Cada molécula de glicose relaciona-se com a seguinte por uma rotação de  $180^\circ$  e o átomo de oxigênio do anel estabelece uma ligação de hidrogênio com o grupamento 3-OH da molécula seguinte. Duas unidades de glicose adjacentes formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água (YEOMAN et al., 2010).

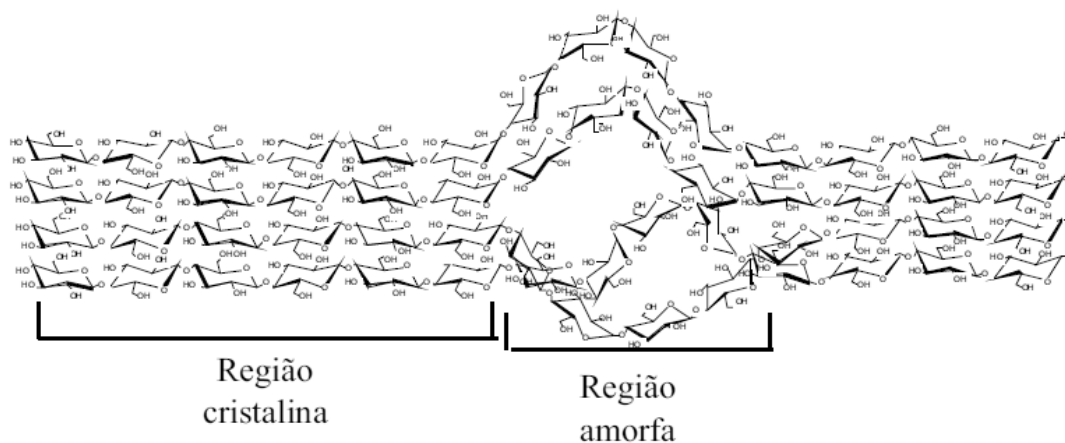


**Figura 2.** Estrutura representativa das cadeias de celulose. Fonte: O autor

As moléculas de celulose ligam-se umas às outras por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, formando fibrilas. As fibrilas da fração celulósica encontram-se dispostas na forma de espirais para conferir força e flexibilidade ao material. Esta fração encontra-se envolvida pela lignina cuja função é aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos (BANERJEE et al., 2016).

A conformação  $\beta$  permite que a celulose forme cadeias lineares extensas. As cadeias de celulose tendem a se agrupar devido às ligações de hidrogênio que ocorrem entre os grupos hidroxilas (-OH) das moléculas de glicose. Essas ligações de hidrogênio conferem à celulose propriedades importantes na estrutura microfibrilada, na organização das regiões cristalina e amorfa e na natureza altamente coesiva (LAVOINE et al., 2012). As microfibrilas organizam-se em macrofibrilas, que por sua vez, constituem as fibras de celulose.

A estrutura cristalina é mais rígida e altamente ordenada devido às ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas, apresentando alto grau de cristalinidade. Essa região é de difícil acesso para a degradação, aumentando a defesa da planta contra organismos externos (XU, 2010). Já as regiões amorfas são regiões menos ordenadas e apresentam fibras mais distantes entre si, resultando em regiões menos compactas facilitando a degradação (Figura 3). Além das regiões amorfas, as fibras de celulose apresentam irregularidades, falhas e microporos que aumentam a superfície de contato da celulose com outras moléculas como água e enzimas (LYND et al., 2002).



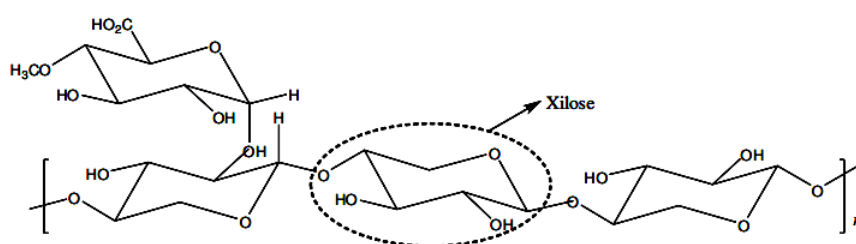
**Figura 3.** Estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e amorfas (SUN; CHENG, 2002).

### 1.1.2. Hemicelulose

As hemiceluloses são importantes componentes estruturais da parede celular vegetal e compreendem de 30 a 40% dos carboidratos totais e correspondem 40% da massa seca da biomassa. São polissacarídeos de baixo peso molecular que se ligam as microfibrilas de celulose, especialmente em tecidos lignificados (ALVES-PRADO et al., 2010).

A estrutura da hemicelulose é linear, semelhante à celulose, porém a hemicelulose apresenta grande variedade de açúcares (JOVANOVIĆ et al., 2009). Esses açúcares estão ligados entre si, principalmente por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros compostos o que impede a formação de grandes regiões cristalinas (POLIZELLI et al., 2005).

A xilana, principal componente da hemicelulose, consiste de um heteropolissacarídeo formado por monômeros de D-xilose unidos por ligações xilopiranosídicas ( $\beta$ -1,4), apresentando ramificações com uma pequena quantidade monomérica de outros açúcares, tais como arabinose, manose, glicose, galactose e ramnose (Figura 4) (VERARDI et al., 2016). 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 em vários pontos à lignina, criando uma capa que se interpõe aos fios de celulose por meio de pontes de hidrogênio. Portanto, a xilana, presente na hemicelulose é importante na conexão entre celulose e lignina (DURAN et al., 2008).



**Figura 4.** Representação esquemática das hemiceluloses (SANTOS et al., 2012).

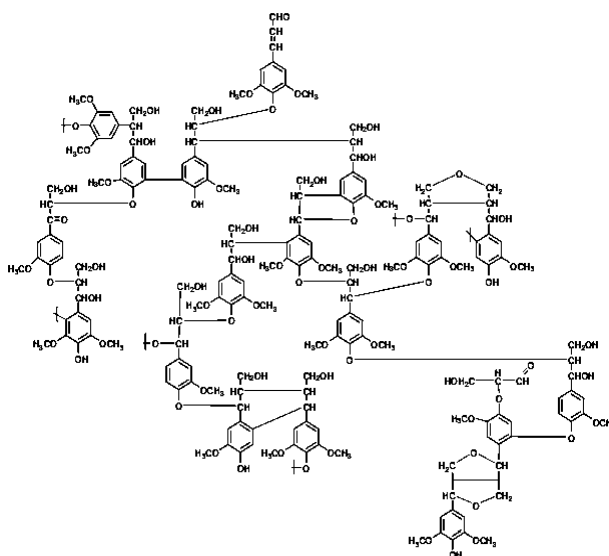
### 1.1.3. Lignina

A lignina presente nas plantas pode representar até 25% de toda a biomassa lignocelulósica produzida no planeta e seu teor nos resíduos vegetais pode atingir até 40% da sua massa seca. A lignina está concentrada em tecidos relacionados com condução de solutos e suporte mecânico e representa um conjunto de polímeros amorfos de alto peso molecular e muitas ligações cruzadas (SANTOS et al., 2012).

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 de compostos aromáticos que envolvem os outros componentes da parede celular (Figura 5), atua contra ataques químicos e enzimáticos produzidos por microrganismos patogênicos e saprófitos e reduz a digestibilidade de material vegetal por animais (COLLINS et al., 2005).

A lignina encontra-se ligada a ambas, celulose e hemicelulose, formando um laço físico, constituindo dessa forma uma barreira impenetrável na parede celular da planta, servindo de suporte estrutural, conferindo impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e estresse oxidativo. Consiste de um heteropolímero amorfo não solúvel em água formado basicamente de unidades de fenil propano (SANCHES, 2009).

Mesmo presente em menores quantidades em relação aos outros componentes, a lignina atribui limitação suficiente para retardar ou evitar completamente a ação enzimática, dificultando a hidrólise da biomassa lignocelulósica (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).

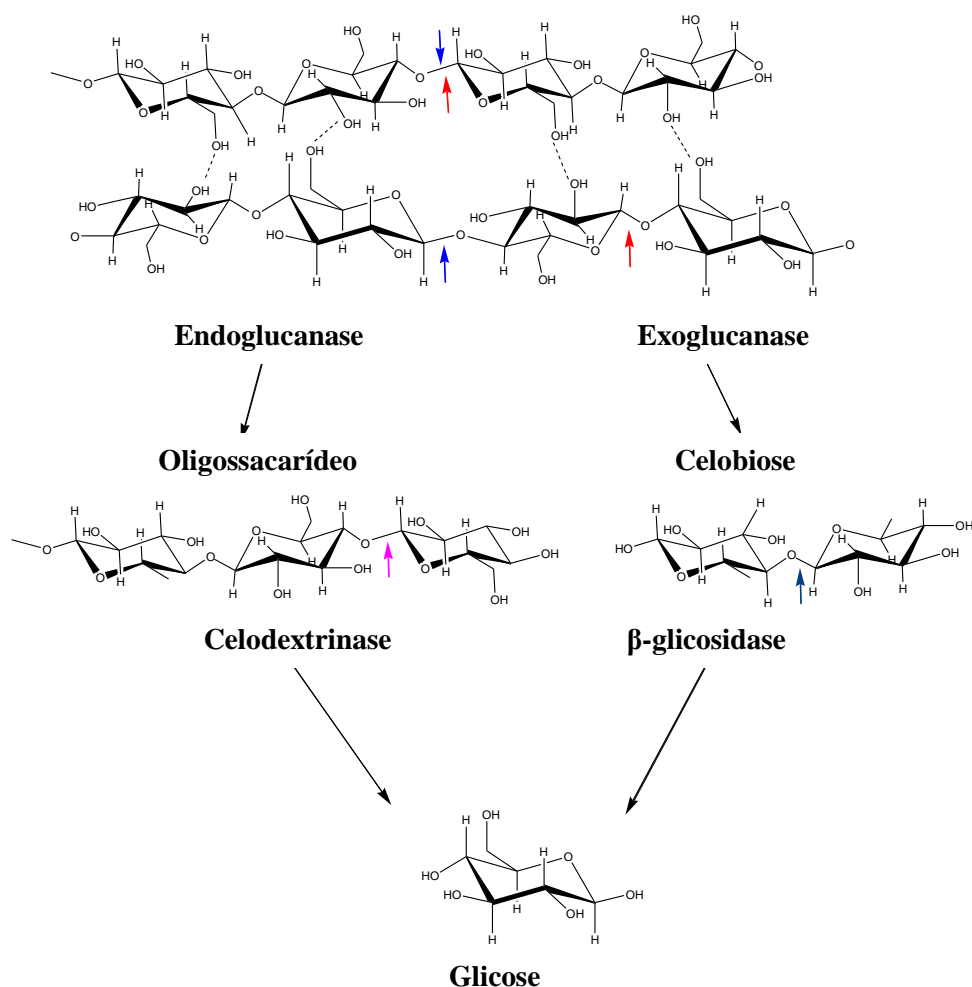


**Figura 5.** Representação esquemática da lignina (SANTOS et al., 2012).

## 1.2. ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre biomassa lignocelulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia sobre diferentes materiais celulósicos liberando açúcares redutores, como a glicose, produto de maior interesse industrial, para posteriormente serem convertidas em etanol (BALAT, 2011; SHARMA et al., 2016).

A hidrólise enzimática do material celulósico até glicose envolve a ação sinérgica de diferentes enzimas, específicas para diferentes sítios da molécula, denominado complexo celulolítico (SINGHANIA et al., 2013). Um sistema enzimático celulósico tem uma organização complexa, consistindo de três componentes principais de acordo com sua atuação sobre a molécula de celulose (Figura 6): endo- $\beta$ -glucanase, exo- $\beta$ -glucanase e  $\beta$ -glicosidase. O modo de ação dos componentes é descrito a seguir:



**Figura 6.** Representação esquemática de um complexo celulolítico. Fonte: o autor.

**1.2.1. Endoglucanases** (EC 3.2.1.4): responsáveis por iniciar a hidrólise da celulose, hidrolisam as ligações internas da celulose de forma aleatória liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, expõe novos terminais para a ação das exoglucanases. A endoglucanase é responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico, diminuindo seu grau de polimerização devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; BHALLA et al., 2013). Atuam somente na porção amorfa da celulose, onde sua atividade é reduzida conforme o encurtamento da cadeia. Essas regiões amorfas permitem melhor ação das enzimas por não possuírem ligações intermoleculares de hidrogênio tão fortes quanto às regiões cristalinas (ZHANG; LYND, 2006).

**1.2.2. Exoglucanases** (EC 3.2.1.91) atuam sobre a celulose a partir de extremidades não redutoras, das regiões cristalinas, liberando celobiose como produto primário (SORENSEN et al., 2015). Essas enzimas sofrem inibição pelo produto de hidrólise, a celobiose, por isso é de grande importância a atuação de outra enzima do complexo celulolítico, a  $\beta$ -glicosidade (NG et al., 2010; JUTURU; WU, 2014).

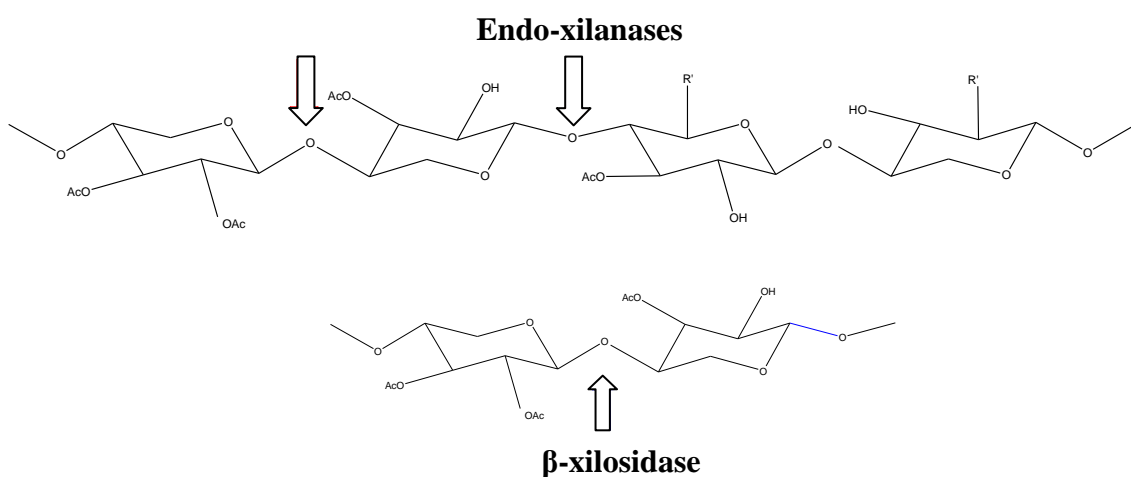
**1.2.3.  $\beta$ -glicosidases** (EC 3.2.1.21) hidrolisam celobiose e outras celodextrinas em glicose, tornando-se o fator limitante na regulação de todo o processo de degradação da celulose (YEOMAN et al., 2010; BANSAL et al., 2012). A ação das  $\beta$ -glicosidases além de finalizar a despolimerização tem a capacidade de aumentar o rendimento global de açúcares fermentescíveis reduzindo o efeito inibidor da celobiose sobre as demais enzimas celulolíticas, promovendo a continuidade do processo de hidrólise enzimática (LEITE et al., 2007).

### **1.3. ENZIMAS HEMICELULOLÍTICAS**

A hidrólise dos heteropolissacarídeos os quais constituem a hemicelulose também requer a ação de uma ampla variedade de enzimas agindo sinergicamente para convertê-la em unidades de xilose, incluindo aquelas que atuam nas cadeias laterais dos polímeros (FALKOSKI et al., 2012). O sistema hemicelulolítico requerido para a hidrólise da hemicelulose é mais complexo que o sistema celulolítico, já que a hemicelulose apresenta natureza heterogênea e inclui a ação de diferentes enzimas tais como as xilanases (E.C. 3.2.1.8), mananases (E.C. 3.2.1.78),  $\beta$ -xilosidases (E.C.



3.2.1.37),  $\beta$ -mannosidasas (E.C. 3.2.1.25),  $\alpha$ -arabinofuranosidasas (E.C. 3.2.1.55),  $\alpha$ -galactosidasas (E.C. 3.2.1.22), acetil xilano esterase (E.C. 3.2.1.72), feruloil esterases (E.C. 3.1.1.73), p-cumaril-esterases (E.C. 3.2.1.73), e  $\alpha$ -glicuronidase (E.C. 3.2.1.139) que atuam no processo de despolimerização da hemicelulose (POLIZELLI et al., 2005; OGEDA; PETRI, 2010). Os componentes do sistema que têm sido mais amplamente estudados são as endoxilanases e as  $\beta$ -xilosidasas (Figura 7):



**Figura 7.** Representação esquemática de um sistema xilanolítico. Fonte: o autor

**1.3.1. Xilanases** (Endo-1,4- $\beta$ -D-xilanases, EC 3.2.1.8) atuam na cadeia central da hemicelulose, a xilana, catalisando a hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4-D-xilosídicas de maneira aleatória, diminuindo o grau de polimerização do polissacarídeo, liberando xilooligossacarídeos e xilobiose (DODD; CANN, 2009).

**1.3.2.  $\beta$ -xilosidasas** (1,4-  $\beta$  -D-xilosidasas, EC 3.2.1.37) hidrolisam externamente a cadeia de xilana e pequenos xilooligossacarídeos liberando xilose (KESHWANI e CHENG, 2009). São importantes na degradação da xilana por remover produtos finais que poderiam inibir as endoxilanases e, com isso, limitar a hidrólise do polissacarídeo (KNOB et al., 2014).

## 1.4. APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE CELULASES E HEMICELULASES

Enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas compreendem aproximadamente 75% do total de enzimas comercializadas e constituem o segundo maior grupo, após as proteases (BHAT, 2000; KATAPODIS et al., 2003).

Na área têxtil, as celulases são utilizadas para desenvolver o aspecto de usado e desbotado (bioestonagem) em tecidos de algodão tingidos e também, para a retirada das regiões de desorganização de microfibrilas de celulose (“pilling”) e amaciamento dos tecidos (BHAT, 2000).

Na indústria de alimentos, atuam no processamento de sopas, cereais e vegetais desidratados, e são adicionadas para melhorar a hidratabilidade dos produtos quando chegam aos consumidores (LEITE et al., 2007).

Em indústrias de alimentação animal, são comercializadas como componentes de indutores de silagem e em ração para aves e suínos com a finalidade de aumentar a digestibilidade de alimentos ricos em fibra de celulose (DILLON, 2004; COSTA et al., 2016).

Na indústria de sucos, as celulases auxiliam nos processos de extração e clarificação, reduzindo a viscosidade e a formação de agregados de carboidratos, proteínas e polifenóis, o que favorece a taxa de filtração e contribui com a estabilidade do produto final (BHAT, 2000).

A tecnologia enzimática desempenha ainda um papel central nos processos de produção de vinho e cerveja. Complexos enzimáticos contendo celulases, glucanases, hemicelulase e pectinases são utilizados na indústria de vinho para acelerar o processo de vinificação e melhorar a qualidade do produto final (NG et al., 2010; BUSSAMRA et al., 2015).

Dentre as aplicações biotecnológicas das xilanases é possível destacar sua utilização nas indústrias de papel e celulose. Durante o processamento da matéria vegetal para obtenção do papel branco é necessário fazer a remoção da lignina. Trabalhos anteriores relatam que a adição de hemicelulases na polpa Kraft, anteriormente ao branqueamento, pode reduzir significativamente a quantidade necessária de catalisadores químicos para remoção da lignina residual e consequentemente reduzir a quantidade de compostos tóxicos resultantes desta etapa. Estas enzimas, principalmente as xilanases, hidrolisam as cadeias de hemicelulose que estão sobrepostas e entrelaçadas entre as fibras de celulose (CARMONA et al., 2005; DURAN et al., 2008; COSTA et al., 2016). A remoção desta “rede” de hemicelulose aumenta a acessibilidade dos agentes químicos às moléculas de lignina aumentando a eficiência do processo e reduzindo os prejuízos ambientais (BOONRUNG et al., 2016).

Outra importante aplicação industrial das celulasas e hemicelulasas consiste no potencial de hidrolisar biomassa vegetal em açúcares fermentescíveis. A biomassa representa uma das fontes de carbono para substituir os combustíveis fósseis, sendo os resíduos agroindustriais os mais atrativos, devido seu baixo custo. Diversos investimentos têm sido realizados para possibilitar a degradação desses materiais complexos em açúcares simples e fermentáveis para produção de etanol de segunda geração (BALAT, 2011; PEREIRA et al., 2015).

### **1.5. CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO**

O cultivo em estado sólido (CES) surgiu como um potencial processo para a produção de celulasas e hemicelulasas microbiana (DELABONA et al., 2012). CES refere-se ao processo onde o crescimento microbiano e a formação do produto ocorrem na superfície de materiais sólidos. Este processo envolve a ausência de água livre entre as partículas do substrato, no entanto, a umidade é absorvida pelo substrato sólido para suportar o crescimento e o metabolismo microbiano (WANG et al., 2013; PIROTA et al., 2014).

As recentes tecnologias de produção de enzimas, seguidas por processos de fermentação são conduzidas numa fase líquida (cultivo submerso) ou utilizando substratos sólidos (CES). Na fermentação submersa, a monitorização ambiental é relativamente simples devido à homogeneidade das suspensões de células microbianas e das soluções de nutrientes e enzimas na fase líquida, já em processos de CES, devido à natureza complexa e à heterogeneidade dos substratos, o monitoramento ambiental é mais desafiador (LIANG et al., 2015).

A maioria das celulasas e hemicelulasas são produzidas por CES, usando estirpes microbianas de tipo selvagem que são consideradas microrganismos promissores (ADSUL et al., 2011; SINGHANIA et al., 2015). Entre as vantagens do CES pode-se destacar baixa demanda de água e energia, o uso de equipamentos e meios de cultura mais simples, baixo custo operacional, maior produtividade dos extratos enzimáticos, entre outros (ANWAR et al., 2014), além disso a redução da poluição ambiental e dos resíduos agrícolas ou acumulação de subprodutos no meio ambiente (KUMAR e KANWAR, 2012).

Fatores ambientais como umidade, temperatura, pH, níveis de oxigênio e as concentrações de nutrientes e produtos afetam o crescimento microbiano e a produção

de celulasas e hemicelulasas (SHARMA et al., 2016). Dessa forma, a aplicação de celulasas industrialmente requer a produção destas enzimas em larga escala, bem como o conhecimento detalhado de seus mecanismos de ação (BHATIA et al., 2002), que somados a otimização das condições de cultivo pode tornar o processo de CES economicamente viável.

## **1.6. SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

O processo de sacarificação enzimática consiste na hidrólise da celulose e hemicelulose buscando açúcares fermentáveis para produção de bioetanol em larga escala. Nesse cenário, o uso de enzimas microbianas capazes de atuar na estrutura de polissacarídeos vegetais surge como ferramentas atraentes para o processo de obtenção de biocombustíveis (TANEDA et al., 2012; ZHANG et al., 2016).

Embora existam grandes vantagens que sustentam o emprego de biomassa lignocelulósica para geração de energia, a recalcitrância desses materiais ainda é um entrave a ser superado (ZHANG; LYND, 2006). 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, sendo o principal entrave para produção de produtos fermentescíveis a partir da biomassa lignocelulósica, como o etanol de segunda geração (LYND et al., 2005; FARINAS, 2011).

Nesse contexto, o pré-tratamento é necessário para alterar a estrutura da biomassa lignocelulósica e tornar a celulose mais acessível ao ataque das enzimas, que convertem os polímeros de carboidratos em açúcares fermentescíveis (GALBE; ZACCHI, 2007). Os processos de pré-tratamento e deslignificação têm o objetivo de romper o complexo celulose-hemicelulose-lignina e desestruturar a fração cristalina da celulose aumentando assim a porosidade do material para favorecer a acessibilidade das enzimas através da hidrólise enzimática (CHANDRA et al., 2007; SAAD et al., 2008). Outros requisitos para um pré-tratamento efetivo são: aumentar a área superficial do material, evitar a degradação ou a perda de carboidratos maximizando os rendimentos em açúcares e evitar ou minimizar a formação de subprodutos inibitórios para a hidrólise e processos de fermentação subsequentes (KUMAR et al., 2009).

A hidrólise enzimática para a sacarificação da biomassa lignocelulósica como o bagaço de cana-de-açúcar tem sido considerado o método mais promissor para hidrólise eficiente da celulose (GAO et al., 2008; HU et al., 2011), por apresentar

rendimento teórico mais elevado em relação a outros métodos, como por exemplo, a hidrólise promovida por ácidos concentrados (TANEDA et al., 2012).

A hidrólise enzimática da celulose ocorre em condições moderadas de temperatura, pressão e pH em comparação à hidrólise química, e resulta em pouca ou nenhuma produção de subprodutos tóxicos devido à alta especificidade do complexo enzimático (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

A hidrólise enzimática da celulose em glicose requer o uso de coquetéis enzimáticos microbianos compostos principalmente pelas endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase (PEREIRA et al., 2015). O custo de produção das enzimas para obtenção de açúcares fermentescíveis a partir de materiais lignocelulósicos é um dos principais obstáculos a serem superados para a viabilização econômica do processo de produção de etanol de segunda geração.

Portanto, a busca de novas enzimas a partir de fontes microbianas, que apresentem alta taxa de hidrólise e baixa inibição pelo produto e por etanol, e que possam ser obtidas pelo cultivo dos microrganismos em baixo custo, torna-se necessária.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Produção, caracterização e aplicação de celulases e hemicelulases de *Lichtheimia ramosa* e *Thermoascus crustaceus*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Otimizar a produção de celulases e hemicelulases por cultivo em estado sólido (CES);
- Caracterizar bioquimicamente as enzimas produzidas;
- Avaliar o rendimento da enzima produzida pelo fungo *Lichtheimia ramosa* na sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré tratado com glicerol;
- Avaliar a aplicabilidade industrial da enzima produzida pelo fungo *Thermoascus crustaceus*.

### 3. REFERÊNCIAS

ADSUL, M. G.; SINGHVI, M. S.; GAIKAIWARI, S. A.; GOKHALE, D. V. Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4304–4312, 2011.

ALVES-PRADO, H. F.; PAVEZZI, F. C.; LEITE, R. S. R.; OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; DASILVA, R. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 333–346, 2010.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, p. 163–173, 2014.

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

BANERJEE, D.; MUKHERJEE, S.; PAL, S.; KHOWALA, S. Enhanced saccharification efficiency of lignocellulosic biomass of mustard stalk and straw by salt pretreatment. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 42–49, 2016.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, v. 32, p. 1341–1346, 2012.

BHALLA, A.; BANSAL, N.; KUMAR, S.; BISCHOFF, K.; SANI, R. K. Improved lignocelluloses conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. **Bioresource Technology**, v. 128, p.751–759, 2013.

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

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial  $\beta$ -glucosidases: cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 375–407, 2002.

BOONRUNG, S.; KATEKAEW, S.; MONGKOLTHANARUK, W.; AIMI, T.; BOONLUE, S. Purification and characterization of low molecular weight extreme alkaline xylanase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* BF1-7. **Mycoscience**, v. 57, p. 408–416, 2016.

BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; COSTA, A. C. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 173–181, 2015.

CARMONA, E. C.; FIALHO, M. B.; BUCHGNANI, E. B.; COELHO, G. D.; BROCHETO-BRAGA, M. R.; JORGE, J. A. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 359–364, 2005.

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

CHAMPAGNE, P.; LI, C. Enzymatic hydrolysis of cellulosic municipal wastewater treatment process residuals as feedstocks for the recovery of simple sugars. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5700–5706, 2009.

CHANDRA, R. P.; BURA, R.; MABEE, W. E.; BERLIN, A.; PAN, X.; SADDLER, J. N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p. 67–93, 2007.

CHUNDAWAT, S. P. S.; BECKHAM, G. T.; HIMMEL, M. E.; DALE, B. E. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, p. 121–145, 2011.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **Federation of European Microbiological Societies 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.

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.

DILLON, A. J. P. Celulases. In: **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto, p. 243-269, 2004.

DODD, D.; CANN, I. K. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 1, p. 2–17, 2009.

DURAN, N.; MARQUES, S.; SALLES, B. C.; MEDEIROS, R. G.; FILHO, E. X. F. Enzimas na indústria de polpa e papel. In: BOM, E.P.S. (Org.). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 205-239, 2008.



FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; ALMEIDA, M. N.; ALFENAS, A. C.; COLODETTE, J. L.; REZENDE, S. T. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 1586–1603, 2012.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa Instrumentação Agropecuária**, São Carlos, 2011.

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1–19, 2010.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p. 41–65, 2007.

GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F. XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7623–7629, 2008.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; 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.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: Is it an additive or synergistic effect?. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 36–48, 2011.

JOVANOVIĆ, 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.

JUTURU, V.; WU, J. C, Microbial exo-xylanases: A mini review. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 174, p. 81–92, 2014.

KATAPODIS, P.; VRSANSKÁ, M.; KEKOS, D.; NERINCKX, W.; BIELY, P.; CLAEYSSSENS, M.; MACRIS, B. J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Sporotrichum thermophile*. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1881-1890, 2003.

KESHWANI, D. R.; CHENG, J. J. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1515–1523, 2009.

KNOB, A.; FORTKAMP, D.; PROLO, T.; IZIDORO, S.C.; ALMEIDA, J.M. Agro-residues as alternative for xylanase production by filamentous fungi. **BioResources**, v. 9, p. 5738–5773, 2014.

KUMAR, A.; KANWAR, S. S. Lipase production in solid-state fermentation (SSF): recent developments and biotechnological applications. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 6, p. 13–27, 2012.

KUMAR, K. S.; MANIMARAN, A.; PERMAUL, K. ; SINGH, S. Production of  $\beta$ -xylanase by a *Thermomyces lanuginosus* MC 134 mutant on corn cobs and its application in biobleaching of bagasse pulp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.107, p. 494–498, 2009.

LAVOINE, N.; DESLOGES, I.; DUFRESNE, A.; BRAS, J. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 735–764, 2012.

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.

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* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391–395, 2008.

LIANG, S.; HAN, Y.; WEI, L.; McDONALD, A. G. Production and characterization of bio-oil and bio-char from pyrolysis of potato peel wastes. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 5, p. 237–246, 2015.

LYND, L. R.; VAN ZYL, W. H.; MCBRIDE, J.E.; LASER, M. L. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass : an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 577–583, 2005.

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.

NG, I. S.; LI, C. W.; CHAN, S. P.; CHIR, J. L.; CHEN, P. T.; TONG, C. G.; YU, S. M.; HO, T. H. High-level production of a thermoacidophilic  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1310-1317, 2010.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, p. 1549-1558, 2010.

PEREIRA, J. C.; MARQUES, N. P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, B.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; GOMES, E.; MARTINS, D. A. B. 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.

PIROTA, R. D.; DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S. Simplification of the biomass to ethanol conversion process by using the whole medium of filamentous fungi cultivated under solid-state fermentation. **BioEnergy Research**, v. 7, p. 744–752, 2014.

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

SAAD, M. B. W.; OLIVEIRA, L. R. M.; CANDIDO, R. G.; QUINTANA, G.; ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A. R. Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping. **Enzyme Microbial Technology**, v. 43, p. 220–225, 2008.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185–194, 2009.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L., FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, p. 56–62, 2012.

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.

SHARMA, S.; SHARMA, V.; KUILA, A. Cellulase production using natural medium and its application on enzymatic hydrolysis of thermo chemically pretreated biomass. **3 Biotech**, v. 6, p. 139–149, 2016.

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.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SUKUMARAN, R. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Role and significance of  $\beta$ -glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500–507, 2013.

SINGHANIA, R. R.; SAINI, R.; ADSUL, M.; SAINI, J. K.; MATHUR, A.; TULI, D. An integrative process for bio-ethanol production employing SSF produced cellulase without extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 102, p. 45–48, 2015.

SORENSEN, T. H.; CRUYS-BAGGER, N.; WINDAHL, M. S.; BADINO, S. F.; BORCH, K.; WESTH, P. Temperature effects on kinetic parameters and substrate affinity of Cel7A cellobiohydrolases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, p. 22193–22202, 2015.

- SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, p. 421–424, 2009.
- SUN, Y. CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1–11, 2002.
- TANEDA, D.; UENO, Y.; IKEO, M.; OKINO, S. Characteristics of enzyme hydrolysis of cellulose under static condition. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 154–160, 2012.
- VERARDI, A.; BLASI, A.; MOLINO, A.; ALBO, L.; CALABRÒ, V. Improving the enzymatic hydrolysis of *Saccharum officinarum* L. bagasse by optimizing mixing in a stirred tank reactor: Quantitative analysis of biomass conversion. **Fuel Processing Technology**, v. 149, p. 15–22, 2016.
- WANG, G.; LIU, C.; HONG, J.; MA, Y.; ZHANG, K.; HUANG, X.; ZOU, S.; ZHANG, M. Comparison of process configurations for ethanol production from acid- and alkali-pretreated corncob by *Saccharomyces cerevisiae* strains with and without  $\beta$ -glucosidase expression. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 154–161, 2013.
- XU, F. Structure, ultrastructure, and chemical composition. Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels: Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicellulose and Cellulose, cap. 2, p. 9–47, 2010.
- YEOMAN, C. J.; HAN, Y.; DODD, D.; SCHROEDER, C. M.; MACKIE, R. I.; CANN, K. I. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. **Advances in Applied Microbiology**, v. 70, p. 1–55, 2010.
- ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Towards an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 797–824, 2006.
- ZHANG, K.; PEI, Z.; WANG, D. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 21–33, 2016.
- ZHOU, Z.; XUE, W.; LEI, F.; CHENG, Y.; JIANG, J. Kraft GL-ethanol pretreatment on sugarcane bagasse for effective enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 90, p. 100–109, 2016.

## CAPÍTULO II

---

### PROPRIEDADES CATALÍTICAS DE CELULASES E HEMICELULASES PRODUZIDAS POR *Lichtheimia ramosa*: APLICAÇÃO DESSAS ENZIMAS NA SACARIFICAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

**RESUMO:** Enzimas microbianas vem sendo estudadas para converter carboidratos complexos da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis. O presente estudo teve como objetivo otimizar a produção de celulases e hemicelulases pelo fungo *Lichtheimia ramosa*, avaliar suas propriedades catalíticas e aplicar o extrato enzimático produzido na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. A produção de carboximetilcelulase (CMCase),  $\beta$ -glicosidase, xilanase e  $\beta$ -xilosidase por *L. ramosa* foi otimizada, sendo obtido respectivamente  $168,1 \pm 2,2$ ,  $270,4 \pm 8,9$ ,  $34 \pm 0,8$  U/g e  $199,2 \pm 2,6$  U/g de substrato seco. O pH ótimo das enzimas foi de 4,5 a 5,5 e a temperatura ótima variou de 55 a 65°C. As enzimas apresentaram estabilidade em ampla faixa de pH e mantiveram cerca de 95% da atividade original quando incubadas por 1 hora a 55°C. CMCase,  $\beta$ -glicosidase, xilanase e  $\beta$ -xilosidase apresentaram meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de 68, 59, 52 e 54 minutos quando encubadas a 60°C, respectivamente. As enzimas foram estáveis em soluções contendo em torno de 10% de etanol e os parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{máx}$ ) obtidos indicam que a  $\beta$ -glicosidase de *L. ramosa* sofreu inibição do tipo competitiva por glicose. O extrato enzimático produzido por *L. ramosa*, nas condições otimizadas, foi utilizado para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar tendo como maior rendimento, cerca de 10,66% de glicose, após 24 horas em bagaço de cana pré-tratado com glicerol. As características das enzimas, somadas à eficiência para hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar, habilitam a aplicação desse extrato enzimático em processos de sacarificação da celulose visando a produção de etanol.

**Palavras-chave:** Complexo celulolítico e hemicelulolítico, cultivo em estado sólido, sacarificação de biomassa vegetal.

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a escassez mundial de combustíveis fósseis, e a decorrente necessidade em encontrar fontes alternativas de combustíveis e energia renovável, resultou em um foco crescente na produção de energia sustentável.

A biomassa lignocelulósica representa um recurso abundante, renovável e cada vez mais importante para produção de biocombustíveis, particularmente o bioetanol (JING et al., 2015). Nesse cenário, o uso de enzimas microbianas capazes de atuar na estrutura de polissacarídeos vegetais para produção de açúcares fermentescíveis, surge como ferramentas atraentes para o processo de obtenção de biocombustíveis (PEREIRA et al., 2015a).

As enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas são glicosil hidrolases que estão envolvidas na degradação da biomassa. A eficiência da hidrólise do material celulósico é resultado das ações sinérgicas de um sistema enzimático constituído de, pelo menos, três classes de enzimas, incluindo: Endoglucanase (EC 3.2.1.4) responsável por iniciar a hidrólise, atua internamente à celulose de forma aleatória, liberando oligossacarídeos de vários tamanhos e, conseqüentemente, expõe novos terminais para a ação das exoglucanases. Exoglucanase ou  $\text{exo-}\beta\text{-1,4-glucanase}$  ou celobiohidrolase (EC 3.2.1.91) atua sobre a celulose removendo unidades de celobiose a partir de extremidades não redutoras da molécula e a  $\beta\text{-1,4-glicosidase}$  ou celobiase (EC 3.2.1.21) que hidrolisa celobiose e outras celodextrinas à glicose controlando a velocidade global da reação e prevenindo o acúmulo de celobiose e outras celodextrinas no meio reacional (NG et al., 2010; LIAO et al., 2015).

As hemicelulases contribuem para a desorganização da estrutura polimérica da parede celular vegetal. As xilanases atuam reduzindo drasticamente o grau de polimerização da hemicelulose. Endo- $\beta\text{-1,4-xilanases}$  (EC 3.2.1.8) clivam internamente o esqueleto estrutural da molécula e as  $\beta\text{-xilosidades}$  (EC 3.2.1.3.7) hidrolisam externamente a cadeia de xilana e pequenos xilooligosacarídeos liberando xilose (GOWDHAMAN et al., 2014; KNOB et al., 2014).

As celulases e hemicelulases possuem diversas aplicações industriais, elas estão presentes na produção de sucos, vinhos e cervejas, nas indústrias têxtil, papel e celulose, detergentes, aditivos para a alimentação animal, dentre outros (NG et al., 2010; GARCIA et al., 2015).

Outra importante aplicação industrial consiste no potencial de hidrolisar biomassa vegetal em açúcares fermentescíveis. A biomassa representa uma fonte de carbono abundante para substituir o uso dos combustíveis fósseis, sendo os resíduos agroindustriais são os mais atrativos, devido seu baixo custo. Diversos investimentos têm sido realizados para possibilitar a degradação de materiais lignocelulósicos complexos em açúcares simples e fermentáveis, visando à produção de etanol (BALAT, 2011).

O alto custo da conversão do material lignocelulósico por hidrólise enzimática é um problema recorrente que limita a produção de bioetanol a partir de uma fonte renovável e altamente energética (BUSSAMRA et al., 2015).

Entre os estudos promissores para otimizar a hidrólise de biomassa vegetal, está o uso de coquetéis envolvendo diferentes classes de enzimas. No entanto, para tornar o processo de produção de bioetanol viável economicamente, as enzimas que são usadas na hidrólise da matéria prima precisam ter suas eficiências aumentadas e seus custos reduzidos. Estas enzimas devem apresentar alta taxa de hidrólise, atividade e estabilidade a altas temperaturas e baixa inibição do produto final e por compostos secundários que poderiam ser gerados no processo (MIELENZ, 2001). Nesse sentido, estudos recentes foram realizados a fim de aumentar a eficiência da produção dessas enzimas através de novas linhagens microbianas e técnicas de cultivo mais eficientes (DELABONA et al., 2013; LAN et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016; SANTOS et al., 2016).

Em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, o fungo filamentosso *Lichtheimia ramosa* apresentou elevado potencial para produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas em resíduos agroindustriais de baixo custo (GONÇALVES et al., 2013; SILVA et al., 2013; GARCIA et al., 2015). Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi otimizar a produção de celulasas e hemicelulasas pelo cultivo em estado sólido do fungo *L. ramosa*. As enzimas produzidas foram caracterizadas bioquimicamente e aplicadas em processos de sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar, visando a obtenção de açúcares fermentescíveis.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Microrganismo**

Foi utilizado o fungo filamentosso mesófilo *Lichtheimia ramosa* isolado a partir de bagaço de cana de açúcar da Usina de Açúcar e Álcool São Fernando, Dourados-MS, Brasil (GONÇALVES et al., 2013). O microrganismo foi mantido em *Ágar Sabouraud Dextrose*, após crescimento a 28°C por 48 horas, a estirpe foi armazenada a 4°C pela equipe do Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos (LEPFER).

### **2.2. Inóculo**

O microrganismo foi cultivado em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio *Ágar Sabouraud Dextrose* inclinado, mantido por 48 horas a 28°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura contendo 25 mL de solução nutriente composta por 0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% nitrato de cálcio (m/v). A inoculação do fungo nos substratos (resíduos agroindustriais) foi realizada pela transferência de 5 mL desta suspensão ( $10^6$  esporos/g de substrato seco).

### **2.3. Cultivo em estado sólido**

Celulases e hemicelulases foram produzidas pelo cultivo do fungo em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de resíduos agroindustriais (farelo de trigo, farelo de soja, sabugo de milho, palha de milho, casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar) e a umidade foi ajustada para 75% com solução nutriente (descrito no item 2.2). Após 96 horas de fermentação a 28°C, as enzimas foram extraídas a partir dos resíduos fermentados (COSTA et al., 2016; SANTOS et al., 2016). O substrato ideal para a produção das enzimas foi usado nas etapas subsequentes para avaliar os efeitos da variação do teor de umidade (50–80%), temperatura (20–45°C) e tempo de cultivo (24–144 h). O parâmetro selecionado em cada etapa foi utilizado para o cultivo posterior. Todo o material foi previamente autoclavado por 20 min a 121°C e os experimentos foram realizados em triplicatas.

### **2.4. Extração das enzimas**

A extração das enzimas a partir dos resíduos fermentados foram realizadas pela adição de 50 mL de água destilada, sendo mantidos em agitação a 100 rpm durante 1



hora. A amostra foi filtrada e centrifugada a  $1500 \times g$  durante 5 min a  $10^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi denominado extrato enzimático extracelular e utilizado nos ensaios subsequentes.

## **2.5. Determinação da atividade de celulases e hemicelulases**

As atividades de CMCase e xilanase foram quantificadas utilizando respectivamente Carboximetilcelulose 3% (m/v) (C5678 Sigma) e xilana 1% (m/v) (Birch-Wood Sigma) e o açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método de ácido 3,5-Dinitrosalicílico-DNS (MILLER, 1959). A atividade de  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase foram determinadas com 50  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático, 250  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,5 e 250  $\mu\text{L}$  de p-nitrofenil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo 4 mM (pNP $\beta$ G, Sigma) para  $\beta$ -glicosidase e p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo 4 mM (pNP $\beta$ X Sigma) para  $\beta$ -xilosidase, reagindo por 10 minutos a  $50^{\circ}\text{C}$ . A reação enzimática foi paralisada com 2 mL de carbonato de sódio 2 M, o p-nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm (PALMA-FERNANDEZ et al., 2002). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto de reação.

## **2.6. Caracterização das celulases e hemicelulases produzidas pelo fungo *L. ramosa***

### **2.6.1. Efeito do pH e temperatura**

O pH ótimo para a atividade de celulases e hemicelulases foi determinado mensurando a atividade das enzimas a  $50^{\circ}\text{C}$  na faixa de pH de 3,0–8,0, com incrementos de 0,5, utilizando solução tampão McIlvaine 0,1 M (MCILVAINE, 1921). A temperatura ótima para a atividade das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas foi obtida pela determinação da atividade enzimática ao longo de um intervalo de temperatura de  $30$ – $75^{\circ}\text{C}$ , com incrementos de  $5^{\circ}\text{C}$ , no respectivo pH ótimo. A estabilidade ao pH foi determinada incubando a enzima durante 24 horas a  $25^{\circ}\text{C}$  em diferentes valores de pH, utilizando as soluções tampão: McIlvaine 0,1 M (pH 3,0–8,0), Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0–8,5), e Glicina NaOH 0,1 M (pH 8,5–10,5), com incrementos de 0,5, tomando-se como 100% o valor mais elevado de atividade residual. A atividade residual foi determinada em condições ideais de pH e temperatura. A termoestabilidade foi determinada através da incubação da enzima durante 1 hora em temperaturas entre  $30$  e  $70^{\circ}\text{C}$ , com incrementos de  $5^{\circ}\text{C}$ , adotando como 100% o valor mais elevado de

atividade residual obtido após o tratamento de amostras. As atividades residuais foram medidas sob condições ótimas de pH e temperatura das enzimas.

### **2.6.3. Efeito de etanol sobre as atividades enzimáticas**

A atividade enzimática foi quantificada com a adição de etanol em diferentes concentrações, de 0–30%, na mistura de reação, com incrementos de 5%. As atividades foram medidas sob condições ótimas de pH e temperatura.

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

A atividade enzimática foi quantificada com a adição de glicose em diferentes concentrações, de 0–200 mM, na mistura de reação. As atividades foram medidas sob condições ótimas de pH e temperatura.

### **2.6.5. Determinação de parâmetros cinéticos**

Os parâmetros cinéticos Michaelinos foram determinados fixando a concentração de glicose em 25 mM e variando a concentração de substrato de 0,2–25 mM, no meio reacional. O cálculo dos parâmetros cinéticos foram obtidos por modulações gráficas descritas por Lineweaver, Burk, (1934).

## **2.7. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com micro-ondas e glicerol**

O bagaço de cana-de-açúcar foi lavado, seco a 40°C, moído e partículas retidas em peneiras de 3 mm. Para o pré-tratamento, foram imergidos 10 g de bagaço de cana em 30 mL de glicerol (100%), por 24 horas. Em seguida, o material foi transferido em balão de fundo redondo de 250 mL, colocado dentro do forno de micro-ondas e ligado em condensador de refluxo de rotação no topo do forno. As amostras foram irradiadas a 2450 MHz, durante 5 min. Após irradiação foi adicionado ao material 30 mL de água destilada, e após agitação foi filtrado. O material sólido foi seco a 40°C e utilizado em ensaios de análise de fibras e no processo de sacarificação enzimática. O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e o pré-tratado com glicerol usados nos experimentos de sacarificação foram caracterizados em relação a celulose, xilana e lignina (PEREIRA et al., 2015b).

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

Os ensaios de sacarificação do bagaço *in natura* e pré-tratados com glicerol foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, fechados com rolhas de látex, utilizando bagaço de cana a 3% (m/v), extrato enzimático do fungo *L. ramosa* (5 FPU de celulose) e tampão de acetato de sódio (0,1 M pH 5,5), para volume final de 25 mL. Os frascos foram incubados em shaker a 300 rpm, e 50°C, durante 24 horas. O conteúdo dos frascos foi filtrado e a quantidade de glicose liberada foi mensurada com o kit glicose-oxidase (Glicose-PP, *Gold Analisa Diagnóstica Ltda*, Brasil). Os experimentos foram realizados em triplicata. O rendimento de glicose foi calculado pela seguinte equação:

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

## 2.9. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são apresentados como a média de três ensaios independentes. A análise estatística dos dados incluiu ANOVA seguido pelo teste de Tukey com nível de significância de 1%, com o auxílio do *software* estatístico ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2016).

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Avaliação dos parâmetros de cultivo para produção das enzimas

### 3.1.1. Seleção de substratos para a produção de celulases e hemicelulases

Dentre os substratos avaliados a maior produção das enzimas foi obtido utilizando farelo de trigo como substrato, produzindo 43,2±1,3 U/g de substrato seco (4,3 U/mL) de CMCase, 162,2±4,2 U/g (16,22 U/mL) de β-glicosidase, 18,7±1,5 U/g (1,87 U/mL) de xilanase e 30,1±1 U/g (3,01 U/mL) de β-xilosidase (Tabela 1).

**Tabela 1.** Produção de celulases e hemicelulases em diferentes substratos agroindustriais por cultivo em estado sólido pelo fungo *L. ramosa* em 96 horas de cultivo, contendo 75% de umidade a 28°C.

Substrato	CMCase (U/g de substrato)	$\beta$ -glicosidase (U/g de substrato)	Xilanase (U/g de substrato)	$\beta$ -xilosidase (U/g de substrato)
Farelo de trigo	43,2 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	162,2 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>	18,7 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	30,1 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>
Palha de milho	15,2 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	3,5 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	5,4 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	1,4 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>
Sabugo de milho	2,0 $\pm$ 0,6 <sup>d</sup>	2,7 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	2,1 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	0,8 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>
Casca de arroz	2,2 $\pm$ 0,1 <sup>d</sup>	0,6 $\pm$ 0,0 <sup>d</sup>	5,1 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	0,3 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>
Farelo de soja	2,2 $\pm$ 0,3 <sup>d</sup>	11,5 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	5,6 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>	1,2 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>
Bagaço de cana	24,1 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>	11,1 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	4,1 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>	3,2 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>

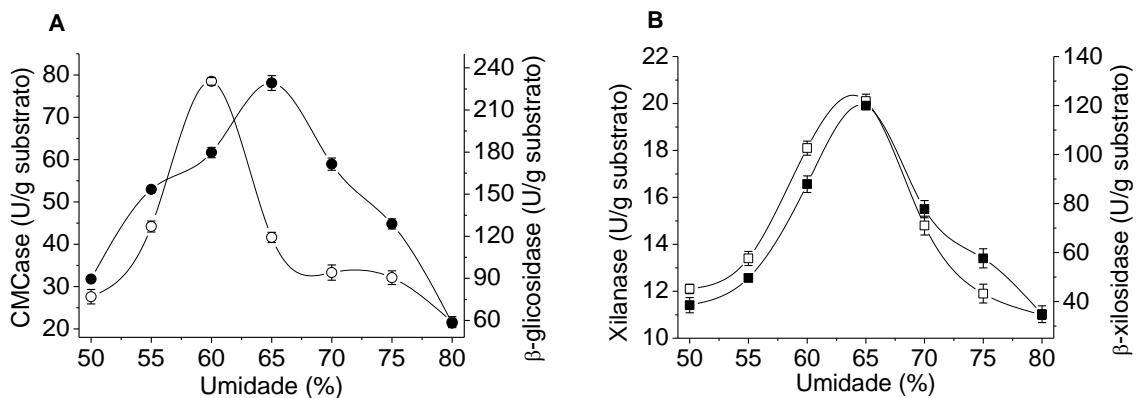
A produção média com letras diferentes indica diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,01$ ). \*Os valores ( $\pm$ ) representam os desvios padrão dos experimentos em triplicata.

Diversos estudos têm enfatizado as vantagens do farelo de trigo como substrato adequado na produção de celulases e hemicelulases por fungos filamentosos por cultivo em estado sólido (DELABONA et al., 2013; GOWDHAMAN et al., 2014; KILIKIAN et al., 2014; COSTA et al., 2016; SANTOS et al., 2016). O farelo de trigo é um substrato com boa capacidade de absorção de água e sua estrutura física favorece a transferência de massa no interior da matriz sólida (OLIVEIRA et al., 2016). Além disso o alto teor de proteína (13–19%), celulose e hemicelulose (superior a 39%) combinado com o baixo teor de lignina (3–6%) são características presentes no farelo de trigo, favorecendo o crescimento microbiano e conseqüentemente a produção de enzimas (FALKOSKI et al., 2013; KILIKIAN et al., 2014).

Os resultados confirmam o fungo *L. ramosa* como bom produtor de todas as enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico avaliadas, dessa maneira, outros parâmetros de cultivo foram avaliados afim de otimizar a produção dessas enzimas.

### 3.1.2. Influência dos parâmetros de cultivo na produção de celulases e hemicelulases utilizando farelo de trigo como substrato

O efeito da umidade inicial na produção de celulases e hemicelulases por *L. ramosa* por CES são apresentadas na Figura 1. Entre os valores de umidade avaliados, a maior produção das enzimas foi obtida em farelo de trigo com 60% de umidade inicial para CMCase e 65% para  $\beta$ -glicosidase, xilanase e  $\beta$ -xilosidade.

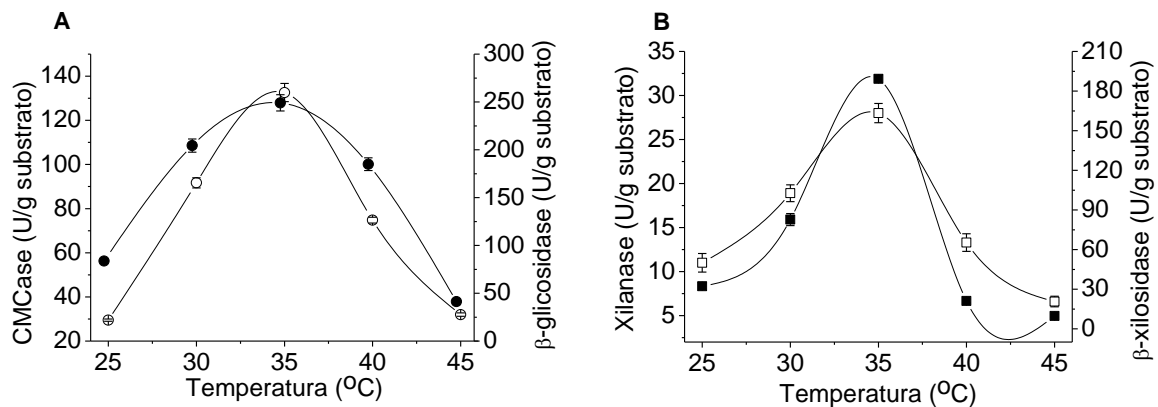


**Figura 1.** Produção de celulases (A) e hemicelulases (B) em cultivo em estado sólido do fungo *L. ramosa* em farelo de trigo contendo valores de umidade distintos, incubados por 96 horas a 28°C. (○) CMCase; (●)  $\beta$ -glicosidase; (□) Xilanase; (■)  $\beta$ -xiliosidase.

O teor de umidade desempenha um papel importante no cultivo em estado sólido, determinando as condições favoráveis de crescimento do microrganismo, e, conseqüentemente, a produção de enzimas de interesse. O baixo teor de umidade no substrato sólido, pode reduzir a solubilidade e a difusão dos nutrientes no substrato, bem como a estabilidade das enzimas extracelulares, podendo prejudicar o crescimento do microrganismo (DELABONA et al., 2013; SADAF, KHARE, 2014). Por outro lado, os níveis de umidade excessivos podem provocar a agregação das partículas do substrato, reduzindo a porosidade da matriz sólida, limitando a disponibilidade e transferência de oxigênio, além de dificultar o crescimento microbiano e reduzir a produção de enzimas (OLIVEIRA et al., 2016).

O efeito do teor de umidade inicial do substrato sobre a produção de celulases e hemicelulases por cultivo em estado sólido também foi descrito anteriormente. Adhyaru et al. (2015) avaliaram a produção enzimática por CES, utilizando o fungo *Aspergillus tubingensis* FDHN1e foi possível aumentar significativamente a atividade enzimática depois de otimizar o teor de umidade inicial do meio sólido.

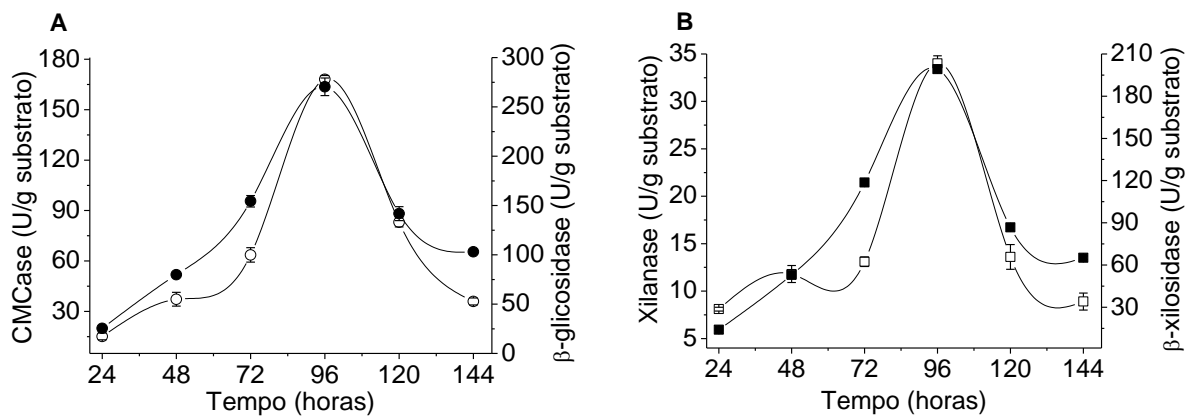
Outro parâmetro importante que influencia o crescimento microbiano é a temperatura. A temperatura ideal para produção de celulases e hemicelulases pelo fungo *L. ramosa* foi obtida nos cultivos a 35°C, apresentando cerca de 132,6 $\pm$ 4,1 U/g de substrato seco (13,26 U/mL) para CMCase, 249,0 $\pm$ 8,5 U/g (24,9 U/mL) para  $\beta$ -glicosidase, 28,0 $\pm$ 1,1 U/g (2,8 U/mL) para xilanase e 189,3 $\pm$ 2,62 U/g (18,93 U/mL) para  $\beta$ -xiliosidase (Figura 2).



**Figura 2.** Produção de celulases (A) e hemicelulases (B) em diferentes temperaturas em cultivo em estado sólido pelo fungo *L. ramosa* em farelo de trigo contendo 60% de umidade inicial para CMCase e 65% para as demais enzimas por 96 horas. (○) CMCase; (●)  $\beta$ -glicosidase; (□) Xilanase; (■)  $\beta$ -xilosidase.

A temperatura de incubação é de extrema importância para produção enzimática devido as alterações ocasionadas em todas as estruturas proteicas microbianas que ocorrem com variações da temperatura (JUTURU, WU, 2014). Em temperaturas inferiores ou superiores da ótima, as atividades metabólicas são consideravelmente reduzidas, com consequente inibição do crescimento microbiano e diminuição da síntese das enzimas (ADHYARU et al. , 2015).

O efeito do tempo de cultivo sobre a produção de celulases e hemicelulases por *L. ramosa* também foi determinado. A maior produção das enzimas avaliadas foi obtida em 96 horas de cultivo, mantendo os demais parâmetros otimizados nos ensaios anteriores, sendo produzido cerca de  $168,1 \pm 2,2$  U/g de substrato seco (16,8 U/mL) para CMCase;  $270,4 \pm 8,9$  U/g (27,0 U/mL) para  $\beta$ -glicosidase;  $34 \pm 0,8$  U/g (3,4 U/mL) para xilanase e  $199,2 \pm 2,6$  U/g (19,92 U/mL) para  $\beta$ -xilosidase (Figura 3).



**Figura 3.** Produção de celulases (A) e hemicelulases (B) pelo fungo *L. ramosa* em função do tempo de cultivo em farelo de trigo a 35°C, contendo 60% de umidade inicial para CMCCase e 65% para as demais enzimas (As barras de erro representam o desvio padrão médio da determinação em triplicata). (○) CMCCase; (●) β-glicosidase; (□) Xilanase; (■) β-xilosidase.

A diminuição da atividade de celulases e hemicelulases após 96 horas de cultivo pode ser devido ao consumo dos nutrientes, produção de metabólitos tóxicos ao microrganismo, acúmulo do calor metabólico, ou ainda, pela inibição ou desnaturação de suas enzimas, em decorrência das alterações ocorridas no meio (XIN; GENG, 2010; SADAF; KHARE, 2014).

A alta produção das enzimas avaliadas, dentro de um curto período de tempo, pode ser atrativo para a aplicação desses biocatalisadores em processos industriais. O tempo necessário para atingir a produção ótima de celulases e hemicelulases pelo fungo *L. ramosa* (96 h) foi mais curto do que a maioria dos relatados anteriormente. Soni; Soni (2010) descreveram a produção máxima de endoglucanase (0,44 U/mL) pelo fungo *Chaetomium erraticum*, quando cultivado por fermentação em estado sólido em farelo de trigo, em 192 horas. Pereira et al. (2015a) relataram a máxima produção de β-glicosidase (41,8 U/g) em 192 horas de cultivo em estado sólido do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em farelo de trigo. Terrasan et al. (2010) otimizaram a produção de hemicelulases em cultivo submerso do fungo *Penicillium janczewskii* obtendo 15,19 U/mL de xilanase e 0,16 U/mL de β-xilosidase em 168 horas de cultivo. Zimbardi et al. (2013) relataram a produção de celulases e hemicelulases pelo fungo *Colletotrichum graminicola* em farelo de trigo com máxima produção de 159,3 U/g de β-glicosidase e 128, U/g de β-xilosidase em 168 horas de fermentação e 378,1 U/g de xilanase em 192 horas.

A otimização dos parâmetros de cultivo do fungo *L. ramosa* resultou em considerável aumento na produção das enzimas de interesse, em comparação aos cultivos iniciais onde as condições não estavam otimizadas (Tabela 1; Figura 3). A produção simultânea de diferentes enzimas envolvidas na hidrólise da biomassa vegetal, pode ser considerada outra vantagem deste fungo, considerando o aspecto de redução dos custos de produção e aplicação dessas enzimas.

### 3.2. Caracterização de celulases e hemicelulases produzidas pelo fungo *L. ramosa*

#### 3.2.1. Efeito do pH e temperatura

As enzimas produzidas por *L. ramosa* apresentaram maior atividade catalítica em pH 4,5; 4,5; 5,0 e 5,5 para xilanase,  $\beta$ -xilosidase, CMCase e  $\beta$ -glicosidase, respectivamente. Com relação à temperatura ótima, CMCase e  $\beta$ -glicosidase apresentaram maior atividade em 60 e 65°C, respectivamente, enquanto que xilanase e  $\beta$ -xilosidase foram mais ativas a 55°C (Tabela 2).

Celulases e hemicelulases apresentaram considerável estabilidade estrutural. CMCase,  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidases mantiveram sua atividade original após 24 horas em faixas de pH entre 3,5 a 10,5. A xilanase foi estável em uma faixa inferior, pH 4,5 à 9,5. Quanto à estabilidade térmica, cerca de 96% da atividade catalítica foi recuperada após 1 hora a 55°C para todas as enzimas avaliadas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Propriedades bioquímicas das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas produzidas pelo fungo *L. ramosa*, obtidos por cultivo em estado sólido, a 35°C em 96 horas de cultivo, utilizando farelo de trigo como substrato.

Enzimas	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	pH estabilidade	Temperatura estabilidade (°C)
CMCase	5,0	60	3,5–10,5	30–55
$\beta$ -glicosidase	5,5	65	3,5–10,5	30–55
Xilanase	4,5	55	4,5–9,5	30–55
$\beta$ -xilosidase	4,5	55	3,5–10,5	30–55

As enzimas produzidas por *L. ramosa* apresentaram atividades ótimas em valores de pH ácidos (4,5–5,5) e sob temperaturas elevadas (entre 55 e 65°C) e foram estáveis sob um amplo espectro de pH e temperatura, características atrativas para a aplicação industrial desse complexo enzimático. Valores de pH ótimo de 5,0 também foi relatado para endoglucanase de outras espécies fúngicas (OLAJUYIGBE; OGUNYEWU, 2016). A xilanase produzida por *Trichoderma inhamatum* apresentou



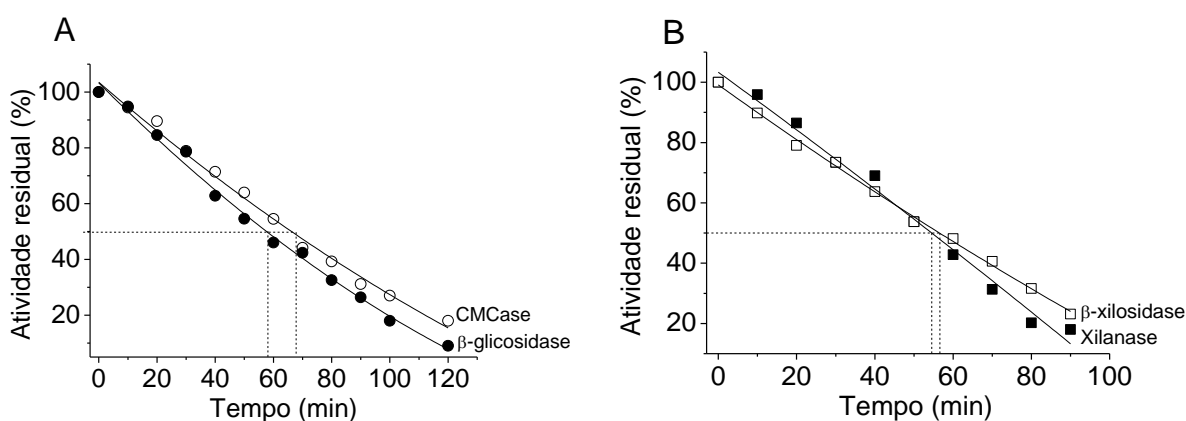
pH ótimo de 5,5 (SILVA et al., 2015), enquanto que a  $\beta$ -xilosidase produzida por *Colletotrichum graminicola* apresentou pH ótimo de 4,7 (ZIMBARDI et al., 2013).

As enzimas avaliadas no presente estudo apresentaram atividade ótima em temperaturas superiores a 50°C. De forma geral, enzimas produzidas por microrganismos mesófilos atuam em temperaturas mais moderadas (GOMES et al., 2007; GARCIA et al., 2015).

Liao et al. (2015) estudando o fungo *Penicillium oxalicum* GZ-2 encontraram temperatura ótima para CMCase de 50°C. Silva et al. (2016) relataram atividade ótima a 60°C para a  $\beta$ -glicosidase produzida pelo fungo *Myceliophthora heterothallica*. Ahmed et al. (2016) estudando a xilanase produzida por *Aspergillus terreus* KP90097 encontraram temperatura ótima de 50°C. A  $\beta$ -xilosidase produzida por *Phanerochaete chrysosporium* apresentou atividade ótima a 50°C (HUY et al., 2015).

Considerando que o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica geralmente é realizado em soluções ácidas (NG et al., 2010; FALKOSKI et al., 2013), estes resultados habilitam a utilização desse complexo enzimático para essa finalidade. Além disso temperaturas elevadas são altamente desejáveis para aplicações industriais, e não são comumente encontradas para enzimas de fungos mesófilos (GARCIA et al., 2015).

As celulasas e hemicelulasas produzidas por *L. ramosa* foram termoinativadas quando incubadas a 60°C, apresentando meia-vida ( $t_{1/2}$ ) em 68, 59, 52 e 54 min para CMCase,  $\beta$ -glicosidase, xilanase e  $\beta$ -xilosidase, respectivamente (Figura 4).



**Figura 4.** Atividade residual de celulasas (A) e hemicelulasas (B) produzida pelo fungo *L. ramosa* em função do tempo de incubação a 60°C.

As enzimas CMCase e  $\beta$ -glicosidase foram mais termoestáveis que a maioria das enzimas produzidas por outras espécies fúngicas, incluindo algumas termófilas (ZANOELO et al., 2004; SOUZA et al., 2010). A xilanase e  $\beta$ -xilosidase também apresentaram estabilidade térmica elevada principalmente quando comparada a outros biocatalisadores com a mesma função biológica, mas produzidos por diferentes espécies (KATAPODIS et al., 2006; YAN et al., 2008) com valores de meia-vida entre 40 segundos a 50 minutos, quando incubadas a 60°C (JIANG et al., 2010; SILVA et al., 2015).

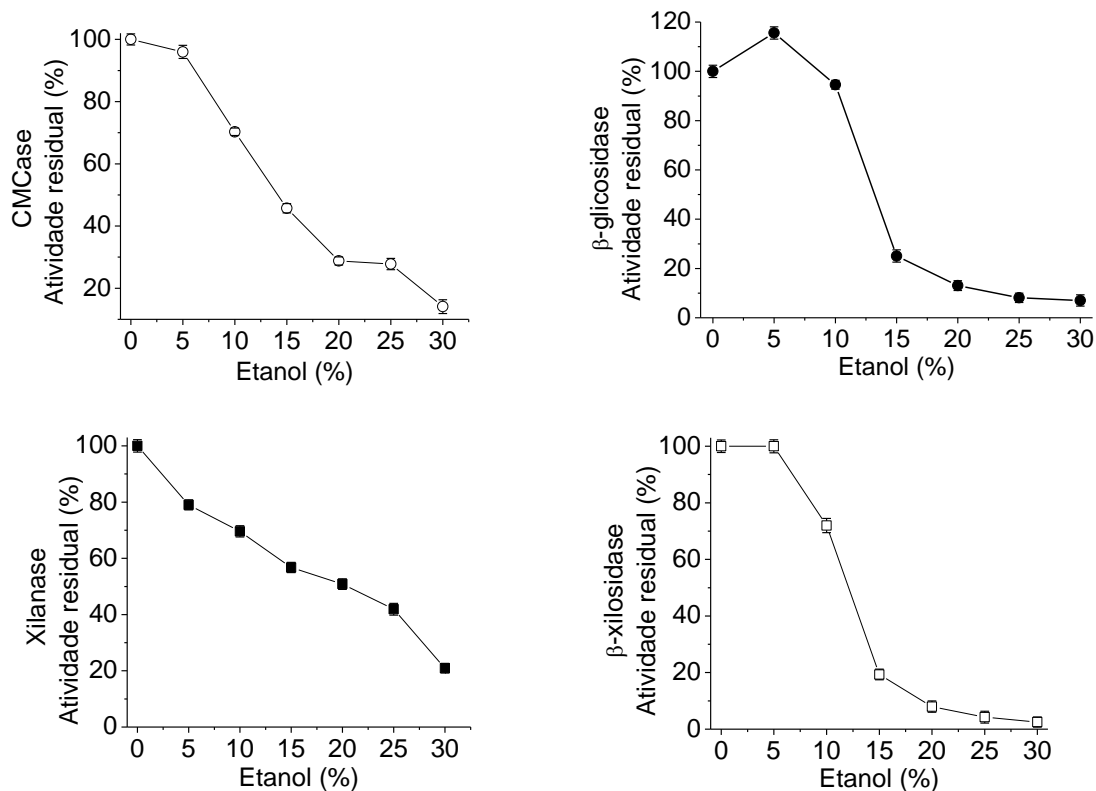
A estabilidade térmica das enzimas produzidas por *L. ramosa* constitui outra característica muito interessante para seu emprego em processos biotecnológicos. Elevada termoestabilidade é propriedade importante para aplicação industrial de celulases e hemicelulases, uma vez que a hidrólise da celulose ocorre com maior velocidade a temperaturas mais elevadas (LEGHLIMI et al., 2013).

A sacarificação de celulose em temperaturas elevadas contribui para proteger tanto o substrato como os produtos da reação de contaminação e deterioração microbiana (LEGHLIMI et al., 2013; OLAJUYIGBE; OGUNYEWU, 2016).

### **3.2.2. Efeito de etanol sobre as atividade enzimáticas**

A avaliação do efeito do etanol sobre a atividade enzimática é essencial em estudos de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, uma vez que estas enzimas são frequentemente expostas a concentrações substanciais de etanol em diversas aplicações industriais (SUN, CHENG, 2002; GARCIA et al., 2015).

Todas as enzimas apresentaram recuperação, de no mínimo, 70% da atividade original em solução contendo até 10% de etanol. A enzima  $\beta$ -glicosidase foi ativada com a presença de etanol na mistura de reação, alcançando cerca de 20% a mais da atividade inicial em solução contendo 5% de etanol (Figura 5).



**Figura 5.** Efeito de etanol sobre a atividade de celulases e hemicelulases produzida pelo fungo *L. ramosa* (As barras de erro representam o desvio padrão médio da determinação em triplicata).

Considerando que a concentração final de etanol nos caldos fermentados obtidos por processos tradicionais é de cerca de 10% (v/v) (GU et al., 2001), é possível inferir que o complexo enzimático produzido por *L. ramosa* é suficientemente estável para ser aplicado em processos industriais contendo etanol.

O aumento do potencial catalítico da enzima β-glicosidase observado pela adição de etanol está relacionada com a atividade glicosiltransferase (VILLENNA et al., 2006), no qual o etanol pode agir como acceptor preferencial do cátion glicosil intermediário durante a hidrólise do substrato, aumentando a velocidade da reação (KRISCH et al., 2012).

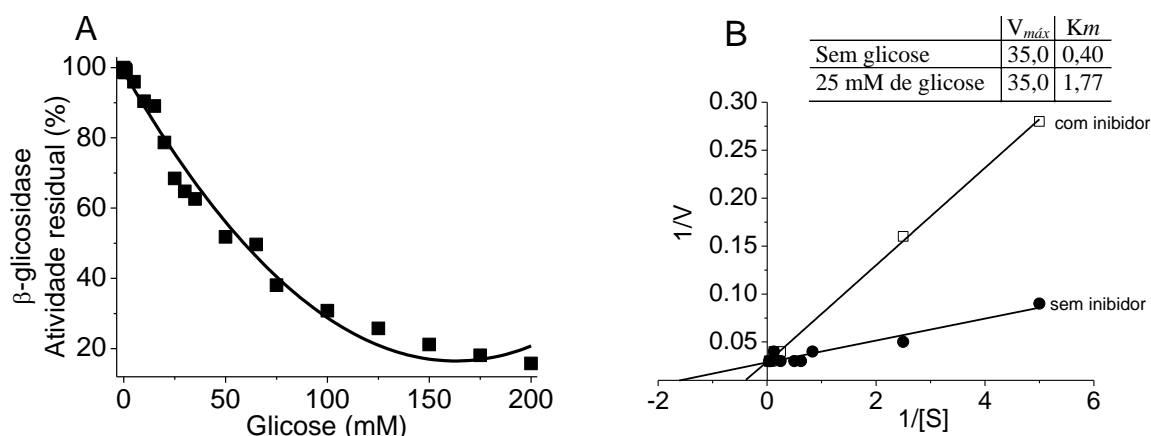
### 3.2.3. Efeito de glicose sobre a atividade da β-glicosidase

Diferentes concentrações de glicose foram adicionadas na mistura de reação para avaliar seu efeito sobre a ação da enzima. A β-glicosidase de *L. ramosa* apresentou inibição por glicose, retendo 50% da sua atividade inicial em concentrações de 50 mM

de glicose, em concentrações mais elevadas (até 150 mM) a enzima reteve cerca de 20% da sua atividade original (Figura 6A).

A grande maioria das  $\beta$ -glicosidases microbianas apresenta forte inibição por glicose. Santos et al. (2016) relataram forte inibição por glicose para  $\beta$ -glicosidase de *Gongronella butleri*, obtendo apenas 50% de atividade catalítica em soluções contendo 10 mM de glicose. A  $\beta$ -glicosidase de *Periconia* sp. também foi fortemente inibida em concentrações de 10 mM de glicose (HARNPICHARNCHAI et al., 2009). Dessa forma, é possível inferir que a  $\beta$ -glicosidase produzida por *L. ramosa* apresenta considerável tolerância a glicose.

Uma alternativa para superar a inibição por açúcares fermentáveis é associar a hidrólise enzimática da celulose à fermentação alcoólica através do processo de sacarificação e fermentação simultânea onde a glicose liberada é convertida em etanol por microrganismos fermentadores (SCOTT et al., 2013; PEREIRA et al., 2015a).



**Figura 6.** (A) Efeito da concentração de glicose sobre a atividade da  $\beta$ -glicosidase; (B) Gráfico de Lineweaver-Burk para o extrato enzimático do fungo *L. ramosa*.

Os parâmetros cinéticos ( $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$ ) para  $\beta$ -glicosidase produzida pelo fungo *L. ramosa* foram calculados, com a presença e ausência de inibidor (glicose) na mistura de reação, pelo duplo recíproco de Lineweaver-Burk (Figura 6B). Na cinética realizada sem adição de glicose (inibidor) os valores de  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  foram de 35,0  $\mu$ mol e 0,40, respectivamente. Os valores de  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  obtidos na presença de glicose foram 35,0  $\mu$ mol e 1,77 mM, respectivamente.

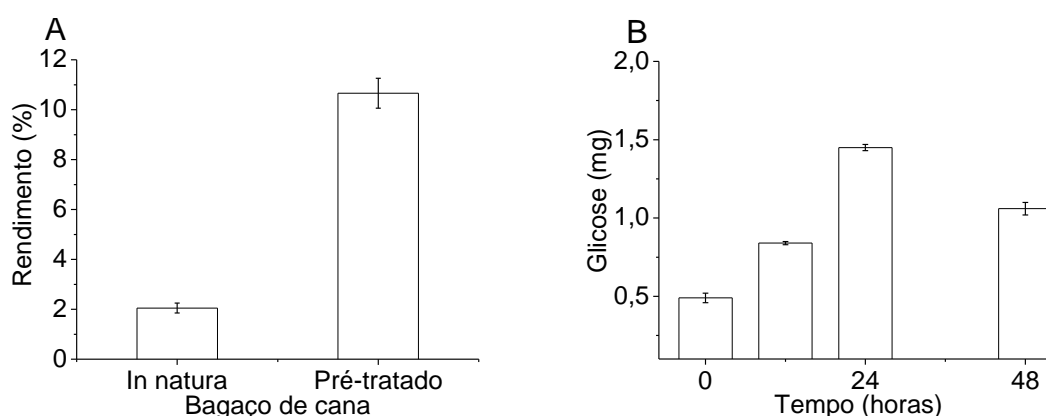
A linearidade gráfica observada no duplo recíproco de Lineweaver-Burk, confirmam o perfil Michaeliano da enzima, com  $r^2 = 0,998$ . Os parâmetros cinéticos obtidos indicam que a inibição da enzima por glicose é do tipo competitiva, onde o valor de  $K_m$  aumenta com a presença do inibidor, no entanto, a  $V_{máx}$  não sofre alteração (Figura 6B).

Nesse tipo de inibição o inibidor (glicose) e o substrato competem pelo sítio ativo da enzima. O aumento na concentração de substrato favorece sua ligação ao sítio ativo, revertendo o efeito inibidor gerado pela glicose, resultando no aumento dos valores do  $K_m$  e a  $V_{máx}$  é inalterada (LEITE et al., 2008; KRISCH et al., 2012).

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

O extrato enzimático produzido por *L. ramosa* foi utilizado na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado com glicerol, sendo convertido apenas 2,05% da celulose constituinte do bagaço *in natura* em glicose e 10,6% para o bagaço pré tratado com glicerol (Figura 7A), após 24 horas de hidrólise.

A baixa conversão de celulose em glicose observada no bagaço de cana *in natura* provavelmente é devido a elevada organização da lignina e hemicelulose, constituintes da parede celular vegetal, que forma uma barreira à ação das enzimas celulolíticas, impedindo a ação eficiente destas enzimas (CHANDEL et al., 2012; FALKOSKI et al., 2013).



**Figura 7.** Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando extrato enzimático de *L. ramosa* (A) Rendimentos de glicose obtido após a sacarificação de bagaço de cana *in natura* e pré-tratado com glicerol; (B) Rendimento de glicose em função do tempo de sacarificação enzimática de bagaço de cana pré-tratado com glicerol (As barras de erro representam o desvio padrão médio da determinação em triplicata).

Devido a maior eficiência obtida na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com glicerol, o mesmo foi utilizado para avaliar a eficiência do processo em função do tempo. O melhor rendimento foi obtido com 24 horas de hidrólise (1,45 mg/mL), sendo possível observar queda considerável em 48 horas (Figura 7B).

A diminuição na quantidade de glicose após 48 horas de hidrólise pode ser justificada pela atividade glicosiltransferase da  $\beta$ -glicosidase. O aumento na concentração de glicose no meio reacional pode favorecer a síntese de celbiose pela atividade de transglicosilação da  $\beta$ -glicosidase (BHATIA et al., 2002). Outro indicativo que reforça essa hipótese é o aumento da atividade catalítica dessa enzima na presença de etanol, evidenciado nos ensaios anteriores (Figura 5), onde a enzima utiliza o etanol como acceptor da glicose liberando etil glicosídeos. Fato evidenciado em trabalhos anteriores (LEITE et al., 2008; KRISCH et al., 2012).

Os rendimentos de glicose obtidos no presente trabalho com bagaço pré-tratado com glicerol, ficam ainda mais expressivos quando comparados com a literatura. Moretti et al. (2014), utilizou enzimas de *Myceliophthora thermophila* para sacarificar o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com microondas e glicerol e obteve rendimento de glicose de 4%. Zimbardi et al. (2013), estudando o fungo *Colletotrichum graminicola* obteve rendimentos máximos de 4,4% de glicose após 72 horas.

Os resultados indicam que o complexo enzimático produzido por *L. ramosa* apresenta potencial para conversão da biomassa lignocelulósica. Nossos resultados são promissores e estimulam a continuação deste trabalho, no que se refere à otimização das condições de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O fungo *L. ramosa* apresentou excelente capacidade para produzir enzimas de degradação da parede celular vegetal, principalmente CMCase,  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase, quando cultivado por fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato, além disso a elevada atividade de  $\beta$ -glicosidase pode ser utilizado como suplementação alternativa à preparação de celulases comerciais.

As enzimas produzidas foram estáveis em ampla faixa de pH e temperaturas e mantiveram 70% de atividade residual em soluções contendo 10% de etanol.

As características das enzimas, somadas a eficiência para hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar, habilitam a aplicação desse extrato enzimático em processos de

sacarificação da celulose visando a produção de etanol. Além disso, a produção simultânea, em níveis significativos, de diferentes enzimas envolvidas na hidrólise da biomassa vegetal, pode ser considerada outra vantagem deste fungo, contribuindo para redução dos custos de produção desses biocatalisadores.

## 5. REFERÊNCIAS

ADHYARU, N. D.; BHATT, S. N.; MODI, A. H. Optimization of upstream and downstream process parameters for cellulase-poor-thermosolvent-stable xylanase production by *Apergillus tubingensis* FDHN1. **Bioresource Technology**, v. 2, p. 1–14, 2015.

AHMED. S. A.; SALEH. S. A. A.; MOSTAFA, F. A.; EL ATY, A. A. A.; AMMAR. H. A. M. Characterization and valuable applications of xylanase from endophytic fungus *Aspergillus terreus* KP900973 isolated from *Corchorus olitorius*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 134–144, 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.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial  $\beta$ -Glucosidases: Cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 375–407, 2002.

BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; COSTA, A. C. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 173–181, 2015.

CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S.; CARVALHO, W.; SINGH, O. V. Sugarcane bagasse and leaves: Foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p. 11–20, 2012.

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.; TREMACOLDIC, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 236–242, 2013.

FALKOSKI, D. L.; GUIMARAES, V. M.; ALMEIDA, M. N.; ALFENAS, A. C.; COLODETTE, J. L.; REZENDE, S. T. *Chrysosporthe cubensis*: a new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 296–305, 2013.

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 residues: characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 314–319, 2015.

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

GONÇALVES, F. A.; LEITE, R. S. R.; RODRIGUES, A.; ARGANDOÑA, E. J. S.; FONSECA, G. G. Isolation, identification and characterization of a novel high level  $\beta$ -glucosidase producing *Lichtheimia ramosa* strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 377–384, 2013.

GOWDHAMAN, D.; MANASWINI, V. S.; JAYANTHI, V.; DHANASRI, M.; JEYALAKSHMI, G.; GUNASEKAR, V.; SUGUMARAN, K. R.; PONNUSAMI, V. Xylanase production from *Bacillus aerophilus* KGJ2 and its application in xylooligosaccharides preparation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 90–98, 2014.

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

HARNPICHARNCHAI, P.; CHAMPREDA, V.; SORNLAKE, W.; EURWILAICHITR, L. A thermotolerant  $\beta$ -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars. **Protein Expression and Purification**, v. 67, p. 61–69, 2009.

HUY, N. D. H.; NGUYEN, C. L.; SEO, J. W.; KIM, D. H.; PARK, S. M. Putative endoglucanase PcGH5 from *Phanerochaete chrysosporium* is a  $\beta$ -xylosidase that cleaves xylans in synergistic action with endo-xylanase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, p. 416–420, 2015.

JIANG, Z.; CONG, Q.; YAN, Q.; KUMAR, N.; DUB, X. Characterization of a thermostable xylanase from *Chaetomium* sp. and its application in Chinese steamed bread. **Food Chemistry**, v. 120, p. 457–462, 2010.

JING, L.; ZHAO, S.; XUE, J. L.; ZHANG, Z.; YANG, Q.; XIAN, L.; FENG, J. X. Isolation and characterization of a novel *Penicillium oxalicum* strain Z1-3 with enhanced cellobiohydrolase production using cellulase-hydrolyzed sugarcane bagasse as carbon source. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 666–675, 2015.



JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188–203, 2014.

KATAPODIS, P.; NERINCKX, W.; CLAEYSSSENS, M.; CHRISTAKOPOULOS, P. Purification and characterization of a thermostable intracellular  $\beta$ -xylosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2402–2409, 2006.

KILIKIAN, B. V.; AFONSO, L. C.; SOUZA, T. F. C.; FERREIRA, R. G.; PINHEIRO, I. R. Filamentous fungi and media for cellulase production in solid state cultures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 279–286, 2014.

KNOB, A.; FORTKAMP, D.; PROLO, T.; IZIDORO, S. C.; ALMEIDA, J.M. Agro-residues as alternative for xylanase production by filamentous fungi. **BioResources**, v. 9, p. 5738–5773, 2014.

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.

LAN, T. Q.; WEI, D.; YANG, S. T.; LIU, X. G. Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 175–182, 2013.

LEGLIMI, H.; MERAIHI, Z.; BOUKHALFA-LEZZAR, H.; COPINET, E.; DUCHIRON, F. Production and characterization of cellulolytic activities produced by *Trichoderma longibrachiatum* (GHL). **African Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 465–475, 2013.

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

LIAO, H.; FAN, X. T.; MEI, X.; WEI, Z.; RAZA, W.; SHEN, Q.; XU, Y. Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification. **Biomass and Bioenergy**, v. 74, p. 122–134, 2015.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, p. 658–666, 1934.

MCILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 49, p. 183–186, 1921.

MIELENZ, J. R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 324–329, 2001.

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. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1062–1071, 2012.

NG, I. S.; LI, C. W.; CHAN, S. P. CHIR, J. L.; CHEN, P. T.; TONG, C. G.; YU, S. M. High-level production of a thermoacidophilic  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1310–1317, 2010.

OLAJUYIGBE, F. M.; OGUNYEWU, O. A. Enhanced production and physicochemical properties of thermostable crude cellulase from *Sporothrix carnii* grown on corncob. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 110–117, 2016.

OLIVEIRA, A. P. A.; SILVESTRE, M. A.; GARCIA, N. F. L.; ALVES-PRADO, H. F.; RODRIGUES, A.; PAZ, M. F. P.; 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**, v. 2016, p. 1–10, 2016.

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

PEREIRA, J. C.; LEITE, R. S. R.; PRADO, H. F. A.; MARTINS, D. A. B.; E. GOMES, E.; SILVA, R. Production and Characterization of  $\beta$ -glucosidase obtained by the solid-state cultivation of the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, p. 723–732, 2015a.

PEREIRA, J. C.; N. MARQUES, N. P.; RODRIGUES, A.; T.; 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, 2015b.

SADAF, A.; KHARE, S. K. Production of *Sporotrichum thermophile* xylanase by solid state fermentation utilizing deoiled *Jatropha curcas* seed cake and its application in xylooligosachharide synthesis. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 126–130, 2014.

SANTOS, F. R. S. S.; GARCIA, N. F. L. G.; 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.

SILVA, C. A. A.; LACERDA, M. P. F.; LEITE, R. S. R.; FONSECA, G. G. Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 1–9, 2013.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The assistat software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, p. 3733–3740, 2016.

SILVA, L. A. O.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 307–313, 2015.

SILVA, V. C. T.; COTO, A. L. S.; SOUZA, R. C.; NEVES, M. B. S.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Effect of pH, temperature, and chemicals on the endoglucanases and  $\beta$ -Glucosidases from the thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica* obtained by solid-state and submerged cultivation. **Biochemistry Research International**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

SONI, S. K.; SONI, R. Regulation of cellulase syntesis in *Chaetomium erraticum*. **BioResources**, v.5, p. 81–98, 2010.

SOUZA, F. H. M.; NASCIMENTO, C. V.; ROSA, J. C.; MASUI, D. C.; LEONE, F. A.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 272–278, 2010.

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

TERRASAN, C. R.; TEMER, B.; DUARTE, M. C.; CARMONA, E. C. Production of xylanolytic enzymes from *Penicillium janczewskii*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4139–4143, 2010.

VILLENA, M. A.; IRANZO, J. F. U.; GUNDLLAPALLI, S. B.; OTERO, R. R. C.; PÉREZ, I. B. Characterization of an exocellular  $\beta$ -glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 229–234, 2006.

XIN, F.; GENG, A. Horticultural waste as the substrate for cellulase and hemicellulase production by *Trichoderma reesei* under solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 295–306, 2010.

YAN, Q. J.; WANG, L.; JIANG, Z. Q.; YANG, S. Q.; ZHU, H. F.; LI, L. T. A xylose-tolerant  $\beta$ -xylosidase from *Paecilomyces thermophila*: Characterization and its co-action with the endogenous xylanase. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5402–5410, 2008.

ZANOELO, F. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.  $\beta$ -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiology Letters**, v. 240, 137–143, 2004.

ZIMBARDI, A. L. R. L.; SEHN, C.; MELEIRO, L. P.; SOUZA, F. H. M.; MASUI, D. C.; NOZAWA, M. S. F.; GUIMARÃES, L. H. S.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. Optimization of  $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -Xylosidase and xylanase production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 2875–2902, 2013.

## CAPÍTULO III

---

### PROPRIEDADES CATALÍTICAS DE XILANASE TERMOESTÁVEL PRODUZIDA PELO FUNGO *Thermoascus crustaceus* POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO LIVRE DE CELULASES

**RESUMO:** O presente estudo teve como objetivo otimizar a produção de xilanase pelo fungo termófilo *Thermoascus crustaceus* por cultivo em estado sólido, avaliar as propriedades catalíticas e a aplicabilidade industrial dessa enzima. A maior produção de xilanase por *T. crustaceus*, cerca de 179,5 U/g de substrato seco (ou 17,9 U/mL), foi obtida por cultivo em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato, contendo 70% de umidade inicial em 48 h de cultivo. A enzima apresentou maior atividade catalítica em pH 5,5 a 70°C. A xilanase produzida por *T. crustaceus* foi estável em ampla faixa de pH (3,5–11,0) e manteve cerca de 95% da atividade original quando incubadas por 1 hora a 70°C. A enzima foi estável em soluções contendo em torno de 10% de etanol. O extrato enzimático produzido por *T. crustaceus* apresentou atividade de endoxilanase e  $\beta$ -xilosidase, tendo como produto de hidrólise xilose e xilooligossacarídeos, não sendo observado atividade de enzimas celulolíticas. Essas características habilita a aplicação da enzima produzida no biobranqueamento de polpa de celulose e na hidrólise de biomassa vegetal visando a obtenção de açúcares fermentescíveis.

**Palavras-chave:** Enzimas industriais, resíduos agroindustrial, caracterização bioquímica, cromatografia de camada delgada, endoxilanase,  $\beta$ -xilosidase, aplicação industrial.

## 1. INTRODUÇÃO

As enzimas microbianas têm recebido atenção por serem precursores de tecnologia limpa para produção de compostos industriais, comercialmente importantes, utilizando biomassa residual como substratos (CORRÊA et al., 2016).

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, se encontra disposta entre a celulose e lignina, representando cerca de 20-35% da biomassa lignocelulósica. A hemicelulose é constituída por uma cadeia principal de monômeros de D-xilose, unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, parcialmente acetilada com ramificações de cadeia curta de resíduos O-acetil,  $\alpha$ -L-arabinofuranosilo e a-D-glucuronilo (ALVES-PRADO et al., 2010; COSTA et al., 2016).

Devido a complexidade estrutural da hemicelulose, a sua hidrólise completa, requer a ação sinérgica de várias enzimas. As xilanases atuam na cadeia central da hemicelulose, reduzindo drasticamente seu grau de polimerização. Endo- $\beta$ -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) clivam as ligações internas do esqueleto estrutural da molécula, liberando xiloligossacáridos de cadeia curta e as  $\beta$ -xilosidades (EC 3.2.1.3.7) hidrolisam externamente a cadeia de xilana e pequenos xilooligosacarídeos liberando xilose (GOWDHAMAN et al., 2014; TANG et al., 2017).

Nas últimas décadas, a xilanase tem atraído muita atenção devido ao grande interesse de seu emprego em diversos processos industriais, como na hidrólise de biomassa vegetal para a produção de biocombustíveis, na melhoria da textura do pão, na clarificação de sucos e vinhos, no aumento da digestibilidade de ração animal (TERRASAN; CARMONA, 2015; WAHAB et al., 2016; TANG et al., 2017). As xilanases apresentam ainda grande importância para a indústria de papel e celulose, uma vez que o tratamento da polpa Kraft com enzimas xilanolíticas facilita a remoção de lignina e reduz a utilização de cloro requerido neste processo como agente de branqueamento, o que por sua vez reduz a liberação de compostos organoclorados no ambiente (WALIA et al. 2014; BOONRUNG et al., 2016). O processo Kraft ocorre em pH e temperatura elevados, o que requer enzimas estruturalmente estáveis, impulsionando a busca por microrganismos termófilos com potencial para produção desses biocatalizadores (SILVA et al., 2015b).

Os fungos filamentosos termófilos produzem enzimas extracelulares com propriedades valiosas para aplicação industrial, como atividade ótima em altas temperaturas, termoestabilidade, tolerância à variação do pH, taxas elevadas de

hidrólise do substrato e maior resistência a agentes desnaturantes (MORETTI et al., 2012; BOONRUNG et al., 2016), além disso, esses microrganismos são mais adaptados ao cultivo em estado sólido, o que favorece a utilização de resíduos agroindustriais como substratos, contribuindo para redução do custo de produção desses biocatalizadores.

Trabalhos anteriores enfatizam a importância de prospectar novas fontes de microrganismos produtores de enzimas industriais (DELABONA et al., 2013; MORETTI et al., 2013; GARCIA et al., 2015; PIROTA et al., 2015; COSTA et al., 2016; GOMES et al., 2016; SANTOS et al., 2016), entretanto, a obtenção de extratos enzimáticos com elevada atividade de xilanase e livre de celulases, provenientes de cultivos em estado sólido, utilizando meios complexos (resíduos agroindustriais), somados a produção de enzimas termoestáveis são escassos.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa isolou uma nova linhagem de *Thermoascus crustaceus* com potencial para a produção de xilanase e reduzida atividade celulolítica, quando cultivada em resíduos agroindustriais. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a produção de xilanase pelo fungo *T. crustaceus* em diferentes resíduos agroindustriais, estudar as propriedades bioquímicas e catalíticas do extrato enzimático e da xilanase obtida.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Microrganismo**

Neste estudo foi utilizado o fungo filamentosso termofílo *Thermoascus crustaceus*, isolado a partir de amostras de bagaço de cana-de-açúcar da Usina de Açúcar e Álcool São Fernando, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. O microrganismo foi identificado pelo Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos do Instituto de Biociências da Universidade do Estado de São Paulo, IB/UNESP, Rio Claro, São Paulo. O fungo foi mantido em *Ágar Sabouraud Dextrose*, após crescimento a 40°C por 72 horas, a linhagem foi armazenada a 4°C pela equipe do Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos da Universidade Federal da Grande Dourados (LEPFER/UFGD).

## **2.2. Inóculo**

O microrganismo foi cultivado em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio *Ágar Sabouraud Dextrose* inclinado, mantido por 72 horas a 40°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura contendo 25 mL de solução nutriente composta por 0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% nitrato de cálcio (m/v). A inoculação do fungo nos substratos (resíduos agroindustriais) foi realizada pela transferência de 5 mL desta suspensão ( $10^7$  esporos/g de substrato seco).

## **2.3. Cultivo em estado sólido (CES)**

A enzima foi produzida pelo cultivo do fungo em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de resíduos agroindustriais (farelo de trigo, farelo de soja, sabugo de milho, palha de milho, casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar) e a umidade foi ajustada para 70% com solução nutriente (descrito no item 2.2). Após 96 horas de fermentação a 40°C, as enzimas foram extraídas a partir dos resíduos fermentados. O substrato ideal para a produção das enzimas foi usado para avaliar os efeitos da variação do tempo de cultivo para a determinação da condição ótima de crescimento e obtenção da enzima de interesse. Todo o material foi previamente esterilizado por 20 min a 121°C e os experimentos foram realizados em triplicatas.

## **2.4. Extração da enzima**

A extração da enzima a partir dos resíduos fermentados foi realizada pela adição de 50 mL de água destilada, sendo mantidos em agitação a 100 rpm durante 1 hora. A amostra foi filtrada em tecido sintético (nylon) e centrifugada a  $1500 \times g$  durante 5 min a 10°C. O sobrenadante foi denominado extrato enzimático e utilizado nos ensaios subsequentes.

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

A atividade de xilanase foi determinada com 0,1 mL do extrato enzimático e 0,9 mL de solução tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4,5, contendo 0,5% de xilana (Birch-Wood Sigma) e o açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método de ácido 3,5-Dinitrosalicílico-DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi



definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto de reação.

## **2.6. Determinação de proteínas**

O teor de proteína foi medido, seguindo o método de Hartree (1972), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

## **2.7. Caracterização da xilanase produzida pelo fungo *T. crustaceus***

### **2.7.1. Efeito do pH e temperatura**

O pH ótimo foi determinado mensurando a atividade da enzima a 50°C em diferentes valores de pH (3,0–8,0), com incrementos de 0,5, utilizando solução tampão McIlvaine 0,1 M (MCILVAINE, 1921). A temperatura ótima para a atividade da xilanase foi obtida pela determinação da atividade enzimática ao longo de um intervalo de temperatura de 30–85°C, com incrementos de 5°C, no respectivo pH ótimo. A estabilidade ao pH foi determinada incubando a enzima por 24 horas a 25°C em diferentes valores de pH, em soluções tampão: McIlvaine 0,1 M (pH 3,0–8,0), Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0–8,5) e Glicina-NaOH 0,1 M (pH 8,5–10,5), com incrementos de 0,5, tomando-se como 100% o valor mais elevado de atividade residual. A atividade residual foi determinada em condições ótimas de pH e temperatura. A termoestabilidade foi determinada pela incubação da enzima durante 1 hora em diferentes temperaturas (30–80°C), com incrementos de 5°C, adotando como 100% o valor mais elevado de atividade residual obtido após o tratamento de amostras. As atividades residuais foram medidas sob condições ótimas de pH e temperatura das enzimas (GARCIA et al., 2015).

### **2.7.2. Efeito de etanol sobre a atividade enzimática**

A atividade enzimática foi quantificada com a adição de etanol em diferentes concentrações, de 0–30%, na mistura de reação, com incrementos de 5%. A atividade foi medida sob condições ótimas de pH e temperatura.

## **2.8. Potencial catalítico do extrato enzimático**

As atividades de CMCase e xilanase foram quantificadas utilizando respectivamente Carboximetilcelulose 3% (C5678 Sigma) e xilana 1% (Birch-Wood Sigma). A atividade em papel de filtro (FPase) foi quantificada de acordo com Ghose

(1987), utilizando uma tira de papel de filtro Whatman n. 1 (1,0 x 6,0 cm) como substrato e o açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método de ácido 3,5-Dinitrosalicílico-DNS (MILLER, 1959). A atividade de  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase foram determinadas com o substrato sintético p-nitrofenil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo 4 mM (pNP $\beta$ G, Sigma) e p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo 4 mM (pNP $\beta$ X Sigma), respectivamente. A reação enzimática foi paralisada com 2 mL de carbonato de sódio 2 M, o p-nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de produto por minuto de reação.

## **2.9. Caracterização do perfil catalítico por cromatografia de camada delgada (TLC)**

A hidrólise do substrato (xilana Birch-Wood) foi realizada em tampão de acetato de sódio 0,05 M, pH 5,5 a 70°C durante 5, 10, 15 e 20 min. Os produtos obtidos pela hidrólise enzimática foram analisados por cromatografia em camada delgada (TLC) em placas de gel de sílica G-60 (10 x 15 cm), utilizando soluções de xilose e xilana (0,5%) como padrões. A fase móvel foi constituída de acetato de etila/isopropanol/água (6: 3: 1; v/v/v) (SILVA et al., 2005). As placas foram reveladas pela aplicação de uma solução de 0,2% de orcinol (m/v) em ácido sulfúrico/metanol (1: 9; v/v), posteriormente as placas foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos.

## **2.10. Análise estatística**

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram apresentados como a média de três ensaios independentes. A análise estatística dos dados incluiu ANOVA seguido pelo teste de Tukey com nível de significância de 1%, com o auxílio do *software* estatístico ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2016).

# **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **3.1. Seleção de substratos para a produção de xilanase**

O fungo *T. crustaceus* apresentou crescimento e produção de xilanase em todos os resíduos avaliados (Tabela 1), no entanto, a maior produção enzimática e atividade específica foram obtidas utilizando farelo de trigo como substrato, produzindo

respectivamente 143,5 U/g de substrato seco e 6,33 U/mg de proteína, após 96 horas de cultivo a 40°C.

**Tabela 1.** Produção de xilanase em diferentes substratos agroindustriais por cultivo em estado sólido pelo fungo *T. crustaceus* em 96 horas de cultivo, contendo 70% de umidade a 40°C.

Substratos	Xilanase (U/mL)	Xilanase (U/g de substrato seco)	Atividade específica (U/mg de proteína)
Farelo de trigo	14,35±0,21 <sup>a</sup>	143,50±2,1 <sup>a</sup>	6,33 <sup>a</sup>
Farelo de soja	0,92±0,005 <sup>b</sup>	9,25±0,05 <sup>b</sup>	0,38 <sup>d</sup>
Palha de milho	0,30±0,01 <sup>d</sup>	3,05±0,1 <sup>d</sup>	0,34 <sup>c</sup>
Casca de arroz	0,14±0,00 <sup>d</sup>	1,42±0,00 <sup>d</sup>	0,25 <sup>d</sup>
Bagaço de cana	0,68±0,02 <sup>c</sup>	6,80±0,25 <sup>c</sup>	0,62 <sup>b</sup>
Sabugo de milho	0,99±0,01 <sup>b</sup>	9,93±0,1 <sup>b</sup>	0,57 <sup>b</sup>

A produção média com letras diferentes indica diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,01$ ). \*Os valores ( $\pm$ ) representam os desvios padrão dos experimentos em triplicata.

A escolha do substrato é de grande importância para o processo de fermentação e para a produção das enzimas de interesse. Diversos estudos relatam o farelo de trigo como excelente substrato para produção de xilanase por diferentes linhagens fúngicas (GARCIA et al., 2015; LI et al., 2015; PIROTA et al., 2015; COSTA et al., 2016), por apresentar características que favorecem o crescimento microbiano e produção de enzimas.

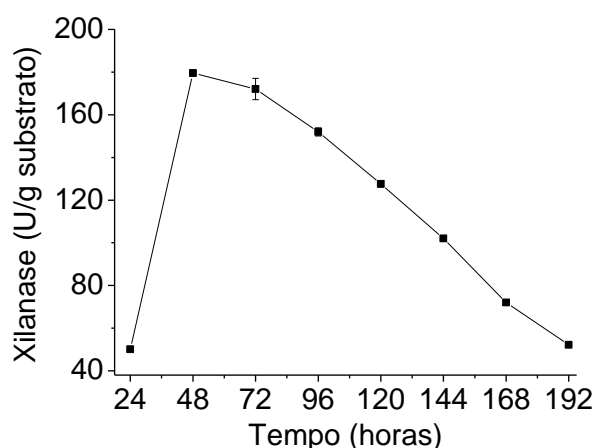
O farelo de trigo é rico em xilana, possui baixo teor de lignina e sua matriz lignocelulósica está facilmente disponível para a ação das enzimas microbianas devido ao processamento industrial e o elevado teor de proteína, além disso, possui boa capacidade de absorção de água, seu grau de porosidade permite a transferência de oxigênio e fornece grande área de superfície facilitando a fixação microbiana e acessibilidade ao substrato (GOWDHAMAN et al., 2014; KNOB et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016). Dessa forma, contribui para o crescimento microbiano e conseqüentemente para produção da enzima de interesse. O farelo de trigo apresenta ainda maiores quantidades de macro e micronutrientes do que outros resíduos agroindustriais como o bagaço de cana, palha de arroz, palha de trigo e farelo de arroz (GONÇALVES et al., 2013).

A utilização de resíduos agrícolas para obtenção de elevados rendimentos de xilanase pelo cultivo em estado sólido permite a redução do custo global de produção

desses biocatalisadores o que habilita a aplicação dessa enzima em diferentes processos industriais (GARCIA et al., 2015).

Devido à maior produção de xilanase em farelo de trigo, o mesmo foi utilizado para avaliar a influência do tempo de cultivo sobre a produção de xilanase pelo fungo *T. crustaceus*.

A maior produção de xilanase foi obtida em 48 horas de cultivo, produzindo 179,5 U/g (ou 17,9 U/mL).



**Figura 1.** Produção de xilanase por cultivo em estado sólido do fungo *T. crustaceus* em farelo de trigo contendo 70% de umidade, incubado a 40°C.

A redução na atividade enzimática após 48 h de cultivo pode estar relacionada com a diminuição de nutrientes necessários no meio, acúmulo do calor metabólico, pela inibição ou desnaturação de suas enzimas em decorrência das alterações ocorridas no meio ou até mesmo pela produção de proteases o que podem inativar enzimas extracelulares previamente secretadas, fato observado em diferentes estudos que utilizam meios de cultivo complexos como resíduos agroindustriais (SADAF, KHARE, 2014; SANTOS et al., 2016; BORSZCZ et al., 2017).

A alta produção de xilanase em um curto período de tempo e a elevada estabilidade estrutural diante do tempo de cultivo adicional é bastante atrativo para a aplicação desses biocatalisadores em processos industriais. O tempo necessário para atingir a produção ótima de celulasas e hemicelulasas pelo fungo *T. crustaceus* (48 h) foi menor do que a maioria dos relatados anteriormente (Tabela 2).

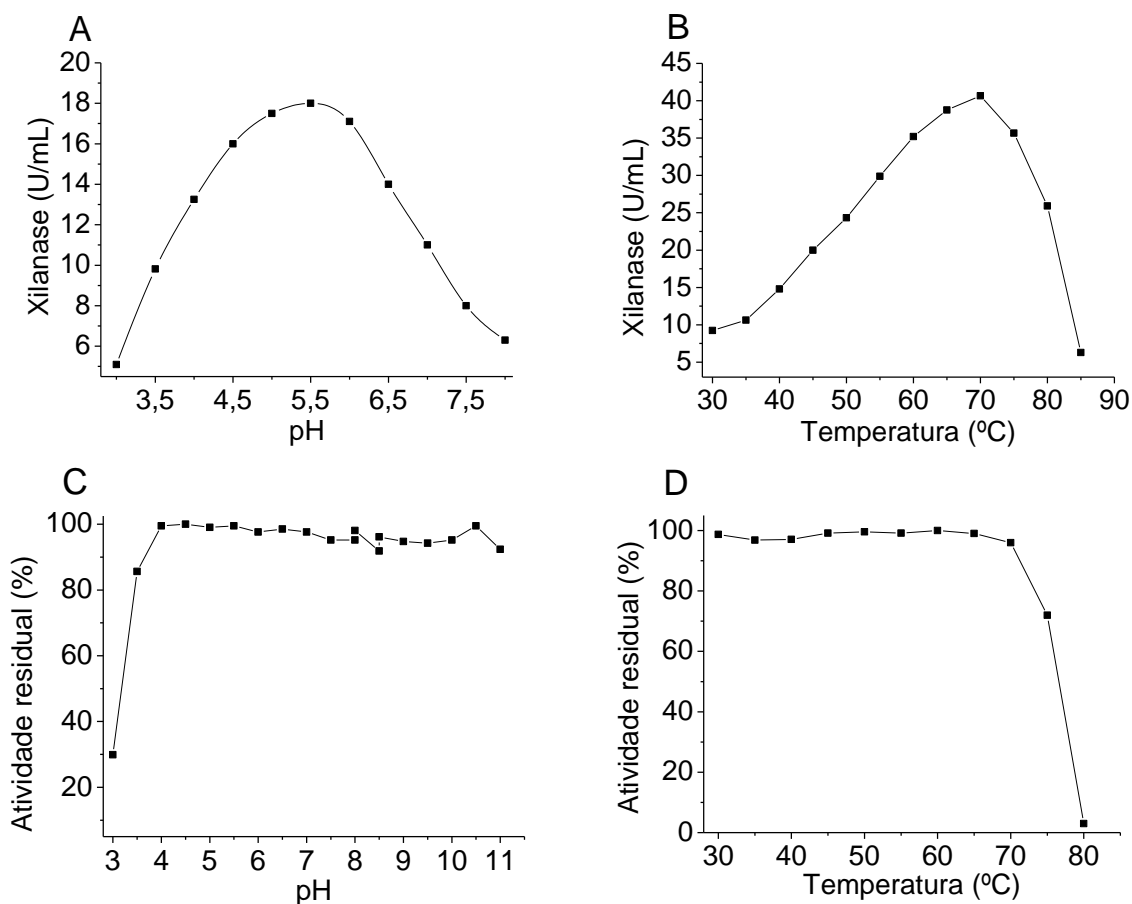
**Tabela 2.** Produção de xilanase por diferentes microrganismos

Microrganismo	Processo de cultivo	Tempo (horas)	U/mL	U/g de substrato	Referência
<i>Thermoascus crustaceus</i>	CES	48	17,9	179,5	Este trabalho
<i>Aureobasidium pullulans</i>	CES	96	---	50	Leite et al. (2007)
<i>Lysinibacillus</i> sp	CES	72	17,8	---	Alves-Prado et al. (2010)
<i>Aspergillus niger</i>	CES	240	---	77	Pirota et al. (2015)
<i>Aspergillus brasiliensis</i> BLf1	CES	120	---	120,5	Menezes et al. (2017)

### 3.2. Caracterização da xilanase produzida pelo fungo *T. crustaceus*

#### 3.2.1. Efeito do pH e temperatura

A xilanase produzida pelo fungo *T. crustaceus* apresentou maior atividade catalítica em pH entre 5,0 e 6,0 e temperatura ótima de 70°C (Figura 2A e B).



**Figura 2.** pH ótimo (A), temperatura ótima (B), pH de estabilidade (C) e temperatura de estabilidade (D) da xilanase produzida pelo fungo *T. crustaceus* obtida por cultivo em estado sólido, a 40°C em 48 horas de cultivo, utilizando farelo de trigo como substrato.

Valores de pH ótimo próximos aos obtidos no presente trabalho são discutidos na literatura para xilanases fúngicas. A xilanase produzida por *Trichoderma inhamatum*

apresentou pH ótimo de 5,0-5,5 (SILVA et al., 2015a). Irfan; Syed (2012) determinaram pH 5,0 como ótimo para xilanase produzida por *Trichoderma viride*.

A temperatura ótima obtida nesse estudo é mais elevada que algumas xilanases relatadas na literatura. Ahmed et al. (2016) estudando a xilanase produzida por *Aspergillus terreus* KP90097 encontraram temperatura ótima de 50°C. Boonrung et al. (2016) relatam temperatura ótima de 50°C para a xilanase do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* BF1-7.

A enzima produzida por *T. crustaceus* manteve sua atividade original após 24 horas em ampla faixa de pH entre 3,5 à 11,0 (Figura 2C). Com relação a termoestabilidade, a enzima apresentou 98% da atividade catalítica após 1 hora a 70°C. Quando a temperatura foi elevada para 75°C durante o mesmo período, a enzima manteve 70% da sua atividade original (Figura 2D). Geralmente, as xilanases microbianas são estáveis sobre uma gama de pH que varia de 3,0 a 7,0 e temperaturas de 50 a 70°C.

Huang et al. (2013), descreveram que as xilanases produzidas por *T. viride* apresentou estabilidade em pH 3,5-7,5. Xilanases de *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus* mantiveram estabilidade superior a 70% por 60 min na faixa de pH de 2,5 a 8,0 (MICHELIN et al., 2010). A xilanase de *Achaetomium* sp. Xz-8 foi incubada em valores de pH 3,0-11,0 durante 60 min, no qual a atividade enzimática foi preservada em 80% em pH 5,0-10,0 (ZHAO et al., 2013). Cheng et al. (2013), estudando a xilanase do fungo *Streptomyces griseorubens* relataram a recuperação de 80% da atividade inicial a 60°C durante 60 min. A xilanase de *A. niger* foram totalmente estáveis à 45°C por 60 min, enquanto as xilanases de *A. niveus* e *A. ochraceus* mantiveram-se totalmente estáveis em até 50°C por 60 min (BETINI et al., 2009). A xilanase do mutante de *Aspergillus fumigatus* RT-1 manteve 45% de sua atividade em 60 min a 70°C, enquanto que a linhagem selvagem perdeu completamente a sua atividade após 50 min de incubação na mesma condição (WAHAB et al., 2016). A elevada temperatura dos processos industriais requer o uso de enzimas que apresentem termoestabilidade, uma vez que temperaturas mais elevadas favorecem a formação de produto em menor tempo (GOMES et al., 2007; DELABONA et al., 2013; OLAJUYIGBE; OGUNYEWO, 2016).

Proteínas termófilas e mesófilas possuem hidrofobicidades, estados oligoméricos e ligações de hidrogênio similares. De forma geral, as enzimas termófilas tendem a ter

um maior número de ligações covalentes (pontes dissulfeto) e interações não covalentes, no entanto, não existe um modelo estrutural que diferencie significativamente uma proteína estável de uma não estável. Pequenas diferenças na quantidade das ligações e interações podem contribuir de forma efetiva na estabilização estrutural de uma proteína, tornando essas proteínas mais resistentes ao desdobraimento em elevadas temperaturas (KUMAR et al., 2000; BRUINS et al., 2001; VIEILLE; ZEIKUS, 2001; LEITE et al., 2008).

A xilanase de *T. crustaceus* é altamente termoestável, o que habilita a aplicação dessa enzima em processos realizados em altas temperaturas, onde as enzimas utilizadas devem ser termotolerantes e preferencialmente ativas em ampla faixa de pH, a enzima apresenta tais características em sua forma bruta, o que pode ser considerado outra vantagem deste fungo, proporcionando flexibilidade para uso dessa enzima em muitos processos industriais (POLIZELI et al., 2005; COSTA et al., 2016).

### 3.3. Potencial catalítico do extrato enzimático do fungo *T. crustaceus*

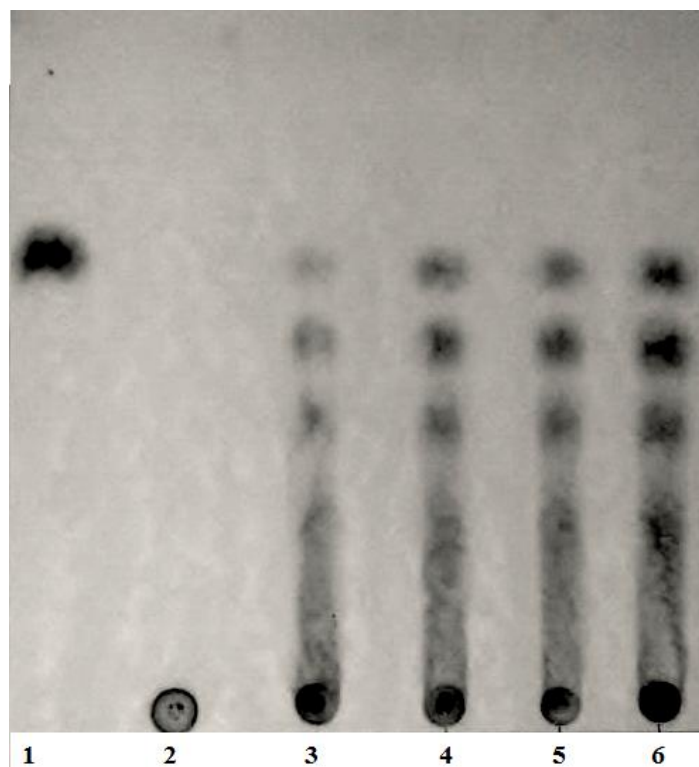
O extrato enzimático produzido por *T. crustaceus* nas condições descritas no presente trabalho apresentou atividade de xilanase (40,65 U/mL),  $\beta$ -xilosidase (13,26 U/mL) e reduzido potencial para hidrolisar celulose, apresentando 1,42 U/mL de CMCase e 0,06 U/mL de FPase (Tabela 3).

**Tabela 3.** Potencial catalítico do extrato enzimático produzido por *T. crustaceus* obtido por cultivo em estado sólido, a 40°C em 48 horas, utilizando farelo de trigo como substrato.

Enzima	Substrato	U/mL
CMCase	Carboximetilcelulose	1,42
FPase	Papel filtro	0,06
Xilanase	Xilana	40,65
$\beta$ -xilosidase	p-nitrofenil $\beta$ -D-glicopiranosídeo	13,26

Estas características são fundamentais para aplicação na indústria de papel e celulose, onde as enzimas devem apresentar elevadas concentrações de xilanase, no entanto, devem estar livre de celulasas. O perfil catalítico produzido por *T. crustaceus* apresenta particularidades difíceis de serem encontradas quando o extrato enzimático é produzido em material complexo como os resíduos agroindústrias (DA-SILVA et al., 2005).

A presença da ação sinérgica de endoxilanases e  $\beta$ -xilosidases foi confirmada pela análise em cromatografia de camada delgada, sendo possível observar a presença de xilooligossacarídeos e monômeros de xilose (Figura 3).



**Figura 3.** Cromatografia de camada delgada dos produtos de hidrólise da xilana pelo fungo *T. crustaceus*. (1) xilose; (2) xilana; (3, 4, 5, 6) 5 min, 10 min, 15 min e 20 min de hidrólise, respectivamente.

Elevadas produções de  $\beta$ -xilosidase não são frequente relatadas para fungos filamentosos. Menezes et al. (2017) estudando o fungo *Aspergillus brasiliensis* BLf1 obteve produção de 18,1 U/g de  $\beta$ -xilosidase. Santos et al. (2016) relatam a produção de 2,84 U/g de  $\beta$ -xilosidase pelo fungo *Gongronella butleri* utilizando farelo de trigo como substrato. Costa et al. (2016) relataram a produção de 0,09 U/mL de  $\beta$ -xilosidase pelo fungo *T. aurantiacus* por fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato.

O potencial do extrato enzimático de hidrolisar a xilana até monômeros de xilose deve ser destacado, considerando a constante busca de otimizar a produção de etanol a partir da biomassa vegetal, onde diferentes trabalhos visam viabilizar a fermentação de pentoses provenientes da quebra total da hemicelulose, obtendo assim maiores

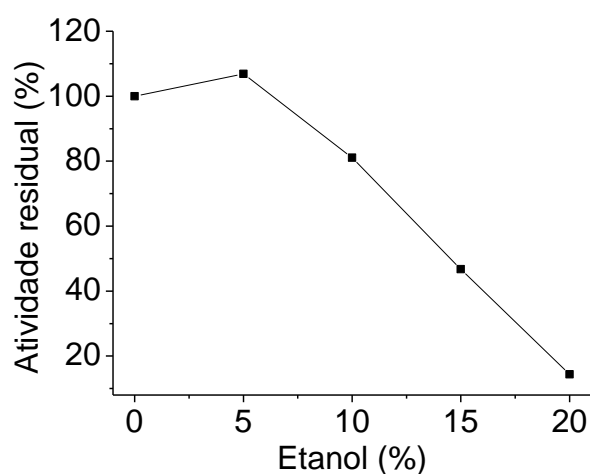


rendimentos nos processos fermentativos (CHANDEL et al., 2011; OREB et al., 2012; MOYSES et al., 2016).

Para o emprego de biocatalizadores em processos de fermentação alcoólica é importante que esses sejam estáveis a presença de etanol na mistura reacional, o que estimula a realização de ensaios nesse sentido.

### 3.4. Efeito do etanol na atividade da xilanase

A xilanase apresentou 110% da atividade original em solução contendo 5% de etanol, na concentração de 10% de etanol houve uma recuperação de 80% em relação a atividade original (Figura 4). Quando a concentração de etanol foi aumentada para 15% foi recuperado 48% da atividade original.



**Figura 4.** Efeito de etanol sobre a atividade da xilanase produzida pelo fungo *T. crustaceus*.

Espera-se que enzimas de microrganismos termófilos sejam mais tolerantes aos solventes orgânicos (GOMES et al., 2007). De acordo com Lv et al. (2008) alguns agentes químicos apresentam efeitos estimulantes nas atividades enzimáticas, que pode ser devido à alteração da conformação estrutural da enzima, o que justifica a elevação do potencial catalítico observado no presente trabalho.

Os resultados indicam o potencial de aplicação da xilanase de *T. crustaceus* em bioprocessos de produção de bioetanol, onde a hidrólise enzimática da biomassa e a fermentação alcoólica podem ocorrer simultaneamente (SANTOS et al., 2016). Considerando que em processos de sacarificação e fermentação simultâneas para produção de etanol, as enzimas empregadas devem ser capazes de tolerar concentrações

de etanol de até 40 g/L (aproximadamente 5% v/v) (DIEN et al, 2003), é possível inferir que a xilanase de *T. crustaceus* apresenta características satisfatórias para aplicação nesse tipo de processo.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fungo *Thermoascus crustaceus* apresentou excelente capacidade para produção de xilanase e reduzido potencial para produção de celulases, principalmente quando cultivado por fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato.

A xilanase produzida foi estável em ampla faixa de pH com elevada estabilidade estrutural, e manteve 80% de atividade residual em soluções contendo 10% de etanol.

O extrato enzimático produzido por *T. crustaceus* apresentou elevada atividade de endoxilanase e  $\beta$ -xilosidase, característica bastante singular para fungos filamentosos.

As características do extrato enzimático obtido, associada à estabilidade da xilanase produzida, estimulam a aplicação desse complexo enzimático em processos de hidrólise de biomassa vegetal e no biobranqueamento da polpa kraft.

#### REFERÊNCIAS

AHMED, S. A.; SALEH S. A. A.; MOSTAFA, F. A.; ATY, A. A. A. E.; AMMAR, H. A. M. Characterization and valuable applications of xylanase from endophytic fungus *Aspergillus terreus* KP900973 isolated from *Corchorus olitorius*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 134–144, 2016.

ALVES-PRADO, H. F.; PAVEZZI, F. C.; LEITE, R. S. R.; OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; DA SILVA, R. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 333–346, 2010.

BETINI, J. H. A.; MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, p. 819–824, 2009.

- BOONRUNG, S.; KATEKAEW, S.; MONGKOLTHANARUK, W.; AIMI, T.; BOONLUE, S. Purification and characterization of low molecular weight extreme alkaline xylanase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* BF1-7. **Mycoscience**, v. 57, p. 408–416, 2016.
- BORSZCZ, V.; BOSCATO, T. R. P.; ANTUNES, A.; ZENI, J.; BACKES, G. T.; VALDUGA, E. Recovery of pectinase obtained by solid-state cultivation of agro-industrial residues. **Industrial Biotechnology**, v.13, p.141–148, 2017.
- BRUINS, M. E; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. M. Thermozyms and their applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 90, p. 155–186, 2001.
- CHANDEL; A. K.; CHANDRASEKHAR, G.; RADHIKA, K.; RAVINDER, R.; RAVINDRA, P. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 6, p. 8–20, 2011.
- CHENG, X.; CHEN, G.; HUANG, S.; LIANG, Z. Biobleaching effects of crude xylanase from *Streptomyces griseorubens* LH-3 on eucalyptus kraft pulp. **BioResources**, v. 8, p. 6424–6423, 2013.
- CORRÊA, J. M.; CHRISTI, D.; TORRE, C. L. D.; HENN, C.; CONCEIÇÃO-SILVA, J. L.; KADOWAKI, M. K.; SIMÃO, R. C. G. High levels of  $\beta$ -xylosidase in *Thermomyces lanuginosus*: potential use for saccharification. **Brazilian Journal of Microbiology**, 47, 680–690, 2016.
- 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.
- DA-SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascusaurantiacus* miehe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 235–241, 2005.
- DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDIC, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 236–242, 2013.

DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; JEFFRIES, T. W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 258–266, 2003.

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 residues: characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 314–319, 2015.

GOMES, A. F. S.; DOS SANTOS, B. S. L.; FRANCISCON, E. G.; BAFFI, M. A. Substrate and temperature effect on xylanase production by *Aspergillus fumigatus* using low cost agricultural wastes. **Bioscience Journal**, v. 32, p. 915–921, 2016.

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

GONÇALVES, F. A.; LEITE, R. S. R.; RODRIGUES, A.; ARGANDOÑA, E. J. S.; FONSECA, G. G. Isolation, identification and characterization of a novel high level  $\beta$ -glucosidase producing *Lichtheimia ramosa* strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 377–384, 2013.

GOWDHAMAN, D.; MANASWINI, V. S.; JAYANTHI, V.; DHANASRI, M.; JEYALAKSHMI, G.; GUNASEKAR, V.; SUGUMARAN, K. R.; PONNUSAMI, V. Xylanase production from *Bacillus aerophilus* KGJ2 and its application in xylooligosaccharides preparation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 90–98, 2014.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422–427, 1972.

HUANG, X. M.; GE, J. L.; FAN, J. X.; CHEN, X. L.; XU, X. H.; LI, J. F.; ZHANG, Y.; ZHOU, D. Characterization and optimization of xylanase and endoglucanase production by *Trichoderma viride* HG 623 using response surface methodology (RSM). **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 4521–4532, 2013.

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.

KNOB, A.; FORTKAMP, D.; PROLO, T.; IZIDORO, S.C.; ALMEIDA, J.M. Agro-residues as alternative for xylanase production by filamentous fungi. **BioResources**, v. 3, p. 5738–5773, 2014.

KUMAR, S.; TSAI, C.; MA, B.; NUSSINOV, R. Contribution of salt bridges toward protein thermostability. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 11, p. 79–85, 2000.

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

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.

LV, Z.; YANG, J.; YUAN, H. Production, purification and characterization of an alkaliphilic endo- $\beta$ -1, 4-xylanase from a microbial community EMSD5. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 343–348, 2008.

MCILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 49, p. 183–186, 1921.

MENEZES, B. S.; ROSSI, D. M.; AYUB, M. A. Z. Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, 58–70, 2017.

MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; BETINI, J. H. A.; SILVA, T. M.; JORGE, A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Production and properties of xylanases from *Aspergillus terricola* Marchal and *Aspergillus ochraceus* and their use in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 33, p. 813–821, 2010.

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.; DA-SILVA, R.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1062–1071, 2012.

MOYSES, D. N.; REIS, V. C.; ALMEIDA, J. R.; MORAES, L. M.; TORRES, F. A. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: challenges and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 207–225, 2016.

OLAJUYIGBE, F. M.; OGUNYEWU, O. A. Enhanced production and physicochemical properties of thermostable crude cellulase from *Sporothrix carnis* grown on corncob. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 110–117, 2016.

OLIVEIRA, A. P. A.; SILVESTRE, M. A.; GARCIA, N. F. L.; ALVES-PRADO, H. F.; RODRIGUES, A.; PAZ, M. F. P.; 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**, v. 2016, p. 1–10, 2016.

OREB, M.; DIETZ, H.; FARWICK, A.; BOLES, E. Novel strategies to improve co-fermentation of pentoses with D-glucose by recombinant yeast strains in lignocellulosic hydrolysates. **Bioengineered**, v. 3, p. 347–351, 2012.

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. S.; TREMACOLDI, C. R.; FARINAS, C. S. Characterization of fungi isolated from the Amazon region for the potential of biomass-degrading enzymes production. **Ciência Rural**, v. 45, p. 1606–1612, 2015.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F. JORGE, J. A. AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 577–591, 2005.

SADAF, A.; KHARE, S. K. Production of *Sporotrichum thermophile* xylanase by solid state fermentation utilizing deoiled *Jatropha curcas* seed cake and its application in xylooligosachharide synthesis. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 126–130, 2014.

SANTOS, F. R. S. S.; GARCIA, N. F. L. G.; 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.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The assistat software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, p. 3733–3740, 2016.

SILVA, L. A. O.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 307–313, 2015a.

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, 2015b.

SILVA, T. M.; ATTILI-ANGELIS, D.; CARVALHO, A. F. A.; DA SILVA, R.; BOSCOLO, M. GOMES, E. Production of saccharogenic and dextrinogenic amylases by *Rhizomucor pusillus* A 13.36. **The Journal of Microbiology**, v. 43, p. 561–568, 2005.

TANG, F.; CHEN, D.; YU, B.; LUO, Y.; ZHENG, P.; MAO, X.; YU, J.; HE, J. Improving the thermostability of *Trichoderma reesei* xylanase 2 by introducing disulfide bonds. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 26, p. 52–59, 2017.

TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. Solid-state fermentation of brewer's spent grain for xylanolytic enzymes production by *Penicillium janczewskii* and analyses of the fermented substrate. **Bioscience Journal**, v. 31, p. 1826–1836, 2015.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p.1–43, 2001.

WAHAB, M. K. H. B. A.; JONET, M. A. B; ILLIAS, R. M. Thermostability enhancement of xylanase *Aspergillus fumigatus* RT-1. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 134, p. 154–163, 2016.

WALIA, A.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A.; KULSHRESTHA, S.; SHIRKOT, C. K. Purification and characterization of cellulase-free low molecular weight endo  $\beta$ -1,4 xylanase from an alkalophilic *Cellulosimicrobium cellulans* CKMX1 isolated from mushroom compost. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 2597–2608; 2014.

ZHAO; L.; MENG, K.; SHI, P.; BAI, Y.; LUO, H.; HUANG, H.; WANG, Y.; YANG, P.; YAO, B. A novel thermophilic xylanase from *Achaetomium* sp. Xz-8 with high catalytic efficiency and application potentials in the brewing and other industries. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1879–1885, 2013.