



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia**

**GIÓRGIA SILVESTRE BARBIERI**

**Avaliação da produção de xilanases em cultivo submerso de  
*Talaromyces amestolkiae* empregando resíduos agroindustriais**

**Araraquara, SP**

**2022**

**GIÓRGIA SILVESTRE BARBIERI**

**Avaliação da produção de xilanases em cultivo submerso de  
*Talaromyces amestolkiae* empregando resíduos agroindustriais**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma

**Araraquara, SP**

**2022**

---

**B236a** Barbieri, Giórgia Silvestre.  
Avaliação da produção de xilanases em cultivo submerso de  
*Talaromyces amestolkiae* empregando resíduos agroindustriais / Giórgia  
Silvestre Barbieri. – Araraquara: [S.n.], 2022.  
69 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação - Engenharia de  
Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de  
Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Área de  
Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Valéria de Carvalho Santos Ebinuma.

1. Xilanase. 2. *Talaromyces amestolkiae*. 3. Hidrólise enzimática. 4.  
Cultivo submerso. 5. Resíduos agroindustriais. I. Ebinuma, Valéria de  
Carvalho Santos, orient. II. Título.

## **Epígrafe**

“Ao verme que primeiro roeu as frias carnes do meu cadáver dedico como saudosa lembrança esta memória póstuma. ”

Machado de Assis

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a minha orientadora Valéria por todo o apoio que vem me dando, para minha formação tanto técnica quanto pessoal: desde os primeiros treinamentos no laboratório em meados de 2016, passando pelos pedidos sucedidos de bolsas (duas bolsas CNPq), ajuda financeira em congressos e atualmente por todo o apoio na minha carreira;

Às agências de fomento (CNPq, CAPES e FAPESP) por ter tornado esse projeto possível;

Aos outros membros do BioPPul que também foram de extrema importância e sempre se mostraram solícitos com as minhas dúvidas e, na minha pesquisa no geral, como os outros ICs e pós graduandos: Ana Clara, Fernanda, Mariana, Agnes;

Às minhas amigas da faculdade, especialmente as Letícias e a Naiara, pela amizade em todos esses anos e compartilhamento de derrotas, fracassos e sucessos;

Aos meus amigos de longa data que não pretendo citar nomes pois com certeza vou deixar alguém de fora sem querer;

Aos meus ex's que me relacionei durante esses quase 8 anos de graduação e que me apoiaram e ouviram meus desabafos;

Aos meus amigos da Agrivalle;

Aos meus amigos da Apoena;

Aos meus pais, sem eles eu com certeza teria feito outro curso mais fácil e teria formado em menos de 8 anos;

## Resumo

Em geral, resíduos agroindustriais podem ser facilmente assimilados por vários microrganismos devido a sua composição, como açúcares. Infelizmente, eles são frequentemente descartados no meio ambiente e, conseqüentemente, causam diversos impactos. Portanto, como esses materiais são mais baratos e ecologicamente amigáveis, eles podem ser apropriados para uso como matérias-primas na biorrefinaria, incluindo a produção de enzimas hidrolíticas com aplicações industriais. Nesse trabalho, a produção de xilanases pelo fungo filamentosso *Talaromyces amestolkiae* usando cinco resíduos agroindustriais (farelo de trigo, farelo de arroz, polpa cítrica, pele de amendoim e casca de amendoim) foi estudada. Primeiramente, os resíduos citados foram caracterizados em termos de celulose, xilana, lignina e extrativos. O meio de cultura usando farelo de trigo gerou a maior atividade enzimática ( $5,4 \text{ U.mL}^{-1}$ ), provavelmente devido ao alto teor de xilana encontrado nesse subproduto. Em seguida, um planejamento experimental completo foi realizado para avaliar as variáveis independentes extrato de levedura, farelo de trigo,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e pH, visando incrementar a variável resposta, atividade enzimática de xilanase. A maior produção de xilanase foi obtida nos pontos centrais ( $20 \text{ g.L}^{-1}$  farelo de trigo,  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  extrato de levedura,  $3 \text{ g.L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$  e pH 7,0):  $13,02 \text{ U.mL}^{-1}$ , 141% mais alta que a obtida anteriormente. O tempo de cultivo foi estudado usando a melhor condição e, o período entre 120 e 144 h promoveu a maior atividade de xilanase. A enzima foi caracterizada em termos de pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade e peso molecular. Os resultados foram: pH ótimo de 4,0, temperatura ótima de 50 a  $60^\circ\text{C}$  e peso molecular entre 25 e 35 kDa. Além da produção e caracterização, a enzima foi aplicada para a produção de xilooligossacarídeos, usando xilana comercial e bagaço da cana-de-açúcar como substratos. A enzima foi eficiente para converter a xilana comercial em xilose, xilobiose e xilotriose. Portanto, resíduos agroindustriais com alto teor de xilana podem ser usados como meio de cultura para a produção de xilanases de forma econômica e sustentável e, a enzima produzida nessas condições pode ser aplicada em processos de hidrólise.

**Palavras-chave:** xilanase, *Talaromyces amestolkiae*, hidrólise enzimática, cultivo submerso, resíduos agroindustriais

## Abstract

In general, agro-industrial byproducts can be easily assimilated by various microorganisms due to their composition composed basically of sugars. Unfortunately, these byproducts are often disposed into the environment and consequently, cause several impacts. Therefore, since they are cheaper and eco-friendly materials, they could be appropriate for use as raw materials in the bio-refinery concept, including the production of hydrolytic enzymes with industrial applicability. In this work, the xylanase production by the filamentous fungi *Talaromyces amestolkiae* using five agro-industrial byproducts, (wheat bran, rice bran, citrus pulp, peanut skin, and peanut shell) was studied. Firstly, the aforementioned byproducts were characterized in terms of cellulose, xylan, lignin, and extractives. The culture medium using wheat bran generated the highest enzymatic activity ( $5.4 \text{ U.mL}^{-1}$ ), probably because of a high amount of xylan available in this by-product. Subsequently, a factorial design was performed evaluating the independent variables yeast extract, wheat bran,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , and pH under the variable response, xylanase activity. The highest xylanase production was obtained in the central point ( $20 \text{ g.L}^{-1}$  wheat bran,  $2.5 \text{ g.L}^{-1}$  yeast extract,  $3 \text{ g.L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , and pH 7):  $13.02 \text{ U.mL}^{-1}$ , 141% higher than the initial one. The cultivation time was studied using the best condition, and the period between 120 and 144 h promoted the highest xylanase activity. Following, the enzyme was characterized in terms of optimum pH, optimum temperature, enzyme stability, and molecular weight. The results were: optimum pH of 4.0, optimum temperature of  $50 - 60^\circ\text{C}$ , and molecular weight between 25 and 35 kDa. Besides the production and characterization, the enzyme was applied to xylooligosaccharides production, using commercial xylan and sugar cane bagasse as substrate. The enzyme was effective to convert the commercial xylan into xylose, xylobiose, and xylotriose. Thus, industrial byproducts with a high amount of xylan can be used as a culture medium to produce xylanases enzymes economically and sustainably, and the enzyme produced in those conditions can be applied to the hydrolysis process.

**Keywords:** xylanase, *Talaromyces amestolkiae*, enzymatic hydrolysis, submerged cultivation, agroindustrial byproducts

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> – Esquema da organização da estrutura lignocelulósica de plantas evidenciand principais moléculas presentes e sua disposição dentro da célula vegetal.....                                                                                                        | 14 |
| <b>Figura 2</b> - Estrutura hipotética da xilana e das enzimas envolvidas na sua degradação. Ac: grupo acetil.....                                                                                                                                                                | 15 |
| <b>Figura 3</b> – Tipos de resíduos agroindustriais produzidos pela agricultura e indústria.....                                                                                                                                                                                  | 16 |
| <b>Figura 4</b> – Integração de processos numa biorrefinaria exemplificando alguns dos produtos gerados direta e indiretamente.....                                                                                                                                               | 23 |
| <b>Figura 5</b> – Possíveis abordagens e caminhos para a otimização de um processo.....                                                                                                                                                                                           | 25 |
| <b>Figura 6</b> – Frente e verso da placa do fungo filamentosso <i>T. amestolkiae</i> em BDA (batata dextrose ágar) suplementado com extrato de levedura após 7 dias de crescimento. ....                                                                                         | 27 |
| <b>Figura 7</b> - Atividade de xilanases (U.mL <sup>-1</sup> ) obtida por cultivo submerso de <i>T. amestolkiae</i> (7 dias, 30°C, 150 rpm) empregando diferentes resíduos. As barras de erro representam o desvio padrão da triplicata. ....                                     | 42 |
| <b>Figura 8</b> - Diagrama de Pareto indicando a significância das variáveis estudadas.....                                                                                                                                                                                       | 44 |
| <b>Figura 9</b> - Atividade enzimática para a xilanase obtida ao longo do cultivo de <i>T. amestolkiae</i> durante 10 dias (240 h) nas condições do ponto central do planejamento experimental 2 <sup>4</sup> . As barras de erro representam o desvio padrão da triplicata. .... | 45 |
| <b>Figura 10</b> - Atividade enzimática obtida para cada ensaio testando a xilana e solução de sais. As barras de erro representam o desvio padrão da triplicata. ....                                                                                                            | 46 |
| <b>Figura 11</b> – pH (A) e temperatura (B) ótimos das enzimas xilanases produzidas por cultivo submerso <i>T. amestolkiae</i> . As barras de erro representam o desvio padrão da triplicata.....                                                                                 | 47 |
| <b>Figura 12</b> - Estabilidade da enzima xilanase produzida por <i>T. amestolkiae</i> em diferentes valores de pH a 30°C.....                                                                                                                                                    | 49 |
| <b>Figura 13</b> - Estabilidade da enzima xilanase produzida por <i>T. amestolkiae</i> em diferentes temperaturas em Tampão McIlvaine pH 4. ....                                                                                                                                  | 49 |
| <b>Figura 14</b> - Perfil PAGE-SDS de meio fermentado de <i>Talaromyces amestolkiae</i> . ....                                                                                                                                                                                    | 51 |
| <b>Figura 15</b> - Conversão da hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar com uma carga inicial de 3% (m/v) em xilose, xilobiose e xilotetose.....                                                                                                                                 | 53 |
| <b>Figura 16</b> - Conversão da hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar com uma carga inicial de 6% (m/v) em xilose, xilobiose e xilotetose.....                                                                                                                                 | 54 |
| <b>Figura 17</b> - Conversão da hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar com uma carga inicial de 9% (m/v) em xilose e xilobiose. ....                                                                                                                                            | 54 |
| <b>Figura 18</b> - Conversão da xilana comercial com uma carga inicial de 3% (m/v) em xilose, xilobiose e xilotriose.....                                                                                                                                                         | 55 |
| <b>Figura 19</b> - Cromatogramas de uma das amostras após 12 h de reação e com diluição de 1:5.....                                                                                                                                                                               | 56 |
| <b>Figura 20</b> - Cromatogramas de uma das amostras após 24 h de reação e com diluição de 1:20.....                                                                                                                                                                              | 56 |
| <b>Figura 21</b> - Conversão da xilana comercial com uma carga inicial de 6% (m/v) em xilose, xilobiose e xilotriose.....                                                                                                                                                         | 57 |



## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - Diferentes microrganismos produtores de xilanase e características da enzima produzida. ....                                                                                             | 21 |
| <b>Tabela 2</b> - Planejamento Fatorial Completo $2^4$ com 4 pontos centrais visando a produção de xilanases por <i>T. amestolkiae</i> evidenciando as variáveis testadas e os níveis de cada ensaio. .... | 34 |
| <b>Tabela 3</b> - Composição da solução de sais de Mandels & Weber.....                                                                                                                                    | 35 |
| <b>Tabela 4</b> - Composição dos géis para eletroforese.....                                                                                                                                               | 38 |
| <b>Tabela 5</b> - Composição dos farelos estudados em relação aos seus teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre.....                                                                            | 40 |
| <b>Tabela 6</b> - Composição dos cinco farelos em relação ao teor de celulose, xilana, lignina, extrativos e óleo.....                                                                                     | 41 |
| <b>Tabela 7</b> - Resultados do planejamento fatorial completo $2^4$ .....                                                                                                                                 | 43 |
| <b>Tabela 8</b> - Composição dos meios utilizados para os ensaios.....                                                                                                                                     | 46 |
| <b>Tabela 9</b> - Composição do bagaço da cana-de-açúcar em relação ao teor de lignina, carboidratos, grupos arabinosil, acetil, metil glucurônico, extrativos e cinzas. ....                              | 52 |
| <b>Tabela 10</b> - Composição do bagaço da cana-de-açúcar de diferentes procedências.....                                                                                                                  | 52 |
| <b>Tabela 11</b> - Composição da xilana comercial em relação ao teor de xilana. ....                                                                                                                       | 52 |

## LISTA DE QUADROS

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1</b> - Principais enzimas que atuam na hidrólise da biomassa lignocelulósica. ....                                                                                 | 18 |
| <b>Quadro 2</b> - Principais enzimas que atuam na hidrólise da hemicelulose, seu local e modo de ação e sua classificação de acordo com o número EC (Enzyme Commission). .... | 19 |
| <b>Quadro 3</b> - Definição dos tipos de biorrefinaria, produtos obtidos, matérias primas empregadas e tipos de processo .....                                                | 22 |
| <b>Quadro 4</b> - Principais aplicações dos fungos do gênero <i>Talaromyces</i> .....                                                                                         | 28 |
| <b>Quadro 5</b> - Propriedades químicas e biológicas dos XOS .....                                                                                                            | 30 |

## Sumário

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 Introdução.....                                                                 | 11 |
| 2 Revisão bibliográfica.....                                                      | 13 |
| 2.1 Materiais lignocelulósicos .....                                              | 13 |
| 2.2 Resíduos agroindustriais.....                                                 | 15 |
| 2.2.1 Hidrólise ácida de biomassa lignocelulósica .....                           | 17 |
| 2.2.2 Hidrólise básica de biomassa lignocelulósica.....                           | 18 |
| 2.2.3 Hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica .....                      | 18 |
| 2.2.3.1 Xilanases .....                                                           | 19 |
| 2.3 Definição e aplicação da biorrefinaria .....                                  | 22 |
| 2.4 Processos fermentativos.....                                                  | 23 |
| 2.4.1 Otimização de processos fermentativos.....                                  | 24 |
| 2.4.2 Cultivo utilizando fungos filamentosos .....                                | 26 |
| 2.4.3 <i>Talaromyces spp</i> .....                                                | 27 |
| 2.5 Oligossacarídeos .....                                                        | 28 |
| 2.5.1 Xilooligossacarídeos .....                                                  | 29 |
| 3 Materiais e métodos.....                                                        | 31 |
| 3.1 Análise da composição dos resíduos .....                                      | 31 |
| 3.1.1 Teor de cinzas .....                                                        | 33 |
| 3.2 Microrganismo e produção de xilanases .....                                   | 33 |
| 3.3 Caracterização da xilanase produzida por <i>T. amestolkiae</i> .....          | 35 |
| 3.4 Produção de xilooligossacarídeos.....                                         | 36 |
| 3.4 Métodos analíticos .....                                                      | 37 |
| 3.4.1 Atividade enzimática .....                                                  | 37 |
| 3.4.2 Determinação de proteínas totais .....                                      | 37 |
| 3.4.3 Eletroforese .....                                                          | 38 |
| 3.4.4 Determinação de xilooligossacarídeos .....                                  | 38 |
| 4 Resultados e discussão .....                                                    | 40 |
| 4.1 Composição dos resíduos usados como componentes do meio de cultura.....       | 40 |
| 4.2 Produção de xilanase empregando diferentes resíduos.....                      | 41 |
| 4.3 Caracterização da xilanase produzida .....                                    | 47 |
| 4.3.1 Determinação da temperatura e pH ótimos.....                                | 47 |
| 4.3.2 Determinação da estabilidade em diferentes valores de temperatura e pH..... | 48 |
| 4.3.3 Determinação do peso molecular da enzima .....                              | 50 |

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.4 Hidrólise enzimática da xilana comercial e da hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar ..... | 51 |
| 4.4.1 Composição da xilana comercial e do bagaço de cana-de-açúcar .....                         | 51 |
| 4.4.2 Hidrólise enzimática da hemicelulose bagaço de cana-de-açúcar .....                        | 53 |
| 4.4.3 Hidrólise enzimática da xilana comercial “Birchwood” .....                                 | 54 |
| 5 Conclusão.....                                                                                 | 58 |
| Referências .....                                                                                | 59 |

## 1 Introdução

O Brasil, com sua larga área e clima propício para o crescimento de várias espécies vegetais é um dos maiores produtores e exportadores de produtos agroindustriais, incluindo grãos, cereais, frutas e legumes (DE AZEVEDO, 2022). Em 2021, essa produção foi de, aproximadamente, 260 toneladas (CAVIGLIA-HARRIS, 2021). Estima-se que desde a produção até o consumo, haja desperdício de, aproximadamente, um terço de material, seja na manufatura do produto ou preparo do alimento (CLARK *et al.*, 2012). Considerando-se a produção de 260 toneladas e essas estimativas, tem-se que aproximadamente 86,7 toneladas de resíduos foram geradas somente no ano passado, demonstrando a grande quantidade de biomassa com potencial para diversas aplicações (CAVIGLIA-HARRIS, 2021; CLARK *et al.*, 2012).

Alternativas ambientalmente amigáveis vem sendo desenvolvidas visando obter formas mais sustentáveis e ao mesmo economicamente viáveis para lidar com essa biomassa. A biorrefinaria propõe a transformação de biomassa não alimentares, tais como resíduos, em componentes químicos, poliméricos, biomoléculas, combustíveis e outros (CHERUBINI *et al.*, 2009).

É possível empregar esses materiais lignocelulósicos residuais como componentes de meios de cultura, visando a produção de biomoléculas de maior valor agregado, tais como enzimas, através de cultivo microbiano. Dentre as possíveis enzimas produzidas por essa via, as hidrolases são uma das classes aplicadas em vários segmentos industriais, tais como na indústria farmacêutica, produção de biocombustíveis, vitaminas, aromatizantes, cosméticos alimentos, bebidas e outras (DEWAN, 2014). Dentro dessa classe, encontram-se as xilanases, enzimas responsáveis por hidrolisar a xilana, um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza, constituinte da hemicelulose que está presente em vegetais (DHIMAN, 2008; JUTURO & WU, 2012). As xilanas podem variar de acordo com o vegetal, consequentemente, as enzimas que as degradam também apresentam diferenças significativas, como estrutura, pH e temperatura ótimos, peso molecular e locais de clivagem (MOTTA *et al.*, 2013).

As xilanases podem ser produzidas por bactérias, fungos filamentosos, leveduras, algas marinhas, protozoários, caracóis, crustáceos, insetos e sementes. No entanto, as xilanases comerciais são produzidas principalmente por fungos filamentosos (POLIZELI et al., 2005). Estes microrganismos são vantajosos pois são capazes de resistir a inibidores e de assimilar uma enorme gama de substratos, como substratos poliméricos de baixo valor agregado. Através desses substratos, há a indução da produção de enzimas capazes de degradá-los, muitas vezes através da produção de enzimas auxiliares, que são responsáveis pela clivagem em outros pontos dos substratos, resultando numa hidrólise mais eficiente e sem geração de subprodutos indesejáveis (MOTTA et al., 2013).

A degradação parcial da xilana por ação de enzimas xilanolíticas resulta na formação de xilooligossacarídeos, moléculas compostas por unidades de xilose, que possuem aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica devido ao seu potencial como prebióticos (KUMAR et al., 2017). Os xilooligossacarídeos melhoram a flora intestinal, diminuindo o risco de infecções e aumentam a absorção de alguns minerais importantes além de seu consumo estar relacionado a diminuição do risco de desenvolver diabetes e obesidade (QIANG et al., 2009). Quando aplicados à ração, resultam em benefícios semelhantes para os animais, melhorando o crescimento e desenvolvimento e assim resultando num produto final de maior qualidade para o consumidor (QIANG et al., 2009).

Dessa maneira, desenvolver um processo que empregue fungos filamentosos, tais como o *Talaromyces amestolkiae*, para a produção de enzimas lignocelulósicas empregando resíduos agroindustriais como parte do meio de cultura é de interesse industrial e faz parte do escopo do presente trabalho. Ademais, o emprego dessas xilanases na hidrólise de hemiceluloses visando a produção de xilooligossacarídeos também foi avaliado.

## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 Materiais lignocelulósicos

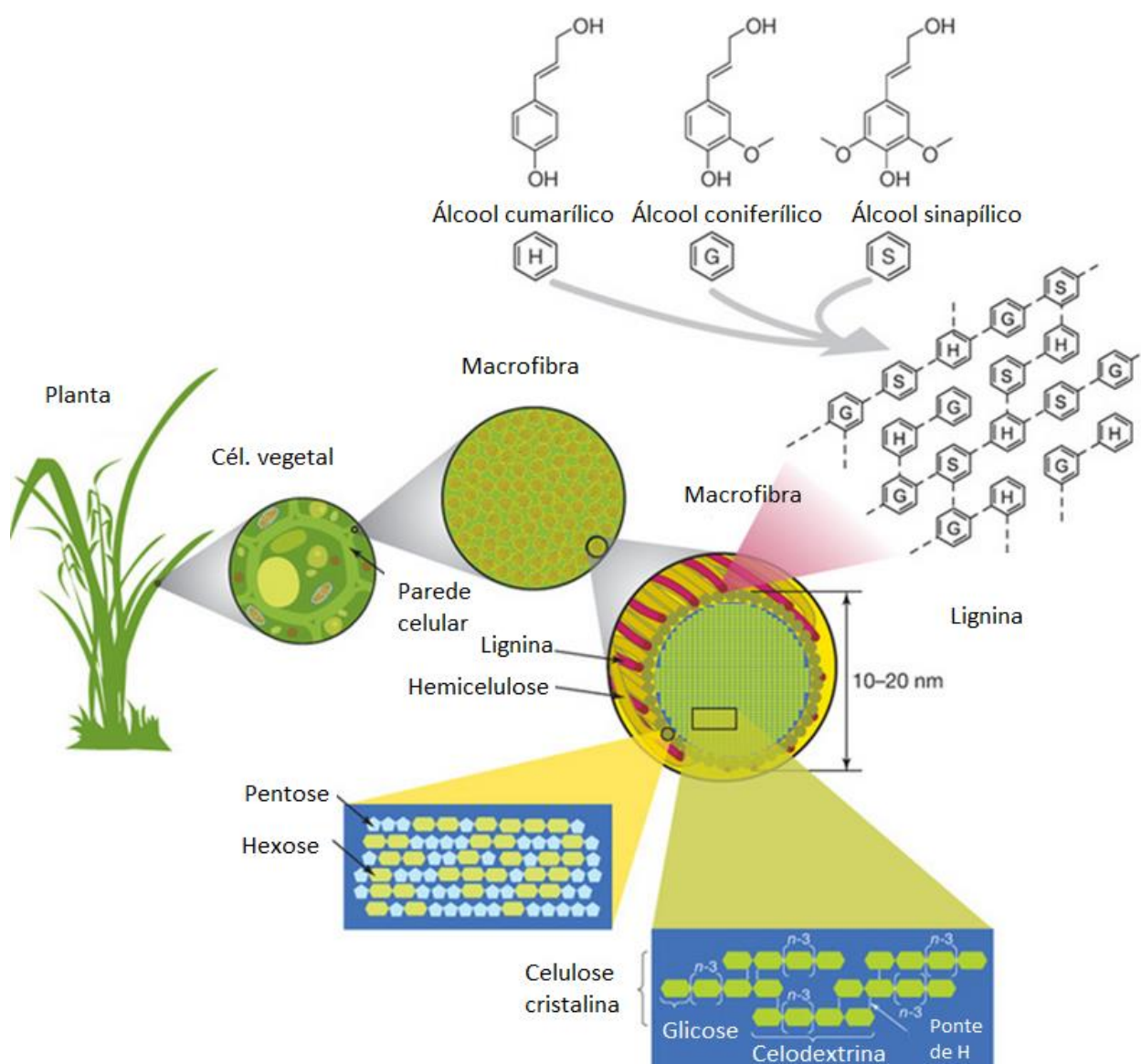
Os materiais lignocelulósicos representam o principal componente da biomassa vegetal. Esses materiais representam uma rede complexa e resistente composta por celulose, hemicelulose e lignina (RAMAMOORTHY et al., 2015). A concentração destes compostos varia na biomassa vegetal de acordo com a espécie vegetal, composição do solo, umidade, cuidados no cultivo e parte do vegetal. Essas estruturas formam as microfibras, que são organizadas em macrofibras e são responsáveis pela estabilidade da parede celular das plantas (MEDEIROS, 2007). A figura 1 representa de maneira simplificada a estrutura de um vegetal e seus principais componentes.

A celulose é a parte mais rígida, formada por cadeias lineares de polímeros de glicose através das ligações  $\beta$ -1-4-glicosídicas ( $C_6H_{11}O_5$ ) que possuem grupos hidroxil, como mostrado na figura 1. Esses grupos formam pontes de hidrogênio inter e intra moleculares, deixando assim o polímero hidrofílico. Essa estrutura é presente em todas as fibras naturais de biomassa vegetal, no entanto, o nível de polimerização é diferente de acordo com sua origem, resultando em mudanças nas propriedades mecânicas do material (RAMAMOORTHY et al., 2015).

A lignina é composta principalmente de 3 moléculas fenólicas: álcool cumarílico (H), álcool coniferílico (G) e álcool sinapílico (S). A estrutura desse composto é extremamente densa (ZAABA & ISMAIL, 2019). Por outro lado, a hemicelulose é constituída por moléculas com possuem entre 70 e 200 unidades de monossacarídeos. Os resíduos de açúcar são variados, como D-glicose, D-xilose, D-arabinose, D-galactose, ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico, grupos O-acetil e ésteres ligados via resíduos de L-arabinose à cadeia principal (MEDEIROS, 2007).

Dentro do grupo de hemiceluloses, as xilanas pertencem a maior classe, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (MEDEIROS, 2007). Devido a sua localização e interação com a lignina na matriz da parede celular, a sua função está relacionada à manutenção da integridade da parede da célula. A xilana pode ser hidrolisada completamente por ação de diversas enzimas, atuando de forma sinérgica, como mostrado na figura 2.

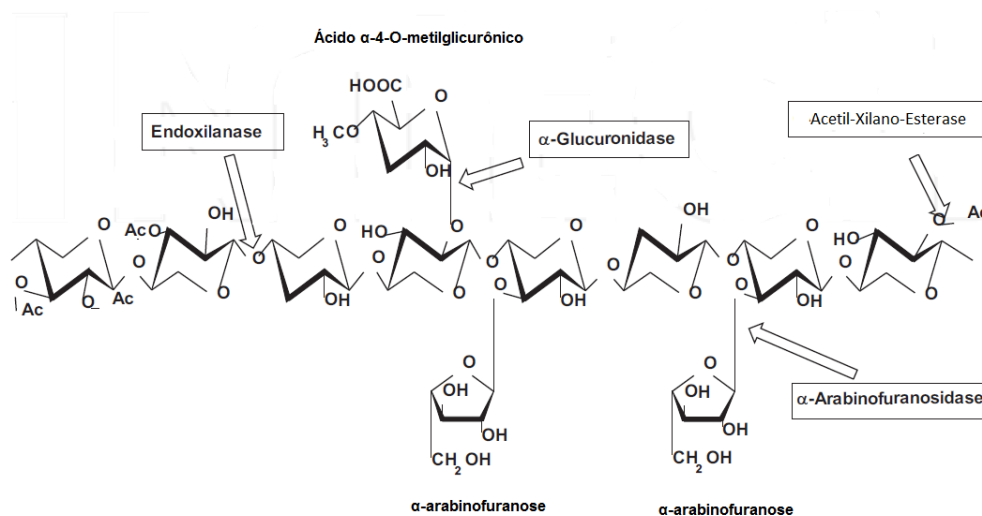
**Figura 1** – Esquema da organização da estrutura lignocelulósica de plantas evidenciando as principais moléculas presentes e sua disposição dentro da célula vegetal.



Adaptado de Potters et al., 2010 e Nishiyama et al., 2002



**Figura 2** - Estrutura hipotética da xilana e das enzimas envolvidas na sua degradação.  
Ac: grupo acetil.

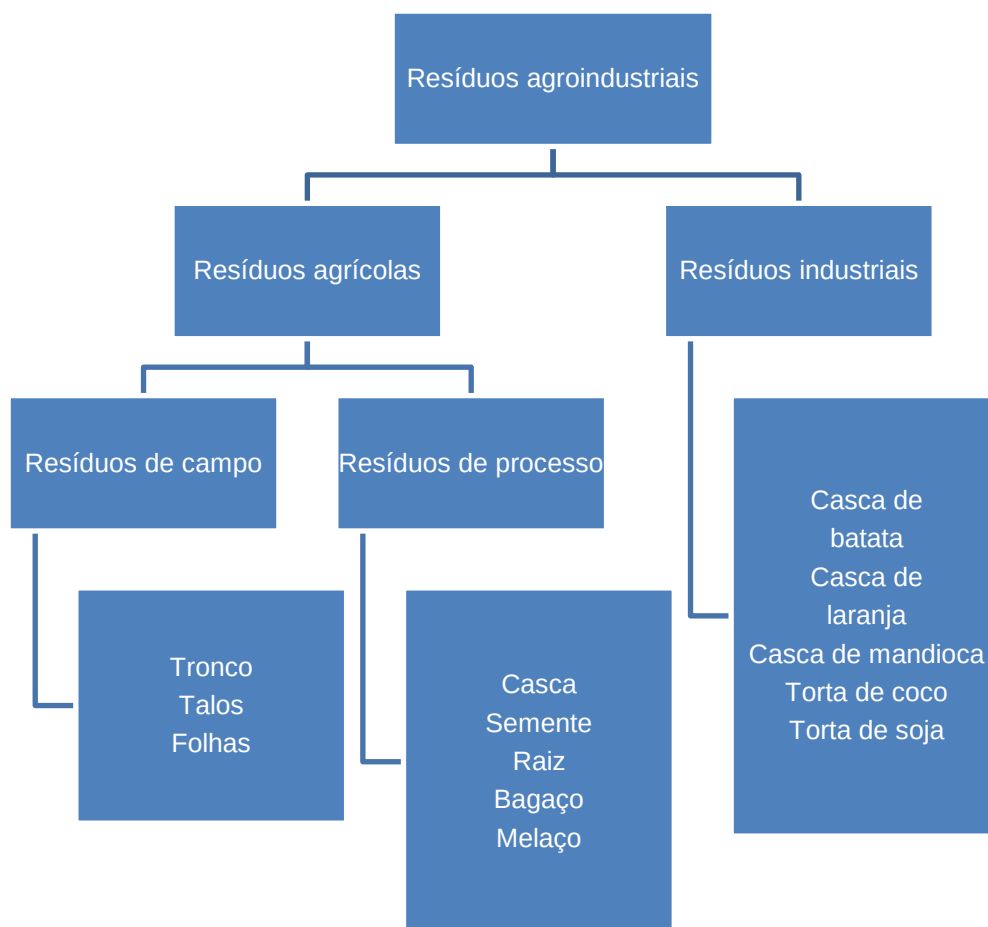


Adaptado de MOTTA *et al.*, 2013.

## 2.2 Resíduos agroindustriais

Os resíduos agroindustriais são separados e definidos em 2 categorias de acordo com Sadah *et al.* (2018): resíduos da agricultura e resíduos industriais, sendo a primeira composta por resíduos do campo e de processamento. Resíduos de campo são os que restam no campo após a colheita, como folhas e caules, enquanto os resíduos do processo continuam aderidos na matéria-prima de interesse mesmo após a colheita. Já os resíduos industriais são gerados principalmente no processamento que ocorre nas indústrias alimentícias (SADH, 2018). A figura 3 mostra alguns exemplos comuns de cada categoria. O teor desses materiais varia de acordo com sua origem, mas sua composição é majoritariamente de materiais lignocelulósicos, havendo assim grande potencial para uso em biorrefinarias e processos fermentativos (SADH *et al.*, 2018).

**Figura 3** – Tipos de resíduos agroindustriais produzidos pela agricultura e indústria



Adaptado de Sadah et al., 2018

Embora parte dessa biomassa residual tenha potencial para ser utilizada para fertilizantes ou ração animal, dados mostram que em vários países o destino desse material é incineração, aterros e rios, causando assim um impacto ambiental para a flora e fauna (SADH, 2018).

No Brasil, até 2010, os resíduos tidos como sem valor agregado provenientes da população e da agricultura eram tradicionalmente deixados ao ar livre sem pré-tratamento (EIGENHEER & FERREIRA, 2015). Com aumento da conscientização e criação de políticas ambientais, esses materiais passaram a ser levados à aterros específicos. No entanto, essa solução ainda não é adequada do ponto de vista econômico ou ambiental, já que com o crescente consumo e

produção, haverá cada vez menos áreas disponíveis para essa finalidade (DE AZEVEDO et al., 2022). De acordo com a limitação geográfica, econômica e cultural, alguns países lidam com esses resíduos em biodigestores ou com incineração térmica, como é o caso do Japão (DE AZEVEDO et al., 2022; SPROSON et al., 2020).

Como a maior parte do resíduo agroindustrial é rico em sacarídeos, ele pode ser empregado como fonte de nutrientes para ração animal, compostagem e biomassa para processos empregando microrganismos, principalmente como fonte de carbono (MALHERBE & CLOETE, 2002). Essa última aplicação é interessante do ponto de vista econômico, pois é capaz de gerar produtos com alto valor agregado utilizando substratos baratos. Geralmente há a necessidade de um pré-tratamento visando a separação e/ou hidrólise de parte dos componentes lignocelulósicos para as etapas subsequentes de aproveitamento (SHARMA & CHUNBAO, 2019).

### **2.2.1 Hidrólise ácida de biomassa lignocelulósica**

Diversos ácidos podem ser aplicados como agentes de remoção da hemicelulose e lignina. Os mais utilizados são HCl,  $H_2SO_4$ ,  $HNO_3$  (SHARMA & CHUNBAO, 2019). Alguns desses ácidos são relativamente baratos e facilmente empregados. Como qualquer abordagem, possui desvantagens, tais como a facilidade de corrosão dos tanques pela ação dos ácidos e formação de subprodutos como furfural, 5-hidroxi-2-furfural, ácidos levulínicos, ácidos fórmicos e outros ácidos orgânicos oriundos da lignina. Esses compostos podem ser prejudiciais para etapas subsequentes de hidrólise enzimática ou onde há emprego de processos fermentativos e, além disso, necessitam de altas temperaturas (SHARMA & CHUNBAO, 2019). Assim, outros métodos mais sustentáveis e com maior rendimento são de interesse.

### 2.2.2 Hidrólise básica de biomassa lignocelulósica

A hidrólise básica é utilizada para remoção da lignina da biomassa, resultando assim na exposição dos polissacarídeos e facilitando as etapas seguintes. Os ácidos mais empregados são  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{NaOH}$  e  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Ela possui como vantagens a quebra da celulose cristalizada e aumento da superfície de contato, ajudando assim nas etapas de hidrólise. Assim como a hidrólise ácida, esse processo também resulta na formação de subprodutos inibidores e necessita de condições extremas (SHARMA & CHUNBAO, 2019).

### 2.2.3 Hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica

Como a lignocelulose é um polímero complexo e variado, são necessárias várias enzimas para sua hidrólise completa. Elas podem ser divididas em 3 grupos, de acordo com a atuação: enzimas celulósicas (celulases), enzimas hemicelulósicas (hemicelulases) e enzimas ligninolíticas (lignases). O quadro 1 mostra algumas enzimas de cada classe. Em contraste com as hidrólises ácidas e básicas, o emprego de enzimas microbianas é considerado sustentável, já que não gera subprodutos tóxicos e geralmente é realizada em condições amenas de temperatura, pressão e pH, diminuindo assim os gastos energéticos. Por outro lado, para obtenção de um processo de hidrólise eficiente é necessário o uso de diversas enzimas, o que encarece o processo, além de poder gerar polímeros de cadeias curtas que não foram completamente hidrolisados (SHARMA & CHUNBAO, 2019).

**Quadro 1** - Principais enzimas que atuam na hidrólise da biomassa lignocelulósica.

| Celulases                                                                                           | Hemicelulases                                                                                                                          | Lignases                                                                                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Endoglucanase<br>$\beta$ -glicosidase<br>Celobiohidrolase ou<br>exoglucanase<br>Glicosiltransferase | Xilanases<br>Manases<br>Endoglucanases<br>$\beta$ -xilosidases<br>$\alpha$ -galactosidases<br>Acetil esterase<br>$\beta$ -glucosidases | Lacases<br>Lignina peroxidase<br>Manganase peroxidase<br>Peroxidase versátil<br>Celobiose desidrogenase |

Adaptado de SHARMA & CHUNBAO, 2019

### 2.2.3.1 Xilanases

Xilanases, pertencentes às hemicelulases, são enzimas da classe das hidrolases EC3.2.1 (MOTTA et al., 2013) e, podem ser classificadas de acordo com o peso molecular, ponto isoelétrico e estrutura cristalina. Como a xilana, principal constituinte da hemicelulose, é um polímero complexo e heterogêneo, possuindo grupos funcionais e estrutura variada, sua despolimerização completa só é possível através de um conjunto de enzimas hidrolíticas com diferentes especificidades. Assim, há diversos tipos de xilanases que atuam na hidrólise de diferentes partes do polímero (MOTTA et al., 2013). O quadro 2 mostra de forma mais detalhada a atuação das hemicelulases.

**Quadro 2** - Principais enzimas que atuam na hidrólise da hemicelulose, seu local e modo de ação e sua classificação de acordo com o número EC (Enzyme Commission).

| Enzima                                   | Local de ação                                                                                                          | Modo de ação                                                                                                        | Número E.C |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Endo-xilanase</b>                     | Cadeia principal da xilana                                                                                             | Hidrolisa principalmente as ligações $\beta$ -1,4-xilose formando xilobiose                                         | 3.2.1.8    |
| <b>Exo-xilanase</b>                      | Cadeia principal da xilana                                                                                             | Hidrolisa principalmente as ligações terminais $\beta$ -1,4-xilose formando xilobiose                               | 3.2.1.37   |
| <b><math>\beta</math>-xilosidase</b>     | Xilooligossacarídeos                                                                                                   | Libera xilose da xilobiose e outros xilooligossacarídeos de cadeia curta                                            | 3.2.1.32   |
| <b><math>\alpha</math>-glucuronidase</b> | Substituintes de ácido glicurônico ou 4-ometilglucurônico ligados a $\alpha$ -1,2 ligados à cadeia principal de xilano | Libera ácido glicurônico dos glucuronoxilanos                                                                       | 3.2.1.31   |
| <b>Acetilxilan esterase</b>              | Grupos O-Acetil ligados nas extremidades das cadeias de xilana                                                         | Hidrolisa as ligações acetiléster em acetil xilanos, liberando ácido acético.                                       | 3.1.1.6    |
| <b>Feruloil esterase</b>                 | grupo feruloil na cadeia lateral de arabinofuranosil ligado à xilose não redutora terminal                             | Hidroliza as ligações éster entre os resíduos da cadeia lateral da arabinose e os ácidos fenólicos (ácido ferúlico) | 3.1.1.1    |

Adaptado de SARROUH (2012)

As xilanases podem ser produzidas por bioprocessos por uma série de microrganismos, como apresentado na Tabela 1. A depender da fonte de produção, essas enzimas podem apresentar diferentes características, tais como peso molecular, pH e temperatura ótimo.

Apesar de diversas bactérias serem capazes de expressar essa classe de enzima, os fungos são mais utilizados pela sua alta capacidade de expressão (MOTTA et al., 2013). Na literatura, vários autores relatam propriedades interessantes dessas biomoléculas. A tabela 1 mostra algumas das xilanases encontradas na literatura, microrganismo produtor e, suas características referentes à atividade enzimática, peso molecular, pH e temperatura ótimos.

Na indústria, as xilanases comerciais também são produzidas por fungos filamentosos. A Rapidase Pomaliq e a Ecopulp TX-200A, ambas obtidas de *Trichoderma Resei* (YOON et al., 2006; SHATALOV, 2007) são alguns dos exemplos.

As aplicações das xilanases são diversas, com destaque para a indústria de papel e celulose que empregam tais enzimas no processo de clareamento do papel. Na indústria alimentícia, as xilanases podem ser usadas na panificação, melhorando as características organolépticas do produto final. Ademais, com o aumento da demanda para produção de biocombustíveis de segunda geração, elas também vêm sendo cada vez mais empregadas nos processos de tratamento da biomassa (MOTTA et al., 2013). Uma outra aplicação interessante é na indústria farmacêutica e de prebióticos, onde essas enzimas são aplicadas visando a obtenção de um produto que beneficie a flora do sistema digestório, consequentemente promovendo benefícios à saúde, tais como menor risco de desenvolver doenças do sistema imune, diabetes, obesidade e constipação (SWENNEN et al., 2006).

**Tabela 1** - Diferentes microrganismos produtores de xilanase e características da enzima produzida.

| Microorganismo                                  | Atividade enzimática (U.mL <sup>-1</sup> ) | Peso molecular (kDa) | pH ótimo  | T ótima (°C) | Referência                 |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------|-----------|--------------|----------------------------|
| <b>Bactérias</b>                                |                                            |                      |           |              |                            |
| <i>Acidobacterium capsulatum</i>                | ND                                         | 41                   | 5         | 65           | Inagaki et al. 1998        |
| <i>Bacillus sp. W-1</i>                         | ND                                         | 21,5                 | 6         | 65           | Okazaki et al., 1985       |
| <i>Bacillus circulans</i>                       | ND                                         | 15                   | 5,5 - 7   | -            | Esteban et al., 1982       |
| <i>Bacillus polymyxa</i>                        | ND                                         | 61                   | 6,5       | 50           | Morales et al., 1995       |
| <i>Cellulomonas fimi</i>                        | ND                                         | 14-150               | 5-6,5     | 40-45        | Khanna & Gauri, 1993       |
| <i>Micrococcus sp</i>                           | ND                                         | 56                   | 7,5-9     | 55           | Gesseesee & Mamo, 1998     |
| <i>Staphylococcus sp. SG-13</i>                 | ND                                         | 60                   | 7,5-9,2   | 50           | Gupta et al., 2000         |
| <b>Leveduras</b>                                |                                            |                      |           |              |                            |
| <i>Cryptococcus albidus</i>                     | ND                                         | 48                   | 5         | 25           | Morosoli et al., 1986      |
| <i>Trichosporon cutaneum</i> SL409              | ND                                         | -                    | 6,5       | 50           | Liu et al., 1998           |
| <b>Fungos</b>                                   |                                            |                      |           |              |                            |
| <i>Aspergillus niger</i>                        | 24                                         | 30                   | 7,5       | 60           | Ahmad et al., 2013         |
| <i>Aspergillus fischeri Fxn1</i>                | ND                                         | ND                   | 6         | 60           | Raj & Chandra, 1996        |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> AR1                | 17,5                                       | 212 - 253            | 6 - 6,5   | 60           | Anthony et al., 2003       |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> RSP-8 (MTCC 12039) | ≈ 22                                       | ND                   | ND        | ND           | Ravichandra et al., 2016   |
| <i>Cephalosporium sp.</i>                       | ND                                         | 35                   | 7,5       | 50           | Kang et al., 1996          |
| <i>Penicillium oxalicum</i> ZH-30               | 14,5                                       | ND                   | ND        | 50 - 60      | Li et al., 2007            |
| <i>Penicillium sclerotiorum</i>                 | 7,8                                        | ND                   | 4,5       | 50           | Knob & Carmona, 2008       |
| <i>Talaromyces byssochlamydoides</i> YH-50      | ND                                         | ND                   | 5,5       | 70           | Yoshioka et al., 1981      |
| <i>Talaromyces emersonii</i> (IMI 392299)       | ND                                         | ND                   | 4,5 - 5,0 | 70           | Waters et al., 2010        |
| <i>Talaromyces stollii</i> LV186                | 7,5                                        | ND                   | ND        | ND           | Orencio-Trejo et al., 2016 |
| <i>Talaromyces thermophilus</i>                 | ND                                         | 25                   | 7,0 - 8,0 | 75 - 80      | Maalej et al., 2009        |
| <i>Tuber maculatum</i>                          | 13,15                                      | ND                   | 5         | 50           | Bedade et al., 2017        |

Adaptado de Beg et al. (2001). ND: não determinado

## 2.3 Definição e aplicação da biorrefinaria

A biorrefinaria pode ser vista como uma alternativa mais adequada para lidar com a biomassa lignocelulósica oriunda de processos agroindustriais, já que conta com aplicações e abordagens diversas. Cherubini et al. (2009) classifica as biorrefinarias de acordo com 4 características principais: plataformas, produtos, matérias primas e processos, de acordo com o mostrado no quadro 3.

**Quadro 3** - Definição dos tipos de biorrefinaria, produtos obtidos, matérias primas empregadas e tipos de processo

| Plataforma                                                                                                                                                                                                    | Produto                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Matéria-prima                                                                                                                                                                                                                                                               | Processos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I.) Açúcares 5C<br>II.) Açúcares 6C<br>III.) Óleos<br>IV.) Biogás<br>V.) Gás de síntese<br>VI.) Hidrogênio<br>VII.) Sucos orgânicos<br>VIII.) Líquidos pirolíticos<br>IX.) Lignina<br>X) Eletricidade e calor | <b>I.) Produtos energéticos</b><br>I.1) Biodiesel<br>I.2) Bioetanol<br>I.3) Biometano<br>I.4) Biocombustíveis sintéticos<br>I.5) Eletricidade e calor<br><br><b>II.) Produtos materiais</b><br>II.1) Alimentos<br>II.2) Ração animal<br>II.3) Fertilizantes<br>II.4) Glicerina<br>II.5) Biomateriais<br>II.6) Químicos e construção<br>II.7) Polímeros e resinas<br>II.8) Biohidrogênio | <b>I.) Colheitas dedicadas</b><br>I.1) Óleos<br>I.2) Açúcares<br>I.3) Amido<br>I.4) Lignocelulose<br>I.5) Gramas<br>I.6) Biomassa marinha<br><br><b>II.) Resíduos</b><br>II.1) Resíduos lignocelulósicos<br>II.2) Resíduos oleaginosos<br>II.3) Resíduos orgânicos e outros | <b>I.) Termoquímico</b><br>I.1) Combustão<br>I.2) Gaseificação<br>I.3) Hidrotérmico<br>I.4) Pirolítico<br><br><b>II.) Bioquímicos</b><br>II.1) Fermentação<br>II.2) Digestão anaeróbica<br>II.3) Conversão aeróbica<br>II.4) Processo enzimático<br><br><b>III.) Processos químicos</b><br>III.1) processo catalítico<br>III.2) Despolpamento<br>III.3) Esterificação<br>III.4) Hidrogenação<br>III.5) Hidrólise<br>III.6) Metanização<br>III.7) Reforma a vapor<br>III.8) Eletrólise da água<br>III.9) Reação de mudança de vapor de água<br><br><b>IV.) Mecânico/físico</b><br>IV.1) Extração<br>IV.2) Separação de fibras<br>IV.3) Fracionamento mecânico<br>IV.4) Prensamento<br>IV.5) Pré tratamento<br>IV.6) Separação |

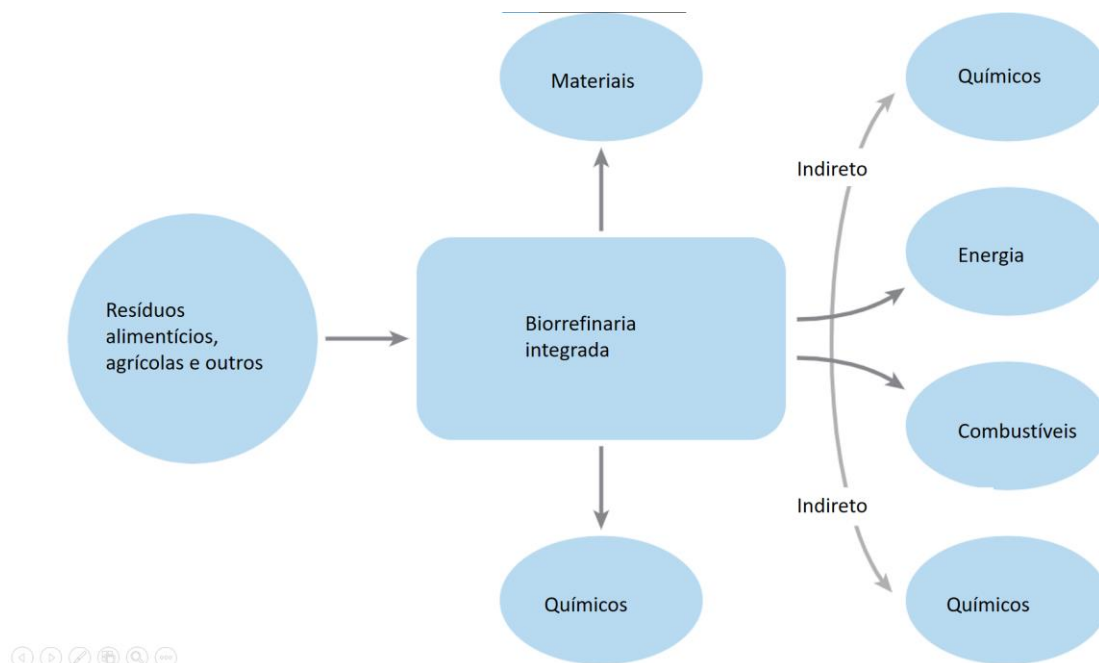
Adaptado de Cherubini 2009

Alguns exemplos de produtos oriundos de biorrefinaria incluem subprodutos com alto teor de material lignocelulósico que podem ser transformados em matérias primas para produção de etanol ou outros processos



fermentativos, gerando assim um produto de maior valor agregado. A figura 4 mostra algumas das aplicações e produtos gerados na biorrefinaria.

**Figura 4** – Integração de processos numa biorrefinaria exemplificando alguns dos produtos gerados direta e indiretamente.



Adaptado de Clark et al., 2012.

## 2.4 Processos fermentativos

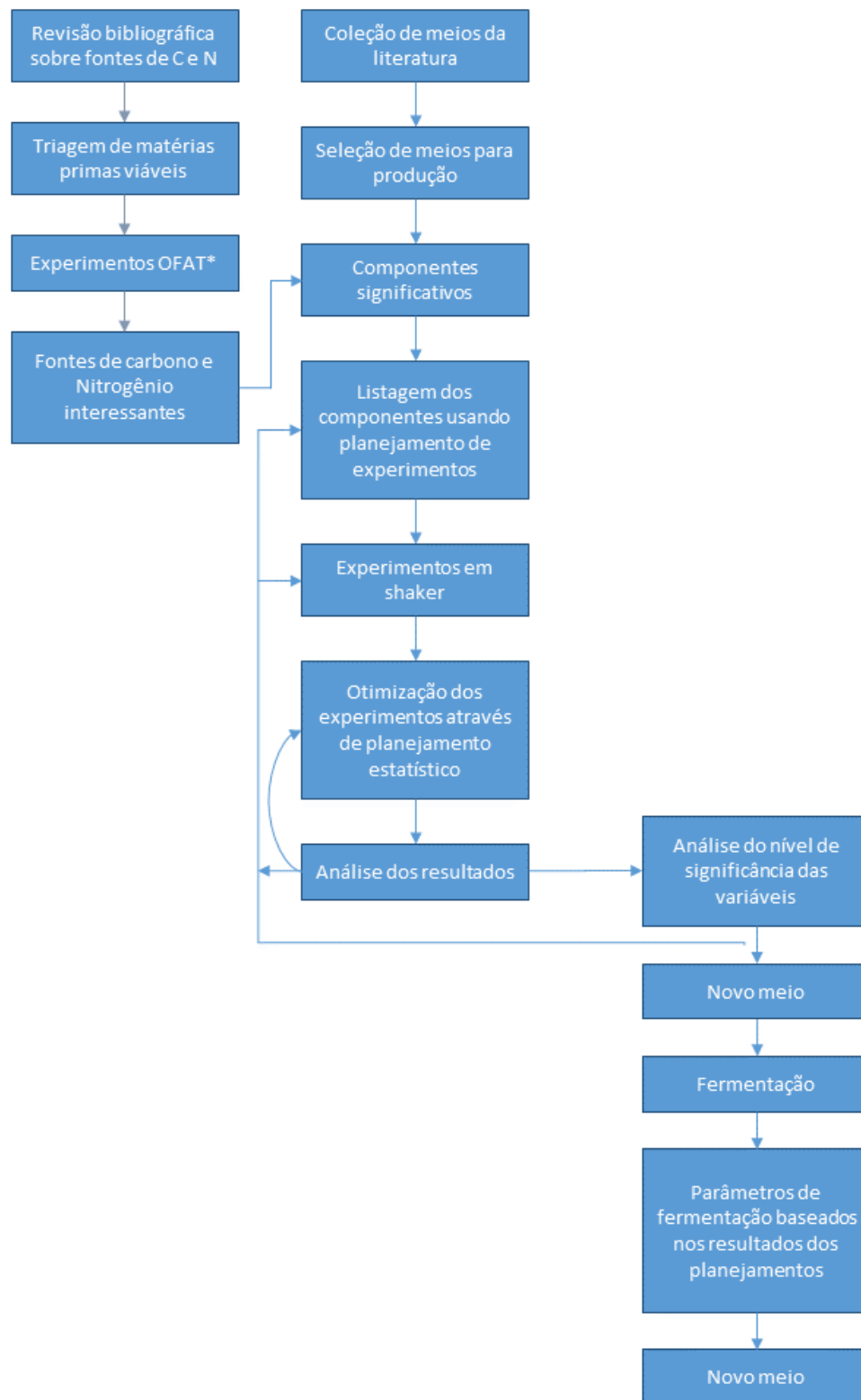
Os humanos vêm usando processos fermentativos há milênios, principalmente para a produção de alimentos, bebidas e produtos medicinais (OZEN, 2015). O termo “fermentação” é largamente usado para descrever processos biológicos onde há a transformação de uma matéria, o substrato, em um produto de interesse através do uso de microrganismos (MEARS et al., 2017). Os processos fermentativos podem ser divididos em sólidos e submersos, mas para a compreensão e otimização de qualquer um deles, é necessário considerar as condições operacionais ideais, entre elas: concentração de inóculo, cepa, pH, temperatura, fontes de carbono e nitrogênio, cofatores, vitaminas e oxigenação (MEARS et al., 2017; BEJARANO & PUOPOLO, 2020). Em cultivos submersos, a oxigenação é controlada através da vazão de ar, agitação e geometria do frasco ou biorreator.

### **2.4.1 Otimização de processos fermentativos**

Para alcançar alta produtividade de forma econômica e sustentável, os processos devem ser estudados visando o incremento do produto de interesse. Singh et al. (2017) mostra várias estratégias que são popularmente utilizadas para aumentar a eficiência de um dado processo. A primeira etapa é a de revisão bibliográfica, seguida pela seleção de abordagens interessantes e viáveis. A partir disso, experimentos simples são realizados com o objetivo de triar alguns pontos e condições importantes. Com os resultados obtidos, podem ser selecionadas variáveis de interesse para a realização de estudos mais complexos com respostas estatísticas que são capazes de prever comportamentos e mostrar matematicamente o grau de influência de cada variável para a variável resposta (SINGH et al., 2017). A figura 5 esquematiza as possíveis abordagens dentro da otimização de um processo, evidenciando que o processo para encontrar um meio adequado para um dado objetivo não é sempre linear, bem-sucedido nas primeiras tentativas e que requer muitas vezes revisão das etapas.

Além disso, ferramentas estatísticas permitem a análise de vários fatores ao mesmo tempo, com o emprego de menor número de experimentos e consequentemente menor gasto de matérias primas, tempo e mão de obra (SINGH et al., 2017). Dentre os planejamentos estatísticos mais empregados, estão o planejamento fatorial, planejamento Plackett-Burman, planejamento Taguchi, planejamento composto central e planejamento Box Behnken.

**Figura 5** – Possíveis abordagens e caminhos para a otimização de um processo



Adaptado de Singh et al., 2017. \*OFAT: *One factor at time* (um fator de cada vez).

## 2.4.2 Cultivo utilizando fungos filamentosos

Existem bioprocessos bem estabelecidos com diversas espécies de fungos filamentosos, que podem ser cultivados em meio sólido ou submerso. Cada abordagem possui vantagens e desvantagens que devem ser estudadas visando a obtenção de bons rendimentos, sustentabilidade e facilidade nas etapas subsequentes de *downstream* (DE LA CRUZ QUIROZ et al, 2015). As matrizes sólidas podem ser usadas como fonte de nutrientes (carbono, nutriente, minerais, óleos, etc) e/ou como suporte para o crescimento fúngico (MASCARIN, 2017). Em geral, seu custo é baixo e sua montagem simples quando comparado à um cultivo submerso. Também há menor quantidade de água disponível, contribuindo para formação de certas estruturas de interesse como conídios (KRISHNA, 2005).

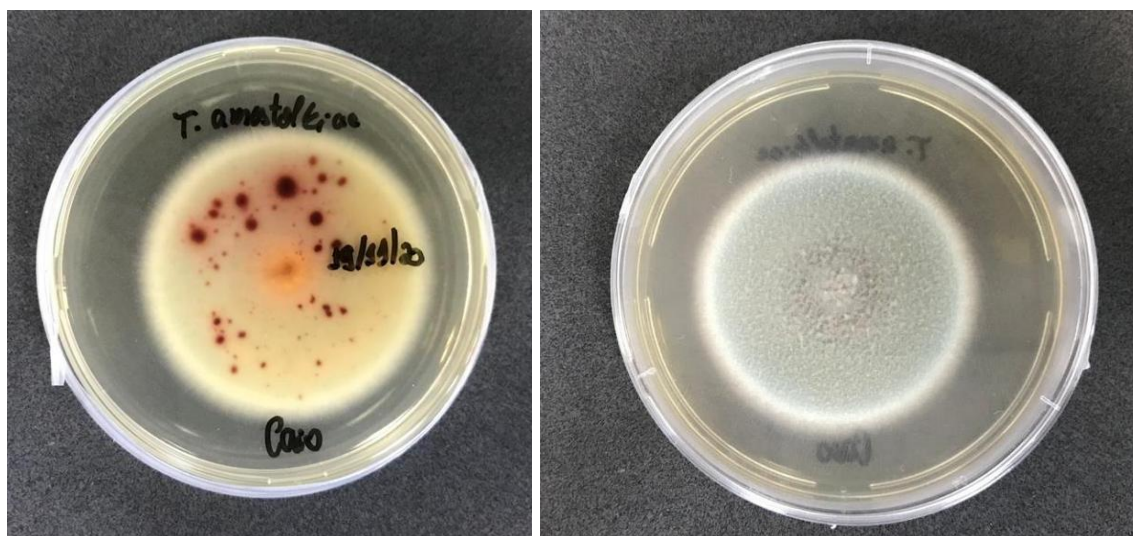
O cultivo submerso apresenta vantagens como melhor taxa de transferência de oxigênio, facilidade na automação e controle dos parâmetros e possibilidade de *scale up* e menor tempo de cultivo. Por outro lado, alguns microrganismos e meios, podem gerar problemas relacionados ao entupimento, formação de biofilme, alta viscosidade e podem ser extremamente sensíveis ao cisalhamento (MASCARIN et al, 2019; KRISHANIA et al, 2018).

Apesar desses empecilhos para a produção, os fungos filamentosos são capazes de produzir uma vasta gama de biomoléculas de interesse industrial e vem sendo utilizados como produtores de antibióticos desde a época da segunda guerra mundial (QUINN, 2013). Além dos antibióticos, eles são conhecidos por sua versatilidade e produção de ácidos orgânicos, polissacarídeos, reguladores do crescimento de plantas, alcaloides, pigmentos, micotoxinas, enzimas e outras proteínas com aplicações farmacêuticas (EL-ENSHASY, 2007; QUINN, 2013). Devido ao seu histórico, potencial e vasta gama estudos, o gênero *Aspergillus* é considerado o gênero mais importante (EL-ENSHASY, 2007). No entanto, outros gêneros como *Penicillium*, *Talaromyces* e *Trichoderma* vêm recebendo atenção e são utilizados na indústria ou vem sido reportados pela comunidade científica como promissores para a produção de biomoléculas (KNOB & CARMONA 2010; KARLA et al., 2020).

### 2.4.3 *Talaromyces* spp.

O fungo filamentoso *Penicillium purpurogenum* foi descrito por Stoll em 1903 – 1904. Suas características mais notáveis eram a cor esverdeada das colônias e produção de pigmentos avermelhados em ágar batata (YILMAZ, 2012). Posteriormente, a espécie *P. purpurogenum* também foi isolada em solo amazônico. Essa espécie pertence ao subgênero *Biverticillium*, o qual foi observado ser filogeneticamente distinto de outros subgêneros de *Penicillium* e que essa distinção deve ser refletida em sua taxonomia (PITT, 1980). Assim, em 1955, Benjamin introduziu o nome *Talaromyces* como uma metamorfose sexual e este gênero foi caracterizado como produtor de ascomas amarelos suaves que consistem em hifas entrelaçadas. Dessa maneira, algumas espécies de *Penicillium* subg. *Biverticillium* foram transferidas e combinadas em *Talaromyces*, e foi observado que algumas espécies excretam altas quantidades de colorantes vermelhos, incluindo as espécies *T. amestolkiae*, *T. atroroseus*, *T. purpureogenus* e *T. albobiverticillius* (PANDIT et al., 2018; SAMSON et al., 2011; SANTOS-EBINUMA et al., 2013; TOLBORG et al., 2020; VENKATACHALAM et al., 2019). Desta maneira, com estudos filogenéticos mais recentes, o fungo *P. purpurogenum* foi reclassificado como *Talaromyces amestolkiae* (ZACCARIM et al., 2019; DE OLIVEIRA et al., 2019).

**Figura 6** – Frente e verso da placa do fungo filamentoso *T. amestolkiae* em BDA (batata dextrose ágar) suplementado com extrato de levedura após 7 dias de crescimento.



Trabalhos do grupo de pesquisa BioPPul (Bioproducts' Production and Purification Lab da FCFar de Araraquara) vem mostrando o potencial de produção de colorantes com o *T. amestolkiae* em escala de bancada, de frascos Erlenmeyer até biorreator de bancada de 4 L (DE OLIVEIRA et al., 2019; DE OLIVEIRA et al., 2020). Outros autores relatam a importância dos fungos desse gênero, como apresentado no quadro 4. Assim, pode-se observar que esse microrganismo tem potencial para produzir diferentes tipos de enzimas, o qual dependerá da fonte de nutrientes empregada durante a etapa de cultivo. Dentre as enzimas produzidas pelo fungo do gênero *Talaromyces*, pode-se destacar as enzimas celulolíticas, as quais podem degradar a hemicelulose da biomassa vegetal gerando dentre outras moléculas, os oligossacarídeos.

**Quadro 4** - Principais aplicações dos fungos do gênero *Talaromyces*

| <b>Espécie</b>                           | <b>Aplicação</b>                                                | <b>Referência</b>                |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Talaromyces</i> spp.                  | Biocontrole contra praga<br>Rhizoctonia solani (praga de arroz) | Abbas et al., 2021               |
| <i>Talaromyces</i> spp.                  | Produção de dextranase                                          | Ebaya et al., 2020               |
| <i>Talaromyces stollii</i> CLY-6         | Produção de diosgenina                                          | Cheng et al., 2021.              |
| <i>Talaromyces emersonii</i>             | Produção de hidrolases<br>termoestáveis                         | Waters et al., 2010              |
| <i>Talaromyces pinophilus</i> 1-95       | Produção de $\alpha$ -amilase                                   | Xian et al., 2015.               |
| <i>Talaromyces cellulolyticus</i>        | Produção de enzimas<br>lignocelulósicas                         | Fujii et al., 2018               |
| <i>Talaromyces leycettanus</i> JCM12802  | Produção de celulases termofílicas                              | Gu et al., 2019                  |
| <i>Talaromyces stipitatus</i> MTCC 12687 | Produção de xilanase e celulase                                 | Bharti et al., 2018              |
| <i>Talaromyces stollii</i> LV186         | Produção de xilanase e celulase                                 | Orencio-Trejo et al., 2016.      |
| <i>Talaromyces amestolkiae</i>           | Produção de $\beta$ -glucosidase                                | Méndez-Líte et al., 2020.        |
| <i>Talaromyces amestolkiae</i>           | $\beta$ -xylosidase                                             | Nieto-Domínguez et al.,<br>2015. |

Fonte: autoria própria

## 2.5 Oligossacarídeos

Prebióticos são pequenas moléculas que melhoram a saúde da flora intestinal através do fornecimento de fonte de carbono para esses microrganismos. Eles, por sua vez, melhoram a saúde do hospedeiro pois propiciam melhores condições para a digestão, absorção de nutrientes e inibem o crescimento de patógenos (KHANGWAL & SHUKLA, 2019). Há também estudos mais recentes que demonstram que possivelmente há uma relação entre microbiota saudável e menor risco de desenvolvimento de certas doenças,

evidenciando assim a importância da ingestão de substâncias prebióticas visando uma melhor qualidade de vida (DAVANI-DAVARI et al., 2019).

Vários outros estudos vêm propondo que a saúde e composição da microbiota dos animais estão diretamente relacionados à saúde do indivíduo (LIN et al., 2016; GUINANE & COTTER, 2013; FIJAN, 2014). A microbiota não é responsável apenas por atividades metabólicas que resultam na absorção de nutrientes, ela também está relacionada com doenças crônicas além de diabetes tipo 2, como obesidade e câncer colorretal (LIN et al., 2016; GUINANE & COTTER, 2013). Sendo assim, é interessante ter uma dieta saudável e equilibrada, podendo esta ser suplementada com prebióticos e/ou probióticos (microrganismos que fazem parte de uma flora saudável) visando prevenir e tratar doenças (LIN et al., 2016). Os mecanismos para esse aspecto positivo não são totalmente compreendidos, mas sabe-se que a fermentação dessas substâncias pela microbiota libera ácidos graxos de cadeia curta, ácido lático, ácido butanoico e outros, que podem ter um papel importante não só no sistema digestório, mas no corpo todo (DAVANI-DAVARI et al., 2019).

Os prebióticos podem ser classificados de acordo com sua estrutura. Os oligossacarídeos compreendem as moléculas formadas por unidades de açúcares não digeríveis. Dentro dessa classe, os mais conhecidos são frutooligossacarídeos (FOS), glicooligossacarídeos (GOS), oligossacarídeos da soja (SMO), mananoligossacarídeos (MOS), galactooligossacarídeos, isomaltoligossacarídeos (IMO), gentiooligossacarídeos, isomaltulose, maltooligossacarídeos (MO) e xilooligossacarídeos (XOS) (PATEL & GOYAL, 2011).

### **2.5.1 Xilooligossacarídeos**

Dentre os oligossacarídeos, destacam-se os xilooligossacarídeos, que são encontrados naturalmente em vegetais, frutas, mel e leite (LIN et al., 2016). A ingestão dessas moléculas estimula o crescimento de bactérias do gênero

*Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*, o que por outro lado diminui ou elimina a presença de microrganismos patógenos (LIN *et al.*, 2016).

Em 1991, os efeitos dos XOS foram estudados por Imaizumi *et al.* em ratos, levando a conclusão de que sua ingestão diminui os sintomas desses animais com diabetes induzida, além de ser recomendada como substituto de açúcar (SAMANTA *et al.*, 2015; IMAIZUMI *et al.*, 1991).

Os xilooligossacarídeos são oligômeros formados por unidades de xilose através da ligação  $\beta$ -(1-4)  $\rightarrow$  ligação xilosídica formando xilobiose (2 monômeros), xilotriose (3 monômeros), xilotetose (4 monômeros), xilopentose (5 monômeros), xilohexose (6 monômeros) e assim por diante (SAMANTA *et al.*, 2015). O quadro 5 mostra as principais propriedades químicas e biológicas dos XOS.

**Quadro 5** - Propriedades químicas e biológicas dos XOS

| Propriedade                   | Valor/Natureza                                                             |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Nome comum                    | Xilooligossacarídeo                                                        |
| Sinônimo                      | D-xilose-hexulose                                                          |
| Fórmula molecular             | $C_{5n}H_{8n+2}O_{4n+1}$ ; n=2 até 6                                       |
| Peso molecular                | 282 até 810                                                                |
| Ponto de fusão                | 134°C                                                                      |
| Estabilidade pH               | 2 a 7                                                                      |
| Vantagens do uso              | Efeito prebiótico, sem elevação da taxa de glicose no sangue, antioxidante |
| Dose diária recomendada       | 8-12 g para adultos saudáveis                                              |
| Efeitos colaterais do excesso | Náusea, flatulência, diarreia e outros                                     |

Adaptado de (SAMANTA *et al.*, 2015)

Diante do exposto, o objetivo da primeira parte desse projeto foi a valorização de resíduos agroindustriais para produção de xilanases em cultivo submerso empregando-se o fungo filamentoso *Talaromyces amestolkiae*. Já a segunda parte, teve como objetivo a aplicação das xilanases na produção de xilooligossacarídeos através do emprego de hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar.



### **3 Materiais e métodos**

Os resíduos utilizados como fontes de carbono e nitrogênio foram farelo de trigo, farelo de arroz foram adquiridos em comércio local, Araraquara, SP, casca de amendoim, pele de amendoim foram doados pela empresa Jazam Peanuts, Pompéia, SP e a polpa cítrica foi doada pela Cutrale, Araraquara, SP. Todos os demais reagentes foram de grau analítico.

#### **3.1 Análise da composição dos resíduos**

A caracterização dos resíduos quanto ao teor de carbono, hidrogênio, nitrogênio, e enxofre foi realizada no Instituto de Química da USP São Paulo (IQ-USP).

Para a caracterização dos carboidratos presentes nas amostras, foram realizadas extrações com hexano e álcool, respectivamente. Inicialmente, os resíduos foram secos em estufa e depois mantidos em dessecador, em seguida, foram pesados em base seca com 3 g de cada resíduo. Foram preparados envelopes utilizando papel filtro Whatman dentro dos quais foram adicionados os resíduos. Após essa etapa, os envelopes foram colocados num sistema com Soxhlet (Laborglass, São Paulo, Brasil) e realizou-se 6 ciclos com hexano de aproximadamente 1h por ciclo. Posteriormente, o solvente foi evaporado utilizando rotaevaporador (Heidolph-Hei-VAP-Advantage) a 40°C e 150 rpm e a amostra foi secada em estufa a 50 °C por 12 h e pesada, sendo a massa extraída quantificada como óleo. Os envelopes foram secados em estufa a 50 °C por 12h visando a evaporação do hexano. De modo análogo (6 ciclos de 1 h cada), foi feita uma extração utilizando etanol 95% (v/v) como solvente, o qual após a extração, foi seco e, dessa vez a massa extraída foi quantificada como aromáticos solúveis. Os envelopes foram secos e em estufa e, em seguida, cerca de 300 mg das amostras (dados em base seca) foram tratadas com 3 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m) por 1h/30°C em tubos de ensaio (PAZ-CEDEÑO, 2017). Em seguida, o conteúdo dos tubos de ensaio foi transferido para frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL com adição de 79 mL de água destilada. A mistura foi autoclavada por

1h/121°C, resfriada e filtrada em filtros de vidro sinterizados de porosidade número 3 previamente pesados. O material retido, fração sólida, nos frascos foi lavado com 10 mL de água destilada e seco em estufa por 12h (PAZ-CEDEÑO, 2017). Os vidros sinterizados foram novamente pesados, agora contendo aromáticos solúveis. Os filtrados passaram por filtros de 0,45 µm e em seguida foram injetados em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (PAZ-CEDEÑO, 2017). A análise cromatográfica foi feita utilizando-se uma coluna BIORAD AMINEX HPX-87P, com água Milli-Q como eluente a 0,6 mL.min<sup>-1</sup> a 80°C e detecção por índice de refração a temperatura de 60°C (Shimadzu, modelo C-R7A), a fim de detectar monômeros de glicose, galactose, xilose e manose (PAZ-CEDEÑO, 2017). O volume de amostra injetada foi de 20 µL. O teor de celulose e hemicelulose foi calculado de através da concentração de glicose, arabinose, xilose e ácido acético.

O teor de lignina insolúvel foi calculado de acordo com a equação 1 e 2.

$$\text{Teor de lignina insolúvel} = \frac{(m \text{ de lignina insolúvel} + m \text{ filtro}) - (m \text{ filtro})}{(m \text{ amostra inicial})} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{Teor de lignina insolúvel} = C \times \text{Absortividade} \times V \text{ da cubeta} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

$$\text{Absortividade} = 105 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

$$\text{Volume da cubeta} = 1 \text{ cm}^3$$

A eficiência da extração da hemicelulose do bagaço foi calculada de acordo com a equação 3:

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{M_h}{P_h \times M_b} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

M<sub>h</sub> = Massa de hemicelulose obtida no final

$P_h$  = Porcentagem de hemicelulose presente no bagaço inicialmente

$M_b$  = Massa de bagaço inicial

### 3.1.1 Teor de cinzas

A caracterização dos substratos em relação ao teor de cinzas foi feita de acordo com a metodologia de Silva & Queiroz (2005). Para tanto, cadinhos de porcelana foram calcinados e tarados a 300°C por 2 h a 1100°C pelo mesmo tempo. Adicionou-se, aproximadamente, 2 g do substrato pesou-se. O material foi calcinado nas mesmas condições citadas anteriormente, resfriado e pesado novamente. O teor de cinzas foi calculado pela diferença de massas do cadinho com cinzas e vazio, como na equação 4:

$$Cinzas (\%) = \frac{(M_2 - M_1)}{M_3} \times 100 \quad (Equação 4)$$

Sendo que:

$M_1$  = massa do cadinho calcinado;

$M_2$  = massa do cadinho com cinzas;

$M_3$  = massa do substrato seco.

### 3.2 Microrganismo e produção de xilanases

*T. amestolkiae* foi generosamente cedido pela Coleção de Culturas DPUA da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. A cultura estava preservada em água destilada esterilizada onde era mantida na geladeira a 4°C e foi reativada em Caldo glicosado (LACAZ *et al.*, 2002), em agitador rotativo a 30 °C durante 7 dias e depois transferida para tubos inclinados contendo meio Czapek Yeast Agar (CYA) (PITT, 1985), os quais foram incubados a temperatura de 30°C, por 7 dias, e, posteriormente, conservados em geladeira a 4°C, sendo repicados a cada 30 dias.

Para os experimentos de produção, o inóculo foi realizado em placa de Petri (90 x 15 mm) contendo meio Ágar batata dextrose (BDA) suplementado com 0,5% (m/v) de extrato de levedura e mantido por um período de 7 dias a 30°C.

Para a produção, do inóculo foram transferidos 5 discos de micélio de 8 mm de diâmetro para frascos tipo Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio de cultivo. Inicialmente, foram testados 5 resíduos (farelo de trigo, farelo de arroz, polpa cítrica, pele de amendoim e casca de amendoim) em um meio com a seguinte composição: (g.L<sup>-1</sup>): resíduo (10), extrato de levedura (5), fosfato de potássio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (1) e pH 7. Nos experimentos posteriores, foi realizado um planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> com 4 pontos centrais, como apresentado na tabela 2 onde o resíduo utilizado foi o que apresentou melhores resultados na produção da enzima na etapa inicial, nomeadamente, farelo de trigo.

**Tabela 2** - Planejamento Fatorial Completo 2<sup>4</sup> com 4 pontos centrais visando a produção de xilanases por *T. amestolkiae* evidenciando as variáveis testadas e os níveis de cada ensaio.

| Ensaio      | Resíduo (g.L <sup>-1</sup> ) | Extrato de levedura (g.L <sup>-1</sup> ) | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> ) | pH |
|-------------|------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------|----|
| 1           | -1                           | -1                                       | -1                                                   | -1 |
| 2           | 1                            | -1                                       | -1                                                   | -1 |
| 3           | -1                           | 1                                        | -1                                                   | -1 |
| 4           | 1                            | 1                                        | -1                                                   | -1 |
| 5           | -1                           | -1                                       | 1                                                    | -1 |
| 6           | 1                            | -1                                       | 1                                                    | -1 |
| 7           | -1                           | 1                                        | 1                                                    | -1 |
| 8           | 1                            | 1                                        | 1                                                    | -1 |
| 9           | -1                           | -1                                       | -1                                                   | 1  |
| 10          | 1                            | -1                                       | -1                                                   | 1  |
| 11          | -1                           | 1                                        | -1                                                   | 1  |
| 12          | 1                            | 1                                        | -1                                                   | 1  |
| 13          | -1                           | -1                                       | 1                                                    | 1  |
| 14          | 1                            | -1                                       | 1                                                    | 1  |
| 15          | -1                           | 1                                        | 1                                                    | 1  |
| 16          | 1                            | 1                                        | 1                                                    | 1  |
| 17 a 20 (C) | 0                            | 0                                        | 0                                                    | 0  |

C – Pontos centrais

Fonte: autoria própria

Também foram feitos ensaios alterando a composição do meio visando a substituição parcial ou total do farelo de trigo por xilana comercial “Birchwood” e a

substituição do  $K_2HPO_4$  pela solução de sais de Mandels & Weber, mostrada na tabela 3.

**Tabela 3** - Composição da solução de sais de Mandels & Weber

| Componente           | Concentração (g/L) |
|----------------------|--------------------|
| $KH_2PO_4$           | 2                  |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,3                |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0,4                |
| $ZnSO_4$             | 0,0014             |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,005              |
| $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0,002              |
| $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0,0016             |

Fonte: Mandels & Weber, 1969

Ao final dos cultivos, os meios foram filtrados utilizando-se papel Whatman tamanho nº1 (Whatman, England) com o auxílio de bomba de vácuo e, em seguida, centrifugados a 2000xg por 15 minutos para sedimentação dos sólidos em suspensão. O sobrenadante foi separado para a determinação do pH final, proteínas totais e atividade enzimática (item 3.4.1).

### **3.3 Caracterização da xilanase produzida por *T. amestolkiae***

A enzima xilanase presente no meio de cultivo foi caracterizada em termos de pH e temperatura ótimos e estabilidade em relação ao pH e temperatura. Para os ensaios de determinação do pH e temperatura ótimos, e estabilidade ao pH e temperatura, o meio filtrado e centrifugado foi liofilizado utilizando o equipamento Thermo Savant Modulyo Benchtop Freeze Dryer System. Para pH ótimo, a enzima liofilizada foi solubilizada na razão de 0,01 % (m/v) em tampão McIlvaine (MCLLVINE, 1921) nos valores de pH de 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Este ensaio foi realizado a 50°C e a atividade enzimática foi determinada de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.1. Para temperatura ótima, a reação foi conduzida utilizando-se o extrato liofilizado ressuspenso na razão de 0,01% (m/v) no pH 4,0 e as temperatura de incubação testadas foram de 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C.

Nos ensaios de estabilidade em relação ao pH, o extrato liofilizado foi ressuspensionado no Tampão Mcllvaine nos mesmos valores de pH descritos anteriormente e incubados em banho termostaticado (Ethik Technology) a 30°C por 24h. No estudo da estabilidade em relação a temperatura, o extrato liofilizado foi ressuspensionado em Tampão Mcllvaine pH 4,0 e incubados em banho termostaticado (Ethik Technology) nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60°C por 24 h. Em ambos os ensaios, alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 3, 6 e 24 h e as reações enzimáticas foram conduzidas de forma análoga a anterior, no entanto, a temperatura da incubação dessa etapa foi feita na temperatura ótima da enzima (60°C). A atividade residual para cada tempo foi calculada a partir da atividade enzimática no tempo zero, sendo igual a 100%, de acordo com a equação 5:

$$Atividade\ residual\ (\%) = \frac{Atividade\ no\ tempo}{Atividade\ inicial} \times 100 \quad (Equação\ 5)$$

### 3.4 Produção de xilooligossacarídeos

A produção de xilooligossacarídeos ocorreu a partir das condições ótimas da enzima e sua estabilidade, especificamente pH 4,0 e 30°C. Foi ajustada a massa de enzima que corresponde a 30 U em 1 mL de tampão Mcllvaine pH 4.

Nos ensaios utilizando hemicelulose do bagaço, o meio reacional continha 1,5 mL de resíduo (3, 6 e 12% (m/v)) e 1,5 mL de enzima ressuspensionada em tampão e a reação ocorreu nos tempos de 12, 24, 36 e 48h.

Para a reação contendo xilana comercial Sigma, foram testados 3 e 6% de substrato com mesma quantidade de enzima e tempos de reação de 3, 6, 12 e 24h.

### 3.4 Métodos analíticos

#### 3.4.1 Atividade enzimática

Para determinação da atividade enzimática foi realizada a reação do meio fermentado ou meio liofilizado com solução do substrato xilana. O sistema consistiu em 500 µL de uma solução de xilana 1% (m/v) de “Larchwood” em tampão citrato 50 mM, pH 5 e 500 µL de extrato enzimático, totalizando 1 mL de volume final. O ensaio foi mantido em banho maria a 50°C por 20 minutos. Decorridos os 20 minutos, foi adicionado 1,5 mL de reagente DNS (3,5-dinitrosalicílico) e os ensaios foram incubados a 100°C por 10 minutos, em seguida, foram resfriados com água corrente e foram adicionados 5 mL de água destilada (MILLER, 1959). As leituras foram efetuadas em leitor de placas a 540 nm e os resultados comparados com uma curva padrão de xilose previamente construída. Uma unidade de atividade xilanásica foi definida de acordo com a equação 6, onde é quantificada a quantidade de µ moles de xilose liberados do meio reacional.

$$\frac{U}{mL} = \frac{\mu \text{ mol de xilose}}{\text{min} \times mL} \quad (\text{Equação 6})$$

#### 3.4.2 Determinação de proteínas totais

Primeiramente foi feita uma curva padrão com soro albumina bovina. A determinação do teor de proteínas totais no meio fermentado foi feita utilizando-se a metodologia de Bradford (BRADFORD, 1976), onde foram adicionados 50 µL de extrato enzimático a 1,5 mL de reagente Bradford do kit Sigma-Aldrich. As amostras foram agitadas e a reação ocorreu por 5 minutos, após os quais elas foram lidas em espectrofotômetro a 595 nm.

### 3.4.3 Eletroforese

A amostra foi preparada ressuspensando-se o extrato enzimático liofilizado em água destilada a concentração de 0,01 % (m/V) o qual foi centrifugado a 2000 xg por 15 minutos. Seguindo a proporção de 1:1 (V/V), a amostra clarificada foi incubada com o tampão de Laemmli (1970) para desnaturação das proteínas sob fervura a 100 °C por 10 minutos. Aplicou-se 3, 5, 10 ou 15 µL à canaleta do gel de SDS-PAGE descontinuo (concentrador: 5% (v/v) e separador 10% (v/v) polimerizado no sistema Mini-protean tetra cell BioRad®. A separação se deu a 80 V (2h) e 100V (~3h) em corrente constante de 20mA em tampão Tris-Glicina (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% (m/v) SDS, pH=8,3). O padrão de peso molecular referência aplicado foi BLUEye Sigma® (11 – 245KDa) composto de 12 bandas pré-coradas. As bandas obtidas foram fixadas em solução de metanol:água:ácido acético (4,5:4,5:1 v/v) por 1 h, reveladas em solução de coomassie ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,6 M, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,16 M, coomassie g-250 0,1 mM no veículo metanol : água destilada (1:4 (v/v)) sob agitação overnight e então lavadas em água até resolução das bandas. As soluções de polimerização seguem descritas na tabela 4.

**Tabela 4** - Composição dos géis para eletroforese.

| Solução                            | Volume           |               |
|------------------------------------|------------------|---------------|
|                                    | Gel concentrador | Gel separador |
| Acrilamida+Bisacrilamida*          | 0,80 mL          | 4,20 mL       |
| Tris-HCl 1,5M pH=8,8               | Não se aplica    | 2,5 mL        |
| Tris-HCl 1M pH=6,8                 | 0,80 mL          | Não se aplica |
| Docedil sulfato de sódio 10% (m/V) | 0,70 mL          | Não se aplica |
| Água destilada                     | 4,10 mL          | 2,30 mL       |
| Tetrametiletenodiamina (TEMED)     | 15,00 µL         | 10,00 µL      |
| Persulfato de amônio 10% (m/V)     | 65,00 µL         | 50,00 µL      |

\*solução comercial a proporção 29:1 (V/V) Sigma®.

### 3.4.4 Determinação de xilooligossacarídeos

Após a reação nos tempos citados na seção anterior, as amostras foram fervidas por 5 min, centrifugadas a 2000 xg por 15 minutos e filtradas em filtros de porosidade de 0,5 µm para injeção. A determinação foi realizada utilizando-se



Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) equipamento Shimadzu, empregando coluna Aminex HPX 47 C a 80 °C e fluxo 0,6 mL/min, utilizando água Mili-Q como eluente.

## 4 Resultados e discussão

### 4.1 Composição dos resíduos usados como componentes do meio de cultura

Inicialmente, os resíduos foram caracterizados em relação ao seu teor de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre. Os resultados estão mostrados na tabela 5. Na Tabela 6 é apresentado a composição dos farelos em termos de celulose, xilana, lignina, extrativos e óleo.

**Tabela 5** - Composição dos farelos estudados em relação aos seus teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre

| Resíduo        | Carbono (%) | Hidrogênio (%) | Nitrogênio (%) | Enxofre (%) | Carbono/Nitrogênio |
|----------------|-------------|----------------|----------------|-------------|--------------------|
| Polpa cítrica  | 33,64       | 5,48           | 1,16           | 0,75        | 29,0               |
| Farelo arroz   | 42,62       | 6,74           | 2,46           | 0,95        | 17,3               |
| Farelo trigo   | 42,22       | 6,73           | 3,6            | 0,97        | 11,7               |
| Casca amendoim | 46,15       | 5,87           | 0,91           | 0,83        | 50,7               |
| Pele amendoim  | 53,05       | -              | 3,69           | -           | 14,4               |

Fonte: autoria própria

O teor de cada componente lignocelulósico é variado, dentre outros fatores, de acordo com a espécie vegetal e parte do vegetal (RAMAMOORTHY et al., 2015). A casca de amendoim por exemplo é uma parte importante dedicada a proteção e sustentação, sendo esse um dos fatores responsáveis pelo alto teor de lignina. O farelo de trigo, é a parte da casca do grão do trigo, no entanto, é menos resistente e possui alto teor de celulose e hemicelulose.

Como pode ser observado na Tabela 6, a relação carbono/nitrogênio se mostrou baixa para o farelo de trigo e alta para a casca de amendoim. Em relação aos teores de celulose, xilana, lignina, extrativos e óleos, o farelo de trigo apresentou o maior teor de xilana e, possivelmente, é uma promissora fonte visando a obtenção de enzimas xilanolíticas.

**Tabela 6** - Composição dos cinco farelos em relação ao teor de celulose, xilana, lignina, extrativos e óleo

| Resíduo               | Celulose | Xilana | Lignina total | Extrativos | Óleo | Total |
|-----------------------|----------|--------|---------------|------------|------|-------|
| (% m/m)               |          |        |               |            |      |       |
| <b>Farelo trigo</b>   | 32,7     | 14,6   | 8,1           | 14         | 22,6 | 69,4  |
| <b>Farelo Arroz</b>   | 25,4     | 6,5    | 24,6          | 26,3       | 10,2 | 93    |
| <b>Polpa Cítrica</b>  | 33,3     | 10,3   | 7,5           | 24,5       | 9,9  | 85,5  |
| <b>Pele Amendoim</b>  | 5        | 1,1    | 14,5          | 42,1       | 35,3 | 98    |
| <b>Casca Amendoim</b> | 20,9     | 9,8    | 43,6          | 3,6        | 20,1 | 98    |

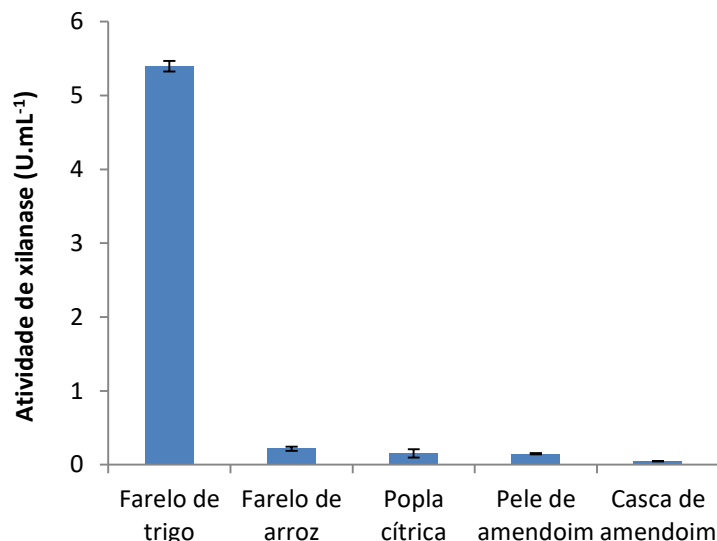
Fonte: autoria própria

## 4.2 Produção de xilanase empregando diferentes resíduos

Os diferentes resíduos industriais, nomeadamente, farelo de trigo, farelo de arroz, polpa cítrica, pele de amendoim e casca de amendoim foram empregados como fonte de nutrientes para o microrganismo *T. amestolkiae* em cultivo submerso visando a produção de xilanases. Os resultados estão reportados na Figura 7.

Nas condições avaliadas, o farelo de trigo apresentou atividade enzimática cerca de 25 vezes superior aos outros resíduos avaliados,  $5,40 \text{ U.mL}^{-1}$ , enquanto os outros apresentaram atividade inferior a  $0,25 \text{ U.mL}^{-1}$ . Em geral, quando há maior teor de um polissacarídeo no meio e ausência de açúcares simples, o metabolismo do microrganismo atua aumentando a produção de enzimas hidrolases (KNOB & CARMONA, 2008).

**Figura 7** - Atividade de xilanases (U.mL<sup>-1</sup>) obtida por cultivo submerso de *T. amestolkiae* (7 dias, 30°C, 150 rpm) empregando diferentes resíduos. As barras de erro representam o desvio padrão da triplicata.



Fonte: autoria própria

Como diversos autores mostram, o teor de carboidratos e o seu tipo são fatores importantes para o crescimento e produção do produto de interesse (KNOB & CARMONA, 2008).

Ahmad et al. (2013), Raj e Chandra (1996) e Ravichandra (1996) estudaram a produção de xilanases produzidas por *Aspergillus sp.* em meio contendo farelo de trigo e obtiveram resultados interessantes com esse substrato. Outros autores como Yoshioka (1981), Waters et al. (2010) e Maalej (2009) também empregaram esse resíduo para a produção de xilanases, utilizando outras espécies de *Talaromyces*. O presente estudo e os citados acima corroboram o caráter indutor da xilana presente na biomassa de forma a aumentar a produção da xilanase. Dessa maneira, nas etapas posteriores do trabalho empregou-se somente farelo de trigo como indutor para a produção de xilanases.

Empregou-se um planejamento fatorial completo para avaliar as variáveis independentes concentração de farelo de trigo, extrato de levedura e  $K_2HPO_4$  e pH sob a variável resposta atividade xilanolítica. A matriz experimental está apresentada na Tabela 2 enquanto os resultados da atividade de xilanase estão apresentados na tabela 7.

**Tabela 7** - Resultados do planejamento fatorial completo  $2^4$

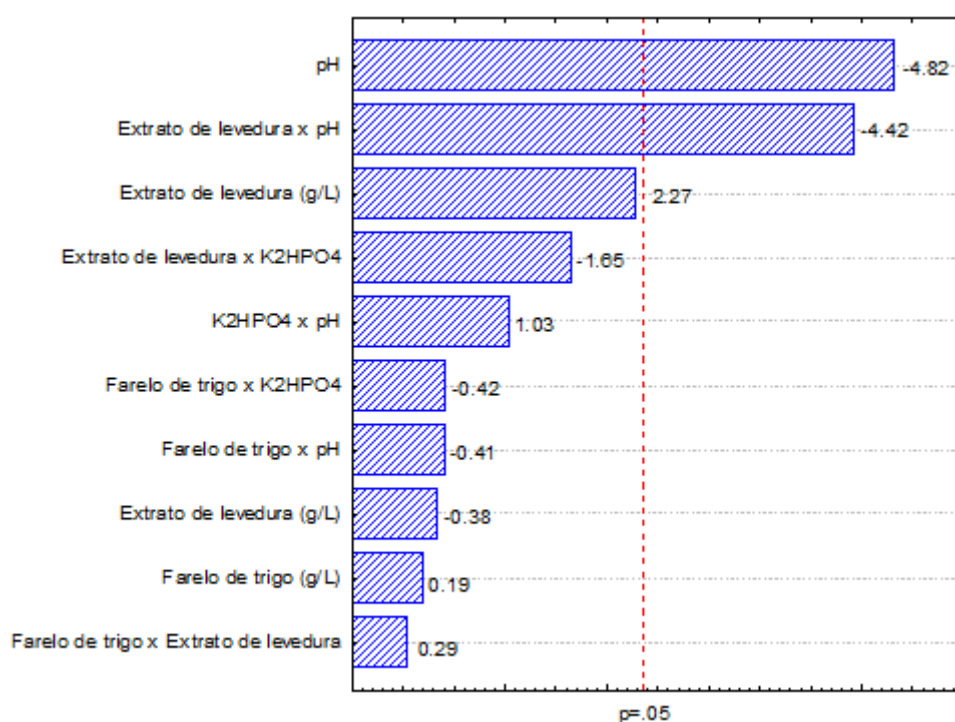
| Ensaio          | Farelo de trigo (g.L <sup>-1</sup> ) | Extrato de levedura (g.L <sup>-1</sup> ) | $K_2HPO_4$ (g.L <sup>-1</sup> ) | pH | Atividade enzimática (U.mL <sup>-1</sup> ) |
|-----------------|--------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------|----|--------------------------------------------|
| 1               | 10                                   | 0                                        | 1                               | 5  | 1,34 ± 0,16                                |
| 2               | 30                                   | 0                                        | 1                               | 5  | 2,57 ± 0,37                                |
| 3               | 10                                   | 5                                        | 1                               | 5  | 8,67 ± 0,26                                |
| 4               | 30                                   | 5                                        | 1                               | 5  | 8,33 ± 0,70                                |
| 5               | 10                                   | 0                                        | 5                               | 5  | 2,48 ± 0,25                                |
| 6               | 30                                   | 0                                        | 5                               | 5  | 2,80 ± 0,21                                |
| 7               | 10                                   | 5                                        | 5                               | 5  | 5,55 ± 1,02                                |
| 8               | 30                                   | 5                                        | 5                               | 5  | 6,09 ± 0,51                                |
| 9               | 10                                   | 0                                        | 1                               | 9  | 1,16 ± 0,07                                |
| 10              | 30                                   | 0                                        | 1                               | 9  | 1,61 ± 0,14                                |
| 11              | 10                                   | 5                                        | 1                               | 9  | 0,35 ± 0,02                                |
| 12              | 30                                   | 5                                        | 1                               | 9  | 0,76 ± 0,11                                |
| 13              | 10                                   | 0                                        | 5                               | 9  | 3,38 ± 0,32                                |
| 14              | 30                                   | 0                                        | 5                               | 9  | 1,85 ± 0,03                                |
| 15              | 10                                   | 5                                        | 5                               | 9  | 0,32 ± 0,03                                |
| 16              | 30                                   | 5                                        | 5                               | 9  | 0,35 ± 0,02                                |
| 17, 18, 19 e 20 | 20                                   | 2,5                                      | 3                               | 7  | 13,02 ± 0,88                               |

Fonte: autoria própria

Para os pontos centrais (17, 18, 19 e 20), com meio de cultura com as composições de 20 g/L de farelo de trigo, 2,5 g/L de extrato de levedura, 3 g/L  $K_2HPO_4$  e pH 7, a atividade enzimática média obtida foi de 13,02 U.mL<sup>-1</sup>, mostrando um incremento de 141% em relação ao obtido nas condições anteriores. Utilizando o Software Estatística, foi possível estudar quais das variáveis testadas possuem maior significância para a produção de xilanase. A figura 8 apresenta o diagrama de Pareto para o planejamento realizado e mostra que o pH e a interação entre as variáveis independentes “extrato de levedura” e “pH” foram as mais importantes nesse estudo, com significância maior que 95%. A variável pH apresentou significância negativa indicando que trabalhar no nível inferior favorece a produção da xilanase. Como a interação entre as variáveis

extrato de levedura e pH apresentou significância negativa indica que trabalhar em valores de pH mais baixo e com maiores concentrações de extrato de levedura. Apesar de o extrato de levedura sozinho não ter significância para o processo a 95% de confiança, o nível positivo geraria uma maior produção de xilanase, resultado que corrobora com a interação entre o extrato de levedura e o pH.

**Figura 8** - Diagrama de Pareto indicando a significância das variáveis estudadas.

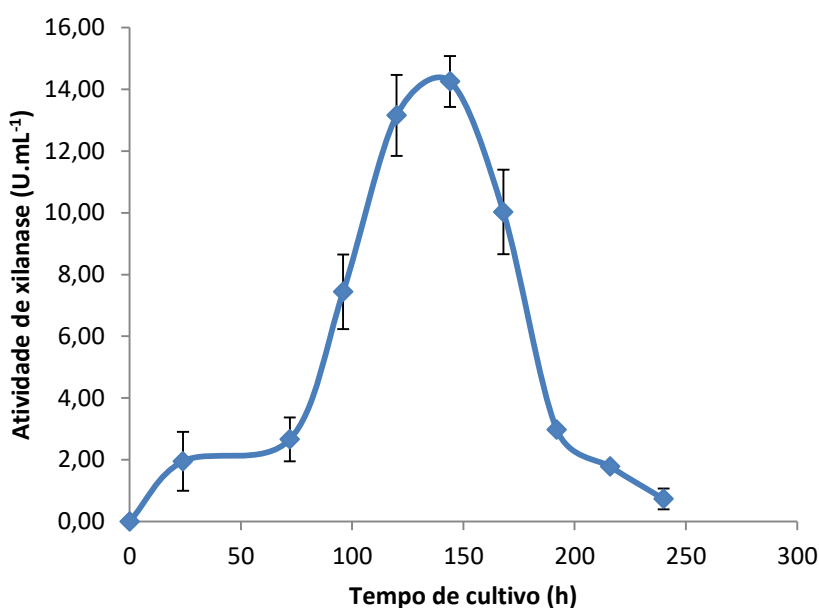


Fonte: autoria própria

O extrato de levedura é o componente mais caro do meio, com preço de, aproximadamente, 540 reais/kg. Assim, trabalhar com maiores concentrações dessa matéria-prima aumentaria o custo do produto final, indo na contramão do objetivo do trabalho é desenvolver um meio de custo reduzido para a obtenção de enzimas hemicelulósicas.

Dessa forma, empregou-se a estratégia de avaliar outras condições de forma a incrementar a produção das xilanases. Nas melhores condições obtidas no planejamento experimental, foram feitos cultivos ao longo de 10 dias para determinar a atividade enzimática em cada dia, como mostrado na figura 9.

**Figura 9** - Atividade enzimática para a xilanase obtida ao longo do cultivo de *T. amestolkiae* durante 10 dias (240 h) nas condições do ponto central do planejamento experimental 2<sup>4</sup>. As barras de erro representam o desvio padrão da triplicata.



Fonte: autoria própria

Esse experimento foi conduzido aplicando-se as melhores condições obtidas no planejamento fatorial completo (farelo de trigo 20 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 2,5 g.L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g.L<sup>-1</sup>, pH = 7,0, agitação = 150 rpm e T° = 30°C). Após 144h de cultivo a atividade enzimática foi máxima (14,25 U.mL<sup>-1</sup>), no entanto, ainda bem próxima do ponto anterior, 120h, com atividade de 13,15 U.mL<sup>-1</sup>. Também visando o menor gasto energético possível, viu-se que é vantajoso realizar o cultivo por 120 horas. Dessa maneira, realizou várias bateladas e liofilizou todo o meio para serem realizados os ensaios de caracterização apresentados na seção 4.3.

O emprego de uma solução adequada de sais resulta em crescimento fúngico e produção de enzimas, já que alguns componentes fazem parte de cofatores. Dessa forma, decidiu-se avaliar a substituição do KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> por uma solução de sais de Mandels e Weber. A composição da solução de sais é mostrada na tabela 3 na seção 3.2.

Os ensaios foram feitos em duplicata utilizando-se as composições mostradas na tabela 8. Os ensaios foram feitos em triplicata e o pH dos meios foi

ajustado para 7 e eles foram cultivados em agitador orbital a 30°C/150 rpm por 7 dias.

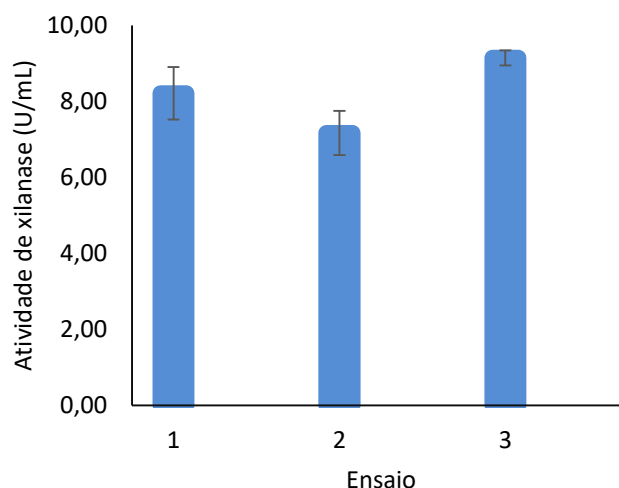
**Tabela 8** - Composição dos meios utilizados para os ensaios

| Ensaio | Extrato de levedura (g/L) | Farelo de trigo (g/L) | Xilana comercial (g/L) | Sais de Mandels & Weber |
|--------|---------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| 1      | 2,5                       | 20                    | 0                      | Presença                |
| 2      | 2,5                       | 0                     | 20                     | Presença                |
| 3      | 2,5                       | 10                    | 10                     | Presença                |

Fonte: autoria própria

A atividade enzimática máxima obtida nesses ensaios foi de  $9,14 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,19$  no ensaio 3, inferior ao encontrado para o meio já selecionado através do planejamento experimental ( $13,02 \text{ U.mL}^{-1}$ ). O ensaio 2, onde a única fonte de carbono foi a xilana comercial Birchwood, apresentou o resultado mais baixo ( $7,16 \text{ U.mL}^{-1}$ ), indicando que o uso de farelos mais baratos é positivo do ponto de vista produtivo e econômico.

**Figura 10** - Atividade enzimática obtida para cada ensaio testando a xilana e solução de sais. As barras de erro representam o desvio padrão da triplicata.



Fonte: autoria própria

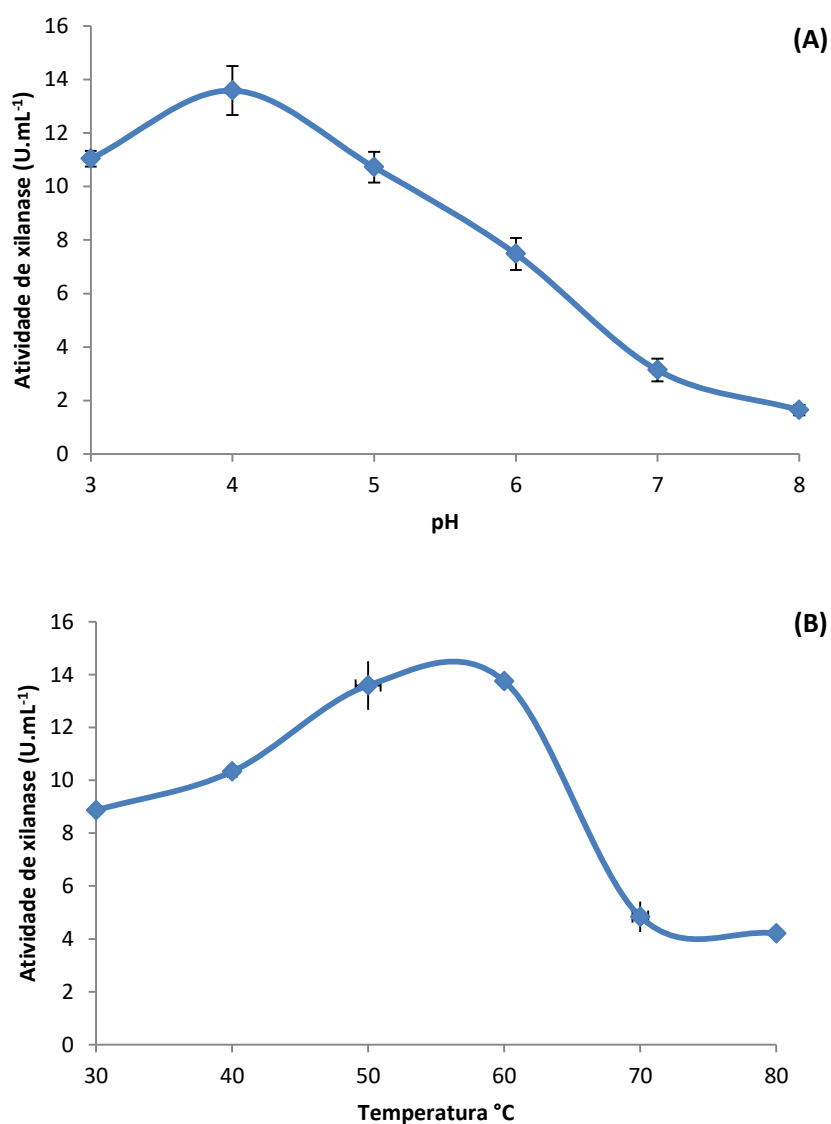


## 4.3 Caracterização da xilanase produzida

### 4.3.1 Determinação da temperatura e pH ótimos

O extrato liofilizado foi ressuspensionado em tampão Mcllvaine em diferentes valores de pH (3, 4, 5, 6, 7 e 8). A Figura 11 apresenta os resultados obtidos para o pH ótimo.

**Figura 11** – pH (A) e temperatura (B) ótimos das enzimas xilanases produzidas por cultivo submerso *T. amestolkiae*. As barras de erro representam o desvio padrão da triplicata.



Fonte: autoria própria

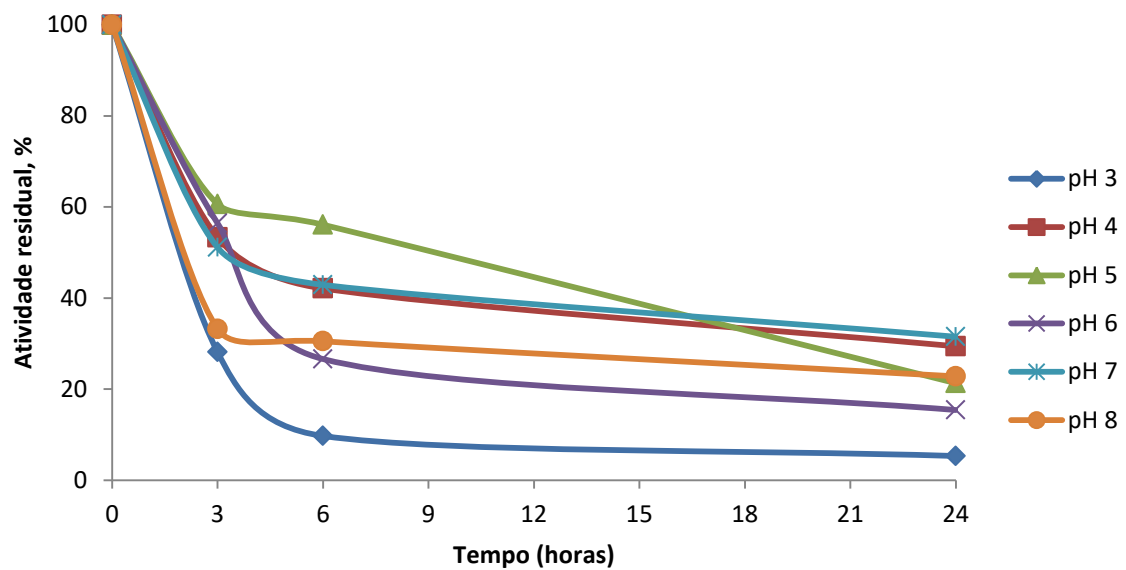
Os valores de pH mais ácidos favoreceram a atividade enzimática, sendo o pH 4 o melhor para essa enzima. Em geral, xilanases de origem bacteriana apresentam pH ótimo próximo da neutralidade, enquanto xilanases de origem fúngica, pH ótimo ácido (WALIA et al., 2017; BEG et al., 2001). A tabela 1 da seção “2.2.3.1 Xilanases” apresenta comparativo de alguns microrganismos produtores de xilanases. Dentre os trabalhos citados, 9 autores estudaram o valor de pH ótimo de xilanases fúngicas e, dentre eles, 6 obtiveram valores de pH ótimos abaixo da neutralidade.

A temperatura ótima da enzima foi determinada na faixa de 30 a 80°C, como mostrado na figura 11. Na faixa de 50 - 60°C a atividade enzimática foi superior e para maiores temperaturas ela decresceu drasticamente, indicando a perda da estrutura terciária. Esses resultados estão de acordo com os mostrados por diversos autores na tabela 1, em que as xilanases de fungos apresentam temperatura ótima entre 50 e 80 °C.

#### **4.3.2 Determinação da estabilidade em diferentes valores de temperatura e pH**

A estabilidade da enzima foi testada na faixa de pH de 3 à 8, onde os valores de pH em que ela se manteve mais estável foram de 4 e 7. Após 24 horas a atividade residual nessas duas condições foi de aproximadamente 30% como mostrado na figura 12. Knob e Carmona (2008) determinaram a atividade residual de xilanase produzida por *Penicillium sclerotiorum* em diferentes valores de pH, após incubação por 24 h e obtiveram resultados semelhantes ao presente trabalho: os valores de pH relatados pelas autoras que resultaram em maior estabilidade foram de 4,0 e 6,0.

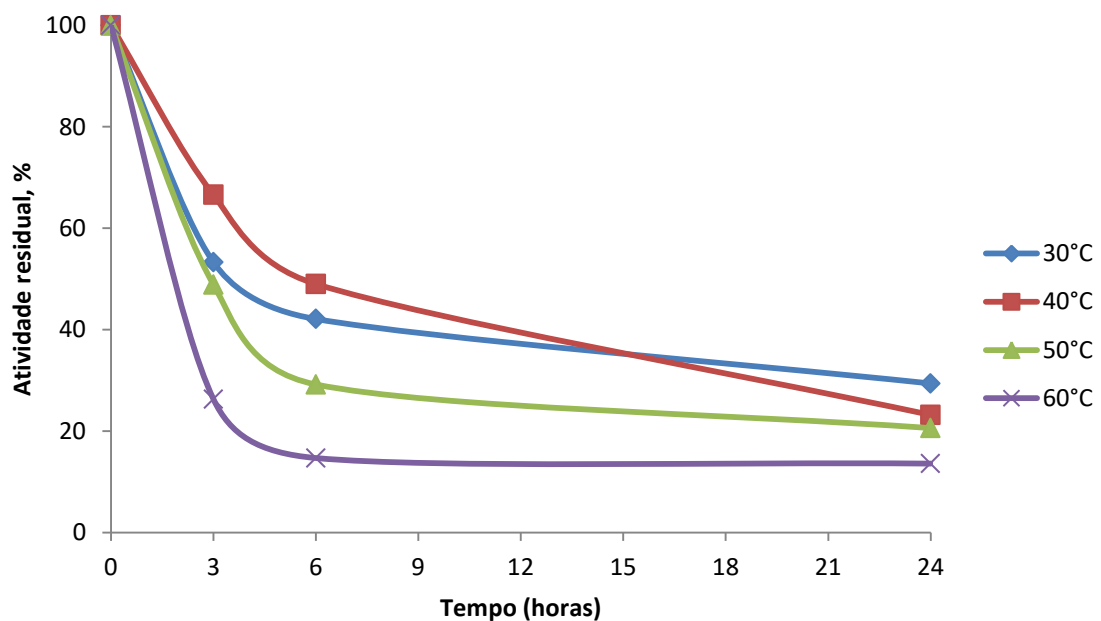
**Figura 12** - Estabilidade da enzima xilanase produzida por *T. amestolkiae* em diferentes valores de pH a 30°C.



Fonte: autoria própria

A estabilidade em diferentes temperaturas foi avaliada na faixa de 30 à 60°C. Como mostrado na figura 13, temperaturas mais altas estão relacionadas a maior perda de atividade ao longo do tempo.

**Figura 13** - Estabilidade da enzima xilanase produzida por *T. amestolkiae* em diferentes temperaturas em Tampão Mcllvaine pH 4.



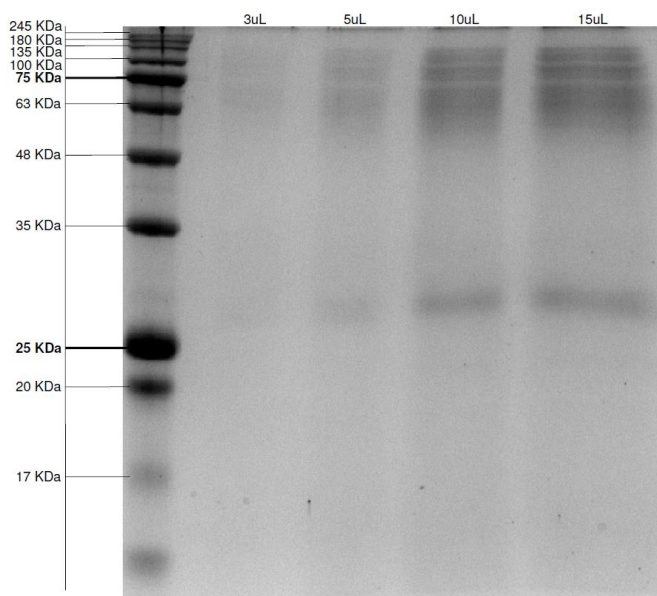
Fonte: autoria própria

Maalej et al. (2009) estudou a estabilidade térmica da xilanase produzida por *Talaromyces thermophilus* nas faixas de temperatura de 50 a 100 °C durante incubação por períodos de tempo variados. Os resultados desse autor indicaram a presença de xilanase termo resistente, já que a atividade residual foi de 100% após 7 dias de incubação a 50 °C. Por outro lado, Li et al. (2007), testaram a estabilidade de xilanase produzida por *Penicillium oxalicum* ZH-30 num período de incubação de 60 minutos, onde à 60 °C, a atividade residual é de cerca de 70%.

#### **4.3.3 Determinação do peso molecular da enzima**

Na figura 14 tem-se o perfil do extrato enzimático obtido nas condições já discutidas. Observa-se que entre os pesos moleculares de 25 e 35kDa há uma banda que provavelmente é referente a enzima de interesse no presente trabalho. As demais bandas são de proteínas de pesos moleculares superiores (> 63 kDa) e provavelmente são de outras proteínas presentes no meio fermentado. A literatura mostra que vários tipos de xilanases podem ser produzidos por diferentes microrganismos, sendo assim, o peso molecular também varia de espécie para espécie. Para confirmar que a banda de 25 kDa é referente a xilanase, ensaios de purificação da enzima devem ser realizados. No entanto, uma outra espécie de *Talaromyces*, o *T. thermophilus*, produz xilanases de peso molecular de 25kDa (MAALEJ et al., 2009).

**Figura 14** - Perfil PAGE-SDS de meio fermentado de *Talaromyces amestolkiae*.



Fonte: autoria própria

#### **4.4 Hidrólise enzimática da xilana comercial e da hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar**

##### **4.4.1 Composição da xilana comercial e do bagaço de cana-de-açúcar**

A composição da xilana comercial Birchwood (sigma) e do bagaço da cana-de-açúcar aplicados para obtenção de XOS foi determinada em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Fernando Masarin, do departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UNESP de Araraquara.

A composição do bagaço da cana-de-açúcar obtida pelo presente projeto está disposta na tabela 9 obtida. A tabela 10 mostra um comparativo da literatura em relação à composição desse mesmo resíduo, onde o teor de celulose do bagaço do trabalho atual foi inferior a todos os mostrados, sendo semelhante ao obtido por Sasaki et al., 2003. A hemicelulose também foi um pouco inferior ao visto na literatura e o teor de lignina foi mais alto.

A xilana “Birchwood” comercial da Sigma foi caracterizada por outros membros do Departamento de Bioprocesso e Biotecnologia (MAFEI *et al.*, 2019). Sua composição está na tabela 11.

**Tabela 9** - Composição do bagaço da cana-de-açúcar em relação ao teor de lignina, carboidratos, grupos arabinosil, acetil, metil glucurônico, extrativos e cinzas.

| Composição do bagaço da cana de açúcar (%) |            |            |                  |              |                         |            |         |            |
|--------------------------------------------|------------|------------|------------------|--------------|-------------------------|------------|---------|------------|
| Lignina total                              | Celulose   | Xilana     | Grupo arabinosil | Grupo Acetil | Grupo metil glucurônico | Extrativos | Cinzas  | Total      |
| 25,1 ± 0,3                                 | 34,4 ± 0,3 | 21,8 ± 0,2 | 1,0 ± 0,0        | 2,5 ± 0,2    | 8,8 ± 0,5               | 2,8 ± 0,0  | 3,2 ± 0 | 99,6 ± 0,5 |

Fonte: autoria própria

**Tabela 10** - Composição do bagaço da cana-de-açúcar de diferentes procedências.

| Composição (% massa seca) |              |         |        |                               |
|---------------------------|--------------|---------|--------|-------------------------------|
| Celulose                  | Hemicelulose | Lignina | Cinzas | Referência                    |
| 50                        | 25           | 25      | 2,4    | Pandey et al., 2000.          |
| 38,9                      | 26,19        | 23,9    | -      | Rodríguez-Chong et al., 2004. |
| 41                        | 25,2         | 23      | 1,1    | Pessoa et al., 1997.          |
| 40                        | 24           | 25      | -      | Saha, 2003                    |
| 35                        | 35,8         | 16,1    | -      | Sasaki et al., 2003.          |
| 43,6                      | 33,5         | 18,1    | 2,3    | Sun et al., 2004.             |
| 44,9                      | 27,5         | 22,1    | 1,6    | Brienzo, 2010                 |

Adaptado de BRIENZO, 2010.

**Tabela 11** - Composição da xilana comercial em relação ao teor de xilana.

| Composição da xilana comercial |                |                   |              |            |          |
|--------------------------------|----------------|-------------------|--------------|------------|----------|
| Hemicelulose (%)               | Arabinosil (%) | Lignina total (%) | Celulose (%) | Cinzas (%) | Soma (%) |
| 58,5 ± 1,2                     | nd             | 4,6 ± 0,4         | -            | 12,6 ± 1,0 | 76,7     |

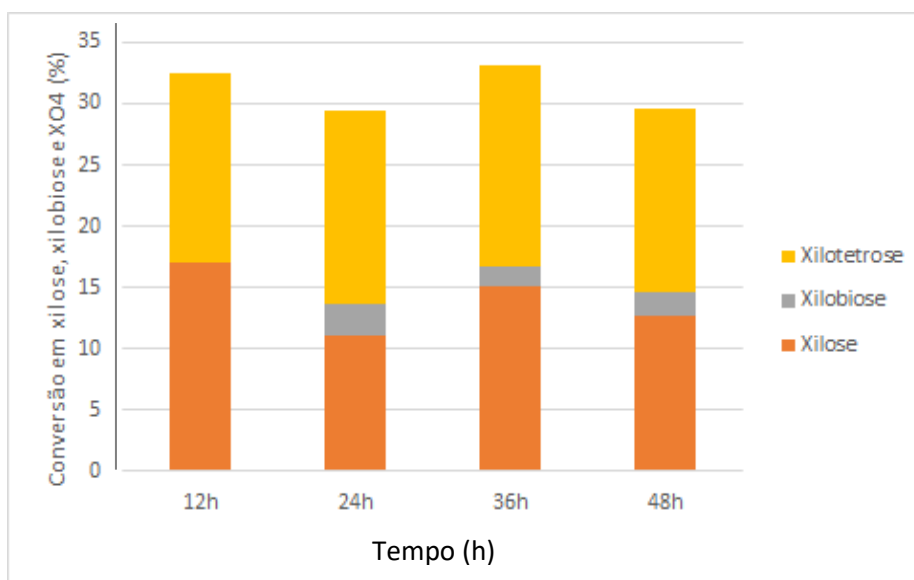
Adaptado de Mafei et al., 2019.

O bagaço possui alto teor de lignina, moléculas associadas à celulose que conferem rigidez e proteção aos vegetais. A grande presença dessas moléculas no bagaço impede a aplicação direta de enzimas para sua hidrólise, sendo necessárias etapas visando remover esses compostos (BRIENZO, 2010).

#### 4.4.2 Hidrólise enzimática da hemicelulose bagaço de cana-de-açúcar

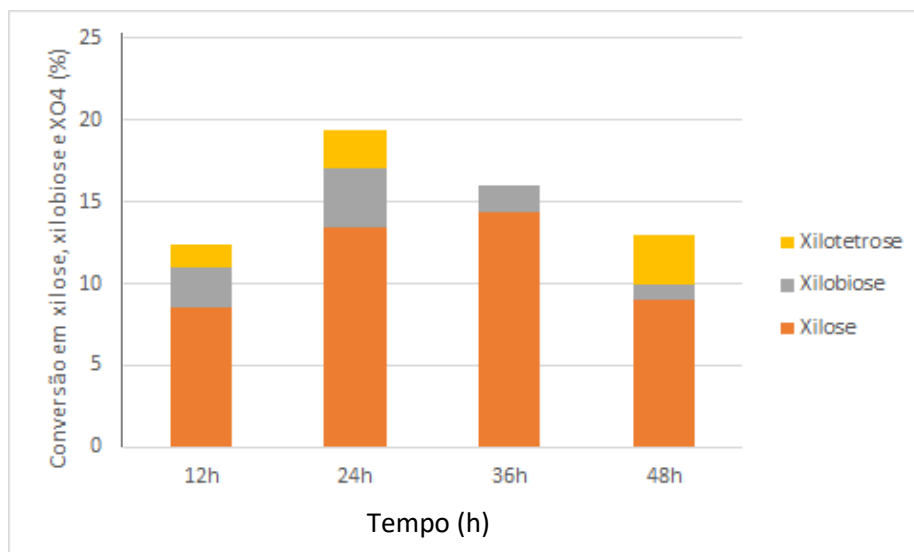
A hemicelulose extraída do bagaço foi hidrolisada nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h variando-se a concentração de hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar, como mostrado na figura 15, 16 e 17 respectivamente. É possível perceber que houve maior formação de moléculas pequenas: xilose, xilobiose e xilotetrose. Para a maior carga de substrato, de 9% (m/v), não houve formação de xilotetrose. Também pode-se notar que a taxa de conversão total ao longo do tempo não variou tanto, indicando que foi atingido um estado estacionário onde a enzima provavelmente se desnaturou e não foi mais capaz de realizar a hidrólise. No projeto anterior foram determinadas as atividades relativas das xilanases até 24 h, onde a atividade residual foi de 30% e provavelmente após 48 h seria muito inferior à esse valor. Outro fator importante é a característica da hemicelulose e facilidade de acesso pelas enzimas. Portanto, a qualidade da hemicelulose extraída pode não ter favorecido a formação de XOS.

**Figura 15** - Conversão da hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar com uma carga inicial de 3% (m/v) em xilose, xilobiose e xilotetrose.



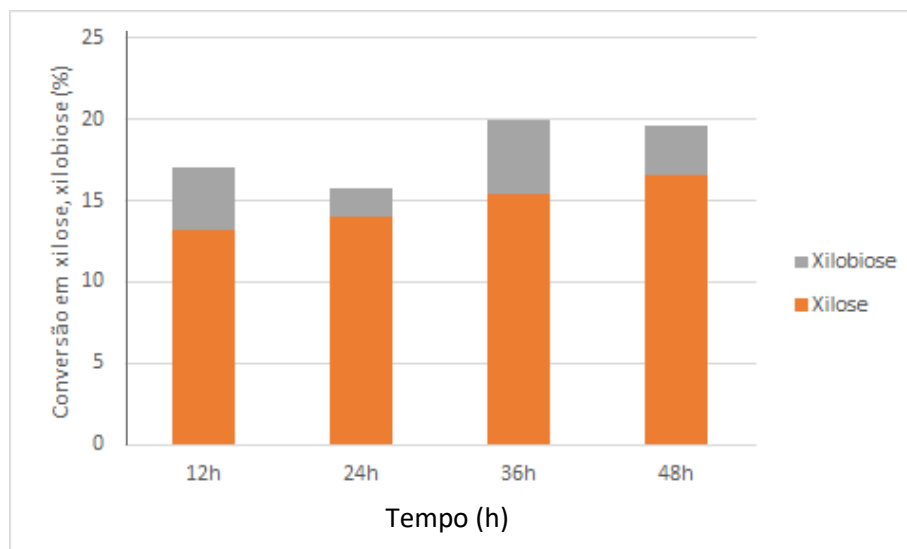
Fonte: autoria própria

**Figura 16** - Conversão da hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar com uma carga inicial de 6% (m/v) em xilose, xilobiose e xilotetrose.



Fonte: autoria própria

**Figura 17** - Conversão da hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar com uma carga inicial de 9% (m/v) em xilose e xilobiose.



Fonte: autoria própria

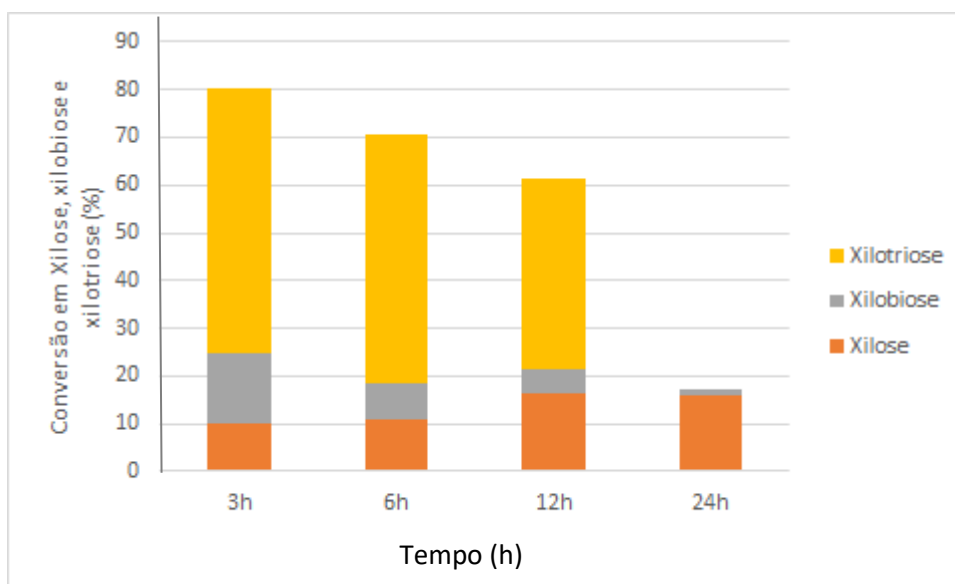
#### 4.4.3 Hidrólise enzimática da xilana comercial “Birchwood”

Como os tempos testados para a hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar foram muito longos e não resultaram na formação tão acentuada de XOS, decidiu-se empregar os tempos de 3, 6, 12 e 24 h para esses ensaios.



Na figura 18 tem-se a conversão do substrato em xilose, xilobiose e xilotriose. Aplicando uma concentração de substrato menor, 3% (m/v), é possível perceber que a conversão foi alta resultando na formação mais significativa foi de xilotriose que com o tempo foi convertida em monômeros.

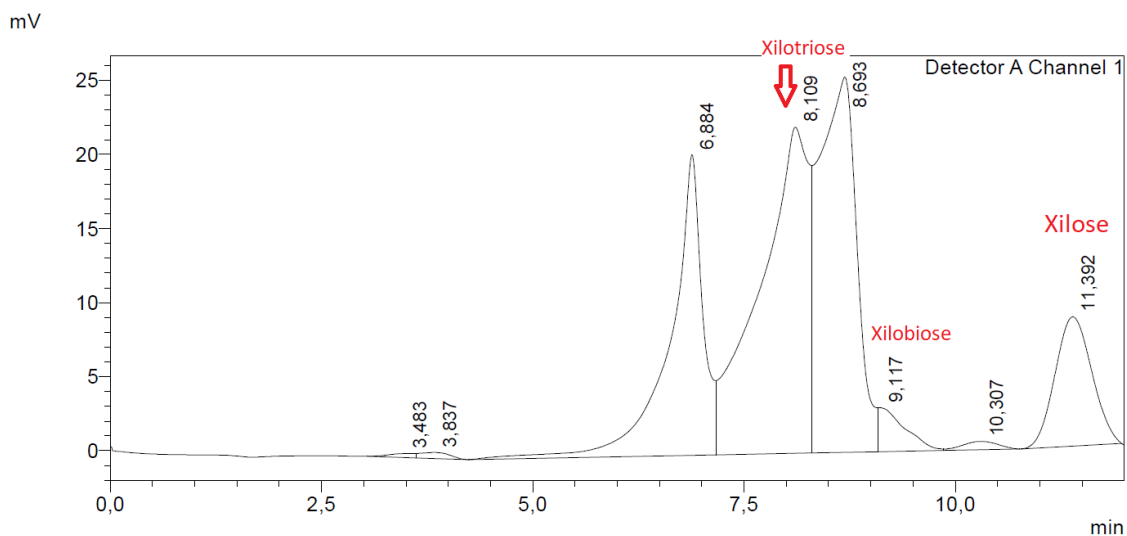
**Figura 18** - Conversão da xilana comercial com uma carga inicial de 3% (m/v) em xilose, xilobiose e xilotriose.



Fonte: autoria própria

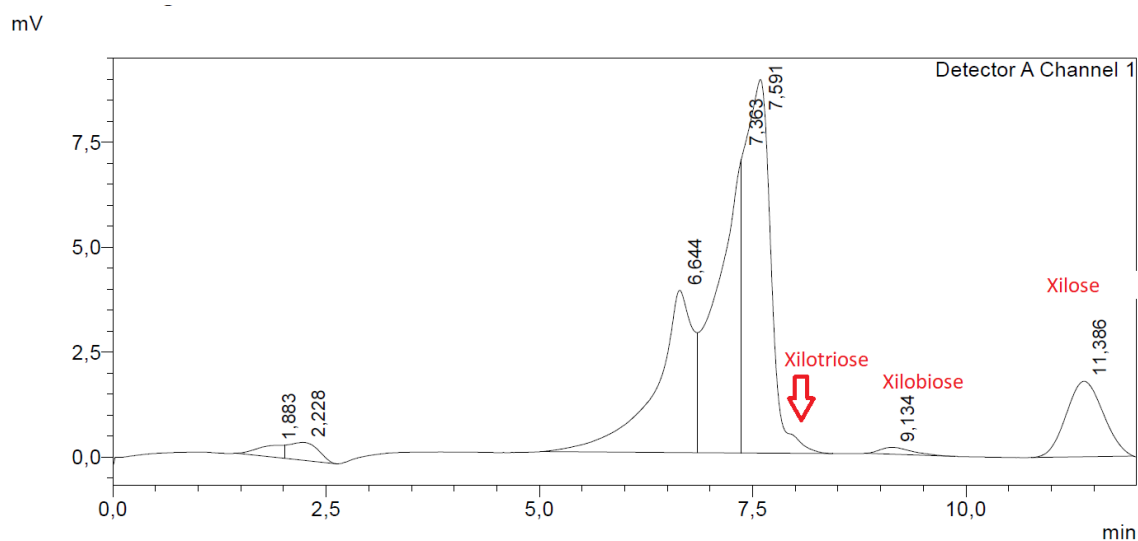
No tempo de 24 h de hidrólise temos um resultado não esperado, pois de acordo com os cromatogramas não houve formação de xilotriose, sendo contrário a tendência esperada e ao balanço de massa. Isso possivelmente se deve a diluição realizada nas amostras de 24 h. As figuras 19 e 20 são referentes aos cromatogramas obtidos. Vemos na figura 19 que o pico referente a xilotriose (tempo de retenção de 8,1 minutos) está fundido com algum outro composto não identificado, mas ainda foi possível identificar sua área. Na figura 20, com a amostra após 24 h de reação, foi realizada uma diluição maior devido a maior concentração de produtos formados e os picos estão todos fundidos e no tempo de retenção referente a xilotriose há um pequeno pico que não foi separado.

**Figura 19** - Cromatogramas de uma das amostras após 12 h de reação e com diluição de 1:5.



Fonte: autoria própria

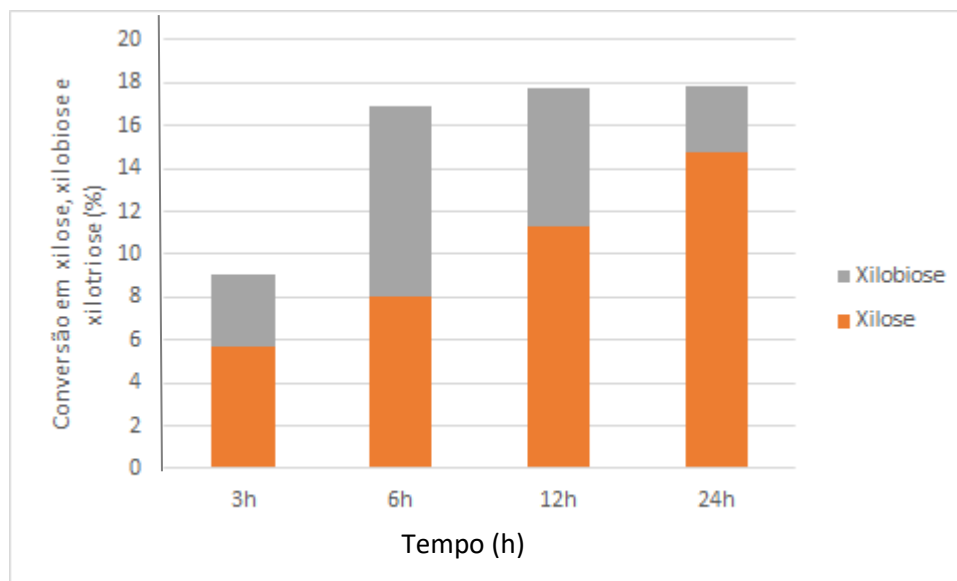
**Figura 20** - Cromatogramas de uma das amostras após 24 h de reação e com diluição de 1:20.



Fonte: autoria própria

Para maior quantidade de substrato, a conversão foi muito mais baixa e significativa para a formação de xilose.

**Figura 21** - Conversão da xilana comercial com uma carga inicial de 6% (m/v) em xilose, xilobiose e xilotriose.



Fonte: autoria própria

As xilanases podem ser divididas em relação ao local de atuação como explicado na seção 2.1. No presente projeto, o meio enzimático aplicado não foi caracterizado em relação a composição de endo e exo xilanases, o que varia de acordo com a espécie de microrganismo, as condições de cultivo e o meio de cultura utilizado (BRIENZO, 2010). Também foram percebidos problemas na análise dos cromatogramas, pois algumas outras substâncias não identificadas possuíram um pico acentuado, interferindo na quantificação dos produtos de interesse.

## 5 Conclusão

A xilanase estudada pode ser produzida por *T. amestolkiae* em meio de cultivo contendo resíduos agroindustriais, os quais induzem a produção da mesma, sendo a composição desses materiais um fator importante, já que materiais lignocelulósicos são ideais para a produção de enzimas capazes de degradá-lo. Além disso, os fatores econômico e ambiental são importantes ao se analisar a viabilidade do processo, sendo assim, a utilização de resíduos algo positivo. A enzima produzida apresentou atividade ótima a pH 4,0 e 50°C e um peso molecular próximo a 30kDa. Assim, pode-se concluir que o uso de resíduos agroindustriais para a obtenção de enzimas é uma alternativa viável para redução de custos de processo e diminuição do descarte deste material no meio ambiente.

A hidrólise enzimática empregando-se a hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar resultou numa eficiência menor do que a obtida com o substrato xilana comercial. No entanto, ambos os ensaios mostram que a enzima utilizada é capaz de hidrolisar esses substratos de forma a obter xilose, xilobiose, xilotriose e xilotetrose. Portanto, embora a formação de XOS ter sido inferior ao esperado, o presente trabalho levanta a possibilidade da utilização da xilanase produzida para hidrólise completa (formação de monômeros) e da utilização de novas condições do meio reacional, tais como tempo, concentração da enzima e do substrato para obter XOS.

## Referências

- ABBAS, Aqleem et al. Isolation and evaluation of the biocontrol potential of *Talaromyces* spp. against rice sheath blight guided by soil microbiome. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 10, p. 5946-5961, 2021.
- AHMAD, Zulfiqar; BUTT, Masood Sadiq; RIAZ, Muhammad. Partial Purification and Characterization of Xylanase produced from *Aspergillus niger* using Wheat Bran. **Pakistan Journal of Agriculture Science, Faisalabad**, v. 50, n. 3, p. 433-437, 2013.
- ANTHONY, T. et al. High molecular weight cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 6, p. 647-654, 2003.
- BARRETT, A. J. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 4: corrections and additions (1997). **European journal of biochemistry**, v. 250, n. 1, p. 1-6, 1997.
- BEDADE, Dattatray et al. Extracellular xylanase production from a new xylanase producer *Tuber maculatum* mycelium under submerged fermentation and its characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 288-293, 2017.
- BEG, Q. et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 326-338, 2001.
- BEJARANO, Ana; PUOPOLO, Gerardo. Bioformulation of microbial biocontrol agents for a sustainable agriculture. In: **How Research Can Stimulate the Development of Commercial Biological Control Against Plant Diseases**. Springer, Cham, 2020. p. 275-293.
- BHARTI, Amit Kumar et al. Exploitation of *Parthenium hysterophorus* biomass as low-cost substrate for cellulase and xylanase production under solid-state fermentation using *Talaromyces stipitatus* MTCC 12687. **Journal of radiation research and applied sciences**, v. 11, n. 4, p. 271-280, 2018.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRIENZO, Michel. **Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CHENG, Leiyu et al. Efficient enzyme-catalyzed production of diosgenin: inspired by the biotransformation mechanisms of steroid saponins in *Talaromyces stollii* CLY-6. **Green Chemistry**, v. 23, n. 16, p. 5896-5910, 2021.

CLARK, James H.; LUQUE, Rafael; MATHARU, Avtar S. Green chemistry, biofuels, and biorefinery. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, v. 3, p. 183-207, 2012.

DAVANI-DAVARI, Dorna et al. Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. **Foods**, v. 8, n. 3, p. 92, 2019. ABBAS, Aqleem et al. Isolation and evaluation of the biocontrol potential of *Talaromyces spp.* against rice sheath blight guided by soil microbiome. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 10, p. 5946-5961, 2021.

DE AZEVEDO, Afonso RG et al. Possibilities for the application of agro-industrial wastes in cementitious materials: a brief review of the Brazilian perspective. **Cleaner Materials**, v. 3, p. 100040, 2022.

DE LA CRUZ-QUIROZ, R. et al. Challenges and opportunities of the bio-pesticides production by solid-state fermentation: filamentous fungi as a model. **Critical reviews in biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 326-333, 2015.

DE OLIVEIRA, Fernanda et al. Biosynthesis of natural colorant by *Talaromyces amestolkiae*: Mycelium accumulation and colorant formation in incubator shaker and in bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, p. 107694, 2020.

DE OLIVEIRA, Fernanda et al. Water-soluble fluorescent red colorant production by *Talaromyces amestolkiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 16, p. 6529-6541, 2019.

DEWAN, S. S. Global markets for enzymes in industrial applications. **BCC Research, Wellesley**, 2014.

DHIMAN, Saurabh Sudha; SHARMA, Jitender; BATTAN, Bindu. Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review. **BioResources**, v. 3, n. 4, p. 1377-1402, 2008.

EBAYA, Mahasen Mohamed Ahmed et al. Purification, Characterization, and Biocatalytic and Antibiofilm Activity of a Novel Dextranase from *Talaromyces sp.* **International Journal of Microbiology**, v. 2020, 2020.

EIGENHEER, Emilio Maciel; FERREIRA, João Alberto. Três décadas de coleta seletiva em São Francisco (Niterói/RJ): lições e perspectivas. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 20, p. 677-684, 2015.

EL-ENSHASY, Hesham A. Filamentous fungal cultures–process characteristics, products, and applications. **Bioprocessing for value-added products from renewable resources**, p. 225-261, 2007.

ESTEBAN, R.; VILLANUEVA, J. R.; VILLA, T. G.  $\beta$ -D-xylanases of *Bacillus circulans* WL-12. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 733-739, 1982.

FIJAN, Sabina. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. **International journal of environmental research and public health**, v. 11, n. 5, p. 4745-4767, 2014.

FUJII, Tatsuya et al. Strain improvement for industrial production of lignocellulolytic enzyme by *Talaromyces cellulolyticus*. In: **Fungal cellulolytic enzymes**. Springer, Singapore, 2018. p. 135-154.

GESSESSE, A.; MAMO, G. Purification and characterization of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Micrococcus* sp. AR-135. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 210-214, 1998.

GU, Yuan et al. Characterization of two thermophilic cellulases from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 and their synergistic action on cellulose hydrolysis. **Plos one**, v. 14, n. 11, p. e0224803, 2019.

GUPTA, S.; BHUSHAN, B.; HOONDAL, G. S. Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 325-334, 2000.

IMAIZUMI, Katsumi et al. Effects of xylooligosaccharides on blood glucose, serum and liver lipids and cecum short-chain fatty acids in diabetic rats. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 199-205, 1991.

INAGAKI, Kenji et al. Gene cloning and characterization of an acidic xylanase from *Acidobacterium capsulatum*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 62, n. 6, p. 1061-1067, 1998.

JUTURU, Veeresh; WU, Jin Chuan. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1219-1227, 2012.

KALRA, Rishu; CONLAN, Xavier A.; GOEL, Mayurika. Fungi as a potential source of pigments: harnessing filamentous fungi. **Frontiers in chemistry**, v. 8, p. 369, 2020.

KANG, Myoung Kyu; MAENG, Pil Jae; RHEE, Young Ha. Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic *Cephalosporium* sp. strain RYM-202. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3480-3482, 1996.

KHANGWAL, Ishu; SHUKLA, Pratyosh. Prospecting prebiotics, innovative evaluation methods, and their health applications: a review. **3 Biotech**, v. 9, n. 5, p. 1-7, 2019.

KHANNA, Sunil et al. Regulation, purification, and properties of xylanase from *Cellulomonas fimi*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 11, p. 990-995, 1993.

KNOB, Adriana; CARMONA, Eleonora Cano. Xylanase production by *Penicillium sclerotiorum* and its characterization. **World Appl Sci J**, v. 4, n. 2, p. 277-283, 2008.

KRISHNA, Chundakkadu. Solid-state fermentation systems—an overview. **Critical reviews in biotechnology**, v. 25, n. 1-2, p. 1-30, 2005.

KUMAR, D. et al. Xylanases and their industrial applications: a review. **Biochemical and cellular archives**, v. 17, n. 1, p. 353-360, 2017.

LACAZ, Carlos da Silva. et al. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAEMMLI, U. K. SDS-page Laemmli method. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LI, Yin et al. Statistical optimization of xylanase production from new isolated *Penicillium oxalicum* ZH-30 in submerged fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 1, p. 82-86, 2007.

LIN, Shyh-Hsiang et al. Prebiotic effects of xylooligosaccharides on the improvement of microbiota balance in human subjects. **Gastroenterology research and practice**, v. 2016, 2016.

LIU, Wen et al. Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* SL409. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 3, p. 331-336, 1998.

MAALEJ, Ines et al. Highly thermostable xylanase of the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*: purification and characterization. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 158, n. 1, p. 200-212, 2009.

MAFEI, Thamyres Del Torto et al. Extraction and characterization of hemicellulose from Eucalyptus by-product: assessment of enzymatic hydrolysis to produce xylooligosaccharides. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 190, n. 1, p. 197-217, 2020.

MALHERBE, Stephanus; CLOETE, Thomas Eugene. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 105-114, 2002.



MANDELS, M., WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 391-414, 1969.

MASCARIN, Gabriel Moura; JARONSKI, Stefan T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 1-26, 2016.

MCILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 183-186, 1921.

MEARS, Lisa et al. Mechanistic fermentation models for process design, monitoring, and control. **Trends in biotechnology**, v. 35, n. 10, p. 914-924, 2017.

MEDEIROS, L. A. **Xilanases de *Penicillium chrysogenum*: produção, purificação, caracterização e aplicação no pré-branqueamento de polpa celulósica de pseudocaule de bananeira frutífera**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MÉNDEZ-LÍTER, Juan Antonio et al. A glucotolerant  $\beta$ -glucosidase from the fungus *Talaromyces amestolkiae* and its conversion into a glycosynthase for glycosylation of phenolic compounds. **Microbial cell factories**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2020.

MORALES, Pilar et al. Purification and characterization of a xylanase and an arabinofuranosidase from *Bacillus polymyxa*. **Enzyme and microbial technology**, v. 17, n. 5, p. 424-429, 1995.

MOROSOLI, Rolf; ROY, Camille; YAGUCHI, Makoto. Isolation and partial primary sequence of a xylanase from the yeast *Cryptococcus albidus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 870, n. 3, p. 473-478, 1986.

MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization**, v. 1, p. 251-276, 2013.

NIETO-DOMÍNGUEZ, Manuel et al. Novel pH-stable glycoside hydrolase family 3  $\beta$ -xylosidase from *Talaromyces amestolkiae*: an enzyme displaying regioselective transxylosylation. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 18, p. 6380-6392, 2015.

NISHIYAMA, Yoshiharu; LANGAN, Paul; CHANZY, Henri. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I $\beta$  from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 31, p. 9074-9082, 2002.

OKAZAKI, Wataru et al. Purification and characterization of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus spp.* **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 2033-2039, 1985.

ORENCIO-TREJO, Montserrat et al. Cellulase and xylanase production by the Mexican strain *Talaromyces stollii* LV186 and its application in the saccharification of pretreated corn and sorghum stover. **BioEnergy Research**, v. 9, n. 4, p. 1034-1045, 2016.

OZEN, M.; DINLEYICI, E. C. The history of probiotics: the untold story. **Beneficial microbes**, v. 6, n. 2, p. 159-165, 2015.

PANDEY, Ashok et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PANDIT, S. G. et al. Functional attributes of a new molecule-2-hydroxymethylbenzoic acid 2'-hydroxy-tetradecyl ester isolated from *Talaromyces purpureogenus* CFRM02. **Food Chemistry**, v. 255, n. October 2017, p. 89–96, 2018.

PATEL, Seema; GOYAL, Arun. Functional oligosaccharides: production, properties and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 1119-1128, 2011.

PAZ-CEDENO, Fernando Roberto. **Hidrólise enzimática da fração polissacarídica do resíduo oriundo do processamento de carragena de *Kappaphycus alvarezii***. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, 2017.

PESSOA JR, A.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, 1997.

PITT, John I. A laboratory guide to common *Penicillium* species. **CSI Res. Org. Div. Food Processing**, 1988.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

POTTERS, Geert; VAN GOETHEM, Davina; SCHUTTE, Frances. Promising biofuel resources: lignocellulose and algae. **Nature education**, v. 3, n. 9, p. 14, 2010.

QIANG, Xu; YONGLIE, Chao; QIANBING, Wan. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrate polymers**, v. 77, n. 3, p. 435-441, 2009.

QUINN, Roswell. Rethinking antibiotic research and development: World War II and the penicillin collaborative. **American journal of public health**, v. 103, n. 3, p. 426-434, 2013.

RAJ, K. Chandra; CHANDRA, T. S. Purification and characterization of xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, n. 3, p. 457-461, 1996.

RAMAMOORTHY, Sunil Kumar; SKRIFVARS, Mikael; PERSSON, Anders. A review of natural fibers used in biocomposites: plant, animal and regenerated cellulose fibers. **Polymer reviews**, v. 55, n. 1, p. 107-162, 2015.

RAVICHANDRA, K. et al. Xylanase production by isolated fungal strain, *Aspergillus fumigatus* RSP-8 (MTCC 12039): Impact of agro-industrial material as substrate. **Sugar tech**, v. 18, n. 1, p. 29-38, 2016.

RODRÍGUEZ-CHONG, Antonio et al. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Journal of food Engineering**, v. 61, n. 2, p. 143-152, 2004.

SADH, Pardeep Kumar; DUHAN, Surekha; DUHAN, Joginder Singh. 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. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279-291, 2003.

SAMANTA, A. K. et al. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2015.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 159–183, 2011

SANTOS-EBINUMA, Valéria de Carvalho. **Produção e extração de colorantes naturais de *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SARROUH, Boutros et al. Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. **J Bioprocess Biotech**, v. 4, p. 002, 2012.

SASAKI, Mitsuru; ADSCHIRI, Tadafumi; ARAI, Kunio. Fractionation of sugarcane bagasse by hydrothermal treatment. **Bioresource technology**, v. 86, n. 3, p. 301-304, 2003.

SHARMA, Hem Kanta; XU, Chunbao; QIN, Wensheng. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: an overview. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 2, p. 235-251, 2019.

SHATALOV, Anatoly A.; PEREIRA, Helena. Xylanase pre-treatment of giant reed organosolv pulps: Direct bleaching effect and bleach boosting. **Industrial Crops and Products**, v. 25, n. 3, p. 248-256, 2007.

SIMÕES, Maria Lúcia Garcia; TAUKE-TORNISIELO, Samia Maria; TAPIA, D. M. Screening of culture condition for xylanase production by filamentous fungi. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 22, 2009.

SINGH, Vineeta et al. Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2087, 2017.

SUN, J. X. et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate polymers**, v. 56, n. 2, p. 195-204, 2004.

SWENNEN, Katrien; COURTIN, Christophe 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.

TIPTON, Keith; MCDONALD, Andrew. A brief guide to enzyme nomenclature and classification. 2018.

TOLBORG, G. et al. Unique processes yielding pure azaphilones in *Talaromyces atrovirens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 2, p. 603–613, 2020.

VENKATACHALAM, M. et al. Salinity and temperature influence growth and pigment production in the marine-derived fungal strain *Talaromyces albobiverticillius* 30548. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 1–19, 2019.

WALIA, Abhishek et al. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

WATERS, Deborah M. et al. *Talaromyces emersonii* thermostable enzyme systems and their applications in wheat baking systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7415-7422, 2010.

XIAN, Liang et al. Purification and characterization of a highly efficient calcium-independent  $\alpha$ -amylase from *Talaromyces pinophilus* 1-95. **PLoS one**, v. 10, n. 3, p. e0121531, 2015.

YILMAZ, N. et al. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 29, n. 1, p. 39-54, 2012.

YOON, Kyung Young; WOODAMS, Edward E.; HANG, Yong D. Enzymatic production of pentoses from the hemicellulose fraction of corn residues. **LWT-Food Science and Technology**, v. 39, n. 4, p. 388-392, 2006.

YOSHIOKA, Hajime et al. Production and characterization of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 579-586, 1981.

ZAABA, Nor Fasihah; ISMAIL, Hanafi. A review on peanut shell powder reinforced polymer composites. **Polymer-Plastics Technology and Materials**, v. 58, n. 4, p. 349-365, 2019.

ZACCARIM, Bruna R. et al. Sequencing and phylogenetic analyses of *Talaromyces amestolkiae* from amazon: A producer of natural colorants. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 1, p. e2684, 2019.