

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

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASE
PRODUZIDAS POR *Pycnoporus sanguineus*

GEISA ALVES DA SILVA

Dourados – MS

2020

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

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASE
PRODUZIDAS POR *Pycnoporus sanguineus*

GEISA ALVES DA SILVA

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental na área de concentração Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Coorientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Margareth Batistote

Dourados – MS

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S586p Silva, Geisa Alves Da
Produção e caracterização de celulasas e hemicelulase produzidas por *Pycnoporus sanguineus* [recurso eletrônico] / Geisa Alves Da Silva. -- 2020.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Rodrigo Simões Ribeiro Leite.
Coorientadora: Margareth Batistote.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2020.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

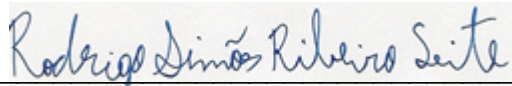
1. Cultivo em estado sólido. 2. Biomassas vegetais. 3. Enzimas. I. Leite, Rodrigo Simões Ribeiro. II. Batistote, Margareth. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Produção e Caracterização de Celulases e Hemicelulase Produzidas Por *Pycnoporus sanguineus*”**, de autoria de **Geisa Alves da Silva**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



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



Prof. Dr. Eduardo da Silva Martins
Membro Examinador (UEMG)



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

Dourados/MS, 29 de Abril de 2020.

Dedico este trabalho ao meu Pai Generci (*in memorian*) que não está mais entre nós. Sua lembrança se faz presente todos os dias, me inspira caráter, dignidade e força.

AGRADECIMENTOS

À Deus por se fazer presente em minha vida.

Aos meus pais Generci (*in memoriam*) e Giselda, e irmão Gustavo. Minha eterna gratidão a vocês pelo apoio, amor e esforços que a mim concederam para a realização das minhas conquistas.

Ao meu Amado Weverton pelo apoio, carinho e força, gratidão pela sua presença em minha vida.

À minha tia Sônia por sua disposição e auxílio que contribuíram para que eu chegasse até aqui, e minha avó Dirce pelo carinho e atenção dedicados a mim todos os dias.

As minhas amigas Elane e Poliana pela amizade, carinho e força em todos os nossos anos juntas pela faculdade, amizade que levarei por toda a vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, pela dedicação, paciência, amizade e conhecimentos transmitidos durante esses anos de trabalho, minha admiração e gratidão pelo seu tempo dedicado à minha formação.

À minha coorientadora Prof^ª. Dr^ª. Margareth Batistote pelo apoio e conhecimentos prestados para a minha caminhada até aqui.

Aos Professores Gustavo, Jeferson e Marcelo pelas valiosas contribuições e apoio.

Aos meus colegas de laboratório em especial a Gabriela e Aline pelo apoio prestado.

Aos membros da banca examinadora Dr. Eduardo da Silva Martins e Dr. Marcelo Fossa Paz pela disponibilidade e sugestões apresentadas ao trabalho.

Ao Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos pelos momentos de trabalho, ensinamentos, companheirismo e descontração.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental pela oportunidade e aos docentes por compartilhar seus conhecimentos e experiências.

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

A todos que de alguma maneira colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho com sugestões, críticas e especialmente amizade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Moléculas que compõem a parede celular lignocelulósica presente nas biomassas vegetais. (SCHLITTLER & PEREIRA Jr., 2008).....	6
Figura 2 - Estrutura da molécula de celulose e ação das celulases (Modificado de Arantes e Sadler, 2010).	8
Figura 3 - Estrutura da molécula de xilana e ação das hemicelulases (Modificado de Dutta & Wu, 2014).	10
Figura 4 - Produção de Endoglucanase (A), β -glicosidase (B) e Xilanase (C) pelo fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> em função do tempo de cultivo em farelo de trigo a 25°C, contendo 70% de umidade (as barras de erro representam o desvio padrão médio da determinação em triplicata).	27
Figura 5 - Atividade de Endoglucanase, β -glicosidase e Xilanase em função da variação do pH (A, B e C) e temperatura (D, E e F), produzidas pelo fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	29
Figura 6 - Avaliação da estabilidade enzimática de Endoglucanase, β -glicosidase e Xilanase em relação ao pH (A, B e C) e temperatura (D, E e F) produzidas pelo fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	31
Figura 7 - Efeito do etanol (A) e glicose (B) sobre a atividade enzimática de β -glicosidase.....	32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Produção de celulases e hemicelulase em diferentes substratos agroindustriais por cultivo em estado sólido pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* em 120 horas de cultivo, contendo 70% de umidade a 25°C..... 26
- Tabela 2** - Atividade de celulases e hemicelulase produzidas por cultivo em estado sólido em farelo de trigo por diferentes espécies fúngicas em função do tempo de cultivo. 28

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	2
OBJETIVOS.....	3
Objetivo geral.....	3
Objetivos específicos	3
REFERÊNCIAS.....	3
CAPÍTULO I.....	5
1. REVISÃO DE LITERATURA	5
1.1 Resíduos lignocelulósicos: estrutura e potencial energético	5
1.2 Cultivo em estado sólido	7
1.3 Enzimas celulolíticas	7
1.4 Enzimas hemicelulolíticas	9
1.5 Aplicações industriais das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas	10
2. REFERÊNCIAS.....	14
CAPÍTULO II	20
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASE PRODUZIDAS POR <i>Pycnoporus sanguineus</i>	20
RESUMO	20
ABSTRACT.....	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4. CONCLUSÃO.....	33
5. REFERÊNCIAS.....	33

INTRODUÇÃO GERAL

Os fungos são microrganismos de fascinante interesse biológico, e de relevante importância econômica e biotecnológica, sua aplicação dentro do mercado industrial resulta atualmente em uma indústria diversificada e com altos rendimentos econômicos, podendo estes serem utilizados na produção de bebidas, alimentos, biocombustíveis, ácidos orgânicos, fármacos e enzimas (SOARES et al., 2010; STEINBERG & SCHUSTER, 2011).

Os microrganismos produtores de enzimas celulolíticas e xilanolíticas são em sua maioria consumidores de carboidratos, deste modo, podem realizar a degradação de compostos a base de celulose, resultando na geração de derivados simples de açúcar (SOARES Jr. et al., 2013).

O processo de hidrólise enzimática de biomassa vegetal consiste na quebra de estruturas componentes da parede celular vegetal, sendo o primeiro passo da bioconversão de celulose em glicose (um açúcar solúvel), podendo envolver um complexo multienzimático. A hidrólise enzimática apresenta algumas vantagens quando comparadas a tratamentos químicos, devido às condições de condução do processo, que geralmente são moderadas e ausentes de corrosão, além de apresentarem especificidade ao substrato não formando produtos indesejáveis (BALAT, 2011).

A vasta funcionalidade e aplicabilidade das enzimas potencializa a otimização em diferentes processos na indústria e agregam valor sobre as indústrias de biotecnologia, estimulando a exploração da biodiversidade microbiana, com o isolamento e seleção de novas cepas produtoras de enzimas (BARATTO et al., 2011).

Os fungos filamentosos são considerados os mais adequados para o Cultivo em Estado Sólido (CES), técnica que reaproveita os resíduos agroindustriais, utilizando-os como substrato para o crescimento do microrganismo, em que suas hifas podem crescer sobre a superfície das partículas sólidas que simulam seu *habitat* natural, que consequentemente contribui para a redução do custo operacional da produção enzimática, minimizando possíveis impactos ambientais decorrentes do seu descarte inadequado (YOON et al., 2014). Essa técnica vem sendo amplamente utilizada para produção de enzimas com potencial biotecnológico para aplicação em diversos processos industriais (CAVALHEIRO et al., 2017; COSTA et al., 2016; GARCIA et al., 2015; GARCIA et al., 2018; SANTOS et al., 2016).

Análises prévias realizadas pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que a espécie *Pycnoporus sanguineus* apresenta potencial de produção de celulases e hemicelulases, despertando o interesse para melhor avaliação destas enzimas. Deste modo, o presente trabalho visa avaliar a produção e caracterização enzimática de celulases e hemicelulase por cultivo em estado sólido pelo fungo *P. sanguineus*. A dissertação é composta em dois capítulos: Capítulo I. Revisão de Literatura; Capítulo II. Produção e caracterização de celulases e hemicelulase produzidas por *Pycnoporus sanguineus*.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi produzir e caracterizar celulases e hemicelulase por Cultivo em Estado Sólido pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* utilizando resíduos agroindustriais como substratos.

Objetivos específicos

- Isolar e identificar o microrganismo (*Pycnoporus sanguineus*);
- Determinar as condições ótimas de cultivo para produção de endoclucanase, β -glicosidase e xilanase;
- Caracterizar bioquimicamente a endoclucanase, a β -glicosidase e a xilanase produzidas;

REFERÊNCIAS

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858- 875, 2011.

BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B. D.; LOCATELLI, G. O. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, v. 11, n. 2, p. 15-28, 2011.

CAVALHEIRO, G. F.; SANGUINE, I. S.; SANTOS, F.R.S.; COSTA, A. C.; FERNANDES, M.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Catalytic properties of amylolytic enzymes produced by using agroindustrial residues on solid-state fermentation. **Biomed Research International**, v. 2017, p. 1-8, 2017.

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, n. 4, p. 1040-1048, 2016.

GARCIA, N. F. L.; SANTOS, F. R. S.; GONCALVES, F. A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production of β -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 314-319, 2015.

GARCIA, N.F.L.; SANTOS, F.R.S.; BOCCHINI, D. A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R. S. R. Catalytic properties of cellulases and hemicellulases produced by *Lichtheimia ramosa*: Potential for sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 49-56, 2018.

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

SOARES Jr., F. L.; DIAS, A. C. F.; FASANELLA, C. C.; TAKETANI, R. G.; LIMA, A. O. D. S.; MELO, I. S.; ANDREOTE, F. D. Endo- and exoglucanase activities in bacteria from angrove sediment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 969-976, 2013.

SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; TREVISOL, L. R.; CARVALHO, R. D.; SCHAUREN, D.; ROCHA, C. L. M. S. C.; BARONI, S. Identification of the amylolytic potential of mutante strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.

STEINBERG, G.; SCHUSTER, M. The dynamic fungal cell. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, n. 18, p. 14-37, 2011.

YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.

CAPÍTULO I

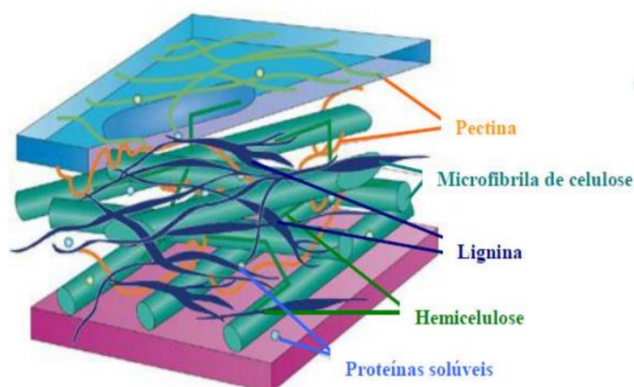
1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Resíduos lignocelulósicos: estrutura e potencial energético

Os resíduos lignocelulósicos são subprodutos gerados durante o processamento industrial a partir de produtos e atividades agrícolas. Normalmente, não há aplicação direta destes resíduos, o que lhes atribui um reduzido valor econômico, como é o caso da palha de milho, casca de arroz, farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, entre outros. Resíduos provenientes de biomassa vegetal são uma rica fonte de açúcares, carboidratos e minerais, podendo ser utilizados como fontes alternativas de carbono e nitrogênio, substituindo às formas industrializadas desses nutrientes empregados em bioprocessos (PANESAR et al., 2016).

Os compostos lignocelulósicos possuem composição química e propriedades mecânicas que os tornam não só uma fonte rica em produtos químicos e açúcares suscetível a fermentação para a produção de biocombustíveis, mas também biopolímeros para diversas aplicações industriais. Formados por uma estrutura complexa (Fig. 1), composta basicamente por microfibrilas de celulose inseridos em uma matriz de hemicelulose, pectina, lignina e uma pequena quantidade de proteínas estruturais, formam a complexa estrutura da parede celular vegetal (FRANÇA-PASSOS, 2018). Estes compostos são unidos fortemente por meio de ligações não-covalentes e por ligações cruzadas covalentes. A composição e a porcentagem de cada um destes compostos podem variar de espécie para espécie de acordo com as condições de crescimento (LADEIRA et al., 2010).

Figura 1 - Moléculas que compõem a parede celular lignocelulósica presente nas biomassas vegetais (SCHLITTLER & PEREIRA Jr., 2008).



Um dos principais componentes da parede celular vegetal, a celulose, é o biopolímero de maior ocorrência no mundo, um homopolissacarídeo não-ramificado constituído por moléculas de glicose unidas entre si por ligações β -1,4 glicosídicas e interações de hidrogênio (CARVALHO et al., 2009).

As cadeias de celulose interagem paralelamente entre si formando ligações de hidrogênio, quando há eliminação de uma molécula de água, duas unidades de glicose contíguas formam uma ligação glicosídica, que devido à sua configuração espacial alternada, a unidade de repetição da celulose é chamada de celobiose, um dissacarídeo (FARINAS, 2011; STRAKOWSKA et al., 2014).

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos naturais, atuam como um elo químico entre a celulose e a lignina. Contrariamente à celulose, a hemicelulose apresenta grande variedade de açúcares nas ramificações, o que impede a formação de grandes regiões cristalinas. A cadeia principal pode ser composta por pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetila, sendo que as xilanas aparecem em maior quantidade, onde são ligados entre si principalmente por ligações glicosídicas β -1,4. Estas características resultam em materiais flexíveis, porém altamente resistentes (BUCKERIDGE et al., 2010; COLLINS et al., 2005; JOVANOVIC et al., 2009).

A complexidade estrutural da parede celular vegetal a torna resistente ao ataque químico e bioquímico, dificultando o acesso das enzimas envolvidas em sua degradação, por isso a compreensão de como agem essas enzimas é fundamental para a viabilização do uso da biomassa vegetal como fonte de energia renovável (FARINAS, 2011).

1.2 Cultivo em estado sólido

O cultivo em estado sólido (CES) refere-se a uma técnica na qual o cultivo do microrganismo é realizado sobre uma matriz sólida com reduzida quantidade de água livre entre as partículas do substrato, onde há umidade suficientemente para ser absorvida pelo substrato sólido para suportar o crescimento e o metabolismo microbiano (HANSEN, et al., 2015; PIROTA et al., 2014; WANG et al., 2013).

A matriz sólida normalmente é insolúvel e age como suporte físico e fonte de nutrientes para o crescimento do microrganismo, que pode ser um sólido natural, como resíduos agroindustriais, ou um suporte inerte, como poliuretano ou resinas poliméricas, os quais servem apenas como suporte para o crescimento dos microrganismos (HAMA et al., 2008; PANDEY et al., 2013; SOCCOL et al., 2017; YANG et al., 2005).

O CES é de grande interesse econômico e possui inúmeras vantagens em relação a outros processos, como por exemplo ao cultivo submerso, pois é uma técnica barata especialmente para países com grande geração de resíduos como o Brasil, por utilizar resíduos agrícolas não refinados (palhas, bagaços e tortas vegetais). Além disso, reproduz as condições do habitat natural dos microrganismos e é menos susceptível a contaminações bacterianas, proporcionando inúmeras vantagens ambientais, uma vez que serve como fonte de energia e tem uma menor geração de efluentes (MARTINS et al., 2011; SINGHANIA et al., 2009; SOCCOL et al., 2017).

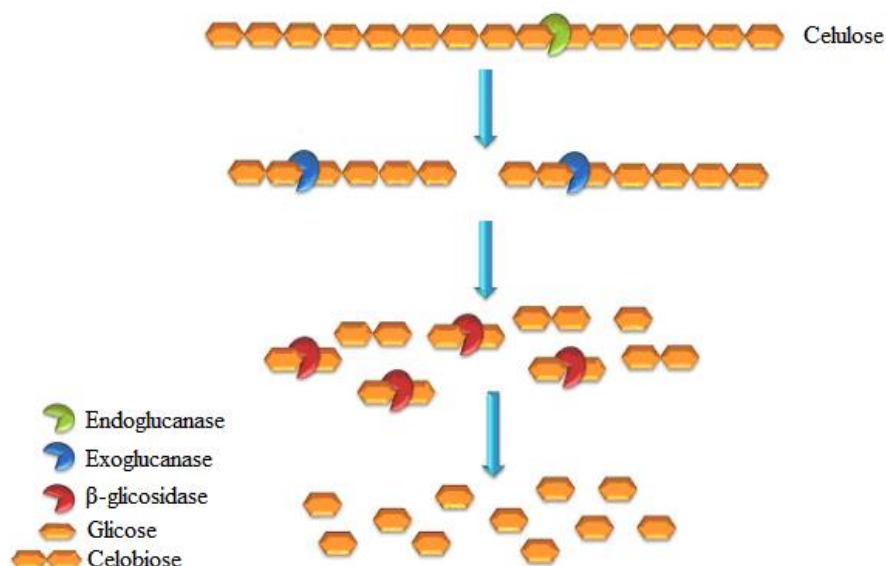
1.3 Enzimas celulolíticas

A hidrólise dos materiais lignocelulósicos requer múltiplas enzimas com diferentes especificidades para desconstruir a complexa estrutura da parede celular vegetal (BOYCE & WALSH, 2015). Especificamente, uma ação sinérgica de lignocelulases - celulases, hemicelulases e lignases é necessária para uma atividade de desconstrução efetiva. Atualmente, esforços têm sido realizados para encontrar meios sustentáveis de produzir quantidades significativas desses biocatalizadores celulósicos (OBENG et al., 2017).

As celulases são glicosil hidrolases usadas na despolimerização da celulose - um polímero hidrofílico, insolúvel em água, composto de unidades repetidas de D-glicose interligadas por ligações β -1,4-glicosídicas - em polissacarídeos de cadeia mais curta, como celodextrina, celobiose e glicose (GARVEY et al., 2013; MORAIS et al., 2012). Essas enzimas são categorizadas distintamente em três: endoglucanases, exoglucanases

ou celobiohidrolases e β -glicosidases ou celobiasas (Fig. 2), de acordo com a sua estrutura e função, mas atuam em conjunto na hidrólise das complexas microfibrilas de celulose da parede celular vegetal (OBENG et al., 2017).

Figura 2 - Estrutura da molécula de celulose e ação das celulasas (Modificado de Arantes e Sadler, 2010).



1.3.1 Endoglucanase: são enzimas responsáveis por dar início à hidrólise da molécula de celulose. Hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura da fibra celulósica, resultando em uma rápida redução no tamanho da cadeia devido à sua fragmentação em oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, novos terminais, para ação das exoglucanases. (BHALLA et al., 2013; CASTRO & PEREIRA Jr, 2010; DIENES et al., 2004). Devido ao seu alto grau de polimerização e baixa cristalinidade a carboximetilcelulose (CMC) é utilizada como substrato preferencial para a atividade dessas enzimas (CAO & TAN, 2002; ZHANG et al., 2006).

1.3.2 Exoglucanases: são constituídos pelas celobiohidrolases, que atuam sobre a celulose a partir de extremidades não redutoras, das regiões cristalinas, liberando unidades de celobiose como produto primário (SORENSEN et al., 2015). Podem ser classificadas em dois tipos: tipo I, que hidrolisam terminais redutores, e as do tipo II, que hidrolisam os não redutores. Elas atuam em sinergia na celulose, podendo sofrer inibição pelo produto de sua hidrólise, a celobiose, que são finalmente hidrolisadas em D-glicose pelas β -glicosidases (BON et al., 2008; JUTURU & WU, 2014; NG et al., 2010).

1.3.3 β -glicosidases: hidrolisam celobiose e outras celodextrinas em glicose, reduzindo assim a inibição das endoglucanases e exoglucanases, tornando-se o fator limitante na regulação de todo o processo de degradação da celulose (BANSAL et al., 2012; YEOMAN et al., 2010). A ação das β -glicosidases, além de finalizar a despolimerização, tem a capacidade de aumentar o rendimento global de açúcares fermentescíveis consumindo a celobiose, reduzindo seu efeito inibidor sobre as demais enzimas celulolíticas, promovendo a continuidade do processo de hidrólise enzimática (OLSEN et al., 2011).

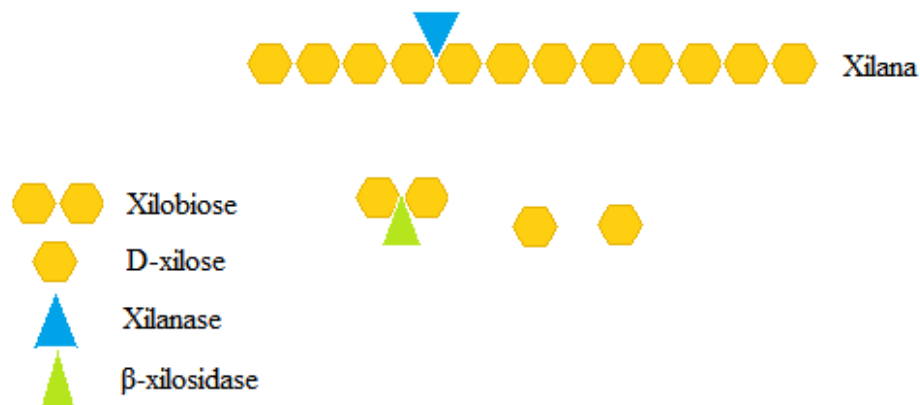
1.4 Enzimas hemicelulolíticas

As hemicelulases compartilham de atividades semelhantes com as celulases por causa das ligações β -1,4-glicosídicas que atuam como suporte principal do componente hemicelulósico da biomassa vegetal, unida covalentemente à lignina, formando juntamente com a celulose uma estrutura altamente complexa. Porém a hemicelulose pode ser degradada mais facilmente que a celulose. Apesar disso, é necessário um sistema de enzimas específicas para degradação completa, dada a sua estrutura variável e ramificada (SHALLOM & SHOHAM, 2003).

O substrato hemicelulósico é um grupo heterogêneo de polissacarídeos com uma estrutura de carboidratos complexa consistindo em diferentes polímeros facilmente hidrolisáveis, tais como pentoses (por exemplo, xilose e arabinose) e uma pequena fração de hexoses (por exemplo, manose, glucose e galactose) (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

A xilana é um polissacarídeo complexo que representa a principal classe de hemicelulose. É composta por uma cadeia de resíduos de xilose ligados por ligações β -1,4-glicosídicas (Fig. 3). É o polissacarídeo hemicelulósico mais comum nas paredes celulares vegetais. Uma variedade dessas enzimas age exclusivamente sobre as cadeias laterais, assim com a sua liberação, a cadeia principal de xilana é exposta à clivagem pelas xilanases. As β -xilosidases clivam xilobiose em dois monômeros de xilose, sendo que esta enzima também pode liberar xilose a partir do final da cadeia principal de xilana ou de um xilooligossacarídeo (FARINAS, 2011).

Figura 3 - Estrutura da molécula de xilana e ação das hemicelulases (Modificado de Dutta & Wu, 2014).



1.4.1 Xilanases: atuam na cadeia central da hemicelulose. Clivam ligações glicosídicas internas da cadeia principal da xilana, catalisando a hidrólise das ligações β -1,4-D-xilosídicas de maneira aleatória, acarretando a diminuição do grau de polimerização do polissacarídeo, liberando xilooligossacarídeos e xilobiose, que por sua vez são hidrolisados por β -xilosidases (ALVES-PRADO et al., 2010; COSTA et al., 2016; DODD & CANN, 2009; POLIZELLI et al., 2005).

1.4.2 β -xilosidases: hidrolisam externamente a cadeia de xilana e pequenos xilooligossacarídeos, liberando xilose (KESHWANI & CHENG, 2009). As xilanases podem ser inibidas por altas concentrações de seus produtos. Uma das funções das β -xilosidases é promover a remoção destes produtos finais que poderiam inibir as endoxilanases e, com isso, limitar a hidrólise do polissacarídeo (KNOB et al., 2014).

1.5 Aplicações industriais das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas

Atualmente a extensiva aplicação de microrganismos em diferentes bioprocessos é utilizada para fornecer uma grande variedade de produtos em indústrias (SINGH & SHARMA, 2016). Dentre as aplicações biotecnológicas das hemicelulases é possível destacar a sua aplicação no processo de branqueamento de polpa de papel, onde é substancialmente aumentado após o pré-tratamento da pasta com a enzima, permitindo assim uma redução de até 25 % do volume do produto clorado originalmente empregado. A hemicelulose é hidrolisada em condições de temperatura controlada para facilitar a remoção da lignina, diminuindo a quantidade de compostos organoclorados gerados no processo. A remoção da hemicelulose aumenta a acessibilidade dos agentes químicos às

moléculas de lignina, aumentando a eficiência do processo, conseqüentemente reduzindo os danos ambientais (BOONRUNG et al., 2016).

O uso das hemicelulases em aplicações comerciais também inclui sua utilização como aditivos para aumento da digestibilidade em ração animal, clarificação de sucos, mucilagem de café, indústria farmacêutica, melhoramentos na panificação, aditivo na produção de leite e derivados, produção de bebidas alcoólicas e álcool. Produtos da hidrólise de xilana, como a xilose, podem ser convertidos em etanol, xilitol, solventes e adoçantes (SILVA et al., 2015).

Um dos grupos de enzimas de maior importância industrial são as celulases, representando cerca de 20% do mercado global de enzimas (SHRIVASTAVA et al., 2014). Na indústria têxtil, muitas restrições foram impostas devidos as preocupações com os prejuízos ambientais. Deste modo, o tratamento enzimático surgiu como uma solução ecologicamente correta, podendo ser utilizado na remoção de corantes da superfície das fibras sem afetar a estrutura da fibra, criando a aparência de desbotado do tecido conhecido como bioestonagem (ARAUJO, et al., 2008).

Presentes em detergentes, podem ocasionar a remoção de microfibrilas presentes na superfície de tecidos à base de algodão, que após repetidas lavagens tornam-se macios e opacos ocorrendo o descolamento parcial das microfibrilas, podendo fazer com que aumente a suavidade da superfície, restaurando a cor original do tecido (BJORK, 1997).

As celulases têm ganhado grande importância na área de biotecnologia de alimentos devido ao aumento de sua aplicação em diversos processos, como em clarificação de sucos, redução da viscosidade de néctares, concentração de purês, extração de azeite e aditivos para melhoramento na qualidade de produtos de panificação (EFRATI et al., 2013; KARMAKAR & RAY, 2011; KUHAD et al., 2010; SHARMA et al., 2014).

Na indústria farmacêutica podem auxiliar na liberação de compostos medicinais de plantas e produtos vegetais. Enzimas incluindo celulases, proteases, amilases, etc., são utilizadas para melhorar a extração de polifenóis bioativos de diferentes cereais (BHANJA et al., 2009; DO et al., 2009).

Uma aplicação de grande importância das celulases é no processo de produção de etanol de 2ª geração, que consiste na hidrólise da celulose e da hemicelulose (polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica) através da atividade enzimática de celulases, gerando açúcares como bioproduto final, os quais posteriormente podem ser utilizados na produção do bioetanol (LUCARINI et al., 2017).

A dieta de animais como os ruminantes consiste em forrageiras que são constituídas de celulose, hemicelulose, pectina e lignina. Para o aumento da digestibilidade dos nutrientes as celulases são utilizadas como aditivos para digestão e absorção de nutrientes tendo um efeito positivo na saúde dos animais, causando ganho de peso (COSTA et al., 2019; MURAD et al., 2009; RODRIGUES et al., 2008; SHRIVASTAVA et al., 2011).

1.6 Fungos basidiomicetos

A fim de contornar os problemas ambientais que podem ser causados pelo descarte incorreto dos resíduos agroindustriais ou pelo uso do pré-tratamento químico utilizado para despolimerização da parede celular vegetal, tem-se como alternativa a utilização da bioconversão desses materiais. Isto ocorre através da utilização de microrganismos produtores de complexos enzimáticos, capazes de degradar materiais lignocelulósicos, na qual a grande biodiversidade brasileira permite a seleção de cepas com capacidade de degradar biomassa e produzir enzimas de interesse biotecnológico (VALENCIA & CHAMBERGO, 2013).

Os organismos predominantemente responsáveis pela degradação de complexos lignocelulósicos são os fungos filamentosos. Estes são amplamente distribuídos por todo o reino fúngico, desde os mais simples e primitivos Chytridiomycetes até os Basidiomicetos mais complexos (MAITAN-ALFENAS et al., 2015).

Os Basidiomicetos são os fungos decompositores mais conhecidos no ramo industrial devido a sua capacidade de produzir complexos enzimáticos de grande potencialidade biotecnológica, especialmente os de podridão branca, ganharam significativa atenção tanto por suas enzimas ligninolíticas quanto por enzimas celulolíticas. No entanto, não são excelentes produtores de enzimas xilanolíticas (METREVELI et al. 2017; SASIDHARA & THIRUNALASUNDARI, 2014; SAHA et al. 2017; SHARMA et al. 2018; WANZENBÖCK et al. 2017).

As espécies de basidiomicetos celulolíticas de podridão branca que são mais extensamente estudadas são dos gêneros *Cotylidia*, *Ganoderma*, *Irpex*, *Lentinus*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Poria*, *Trametes*, *Schizophyllum* e *Pycnoporus* (LYND et al. 2002; METREVELI et al., 2017; SHARMA et al., 2018; ZHOU et al., 2018), cuja espécie será avaliada no presente estudo.

O *Pycnoporus sanguineus* é um dos fungos da podridão branca (SANCHEZ, 2009; YOON et al., 2012) que possui alta capacidade de hidrolisar a biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis devido à secreção de enzimas lignocelulolíticas. Esses açúcares possuem grande interesse comercial como matéria-prima para produção de biocombustíveis (CHU & FENG, 2013). Recentemente, a maior demanda por enzimas pela indústria tornou-se o principal fator para explorar novas fontes locais para a produção de enzimas para atender à estas necessidades (SAFRI et al., 2017). O que justifica a constante busca por microrganismos hiperprodutores de biocatalisadores com aplicações industriais.

2 REFERÊNCIAS

- 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, n. 1-8, p. 333-346, 2010.
- ARANTES, V.; SADLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 4, 2010.
- ARAÚJO, R.; CASAL, M.; CAVACO-PAULO, A. Application of enzymes for textile fibres processing. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, n. 5, p. 332-349, 2008.
- 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, n. 7, 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.
- BHANJA, T.; KUMARI, A.; BANERJEE, R. Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 11, p. 2861-2866, 2009.
- BJORK, N.; CLARKSON, K. A.; LAD, P. J.; WEISS, G. L. **Degradation resistant detergent compositions based on cellulase enzymes**. U.S. Patent n. 5,688,290, 18 nov. 1997.
- BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. **Enzimas na produção de etanol**. In: Enzimas em Biotecnologia: Produções, Aplicações e Mercado. 1ª ed. Rio de Janeiro. Bon, E.P.S. et al. (eds). Interciência Brasil. p. 241-271, 2008.
- 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, n. 6, p. 408–416, 2016.
- BOYCE, A.; WALSH, G. Characterisation of a novel thermostable endoglucanase from *Alicyclobacillus vulcanalis* of potential application in bioethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 18, p. 7515-7525, 2015.
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D. dos; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Editora Blucher, 2010. p. 365-380.
- CAO, Y.; TAN, H. Effect s of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 14, p. 1291-1296, 2002.
- CASTRO, A. M. de; PEREIRA-JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

- CHU, K. H.; FENG, X. Enzymatic conversion of newspaper and office paper to fermentable sugars. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 91, n. 1-2, p. 123-130, 2013.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n.1, 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, n. 4, p. 1040-1048, 2016.
- DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Industrial Crops and Products**, v. 20, n. 1, p. 11-21, 2004.
- DO, Y. K.; KIM, J. M.; CHANG, S. M.; HWANG, J. H.; KIM, W. S. Enhancement of polyphenol bioactivities by enzyme reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 2-3, p. 173–178, 2009.
- DODD, D.; CANN, I. K. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 2-17, 2009.
- DUTTA, S.; WU, K. C. W. Enzymatic breakdown of biomass: enzyme active sites, immobilization, and biofuel production. **Green Chemistry**, v. 16, n. 11, p. 4615-4626, 2014.
- EFRATI, Z.; TALAEIPOUR, M.; KHAKIFIROUZ, A.; BAZYAR, B. Impact of cellulase enzyme treatment on strength, morphology and crystallinity of deinked pulp. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 47, n. 7-8, 547–551, 2013.
- FARINAS, C. S. **A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011. 13 p. (Embrapa Instrumentação. Documentos, ISSN: 1518-7179; 54).
- FRANÇA-PASSOS, D.; PEREIRA Jr. N.; CASTRO, A. M. A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 14, p. 60-66, 2018.
- GARVEY M, KLOSE H, FISCHER R.; LAMBERTZ, C.; COMMANDEUR, U. Cellulases for biomass degradation: comparing recombinant cellulase expression platforms. **Trends Biotechnology**, v. 31, n. 10, p. 581-593, 2013.
- HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; SUZUKI, Y.; YOSHIDA, A.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Preparation and comparative characterization of immobilized *Aspergillus oryzae* expressing *Fusarium heterosporum* lipase for enzymatic biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 637-645, 2008.
- HANSEN, G. H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J. C.; LÜBECK, P. S.; ANDERSEN, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1327-1341, 2015.
- HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

JOVANOVIC, I.; MAGNUSON, J. K.; COLLART, F.; ROBBERTSE, B.; ADNEY, W. S.; HIMMEL, M. E.; BAKER, S. E. Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 687-697, 2009.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial exo-xylanases: A mini review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 1, p. 81-92, 2014.

KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Current trends in research and application of microbial cellulases. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 41-53, 2011.

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. Agroresidues as alternative for xylanase production by filamentous fungi. **BioResources**, v. 9, n. 3, p. 5738-5773, 2014.

KUHAD, R. C.; MEHTA, G.; GUPTA, R.; SHARMA, K. K. Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulose improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 8, p. 1189-1194, 2010.

LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V.; DELATORRE, A. B.; PEREZ, V. H.; MARTINS, L. L. M. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus sp.* em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 324-328, 2010.

LUCARINI, A. C., DELQUIARO, A. C. T., VIDOCA, L. C. P. T., BRAZ, R., MARTINS, R. M., ALVES, T. P. Estudo da hidrólise enzimática da palha da cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 2, p. 242-253, 2017.

LYND L. R.; WEIMER P. J.; VAN-ZYL W. H.; PRETORIUS I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; GUIMARÃES, V. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass, converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 44-49, 2015.

MARTINS, A.; GRAEBIN, N.; LORENZONI, A. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2311-2316, 2011.

METREVELI, E.; KACHLISHVILI, E.; SINGER, S. W.; ELISASHVILI, V. Alteration of white-rot basidiomycetes cellulase and xylanase activities in the submerged co-cultivation and optimization of enzyme production by *Irpex lacteus* and *Schizophyllum commune*. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 652-660, 2017.

MORAIS, S.; BARAK, Y.; LAMED, R.; WILSON, D. B.; XU, Q.; HIMMEL, M. E.; BAYER, E. A. Paradigmatic status of an endo- and exoglucanase and its effect on crystalline cellulose degradation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 78, 2012.

- MURAD, H. H.; HANFY, M. A.; KHOLIF, A. M.; GAWAD, M. H. A.; MURAD, H. A. Effect of cellulases supplementation to some low quality roughages on digestion and milk production by lactating goats. **Journal of Biological Chemistry and Environmental Sciences**, v. 4, p. 791-809, 2009.
- NG, I. S.; LI, C. W.; CHAN, S. P.; CHIR, J. L.; CHEN, P. T.; TONG, C. G.; YU, S. M.; HO, T. H. D. High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1310-1317, 2010.
- OBENG, E. M.; ADAM, S. N. N.; BUDIMAN, C.; ONGKUDON, C. M.; MAAS, R.; JOSE, J. Lignocellulases: a review of emerging and developing enzymes, systems, and practices. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 16, 2017.
- OLSEN, S. N.; LUMBY, E.; McFARLAND, K.; BORCH, K.; WESTH, P. Kinetics of enzymatic high-solid hydrolysis of lignocellulosic biomass studied by calorimetry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 626-635, 2011.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2013.
- PANESAR, P. S., KAUR, R., SINGLA, G., SANGWAN, R. S. Bio-processing of agro-industrial wastes for production of food-grade enzymes: progress and prospects. **Applied Food Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 208-227, 2016.
- 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, n. 2, p. 744-752, 2014.
- POLIZELLI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCEZI, H.; JORGE, J. AMORIM, D. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, (Mini-Review), v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.
- RODRIGUES, M. A. M.; PINTO, P.; BEZERRA, R. M. F.; DIAS, A. A.; GUEDES, C. V. M. Effect of enzyme extracts isolated from white-rot fungi on chemical composition and in vitro digestibility of wheat straw. **Animal Feed Science and Technology**, v. 141, n. 3-4, p. 326-338, 2008.
- SAFRI, N. A.; JALIL, R.; KALIL, M. S. Fermentable sugars from agrowastes using cellulase enzymes from local white rot fungi *Pycnoporus sanguineus*. **Journal Kejuruteraan**, v. 29, n. 2, p. 105-111, 2017.
- SAHA, B. C.; KENNEDY, G. J.; QURESHI, N.; COTTA, M. A. Biological pretreatment of corn stover with *Phlebia brevispora* NRRL-13108 for enhanced enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production. **Biotechnology Progress**, v. 33, n. 2, p. 365-374, 2017.
- SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.
- SASIDHARA, R.; THIRUNALASUNDARI, T. Phytochemicals and antioxidant potentials of *Pleurotus djamour*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 4, p. 950-953, 2014.

- SCHLITTLER, L. A. F. S.; PEREIRA Jr., N. Produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósicos: pré-tratamento e estratégias de processamento. **Diálogos & Ciência-Revista da Rede de Ensino FTC**, v. 2, n. 6, p. 25-28, 2008.
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 219-228, 2003.
- SHARMA, D.; SUD, A.; BANSAL, S.; MAHAJAN, R.; SHARMA, B. M.; CHAUHAN, R. S.; GOEL, G. Endocellulase production by *Cotylidia pannosa* and its application in saccharification of wheat bran to bioethanol. **BioEnergy Reserarch**, v. 11, n. 1, p. 219-227, 2018.
- SHRIVASTAVA, B.; THAKUR, S.; KHASA, Y. P.; GUPTA, A.; PUNIYA, A. K.; KUHAD, R. C. White-rot fungal conversion of wheat straw to energy rich cattle feed. **Biodegradation**, v. 22, n. 4, p. 823–831, 2011.
- SILVA, C. D. O. G.; AQUINO, E. N.; RICART, C. A. O.; MIDORIKAWA, G. E. O.; MILLER, R. N. G. GH11 xylanase from *Emericella nidulans* with low sensitivity to inhibition by ethanol and lignocellulose-derived phenolic compounds. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 13, 2015.
- SINGH, A., SHARMA, R. Mycoremediation an eco-friendly approach for the degradation of cellulosic wastes from paper industry with the help of cellulases and hemicellulase activity to minimize the industrial pollution. **International Journal of Environmental Engineering Management**, v. 4, n. 3, p. 199-206, 2013.
- SINGHANIA, R.; PATEL, A.; SOCCOL, C. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.
- SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research & Innovation**, v.1, n.1, p. 52-71, 2017.
- 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, n. 36, p. 22193-22202, 2015.
- STRAKOWSKA, J.; BLASZCZYK, L.; CHELKOWSKI, J. The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. **Journal of basic microbiology**, v. 54, n. 1, p. 2-13, 2014.
- VALENCIA, E. Y.; CHAMBERGO, F. S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 9-18, 2013.
- WANG, G.; LIU, C.; HONG, J.; MA, Y.; ZHANG, K.; HUANG, X.; ZOU, S.; ZHANG, M. Comparison of process configurations for ethanol production from acidand alkali-pretreated corncob by *Saccharomyces cerevisiae* strains with and without β -glucosidase expression. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 154-161, 2013.
- WANZENBÖCK, E.; APPRICH, S.; TIRPANALAN, O.; ZITZ, U.; KRACHER, D.; SCHEDLE, K.; KNEIFEL, W. Wheat bran biodegradation by edible *Pleurotus* fungi — sustainable perspective for food and feed. **LWT-Food Science Technology**, v. 86, p. 123-131, 2017.

YANG, Z.; PAN, W. Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 1, p. 19-28, 2005.

YEOMAN, C. J.; HAN, Y.; DODD, D.; SCHROEDER, C. M.; MACKIE, R. I.; CANN, I. K. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. **Advances in Applied Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 1-55, 2010.

YOON, L. W.; NGOH, G. C.; CHUAA, A. S. M. Simultaneous production of cellulase and reducing sugar from alkali-pretreated sugarcane bagasse via solid state fermentation. **BioResources**, v. 7, n. 4, 5319-5332, 2012.

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

ZHOU, S.; HERPOËL-GIMBERT, I.; GRISEL, S.; SIGOILLOT, J. C.; SERGENT, M.; RAOUCHE, S. Biological wheat straw valorization: multicriteria optimization of *Polyporus brumalis* pretreatment in packed bed bioreactor. **Microbiology Open**, v. 7, n. 1, p. e00530, 2018.

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASE PRODUZIDAS POR *Pycnoporus sanguineus*

RESUMO

Os resíduos lignocelulósicos são subprodutos gerados durante o processamento industrial a partir de produtos e atividades agrícolas, podendo ser utilizados em conjunto com microrganismos para a produção de biomoléculas de alto valor agregado, como as enzimas. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo produzir e caracterizar celulases e hemicelulase por cultivo em estado sólido pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. A produção de endoglucanase, β -glicosidase e xilanase por *Pycnoporus sanguineus* foi otimizada, sendo obtido respectivamente $63,04 \pm 2,39$, $32,35 \pm 0,66$ e $11,28 \pm 0,78$ U.g⁻¹ de substrato seco, entre 96 – 120 horas de cultivo em farelo de trigo. A atividade ótima para endoglucanase foi obtida em pH 5,0 e 70°C; para β -glicosidase foi pH 4,0 e 70°C e para xilanase pH 5,5 e 75°C. Em relação a estabilidade ao pH a enzima endoglucanase manteve-se estável na faixa de 3,5 – 8,0; β -glicosidase foi na faixa de 4,0 – 7,0 e xilanase de 3,0 – 6,0. Na avaliação da termoestabilidade a enzima endoglucanase foi estável na faixa de temperatura de 30 – 60°C, β -glicosidase 30 – 55°C e xilanase 30 – 65°C. A β -glicosidase foi fortemente inibida por glicose, retendo cerca de 50% de sua atividade original em solução contendo 25 mM de glicose. A mesma enzima apresentou estabilidade catalítica quando incubada em solução contendo 15% de etanol, o que possibilita sua utilização em processos de fermentação alcoólica. O fungo *Pycnoporus sanguineus* apresentou potencial para produção de enzimas quando cultivado em substrato de reduzido valor agregado (baixo custo) e suas enzimas apresentaram características promissoras para aplicação industrial, devido a elevada estabilidade ao pH e temperatura.

Palavras-chave: Cultivo em estado sólido; Biomassas vegetais; Enzimas.

ABSTRACT

Lignocellulosic residues are by-products generated during industrial processing from agricultural products and activities, and can be used in conjunction with microorganisms for the production of high added value biomolecules, such as enzymes. In this context, the present study aimed to produce and characterize cellulases and hemicellulase by cultivation in solid state by the fungus *Pycnoporus sanguineus* using agroindustrial residues as substrate. The production of endoglucanase, β -glucosidase and xylanase by *Pycnoporus sanguineus* was optimized, obtaining 63.04 ± 2.39 , 32.35 ± 0.66 and 11.28 ± 0.78 Ug⁻¹ of dry substrate, respectively. 96 - 120 hours of wheat bran cultivation. The optimal activity for endoglucanase was obtained at pH 5.0 and 70°C; for β -glucosidase it was pH 4.0 and 70°C and for xylanase pH 5.5 and 75°C. Regarding pH stability, the enzyme endoglucanase remained stable in the range of 3.5 - 8.0; β -glycosidase was in the range of 4.0 - 7.0 and xylanase was 3.0 - 6.0. In the evaluation of thermostability, the enzyme endoglucanase was stable in the temperature range of 30 - 60°C, β -glucosidase 30 - 55°C and xylanase 30 - 65°C. B-glucosidase was strongly inhibited by glucose, retaining about 50% of its original activity in a solution containing 25 mM of glucose. The same enzyme showed catalytic stability when incubated in a solution containing 15% ethanol, which enables its use in alcoholic fermentation processes. The fungus *Pycnoporus sanguineus* showed potential for enzyme production when grown on a low added value substrate (low cost) and its enzymes showed promising characteristics for industrial application, due to the high stability at pH and temperature.

Keywords: Solid state cultivation; Vegetable biomass; Enzymes.

1. INTRODUÇÃO

O estado de Mato Grosso do Sul é localizado na região Centro-Oeste, tendo este como Bioma predominante o Cerrado, o qual detém 30% da biodiversidade total brasileira, incluindo uma pequena parcela de fungos já catalogados, porém com o menor número de registros identificados (CARRANZA et. al, 2014; FRANÇOSO et al., 2015), despertando o interesse em estudos mais aprofundados sobre a biodiversidade de microrganismos do local.

No Brasil a alta produção agrícola gera uma grande quantidade de resíduos, dentre eles palha e bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, resíduos de milho, farelo de arroz e até mesmo resíduos de fruta, tais como bagaço de laranja e maracujá. Além de serem abundantes e apresentarem baixo custo, suas moléculas fazem parte do complexo lignocelulósico que são formadas por microfibrilas de celulose inseridos em uma matriz de hemicelulose e lignina passíveis de conversão em açúcares fermentescíveis (OGEDA, 2010).

A conversão da biomassa vegetal em açúcares fermentescíveis pode ser realizada por hidrólise enzimática, onde as enzimas utilizadas são produzidas principalmente por fungos filamentosos, que têm grande importância devido à sua produção de celulasas e hemicelulasas com características físico-químicas variadas, de grande interesse industrial. Porém, a produção desses biocatalisadores ainda apresenta alto custo. A fim de contornar este problema, trabalhos recentes têm empregado processos de cultivo em estado sólido para produção de enzimas industriais utilizando resíduos agroindustriais como substrato (CAVALHEIRO et al., 2017; COSTA et al., 2019; FACHINNI, 2010; GARCIA et al., 2018; LIAO et al., 2015).

O cultivo em estado sólido (CES) é caracterizado pelo crescimento de microrganismos sobre um substrato sólido com baixa quantidade de água livre entre as partículas de substrato, porém com umidade suficiente para o desenvolvimento microbiano (HANSEN et al., 2015; YOON et al., 2014).

A espécie *Pycnoporus sanguineus* vêm sendo amplamente relatada na literatura em diversos estudos de biotransformação, tais como, de medicamentos, metais pesados, corantes, no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos principalmente na remoção de

lignina e sacarificação enzimática (FALKOSKI & GUIMARÃES, 2012; GAO et al., 2017; GAUNA et al., 2018; SCARPA et al., 2019; YOON et al., 2013; YAHAYA & DON, 2014).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar bioquimicamente enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas obtidas por cultivo em estado sólido do fungo filamentosso *Pycnoporus sanguineus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

O fungo filamentosso mesófilo *Pycnoporus sanguineus* foi utilizado no presente trabalho. O referido microrganismo foi isolado de troncos de árvore localizados em área de Cerrado da região de Dourados – MS (22°10'49.2"S - 54°56'57.4"W), e identificado pela Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. A linhagem foi armazenada no Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos (LEPFER) da Universidade Federal da Grande Dourados, sendo mantida em meio *Sabouraud dextrose ágar*, após crescimento a 28°C por 96 horas e posteriormente armazenada a 4°C.

2.2 Inóculo

O fungo *P. sanguineus* foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio *ágar Sabouraud Dextose* inclinado, mantido por 48 horas a 28°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% nitrato de amônio m/v). A inoculação do fungo nos substratos (resíduos agroindustriais) se deu pela transferência de 5 mL desta suspensão, perfazendo 5 mg de massa micelial seca / grama de substrato seco (Adaptado de: MARTINS et al., 2019).

2.3 Cultivo em estado sólido (CES)

As enzimas foram produzidas pelo cultivo do fungo *P. sanguineus* em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de resíduos agroindustriais (farelo de trigo, farelo de soja, palha de milho, bagaço de cevada, casca de arroz e bagaço de cana de açúcar), a umidade foi ajustada para 70% com solução nutriente (descrito no item 2.2). Após 120 horas de cultivo a 25°C a solução enzimática foi extraída dos resíduos cultivados. O melhor substrato para produção da enzima foi utilizado para avaliação do tempo de cultivo (24 – 168 horas). Os demais parâmetros foram fixados em 70% de umidade e temperatura de 25°C. Todo material foi previamente autoclavado por 20 minutos a 121°C e os experimentos foram realizados em triplicatas (GARCIA et al., 2015).

2.4 Extração da Enzima

A extração da enzima dos resíduos fermentados foi realizada pela adição de 50 mL de água destilada, mantidos em agitação de 100 rpm por 1 hora. As amostras foram filtradas e centrifugadas a 3.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi considerado extrato enzimático utilizado nas etapas seguintes (GARCIA et al., 2015).

2.5 Determinação das atividades enzimáticas

- **Endoglucanase e Xilanase**

As atividades de endoglucanase e xilanase foram quantificadas utilizando respectivamente, Carboximetilcelulose 3% (m/v) (C5678 Sigma) e xilana 0,5% (m/v) (Birch-Wood Sigma) em solução-tampão acetato de sódio a 0,1M, no pH 4,5. A atividade enzimática foi determinada com 900 µL de tampão com substrato e 100 µL do extrato enzimático, reagindo por 10 minutos à 50°C (ALVES-PRADO et al., 2010). A reação enzimática foi paralisada através da adição de 1 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) e o extrato colocado em banho de ebulição a 100°C por 10 minutos. O açúcar redutor liberado foi quantificado por espectrofotometria a 540 nm pelo método de DNS (MILLER, 1959). A atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima que produz 1 µmol de produto por minuto de reação.

- **β -glicosidase**

A atividade de β -glicosidase foi determinada pela adição de 50 μ L do extrato enzimático, 250 μ L de tampão acetato de sódio a 0,1M, no pH 4,5 e 250 μ L de p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo 4mM (pNP β G, Sigma), reagindo por 10 minutos à 50°C. A reação enzimática foi paralisada com 2 mL de carbonato de sódio 2M. O p-nitrofenol liberado foi quantificado em espectrofotômetro a 410 nm (LEITE et al., 2008). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto de reação.

2.6 Caracterização bioquímica das enzimas produzidas

2.6.1 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática

O pH ótimo foi determinado mensurando a atividade das enzimas à 50°C em diferentes valores de pH (3,0 a 8,0), sendo utilizado tampão McIlvaine a 0,1M. A temperatura ótima foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em temperaturas de 30 a 85°C, nos respectivos valores de pH ótimo de cada enzima. A estabilidade das enzimas ao pH foi determinada incubando-as por 24 horas à 25°C em diferentes valores de pH (3,0 a 10,5). Os tampões utilizados foram McIlvaine 0,1M (3,0 a 8,0) e Glicina-NaOH 0,1M (8,5 a 11,0). A termoestabilidade foi determinada incubando as enzimas por 1 hora em diferentes valores de temperatura (30 a 85°C) (LEITE et al., 2008). As atividades residuais foram mensuradas nas respectivas condições ótimas de cada enzima.

2.6.2 Efeito de etanol sobre a atividade da β -glicosidase

A atividade enzimática foi quantificada com a adição de etanol em diferentes concentrações, 0–30% na mistura de reação, com incrementos de 5% (GARCIA et al., 2018). A atividade foi mensurada sob condições ótimas de pH e temperatura.

2.6.3 Efeito de glicose sobre a atividade da β -glicosidase

A atividade enzimática foi quantificada com a adição de glicose em diferentes concentrações, 0–100 mM, na mistura de reação (GARCIA et al., 2018). A atividade foi medida sob condições ótimas de pH e temperatura.

2.6.4 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 5%, com o auxílio do *software* estatístico GENES (CRUZ, 2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação dos parâmetros de cultivo para produção de enzimas

Dentre os substratos avaliados (resíduos agroindustriais) para produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas pelo fungo filamentoso *P. sanguineus*, a maior produção foi obtida utilizando farelo de trigo como substrato, atingindo cerca de 63,04 U.g⁻¹ de substrato seco (ou 6,3 U.mL⁻¹) de endoglucanase; 32,35 U.g⁻¹ (ou 3,2 U.mL⁻¹) de β-glicosidase e 11,28 U.g⁻¹ (ou 1,1 U.mL⁻¹) de xilanase após 120 horas da inoculação (Tabela 1).

Tabela 1 - Produção de celulasas e hemicelulasas em diferentes substratos agroindustriais por cultivo em estado sólido pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* em 120 horas de cultivo, contendo 70% de umidade a 25°C.

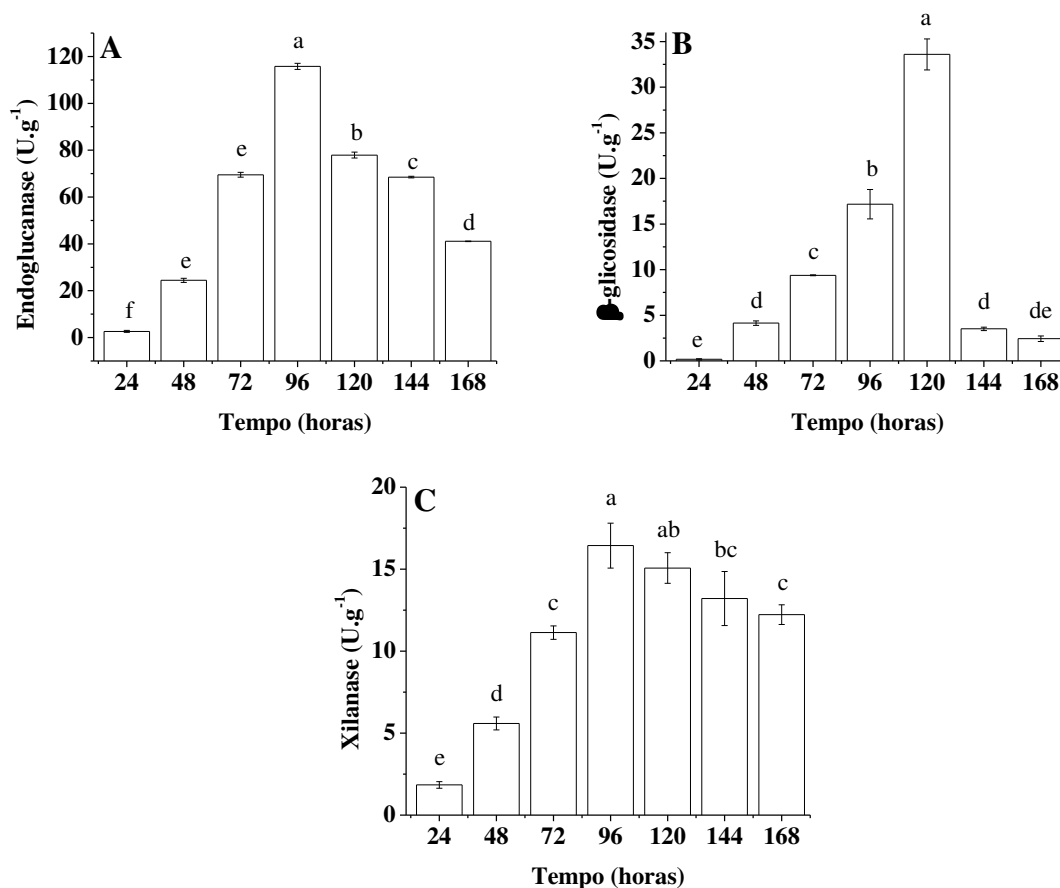
Substrato	Endoglucanase (U.g ⁻¹) de substrato	β-glicosidase (U.g ⁻¹) de substrato	Xilanase (U.g ⁻¹) de substrato
Farelo de trigo	63,04 ± 2,39 ^a	32,35 ± 0,66 ^a	11,28 ± 0,78 ^a
Bagaço de cevada	32,71 ± 1,76 ^b	11,97 ± 1,79 ^b	8,67 ± 0,90 ^b
Farelo de soja	17,57 ± 3,43 ^c	8,12 ± 1,03 ^c	3,45 ± 0,28 ^{cde}
Bagaço de cana	9,43 ± 0,12 ^d	1,08 ± 0,08 ^e	4,21 ± 0,50 ^{cd}
Palha de milho	7,33 ± 1,71 ^d	3,99 ± 0,05 ^d	1,97 ± 0,05 ^{de}
Casca de arroz	7,25 ± 0,37 ^d	1,10 ± 0,08 ^e	3,23 ± 0,60 ^{cde}

A produção média com letras diferentes indica diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). *Os valores (\pm) representam os desvios padrão dos experimentos em triplicata.

Devido a sua boa capacidade de absorção de água e estrutura física favorecer a transferência de massas no interior da matriz sólida, o farelo de trigo mostra-se como um excelente substrato para produção enzimática por cultivo em estado sólido por fungos filamentosos, sendo amplamente utilizado na literatura para esta finalidade (COSTA et al., 2016; FALKOSKI et al., 2013; GARCIA et al., 2018; GOVUMONI et al., 2015; KILIKIAN et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016; SANTOS et al., 2016a). Dessa forma o farelo de trigo foi utilizado nos ensaios subsequentes visando avaliar o tempo ótimo de cultivo para produção de enzimas.

A maior produção de endoglucanase, β -glicosidase e xilanase foram obtidas entre 96 e 120 horas de cultivo, sendo produzido $115,82 \text{ U.g}^{-1}$, $33,6 \text{ U.g}^{-1}$ e $16,44 \text{ U.g}^{-1}$ de substrato, respectivamente (Figura 1).

Figura 4 - Produção de Endoglucanase (A), β -glicosidase (B) e Xilanase (C) pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* em função do tempo de cultivo em farelo de trigo a 25°C , contendo 70% de umidade (as barras de erro representam o desvio padrão médio da determinação em triplicata).



De modo geral, os fungos basidiomicetos possuem como uma de suas características a produção de enzimas extracelulares associada às estruturas da hifa micelial e longo período de crescimento, quando comparados a outras linhagens fúngicas. Dessa forma, a recuperação das enzimas de interesse torna-se um desafio ainda maior (BENTIL et al., 2018).

No entanto, os resultados obtidos no presente estudo utilizando a espécie *P. sanguineus* indicam produção de celulasas e hemicelulasas com reduzido tempo de cultivo, entre 96 e 120 horas.

Com exceção da xilanase que não houve produção expressiva, principalmente quando comparada ao *Aspergillus niger* que obteve a produção de 2604,06 U.g⁻¹ no mesmo período de tempo (96 horas), foi possível observar resultados promissores quando comparados a outros trabalhos da literatura, com relação a produção de endoglucanase e β -glicosidase (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade de celulasas e hemicelulase produzidas por cultivo em estado sólido em farelo de trigo por diferentes espécies fúngicas em função do tempo de cultivo.

Espécies	Endoglucanase U.g ⁻¹	β -glicosidase U.g ⁻¹	Xilanase U.g ⁻¹	Tempo de cultivo (horas)	Referências
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	115,82	33,6	16,44	96 - 120	Presente trabalho
<i>Funalia trogii</i> IBB 146	72	-	69	264	Elisashvili et al., (2008)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> MTCC 787	0,08	-	66	264	Govumoni et al. (2015)
<i>Pleurotus ostreatus</i> IBB 10	12	-	6	264	Elisashvili et al. (2009)
<i>Pleurotus ostreatus</i> M2191	39	-	45	264	Elisashvili et al., (2008)
<i>Pseudotremella gibbosa</i> IBB 22	18	-	15	264	Elisashvili et al. (2009)
<i>Lentinula edodes</i> EF 28	118,53	21,44	-	504	Konno et al. (2012)
<i>Aspergillus niger</i>	-	21,69	2604,06	96	Dhillon et al. (2011)
<i>Trichoderma reesei</i>	68,57	13,58	2467,53	96	Dhillon et al. (2011)

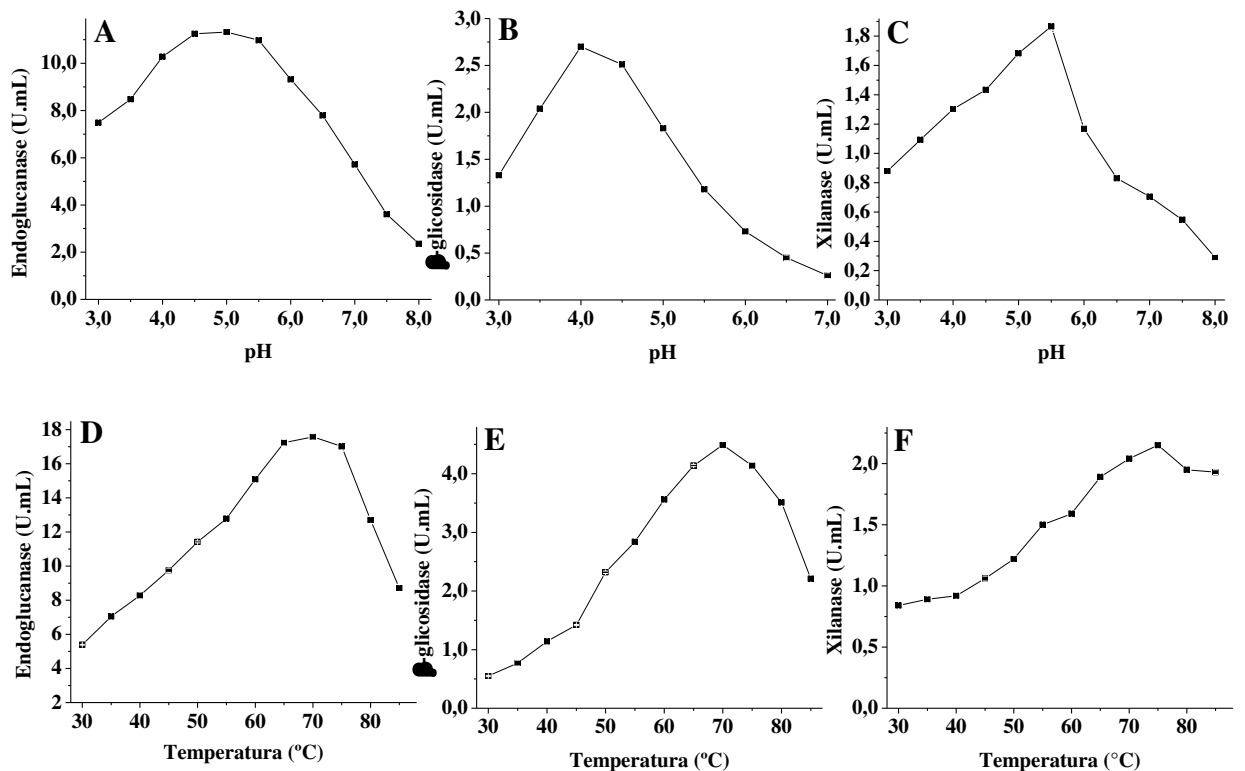
(-) Não analisado

3.2 Efeito de pH e temperatura sobre a atividade enzimática

As enzimas produzidas por *P. sanguineus* apresentaram maior atividade catalítica em pH 4,5 a 5,5; 4,0 e 5,5 para endoglucanase, β -glicosidase e xilanase, respectivamente (Figura 5 – A, B e C).

Os dados obtidos no presente estudo indicam que as enzimas possuem potencial para aplicação em processos que exigem valores de pH mais ácidos. Valores similares para endoglucanase também foram obtidos por Olajuyigbe et al. (2016) utilizando o fungo *Sporothrix carnis* quando cultivado em sabugo de milho; Garcia et al. (2018) com o fungo *Lichtheimia ramosa* relataram como ótimo pH 5,0 para a enzima endoglucanase. Santos et al. (2016) obtiveram como pH ótimo 4,5 para a enzima β -glicosidase utilizando o fungo *Gongronella butleri*. Costa et al. (2019) obtiveram maior atividade catalítica para xilanase produzida por *Trichoderma viride* em pH 6,0.

Figura 5 - Atividade de Endoglucanase, β -glicosidase e Xilanase em função da variação do pH (A, B e C) e temperatura (D, E e F), produzidas pelo fungo *Pycnoporus sanguineus*.



As temperaturas ótimas obtidas foram de 65 a 75°C para endoglucanase, 70°C para β -glicosidase, e 75°C para xilanase (Figura 5 – D, E e F). Os valores obtidos em relação a temperatura ótima das enzimas não são comumente encontrados para biocatalisadores produzidos por microrganismos mesófilos. Casciatori et al. (2015) avaliaram a endoglucanase produzida por *Trichoderma reesei* e obtiveram 45°C como temperatura ótima.

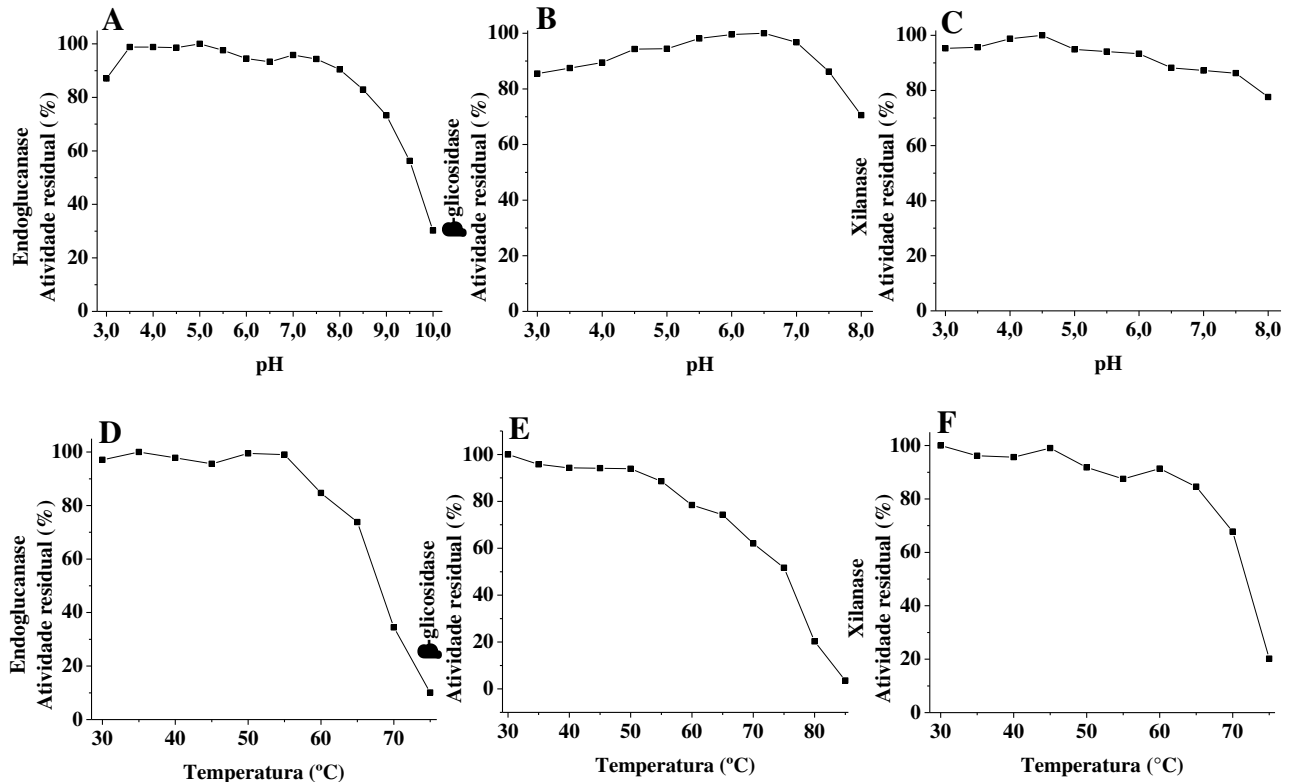
Em estudos realizados por Teixeira et al. (2016) com β -glicosidase relataram atividade ótima à 60°C utilizando o fungo *Myceliophthora heterothallica*. Garcia et al. (2018) obtiveram como temperatura ótima 65°C para xilanase do fungo *Lichtheimia ramosa*. Ahmed et al. (2016) descreveram 50°C como temperatura ótima para xilanase do fungo *Aspergillus terreus*.

Do ponto de vista industrial as enzimas produzidas por *Pycnoporus sanguineus* são interessantes para diversas aplicações que exijam altas temperaturas, pois permite uma flexibilização das condições térmicas de produção, podendo esse até ser equiparado a espécies termófilas, como no caso do fungo *Myceliophthora sp.* que produziu endoglucanase apresenta como temperatura ótima 65°C (CASCIA TORI et al., 2015).

As enzimas do presente estudo apresentaram estabilidade estrutural em uma ampla faixa de pH, a endoglucanase demonstrou estabilidade em uma faixa de pH de 3,5 - 8,0 retendo cerca de 80% de sua atividade original após 24 horas em pH 8,5. Para β -glicosidase a faixa foi de 4,0 - 7,0, retendo 70% de sua atividade original em pH 8,0. No ensaio utilizando xilanase esta demonstrou estabilidade entre a faixa de pH 3,0 - 6,0 (Figura 6 – A, B e C).

Marques et al. (2018) avaliaram a estabilidade de endoglucanase produzida pelos fungos *Botryosphaeria sp.* no qual a enzima manteve-se estável na faixa de pH 3,5 - 8,5 e *Saccharicola sp.* onde a endoglucanase apresentou perda de aproximadamente 50% de sua atividade após 24 h de incubação entre pH 3,5 - 9,0. Os mesmos autores avaliando a estabilidade de β -glicosidase obtiveram valores de pH 3,5 - 10,5. Santos et al. (2016)b realizaram estudos com a espécie *Aspergillus cf. tubingensis* avaliando a enzima xilanase, que apresentou estabilidade ao pH na faixa de 4,0 – 7,0.

Figura 6 - Avaliação da estabilidade enzimática de Endoglucanase, β -glicosidase e Xilanase em relação ao pH (A, B e C) e temperatura (D, E e F) produzida pelo fungo *Pycnoporus sanguineus*.



Com relação a termoestabilidade, a enzima endoglucanase manteve-se estável na temperatura de 30 - 60°C, β -glicosidase 30 - 55°C e xilanase 30 - 65°C (Figura 6 – D, E e F). As enzimas produzidas por *P. sanguineus* mostraram-se estáveis em uma ampla faixa de temperatura. Tais características enzimáticas são de extrema importância para aplicação industrial (NIGAM, 2013).

Estudos realizados por Marques et al. (2018) avaliaram a produção enzimática de duas espécies fúngicas sendo uma delas *Botryosphaeria sp.* obtendo temperatura de estabilidade entre 30 – 50°C para endoglucanase, 30 – 60°C para β -glicosidase e 30 – 55°C para xilanase. Para a espécie do fungo *Saccharicola sp.* os autores descreveram termoestabilidade para endoglucanase de 30 à 50°C, β -glicosidase 30 à 65°C e xilanase 30 à 55°C.

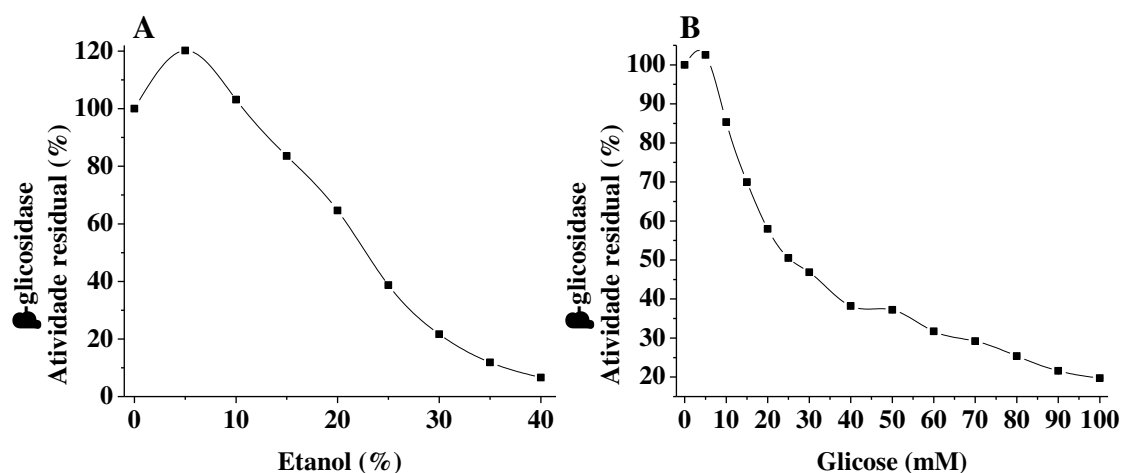
Em termos biotecnológicos, é de suma importância realizar estudos sobre a estabilidade térmica das enzimas, pois sua resistência sob condições de altas temperaturas e agentes desnaturantes é um dos critérios mais importantes para aplicação desses biocatalisadores em processos industriais. Frequentemente, diversos processos industriais são comprometidos pela inativação dessas macromoléculas, influenciando no rendimento final do produto desejado (BOKHARI et al., 2009).

3.2.3 Efeito de etanol e glicose sobre a atividade de β -glicosidase

A β -glicosidase produzida por *P. sanguineus* foi ativada pela presença de etanol na mistura de reação, alcançando 120% da atividade inicial na concentração de 5% de etanol, quando a concentração de etanol foi elevada para 20%, ainda manteve pouco mais de 60% de sua atividade original (Figura 7A).

Resultados similares sobre o aumento na atividade em concentração de 5 - 10% pode ser observado para β -glicosidase de diferentes espécies fúngicas (KRISCH et al., 2012; LEITE et al., 2008; MARQUES et al., 2018). De acordo com Villena et al. (2006) o aumento observado na atividade enzimática em baixas concentrações de etanol podem estar relacionado com a atividade de glicosiltransferase evidenciada para algumas β -glicosidasas. Nessa reação o etanol atua como acceptor preferencial do cátion glicosil intermediário durante a hidrólise do substrato, aumentando a velocidade da conversão do substrato à produto (KRISCH et al., 2012).

Figura 7 - Efeito do etanol (A) e glicose (B) sobre a atividade enzimática de β -glicosidase.



A β -glicosidase produzida por *P. sanguineus* foi fortemente inibida por glicose, retendo 50% de sua atividade original na concentração de 25 mM de glicose (Fig. 7B). Segundo Kuusk e Valjamae (2017) no processo de hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica para açúcares fermentescíveis, uma consequência inevitável é o acúmulo de produtos de hidrólise, o que resultaria na inibição de celulases. Uma alternativa para transpor o efeito inibidor da glicose sobre a atividade enzimática seria associar a hidrólise enzimática da celulose a uma fermentação alcoólica, em um processo intitulado sacarificação e fermentação simultânea, no qual a glicose liberada pela hidrólise da celulose é prontamente convertida em etanol (PEREIRA et al., 2016). Por outro lado, as enzimas utilizadas nesse tipo de processo devem ser estáveis à presença do etanol.

Considerando que em processos fermentativos realizados por *Saccharomyces cerevisiae* são afetados em concentrações a partir de 8% de etanol, sendo sua produção gradativamente reduzida (LALUCE et al., 2009), é possível inferir que a β -glicosidase produzida por *P. sanguineus* apresenta estabilidade suficiente para ser utilizada em processos de sacarificação e fermentação simultâneas.

4. CONCLUSÃO

O fungo basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus* apresentou capacidade para produção de endoglucanase e β -glicosidase, e reduzido potencial para produção de xilanase, principalmente quando realizado o cultivo em estado sólido utilizando resíduo agroindustrial farelo de trigo como substrato de baixo custo.

As enzimas produzidas apresentaram valores de pH ótimo mais ácidos e temperaturas ótimas elevadas que, somado à estabilidade estrutural em ampla faixa de pH e temperatura, tornam estas características interessantes para aplicação industrial.

A β -glicosidase se manteve estável em elevada concentração de etanol podendo ser aplicada em processos de sacarificação e fermentação simultânea.

5. REFERÊNCIAS

AHMED, S. A.; SALEH, S. A.; MOSTAFA, F. A.; EL ATY, A. A.; AMMAR, H. A. 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.; DASILVA, R. Screening and production study of microbial xylanase producers from brazilian cerrado. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 161, p. 333-346, 2010.

BENTIL J. A.; THYGESEN, A.; MENSAH, M.; LANGE, L.; MEYER, A. S. Cellulase production by white-rot basidiomycetous fungi: solid-state versus submerged cultivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 14, p. 5827-5839, 2018.

BOKHARI, S.; LATIF, F.; RAJOKA, M. Purification and characterization of xylanases from *Thermomyces lanuginosus* and its mutant derivative possessing novel kinetic and thermodynamic properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 493-502, 2009.

CARRANZA, T.; BALMFORD, A.; KAPOV, V.; MANICA, A. Protected area effectiveness in reducing conversion in a rapidly vanishing ecosystem: the Brazilian Cerrado. **Conservation Letters**, v. 7, n. 3, p. 216-223, 2014.

CASCIATORI, P. A. **Produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *Trichoderma reesei* e *Myceliophthora thermophila* e aplicação na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**. 2015. 96 f. Dissertação – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2015.

CAVALHEIRO, G. F.; SANGUINE, I. S.; SANTOS, F. R. S.; COSTA, A. C.; FERNANDES, M.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Catalytic properties of amylolytic enzymes produced by using agroindustrial residues on solid-state fermentation. **Biomed Research International**, v. 2017, p. 1-8, 2017.

COSTA, A. C.; CAVALHEIRO, G. F.; VIEIRA, E. R. Q.; GANDRA, J. R.; GOES, R. H. T. B.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Catalytic properties of xylanases produced by *Trichoderma piluliferum* and *Trichoderma viride* and their application as additives in bovine feeding. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, p. 101161, 2019.

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, n. 4, p. 1040-1048, 2016.

CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

DHILLON, G. S.; OBEROI, H. S.; KAUR, S.; BANSAL, S.; BRAR, S. K. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1160-1167, 2011.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARDZIANI, T.; AGATHOS, S. N. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 331-339, 2009.

ELISASHVILI, V.; PENNINGKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARDZIANI, T.; KVESITADZE, G. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solidstate fermentation of

lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 3, p. 457-462, 2008.

FACCHINI, F. D. A.; VICI, A. C.; REIS, V. R. A.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; REIS, R. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* C03 using agro-industrial residues with potential application as additives in animal feed. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 347-355, 2011.

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.

FRANÇOSO, R. D.; BRANDÃO, R.; NOGUEIRA, C. C.; SALMONA, Y. B.; MACHADO, R. B.; COLLI, G. R. Habitat loss and the effectiveness of protected areas in the Cerrado Biodiversity Hotspot. **Natureza & Conservação**, v. 1, n. 1, p. 35-40, 2015.

GARCIA, N. F. L.; SANTOS, F. R. S.; GONCALVES, F. A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production of β -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 314-319, 2015.

GARCIA, N. F. L.; SANTOS, F. R. S.; BOCCHINI, D. A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Catalytic properties of cellulases and hemicellulases produced by *Lichtheimia ramosa*: Potential for sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 49-56, 2018.

GAO, N.; LIU, C. X.; XU, Q. M.; CHENG, J. S.; YUAN, Y. J. 2017. Simultaneous removal of ciprofloxacin, norfloxacin, sulfamethoxazole by co-producing oxidative enzymes system of *Phanerochaete chrysosporium* and *Pycnoporus sanguineus*. **Chemosphere**, v. 195, p. 146-155, 2017.

GAUNA, A.; LARRAN, A. S.; PEROTTI, V. E.; FELDMAN, S. R.; PERMINGEAT, H. R. Fungal pretreatments improve the efficiency of saccharification of *Panicum prionitis* Ness biomass. **Biofuels**, v. 7269, p. 1-7, 2018.

GOVUMONI, S. P.; GENTELA, J.; KOTI, S.; HARAGOPAL, V.; VENKATESHWAR, S.; RAO, L. V. Extracellular lignocellulolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* (MTCC 787) under solid-state fermentation of agro wastes. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 10, p. 700-10, 2015.

HANSEN, G. H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J. C.; LÜBECK, P. S.; ANDERSEN, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1327-1341, 2015.

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, n. 1, p. 279-286, 2014.

KONNO, C. T.; HELM, C. V.; BACHMANN, V. Produção de celulasas em farelos de trigo e arroz e grão de trigo por *Lentinula edodes*. In: **Embrapa Florestas-Resumo em anais de congresso**. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 11., 2012, Colombo. Anais. Colombo: Embrapa Florestas, 2012.

- KRISCH, J.; BENCSIK, O.; PAPP, T.; VÁGVÖLGYI, C.; TAKÓ, M. Characterization of a β -glucosidase with transgalactosylation capacity from the zygomycete *Rhizomucor miehei*. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 555-560, 2012.
- KUUSK, S.; VÄLJAMÄE, P. When substrate inhibits and inhibitor activates: implications of β -glucosidases. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 7, 2017.
- LALUCE, C.; TOGNOLLI, J. O.; DE OLIVEIRA, K. F.; SOUZA, C. S.; MORAIS, M. R. Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 4, p. 627-637, 2009.
- LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E.; SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391-395, 2008.
- LIAO, H.; ZHENG, H.; LI, S.; WEI, Z.; MEI, X.; MA, H.; ...XU, Y. Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Scientific Reports**, v. 5, p. 12631, 2015.
- MARQUES, N. P.; DE CASSIA PEREIRA, J.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; ARAÚJO, A. R.; FERREIRA, H.; RODRIGUES, A.; DUSSÁN, K. J.; BOCCHINI, D. A. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 66-75, 2018.
- MARTINS, E. D. S.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; JUNIOR, R. B. Production of cellulases by *Thermomucor indicae-seudaticae*: characterization of a thermophilic β -glucosidase. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 8, p. 830-836, 2019.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- NIGAM, P. S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. **Biomolecules**, v. 3, n. 3, p. 597-611, 2013.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.
- OLAJUYIGBE, F. M.; OGUNYEW, 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.; 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.
- PEREIRA, J.; DE, C.; TRAVAINI, R.; MARQUES, N. P.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S.; MARTINS, D. A. B. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 122-129, 2016.

- SANTOS, F. R. S.; GARCIA, N. F. L.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production and characterization of β -glucosidase from *Gongronella butleri* by solid-state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 16, p. 633-641, 2016a.
- SANTOS, J. A.; VIEIRA, J. M.; VIDEIRA, A.; MEIRELLES, L. A.; RODRIGUES, A.; TANIWAKI, M. H.; SETTE, L. D. Marine-derived fungus *Aspergillus cf. tubingensis* LAMAI 31: a new genetic resource for xylanase production. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 25, 2016b.
- TEIXEIRA, V. D. C. S.; SOUZA, A. L. C.; CARVALHO, R. S.; BERTOLDI, M. S. N.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Effect of pH, temperature, and chemicals on the endoglucanases and β -glucosidases from the thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica* F. 2.1. 4. obtained by solid-state and submerged cultivation. **Biochemistry Research International**, v. 2016, 2016.
- VILLENA, M. A.; IRANZO, J. F.; GUNDLLAPALLI, S. B.; OTERO, R. R. C.; PÉREZ, A. I. B. Characterization of an exocellular β -glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 229-234, 2006.
- YAHAYA, Y. A.; DON, M. M. *Pycnoporus sanguineus* potential biosorbent for heavy metal removal from aqueous solution: a review. **Journal of Physical Science**, v. 25, p. 1-32, 2014.
- YOON, L. W.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Simultaneous production of cellulase and reducing sugar through modification of compositional and structural characteristic of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, p. 250–256, 2013.
- YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass & Bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.