



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

Campus de São José do Rio Preto

Emanuella Roberto Ribeiro

**Investigação de enzimas despolimerizantes da biomassa vegetal secretadas pela  
levedura *Aureobasidium leucospermi* LB86 em cultivo sólido**

São José do Rio Preto – SP

2024

Emanuella Roberto Ribeiro

**Investigação de enzimas despolimerizantes da biomassa vegetal secretadas pela  
levedura *Aureobasidium leucospermi* LB86 em cultivo sólido**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eleni Gomes

São José do Rio Preto – SP

2024

R484i      Ribeiro, Emanuella Roberto

Investigação de enzimas despolimerizantes da biomassa vegetal secretadas pela levedura *Aureobasidium leucospermi* LB86 em cultivo sólido / Emanuella Roberto Ribeiro. -- São José do Rio Preto, 2024

84 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Ronivaldo Rodrigues Da Silva  
Coorientadora: Eleni Gomes

1. Bioprocesso. 2. Fermentação. 3. Fungos. 4. Hidrolases. 5. Subprodutos agroindustrial.

Emanuella Roberto Ribeiro

**Investigação de enzimas despolicimerizantes da biomassa vegetal secretadas pela  
levedura *Aureobasidium leucospermi* LB86 em cultivo sólido**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

**Comissão Examinadora**

Prof. Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisângela de Souza Miranda Muynarsk

Instituto de Biociências / Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Diego Alves Monteiro

Matrix LCMS - Suporte Técnico e Científico em Cromatografia e Espectrometria de Massas

São José do Rio Preto

27 de Fevereiro de 2024

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer e dedicar esta dissertação:

Primeiramente à Deus, pelo dom da vida e ter permitido que tudo isso acontecesse;

À minha família, minha mãe Adriana, meu pai José e minha irmã Rafaela, que me incentivaram a cada momento e me proporcionaram o suporte necessário para não desistir;

Ao meu orientador, Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva, que durante todo o período do projeto me acompanhou pontualmente, dando todo auxílio necessário e, além disso, possibilitou através de seus ensinamentos que eu pudesse estar concluindo este trabalho;

Aos meus amigos, que tenho como irmãos, Rafael e Cíntia, que além de me ajudaram e compartilharem seus conhecimentos, também tornaram todo o processo do mestrado mais “leve” e melhor;

Ao Ibilce e ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – Ibilce/Unesp, pela infraestrutura cedida para o desenvolvimento do trabalho;

À todos os integrantes do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – Ibilce/Unesp, pela parceria e colaboração em tudo que foi necessário;

Aos membros da banca de qualificação e defesa, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Heloiza Ferreira Alves do Prado, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisângela de Souza Miranda Muynarsk e Dr. Diego Alves Monteiro. Agradeço todos por aceitarem a participar da minha banca e por fazerem contribuições para a melhoria do meu trabalho;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

## RESUMO

No Brasil, avanços em tecnologias sustentáveis e em bioeconomia para a obtenção de produtos com maior valor agregado, como enzimas, são favorecidos pela disponibilidade e variedade de matéria-prima renovável (subprodutos agroindustriais), tais como o farelo de trigo. No presente estudo, propomos investigar a produção de hidrolases, como endoglucanase, xilanase,  $\beta$ -glicosidase,  $\beta$ -xilosidase e protease, secretadas pela levedura *Aureobasidium leucospermi* LB86 em cultivo sólido (CES), utilizando o farelo de trigo como substrato. Em seguida, conduzir estudos de caracterização bioquímica funcional, para determinar a influência de variados agentes físico-químicos. Com relação à influência do pH na atividade enzimática, foi observado perfis similares para xilanase,  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase, com maior atividade estimada na faixa de pH 6,0. Para endoglucanase e protease, detectamos maior atividade em pH 5,0 e 9,0, respectivamente. Quanto à influência de temperatura na atividade das enzimas, notamos maior atividade, para endoglucanase e xilanase, a 50°C; para  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase, a 40°C; e para protease, a 45°C. Quanto à estabilidade térmica, notamos atividades remanescentes para endoglucanase e xilanase acima de 60% até 50 e 55°C, respectivamente. Para  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase, ambas as enzimas não exibiram redução da atividade até 40°C, com uma queda acentuada a partir de 45°C. Em relação à protease, a atividade se manteve acima de 80% até 50°C. Em incubação com inibidores, a atividade proteolítica foi reduzida cerca de 83% na presença de PMSF, indicando assim a presença de serino protease no extrato fermentativo. Na presença de diferentes íons metálicos, houve maior aumento nas atividades de endoglucanase e xilanase quando adicionado  $MnCl_2$ . Para  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase,  $CdCl_2$  aumentou significativamente as atividades das enzimas. Para a peptidase, os sais  $CoCl_2$  e o  $CdCl_2$ , foram os que mais aumentaram a atividade enzimática. No estudo sobre o efeito dos compostos derivados do pré-tratamento da biomassa vegetal, de todas as enzimas avaliadas, apenas as atividade de endoglucanase e xilanase foram detectadas em incubação com todos os compostos separadamente. Na presença do etanol 10%, a atividade de  $\beta$ -glicosidase foi a única que se manteve estável, mas foi reduzida na presença de D-Glicose com atividade remanescente de 60% a 0,5 M deste açúcar.

**Palavras-chave:** Bioprocesso. Fermentação. Fungos. Hidrolases. Subprodutos agroindustrial.

## ABSTRACT

In Brazil, advances in sustainable technologies and bioeconomy to obtain products with greater added value, such as enzymes, are favored by the availability and variety of renewable raw materials (agro-industrial by-products), such as wheat bran. In the present study, we propose to investigate the production of hydrolases, such as endoglucanase, xylanase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase and protease secreted by the yeast *Aureobasidium leucospermi* LB86 in solid cultivation (SSC), using wheat bran as substrate. Then, conduct functional biochemical characterization studies to determine the influence of various physicochemical agents. Regarding the influence of pH on enzyme activity, similar profiles were observed for xylanase,  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -xylosidase, where the highest activity was estimated in the pH range 6.0. For endoglucanase and protease, we detected greater activity at pH 5.0 and 9.0, respectively. As for the influence of temperature on enzyme activity, we noted for endoglucanase and xylanase, at 50°C; for  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -xylosidase, at 40°C; and for protease, at 45°C. Regarding thermal stability, we noticed remaining activities for endoglucanase and xylanase above 60% up to 50 and 55°C, respectively. For  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -xylosidase, both enzymes did not show a reduction in activity up to 40°C, showing a sharp drop from 45°C onwards. Regarding protease, the activity remained above 80% up to 50°C. In incubation with inhibitors, proteolytic activity was reduced by approximately 83% in the presence of PMSF, thus indicating the presence of serine protease in the fermentative extract. In the presence of different metal ions, there was a greater increase in endoglucanase and xylanase activities when  $\text{MnCl}_2$  was added. For  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -xylosidase,  $\text{CdCl}_2$  salt significantly increased the enzyme activities. In proteolytic activity, the salts  $\text{CoCl}_2$  and  $\text{CdCl}_2$  were those that most increased activity. In the study on the effect of compounds derived from the pretreatment of plant biomass, of all the enzymes evaluated, only endoglucanase and xylanase activities were detected in the presence of all compounds. In the presence of 10% ethanol,  $\beta$ -glucosidase activity is the only one that remains stable in the presence of ethanol. In the presence of 10% ethanol,  $\beta$ -glucosidase activity was the only one that remained stable, but was reduced in the presence of D-Glucose with a remaining activity of 60% at 0.5 M of this sugar.

**Keywords:** Bioprocess. Fermentation. Fungi. Hydrolases. Agro-industrial by-products.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura da biomassa lignocelulósica .....	17
<b>Figura 2.</b> Estrutura repetitiva da molécula de celulose.....	18
<b>Figura 3.</b> As diferentes formas de distribuição da celulose. A: celulose cristalina está no centro da microfibrila sendo envolta pela região amorfa. B: as regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal .....	19
<b>Figura 4.</b> Estrutura de monossacarídeos que formam as hemiceluloses .....	20
<b>Figura 5.</b> Precursores primários na formação da lignina.....	21
<b>Figura 6.</b> Esquema da estrutura do grão de trigo com suas principais divisões morfológicas .....	22
<b>Figura 7.</b> Sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e $\beta$ -glicosidases na despolimerização da celulose .....	28
<b>Figura 8.</b> Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana: acetilxilana esterase, $\alpha$ -glucuronidase, endoxilanaase, $\alpha$ -L-arabionofuranosidase e $\beta$ -xilosidase .....	30
<b>Figura 9.</b> Modo geral de ação das exopeptidases e endopeptidases .....	32
<b>Figura 10.</b> Células da levedura <i>Aureobasidium leucospermi</i> , exemplo de espécie pertencente ao género <i>Aureobasidium</i> . Visualização em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes.....	34
<b>Figura 11.</b> Produção de xilanase e endoglucanase pela levedura <i>A. leucospermi</i> LB86 ao longo do CES com farelo de trigo como substrato. As linhas em preto e vermelho referem-se a atividade enzimática de xilanase e endoglucanase, respectivamente .....	43
<b>Figura 12.</b> Produção de $\beta$ -xilosidase e $\beta$ -glicosidase pela levedura <i>A. leucospermi</i> LB86 ao longo do CES com farelo de trigo como substrato. As linhas em preto e vermelho referem-se a atividade enzimática de $\beta$ -xilosidase e $\beta$ -glicosidase, respectivamente ....	44
<b>Figura 13.</b> Produção de protease pela levedura <i>A. leucospermi</i> LB86 ao longo do CES com farelo de trigo como substrato .....	44
<b>Figura 14.</b> Efeito do pH na atividade de endoglucanase secretada por <i>A. leucospermi</i> LB86. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes .....	46
<b>Figura 15.</b> Efeito do pH na atividade de xilanase secretada por <i>A. leucospermi</i> LB86. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes .....	47
<b>Figura 16.</b> Efeito do pH na atividade de $\beta$ -glicosidase secretada por <i>A. leucospermi</i> LB86. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes .....	48

<b>Figura 17.</b> Efeito do pH na atividade de $\beta$ -xilosidase secretada por <i>A. leucospermi</i> LB86. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes .....	49
<b>Figura 18.</b> Efeito do pH na atividade de protease secretada por <i>A. leucospermi</i> LB86. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes .....	50
<b>Figura 19.</b> Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da endoglucanase secretada por <i>A. leucospermi</i> LB86. As linhas preta e vermelha no gráfico são referentes ao efeito da temperatura na atividade enzimática e ao efeito da temperatura na estabilidade da atividade enzimática, respectivamente. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes .....	51
<b>Figura 20.</b> Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da xilanase secretada por <i>A. leucospermi</i> LB86. As linhas preta e vermelha no gráfico são referentes ao efeito da temperatura na atividade enzimática e ao efeito da temperatura na estabilidade da atividade enzimática, respectivamente. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes .....	52
<b>Figura 21.</b> Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da $\beta$ -glicosidase secretada por <i>A. leucospermi</i> LB86. As linhas preta e vermelha no gráfico são referentes ao efeito da temperatura na atividade enzimática e ao efeito da temperatura na estabilidade da atividade enzimática, respectivamente. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes .....	53
<b>Figura 22.</b> Efeito da temperatura na atividade e estabilidade de $\beta$ -xilosidase secretada por <i>A. leucospermi</i> LB86. As linhas preta e vermelha no gráfico são referentes ao efeito da temperatura na atividade enzimática e ao efeito da temperatura na estabilidade da atividade enzimática, respectivamente. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes .....	54
<b>Figura 23.</b> Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease secretada por <i>A. leucospermi</i> LB86. As linhas preta e vermelha no gráfico são referentes ao efeito da temperatura na atividade enzimática e ao efeito da temperatura na estabilidade da atividade enzimática, respectivamente. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes .....	55
<b>Figura 24.</b> Efeito dos açúcares D-Glicose, L-Arabinose e D-Xilose nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 M na atividade de $\beta$ -glicosidase secretada por <i>A. leucospermi</i> LB86. As linhas vermelha, preta e azul se referem ao efeito de D-Glicose, L-Arabinose	

e D-Xilose, respectivamente, nas atividades das enzimas. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes..... 61

**Figura 25.** Efeito dos açúcares D-Glicose, L-Arabinose e D-Xilose nas concentrações finais de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 M na atividade de  $\beta$ -xilosidase secretada por *A. leucospermi* LB86. As linhas vermelha, preta e azul se referem ao efeito de D-Glicose, L-Arabinose e D-Xilose, respectivamente, nas atividades das enzimas. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes ..... 63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Exemplo de enzimas envolvidas na degradação da lignocelulose.....	25
<b>Tabela 2.</b> Efeito de inibidores na atividade da protease secretada por <i>A. leucospermi</i> LB86. Os dados estão expressos em atividade relativa, sendo que o ensaio controle (sem adição de inibidores) corresponde a 100% de atividade. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes.....	56
<b>Tabela 3.</b> Efeito de íons sobre a atividade das enzimas secretadas por <i>A. leucospermi</i> LB86. Os dados estão expressos em atividade relativa, sendo que o ensaio controle (sem adição de íons) corresponde a 100% de atividade. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes .....	57
<b>Tabela 4.</b> Efeito de compostos derivados do pré-tratamento da biomassa vegetal sobre a atividade das enzimas secretadas por <i>A. leucospermi</i> LB86. Os dados estão expressos em atividade relativa, sendo que o ensaio controle (sem adição de compostos inibidores) corresponde a 100% de atividade. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes.....	58
<b>Tabela 5.</b> Efeito do etanol 10% sobre a atividade das enzimas secretada por <i>A. leucospermi</i> LB86. Os dados estão expressos em atividade relativa, sendo que o ensaio controle (sem adição de etanol) corresponde a 100% de atividade. Etanol <sup>1</sup> refere-se ao ensaio em faixa de pH ótimo de cada enzima, e Etanol <sup>2</sup> ao ensaio em pH 5,0. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes .....	60
<b>Tabela 6.</b> Capacidade de hidrólise de diferentes substratos pelo extrato obtido por bioprocessamento em estado sólido pela levedura <i>A. leucospermi</i> LB86. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes .....	64

## ABREVIACOES UTILIZADAS

AIA – cido Iodo Acético

CES - Cultivo em estado slido

DNS - 3 5-dinitrosalicylic acid (cido 3,5-dinitrosalicílico)

EDTA - *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (cido etilenodiamino tetra-acético)

FES - Fermentaco em estado slido

FSm - Fermentaco submersa

HMF – 5-hidroximetilfurfural

NEM - N-etilmaleimida

PMSF - *Phenylmethylsulfonyl Fluoride* (Fluoreto de fenil-metil-sulfonila)

*p*NPG - *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo

*p*NPX - *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilanopiranosdeo

TCA - *Trichloroacetic acid* (cido tricloroacético)

U/mL - Unidade de Atividade/mL

YEPD - *Yeast Extract, Peptone, Dextrose* (Extrato de levedura, Peptona, Dextrose)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
2.1 Biomassa lignocelulósica .....	16
2.1.1 Celulose .....	17
2.1.2 Hemicelulose .....	19
2.1.3 Lignina.....	20
2.2 Farelo de trigo.....	21
2.3 Enzimas .....	23
2.4 Hidrólise enzimática da biomassa vegetal e fungos lignocelulolíticos .....	24
2.4.1 Celulases.....	27
2.4.2 Hemicelulases .....	29
2.4.3 Proteases .....	31
2.5 Cultivo de microrganismos em substrato sólido.....	32
2.6 <i>Aureobasidium</i> spp. ....	33
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	35
3.1 Objetivos gerais .....	35
3.2 Objetivos específicos .....	35
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
4.1 Pré-inóculo para o CES .....	36
4.2 Produção das enzimas por cultivo em estado sólido (CES) .....	36
4.3 Determinação das atividades enzimáticas .....	36
4.3.1 Endoglucanase .....	36
4.3.2 Xilanase .....	37
4.3.3 $\beta$ -glicosidase .....	37
4.3.4 $\beta$ -xilosidase.....	38
4.3.5 Protease.....	38
4.4 Determinação das propriedades bioquímicas das enzimas.....	38
4.4.1 Concentração do extrato fermentativo.....	38
4.4.2 Efeito do pH sobre a atividade das enzimas .....	38
4.4.3 Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas .....	39
4.4.5 Efeito da temperatura na estabilidade das enzimas .....	39
4.4.6 Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica .....	39
4.4.7 Efeito de íons sobre as atividades enzimáticas .....	39

4.4.8 Efeito de compostos derivados do pré-tratamento da biomassa vegetal sobre as atividades enzimáticas .....	40
4.4.9 Efeito de etanol sobre as atividades enzimáticas.....	40
4.5 Efeito de açúcares sobre as atividade enzimáticas .....	40
4.5.1 Hidrólise de diferentes substratos.....	40
4.5.2 Produção e quantificação de etanol .....	41
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
5.1 Avaliação do crescimento e presença de hidrolases no extrato do CES da levedura <i>Aureobasidium leucospermi</i> LB86 em farelo de trigo .....	43
5.2 Efeito de pH na atividade das enzimas secretadas por <i>Aureobasidium leucospermi</i> LB86.....	45
5.3 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas secretadas por <i>Aureobasidium leucospermi</i> LB86 .....	51
5.4 Efeito dos inibidores na atividade da proteolítica .....	55
5.5 Efeito dos íons nas atividades enzimáticas.....	56
5.6 Efeitos dos compostos derivados do pré-tratamento da biomassa vegetal nas atividades enzimáticas .....	58
5.7 Efeito do etanol nas atividades enzimáticas .....	60
5.8 Efeito de açúcares nas atividades de $\beta$ -glicosidase e $\beta$ -xilosidase .....	61
5.9 Hidrólise de diferentes substratos.....	64
6.0 Produção e quantificação de etanol .....	65
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Na biotecnologia, opções sustentáveis a fim de melhorar ou inovar processos biológicos convencionais são muito requeridas. Juntamente a esse propósito, o esgotamento dos combustíveis fósseis vem contribuindo para o aumento da procura de fontes de energias renováveis e sustentáveis que possam substituí-los (Srivastava *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2019).

A hidrólise enzimática de polissacarídeos da biomassa vegetal com propósito a liberação de açúcares como glicose e xilose, e suas conversões a biocombustíveis, é uma alternativa para atender a demanda bioenergética. Para tanto, enzimas celulolíticas e xilanotíficas capazes de hidrolisar celulose e hemicelulose do material vegetal são essenciais e podem ser prospectadas via cultivo microbiano em meio contendo subprodutos agroindustriais (Alcides *et al.*, 2020).

Pelo fato de enzimas apresentarem uma alta especificidade ao substrato, atividade em condições brandas de temperatura e pH e irem de encontro aos padrões definidos pela química verde, a sua utilização em processos industriais são preferíveis a catalisadores químicos (Souza *et al.*, 2017; Morshed *et al.*, 2021).

Algumas características fazem com que as enzimas de origem microbiana tenham maior procura para aplicação industrial, como a diversidade de espécies, versatilidade para crescer em diferentes condições de temperatura e pH, facilidade no isolamento e manipulação genética, período curto para cultivo e baixo-custo de produção quando comparado a enzimas de origem animal e vegetal (Gopinath *et al.*, 2017). Neste cenário, os fungos se destacam como excelentes produtores de enzimas, capazes de crescer em diferentes substratos agrícolas e secretarem uma variedade de enzimas lignocelulolíticas. Entretanto, a maioria das investigações com estes microrganismos tem priorizado os fungos filamentosos, com escassos trabalhos envolvendo enzimas de leveduras (Orlandelli *et al.*, 2012).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a produção de enzimas despolimerizantes da biomassa vegetal, como endoglucanase, xilanase,  $\beta$ -glicosidase,  $\beta$ -xilosidase e protease, pela levedura *Aureobasidium leucospermi* LB86, cultivada em meio sólido contendo farelo de trigo como substrato.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biomassa lignocelulósica

O crescimento populacional juntamente com o desenvolvimento da sociedade são fatores que impactam diretamente em um maior consumo de alimentos, produtos industrializados e energia, sobrecarregando assim as reservas naturais existentes no planeta. Os esforços para que haja a diminuição na utilização de combustíveis fósseis, que são fontes não renováveis e que vem aumentando a emissão de gases de efeito estufa (GEE), estão cada vez maiores por esse motivo. Como uma alternativa aos combustíveis fósseis, a busca por opções que colaborem para um menor impacto ambiental e melhora na qualidade de vida, como matérias primas renováveis, são investigadas para atender a demanda da população mundial (Choudhary *et al.*, 2017; Aguiar *et al.*, 2021).

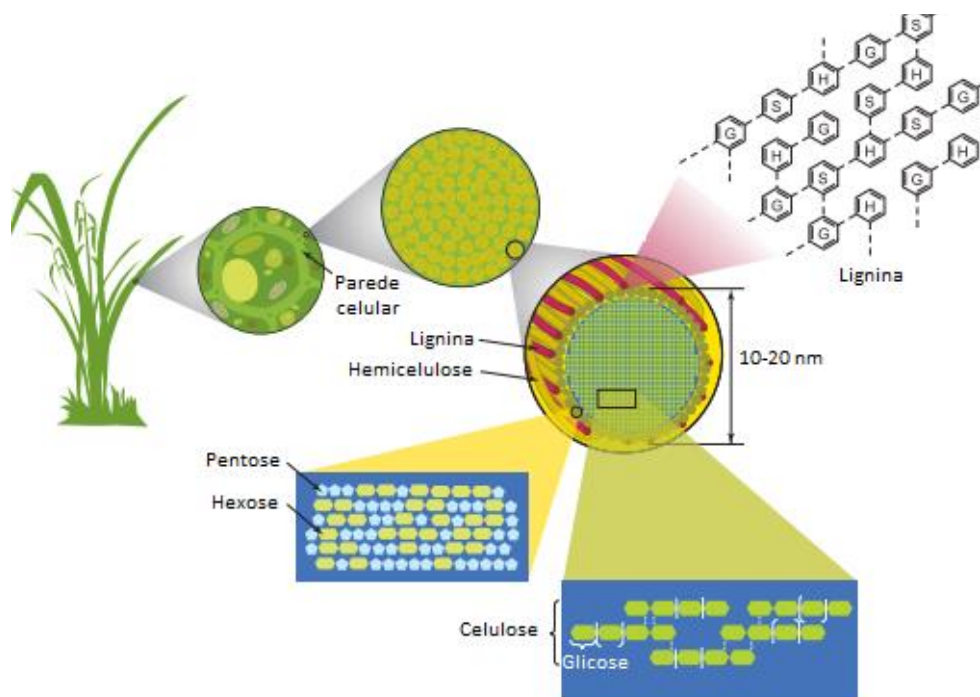
Considerando a necessidade de abordagens mais sustentáveis, uma opção bastante atrativa para a obtenção de uma variedade de produtos é a biomassa lignocelulósica (Okolie *et al.*, 2021). Os biopolímeros lignocelulósicos estão presentes em mais de 90% do peso seco de uma célula vegetal e são uma fonte rica em carbono orgânico renovável. A parede celular desse material é composta por três principais frações poliméricas (Figura 1), sendo elas a celulose, a hemicelulose e a lignina, onde a quantidade de cada polímero pode variar de acordo com a família, espécie e localização nas plantas (Rytioja *et al.*, 2014).

Essa biomassa lignocelulósica pode ser obtida principalmente através de atividades agrícolas e agroindustriais, o que torna a utilização desse material ainda mais viável, uma vez que o Brasil se destaca como um dos países com maior atividade agrícola no mundo, o que, conseqüentemente, torna o país também um dos maiores produtores de subprodutos agroindustriais, sendo a maioria de natureza vegetal (Ricardino *et al.*, 2020). Com isso, o aproveitamento desses subprodutos faz com seja minimizado os impactos ambientais que seriam causados pelo descarte incorreto no ambiente e, além disso, tornam esses subprodutos matérias-primas para a produção dos mais variados produtos com valor agregado (Prakash *et al.*, 2019).

Através do aproveitamento do bagaço de cana de açúcar, colmos de milho, farelos de trigo, de soja e algodão, que são exemplos dos principais subprodutos lignocelulósicos gerados no país, é possível a produção de biocombustíveis, ácidos orgânicos, triacilgliceróis, enzimas e outras biomoléculas (Marzo *et al.*, 2019). Todos esses subprodutos, devido ao seu alto valor nutritivo, facilitam o crescimento

microbiano e podem ser utilizados como substratos para diferentes estratégias de fermentação para a obtenção desses produtos, onde a fermentação em estado sólido (FES) fica em evidência (Sadh; Duhan; Duhan, 2018; Nnolim; Okoh; Nwodo, 2020).

**Figura 1.** Estrutura da biomassa lignocelulósica



**Fonte:** Adaptado de Rubin, 2008

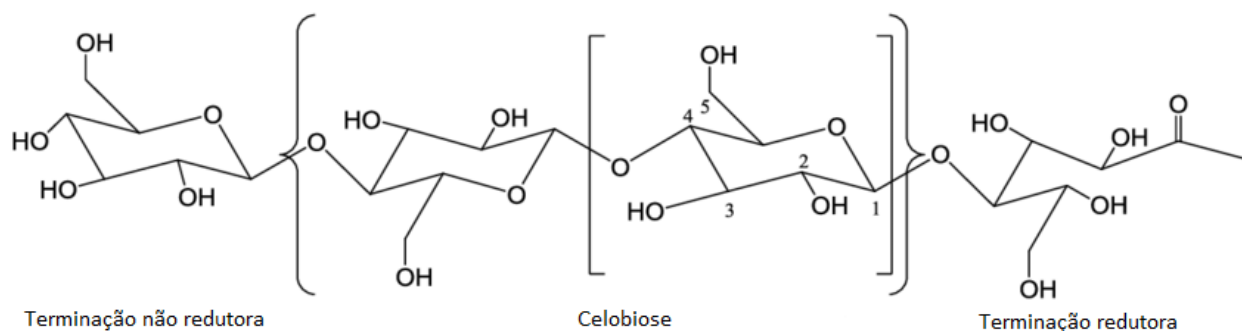
### 2.1.1 Celulose

Se destacando como o polímero mais abundante encontrado na natureza e também como principal constituinte presente na parede celular dos materiais lignocelulósicos, a celulose é um homopolissacarídeo linear e não ramificado constituído de milhares de subunidades de D-glicose unidas por ligações do tipo  $\beta$ -1,4 glicosídicas (Figura 2). As milhares de subunidades de D-glicose formam longas cadeias celulósicas que são unidas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, e forças de *van der Waals*, onde toda essa associação formam as fibrilas, que por sua vez, se organizam e formam as fibras de celulose (Prasad *et al.*, 2019).

A estrutura da fibra vegetal da celulose se alterna em regiões conhecidas como cristalinas e amorfas (Figura 3). A parte cristalina, correspondente entre 40 a 70% da celulose encontrada na parede celular vegetal, é uma região altamente compacta com suas cadeias de celulose orientadas de forma paralela e fortemente ligadas por ligações de hidrogênio e interações de *van der Waals*. Essas características fazem com que essa

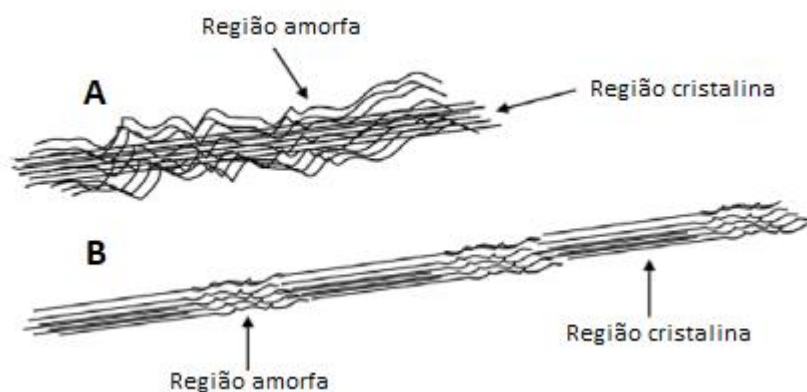
região seja mais resistente a produtos químicos, solventes e hidrólise enzimática (Zhang *et al.*, 2006; Wada *et al.*, 2010). Em contrapartida a esse alto grau de cristalinidade, a região amorfa se caracteriza por ter um menor grau de ordenação e compactação, o que faz com que essa região possua um maior distanciamento entre as cadeias e, conseqüentemente, seja mais flexível e suscetível a ação de hidrolisantes químicos e degradação enzimática (Guimarães *et al.*, 2013).

**Figura 2.** Estrutura repetitiva da molécula de celulose



**Fonte:** Adaptado de Cordeiro, 2016

**Figura 3.** As diferentes formas de distribuição da celulose. A: celulose cristalina está no centro da microfibrila sendo envolta pela região amorfa. B: as regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal



**Fonte:** Adaptado de Andersen, 2007

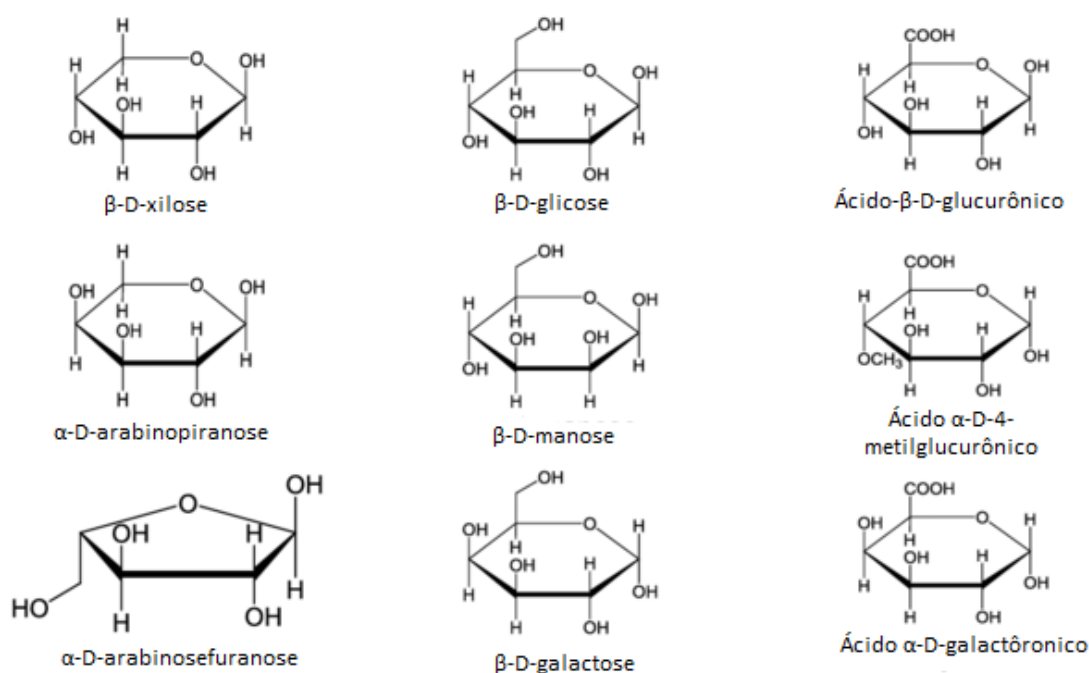
### 2.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose, ao contrário da celulose, que é constituída apenas por moléculas de glicose, é um heteropolissacarídeo de cadeia ramificada composto por várias unidades de açúcares diferentes, na qual sua natureza química varia de acordo com o tecido, estágio de desenvolvimento, bem como as espécies de plantas. Representa de 15 a 35% da biomassa vegetal e apresenta como principal função fornecer a ligação entre a celulose e a lignina (Gírio *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2019). Na sua maioria, este polímero heterogêneo é constituído por açúcares simples, como pentoses (D-xilose e L-arabinose) e hexoses (D-manose, D-glicose e D-galactose), e também por açúcares complexos (Figura 4), como os ácidos urônicos (D-ácido glucurônico, ácido D-galacturônico e o 4-O-metil-glucurônico) (Saha, 2003; Adsul *et al.*, 2011).

Devido a sua complexidade, os polímeros de hemicelulose são classificados de acordo com o açúcar encontrado em maior quantidade na sua cadeia principal e na ramificação lateral, sendo a xilana o tipo de hemicelulose mais frequente em plantas (Soccol *et al.*, 2019). A xilana é um polímero de unidades de D- xilose unidas por ligações  $\beta$  (1,4). Esse polímero possui capacidade de manter ligações com outros polissacarídeos por meio de ligações laterais, podendo assim ser agrupada nas seguintes classes: homoxilanas, glucuronoxilanas, arabinoglucuronoxilanas, arabinoxilanas e glucuronoarabinoxilanas (Scheller; Ulvskov, 2010).

Como possui uma variedade de açúcares e ligações químicas em uma mesma cadeia, para que ocorra a hidrólise enzimática completa da hemicelulose, é necessário a ação de diferentes tipos de enzimas, entretanto, quando comparado com a celulose, sua degradação é mais fácil (Agger *et al.*, 2010; Alvarez *et al.*, 2016). Essa facilidade se deve a estrutura amorfa e o menor grau de polimerização da hemicelulose em relação a celulose, o que acaba fazendo com que esse heteropolissacarídeo apresente uma baixa estabilidade química e térmica (Saha; Cotta, 2007).

**Figura 4.** Estrutura de monossacarídeos que formam as hemiceluloses



**Fonte:** Adaptado de Cordeiro, 2016

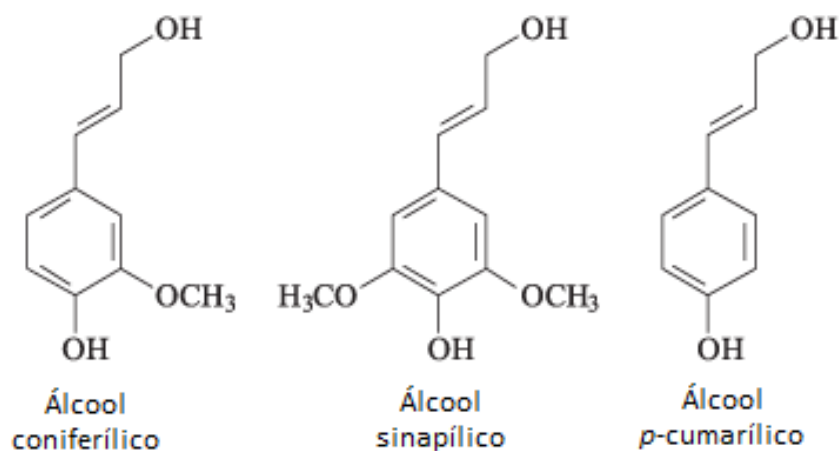
### 2.1.3 Lignina

A lignina, o principal componente não-carboidrato da biomassa vegetal, é um polímero aromático amorfo heterogêneo, que apresenta uma estrutura complexa formada pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool coniferílico (guaiacil propanol), álcool cumarílico (p-hidroxifenil propanol) e álcool sinapílico (siringil propanol) (Figura 5). Esse polímero polifenólico é covalentemente ligado aos grupos laterais em variadas hemiceluloses, formando uma matriz complexa envolvendo as microfibrilas de celulose (Agrawal *et al.*, 2021).

Correspondendo entre 18 a 34% do peso seco da biomassa lignocelulósica, a lignina tem como principal função biológica fornecer rigidez e proteção ao tecido vegetal, podendo agir como antioxidante e impedindo a degradação enzimática, assim, sendo um importante componente no que diz respeito a resistência a ataques biológicos. Essa proteção a ataques biológicos, principalmente contra microrganismos celulolíticos, é devido às fortes ligações carbono-carbono (C-C) e éter (C-O-C) encontrados na lignina (Filho *et al.*, 2008).

Devido a sua estrutura complexa, que dificulta o acesso de muitas enzimas aos outros constituintes da biomassa de origem vegetal, quando há intuito de hidrolisar materiais lignocelulósicos, a lignina é um composto indesejável, que normalmente é eliminado usando pré-tratamentos químicos. Além disso, enzimas pertencentes ao grupo das celulasas, podem ser ligadas de forma irreversível à lignina, fazendo com que seja necessária uma maior quantidade de enzima para hidrólise, podendo dificultar também a recuperação dessas enzimas após sua ação (Filho *et al.*, 2008).

**Figura 5.** Precursores primários na formação da lignina



**Fonte:** Adaptado de Barbosa *et al.*, 2008

## 2.2 Farelo de trigo

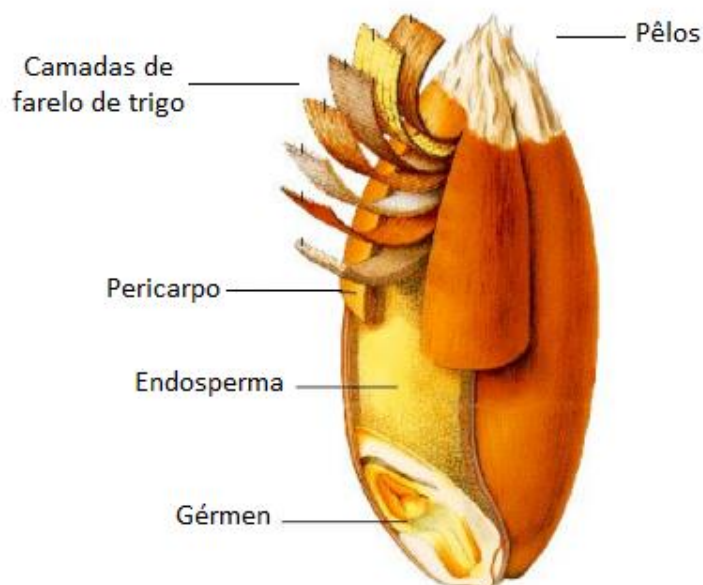
Sendo uma das gramíneas mais cultivadas no mundo, o trigo (*Triticum aestivum*) é um alimento básico que se destaca na indústria alimentícia, onde é utilizado principalmente na produção de farinha, que por sua vez, é empregada no preparo de pães, biscoitos, macarrões, entre outros alimentos. A composição do trigo pode variar conforme as condições do solo e do clima de onde é plantado (Certrem, 2004).

Normalmente, o grão é composto por cerca de 70% de carboidratos e também por proteínas, ácidos graxos essenciais, vitaminas e fibras alimentares (Wynn *et al.*, 1979).

Mundialmente, cerca de 150 milhões de toneladas de trigo são produzidas todo ano (Alonso, 2018). No Brasil, o grão bate recorde de produção conforme o passar dos anos, onde possui área de mais de dois milhões de hectares destinada ao plantio. Ainda no país, o grão apresentou uma crescente produção nos últimos anos, de 6,3 em 2020, 7,7 em 2021 e 9,7 milhões de toneladas em 2022, com uma previsão de 9,8 milhões de toneladas do grão em 2023 (Conab, 2023).

As principais divisões morfológicas do grão de trigo são o pericarpo, endosperma e o gérmen, conforme representado na Figura 6. O pericarpo, também conhecido como casca, é a camada que dá origem ao farelo de trigo, que é uma grande fonte de fibras e minerais. O endosperma é a estrutura que armazena nutrientes utilizados na germinação. E por fim, o gérmen, que é encontrado mais internamente, é a estrutura mais nobre do trigo, sendo constituído de gorduras e lipídios (Bacha, 2006).

**Figura 6.** Esquema da estrutura do grão de trigo com suas principais divisões morfológicas



**Fonte:** Adaptado de Pinto (2010)

O farelo de trigo é um subproduto gerado em grande quantidade (cerca de 73-77%) após o processo de moagem do grão de trigo para a produção de farinha branca (Pruckler *et al.*, 2014; Mao *et al.*, 2020). Representa de 13 a 25% do peso seco do grão

processado (Germec; Turhan, 2019), onde essa taxa pode variar de acordo com o tipo de processo que for utilizado, o úmido ou seco (Onipe *et al.*, 2015). Sendo assim, grandes quantidades desse material é gerado.

Comumente, a destinação do farelo de trigo é para ração animal, com cuidados em relação ao seu valor nutricional, que por muitas vezes limita o uso na dieta de aves e ruminantes. Em sua maior parte, o subproduto é descartado ou queimado por conta do alto custo com transporte. Entretanto, a valorização desse material é favorável, seja para geração de energia ou na produção de biocombustíveis, principalmente das frações não comestíveis, como lignina, celulose e hemicelulose (Alonso, 2018). Além disso, devido a sua composição, o farelo pode ser utilizado como fonte para a produção de enzimas, como as pertencentes aos grupos de celulasas, hemicelulasas, ligninases e peptidases, através de processos fermentativos utilizando microrganismos (Castro, 2010; Scheuer *et al.*, 2011).

### **2.3 Enzimas**

As enzimas são as moléculas capazes de aumentar a velocidade de reações químicas e biológicas reduzindo a energia necessária para a ativação. Esses biocatalisadores são extraídos a partir de células, onde sua grande maioria apresenta natureza proteica, com exceção das ribozimas, um pequeno grupo de moléculas de RNA que também apresentam atividade catalítica (Ashkan *et al.*, 2021). De forma geral, as enzimas possuem uma alta especificidade e eficiência catalítica sobre seu substrato, além de atuarem em condições brandas de pH e temperatura (Xie *et al.*, 2022).

Além de serem elementos centrais em vias biossintéticas, síntese de diversos produtos e intermediários celulares e desempenharem papel relevante nos mais variados processos fisiológicos nos seres vivos, fora do *in vivo*, a utilização das enzimas na área industrial desperta bastante interesse (Katsimpouras; Stephanopoulos, 2021). No ano de 2019, o mercado global de enzimas industriais foi estimado em US\$2,4 bilhões e, segundo pesquisas, estima-se que possa chegar a 3,2 bilhões em 2025 (Zhang *et al.*, 2020). Dentre as classes de enzimas, na indústria, as hidrolases ocupam lugar de destaque, representando cerca de 75% do mercado total de enzimas (Kocaba *et al.*, 2022). São muito aplicadas na fabricação e processamento de alimentos e bebidas, biocombustíveis, detergentes, ração animal, produtos de consumo e farmacêuticos (Prasad; Roy, 2018).

A ampla utilização de enzimas na indústria se deve a suas características, já citadas, como alta especificidade e apresentação de atividade em condições brandas de temperatura e pH, além de serem naturais e seguras, sendo assim então, preferíveis a catálise química em processos industriais (Bilal; Iqbal, 2020; Fasim; More; More, 2021).

A grande maioria das enzimas industriais são obtidas a partir de microrganismos, onde aproximadamente 60% são produzidas a partir de fungos filamentosos, 24% de bactérias e 4% de leveduras, sendo os 10% restantes de fontes animais e vegetais. O destaque dos microrganismos em contraste com as plantas e os animais na produção de enzimas se deve aos altos rendimentos, reprodutibilidade, fácil otimização, crescimento exponencial e viabilidade econômica que os microrganismos apresentam (Fasim; More; More, 2021).

#### **2.4 Hidrólise enzimática da biomassa vegetal e fungos lignocelulolíticos**

Enzimas lignocelulolíticas têm muito destaque em relação a outros grupos devido à complexidade de sua composição e a abrangência de diversas enzimas e mecanismos (Liu *et al.*, 2013). As celulasas, hemicelulasas e ligninases são as principais enzimas responsáveis pela desconstrução dos polímeros de celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente (Chandra *et al.*, 2019). Tais enzimas podem ser agrupadas em diferentes famílias: polissacarídeo liases (PL), que são enzimas responsáveis pela clivagem das ligações glicosídicas por meio de reações de  $\beta$ -eliminação; glicosil hidrolases (GH), hidrolases que clivam as ligações glicosídicas; carboidrato esterases (CE), enzimas que degradam ligações do tipo éster que envolvem carboidratos; oxidases da lignina, e muitas outras, com base no banco de dados *Carbohydrate Active Enzymes* (CAZy), como observado na Tabela 1 (Cantarel *et al.*, 2009; Lombard *et al.*, 2014).

**Tabela 1.** Exemplo de enzimas envolvidas na degradação da lignocelulose

<b>Enzimas</b>	<b>Código da enzima</b>	<b>Família CAZy</b>	<b>Substrato</b>	<b>Produto</b>
Celobiohidrolase	EC 3.2.1.91	GH6,7	Celulose	Celobiose
Endo-1,4- $\beta$ -glucanase	EC 3.2.1.4	GH5,7,12,45	Celulose	Celodextrina, glicose
$\beta$ -glicosidase	EC 3.2.1.21	GH1,3	Celodextrinas	Glicose
Celulose monooxigenase	-	-	Celulose	Celodextrina oxidada
Celobiose desidrogenase	EC 1.1.99.18	-	Celobiose	Celobiono-1,5-lactona
Expansiva	-	-	Celulose	Celulose rompida
Endo- $\beta$ -1,4-xilanase	EC 3.2.1.8	GH10,11,30	Xilana	Xilo-oligossacarídeos, xilose
$\beta$ -xilosidase	EC 3.2.1.37	GH3,30,43	Xilo-oligossacarídeos	Xilose
Endo-1,5- $\alpha$ -arabinase	EC 3.2.1.99	GH43,93	Arabinana	Arabino-oligossacarídeos, arabinose
$\alpha$ -L-arabinofuranosidase	EC 3.2.1.55	GH43	Arabinana, arabino-oligossacarídeos	Arabinose
Endo-1,4-manase	EC 3.2.1.78	GH5,26	Manana	Mano-oligossacarídeos
$\beta$ -manosidase	EC 3.2.1.25	GH2	Mano-oligossacarídeos	Manose
Endo- $\beta$ -1,4-galactanase	EC 3.2.1.89	GH53	Galactana	Galacto-oligossacarídeos
$\beta$ -galactosidase	EC 3.2.1.23	GH2,35	Galactana, xiloglicana	Galactose
A-galactosidase	EC 3.2.1.22	GH27,36	Galactomanana	Galactose
Xiloglicanase	EC 3.2.1.151	GH12,74	Xiloglicana	Xiloglicana-oligossacarídeos
Acetilxilana	EC 3.1.1.72	CE1,2,3,5,12	Xilana	Ácido acético

esterase				
Feruloil esterase	EC 3.1.1.73	CE1	Xilana, arabinana, xiloglucana	Ácidos hidroxicinâmicos (ex: ácidos cafeucim ferúlico e p- cumárico)
Glicuronoil esterase	EC 3.1.1.-	CE15	Xilana	Ácido-4-O- metilglicurônico
Lacase	EC 1.10.3.2	-	Lignina	Radicais aromáticos
Lignina peroxidase	EC 1.11.1.14	-	Lignina	Radicais aromáticos
Manganês peroxidase	EC 1.11.1.13	-	Lignina	Radicais aromáticos
Versátil peroxidase	EC 1.11.1.16	-	Lignina	Radicais aromáticos

---

**Fonte:** Adaptado de Liu *et al.*, 2013

Na natureza, os fungos se destacam como organismos capazes de crescer em diferentes ambientes e degradar polímeros complexos, como os presentes na biomassa vegetal. A versatilidade em decompor o material lignocelulósico implica na secreção de um arsenal de enzimas, incluindo as hidrolases celulases, hemicelulases e proteases, que permitem a degradação da fibra vegetal, fazendo destes substratos fonte de carbono e energia para o fungo (Aguiar, 2011; Chandra *et al.*, 2019).

Embora os fungos filamentosos sejam mais estudados e conhecidos como grandes produtores de enzimas que degradam a biomassa vegetal, as leveduras, apesar de poucos exploradas, também têm sido prospectadas para a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas (Lachance *et al.*, 2011). Como exemplo, temos espécies pertencentes aos gêneros *Cryptococcus*, *Pichia*, *Candida*, *Trichosporon* e *Aureobasidium* (Biely, 1980; Leathers, 1986; Bhadra *et al.*, 2008; Yegin *et al.*, 2018).

### 2.4.1 Celulases

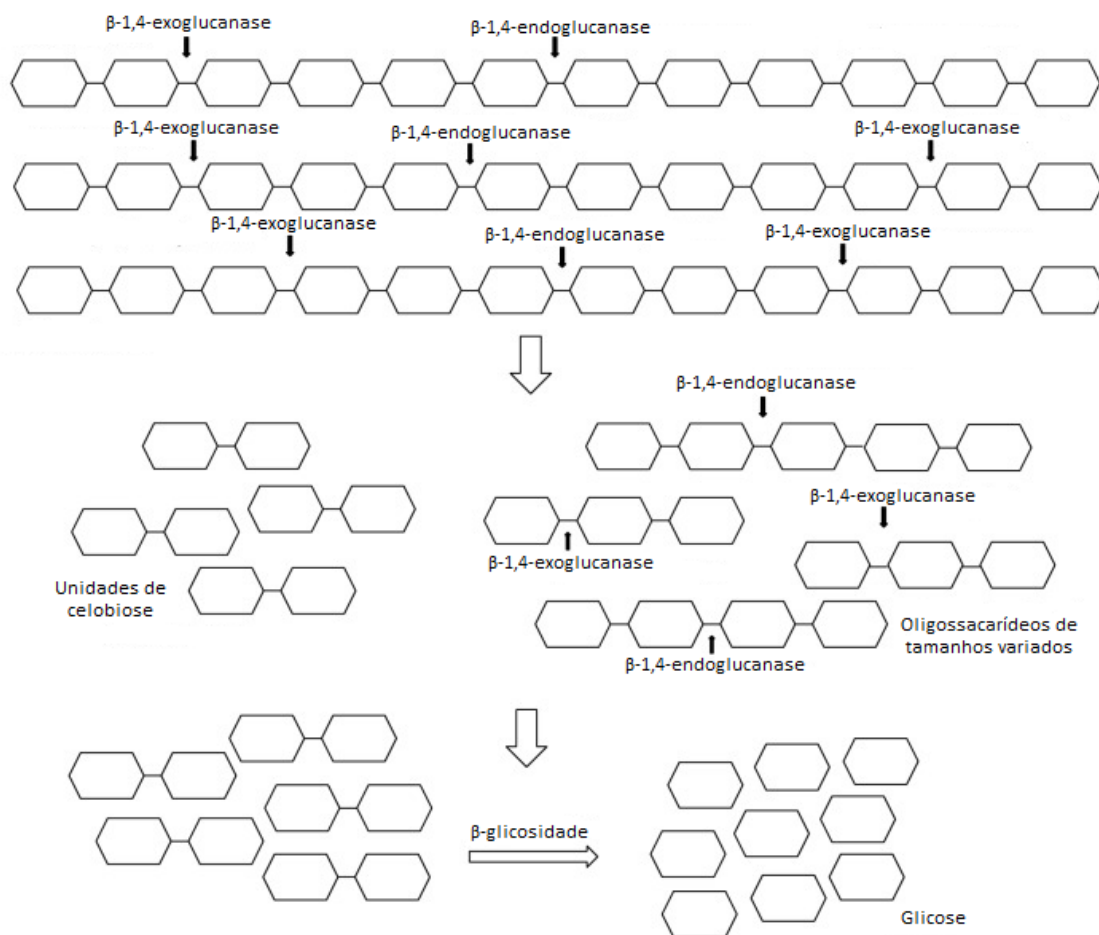
As enzimas pertencentes ao complexo celulolítico possuem papel fundamental na degradação da biomassa lignocelulósica, uma vez que atuam na hidrólise da celulose, seu principal constituinte, agindo sinergisticamente para a conversão desse polissacarídeo em monômeros e dímeros de glicose (Falkoski *et al.*, 2013; Srivastava *et al.*, 2018). Conforme o local de atuação no substrato, são classificadas três principais celulases pertencentes ao grupo de glicosil-hidrolases (GH): endoglucanases (endo- $\beta$ -1,4-glucanases), exoglucanases (exo-1,4- $\beta$ -D-glicosidase) e  $\beta$ -glicosidases (1,4- $\beta$ -D-glicosidases) (Horn *et al.*, 2012; Champreda *et al.*, 2019).

As endoglucanases (EC 3.2.1.4) são as enzimas que iniciam o processo de hidrólise da molécula de celulose. Essas enzimas atuam clivando as ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas internas da cadeia e regiões amorfas da celulose, reduzindo assim o grau de polimerização, liberando oligossacarídeos de tamanhos variados com extremidades redutoras e não redutoras (Castro, 2010; Saini *et al.*, 2015).

As exoglucanases (EC 3.2.1.91), também conhecidas como celobiohidrolases, participam principalmente na hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas das partes mais externas e regiões cristalinas da celulose, tanto nas regiões redutoras e não redutoras. Como resultado, há a liberação de unidades de celo-oligossacarídeos e celobiose (dissacarídeos) (Castro, 2010).

As  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21), também chamadas de celobiasas, são importante na etapa final de despolimerização da celulose, sendo responsáveis pela conversão da celobiose e de outros oligossacarídeos de tamanhos pequenos em monômeros de glicose, assim, finalizando todo o processo celulolítico (Champreda *et al.*, 2019).

**Figura 7.** Sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidasas na despolimerização da celulose



**Fonte:** Adaptado de Saini *et al.*, 2015

Correspondente à terceira classe de enzimas industriais mais vendidas no mundo, as enzimas celulolíticas apresentam grande importância biotecnológica, onde contribuem em torno de 20% com o mercado global de enzimas. Apresentam vastas aplicações, principalmente nas indústrias têxtil, de produção de ração animal, de biocombustíveis e de bebidas (Srivastava, 2018; Verma; Kumar; Bansal; 2018). Segundo Zanchetta (2013), na indústria de bebidas, por exemplo, as  $\beta$ -glicosidasas no processo de vinificação são muito importantes, pois facilitam a extração de pigmentos e substâncias aromatizantes presentes na uva e melhoram o aroma e sabor do vinho através da degradação de compostos de sabores desagradáveis, liberando substâncias flavorizantes. Ainda segundo o mesmo autor, na produção de ração animal, as celulasas quando adicionadas à ração, juntamente com as celulasas produzidas pelos

microrganismos presentes no rúmen do animal em questão, aumentam a digestibilidade das fibras da parede celular vegetal, assim melhorando a conversão da pastagem em carne e leite.

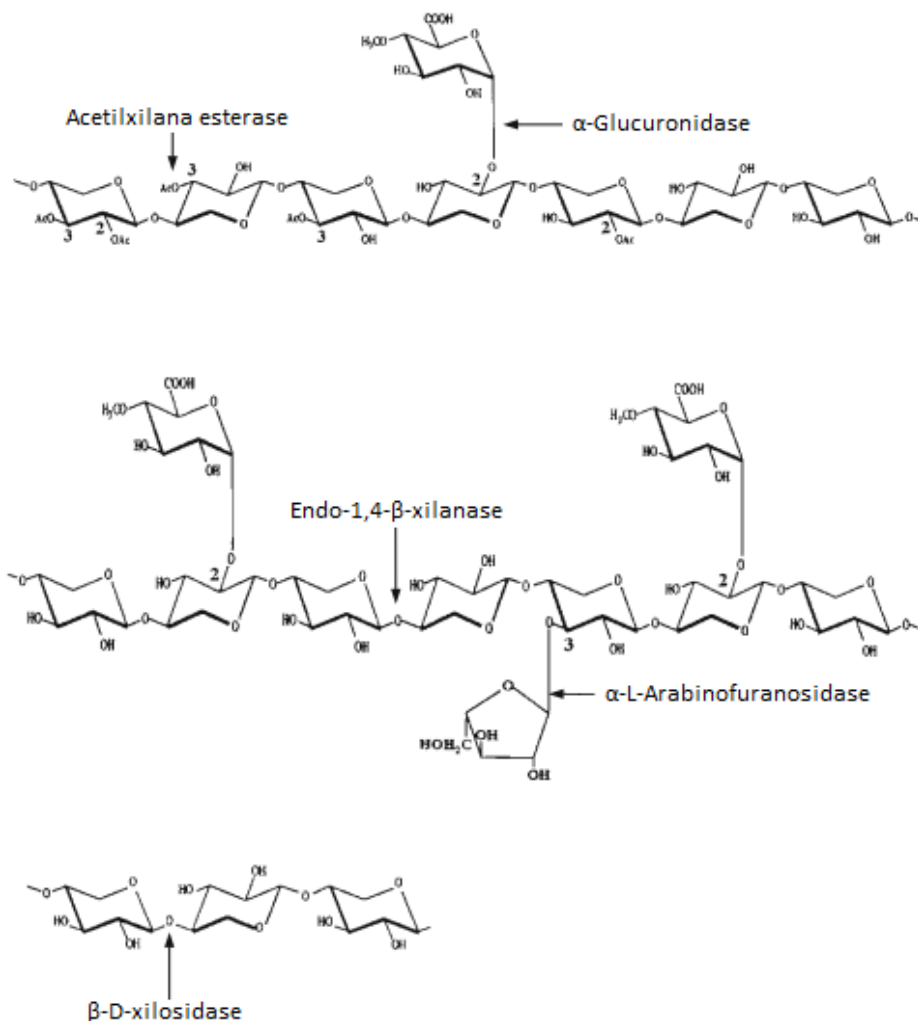
#### 2.4.2 Hemicelulases

As enzimas responsáveis pela degradação da hemicelulose são denominadas hemicelulases, enzimas que pertencem ao grupo glicosil hidrolases (GH). Devido a diversidade de açúcares em sua composição, para que seja degradada todas as frações da hemicelulose, é necessário a ação coordenada de diversas enzimas, que são classificadas de acordo com sua especificidade e local de ação. As principais enzimas do complexo hemicelulolítico que despolimerizam a cadeia principal da hemicelulose são as endo-1,4-xilanases e as  $\beta$ -D-xilosidases. Já as principais hemicelulases que agem nas cadeias laterais são as  $\alpha$ -arabinofuranosidases,  $\alpha$ -glucoronidases, acetil-xilanaesterase e feruloil-esterases (Subramaniyan; Prema, 2002; Chadha; Rai; Mahajan, 2019).

As endoxilanases (E.C. 3.2.1.8) atuam sobre as ligações glicosídicas internas da cadeia de xilana, o tipo de hemicelulose mais frequente. Essas enzimas clivam as ligações  $\beta$ -1,4-xilosídicas entre dois resíduos D-xilopiranosídeo onde os principais produtos gerados são a xilobiose, xilotriose e oligômeros contendo de 2 a 4 resíduos de  $\beta$ -D-xilopiranosil (Carvalho *et al.*, 2013).

As  $\beta$ -xilosidases (E.C.3.2.1.37) são xilanases responsáveis por converter a xilobiose e xilo oligômeros, liberados pela ação das endoxilanases, em monossacarídeos de xilose, a partir dos terminais não redutores. As atividades desempenhadas por essas enzimas são importantes no que diz respeito a degradação geral da biomassa lignocelulósica pois há trabalhos que indicam que os xilo oligômeros agem como inibidores competitivos de algumas celulases e xilanases, sendo então a participação das  $\beta$ -xilosidases crucial para a evitar a inibição por xilo-oligossacarídeos (Carvalho *et al.*, 2013).

**Figura 8.** Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana: acetilxilana esterase,  $\alpha$ -glucuronidase, endoxilanase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e  $\beta$ -xilosidase



**Fonte:** Adaptado de Polizeli *et al.*, 2005

São diversas as aplicações das xilanases, podendo essas enzimas serem empregadas na indústria de papel e celulose para o branqueamento do papel kraft, na indústria alimentícia no refinamento das propriedades de cozimento da massa de pão e melhoramento das características organolépticas do produto final e também na produção de biocombustíveis, participando do processo de clivagem de biomassa lignocelulósica em monossacarídeos. Além disso, os oligossacarídeos que são produzidos pela ação das xilanases, podem ser aplicados como aditivos alimentares ou adoçantes alternativos, possuindo efeitos prebióticos, já que não são hidrolisados e nem absorvidos no trato gastrointestinal superior, o que acaba estimulando seletivamente o crescimento ou

atividade de microrganismos benéficos no cólon (Swennen *et al.*, 2006; Falck *et al.*, 2013).

### 2.4.3 Proteases

As proteases, também chamadas de proteinases ou peptidases, são as enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ligações peptídicas encontradas em proteínas e peptídeos. Como realizam a sua clivagem através da hidrólise, as enzimas proteolíticas são pertencentes ao grupo 3 das hidrolases e ao subgrupo 4, já que hidrolisam ligações peptídicas. Essas enzimas podem ser classificadas de diversas maneiras, como a partir de sua fonte de isolamento, podendo ser de origem animal, vegetal ou microbiana, a partir de sua ação catalítica e especificidade pelo substrato (Parkin, 2010; Aguilar; Sato, 2018).

De acordo com sua região de clivagem, as proteases podem ser classificadas em exopeptidases e em endopeptidases. As exopeptidases são responsáveis por clivar as ligações das regiões mais extremas da cadeia polipeptídica, podendo ser subclassificadas em aminopeptidases, tipos de exopeptidases que hidrolisam as ligações peptídicas adjacentes ao terminal amino, liberando aminoácidos livres, dipeptídeos e tripeptídeos, e as carboxipeptidases, tipos de exopeptidases que clivam a região carboxiterminal liberando aminoácidos livres ou dipeptídeos (Gurumallesh *et al.*, 2019; Naveed *et al.*, 2021).

As endopeptidases são as proteases que realizam clivagens no interior da cadeia polipeptídica, onde de acordo com o grupo funcional ativo e seu mecanismo de ação, podem ser categorizadas como serino, cisteíno, aspártico e metaloprotease. As serino proteases possuem o resíduo de serina no sítio ativo, o qual age como agente nucleofílico para clivagem da ligação peptídica no substrato. As endopeptidases cisteínicas são aquelas que possuem o aminoácido cisteína conjugado com histidina em seu sítio ativo. Já as proteases aspárticas, são aquelas que possuem um sítio catalítico central composto por um par de aspartatos. E por fim, as metaloproteases são enzimas que possuem necessidade de ions metálicos, como o zinco, para atividade enzimática (Souza *et al.*, 2017; Brandão *et al.*, 2018; Thakur *et al.*, 2018; Naveed *et al.*, 2021; Purushothaman *et al.*, 2021).



microrganismo se desenvolve em substratos sólidos com baixa disponibilidade de água (Santos, 2014; Fasim; More; More, 2021).

Entre os dois tipos de processos fermentativos, em escalas industriais, a fermentação submersa é o mais utilizado. Entretanto, a fermentação em estado sólido, também chamada de cultivo em estado sólido (CES), vem ganhando cada vez mais destaque para a produção enzimática, principalmente na produção de enzimas de origem fúngica (Soccol *et al.*, 2017). Como já citado, a principal característica do CES é a utilização de substratos com baixa atividade de água, fazendo com que as condições de crescimento se assemelhem ao habitat natural dos fungos, o que possibilita o desenvolvimento destes com mais facilidade no substrato sólido e, também, a produção de grandes quantidades de enzimas (Rodríguez-León *et al.*, 2018).

Ademais, assim que os parâmetros definidos para o CES estão adequados à linhagem, muitas vantagens do ponto de vista econômico e ambiental são contabilizados, como maior rendimento do produto, menor necessidade de espaço e energia, baixa produção de águas residuais ligadas a redução dos riscos de contaminação bacteriana e, principalmente, agregação de valor a produtos oriundos da fermentação de resíduos agroindustriais (Aljammal; Alkhalaf, 2018). Em virtude a esse destaque na utilização de subprodutos agroindustriais como substrato, o CES tem sido utilizado para a obtenção de celulases (Kang, 2004; Gao *et al.*, 2008), xilanases, pectinases e ligninases (Papinutti; Forchiassin, 2007) a partir de fungos.

## **2.6 *Aureobasidium* spp.**

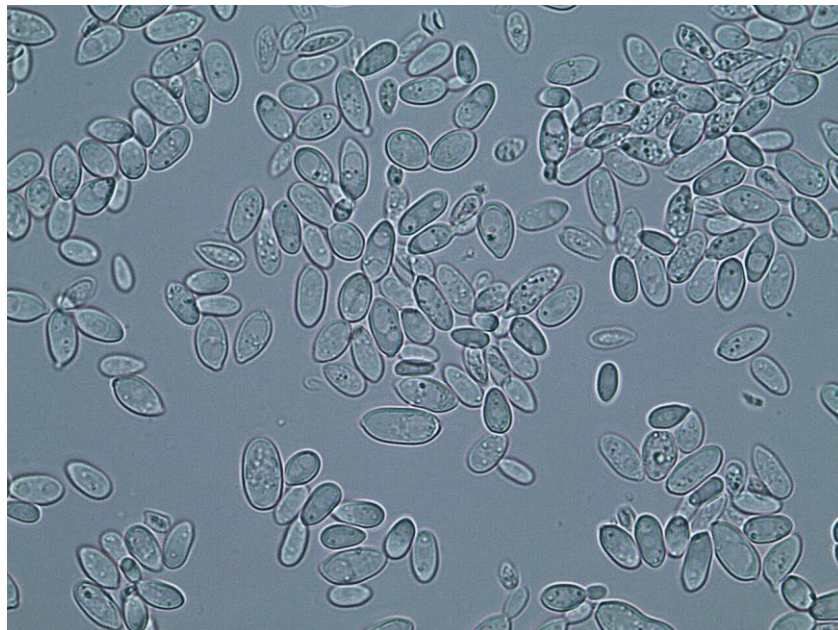
*Aureobasidium* é um gênero de fungos dimórficos que, de forma geral, apresentam células de levedura maiores e células filamentosas menores. É um gênero ubíquo e amplamente distribuído, podendo ser encontrado em água doce e hipersalina, gelo, solo de florestas, folhas de plantas e superfícies de frutos (Zalar *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2019). A capacidade de produzir uma grande quantidade de propágulos e a grande diversidade intraespecífica permitiu que muitas espécies pertencentes a esse gênero habitassem essa variedade de ambientes, inclusive locais que são classificados como inóspitos ou extremos (Jiang *et al.*, 2019). Além disso, apresentam uma ampla gama de estilos de vida, podendo ser saprófitos, endofíticos e patógenos de vegetais e humanos (Lee *et al.*, 2021).

O genoma de mais de 50 cepas de diferentes *Aureobasidium* spp. foram sequenciados de acordo com o banco de dados *Index Fungorum*, para mais, novas

espécies são regularmente descritas (Fungorum, 2022). Entre as espécies, *Aureobasidium pullulans* é a mais estudada, entretanto, atualmente o interesse por outras espécies cresce cada vez mais devido às propriedades versáteis e aplicáveis que os microrganismos pertencentes a esse grupo possuem (Francesco *et al.*, 2023).

Dentre as propriedades versáteis e aplicáveis, já é de conhecimento a produção de inúmeras enzimas importantes por *Aureobasidium* spp., como amilases, proteases, lipases, xilanases e celulases, sendo essas enzimas produzidas por esses fungos muito utilizadas, por exemplo, na indústria alimentícia. Exemplos de aplicações são de endo-1,4- $\beta$ -xilanase,  $\beta$ -xilosidase, poligalacturonase e pectina liase na clarificação de polpa de frutas e sucos, enquanto que glucoamilase e  $\alpha$ -amilase têm sido usados para sacarificação de amido e na panificação (Van Nieuwenhuijzen, 2014; Jiang *et al.*, 2021).

**Figura 10.** Células da levedura *Aureobasidium leucospermi*, exemplo de espécie pertencente ao gênero *Aureobasidium*. Visualização em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes



**Fonte:** Autoria própria, 2024

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

Investigar a produção de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e proteases pela levedura *Aureobasidium leucospermi* LB86 por cultivo sólido contendo o subproduto agroindustrial farelo de trigo.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Avaliar o farelo de trigo no suporte nutricional para o crescimento da levedura *A. leucospermi* LB86;

Verificar em que medida o farelo de trigo é indutor na produção de hidrolases;

Realizar a caracterização bioquímica funcional das enzimas presentes do extrato fermentativo (efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade, efeito de íons, inibidores, etanol, açúcares etc);

Quantificar a produção de etanol pela levedura *A. leucospermi* LB86 utilizando hidrolisado de farelo de trigo como meio fermentativo.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Pré-inóculo para o CES**

A levedura *A.leucospermi* LB86, anteriormente armazenada na coleção de fungos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – Ibilce – Unesp, em criotubos sob solução de glicerol a 15%, em freezer a -80°C, foi cultivada a 30°C por 48 horas em meio nutriente sólido de YEPD (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% glicose) acrescido de ágar. Após esse período, uma colônia isolada foi utilizada para obter biomassa da levedura para inocular o meio fermentativo. Para isso, o pré-inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio YEPD sem ágar, durante 24 horas, a 30°C e sob agitação de 150 rpm. Em seguida as células foram ressuspensas em solução salina (descrita abaixo) e 1 mL foi aplicado no meio de fermentativo.

### **4.2 Produção das enzimas por cultivo em estado sólido (CES)**

O CES foi realizada em embalagens de polipropileno (12 x 22 cm) vedadas com tampões de algodão contendo 4 g de farelo de trigo. Para umedecer o substrato, foi adicionado 7 mL de solução salina, composta por (g L<sup>-1</sup>) (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (0,1%); (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (0,1%); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1%) e MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O) (0,02%) (Silva *et al.*, 2019; Vaz *et al.*, 2021). Todo o material foi autoclavado a 120°C, 1 atm, durante 30 minutos. Posteriormente, foi inoculado em cada embalagem 1 mL de suspensão celular provenientes do pré-inóculo anteriormente realizado, onde continha ~ 8,5 mg de massa celular (biomassa úmida). O cultivo foi mantido a 30°C por um período de 168 horas.

Para acompanhar a produção de enzimas ao longo do tempo de cultivo da levedura, foram retirados a cada 24 horas uma embalagem de fermentação. A cada amostra retirada foram adicionados 50 mL de água destilada, sendo a mistura homogeneizada manualmente e mantida sob agitação em shaker (100 rpm), por 10 minutos. Após esse período, o material foi filtrado em tecido nylon e centrifugado a 4000 rpm por 15 min, a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

### **4.3 Determinação das atividades enzimáticas**

#### **4.3.1 Endoglucanase**

Para determinar a atividade de endoglucanase foi utilizado 50 µl de solução enzimática e 450 µl de carboximetilcelulose 1% (CMC-Sigma Aldrich) diluído em

tampão acetato a 150 mM em pH 5,0. A solução foi incubada durante 100 minutos em banho a 40°C. O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método DNS (Miller, 1959), adicionando 500 µl da solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) à mistura da reação. A mistura foi incubada a 96°C durante 10 minutos, em seguida foi resfriada em banho de gelo e adicionado 5 mL de água destilada. Após a homogeneização, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade de endoglucanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de glicose por minuto, nas condições de reação, comparado a curva padrão de glicose, previamente preparada.

#### 4.3.2 Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada em mistura de reação contendo 50 µl de solução enzimática e 450 µl de xilana *birchwood* 1% (Sigma Aldrich) a 150 mM em tampão acetato pH 5,0. A solução foi incubada durante 100 minutos em banho a 40°C. O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método DNS (Miller, 1959), adicionando 500 µl da solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) à mistura da reação. A mistura foi incubada a 96°C durante 10 minutos, em seguida foi resfriada em banho de gelo e adicionado 5 mL de água destilada. Após a homogeneização, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de xilose por minuto, nas condições de reação, comparado a curva padrão de xilose, previamente preparada.

#### 4.3.3 β-glicosidase

Para determinação da atividade de β-glicosidase utilizou-se 50 µL do solução enzimática e 450 µl de *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (2mM) (*p*NPG-Sigma Aldrich) dissolvido em solução tampão acetato (150 mM, pH 5,0). A reação foi mantida a 40°C, por 60 minutos, e interrompida com a adição de 500 µL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 M). O *p*-nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de nitrofenol por minuto de reação utilizando curva padrão obtido com solução de *p*-nitrofenol em variadas concentrações (Kumar; Ramón, 1996).

#### 4.3.4 $\beta$ -xilosidase

A atividade de  $\beta$ -xilosidase foi avaliada utilizando 50  $\mu$ L da solução enzimática e 450  $\mu$ L de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (2mM) (*p*NPX-Sigma Aldrich) dissolvido em solução tampão acetato (150 mM, pH 5,0). A reação foi mantida a 40°C, durante 60 minutos, sendo interrompida com a adição de 500  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2M). O nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por minuto de reação, seguindo as condições citadas (Kumar; Ramón, 1996).

#### 4.3.5 Protease

Para avaliar a atividade proteolítica, foi utilizado 50  $\mu$ L de solução enzimática e 450  $\mu$ L de 1% de caseína (*Casein sodium salt from bovine milk*-Sigma Aldrich) dissolvida em solução de tampão fosfato monobásico (150 mM, pH 6,5). A reação foi mantida a 40°C, durante 90 minutos, sendo interrompida com a adição de 600  $\mu$ L de ácido tricloroacético 10%. A quantificação da atividade caseinolítica foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 280 nm. A unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima requerida para promover o aumento de 0.01, por minuto, da absorbância a 280 nm (Meyers; Ahearn, 1977).

### 4.4 Determinação das propriedades bioquímicas das enzimas

#### 4.4.1 Concentração do extrato fermentativo

Antes de realizar a caracterização físico-química das enzimas, com base no primeiro bioprocessamento em estado sólido, foi escolhido o menor tempo de cultivo em que observamos alta atividade pro conjunto de enzimas de interesse. Dessa maneira, o terceiro dia de cultivo da levedura (72 horas) foi escolhido para a retirada do experimento.

A partir disso, o extrato fermentativo foi concentrado usando o sistema QuixStand® (QSM-03SP, GE), equipado com um cartucho de membrana de corte 10 kDa. O volume inicial de 910 mL foi concentrado para um volume final de 170 mL.

#### 4.4.2 Efeito do pH sobre a atividade das enzimas

Para determinação da faixa de pH ótimo das enzimas presentes no extrato fermentativo concentrado, foram utilizados os substratos mencionados anteriormente

para cada atividade enzimática. A abrangência de pH foi de 4,0 até 10,5 com variações de 0,5 unidades. As reações foram conduzidas a 40°C utilizando os seguintes tampões: acetato (pH 4,0, 4,5 e 5,0), MES (pH 5,5, 6,0 e 6,5), HEPES (pH 7,0 7,5 e 8,0), BICINE (pH 8,5 e 9,0) e CAPS (pH 9,5, 10,0 e 10,5), todos a 0,2 M. Os ensaios de atividade enzimática foram realizados em triplicata.

#### **4.4.3 Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas**

Para avaliar o efeito da temperatura sobre as atividades enzimáticas, foram utilizados tampões com pH ótimos pré-determinados para cada enzima, variando-se a temperatura de 30 a 65°C, alternando 5°C. Todos os ensaios de atividade enzimática foram realizados em triplicata.

#### **4.4.5 Efeito da temperatura na estabilidade das enzimas**

Para determinação do efeito da temperatura na estabilidade das enzimas, a solução enzimática foi pré-incubada, sem a presença do substrato, nas temperaturas de 30 a 65°C, com variação de 5°C, durante 60 minutos. Posteriormente, as reações foram realizadas normalmente, utilizando os pH e temperaturas ótimos pré-determinados. Todos os ensaios de atividade enzimática foram realizados em triplicata.

#### **4.4.6 Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica**

Para testar o efeito de diferentes inibidores na atividade proteolítica, foram utilizados o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido iodoacético (AIA), fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) e N-etilmaleimida (NEM) na concentração final de 5 mM.

As reações foram realizadas nas condições ótimas de pH e temperatura para a atividade de protease. Todos os ensaios de atividade enzimática foram realizados em triplicata.

#### **4.4.7 Efeito de íons sobre as atividades enzimáticas**

Para avaliar as atividades enzimáticas na presença de diferentes íons, foram utilizados os íons metálicos: cloreto de manganês ( $MnCl_2$ ), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cobre ( $CuCl_2$ ), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de lítio (LiCl), cloreto de bário ( $BaCl_2$ ), cloreto de cobalto ( $CoCl_2$ ), cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), cloreto de ferro

(FeCl<sub>3</sub>), cloreto de cádmio (CdCl<sub>2</sub>) e cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) na concentração final de 5 mM.

As reações foram realizadas nas condições ótimas de pH e temperatura de cada atividade testada. Todos os ensaios de atividade enzimática foram realizados em triplicata.

#### **4.4.8 Efeito de compostos derivados do pré-tratamento da biomassa vegetal sobre as atividades enzimáticas**

Para o estudo das atividades enzimáticas na presença de compostos derivados do pré-tratamento da biomassa vegetal, foram utilizados os compostos vanilina, furfural, 5-hidroxiacetilfurfural, ácido gálico e ácido tânico na concentração final de 5 mM.

As reações foram realizadas nas condições ótimas de pH e temperatura de cada atividade testada. Todos os ensaios de atividade enzimática foram realizados em triplicata.

#### **4.4.9 Efeito de etanol sobre as atividades enzimáticas**

Para determinar o efeito do etanol sobre as atividades enzimáticas, foi adicionado etanol na concentração de 10% na mistura reacional de cada atividade enzimática avaliada em suas condições ótimas de pH e temperatura. Além disso, a presença do etanol na concentração de 10% também foi avaliada em pH 5,0 em cada atividade enzimática. Todos os ensaios de atividade enzimática foram realizados em triplicata.

#### **4.5 Efeito de açúcares sobre as atividades enzimáticas**

Para avaliar o efeito de açúcares nas atividades enzimáticas, foram utilizados os açúcares glicose, arabinose e xilose nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 M.

As reações foram realizadas nas condições ótimas de pH e temperatura de cada atividade testada. Todos os ensaios de atividade enzimática foram realizados em triplicata.

##### **4.5.1 Hidrólise de diferentes substratos**

A atividade enzimática do extrato fermentativo foi medida em diferentes substratos. Os substratos utilizados foram carboximetilcelulose, avicel, xilana, *p*-

nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, *p*-nitrofenol- $\beta$ -D-xilopiranosídeo, *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucosaminídeo e caseína, todos a 0,2 M.

Para os substratos *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, *p*-nitrofenol- $\beta$ -D-xilopiranosídeo, *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo e *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucosaminídeo, as reações aconteceram a 40°C em pH 6,0. Para carboximetilcelulose e avicel, as reações aconteceram a 50°C em pH 5,0. Para xilana, a reação aconteceu a 50°C em pH 6,0. Para caseína, a reação aconteceu a 45°C em pH 9,0. Todos os ensaios de atividade enzimática foram realizados em triplicata.

#### 4.5.2 Produção e quantificação de etanol

A produção e quantificação de etanol pela levedura *A.leucospermi* LB86 foi realizada utilizando erlenmeyers de 125 mL contendo 15 mL de hidrolisado de farelo de trigo e 5 mL de solução salina composta por fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (2,0 g/L), sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,0 g/L), sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O) (1,0 g/L), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) (0,3 g/L), ureia (0,3 g/L) e extrato de levedura (10,0 g/L).

O hidrolisado de farelo de trigo foi obtido com a aplicação do extrato enzimático do presente estudo. Foi adicionado em erlenmeyers de 50 mL: 2 g de substrato, previamente lavado; 8 mL de tampão MES em pH 6,0 (pH ótimo para o maior conjunto de atividades testadas); e 2 mL do extrato enzimático. Os erlenmeyers foram incubados a 40°C (temperatura ótima para o maior conjunto de atividades testadas) e sob agitação de 150 rpm durante 120 minutos. Após esse período, o material foi filtrado e centrifugado a 4000 rpm por 15 min, a 4°C. O sobrenadante teve seu pH ajustado para 4,5 e foi utilizado como meio fermentativo.

A fermentação foi iniciada com inóculo a 0,7 DO<sub>600</sub>. Os erlenmeyers foram vedados com uma válvula, que foi preenchida com 3,5 mL de 1 g L<sup>-1</sup> de solução de metabissulfito de sódio. O experimento foi realizado a 30°C sob agitação de 150 rpm, e amostras foram coletadas nos tempos de 24 e 48 horas de fermentação. O meio foi centrifugado a 4000 rpm por 15 min a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para quantificação de etanol por cromatografia gasosa headspace (HSGC). Inicialmente, 5 mL de cada amostra foram colocados em frascos de vidro de 10 mL, selados com septo de borracha e mantidos a 40°C por 10 min. Em seguida, 100  $\mu$ L do headspace foram coletados usando uma seringa *gas tight* (500  $\mu$ L) e injetados em um cromatógrafo gasoso (PerkinElmer-Clarus 480) equipado com uma coluna EN14103 (30 m, 0,32 mm,

0,25  $\mu\text{m}$ : Agilent Technologies). Foi utilizado nitrogênio como gás de arraste, com fluxo de  $1,7 \text{ mL min}^{-1}$ . O detector de ionização de chama (FID) foi operado com  $\text{H}_2$  ( $45 \text{ mL min}^{-1}$ ) e ar sintético ( $450 \text{ mL min}^{-1}$ ). As temperaturas dos blocos de injeção e detecção foram  $200$  e  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. A temperatura inicial do forno começou em  $40^\circ\text{C}$  subindo para  $150^\circ\text{C}$  ( $15^\circ\text{C min}^{-1}$ ) com um tempo total de execução de  $7,3 \text{ min}$ . Uma curva analítica foi construída com soluções etanol:água (m/v) em diferentes concentrações ( $0,25$ ;  $0,5$ ;  $1,0$ ;  $1,5$ ;  $2,0$  e  $5,0 \text{ g L}^{-1}$  de etanol) (Martins *et al.*, 2018).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

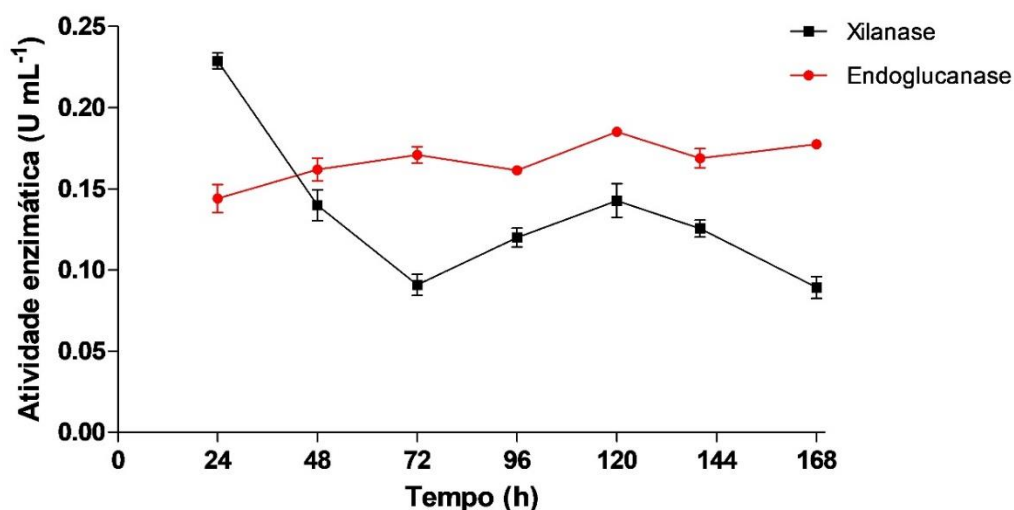
### 5.1 Avaliação do crescimento e presença de hidrolases no extrato do CES da levedura *Aureobasidium leucospermi* LB86 em farelo de trigo

A levedura *A. leucospermi* LB86 foi cultivada, em CES, utilizando o farelo de trigo como substrato, durante o período de 168 horas, com a finalidade de analisar seu crescimento sobre o substrato e a capacidade de produzir as enzimas de interesse.

A levedura foi capaz de crescer em meio sólido com o farelo de trigo usado como fonte de carbono. Verificou-se o crescimento da biomassa visualmente, onde a cada 24 horas, foi observado um crescente espalhamento da colônia sobre o farelo de trigo. Dessa forma, foi possível concluir que, nas condições realizadas no trabalho, o farelo de trigo favoreceu o crescimento da levedura em questão.

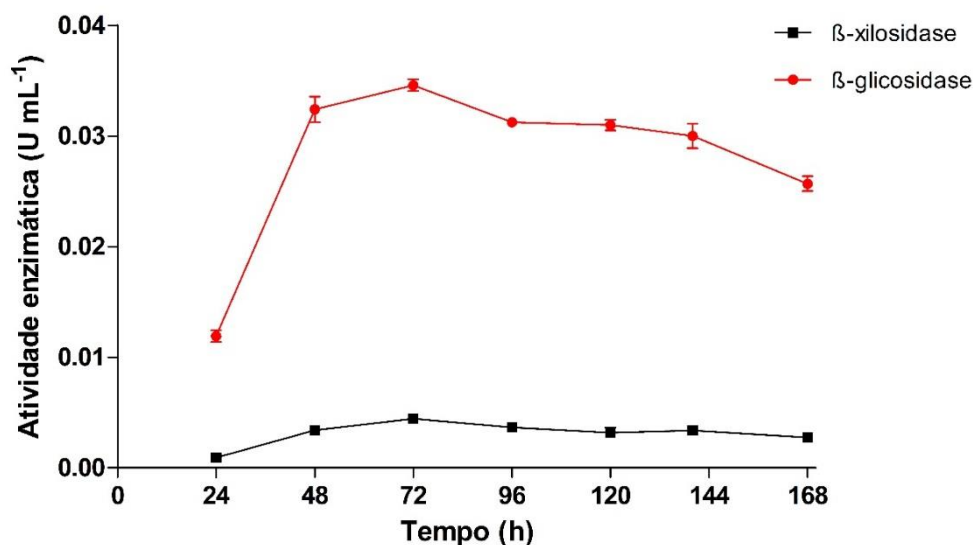
Com os extratos fermentativos que foram retirados a cada 24 horas, foram feitos os ensaios enzimáticos para avaliar as atividades enzimáticas e a influência do tempo na produção das enzimas. Foram avaliadas as atividades de endoglucanase,  $\beta$ -glicosidase, xilanase,  $\beta$ -xilosidase e protease. Foi observado atividade para todas as enzimas avaliadas, como demonstrado nas Figuras 11, 12 e 13.

**Figura 11.** Produção de xilanase e endoglucanase pela levedura *A. leucospermi* LB86 ao longo do CES com farelo de trigo como substrato. As linhas em preto e vermelho referem-se a atividade enzimática de xilanase e endoglucanase, respectivamente



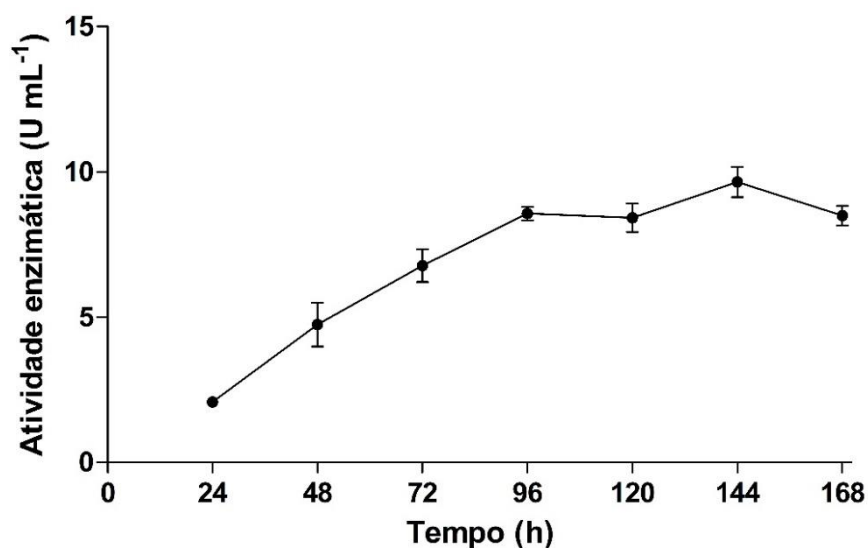
Fonte: Autoria própria, 2024

**Figura 12.** Produção de  $\beta$ -xilosidase e  $\beta$ -glicosidase pela levedura *A. leucospermi* LB86 ao longo do CES com farelo de trigo como substrato. As linhas em preto e vermelho referem-se a atividade enzimática de  $\beta$ -xilosidase e  $\beta$ -glicosidase, respectivamente



Fonte: Autoria própria, 2024

**Figura 13.** Produção de protease pela levedura *A. leucospermi* LB86 ao longo do CES com farelo de trigo como substrato



Fonte: Autoria própria, 2024

A maior atividade para endoglucanase foi no tempo de 120 horas (Figura 11) com aproximadamente  $0,20 \text{ U mL}^{-1}$ . Para xilanase, a maior atividade ocorreu no tempo de 24 horas (Figura 11), com cerca de  $0,23 \text{ U mL}^{-1}$ . No caso das enzimas  $\beta$ -glicosidase e

$\beta$ -xilosidase, podemos dizer que ambas tiveram sua maior atividade no tempo de 72 horas (Figura 12), onde a  $\beta$ -glicosidase apresentou um pouco mais de  $0,03 \text{ U mL}^{-1}$ , enquanto que a  $\beta$ -xilosidase teve um pouco menos de  $0,01 \text{ U mL}^{-1}$ . No caso da protease, o tempo de maior atividade foi de 144 horas (Figura 13), com aproximadamente  $10 \text{ U mL}^{-1}$ . A partir disso, foi possível ver que o farelo de trigo é uma alternativa para a produção de hidrolases. Isso porque o farelo de trigo, assim como outras fontes de carbono complexas, é à base de celulose, hemicelulose e, também, uma substância rica em proteínas, apresentando assim elevado potencial para produção de enzimas hidrolíticas (Tuysuz *et al.*, 2020; Arya *et al.*, 2022).

Observando a influência do tempo nas atividades avaliadas, conseguimos inferir que no substrato utilizado para o crescimento de *A. leucospermi* LB86, farelo de trigo, os carboidratos foram consumidos preferencialmente pela levedura nos primeiros dias e, posteriormente, as proteínas. Uma possível justificativa para isso é que açúcares liberados pela atividade de xilanase nas primeiras horas e de endoglucanase ao longo dos dias, como oligossarídeos de tamanhos variados, podem ter sido utilizados como substratos para as enzimas com atividade de  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase. No caso da protease, observamos que a produção vai aumentando ao longo dos dias, sendo o tempo de 144, penúltimo dia de fermentação, o de maior produção. O penúltimo dia ter sido o dia de maior produção pode ser justificado pela possível diminuição na quantidade de carboidratos ao longo das 168 horas, já que desde o primeiro dia, já estavam sendo consumidos. Sendo assim então, as proteínas começaram a ser utilizadas em maior quantidade como fonte de carbono pela levedura.

Com intuito de incrementar os níveis de produção de enzimas, diferentes técnicas de modificação genética podem ser utilizadas. No que tange à expressão gênica, temos a expressão heteróloga, onde as leveduras hospedeiras mais comumente utilizados na expressão heteróloga de proteínas são a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Pichia pastoris* (Castro; Pereira, 2010). Dessa forma, trabalhos futuros a fim de otimizar a produção das enzimas encontradas no presente estudo podem ser realizados.

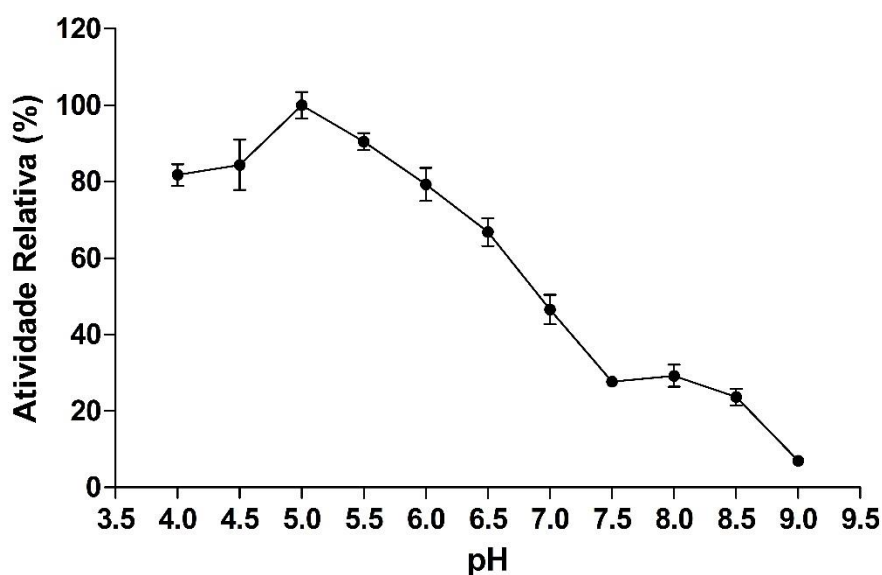
## **5.2 Efeito de pH na atividade das enzimas secretadas por *Aureobasidium leucospermi* LB86**

O efeito do pH na atividade das enzimas foi analisado incubando-as em diferentes tampões na faixa de pH 4,0 a 9,5 para as atividades de endoglucanase,

xilanase,  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase e na faixa de pH 5,5 a 10,5 para a atividade de protease (ensaio caseinolítico).

O estudo da influência do pH na atividade de endoglucanase indicou maior atividade em pH 5,0 (Figuras 14).

**Figura 14.** Efeito do pH na atividade de endoglucanase secretada por *A. leucospermi* LB86. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes



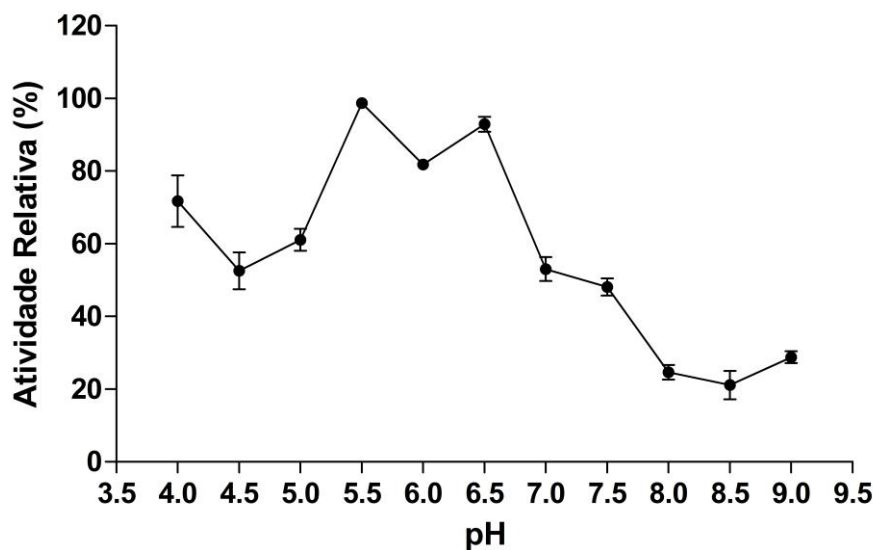
Fonte: Autoria própria, 2024

Observando a Figura 14, vemos que a faixa de pH em que há atividade máxima de endoglucanase é 4,0-5,5, onde no pH 5,0 se observa a maior atividade, sendo ele o utilizado para prosseguir com os experimentos. Assim como no presente estudo, a maioria das endoglucanases de origem fúngica apresentam sua maior atividade em pH entre 4,0 e 5,0 (Valášková; Baldrian, 2006).

Enzimas com atividade em pH ácidos possuem potencial aplicação nos mais variados processos industriais, principalmente na indústria alimentícia, mais especificamente na panificação (Trabelsi *et al.*, 2019).

Para xilanase, a maior atividade enzimática foi notada na faixa de pH 5,5-6,5 (Figura 15), onde o pH 6,0 foi utilizado para prosseguir os experimentos.

**Figura 15.** Efeito do pH na atividade de xilanase secretada por *A. leucospermi* LB86. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes



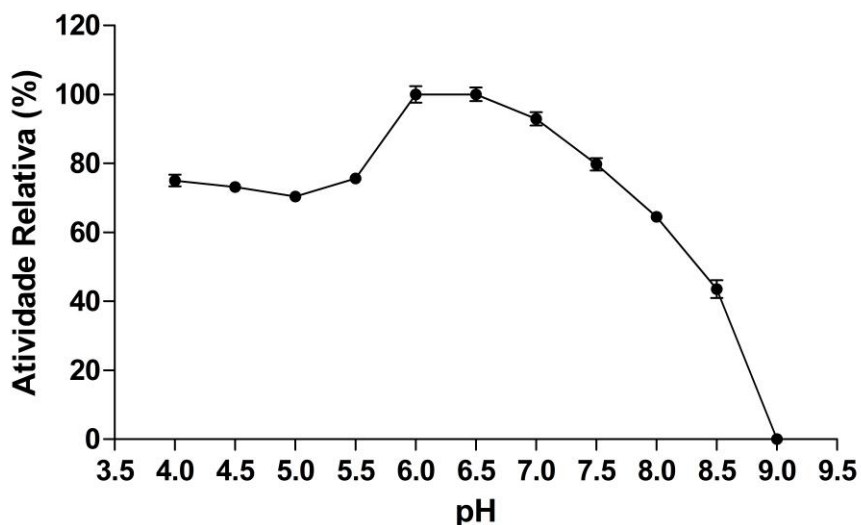
**Fonte:** Autoria própria, 2024

Essa característica de atividade em pH ácido já foi relatada para enzimas produzidas por leveduras do mesmo gênero. Nos trabalhos de Li *et al.* (1993) e Silva (2020), as xilanases produzidas por *Aureobasidium pullulans* e *Aureobasidium pullulans* LB 3.1 exibiram pH ótimo a 4,4 e na faixa de 2,5-4,0, respectivamente.

Estudos já mostraram que xilanases com suas atividades máximas em pHs ácidos possuem potencial para diversas aplicações. No trabalho de Zhao *et al.* (2013), a adição de xilanase ácida na fermentação da cerveja promoveu o aumento na taxa de filtração e redução da viscosidade da mistura. Já em estudos visando melhorias na qualidade de pães, a xilanase bruta de caráter ácido produzida pela levedura *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1 diminuiu a firmeza e tamanho do miolo do pão, aumentou seu volume e melhorou sua maleabilidade (Yegin *et al.*, 2018).

O estudo sobre a influência do pH na atividade de  $\beta$ -glicosidase indicou maior atividade na faixa de pH 6,0-6,5, como podemos observar na Figura 16. O pH 6,0 foi o utilizado para prosseguir com os experimentos.

**Figura 16.** Efeito do pH na atividade de  $\beta$ -glicosidase secretada por *A. leucospermi* LB86. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes



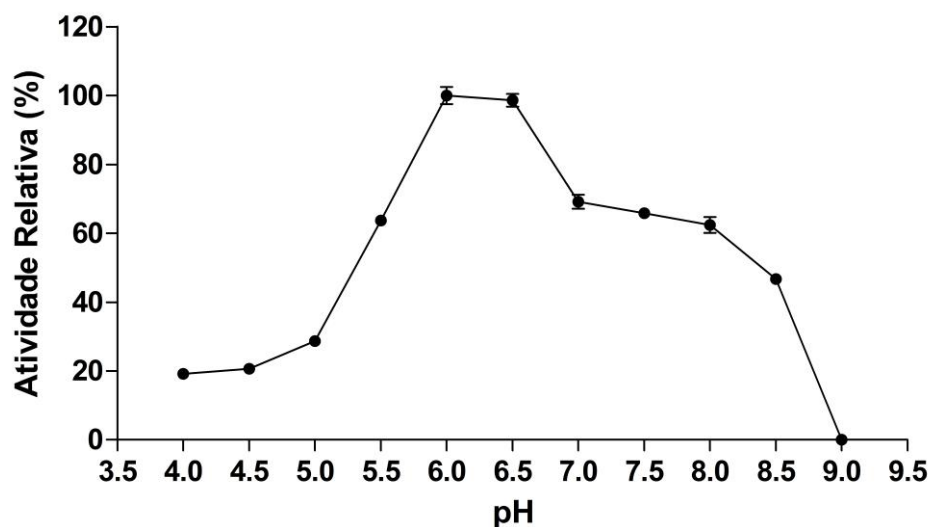
**Fonte:** Autoria própria, 2024

A enzima exibiu progressiva queda a partir do pH 7,5 e nenhuma atividade em pH 9,0. A maioria das  $\beta$ -glicosidase fúngicas exibem pH ótimo entre 4,0 e 6,0 (Bhatia *et al.*, 2002; Sarry; Gunata, 2004), o que se assemelha ao encontrado neste estudo. Um exemplo é a  $\beta$ -glicosidase intracelular produzida pela levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1 (Maitan, 2011), cuja atividade máxima foi notada a pH 6,0. Outro exemplo é  $\beta$ -glicosidase produzida pela levedura *Aureobasidium pullulans* (Leite *et al.*, 2008), com máxima atividade a pH 4,0.

A atividade máxima em pH ácido da enzima pode implicar em diversas aplicações, principalmente em processos de vinificação, uma vez que em condições típicas, a atividade de  $\beta$ -glicosidases em pH alcalino pode ser reduzida pelo baixo pH em que ocorre o processo, bem como pelas altas concentrações de álcool, falta de oxigênio e presença de glicose (Gunata, 1894; Delcroix *et al.*, 1994).

Ao avaliar o efeito do pH na atividade de  $\beta$ -xilosidase, observamos atividade máxima na faixa de pH 6,0-6,5, como podemos observar na Figura 17. O pH 6,0 foi determinado para seguir com os experimentos.

**Figura 17.** Efeito do pH na atividade de  $\beta$ -xilosidase secretada por *A. leucospermi* LB86. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes

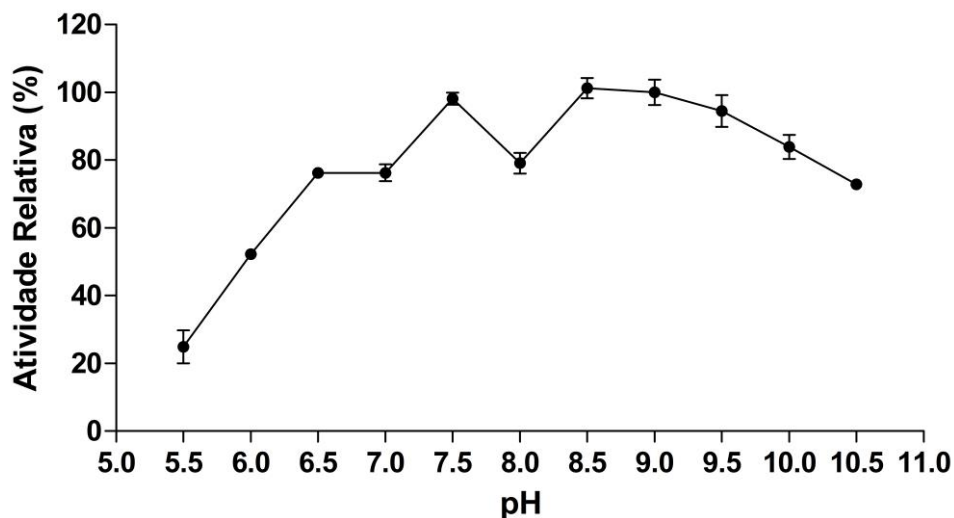


**Fonte:** Autoria própria, 2024

Atividade ótima em pH ácido é comumente relatada para  $\beta$ -xilosidases (Ohta *et al.*, 2010). No trabalho de Romero *et al.* (2012), a  $\beta$ -xilosidase produzida pela levedura *Pichia membranifaciens* teve um comportamento semelhante a  $\beta$ -xilosidase secretada por *A. leucospermi* LB86, tendo como pH ótimo 6,0.

Conforme observamos na Figura 18, a protease exibiu maior atividade a pH 7,5 e na faixa de pH 8,5-9,5, com baixa performance em pH ácidos. O pH 9,0 foi escolhido para prosseguir com os experimentos.

**Figura 18.** Efeito do pH na atividade de protease secretada por *A. leucospermi* LB86. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes



**Fonte:** Autoria própria, 2024

Semelhante ao que encontramos no presente estudo, alguns trabalhos já demonstraram a produção de proteases alcalinas em leveduras, como em *Candida olea* e *Aureobasidium pullulans* 10, cujas atividades ótimas das proteases foram descritas sendo pH 8,0-9,0 e 9,0, respectivamente (Nelson; Young, 1987; Ma *et al.*, 2007). No trabalho de Silva *et al.* 2019, onde foi utilizado a mesma levedura do presente estudo, *A. leucospermi* LB86, a maior atividade da protease purificada foi em pH 7,0 e, indo de constraste com o que é encontrado neste trabalho, a partir do pH 8,5 teve um brusca queda em sua atividade, onde na faixa de pH 9,0-10,0, a atividade foi totalmente reduzida.

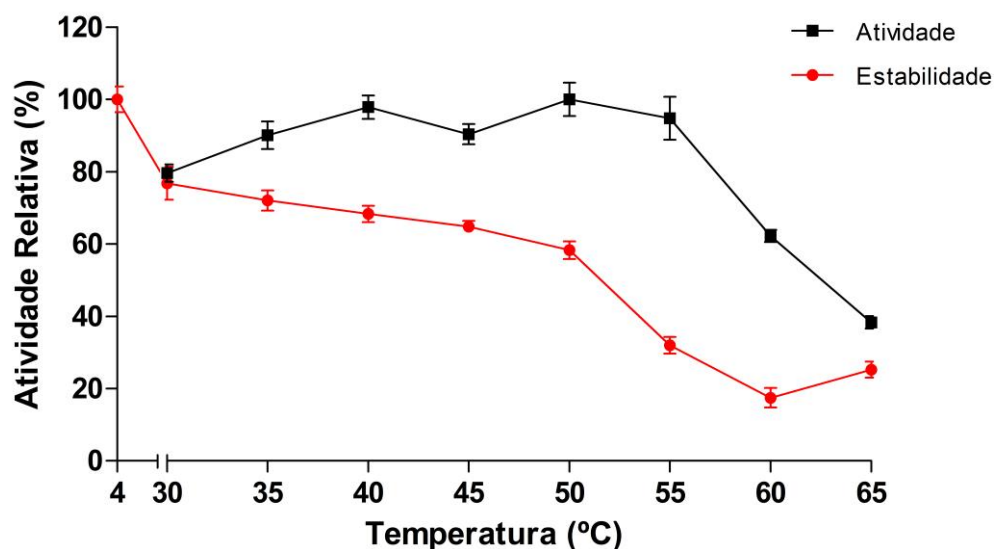
Dentre os tipos de proteases, as alcalinas são as mais aplicadas na indústria (Anwar; Saleemuddin, 1998). São utilizadas na indústria de alimentos, farmacêutica, coureira e, principalmente, na produção de sabão em pó, uma vez que é necessário tolerar e ser ativo no pH normalmente elevado das formulações de sabão em pó, que são entre 9,0-12,0 (Takami *et al.*,1989).

### 5.3 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das enzimas secretadas por *Aureobasidium leucospermi* LB86

A compreensão sobre a temperatura ótima e termoestabilidade enzimática é uma propriedade muito importante, tanto para entender as funções da proteína, quanto para sua utilização nos setores industriais (Ruller *et al.*, 2008; Coura, 2012).

Para endoglucanase, observamos na Figura 19 que a maior atividade aconteceu na faixa de 35-55°C, onde a temperatura de 50°C foi escolhida para prosseguir com os experimentos. Em relação a estabilidade, a enzima manteve sua atividade acima de 60% entre as temperaturas de 30 a 50°C. Maior queda na performance da endoglucanase foi notada a partir de 55°C, com atividades inferiores a 30%.

**Figura 19.** Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da endoglucanase secretada por *A. leucospermi* LB86. As linhas preta e vermelha no gráfico são referentes ao efeito da temperatura na atividade enzimática e ao efeito da temperatura na estabilidade da atividade enzimática, respectivamente. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes

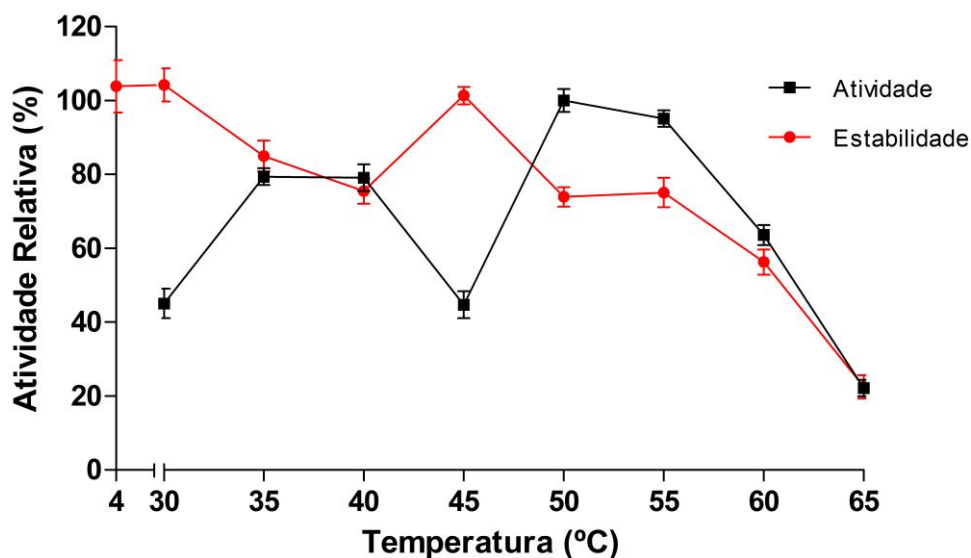


Fonte: Autoria própria, 2024

Para xilanase conforme mostrado na Figura 20, a atividade máxima foi detectada na faixa de 50-55°C, onde a temperatura de 50° foi determinada para prosseguir com os experimentos. Sobre a estabilidade, a enzima manteve mais de 70% de atividade quando exposta as temperaturas entre 30-55°C. A partir de 60°C, uma maior queda na atividade

xilanolítica foi observada, com aproximadamente 20% de atividade remanescente a 65°C.

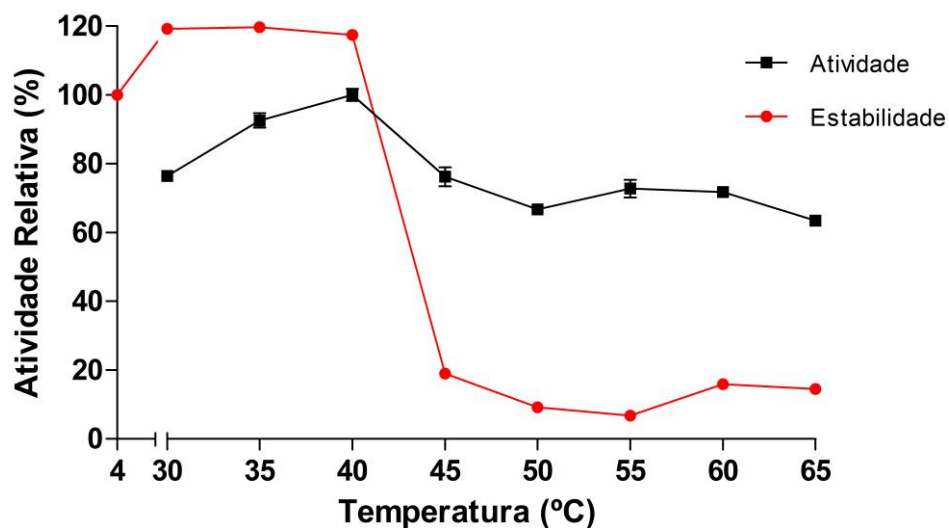
**Figura 20.** Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da xilanase secretada por *A. leucospermi* LB86. As linhas preta e vermelha no gráfico são referentes ao efeito da temperatura na atividade enzimática e ao efeito da temperatura na estabilidade da atividade enzimática, respectivamente. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes



**Fonte:** Autoria própria, 2024

Para  $\beta$ -glicosidase (Figura 21), a maior atividade foi identificada a 40°C, temperatura determinada para realizar os experimentos posteriores. Em relação a termoestabilidade, atividade enzimática teve um aumento (em torno de 20%) quando submetida as temperaturas de 30, 35 e 40°C. A partir dos 45°C ocorreu uma queda brusca na performance da enzima, exibindo atividade inferior a 20% de sua atividade inicial.

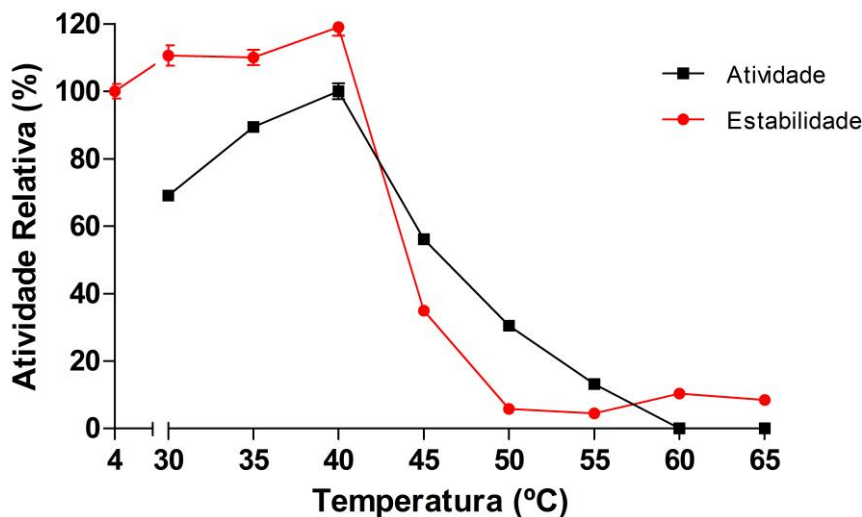
**Figura 21.** Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da  $\beta$ -glicosidase secretada por *A. leucospermi* LB86. As linhas preta e vermelha no gráfico são referentes ao efeito da temperatura na atividade enzimática e ao efeito da temperatura na estabilidade da atividade enzimática, respectivamente. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes



**Fonte:** Autoria própria, 2024

Para  $\beta$ -xilosidase, a atividade ótima foi observada a 40°C (Figura 22), temperatura escolhida para prosseguir com os experimentos. Quando submetida ao teste de estabilidade, a atividade de  $\beta$ -xilosidase apresentou um leve aumento nas temperaturas de 30, 35 e 40°C e, assim como na atividade de  $\beta$ -glicosidase, a atividade sofreu uma considerável queda a partir de 45°C, com menos de 10% de atividade entre 50-65°C.

**Figura 22.** Efeito da temperatura na atividade e estabilidade de  $\beta$ -xilosidase secretada por *A. leucospermi* LB86. As linhas preta e vermelha no gráfico são referentes ao efeito da temperatura na atividade enzimática e ao efeito da temperatura na estabilidade da atividade enzimática, respectivamente. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes

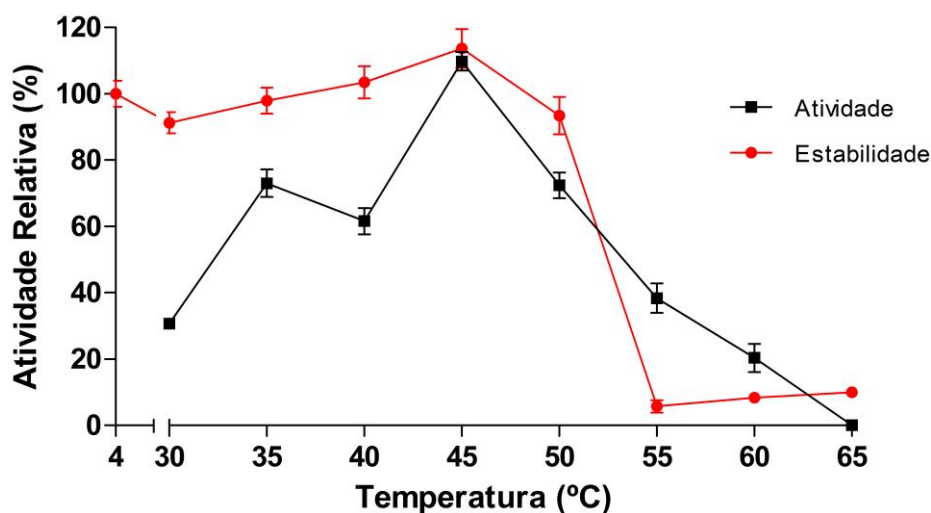


**Fonte:** Autoria própria, 2024

Para protease, a temperatura ótima de atividade caseinolítica foi descrita a 45°C, apresentando uma progressiva queda a partir dos 50°C e perdendo toda atividade enzimática a 65°C (Figura 23). A temperatura definida para prosseguir os experimentos foi a de 45°C. Em relação a sua estabilidade, entre as temperaturas de 30 a 45°C, a atividade se manteve acima de 80%. Na temperatura de 50°C a atividade ficou próxima a 80% e a partir de 55°C cai bruscamente, se mantendo abaixo dos 10%.

No trabalho de Silva *et al.* (2019), onde foi utilizado a mesma levedura desse estudo, a protease purificada também apresentou temperatura ótima a 45°C. Além disso, a protease purificada, também quando pré-incubada durante 60 minutos, manteve sua atividade acima de 80% nas temperaturas entre 30-45 °C, e 80% a 50°C.

**Figura 23.** Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease secretada por *A. leucospermi* LB86. As linhas preta e vermelha no gráfico são referentes ao efeito da temperatura na atividade enzimática e ao efeito da temperatura na estabilidade da atividade enzimática, respectivamente. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes



Fonte: Autoria própria, 2024

#### 5.4 Efeito dos inibidores na atividade da proteolítica

Para obter maior conhecimento sobre o mecanismo de ação da protease presente no extrato, a atividade enzimática foi avaliada na presença de diferentes inibidores de protease. Na Tabela 2 é demonstrado a susceptibilidade do extrato enzimático a inibidores de metalo proteases (EDTA), cisteíno proteases (AIA e NEM) e serino proteases (PMSF).

**Tabela 2.** Efeito de inibidores na atividade da protease secretada por *A. leucospermi* LB86. Os dados estão expressos em atividade relativa, sendo que o ensaio controle (sem adição de inibidores) corresponde a 100% de atividade. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes

Inibidores (5 mM)	Atividade Relativa (%)	Classe de enzimas inibidas
Controle	100,0 ± 8,5	-
EDTA	95,2 ± 8,1	Metalo
AIA	113,6 ± 2,5	Cisteíno
NEM	99,8 ± 5,4	Cisteíno
PMSF	16,3 ± 1,7	Serino

**Fonte:** Autoria própria, 2024

Sob efeito de inibidores, houve mais de 80% de inibição da atividade proteolítica pelo PMSF, o que sugere a presença de serino proteases no extrato enzimático. A falta de alteração significativa da atividade enzimática na presença de EDTA, AIA e NEM, quando comparado ao controle (atividade de protease sem a presença de inibidores), pode indicar a ausência de metalo e cisteíno proteases no extrato.

### 5.5 Efeito dos íons nas atividades enzimáticas

Ao estudar a influência dos íons metálicos nas atividades de endoglucanase, xilanase,  $\beta$ -glicosidase,  $\beta$ -xilosidade e protease (Tabela 3), observamos modulação positiva e negativa nas atividades avaliadas.

**Tabela 3.** Efeito de íons sobre a atividade das enzimas secretadas por *A. leucospermi* LB86. Os dados estão expressos em atividade relativa, sendo que o ensaio controle (sem adição de íons) corresponde a 100% de atividade. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes

Íons (5 mM)	Endoglucanase (%)	Xilanase (%)	$\beta$ -glicosidase (%)	$\beta$ -xilosidase (%)	Protease (%)
NaCl	90,4 $\pm$ 8,4	118,9 $\pm$ 7,5	104,7 $\pm$ 2,0	97,2 $\pm$ 4,5	64,5 $\pm$ 1,4
CoCl <sub>2</sub>	86,4 $\pm$ 3,2	161,2 $\pm$ 6,8	82,7 $\pm$ 5,7	13,9 $\pm$ 3,4	187,7 $\pm$ 2,5
CuCl <sub>2</sub>	90,2 $\pm$ 7,2	142,8 $\pm$ 8,5	0,0	0,0	0,0
LiCl	86,9 $\pm$ 5,6	125,3 $\pm$ 3,1	73,5 $\pm$ 4,7	87,1 $\pm$ 7,4	87,4 $\pm$ 6,6
CdCl <sub>2</sub>	63,5 $\pm$ 5,1	81,4 $\pm$ 3,9	274,4 $\pm$ 17,8	207,9 $\pm$ 6,3	169,8 $\pm$ 6,7
MnCl <sub>2</sub>	125,1 $\pm$ 5,4	198,9 $\pm$ 6,7	0,0	0,0	101,7 $\pm$ 6,4
MgCl <sub>2</sub>	71,8 $\pm$ 2,5	106,5 $\pm$ 6,4	88,8 $\pm$ 1,2	61,4 $\pm$ 3,9	114,6 $\pm$ 10,2
HgCl <sub>2</sub>	12,4 $\pm$ 2,6	111,8 $\pm$ 5,1	0,0	0,0	0,0
BaCl <sub>2</sub>	77,6 $\pm$ 2,9	106,6 $\pm$ 5,4	0,0	31,9 $\pm$ 1,2	104,5 $\pm$ 4,7
FeCl <sub>3</sub>	63,4 $\pm$ 7,8	56,0 $\pm$ 3,2	0,0	0,0	0,0
KCl	92,7 $\pm$ 1,4	140,8 $\pm$ 5,4	92,3 $\pm$ 5,4	61,2 $\pm$ 4,2	111,1 $\pm$ 5,4
<b>Controle</b>	100,0 $\pm$ 7,1	100,0 $\pm$ 8,5	100,0 $\pm$ 1,6	100,0 $\pm$ 8,0	100,0 $\pm$ 1,2

**Fonte:** Autoria própria, 2024

Para endoglucanase, notamos uma redução significativa da atividade quando HgCl<sub>2</sub> esteve presente no meio reacional, cuja atividade remanescente foi de 12,4%. Em contrapartida, na presença de MnCl<sub>2</sub> a atividade aumentou por volta de 25%. Para a atividade de xilanase, em incubação com a maioria dos sais de cloreto, houve aumento da atividade enzimática, exceto com CdCl<sub>2</sub> e FeCl<sub>3</sub>, que causaram redução da atividade, tendo sido notada atividade residual de 81,4 e 56,0%, respectivamente. Em presença de CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> e KCl, a atividade xilanolítica aumentou, sendo MnCl<sub>2</sub> o que mais provocou aumento da atividade enzimática, na faixa de 99% (198,9%). Para  $\beta$ -glicosidase, CuCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub> e FeCl<sub>3</sub> causaram perda total da atividade, enquanto que CdCl<sub>2</sub> provocou aumento significativo na atividade enzimática, em torno de 174% (274%). Na atividade de  $\beta$ -xilosidase, detectamos algo semelhante a  $\beta$ -glicosidase, onde CdCl<sub>2</sub> causou o maior aumento da atividade enzimática, em torno de 108% (207,9%). Em contrapartida, os demais sais de cloreto reduziram a atividade de  $\beta$ -xilosidase, especialmente CuCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> e FeCl<sub>3</sub>, com os quais a atividade enzimática não foi detectada. Para protease, aumento na atividade foi notada em

presença de  $\text{CoCl}_2$  e  $\text{CdCl}_2$ , em torno de 88% (187,7%) e 70% (169,8%), respectivamente. Na contramão,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$  e  $\text{FeCl}_3$  reduziram a zero a atividade proteolítica.

Íons podem afetar a atividade enzimática por interagir com grupos amina e ácido carboxílico dos aminoácidos, resíduos catalíticos ou, também, por formarem complexos com outras moléculas ligadas as enzimas (Pereira, 2017). Por exemplo, o íon  $\text{Hg}^{2+}$  é um agente oxidante do grupo sulfidril, carboxil e de resíduos de triptofano, podendo assim provocar alterações na estrutura e atividade de enzimas (Painbeni, 1992). Isso pode indicar a importância desses grupos para as enzimas protease,  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase, uma vez que na presença  $\text{Hg}^{2+}$  houve perda total das atividades enzimáticas.

### 5.6 Efeitos dos compostos derivados do pré-tratamento da biomassa vegetal nas atividades enzimáticas

No estudo sobre o efeito da vanilina, ácido tânico, ácido gálico, furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) nas atividades de endoglucanase, xilanase,  $\beta$ -glicosidase,  $\beta$ -xilosidase e protease (Tabela 4), observamos que grande parte dos compostos influenciou o desempenho das enzimas.

**Tabela 4.** Efeito de compostos derivados do pré-tratamento da biomassa vegetal sobre a atividade das enzimas secretadas por *A. leucospermi* LB86. Os dados estão expressos em atividade relativa, sendo que o ensaio controle (sem adição de compostos inibidores) corresponde a 100% de atividade. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes

<b>Compostos inibidores (5 mM)</b>	<b>Endoglucanase (%)</b>	<b>Xilanase (%)</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidase (%)</b>	<b><math>\beta</math>-xilosidase (%)</b>	<b>Protease (%)</b>
Vanilina	92,8 ± 6,6	74,4 ± 8,5	100,5 ± 6,8	104,1 ± 5,1	8,2 ± 2,1
Ácido Gálico	89,6 ± 4,4	56,2 ± 4,3	0,0	32,7 ± 6,0	9,5 ± 5,4
Ácido Tânico	59,0 ± 6,3	66,3 ± 1,6	0,0	0,0	0,0
Furfural	116,9 ± 6,4	70,0 ± 5,8	76,9 ± 6,3	92,5 ± 2,1	0,0
HMF	76,5 ± 4,9	82,8 ± 9,7	79,4 ± 5,9	100,7 ± 3,4	0,0
<b>Controle</b>	100,0 ± 6,5	100,0 ± 8,3	100,0 ± 4,5	100,0 ± 2,3	100,0 ± 6,1

**Fonte:** Autoria própria, 2024

Para endoglucanase, o composto ácido tânico foi capaz de reduzir a atividade, deixando-a em torno de 59%, sendo dentre os compostos adicionados, o que mais diminuiu a atividade enzimática. Com os outros compostos, a atividade de endoglucanase não diminuiu mais do que de 30%, sendo notada melhora na atividade da enzima na presença de furfural. Na atividade de xilanase, há maior perda de atividade na presença do ácido gálico, deixando-a em torno de 56,2%. Em presença na atividade de  $\beta$ -glicosidase, os ácidos gálico e tânico reduziram totalmente a atividade da enzima, enquanto que na presença de vanilina, furfural e HMF, a atividade não sofreu alterações significativas. Para  $\beta$ -xilosidase, encontramos um perfil semelhante a  $\beta$ -glicosidase, onde o ácido tânico reduziu totalmente a atividade  $\beta$ -xilosídica, e o ácido gálico, mesmo que não totalmente, reduziu expressivamente a atividade da enzima, deixando em torno de 32,7%. Já na presença dos outros compostos, vanilina, furfural e HMF, a atividade não sofreu reduções acima de 10%. Na atividade proteolítica, todos os compostos reduziram a atividade da enzima, não passando de 10% a atividade na presença de vanilina e ácido gálico, e tendo sua atividade totalmente reduzida na presença de ácido tânico, furfural e HMF.

Diversos trabalhos relataram o efeito inibitório dos compostos gerados na etapa de pré-tratamento da biomassa sobre as enzimas utilizadas na conversão da biomassa vegetal. Na Tabela 4, é possível observar que os ácidos tânico e gálico foram os que apresentaram capacidade de reduzir um conjunto maior de enzimas. A atividade de residual de endoglucanase foi de 89,6% e 59% na presença de ácido gálico e ácido tânico, respectivamente. Para xilanase, na presença de ácido gálico, a atividade remanescente foi de 56,2%, e 66,3% com ácido tânico. A atividade de  $\beta$ -glicosidase não foi detectada na presença dos dois ácidos citados, enquanto as atividades de  $\beta$ -xilosidase e protease foram reduzidas à zero com ácido tânico. Nos trabalhos de Ximenes *et al.* (2011) e Mhlongo *et al.* (2015) o ácido tânico e gálico inibiram todas as atividades enzimáticas testadas. Os fénois poliméricos, como é o caso do ácido tânico, por exemplo, são bem conhecidos por formarem complexos com enzimas e as precipitarem na solução, podendo assim inibir suas atividades (Kim *et al.*, 2011). Ademais, a vanilina é capaz de inibir a atividade de enzimas celulolíticas, e em particular de  $\beta$ -glicosidasas (Ximenes *et al.*, 2010), o que difere dos resultados do presente estudo, já que na presença desse composto, as atividades de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase não foram inibidas e nem expressivamente reduzidas, ficando em torno de 92,8 e 100,5%, respectivamente.

### 5.7 Efeito do etanol nas atividades enzimáticas

A presença do etanol na concentração de 10% em pH ótimo de cada enzima e em pH 5,0 mostrou-se capaz de alterar as atividades de endoglucanase, protease, xilanase e  $\beta$ -xilosidase. Para  $\beta$ -glicosidase, em contrapartida, a presença do álcool não provocou alterações na atividade, como podemos observar na Tabela 5.

**Tabela 5.** Efeito do etanol 10% sobre a atividade das enzimas secretada por *A. leucospermi* LB86. Os dados estão expressos em atividade relativa, sendo que o ensaio controle (sem adição de etanol) corresponde a 100% de atividade. Etanol <sup>1</sup> refere-se ao ensaio em faixa de pH ótimo de cada enzima, e Etanol <sup>2</sup> ao ensaio em pH 5,0. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes

	<b>Endoglucanase</b>	<b>Protease</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidase</b>	<b><math>\beta</math>-xilosidase</b>	<b>Xilanase</b>
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>Controle</b>	100,0 $\pm$ 4,8	100,0 $\pm$ 6,8	100,0 $\pm$ 6,1	100,0 $\pm$ 3,0	100,0 $\pm$ 3,4
Etanol <sup>1</sup>	54,0 $\pm$ 3,4	16,6 $\pm$ 4,0	103,5 $\pm$ 5,1	36,5 $\pm$ 8,2	77,5 $\pm$ 5,9
<b>Controle</b>	-	-	100,0 $\pm$ 4,8	100,0 $\pm$ 7,9	100,0 $\pm$ 8,5
Etanol <sup>2</sup>	-	-	96,9 $\pm$ 4,9	106,8 $\pm$ 7,0	67,6 $\pm$ 6,5

**Fonte:** Autoria própria, 2024

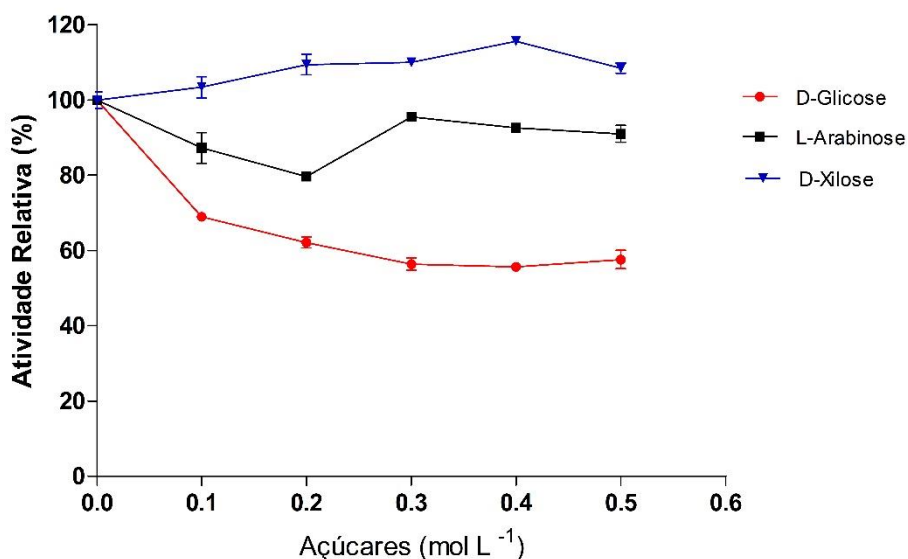
Para endoglucanase, onde seu pH ótimo já é o pH 5,0, a adição do etanol 10% diminuiu em torno de 46% a performance enzimática. Na atividade proteolítica, a presença do etanol 10% fez com a atividade reduzisse a 16,6% em seu pH ideal (pH 9,0). Em pH 5,0, o substrato utilizado para o ensaio proteolítico, caseína, não é totalmente dissolvido, por esse motivo não foi possível verificar a atividade da enzima na presença de etanol em pH 5,0. Para  $\beta$ -glicosidase, a presença do etanol 10% não provocou alterações significativas em ambos pHs, tanto em seu pH ótimo (pH 6,0) quanto em pH 5,0, apresentando-se como tolerante nessas condições ao álcool. Na atividade  $\beta$ -xilósídica, o etanol 10% em pH ótimo (pH 6,0) reduziu a atividade da enzima, fazendo com que ficasse em 36,5%. Já em pH 5,0, a atividade de  $\beta$ -xilosidase não apresenta alterações, se mostrando tolerante nessas condições. Para a atividade xilanolítica, o etanol 10% em pH ótimo (pH 6,0) fez com que a atividade reduzisse para em torno 77,5%. Em pH 5,0, a atividade reduziu mais de 30%, ficando na faixa de 67,6%.

A presença de etanol 10% na mistura de reação não alterar a atividade catalítica de  $\beta$ -glicosidase é uma característica que pode favorecer o emprego da enzima em processos fermentativos para a produção de etanol, já que, em processos tradicionais, a concentração final de etanol dos caldos fermentados obtidos gira em torno de 7-10% (Gu *et al.*, 2001). Para as atividades que foram reduzidas na presença do álcool, uma possível justificativa é que a mudança na polaridade do meio, induzida por etanol, pode ter alterado a conformação das enzimas e conseqüentemente reduziu as atividades enzimáticas (Barbagallo *et al.*, 2004).

### 5.8 Efeito de açúcares nas atividades de $\beta$ -glicosidase e $\beta$ -xilosidase

Os estudos com a presença dos açúcares D-glicose, L-arabinose e D-xilose nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 M nas atividades de  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase demonstraram que esses carboidratos podem provocar alterações na performance enzimática (Figuras 24 e 25).

**Figura 24.** Efeito dos açúcares D-Glicose, L-Arabinose e D-Xilose nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 M na atividade de  $\beta$ -glicosidase secretada por *A. leucospermi* LB86. As linhas vermelha, preta e azul se referem ao efeito de D-Glicose, L-Arabinose e D-Xilose, respectivamente, nas atividades das enzimas. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes



Fonte: Autoria própria, 2024

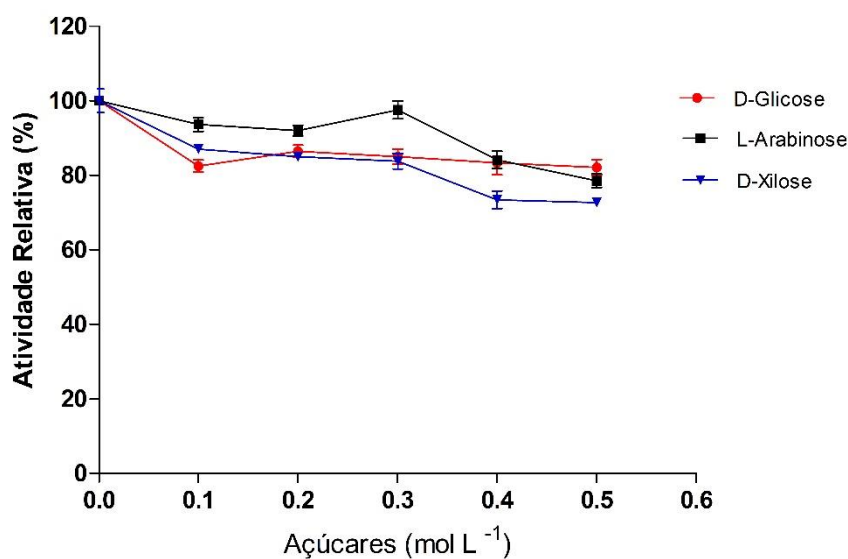
Para a atividade de  $\beta$ -glicosidase, observamos na Figura 24, na linha em vermelho, que a D-glicose inibiu a atividade da enzima desde a concentração de 0,1 M, onde a mesma foi detectada a nível de 80%. Nas outras concentrações, a queda foi contínua, onde na maior concentração, de 0,5 M, a atividade enzimática foi de 60%. Na presença de L-arabinose, em linha preta no gráfico, a atividade observada foi maior do que com D-glicose, onde para as concentrações de 0,1 e 0,2 a atividade detectada foi em torno de 80%, e nas concentrações de 0,3, 0,4 e 0,5, as atividades foram de 90%. Com a adição de D-xilose, as atividades não sofreram redução, onde observamos no gráfico na linha em azul que, na verdade, na presença desse açúcar, houve um pequeno aumento na atividade  $\beta$ -glicosídica.

A  $\beta$ -glicosidase produzida por *A. leucospermi* LB86 se mostrou mais tolerante na presença de glicose que a  $\beta$ -glicosidase produzida por *Aureobasidium pullulans* do trabalho de Baffi *et al.* 2013. Na presença de glicose em concentrações mais baixas que as utilizadas no presente estudo, 0,05 M, a  $\beta$ -glicosidase de *A. pullulans* conseguiu manter sua atividade em 60%, e na concentração mais alta de glicose utilizada, 0,4 M, a atividade foi reduzida a 20%, ao contrário da  $\beta$ -glicosidase utilizada neste trabalho, que a 0,4 M manteve 60% da sua atividade. Em contrapartida, no trabalho de Silva *et al.* 2019, a  $\beta$ -glicosidase produzida *Pichia guilliermondii* G1.2 se apresentou mais tolerante, onde na presença de glicose a 0,3 M, manteve 73% de sua atividade, enquanto que no presente estudo, a 0,3 M, a atividade ficou em 60%.

A maioria das  $\beta$ -glicosidasas é sensível à glicose, sendo inibidas na presença desse monossacarídeo. Estudos sugerem que o comprometimento da catálise enzimática na presença de glicose é devido aos sítios ativos mais expostos, o que torna a região mais acessível ao açúcar, o qual acaba exercendo efeito inibitório sobre a enzima (Giuseppe *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2015). Ter a atividade estimulada ou inibida por glicose é uma informação de suma importância, principalmente para processos de vinificação e sacarificação da celulose. Em alguns casos, a atividade  $\beta$ -glicosídica pode não ser inibida por etanol, mas amplamente reduzida por glicose. Logo, a utilização de enzimas em processos de otimização do aroma de vinho não são possíveis no mosto, mas viáveis ao final da fermentação, quando o conteúdo de glicose no vinho é consideravelmente menor e geralmente insuficiente para impossibilitar a utilização da enzima no tratamento (Gallifuoco *et al.*, 1999; Barbagallo *et al.*, 2004). O mesmo é verdade para o uso de  $\beta$ -glicosidasas como aditivo ao coquetel celulolítico para hidrólise da fibra vegetal. Enzimas pouco sensíveis à glicose, produto final da

sacarificação de celulose, é amplamente requerida para a produção de etanol de segunda geração (Vaz *et al.*, 2021).

**Figura 25.** Efeito dos açúcares D-Glicose, L-Arabinose e D-Xilose nas concentrações finais de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 M na atividade de  $\beta$ -xilosidase secretada por *A. leucospermi* LB86. As linhas vermelha, preta e azul se referem ao efeito de D-Glicose, L-Arabinose e D-Xilose, respectivamente, nas atividades das enzimas. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes



**Fonte:** Autoria própria, 2024

Em incubação com a D-glicose, linha em vermelho no gráfico, a atividade remanescente de  $\beta$ -xilosidase foi acima de 80%, não passando de 90%, em todas as concentrações deste açúcar. Com adição de L-arabinose nas condições do experimento, a atividade  $\beta$ -xilosídica não sofreu alterações significativas, com atividade acima de 90% nas concentrações de 0,1, 0,2 e 0,3 M. Em 0,4 e 0,5 M a atividade diminuiu, ficando próxima a 80%. Na presença de D-xilose, linha em azul no gráfico, a atividade registrada foi superior a 80% nas concentrações de 0,1, 0,2 e 0,3 M, apresentando uma ligeira diminuição nas concentrações de 0,4 e 0,5 M deste açúcar, próximo a 80% de atividade residual.

A atividade de  $\beta$ -xilosidase do presente estudo se mostrou mais tolerante a presença de xilose do que a  $\beta$ -xilosidase produzida por *Aureobasidium pullulans* CBS 135684 no trabalho de Bankeeree *et al.* 2018, que teve sua atividade totalmente inibida na presença de xilose a 0,055 M. Já no trabalho de Li *et al.* 2018, a  $\beta$ -xilosidase

recombinante produzida pela bactéria *Dictyoglomus thermophilum*, se apresentou menos sensível a presença de xilose, onde a 0,5 M manteve sua atividade sem alteração, ao contrário da  $\beta$ -xilosidase do presente estudo, que a 0,5, tem 80% de sua atividade.

A xilose como produto final é um inibidor bem conhecido de muitas  $\beta$ -xilosidases microbianas. Dessa maneira,  $\beta$ -xilosidases com uma menor sensibilidade à inibição da xilose tem grande potencial de aplicação, principalmente para hidrólise de hemicelulose (Terrasan; Guisan; Carmona, 2016; Bankeeree *et al.*, 2018). Uma das possíveis explicações para as  $\beta$ -xilosidases com maior tolerância à xilose pode estar ligada ao mecanismo de inibição não competitiva, onde a xilose pode se ligar à enzima em locais diferentes do sítio ativo, sem causar efeito na ligação do substrato (Jordan; Braker, 2007).

### 5.9 Hidrólise de diferentes substratos

O extrato fermentativo foi submetido a testes de reação com diferentes substratos para avaliar se apresentava atividades além das que já foram estudadas anteriormente. Para isso, utilizamos os substratos já utilizados, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo, carboximetilcelulose, xilana e caseína, e também outros substratos, como *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucosaminídeo e avicel (Tabela 6).

**Tabela 6.** Capacidade de hidrólise de diferentes substratos pelo extrato obtido por bioprocessamento em estado sólido pela levedura *A. leucospermi* LB86. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes

Substratos	Atividade enzimática (U/mL)
<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo	0,03 U/mL
<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo	0,03 U/mL
<i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo	0,03 U/mL
<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-glucosaminídeo	0,02 U/mL
Carboximetilcelulose	0,91 U/mL
Xilana	0,43 U/mL
Caseína	5,61 U/mL
Avicel	0,0

**Fonte:** Autoria própria, 2024

Observando a Tabela 6, dentre os substratos avaliados, o único substrato que o extrato não apresentou capacidade de hidrolisar foi a microcelulose cristalina Avicel. Dessa maneira, podemos inferir a ausência ou baixa quantidade de atividade de exoglucanase no extrato enzimático. Ademais, foi hidrolisado a maior parte dos substratos testados, o que pode indicar a presença de uma gama de enzimas que podem atuar na degradação de diversos substratos.

## 6.0 Produção e quantificação de etanol

A produção de etanol pela levedura *A. leucospermi* LB86 foi semelhante nos dois tempos de fermentação avaliados, 24 e 48 horas, com produção de  $0,68 \pm 0,13 \text{ g/L}^{-1}$  e  $0,65 \pm 0,13 \text{ g L}^{-1}$  de etanol, respectivamente. Com resultados próximos ao do presente estudo, no trabalho de Silva *et al.* (2023), as leveduras selvagens (*wild type*) *Pichia guilliermondii* e *Candida oleophila* produziram, respectivamente,  $0,93 \pm 1,13$  e  $0,61 \pm 0,75 \text{ g/L}^{-1}$  de etanol em 96 horas de fermentação em meio contendo xilose como único açúcar fermentescível. Já no trabalho de Zhao *et al.* (2018), foi reportado uma maior produção pela levedura mutante *Candida glycerinogenes* UG-21, com 37,2 g/L de etanol a partir da fermentação do hidrolisado de bagaço de cana não desintoxicado.

De fato, a levedura *A. leucospermi* LB86, nas condições de fermentação avaliada, não exibiu alta produção de etanol. Entretanto, os resultados de produção das glicosidases suportam futuros estudos para uso destas enzimas como aditivo a coquetéis de enzimas celulolíticas para melhoramento da degradação de fibra vegetal. Para além disso, também podemos dar continuidade aos estudos de purificação e testes de aplicação destas enzimas, especialmente para  $\beta$ -glicosidases que se mostraram tolerantes a etanol 10% e moderada tolerância a glicose. Os testes de aplicação de  $\beta$ -glicosidases podem também ser direcionados ao melhoramento do aroma de bebidas, como vinho, a fim de proporcionar a liberação de terpenos complexados com açúcares.

## 6. CONCLUSÕES

A levedura *A. leucospermi* LB86 foi capaz de crescer em CES utilizando o subproduto agroindustrial farelo de trigo como substrato;

Através do extrato enzimático obtido pelo CES, verificamos a presença de atividades para endoglucanase, xilanase,  $\beta$ -glicosidase,  $\beta$ -xilosidase e protease;

As atividades máximas em pHs ácidos para endoglucanase, xilanase,  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase podem proporcionar diversas aplicações industriais;

Para atividade proteolítica, identificamos que a levedura *A. leucospermi* LB86 utilizando o farelo de trigo como substrato produziu serino-proteases, uma vez que na presença do PMSF, a atividade foi expressivamente reduzida;

A atividade de  $\beta$ -glicosidase não ser inibida na presença de etanol 10% em seu pH ótimo e em pH 5,0 pode ser um indício de aplicação da enzima em processos fermentativos para a produção de etanol e melhoramento de aroma de bebidas, como vinho;

O extrato enzimático obtido pelo cultivo de *A. leucospermi* LB86 em farelo de trigo é fonte de uma variedade de hidrolases, onde, em futuros estudos, podem ser submetidas a expressão heteróloga, para melhoramento na produção das enzimas, realização de processos de purificação e avaliação dos citados potenciais de aplicação destas enzimas.

## REFERÊNCIAS

ADSUL, Mukund. G. *et al.* Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. **Bioresour Technol**, v. 102, p. 4304 - 4312, 2011.

AGGER, Jane. *et al.* Enzymatic xylose release from pretreated corn bran arabinoxylan: differential effects of deacetylation and deferuloylation on insoluble and soluble substrate fractions. **J Agric Food Chem**, v. 58, p. 6141 - 6148, 2010.

AGRAWAL, Ruchi. *et al.* Bioresource Technology Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 332, p. 125042, 2021.

AGUIAR, André. *et al.* Sugarcane straw as a potential second generation feedstock for biorefinery and white biotechnology applications. **Biomass and Bioenergy**, v. 144, p. 105896, 2021.

AGUIAR, André.; FERRAZ, André. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, 2011.

AGUILAR, Jessika. G. S.; SATO, Hélio. H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.

ALCIDES, Mayara.; OLIVEIRA, Leonardo.; BAGAGLI, Marcela. Estudo da produção de exopolissacarídeo solúvel de kefir de água. **Revista Brasileira de Iniciação Científica (RBIC)**, v. 7, n. 4. Brasil, 2020.

ALJAMMAS, Houthail. A.; ALKHALAF, Hassan. A. F. W. Study the influence of culture conditions on rennin production by *Rhizomucor miehei* using soli-state fermentation. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.16, p. 213-216, 2018.

ALONSO, Esther. The role of supercritical fluids in the fractionation pretreatments of a wheat branbased biorefinery. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, p. 603-614, 2018.

ALVAREZ, Consolación. *et al.* Enzymatic hydrolysis ofbiomass from wood. **Microbial Biotech.** v.9, p. 149 - 156, 2016.

ANDERSEN, Natalija. Enzymatic hydrolysis of cellulose: experimental and modeling studies. Ph.D. Thesis. **Technical University Of Denmark**, 2007.

ANWAR, Adil.; SALEEMUDDIN, Mohammed. Alkaline proteases: a review. **Bioresource technology**, v. 64, n. 3, p. 175-183, 1998.

ARYA, Prashant. S. *et al.* Valorization of agro-food wastes: Ease of concomitant-enzymes production with application in food and biofuel industries. **Bioresource technology**, v. 361, p. 127738, 2022.

ASHKAN, Zahra. *et al.* A. Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials: An update. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 708-721, 2021.

ATY, Abeer. A. A. E. *et al.* Thermodynamics characterization and potential textile applications of *Trichoderma longibrachiatum* KT693225 xylanase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 129-137. 2018.

BACHA, Carolina B. **Determinação do teor de lignina em amostras de gramíneas ao longo do crescimento através de três métodos analíticos e implicações com as equações de "Cornell Net Carbohydrate and Protein System"**. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

BAFFI, Milla A. *et al.* Wine aroma improvement using a  $\beta$ -glucosidase preparation from *Aureobasidium pullulans*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 169, p. 493-501, 2013.

BANKEEREE, Wichanee *et al.* Enzymatic hydrolysis of black liquor xylan by a novel xylose-tolerant, thermostable  $\beta$ -xylosidase from a tropical strain of *Aureobasidium pullulans* CBS 135684. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 184, p. 919-934, 2018.

BARBAGALLO, Riccardo. N. *et al.* Selection, characterization and comparison of  $\beta$ -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 1, p. 58-66, 2004.

BARBOSA, Luiz. C. A. *et al.* Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI CG/EM). **Química Nova**, v. 31, p. 2035-2041, 2008.

BHADRA, Bhaskar. *et al.* Yeasts and Yeast-Like Fungi Associated with Tree Bark: Diversity and Identification of Yeasts Producing Extracellular Endoxylanases. **Yeast Biodiversity**, v. 56, p. 489-494, 2008.

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

BIELY, Peter.; VRSANSKÁ Maria.; KRÁTKÝ, Zdeněk. Degrading Enzymes of the Yeast *Cryptococcus albidus*: Identification and Cellular Localization. **European journal of biochemistry**, v. 108, n. 1, p. 313-321, 1980.

BILAL, Muhammad.; IQBAL, Hafiz. M. Sustainable bioconversion of food waste into high-value products by immobilized enzymes to meet bio-economy challenges and opportunities-A review. **Food Research International**, v. 123, p. 226-240, 2019.

BRANDÃO, Verônica. C. M. *et al.* Increased Expression Levels of Metalloprotease, Tissue Inhibitor of Metalloprotease, Metallothionein, and p63 in Ectopic Endometrium: An Animal Experimental Study. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 40, p. 705-712, 2018.

CAMPAYO, Vicenta G.; WOOD, Thomas. M. Purification and characterisation of a  $\beta$ -D-xylosidase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. **Carbohydrate research**, v. 242, p. 229-245, 1993.

CANTAREL, Brandi. L. *et al.* The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl\_1, p. D233-D238, 2009.

CAO, Li. C. *et al.* Engineering a novel glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase as supplementation to enhance the hydrolysis of sugarcane bagasse at high glucose concentration. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2015.

CARVALHO, Ana. F. A. *et al.* Xylooligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, p. 75–85, 2013.

CASTRO, Aline. M. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, n.1, p.181-188, 2010.

CERTREM, Tecnologia de massas. Centro Regional de Treinamento em Moagem e Panificação. **Fortaleza-CE**. v.1, p.34 .2004.

CHADHA, Bhupinder. S.; RAI, Rohit.; MAHAJAN, Chhavi. Hemicellulases for lignocellulosics-based bioeconomy. In: *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels*. **Academic Press**, p. 427-445. 2019.

CHAMPREDA, Verawat. *et al.* Designing cellulolytic enzyme systems for biorefinery: From nature to application. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 128, n. 6, p. 637–654, 2019.

CHOUDHARY, Jairam.; SINGH, Surender.; NAIN, Lata. Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation

from diverse environments. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 123, n. 3, p. 342-346, 2017.

COMLEKCIOGLU, Ugur. *et al.* Application of recombinant xylanase from *Orpinomyces* sp. in elemental chlorinefree bleaching of kraft pulps. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 19, n. 1, p. 8941- 8950, 2014.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Série Histórica das Safras**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras/itemlist/category/913-trigo>. Acesso em: 17 de mar 2023.

CORDEIRO, Márcio. A. **Estudo da hidrólise enzimática do caroço de açaí (Euterpe oleraceae Mart) para a produção de etanol**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal Do Pará, Pará, 2016.

DELCROIX, Agnès. *et al.* Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking: effect on the terpenol content of Muscat wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 45, n. 3, p. 291-296, 1994.

DENTI, Andressa. F. Tecnologia enzimática: classificação, imobilização, suportes e aplicações. **Revista Perspectiva**, v. 45, n. 171, p. 97-110, 2021.

DI FRANCESCO, Alessandra.; ZAJC, Janja.; STENBERG, Johan. A. *Aureobasidium* spp.: Diversity, Versatility, and Agricultural Utility. **Horticulturae**, v. 9, n. 1, p. 59, 2023.

FALCK, Peter. *et al.* Xylooligosaccharides from hardwood and cereal xylans produced by a thermostable xylanase as carbon sources for *Lactobacillus brevis* and *Bifidobacterium adolescentis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 30, p. 7333-7340, 2013.

FALKOSKI, Daniel. L. *et al.* Characterization of Cellulolytic Extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and Its Application in Biomass Saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 1586–1603, 2013.

FASIM, Aneesa.; MORE, Veena. S.; MORE, Sunil. S. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 68-76, 1 jun. 2021.

FUNGORUM. Cabi Database Index Fungorum 2022. Disponível em: <http://www.speciesfungorum.org/>. Acesso em: 22 de mar 2023.

GALLIFUOCO, Alberto. *et al.* Immobilized  $\beta$ -glucosidase for the winemaking industry: study of biocatalyst operational stability in laboratory-scale continuous reactors. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 179-185, 1999.

GAO, Jianmin. *et al.* Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7623–7629, 2008.

GERMEC, Mustafa.; OZCAN, Ali.; TURHAN, Irfan. Bioconversion of wheat bran into high valueadded products and modelling of fermentations. **Industrial Crops and Products**, v. 139, p. 111565, 2019.

GÍRIO, Francisco. M., *et al.* Bioresource Technology Hemicelluloses for fuel ethanol: A review **Bioresource Technology**, 101(13), 4775–4800. 2010.

GIUSEPPE, Priscila. O. *et al.* Structural basis for glucose tolerance in GH1  $\beta$ -glucosidases. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 70, n. 6, p. 1631-1639, 2014.

GOPINATH, Subash. C. B. *et al.* Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

GU, Yasong. *et al.* Hyperproduction of Alcohol Using Yeast Fermentation in Highly Concentrated Molasses Medium. Tsinghua Science and Technology. **Tsinghua University**, v. 6, n. 3, p. 225-230, 2001.

GUIMARÃES, Nelciele. C. A. *et al.* Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate. **SpringerPlus Journal**, v. 2, p. 1-7, 2013.

GUNATA, Yusuf. Z. Recherches sur la fraction liee de nature glycosidique del'arome du raisin: importance des terpenylglycosides, action des glycosidases. **These, Université Montpellier, France**, 1984.

GURUMALLESH, Poorani. *et al.* A systematic reconsideration on proteases. **International journal of biological macromolecules**, v. 128, p. 254-267, 2019.

GUSAKOV, Alexander. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 419-425, 2011.

HORN, Svein. J. *et al.* Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5-45, p. 2-12, 2012.

JIANG, Ning.; FAN, Xinlei.; TIAN, Chengming. Identification and characterization of leaf-inhabiting fungi from castanea plantations in China. **Journal of Fungi**, v.7, p.64. 2021.

JIANG, Yujia. *et al.* Current status and perspectives on biobutanol production using lignocellulosic feedstocks. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100245, 2019.

JORDAN, Douglas B.; BRAKER, Jay D. Inhibition of the two-subsite  $\beta$ -D-xylosidase from *Selenomonas ruminantium* by sugars: competitive, noncompetitive, double binding, and slow binding modes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 465, n. 1, p. 231-246, 2007.

JOURDIER, Etienne. *et al.* Cellulase activity mapping of *Trichoderma reesei* cultivated in sugar mixtures under fed-batch conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2013.

KANG, Sung. *et al.* Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 2, 110 p. 153–156, 2004.

KATSIMPOURAS, Constantinos.; STEPHANOPOULOS, Gregory. Enzymes in biotechnology: Critical platform technologies for bioprocess development. **Current Opinion in Biotechnology**. Elsevier Current Trends, v. 69, p. 91-102. 2021.

KIM, Youngmi *et al.* Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. **Enzyme and microbial technology**, v. 48, n. 4-5, p. 408-415, 2011.

KOCABAŞ, Didem. S.; LYNE, John.; USTUNOL, Zeynep. Hydrolytic enzymes in the dairy industry: Applications, market and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 467-475, 2022.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, Hiroshi. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. **Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 561-594, 1999.

KUMAR, Sudeep., RAMÓN, Daniel. Purification and regulation of the synthesis of a b-xylosidase from *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology Letters** Amsterdam, v.135, p.287-293, 1996.

LACHANCE, Marc-André. *et al.* *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. **Canadian journal of microbiology**, v. 45, n. 2, p. 172- 177, 1999.

LEATHERS, Timothy. D. Color variants of *Aureobasidium pullulans* overproduce xylanase with extremely high specific activity. **Apply Environmental Microbiology**. v. 52, p.1026-1030, 1986.

LEE, Dong-Hyeon. *et al.* A novel species of *Aureobasidium* (Dothioraceae) recovered from *Acer pseudosieboldianum* in Korea. **Journal of Asia-Pacific Biodiversity**, v.14, p.657–661. 2021.

LEITE, Rodrigo. S. R. *et al.* Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidase produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.43, p.391-395, 2008.

LEITE, Rodrigo. S. R. *et al.* Production of Cellulolytic and Hemicellulolytic Enzymes from *Aureobasidium pulluans* on Solid State Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, p. 281-288, 2007.

LI, Qi *et al.* Characterization of a novel thermostable and xylose-tolerant GH 39  $\beta$ -xylosidase from *Dictyoglomus thermophilum*. **BMC biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2018.

LI, Xin. L. *et al.* Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 3212-3218, 1993.

LIU, Guodong. *et al.* Development of highly efficient, low-cost lignocellulolytic enzyme systems in the post-genomic era. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 962-975, 2013.

LOMBARD, Vincent *et al.* The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic acids research**, v. 42, n.1, p.490-495, 2014.

LYND, Lee. R. *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MA, X. Chunling. *et al.* Purification and characterization of an alkaline protease from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* for bioactive peptide production from different sources. **Marine Biotechnology**, v. 9, p. 343-351, 2007.

MAITAN, Gabriela. P. **Produção, purificação e caracterização de  $\beta$ -glicosidases livre e imobilizada de *Debaryomyces hansenii***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

MAO, Lei. *et al.* Wheat bran addition improves *Ceriporiopsis subvermispora* and *Lentinula edodes* growth on wheat straw, but not delignification. **Animal Feed Science and Technology**, v. 259, p. 114361, 2020.

MARTINS, Gisele. M. *et al.* The isolation of pentose-assimilating yeasts and their xylose fermentation potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 162-168, 2018.

MARZO, Cristina. *et al.* Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. **Waste Management and Research**, v. 37, n. 2, p. 149–156, 2019.

MEYERS, S. P.; AHEARN, D. G. Extracellular proteolysis by *Candida lipolytica*. **Mycologia**, v. 69, p. 646-651, 1977.

MHLONGO, Sizwe. *et al.* Lignocellulosic hydrolysate inhibitors selectively inhibit/deactivate cellulase performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 81, p. 16–22, December 2015 2015.

MILLER, Gail. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOREIRA, Leonora. R. S. *et al.* Two  $\beta$ -xylanases from *Aspergillus terreus*: characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 46-52, 2013.

MORSLED, Mohammad. N. *et al.* An overview on biocatalysts immobilization on textiles: Preparation, progress and application in wastewater treatment. **Chemosphere**, v. 279, p. 130481, 2021.

NAGAR, Sushil. *et al.* Hyper production of alkali stable xylanase in lesser duration by *Bacillus pumilus* SV85S using wheat bran under solid state fermentation. **New biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 581-587, 2011.

NAVEED, Muhammad. *et al.* Protease a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. **Catalysis Letters**, v. 151, n. 2, p. 307-323, 2021.

NAWEL, Boucherba. *et al.* Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 519-525, 2011.

NAZIR, Asiya. *et al.* Purification and characterization of an endoglucanase from *Aspergillus terreus* highly active against barley  $\beta$ -glucan and xyloglucan. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1189-1197, 2009.

NELSON, George.; YOUNG, Thomas W. Extracellular acid and alkaline proteases from *Candida olea*, **Microbiology**. v. 133, n. 6, p. 1461-1469, 1987.

OHTA, Kazuyoshi. *et al.* Cell-associated  $\beta$ -xylosidase from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524: Purification, properties, and characterization of the encoding gene. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 110, n. 2, p. 152-157, 2010.

OKOLIE, Jude. A., *et al.* Chemistry and Specialty Industrial Applications of Lignocellulosic Biomass. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, p. 2145-2169, 2021.

ONIPE, Oluwatoyin. O.; JIDEANI, Afam. I.; BESWA, Daniso. Composition and functionality of wheat bran and its application in some cereal food products. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 12, p. 2509-2518, 2015.

ORLANDELLI, Ravelly. C. *et al.* Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.

PAINBENI, Eric *et al.* Purification and characterization of a *Bacillus polymyxa* beta-glucosidase expressed in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 9, p. 3087-3091, 1992.

PAPINUTTI, Leandro.; FORCHIASSIN, Flavia. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 54–59, 2007.

PEREIRA, Josiani C. *et al.* Effect of metal ions, chemical agents and organic compounds on lignocellulolytic enzymes activities. **Enzyme inhibitors and activators**, v. 29, p. 139-164, 2017.

PINTO, Raquel. R. **Balço de massa do processo de produo de farinha de trigo**. Trabalho de diplomao em Engenharia Quimica - Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, 2010.

POLIZELI, Maria D. L. T. D. M. *et al.* Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.

PRASAD, Rajesh K. *et al.* Bioethanol production from waste lignocelluloses: A review on microbial degradation potential. **Chemosphere**, v. 231, p. 588-606, 2019.

PRASAD, Shivcharan.; ROY, Ipsita. Converting enzymes into tools of industrial importance. **Recent patents on biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 33-56, 2018.

PRUECKLER, Michael. *et al.* Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. **LWT-Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 211- 221, 2014.

PURUSHOTHAMAN, Kavya. *et al.* Aspartic protease-pepstatin An interactions: Structural insights on the thermal inactivation mechanism. **Biochimie**, v. 189, p. 26-39, 2021.

RAO Mala. B. *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RICARDINO, Isadora. E. F.; SOUZA, Maria. N. C.; SILVA, Irineu. F. N. Vantagens e Possibilidades do reaproveitamento de resíduos agroindustriais. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 1, n. 8, p. 55-79, 2020.

RODRÍGUEZ-LEÓN, Jose. A. *et al.* Kinetics of the solid-state fermentation process. **Current developments in biotechnology and bioengineering**, p. 57-82. 2018.

ROMERO, Amadeu. M.; MATEO, Jose. J.; MAICAS, Sergi. Characterization of an ethanol-tolerant 1, 4- $\beta$ -xylosidase produced by *Pichia membranifaciens*. **Letters in applied microbiology**, v. 55, n. 5, p. 354-361, 2012.

RUBIN, Edward. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 841-845, 2008.

RULLER, Roberto.; DELIBERTO, Laila.; FERREIRA, Tatiana. L.; WARD, Richard. J. Thermostable variants of the recombinant xylanase A from *Bacillus subtilis* produced by directed evolution show reduced heat capacity changes. **Proteins**, v. 70, n. 4, p. 1280-1293, 2008.

RYTIOJA, Johanna. *et al.* Plant-PolysaccharideDegrading Enzymes from Basidiomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 614-649, 2014.

SADH, Pardeep. K.; DUHAN, Surekha.; DUHAN, Joginder. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2018.

SAHA, Badal. C. Hemicellulose bioconversion. **Microbiol Biotechnol**, v. 30, p. 279 - 291, 2003.

SAHA, Badal. C.; COTTA, Michael. A. Enzymatic hydrolysis and fermentation of lime pretreated wheat straw to ethanol. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.82, p. 913-919, 2007.

SAINI, Anita. *et al.* Actinomycetes: a source of lignocellulolytic enzymes. **Enzyme research**, v. 2015, 2015.

SANDRIM, Valeria. *et al.* Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1823-1828, 2005.

SANTOS, Flávia. R. S. **Produção e caracterização de celulases e hemicelulases por linhagens fúngicas mesófilas isoladas do cerrado sul-mato-grossense**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Aniaml) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2014.

SARAIVA, Bianka. *et al.* Valorização de resíduos agroindustriais: fontes de nutrientes e compostos bioativos para a alimentação humana. **PubSaúde**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2018.

SARRY, Jean. E.; GUNATA, Ziya. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. **Food Chemistry**, v. 87, n. 4, p. 509-521, 2004.

SCHELLER, Henrik V.; ULVSKOV, Peter. Hemicelluloses. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 263-289, 2010.

SCHEUER, Patrícia. M. *et al.* Review trigo: características e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.13, n.2, p.211-222, 2011.

SILVA Ronivaldo. R.; PEDEZZI Rafael.; SOUTO Tatiane. B. Exploring the bioprospecting and biotechnological potential of white-rot and anaerobic Neocallimastigomycota fungi: peptidases, esterases, and lignocellulolytic enzymes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, p. 3089-3101, 2017.

SILVA, La.; TERRASAN, César. R. F.; CARMONA, Eleonora. C. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 307-313, 2015.

SILVA, Pedro. L. B. **Avaliação do perfil de enzimas hemicelulolíticas de duas espécies de *Aureobasidium***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2020.

SILVA, Roberto. *et al.* Production of Xylanase and CMCCase on Solid State Fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 235-241, 2005.

SILVA, Ronivaldo R. *et al.* Xylose consumption and ethanol production by *Pichia guilliermondii* and *Candida oleophila* in the presence of furans, phenolic compounds, and organic acids commonly produced during the pre-treatment of plant biomass. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-7, 2023.

SILVA, Ronivaldo. R. *et al.* Biochemical characteristics and potential application of a novel ethanol and glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase secreted by *Pichia guilliermondii* G1.2. **Journal of Biotechnology**, v. 294, p. 73-80, 2019.

SILVA, Ronivaldo. R. *et al.* Milk clotting and storage-tolerant peptidase from *Aureobasidium leucospermi* LB86. **Process Biochemistry**, v. 85, p. 206-212, 2019.

SOCCOL, Carlos. R. *et al.* Lignocellulosic bioethanol: current status and future perspectives. **Biofuels**, p. 331-354, 2019.

SOCCOL, Carlos. R. *et al.* Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52-71, 2017.

SOUZA, Paula. M. *et al.* Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1103-1110, 2017.

SRIVASTAVA, Neha. *et al.* Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386, 2018.

SUTAY KOCABAŞ, Didem.; LYNE, John.; USTUNOL, Zeynep. Hydrolytic enzymes in the dairy industry: Applications, market and future perspectives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 119, p. 467–475, 2022.

SWENNEN, Katrien.; COURTIN, Cristophe. M.; DELCOUR, Jan. A. Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 46, n. 6, p. 459-471, 2006.

TAKAMI, Hideto.; AKIBA, Teruhiko.; HORIBOSHI, Koki. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 120-124, 1989.

TERRASAN, César R. F.; GUISAN, José. M.; CARMONA, Eleonora. C. Xylanase and  $\beta$ -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: Purification, characterization and hydrolysis of substrates. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 54-62, 2016.

THAKUR, Neha.; GOYAL, Meghna.; SHARMA, S.; KUMAR, Dinesh. Proteases: Industrial applications and approaches used in strain improvement. **Biological Forum—An International Journal**, v. 10, n. 1, p. 158-167, 2018.

TRABELSI Sahar; B.E. S. *et al.* The optimized production, purification, characterization, and application in the bread making industry of three acid-stable alpha-amylases isoforms from a new isolated *Bacillus subtilis* strain US586. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1–13, 2019.

TUYSUZ, Elanur. *et al.* Co-production of amylase and protease by locally isolated thermophilic bacterium *Anoxybacillus rupiensis* T2 in sterile and non-sterile media using waste potato peels as substrate. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, p. 6793-6802, 2020.

VALÁSKOVÁ, Vendula.; BALDRIAN, Petr. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* – production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. **Microbiology**, v. 152, n. 12, p. 3613-3622, 2006.

VAN NIEUWENHUIJZEN, Elke. J. *Aureobasidium*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, 2nd ed.; Academic press: Cambridge, MA, USA, pp. 105–109. 2014.

VAZ, Jaqueline. E. et al. Functional properties and potential application of ethanol tolerant  $\beta$ -glucosidases from *Pichia ofunaensis* and *Trichosporon multisporum* yeasts. **3 Biotech**, v. 11, p. 1-12, 2021.

VAZ, Jaqueline. E. et al. Functional properties and potential application of ethanol tolerant  $\beta$ -glucosidases from *Pichia ofunaensis* and *Trichosporon multisporum* yeasts. **3 Biotech**, v. 11, p. 1-12, 2021.

VERMA, Nitin.; KUMAR, Vivek.; BANSAL, Mukesh. C. Utility of *Luffa cylindrica* and *Litchi chinensis* peel, an agricultural waste biomass in cellulase production by *Trichoderma reesei* under solid state cultivation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 483-492, 2018.

WADA, Masahisa.; IKE, Masakazu.; TOKUYASU, Ken. Enzymatic hydrolysis of cellulose I is greatly accelerated via its conversion to the cellulose II hydrate form. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 4, p. 543-548, 2010.

WANG, Meizhu. et al. Comparative pathogenicity of opportunistic black yeasts in *Aureobasidium*. **Mycoses**, 62, 803–811. 2019.

WOICIECHOWSKI, Adenise. et al. Emprego de Resíduos Agroindustriais em Bioprocessos Alimentares. **Biotecnologia de Alimentos**, v. 1, p. 143-171, 2013.

WOODWARD, Jonathan.; WISEMAN, Alan. Fungal and other  $\beta$ -D-glucosidases – their properties and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, p. 73-79, 1982.

XIE, Jiayu.; ZHANG, Yi.; SIMPSON, Benjamin. Food Enzymes Immobilization: Novel Carriers, Techniques and Applications. **Food Science**, v. 43, p. 1-9, 2022.

XIMENES, Eduardo. *et al.* Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and microbial technology**, v. 48, n. 1, p. 54-60, 2011.

YEGIN, Sirma.; ALTINEL, Burak.; TULUK, Kubra. A novel extremophilic xylanase produced on wheat bran from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1: Effects on dough rheology and bread quality. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 389-397. 2018.

ZALAR, Poloma. *et al.* Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties **Studies in mycology**, v. 61, n. 1, p. 21-38, 2008.

ZHANG, Y.-H. P.; HIMMEL, Michael. E.; MIELENZ, Jonathan R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.

ZHANG, Yi. *et al.* Trends in nanozymes development versus traditional enzymes in food science. **Current Opinion in Food Science**, v. 37, p. 10-16, 2021.

ZHAO, Meilin *et al.* Ethanol fermentation from non-detoxified lignocellulose hydrolysate by a multi-stress tolerant yeast *Candida glycerinogenes* mutant. **Bioresource technology**, v. 273, p. 634-640, 2019.