



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Pedro Lucas Bueno da Silva

**Avaliação do perfil de enzimas hemicelulolíticas de duas espécies
de *Aureobasidium***

São José do Rio Preto

2020

Pedro Lucas Bueno da Silva

**Avaliação do perfil de enzimas hemicelulolíticas de duas espécies
de *Aureobasidium***

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Eleni Gomes

Coorientador: Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva

São José do Rio Preto

2020

S586a	Silva, Pedro Lucas Bueno da Avaliação do perfil de enzimas hemicelulolíticas de duas espécies de <i>Aureobasidium</i> / Pedro Lucas Bueno da Silva. -- São José do Rio Preto, 2020 75 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientadora: Eleni Gomes Coorientadora: Ronivaldo Rodrigues da Silva 1. Hemicelulases. 2. <i>Aureobasidium</i>. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São
José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Pedro Lucas Bueno da Silva

**Avaliação do perfil de enzimas hemicelulolíticas de duas espécies
de *Aureobasidium***

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a Gabriela Salvador de Amo
IFSP – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (Catanduva)

Prof^a. Dr^a Tatiane Iembo
FACERES – Faculdade de Medicina Faceres

Prof^a. Dr^a Marcia Maria de Souza Moretti
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Ricardo Barros Mariutti
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

05/03/2020

Dedico esse trabalho primeiramente aos meus pais, Amarildo e Tânia, minha irmã Aline e a todos os amigos que de alguma forma sempre estiveram me apoiando.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e a espiritualidade que estiveram em todos os momentos.

Aos meus familiares, por todo apoio e incentivo, especialmente meus pais, Tânia e Amarildo, pelo amor e paciência.

A minha irmã, Aline, por todo amor e apoio, seu marido Ivan e minha afilhada Ana Júlia.

Aos meus familiares, avós, tios (as), por todo carinho e torcida.

À minha orientadora, Prof. Dr^a. Eleni Gomes, pela oportunidade, confiança e pelos valiosos ensinamentos;

A minha namorada, Nathalia, por todo amor, carinho e paciência.

A minha sogra, Docerina, por todo carinho e apoio em todos os momentos.

Aos meus amigos de infância, especialmente, Rodney Freitas, Rafael Moraes e Lucas Magno.

Os amigos e colegas do laboratório, ao qual fizeram parte diretamente ao trabalho;

Ao Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas da UNESP/ Câmpus de São José do Rio Preto e todos seus colaboradores, que por meio do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia tornou viável a obtenção do título de Doutor.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

RESUMO

O grande acúmulo de biomassa lignocelulósica oriunda da produção de etanol no Brasil contribui para um aumento em pesquisas para utilização para etanol de segunda geração e produção de enzimas com maior valor agregado. Considerando que o grupo de pesquisa ao qual esse trabalho está vinculado tem desenvolvido pesquisas com celulasas, hemicelulasas, ligninases, pectinases, esse estudo teve por objetivo selecionar leveduras produtoras dessas enzimas, realizar a caracterização físico-química e a purificação enzimática. Diversos trabalhos tem sido desenvolvidos a fim do reaproveitamento de material lignocelulósico oriundo da produção de etanol por cana-de-açúcar para a produção de enzimas de interesse comercial e sua principal aplicação na produção de etanol de segunda geração. Foi selecionado duas leveduras entre 30 escolhidas da coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicadas UNESP/IBILCE: *A. pullulans* LB 3.1 e *A. leucospermi* LB 86 e que foram cultivadas com farelo de trigo. Ambas foram capazes de produzir xilanase, β -xilosidase e β -glicosidase, sendo a maior atividade de xilanase de 72 U ml⁻¹ para LB 3.1 de 5,5 U ml⁻¹ para LB 86, bem como a atividade de β -xilosidase que foi (6,7 U ml⁻¹) para LB 3.1 e (4,0 U ml⁻¹). Com relação à influência do pH na atividade enzimática foi observado perfis similares para xilanase e β -xilosidase produzidas pela levedura *A. pullulans* LB 3.1, com uma maior atividade na faixa de pH 2,5 a 3,5. Essa característica foi observada também para a β -xilosidase de *A. leucospermi* LB 86, cuja maior atividade foi observada em pH 3,5. A solução enzimática da cepa LB 3.1 foi submetida a uma purificação parcial e caracterização da β -xilosidase. A enzima possui características ácidas, com melhor atividade em pH 4,5 e demonstrou uma termoestabilidade de até 60 min a 80 °C, sendo superior a resultados encontrados na literatura.

Palavras-chave: Hemicelulasas. *Aureobasidium pullulans*. *Aureobasidium leucospermi*. Purificação enzimática. Cultivo estado sólido.

ABSTRACT

The large accumulation of lignocellulosic biomass from ethanol production in Brazil contributes to an increase in research for use for second generation ethanol and the production of enzymes with greater added value. Considering that the research group to which this work is linked has developed research with cellulases, hemicellulases, ligninases, pectinases, this study aimed to select yeasts that produce these enzymes, perform physical-chemical characterization and enzymatic purification. Several works have been developed in order to reuse lignocellulosic material from the production of ethanol by sugarcane for the production of enzymes of commercial interest and its main application in the production of second generation ethanol. Two yeasts were selected from 30 chosen from the collection of the Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology UNESP / IBILCE: *A. pullulans* LB 3.1 and *A. leucospermi* LB 86 and which were grown with wheat bran. Both were able to produce xylanase, β -xylosidase and β -glycosidase, with the highest xylanase activity being 72 U ml⁻¹ for LB 3.1 and 5.5 U ml⁻¹ for LB 86, as well as the activity of β -xylosidase which was (6.7 U ml⁻¹) for LB 3.1 and (4.0 U ml⁻¹). Regarding the influence of pH on enzyme activity, similar profiles were observed for xylanase and β -xylosidase produced by the yeast *A. pullulans* LB 3.1, with a greater activity in the pH range 2.5 to 3.5. This characteristic was also observed for the β -xylosidase of *A. leucospermi* LB 86, whose greatest activity was observed at pH 3.5. The enzymatic solution of the LB 3.1 strain was subjected to partial purification and β -xylosidase characterization. The enzyme has acidic characteristics, with better activity at pH 4.5 and has demonstrated a thermostability of up to 60 min at 80 °C, being superior to results found in the literature.

Keywords: Hemicellulases. *Aureobasidium pullulans*. *Aureobasidium leucospermi*. Enzyme purification. Solid state cultivation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Composição da lignocelulose.....	17
Figura 2. Composição relativa da lignocelulose.	18
Figura 3. Estrutura da molécula de celulose.....	19
Figura 4. Estrutura encontrada na hemicelulose.	20
Figura 5. Estrutura da lignina.....	21
Figura 6. Tipos de lignina encontrados em diferentes vegetais.....	22
Figura 7. Atuação das endoglucanases na hidrólise enzimática.	24
Figura 8. Esquema do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.	26
Figura 9 Embalagem de polipropileno para CES.....	37
Figura 10. Produção de xilanase pela levedura <i>A. pullulans</i> LB 3.1 ao longo do CES com farelo de trigo como substrato.	47
Figura 11 Produção de xilanase pela levedura <i>A. leucospermi</i> LB 86 ao longo do CES com farelo de trigo como substrato.	48
Figura 12 Produção de β -xilosidase pela levedura <i>A. pullulans</i> LB 3.1 ao longo do CES com farelo de trigo como substrato.	49
Figura 13. Produção de β -xilosidase pela levedura <i>A. leucospermi</i> LB 86 ao longo do CES com farelo de trigo como substrato.	49
Figura 14. Produção de β -glicosidase pela levedura <i>A. pullulans</i> LB 3.1 ao longo do CES com farelo de trigo como substrato.	50
Figura 15. Produção de β -glicosidase pela levedura <i>A. leucospermi</i> LB 86 ao longo CES sólido com farelo de trigo como substrato.....	50
Figura 16. Efeito do pH sobre a atividade de xilanase bruta obtida pelo cultivo da levedura <i>A. pullulans</i> LB 3.1.....	51
Figura 17. Efeito do pH sobre a atividade de β -xilosidase da solução enzimática bruta obtida pela levedura <i>A. pullulans</i> LB 3.1.	52
Figura 18. Efeito do pH sobre a atividade de β -xilosidase bruta obtida pelo cultivo da levedura <i>A. leucospermi</i> LB 86.....	52
Figura 19. Efeito da temperatura sobre a atividade de xilanase bruta obtida pelo cultivo da levedura <i>A. pullulans</i> LB 3.1.....	53
Figura 20. Efeito da temperatura sobre a atividade de β -xilosidase bruta obtida pelo cultivo da levedura <i>A. pullulans</i> LB 3.1.....	54

Figura 21. Efeito da temperatura sobre a atividade de β -xilosidase bruta obtida pelo cultivo da levedura <i>A. leucospermi</i> LB 86.	54
Figura 22. Efeito do pH sobre a estabilidade de β -xilosidase de <i>A. pullulans</i> LB 3.1, incubada a 4 °C.	55
Figura 23. Efeito do pH sobre a estabilidade de β -xilosidase de <i>A. leucospermi</i> LB 86, quando incubada a 4 °C.	56
Figura 24. Efeito do pH sobre a estabilidade de β -xilosidase de <i>A. pullulans</i> LB 3.1, quando incubada a 25 °C.	56
Figura 25. Efeito do pH sobre a estabilidade de β -xilosidase de <i>A. leucospermi</i> LB 86, quando incubada a 25 °C.	57
Figura 26 Efeito da termoestabilidade da enzima β -xilosidase bruta de <i>A. pullulans</i> LB 3.1 em diferentes tempos, quando na ausência do substrato.	58
Figura 27 SDS-PAGE 10 % da enzima parcialmente purificada e enzima bruta. Marcador de massa molecular SigmaMarker TM Wide Range 6,500 a 200,00 kDa.	59
Figura 28 Efeito do pH sobre a atividade da β -xilosidase, produzida por <i>A. pullulans</i> LB 3.1, após purificação parcial na temperatura ótima de 80° C. A atividade relativa é baseada em um ponto máximo de atividade (29 U/ml).	62
Figura 29 Efeito da temperatura sobre a atividade da β -xilosidase, produzida por <i>A. pullulans</i> LB 3.1, após purificação parcial em pH 4,0. A atividade relativa é baseada em um ponto máximo de atividade (29 U/ml).	63
Figura 30 Efeito da temperatura sobre a estabilidade da β -xilosidase parcialmente purificada, produzida por <i>A. pullulans</i> , em diferentes tempos, quando em ausência de substrato.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Leveduras produtoras de enzimas xilanolíticas.	30
Tabela 2. Leveduras cultivadas.	35
Tabela 3. Tampões utilizados para caracterização.....	40
Tabela 4. Leveduras utilizadas para o crescimento em diferentes tipos de substratos.	45
Tabela 5. Atividades enzimáticas pelas leveduras <i>A. pullulans</i> LB 3.1 e <i>A. leucospermi</i> LB 86.....	46
Tabela 6 Atividade enzimática para avaliação de possíveis contaminantes.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

CES: Cultivo em estado sólido

FES: Fermentação em estado sólido

YEPD: Extrato de levedura, Peptona, Dextrose.

PNPX: *p*-nitrofenil- β -D-xilanopiranosídeo

PNPG: *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo

PNPA: *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosidase

PTFE: Polietrafluretileno

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICO	16
3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICO.	18
3.1 Celulose	18
3.2 Hemicelulose	19
3.3 Lignina.....	20
4 DEGRADAÇÃO DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.	22
4.1 Hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósico.....	23
4.2 Celulases.....	23
4.3 Hemicelulases	24
6 MICRORGANISMOS E ENZIMAS DO COMPLEXO LIGNOCELULOLÍTICO.....	28
6.1 Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica.....	31
7 CULTIVO DE MICRORGANISMOS EM ESTADO SÓLIDO.....	32
8 OBJETIVOS	33
8.1 Objetivos gerais.....	33
8.2 Objetivos específicos	33
9 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
9.1 Microrganismos	34
9.2 Meios nutrientes e condições de cultivo	36
9.2.1 Pré-inóculos para o CES	36
9.2.2 Substratos lignocelulósicos	36
9.2.3 Produção das enzimas por CES	36
9.2.4 Embalagem de polipropileno para CES.....	37
9.3 Determinação da atividade enzimática.....	38
9.3.1 Xilanase.....	38

9.3.2 Avicelase	38
9.3.3 β -glicosidase	38
9.3.4 β -xilosidase	39
9.3.5 Endoglucanase.....	39
9.3.6 Pectinase.....	39
9.4 Caracterização físico-química da enzima.....	40
9.4.1 Efeito do pH sobre a atividade da enzima.	40
9.4.2 Efeito da temperatura sobre atividade enzimática.....	41
9.4.3 Avaliação da estabilidade enzimática de β -xilosidase.....	41
9.4.4 Efeito da termoestabilidade sobre a atividade da β -xilosidase de <i>A. pullulans</i> LB 3.1.....	41
9.5 Purificação parcial da enzima.....	41
9.5.1 Concentração do extrato fermentativo	41
9.6 Cromatografia por gel filtração	42
9.7 Cromatografia por troca aniônica	42
9.8 Precipitação por TCA	43
9.9 Efeito do pH sobre a atividade da β -xilosidase.....	43
9.10 Efeito da temperatura sobre a atividade da β -xilosidase.....	43
9.11 Termoestabilidade	43
10 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
10.1 Avaliação do crescimento de microrganismos em diferentes tipos de meio.....	44
10.2 Avaliação da produção de enzimas pelas leveduras <i>Aureobasidium pullulans</i> LB 3.1 e <i>Aureobasidium leucospermi</i> LB 86	44
10.4 Avaliação da estabilidade da β -xilosidase após incubação em 4 °C e 25 °C. ...	55
10.5 Avaliação da termoestabilidade da enzima β -xilosidase bruta de <i>Aureobasidium pullulans</i> LB 3.1 em diferentes tempos, quando na ausência do substrato.....	57
10.6 Purificação parcial da β -xilosidase de <i>Aureobasidium pullulans</i> LB 3.1	58
10.7 Caracterização físico-química	60

10.7.1 Efeito do pH.....	60
10.7.2 Efeito da temperatura.....	62
10.7.3 Efeito da termoestabilidade	63
REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

O aproveitamento de resíduos agroindustriais como substratos para o cultivo de microrganismos, além de viabilizar produtos de maior valor agregado como, etanol e enzimas lignocelulolíticas, colabora para um descarte adequado desse resíduo. (PANDEY et al., 2000) O uso de microrganismos para a produção de produtos de interesse como, etanol de segunda geração, necessita de algumas etapas como pré-tratamento, sacarificação enzimática e fermentação.

A busca por enzimas produzidas por microrganismos tem aumentado devido a alta produção e menor produção de toxinas. Há um grande interesse por β -xilosidase e outras enzimas lignocelulolíticas de fungos, para a aplicação na biotecnologia.

O maior obstáculo encontrado na produção de etanol 2G é a conversão das fibras em açúcares fermentescíveis, devido a sua recalcitrância, o que dificulta a ação das enzimas. Entretanto, o processo de pré-tratamento do material é uma das estratégias que pode facilitar o acesso das enzimas, potencializando os rendimentos. (WEI et al., 2009).

Dentre as enzimas que atuam nesse processo de conversão estão as xilanases, que constituem as endoxilanases e β -xilosidase, realizam um papel muito importante nas reações de hidrólise da xilana, é o componente mais importante na fração hemicelulósica da biomassa lignocelulósica (ZHOU et al., 2011). Este complexo enzimático é formado pela ação de hemicelulases e celulases, e é muito utilizado em setores industriais, na indústria de celulose e papel e na sacarificação da hemicelulose para a produção de etanol de 2ª geração (ADSUL et al., 2004). As β -xilosidases tem recebido uma atenção especial, devido a sua importância biológica, como na degradação de subprodutos hemicelulolítico de resíduo agroindustrial para produção de biocombustíveis (PAN et al., 2001). As β -xilosidases (EC 3.2.1.37) são exo glicosidases que atuam na remoção de resíduos de β -1,4-xilosil na região terminal não redutora de xilobiose e xilo-oligossacarídeos. Essas enzimas são de grande interesse para a bioquímica e biotecnologia, sua função juntamente com outras hemicelulases são diversas: bioconversão de resíduo industrial em açúcares, aditivos alimentares para animais, produção de 2,3-butenodiol e o etanol de 2ª geração (SAHA, 2003; TERRASAN, 2016).

Destaca-se também, a necessidade de aprimorar e desenvolver técnicas de purificação para obter maior especificidade e chegar a um produto final de melhor qualidade e valor agregado.

Nesse contexto, no presente estudo teve como objetivo a produção e avaliação do perfil enzimático de leveduras assimiladoras de pentoses da coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada.

Revisão Bibliográfica

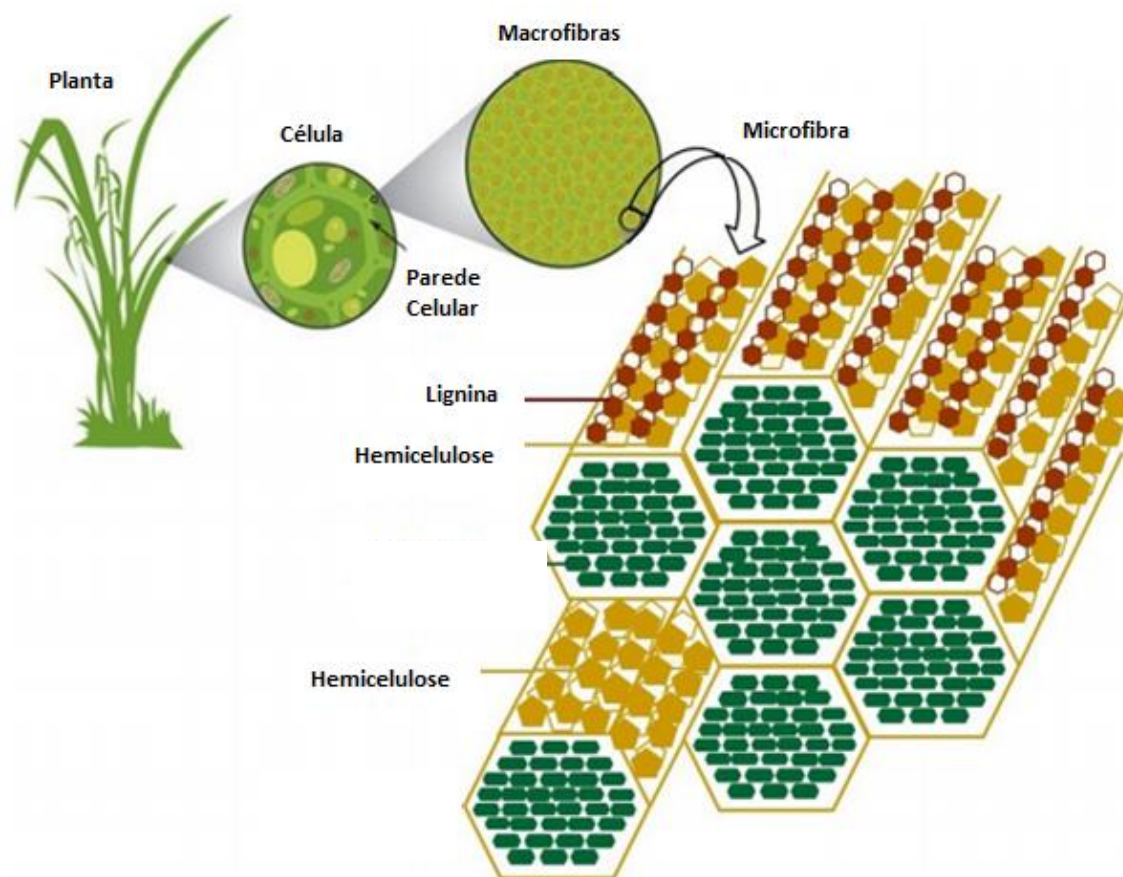
2 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICO

Os resíduos lignocelulósicos são gerados a partir de diversas atividades agrícolas e agroindustriais (LIM; MATU, 2015). O Brasil, com grande produção no setor agrícola, gera alta quantidade de resíduos, os quais são passíveis de aproveitamento, estimulando o desenvolvimento de formas de aproveitamento desse material. Os principais resíduos gerados no país são os farelos de trigo, de soja, de algodão, a palha o bagaço de cana-de-açúcar e a palha os colmos de milho (ABBASI; ABBASI, 2010).

O bagaço de cana-de-açúcar se destaca entre os resíduos lignocelulósico pelo grande volume em que é gerado e pelas várias possibilidades de aproveitamento, no setor de geração de energia, componentes de ração ou como fonte de açúcares para bioprocessos (FERNANDES et al., 2017). Os dados da safra 2018/2019 indicam que o Brasil produziu cerca de 640 mil toneladas de cana-de-açúcar, sendo o estado de São Paulo responsável por mais da metade de toda produção Brasileira, atingindo aproximadamente 358 mil toneladas. O volume total de bagaço gerado está em torno de 210.000 toneladas (ÚNICA, 2018).

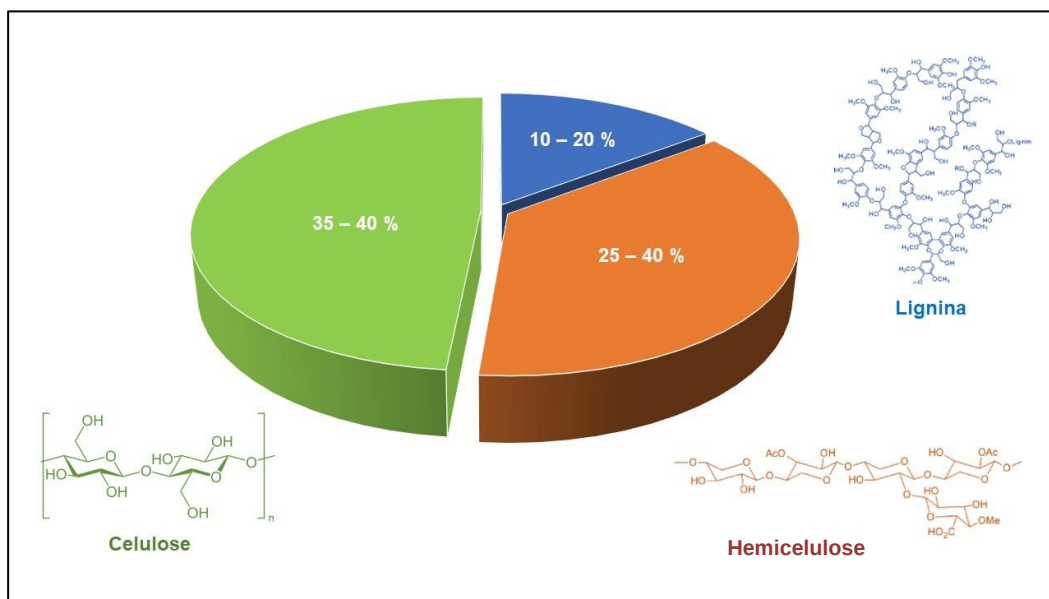
O bagaço da cana-de-açúcar é composto por 35 a 40 % de celulose, 25 a 40 % de hemicelulose e 10 a 20 % de lignina. (Figuras 1 e 2). Por essa alta proporção de polímeros de açúcares, diversas tecnologias têm sido empregadas para o desenvolvimento de métodos para aproveitar o bagaço na produção de biocombustíveis e outros produtos de valor agregado (ADSUL et al., 2004).

Figura 1. Composição da lignocelulose



Fonte: Adaptado de KHATTAB (2019).

Figura 2. Composição relativa da lignocelulose.



Fonte: Autoria própria

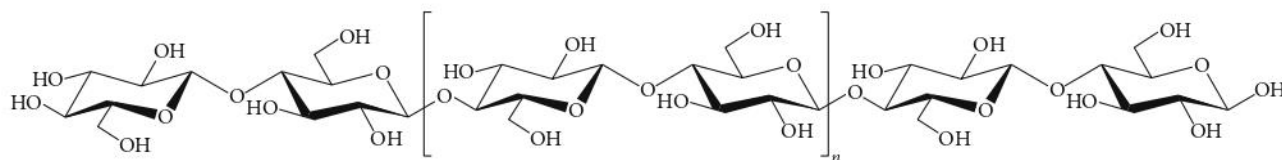
3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICO.

3.1 Celulose

A celulose é um carboidrato presente nas estruturas das paredes celulares em todas as plantas superiores (BRETT, 2000). Estruturalmente a membrana celular se apresenta em uma cadeia linear não ramificada, de unidades de D-glicose unidas por ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ (KÖPCKE, 2008; CALIARI et al., 2017) (Figura 3.).

A composição glicídica e sua abundância na biomassa vegetal a torna um recurso energético de abundância no planeta (CHEN, 2014). Além da celulose ser utilizada na produção de biocombustíveis ele também é empregada na indústria alimentícia, na produção de fibras, cosméticos, plásticos, membranas de papel, tintas, revestimentos e nano materiais (GUERRIERO et al., 2016).

Figura 3. Estrutura da molécula de celulose



Fonte: Adaptado de SAINI e at.(2015).

A celulose presente nas paredes celulares das plantas está organizada na forma de longas e organizadas fibras. Alguns autores citam a celulose dividida em regiões amorfas e cristalinas (TAHERZADEH; KARIMI, 2007; VLASENKO et al., 2010; SUKUMARAN et al., 2010; TOMÁS-PEJÓ et al., 2011; MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015; MADADI; TU; ABBAS, 2017). Entretanto, Payne et al. (2015) afirmam que as regiões amorfas não existem, sendo uma torção entre as microfibrilas da celulose.

As fibras de celulose exibem extremidades redutoras (com hidroxila livre) e não redutoras (sem hidroxila livre), ficando as primeiras acessíveis ao ataque de enzimas hidrolíticas, como hemicelulases e celulases (PÉREZ; SAMAIN, 2010).

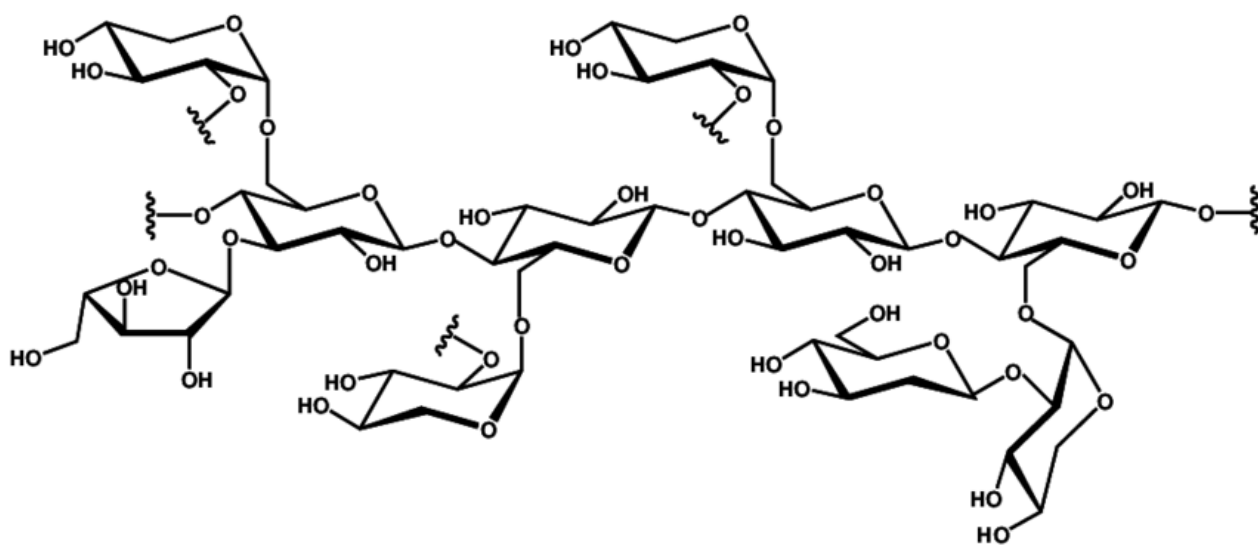
3.2 Hemicelulose

Representando de 25 a 40 % do material lignocelulósico, a hemicelulose constitui-se de polissacarídeos de estrutura amorfa com cadeia ramificada (Figura 4), contendo pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose) e ácidos urônicos, como ácido α -D-galacturônico, ácido α -D-4-O-metilgalacturônico. Além disso, os grupos hidroxila nos açúcares podem ser parcialmente substituídos por acetila (GÍRIO et al., 2010).

A hemicelulose é composta em sua maior parte de xilana, um polímero de unidades de xilose unidas por ligações β (1 $\rightarrow$ 4), sendo agrupada em classes: homoxilanas, glucuronoxilanas, arabinoglucuronoxilanas, arabinoxilanas, glucuronoarabinoxilanas e heteroxilanas (EBRINGEROVÁ, 2006). As xilanas possuem a capacidade de manter ligações com outros polissacarídeos por meio de

ligações laterais. Além disso, podem ser acetiladas e realizam ligações ésteres, com ácido *p*-cumárico e ferúlico, porção ligada à lignina (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Os açúcares derivados da hemicelulose também são de grande aplicabilidade para obter produtos de fermentação como solventes, ração, medicamentos, alguns tipos de plásticos e nanopartículas (GUERRIERO et al., 2016)

Figura 4. Estrutura encontrada na hemicelulose.

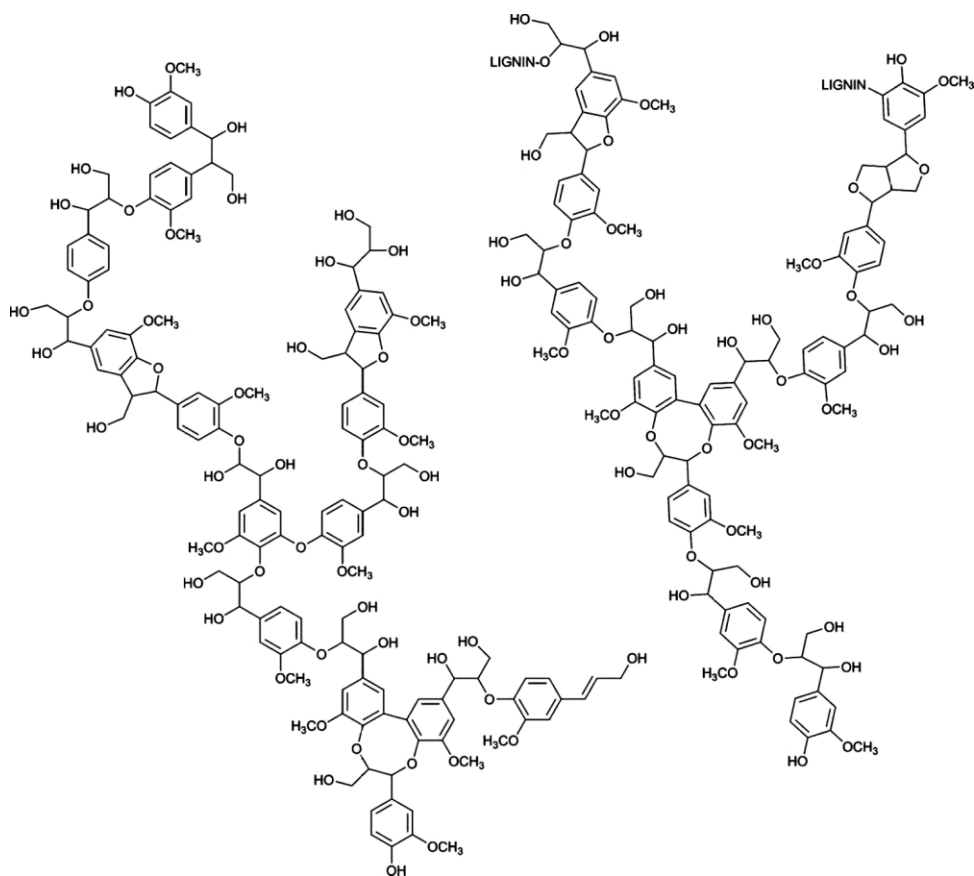


Fonte: Shallom e Shoham, 2003.

3.3 Lignina

A lignina compõe cerca de 10 a 20 % da biomassa lignocelulósica (SAAKE et al., 2007). É um heteropolímero amorfa que consiste em três unidades: álcool *p*-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico. A lignina físico-quimicamente é um material heterogêneo, possui regiões amorfas e estruturas globulares. Sua composição pode variar de acordo com as espécies de plantas. (Figura 5) (HATAKEYAMA et al., 2009; KAI et al., 2017).

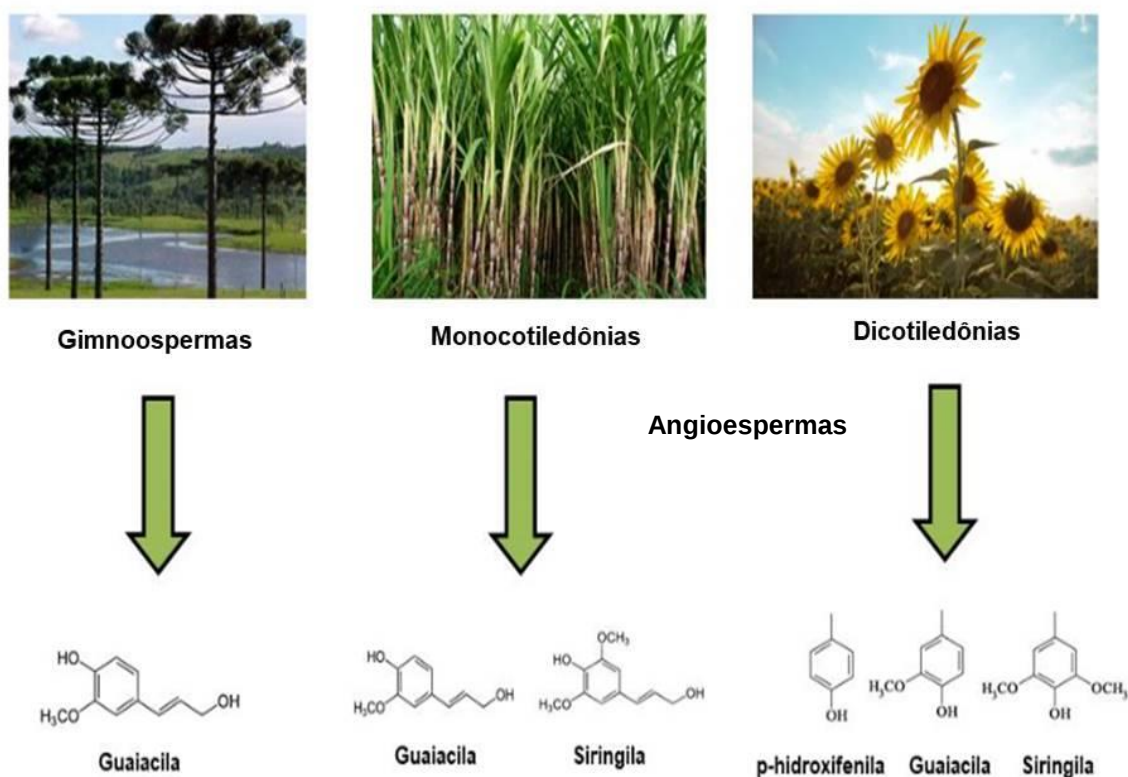
Figura 5. Estrutura da lignina



Fonte: Adaptado de AZAPIRA, 2013.

A sua principal função é atuar como uma barreira física, sendo um suporte de resistência aos materiais lenhosos e impermeabiliza os vasos condutores de água e nutrientes. Por ser recalcitrante ao ataque microbiano, atua também como barreira ao ataque de patógenos de plantas (DAVIDON et al., 2013). A lignina pode ser utilizada por uma gama de produtos de valor agregado como alguns antioxidantes, resinas, aditivos de combustível, lubrificantes, tintas, corantes, graxas e diversos produtos aromáticos (GUERRIERO et al., 2016)

Figura 6. Tipos de lignina encontrados em diferentes vegetais.



Fonte: Adaptado de CRESTINI, 2013.

4 DEGRADAÇÃO DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.

A conversão do material lignocelulósico em monômeros de açúcares pode ser alcançada por métodos químicos, físicos e/ou enzimáticos. Alguns processos químicos baseiam-se na utilização de ácidos ou bases e altas temperaturas e/ou pressão, gerando hidrolisados ricos em açúcares fermentescíveis (glicose e xilose) (YE et al, 2017). O processo alcalino é o mais utilizado, pois atua na clivagem das ligações ésteres promovendo o aumento da porosidade da biomassa (MORETTI, 2014).

4.1 Hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos.

A degradação da biomassa pode ocorrer por diversos microrganismos produtores de uma complexa mistura de enzimas (SANDGREN et., 2005). As celulases, hemicelulases e ligninases são as principais enzimas responsáveis por todo esse processo, transformando carboidratos em açúcares que posteriormente será fermentado pelas leveduras até a obtenção do etanol. Os microrganismos mais atuantes na degradação da lignocelulose são os fungos, que atuam na lignina e deixa a celulose mais exposta; outros microrganismos atuam na lignina e na celulose, com a produção de enzimas oxidativas (CHANDRA et al., 2019).

4.2 Celulases

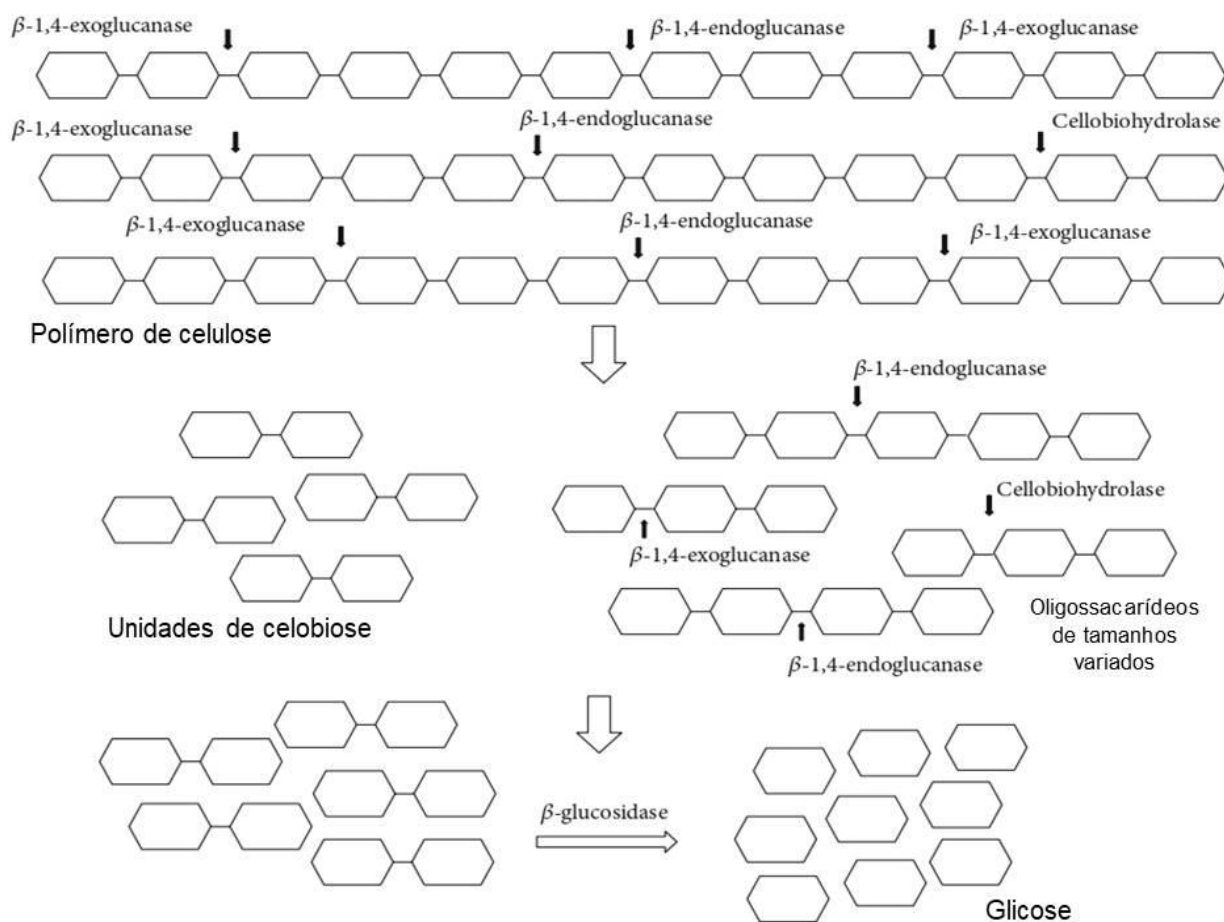
As celulases exercem um papel fundamental na hidrólise da biomassa lignocelulósica, liberando monômeros de açúcares, que podem ser utilizados na produção de etanol de 2ª geração, a partir da fermentação (FALKOSKI et al., 2013). Constituindo um grupo de glicosil-hidrolases (GH), atuam nas ligações glicosídicas entre os resíduos de glicose da celulose, envolvendo uma ação sinérgica de um complexo de enzimas diferentes (Figura 7) (HORN et al., 2012; SRIVASTAVA et al., 2018):

I. Endoglucanases ou CMCase (EC3.2.1.4), atuam na catalisação da hidrólise da cadeia de celulose, com a clivagem das ligações β (1-4), liberando celooligossacarídeos e gerando extremidades redutoras e não redutoras (SAINI et al., 2015). Elas têm um papel muito importante na rápida solubilização do polímero de celulose, diminuindo o grau de sua polimerização, devido a liberação dos oligossacarídeos.

II. Exoglucanases, Celobiohidrolases ou Avicelases (EC 3.2.1.176), elas são importantes nas quebras de ligação glicosídica, atuando nas regiões amorfas, cristalinas, tanto nas regiões redutoras e não redutoras, liberando unidades de celooligossacarídeos e celobiose (COUGHLAN; LJUNGDAHL, 1988; VOUTILAINEN, 2010; CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

III. Celobiasas ou β -glicosidases (EC 3.2.1.21) são responsáveis pela hidrólise da celobiose e outras celodextrinas à glicose, sendo a última a contribuir para o processo catalítico da celulose, finalizando todo o processo celulolítico (YEOMAN et al., 2010).

Figura 7. Atuação das endoglucanases na hidrólise enzimática.



Fonte: Adaptado de SAINI e al., 2015.

4.3 Hemicelulases

As hemicelulases são responsáveis pela degradação da biomassa vegetal. Os substratos dessas enzimas, as hemiceluloses, forma um grupo heterogêneo de ramificações de polissacarídeos, sendo ligados por pontes de hidrogênio, formando uma resistente rede de microfibras na parede celular de alguns vegetais. (SHALLOM; SHOHAM, 2003).

As enzimas do complexo hemicelulolítico degradam todas as frações da hemicelulose, sendo denominadas de xilanase (xilanas), β -xilosidase (xilobiose) mananase (manana), arabinase (arabinana), entre outras (BHATHAZLEWOOD, 2001; SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002). Em função dessa complexidade, é necessário um coquetel enzimático para a conversão em unidades de xilose e outros

açúcares. Essas enzimas são normalmente classificadas de acordo com sua forma de ação nos substratos.

As xilanases (endo-1,4- β -D-xilanases, E.C. 3.2.1.8) atuam na clivagem de ligações glicosídicas internas da cadeia de xilana, com isso, há uma diminuição na despolimerização do substrato, produzindo xilo oligômeros e xilobiose. As enzimas β -xilosidases (1,4- β -D-xilosidases, E.C.3.2.1.37) atuam na hidrólise dos xilos oligômeros e xilobiose, liberando xilose a partir da extremidade não redutora. (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002; POLIZELI et al., 2005; ALVES-PRADO et al., 2010). A maioria das enzimas hidrolíticas possui ação extracelular, diferente das β -xilosidases pode apresentar também ação intracelular, algumas associadas ao micélio em fungos e ligadas as células em bactérias e leveduras (KNOB; TERRASAN; CARMONA, 2010).

As β -xilosidases tem uma função muito importante na diminuição dos produtos gerados pelas xilanases, elas atuam nos xilos oligossacarídeos, aumentando assim a eficiência da hidrólise da xilana (POLIZELI et al., 2005). As xilanases apresenta uma grande importância para a indústria de alimentos na panificação, aplicação na indústria de papel, como um biobranqueador e no desenvolvimento de etanol de segunda geração, a partir da fermentação alcoólica da xilose (BUTT et al., 2008; LIAO et al., 2015).

5 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA

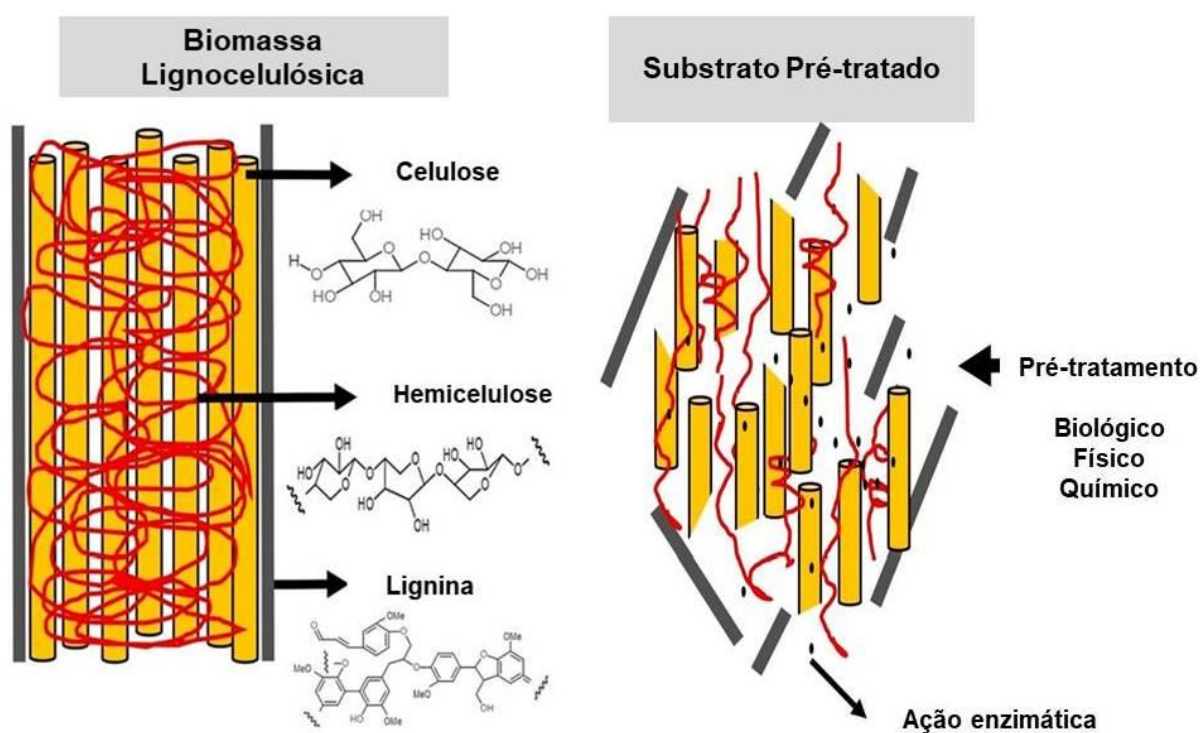
Os desafios para a produção de etanol de 2ª geração, além do aproveitamento dos açúcares da biomassa vegetal para outros propósitos, está principalmente na desconstrução da biomassa, a partir de um pré-tratamento e da hidrólise (LYND et al., 2002, 2008; MARGEOT et al., 2009). A maior dificuldade durante a hidrólise do material lignocelulósico é a digestibilidade da celulose, devido alguns fatores físico-químicos. Devido a estas características em sua estrutura, esse processo é necessário e muito importante para obter os produtos fermentáveis. O pré-tratamento tem a função de quebrar a lignina e romper a estrutura cristalina da celulose, aumentando assim o acesso das enzimas, para posterior hidrólise (KOUAIE, 2019). O pré-tratamento é utilizado em todo o mundo, podendo ser

dividido em pré-tratamentos biológicos, físicos, químicos e suas combinações (Figura 8).

Dentre os tratamentos físicos, estão os mecânicos, hidrotérmico, radiação, micro-ondas, sendo os mais utilizados, explosão a vapor e micro-ondas. O pré-tratamento mecânico reduz o tamanho da partícula e a cristalinidade do material, aumentando a superfície e facilitando o acesso enzimático. O mais utilizado é o processo de moagem, como o moinho de bolas, moinho de martelo e moinho de facas (MOSET et al., 2018).

A explosão a vapor é um método comumente utilizado, em que se utiliza uma autoclave, submetendo o bagaço a uma pressurização em grande tempo e posterior despressurização súbita, tendo como resultado uma transformação parcial de hemicelulose e rompimento de fibras. Como desvantagem tem-se a geração de compostos inibidores a degradação parcial da hemicelulose (ZHENG et al., 2010).

Figura 8. Esquema do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de (KOUAIE, 2019).

A utilização de micro-ondas tem sido empregada sozinha ou com soluções alcalinas, ácidas e ácidas com glicerol (MORETTI et al., 2014). Essa técnica é baseada na transferência superficial do calor, interagindo diretamente o campo eletromagnético com o objeto, para gerar calor. Os choques provocados por esse movimento promovem uma desestruturação do material (DIAZ et al., 2015) degradando parcialmente a lignina e as hemicelulases, facilitando o acesso das enzimas. O pré-tratamento atua na solubilização da hemicelulose e lignina, facilitando a hidrólise ácida ou enzimática. Uma variedade de substâncias é utilizada, como o ácido sulfúrico e ácido fosfórico (IMMAN, et al., 2014, PEREIRA, et al., 2015) Essa etapa pode ser classificada de acordo com o tipo de composto usado:

Pré-tratamento ácido: ácido sulfúrico é o reagente mais comum entre os tratamentos, com grande atuação na quebra da lignina, hemicelulose e da celulose (SHIMIZU et al., 2018). Esse tratamento pode ser realizado sobre alta temperatura, combinando diferentes concentrações do ácido. Uma das desvantagens desse tratamento está na corrosão dos equipamentos utilizados e a formação de compostos inibitórios a partir da degradação de açúcares, como furfural e 5-hidroximetilfurfural, que podem afetar um processo posterior de fermentação (XAVIER et al., 2018). Sendo assim, uma maneira de melhorar a atuação enzimática é o uso de ácido diluído combinado com alta temperatura, para aumentar a digestibilidade da hemicelulose e diminuir os inibidores (BHUTTO, 2017).

Pré-tratamento alcalino: Uma metodologia muito utilizada é o uso de hidróxido de sódio, sua aplicação atua principalmente na lignina e parcialmente na hemicelulose, melhorando a atuação enzimática na celulose (CAO, et al., 2012). O uso desse tratamento traz algumas vantagens, como o aumento da área de superfície interna e a diminuição da cristalinidade da celulose. Isso resulta em um acesso mais fácil das enzimas e atuação de microrganismos. (HENDRIKS E ZEEMAN, 2009). Quando comparado ao pré-tratamento ácido, o alcalino não necessita de altas temperaturas, sendo realizado até em temperatura ambiente, mas possui a desvantagem de tempo, que podem levar de horas a dias e a necessidade de neutralização (BHUTTO et al., 2017).

Pré-tratamento com organosolventes: esse tratamento é empregado usando solventes orgânicos, como metanol, etanol, acetona, etileno-glicol, e álcool furfurílico (KUMAR et al., 2009). A temperatura ideal nesse processo está na faixa de 100 a 250 °C, com isso, têm sido utilizados um catalisador para que seja realizado em temperatura mais baixa (AGBOR et al., 2011). A exposição da biomassa a esse tratamento leva a hidrólise da lignina e hemicelulose, bem como das ligações éter e éster entre os polímeros, resultando assim, na remoção da lignina e na solubilização da hemicelulose.

Os processos biológicos são empregados por microrganismos, alguns fungos marrons, brancos, que atuam na maioria das vezes na lignina, hemicelulose e pouco na celulose, devido a sua maior resistência (SÀNCHEZ, 2009). Alguns atuam na degradação da lignina, como por exemplo o *Sclerotium cepivorum*, mais conhecido como fungo da podridão branca, que produz enzimas como peroxidases e lacases, que atuam diretamente na lignina.

6 MICRORGANISMOS E ENZIMAS DO COMPLEXO LIGNOCELULOLÍTICO.

Muitos estudos com microrganismos que utilizam a xilana como fonte de carbono têm sido publicados, embora a maioria tem utilizado fungos filamentosos (SUN, CHENG, 2002), por serem conhecidos como grandes produtores de enzimas despolimerizantes, pesquisas têm sido realizadas também com leveduras, principalmente para busca de novas enzimas para aplicação biotecnológica (SHIVAJI, PRASAD, 2009). As leveduras são fungos unicelulares, sendo encontradas em todos os biomas do mundo (LACHANCE et al., 2011).

Alguns fungos filamentosos encontrados em madeira em decomposição utilizam esse material, que é rico em celulose, para obtenção de energia, a partir da ação de várias enzimas incluindo endoglucanases, celobiohidrolases e β -glucosidases (BALDRIAN, VALASKOVA, 2008). Esse processo de decomposição ocorre a partir de um consórcio de microrganismos, com envolvimento de fungos filamentosos, leveduras e bactérias (BLANCHETTE, SAHW, 1978, GONZALEZ, 1989). No estágio intermediário, as principais mudanças ocorrem por fungos (HEILMANN-CLAUSEN, BODDY, 2005). Como por exemplo, os fungos da podridão branca degradam a celulose, hemicelulose e lignina, transformando-os em CO₂ e

água. Com o processo de degradação, ocorre uma diminuição da recalcitrância, resultando em um material de coloração branca e esponjosa, diferente dos fungos da podridão marrom, que degradam a celulose e hemicelulose, deixando o material com coloração escura (MARTÍNEZ et al., 2005; GIMENES; ROBERTO, 2010; HERNÁNDEZ-ORTEGA; FERREIRA; MARTÍNEZ, 2012). Várias leveduras foram descritas como capazes de produzir enzimas celulolíticas (THONGEKKAEW, 2016), incluindo algumas leveduras pertencentes aos gêneros *Cryptococcus*, *Pichia*, *Candida*, *Trichosporon* (BIELY 1980; LEATHERS, 1986; BHADRA et al., 2008) (Tabela 1).

Diversas tecnologias têm sido empregadas para a aplicação das enzimas xilanolíticas em diversos processos biotecnológicos (LARA et al., 2014). As principais aplicações têm sido na indústria têxtil, papel, alimentos e produção de ração animal. Alguns estudos estão sendo realizados na produção de prebióticos, atuando como um meio seletivo ao crescimento de microrganismos lácteos (MILESSI, et al., 2016). Além disso, a xilose quando convertida pela ação das xilanases se transforma em xilitol, um adoçante de baixo teor calórico e não cariogênico, semelhante a sacarose, muito utilizada em dietas restritas à glicose (POLIZELI, et al., 2005).

As xilanases também estão sendo utilizadas na dieta de animais, principalmente suínos e aves, uma vez que sua aplicação tem como função melhorar a digestão de compostos lignocelulósicos presentes na alimentação (VANDORN et al., 2018). Além de auxiliar na digestibilidade, as enzimas podem auxiliar no crescimento de microrganismos no sistema digestório do animal.

Dentro da indústria alimentícia, as xilanases podem ser utilizadas, juntamente com outras enzimas na extração e clarificação de sucos (POLIZELI et al., 2005). Na panificação, ela tem uma grande importância, devido a sua capacidade de absorção de água e interação com glúten e hidrólise do amido, melhorando a estrutura da massa e seu manuseio.

Tabela 1. Leveduras produtoras de enzimas xilanolíticas.

Microrganismo	Referência	Enzimas		
		Xilanase	β -Xilosidase	β -Glicosidase
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Tanaka et al., (2004); Yegin et al.,(2018)	X	X	
<i>Hanseniapora osmophila</i>	Manzanares et al., 1998		X	
<i>Hanseniapora uvarum</i>	Manzanares et al., 1998		X	
<i>Aureobasidium microsliclum</i>	Jimenez et al., 1991	X	X	X
<i>Candida ancudensis</i>	Jimenez et al., 1991	X		X
<i>Cryptococcus albidus</i>	Biely et al., 1978	X		
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Otero et al., 2015			
<i>Cryptococcus flavescens</i>	Gomes et al., 2015	X		
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	Gomes et al., 2015	X		
<i>Bullera sinensis</i>	Gomes et al., 2015	X		
<i>Candida melibiosica</i>	Gomes et al., 2015	X		
<i>Hannaella pagnoccae</i>	Gomes et al., 2015	X		
<i>Occultifur brasiliensis</i> sp. nov	Gomes et al., 2015	X		
<i>Myriangiale</i> sp	Gomes et al., 2015	X		
<i>Pichia stiptis</i>	Lee et al., 1987	X		
<i>Pichia anômala</i>	Manzanares et al., 1998		X	
<i>Pichia membranifaciens</i>	Romero et al., 2012		X	
<i>Trichosporon mycotoxinivoran</i>	Thongekkaew et al. 2012	X		

Fonte: Autoria própria

A aplicação das β -xilosidase na produção de papel pela indústria Indiana tem recebido incentivos no uso de processos ecologicamente corretos e mais econômicos. as xilanases tem sido empregada como um grande potencial bio-branqueamento de polpas, substituindo assim processos químicos que geram grandes quantidades de resíduos (SINGH, et al., 2016). Outra aplicação enzimática

importante na Índia tem sido na indústria têxtil, atuando no branqueamento, remoção de impurezas e resistência do tecido (SINGH et al., 2016). Além de sua aplicação, houve um aumento de aproximadamente 20% na brancura, resistência e diminuição do amarelado, comparado ao tecido tratado convencionalmente.

Um dos maiores focos atualmente é o uso de xilanases na produção de biocombustíveis, o etanol 2ª geração. A conversão do material lignocelulósico em açúcares simples se deve à conversão da celulose e hemicelulose, sendo posteriormente transformados em etanol por microrganismos. Para que ocorra um rendimento significativo e competitivo, é necessária a utilização completa dos açúcares (MACRELI; GALBE; WALLBERG., 2014).

6.1 Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica

Os efeitos enzimáticos sobre a biomassa lignocelulósica estão relacionados com a complexidade do material lignocelulósico e das enzimas envolvidas. Isto é devido à especificidade de cada enzima e o sinergismo entre elas. (HOSSEINI et al., 2019) A hidrólise necessita de enzimas altamente específicas, tais como, celulasas, hemicelulasas e ligninases. A utilização de enzimas demonstra rendimentos elevados e formação de compostos inibitórios (SUAREZ et al., 2014). No entanto, o processo por hidrólise enzimática é lento e a atuação enzimática depende das características do substrato como cristalinidade, grau de polimerização, tamanho da partícula e conteúdo da lignina (ALVIRA et al., 2010).

A cristalinidade do material se refere a quantidade de celulose cristalina no sólido total, após a remoção da lignina e da hemicelulose, ocorre o aumento da área de superfície, reduzindo a cristalinidade da celulose e facilitando a atuação das enzimas a biomassa lignocelulósica. (YANG et al., 2011)

Devido a essa complexidade e especificidade entre enzimas e substratos são necessário uma gama de enzimas e/ou atuação de diversos microrganismos. O tempo, o custo das enzimas e a baixa concentração de açúcar são as maiores dificuldades encontradas para a hidrólise enzimática (MONDENBACH E NOKES, 2013).

A degradação enzimática da celulose sólida é outro fator que dificulta a atuação enzimática, sendo necessário um limite sólido-líquido, onde as enzimas são componentes móveis, levando ao acúmulo de produto.

7 CULTIVO DE MICRORGANISMOS EM ESTADO SÓLIDO.

O cultivo em estado sólido (CES) ou fermentação em estado sólido, (FES) é o processo em que o microrganismo é submetido ao crescimento em um substrato sem água entre as partículas sólidas, sendo muito utilizado para a produção enzimática (SOCCOL et al., 2017).

Diversos trabalhos tem sido realizado afim de encontrar cepas com alto potencial de produção enzimática, utilizando processos estáveis e principalmente que seja de baixo custo. Alguns obstáculos principais que devem ser otimizados (pH, temperatura, aeração, granulometria, especificidade de biomassa e enzima), são situações que interferem no resultado de crescimento dos microrganismos e expressão enzimática (LAKSHMIA e al., 2009).

Uma das vantagens desse processo é a utilização de resíduos agroindustriais por exemplo bagaço de cana, farelo de trigo, farelo de soja, entre outros, que são de grande importância econômica (AITA, et al., 2019). O menor requerimento de espaço, baixo custo, baixa contaminação, alta produtividade, tem sido a motivação para o engajamento desse processo (PANDEY et al., 2000)

Os fungos por suas características de crescimento e reprodução têm uma grande facilidade de adaptação a substratos, além de produzirem uma complexidade de enzimas que podem ser utilizadas em vários setores industriais (GOMES; SILVA; SERZEDELLO et al., 1998).

8 OBJETIVOS

8.1 Objetivos gerais

O presente trabalho teve por objetivo geral produzir e caracterizar enzimas do complexo hemicelulolítico usando leveduras da coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada.

8.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de crescimento das leveduras selecionadas em palha de milho, papelão, farelo de trigo;

- Avaliar a produção de celulasas, xilanases, β -glicosidase, β -xilosidase;

9 MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 Microrganismos

Foram selecionados microrganismos que possuíam histórico da utilização de pentoses, oriunda da coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (Tabela 2). Os microrganismos foram cultivados em três tipos de substratos, farelo de trigo, papelão moído, palha de milho triturada.

Tabela 2. Leveduras cultivadas.

<i>Metschnikowia koreensis</i> G18
<i>Aureobasidium pullulans</i> LB 3.1
<i>Aureobasidium leucospermi</i> LB 86
<i>Aureobasidium pullulans</i> G 19.1
<i>Pichia guilliermondii</i> G 4.2
<i>Candida tropicalis</i> LS 2
<i>Candida tropicalis</i> LS 4
<i>Candida tropicalis</i> LS 1
<i>Hanseniaspora</i> sp. G 7.1
<i>Debaryomyces</i> sp. B2
<i>Candida shehatae</i> BR6 1A
<i>Trichosporon multisporon</i>
<i>Pichia ofunaensis</i>
<i>Debaryomyces</i> sp. B 3
<i>Rhodotorula</i> sp 10.2
LC 01
levedura 18
levedura 20
levedura 13
levedura 11
levedura 23
levedura 22
levedura 17
levedura 3
levedura 9
levedura 7
levedura 12, 14
levedura 25, 1A

Fonte: Autoria própria

9.2 Meios nutrientes e condições de cultivo

9.2.1 Pré-inóculos para o CES

Para o cultivo em estado sólido foi feito um pré-inóculo em Erlenmeyer de 125 ml, contendo 20 ml de meio nutriente sólido de YEPD (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% glicose). O microrganismo foi inoculado por estrias, em superfície de do meio YEPD inclinado e incubado a 29 °C, por 36 horas. Após esse período, o microrganismo foi suspenso, com auxílio de alça de inoculação, com 25 mL de solução nutriente composta por (g L⁻¹) (KH₂PO₄) (3,0); (K₂HPO₄) (3,0) e MgSO₄ 7H₂O) (0,5) (Adaptado de LEITE et al., 2008)

9.2.2 Substratos lignocelulósicos

Farelo de trigo: comercializado pela Natural Life®. O farelo foi lavado por quatro vezes para a retirada de pequenas partículas e açúcares presente no farelo. Posteriormente, foi levado em estufa com circulação de ar a 40 °C durante 24 horas.

Palha de milho: palha de milho foi obtida em propriedade rural no município de Buritama, SP e triturada em processador de modo a se obter partículas de 0,2 cm.

Papelão: obtido a partir de caixas de embalagens e triturado em processadores de modo a se obter partículas 0,5 cm. Foi tamisado para retirar os resíduos menores e assim, padronizar o material.

9.2.3 Produção das enzimas por CES

O CES foi realizado em embalagens de polipropileno (16 x 22 cm) vedadas com tampões de algodão contendo 5 g de substrato, adicionados 11,0 ml de solução nutriente para obter 70 % de umidade. A solução nutriente foi composta por (g L⁻¹) (KH₂PO₄) (3,0); (K₂HPO₄) (3,0) e MgSO₄ 7H₂O) (0,5) (MORETTI, et al., 2012).

Cada embalagem recebeu inóculo de 5 mL da suspensão de células citadas no item 8.2.1. O cultivo foi mantido a 29 °C por 168 horas. A cada 24 horas uma embalagem foi retirada e adicionados 50 mL de água destilada para suspensão do material fermentado. A mistura foi homogeneizada manualmente e mantida sob

agitação em shaker, a 80 rpm, por 1 hora, sob temperatura de 25 °C. Após esse período, o material foi filtrado com tecido de nylon, centrifugado a 10000 x g por 20 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como solução enzimática bruta para determinação da atividade enzimática.

9.2.4 Embalagem de polipropileno para CES

O CES foi realizado em embalagens de polipropileno, essa metodologia foi desenvolvida no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada. O material possui as dimensões de 15 x 10 cm, para que não ocorra compactação, foi inserido um arame em forma de espiral, adicionado de uma rolha feita com algodão para vedação. (Figura 9)

Figura 9 Embalagem de polipropileno para CES



Fonte: Autoria própria

9.3 Determinação da atividade enzimática.

9.3.1 Xilanase

A mistura de reação foi composta por 100 µl de solução enzimática e 900 µl de xilana *birchwood*-Sigma Aldrich a 4 mM em tampão acetato pH 5,0. A solução foi incubada durante 10 min em banho a 60 °C. O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método DNS (Miller, 1959), adicionando 1 mL do reagente DNS à mistura de reação. A mistura foi incubada a 100 °C durante 5 minutos, em seguida foi resfriada em banho de gelo e adicionado 2,5 ml de água destilada. Após a homogeneização, foi realizado a leitura em espectrofotômetro Agilent Cary 60 a 540 nm. A atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de xilose por minuto, nas condições de reação, comparado a curva padrão de xilose, previamente preparada.

9.3.2 Avicelase

A atividade de avicelase consistiu na adição de 100 µl do extrato enzimático bruto em 900 µl de solução 1% de celulose microcristalina – avicel (tendo sido diluído 1,0 mL em tampão acetato 0,05 M, pH 5,0 e incubado a 50°C, por 30 minutos). Periodicamente, o sistema substrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método de Miller (1959). Antes de ser realizada a leitura no espectrofotômetro, a reação foi mantida em repouso pelo tempo de 20 minutos para que pudesse ocorrer a precipitação do substrato, impedindo que a turbidez do mesmo interferisse na leitura.

9.3.3 β-glicosidase

Para determinar a atividade de β-glicosidases, 50 µL da solução enzimática foi adicionada à mistura de 250 µl de solução tampão acetato (0,1 M, pH 5,0) e 250 µL de 4-nitrofenol-β-D-glicopiranosídeo (4 mmol.L⁻¹) – PNPG, Sigma Aldrich. A reação foi mantida a 60 °C, por 10 minutos, e interrompida com a adição de 2,0 mL de solução de Na₂CO₃ (2 M). O p-nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida

como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de nitrofenol por minuto de reação utilizando curva padrão obtido com solução de nitrofenol em variadas concentrações.

9.3.4 β -xilosidase

Para determinação da atividade de β -xilosidase, 50 μL da solução enzimática foram adicionados à mistura de 250 μL de solução tampão acetato (0,1 mol.L^{-1} , pH 5,0) e 250 μL de *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo PNPX, Sigma - Aldrich (4 mmol.L^{-1}). A reação foi mantida a 50 $^{\circ}\text{C}$, durante 10 minutos, sendo interrompida com a adição de 2,0 ml de Na_2CO_3 (2,0 mol.L^{-1}). O nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de nitrofenol por minuto de reação, seguindo as condições citadas.

9.3.5 Endoglucanase

A atividade de endoglucanase (CMCase) foi determinada por procedimento idêntico ao descrito para a atividade de xilanase (item 8.3.3), porém utilizando-se carboximetilcelulose (CMC – Sigma C5768) (40,0 g/L) como substrato e curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de glicose por minuto de reação.

9.3.6 Pectinase

A atividade enzimática foi determinada através de uma mistura de reação contendo 100 μl da solução enzimática e 900 μl de solução tampão acetato-NaOH a 0,1 M, pH 5,0, contendo 1% de pectina. Tal mistura foi então incubada a 60 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, sendo a reação interrompida pela adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico), para a quantificação de açúcares redutores, com base na curva padrão de ácido galacturônico (quantificação em espectrofotômetro a 540 nm). Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de açúcar redutor por minuto, nas condições de reação.

9.4 Caracterização físico-química da enzima.

A caracterização enzimática foi realizada com as enzimas que apresentaram maior atividade e foram: xilanase e β -xilosidase para *Aureobasidium pullulans* LB 3.1 e β -xilosidase para *Aureobasidium leucospermi* LB 86.

As atividades foram realizadas com as amostras que obtiveram maior pico de produção para ambas as leveduras, as enzimas utilizadas são de solução enzimática bruta, sem qualquer procedimento de purificação.

9.4.1 Efeito do pH sobre a atividade da enzima.

Para a determinação do efeito do pH sobre a atividade enzimática, a reação foi realizada como descrito, porém com o pH variando entre 3,0 e 10,5. Foram utilizados os seguintes tampões a 0,1 M. (Tabela 3).

Tabela 3. Tampões utilizados para caracterização.

Tampão	pH
Citrato de N_2	3,0
Acetato- NaOH	3,5 – 5,5
MES (Sigma M5287)	6,0 – 6,5
HEPES (Sigma H3375)	7,0 – 7,5
BICINE (Sigma 150-25-4)	8,0 – 9,5
CAPS (Sigma C2632)	10 – 10,5

Fonte: Autoria própria

9.4.2 Efeito da temperatura sobre atividade enzimática

A temperatura ótima de atividade foi definida a partir da obtenção do melhor pH, posteriormente foi submetido em temperaturas de 40 °C a 90 °C.

9.4.3 Avaliação da estabilidade enzimática de β -xilosidase.

Ensaio para avaliação da estabilidade das enzimas quando mantidas em várias condições de pH e duas variações de temperaturas 25 °C e 4 °C, visando demonstrar a estabilidade das enzimas em condições de estocagem e processos de concentração e/ou purificação. A porcentagem de atividade foi calculada tornando-se como 100 % o valor da atividade enzimática no tempo zero de incubação.

A solução enzimática foi incubada a 4 °C, em diferentes pHs, utilizando os tampões citados na Tabela 3. Após 24 horas de incubação, foi adicionado o tampão com melhor atividade, previamente estabelecido e a reação aconteceu na temperatura de melhor atividade.

9.4.4 Efeito da termoestabilidade sobre a atividade da β -xilosidase de *A. pullulans* LB 3.1.

A solução enzimática foi pré-incubada, sem a presença do substrato, nas temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80, 85 e 90 °C e utilizando os tempos de 15, 30, 60 e 90 minutos. Posteriormente as incubações, foi realizado as atividades enzimáticas, utilizando pH e temperatura ótimas.

9.5 Purificação parcial da enzima.

9.5.1 Concentração do extrato fermentativo

O extrato bruto foi concentrado usando o sistema QuixStand® (QSM-03SP, GE) equipado com cartucho de membrana de corte 10 Kda. O volume inicial foi de 460 ml e foi concentrado para um volume final de 58 ml.

9.6 Cromatografia por gel filtração

Inicialmente foi utilizado o método de filtração em gel, a fim de pré-purificar a β -xilosidase. A coluna utilizada foi uma coluna de resina Sephadex® G-75 (2,5 cm / 100 cm), foi equilibrada com 5 volumes de coluna utilizando um tampão acetato de sódio (50 mM), pH 4,0, com adição de NaCl 50 mM. Após o equilíbrio da coluna, 1 ml de solução enzimática, previamente filtrada em filtro de PTFE 0,45 μ m, foi aplicado a coluna. Foi estabelecida uma vazão de 0,5 mL/min e coletados um volume de fração de 5 ml por tubo. O procedimento foi realizado utilizando uma bomba do tipo peristáltica (Bio-Rad® EP-1), e as amostras coletadas por um coletor de frações Pharmacia LKB FRAC.

As frações que apresentaram atividade de β -xilosidase foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Em seguida, as frações selecionadas, com perfil protéico similar, foram reunidas e concentradas utilizando tubo Vivaspín GE® 30.000 MWCO 20 ml. Este processo foi realizado sucessivamente com adição de tampão acetato de sódio (50 mM), pH 4,0, sem NaCl. Esse processo foi realizado até que fosse retirado o NaCl previamente presente na amostra, sendo monitorada a condutividade.

9.7 Cromatografia por troca aniônica

As amostras foram submetidas à cromatografia de troca aniônica usando coluna Resource™ Q (1 mL) acoplada a um ÄKTA purifier (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com 10 volumes de coluna utilizando tampão A (tampão MES, 50 mM, pH 6,0). Tampão B (tampão MES, 50 mM, pH 6,0 + NaCl 1 M) foi utilizado para eluição da proteína em um gradiente linear de NaCl. Foi utilizado uma detecção de 280 nm e um fluxo de 1 mL/min com volume de coleta de 2,0 ml.

As frações que exibiram atividade de β -xilosidase foram concentradas com TCA (ácido tricloroacético) e analisadas em SDS PAGE a 10 % (LAEMMLI, 1970).

9.8 Precipitação por TCA

Um volume de 250 µl de solução de TCA (100%) foi adicionado a 1 ml de amostra (1:4), e incubado a 4°C por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspenso em 200 µl de acetona (4 °C), e centrifugado a 14.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram incubados *overnight* a temperatura ambiente para evaporação da acetona. Posteriormente a amostra foi ressuspenso em tampão de amostra para o SDS PAGE.

9.9 Efeito do pH sobre a atividade da β -xilosidase

A atividade enzimática foi medida utilizando o substrato PNPX e variando os tampões a 0,1 M com pH de 3,0 a 10,5, sendo os tampões citrato (pH 3,0), acetato (pH 3,5 a 5,5), MES (pH 6,0 a 6,5), Hepes (pH 7,0 e 7,5), Bicine (pH 8,0 a 9,0) e Caps (pH 9,5 a 10,5).

9.10 Efeito da temperatura sobre a atividade da β -xilosidase.

A atividade foi determinada utilizando as mesmas condições anteriores, porém, utilizando a faixa de pH com melhor atividade e variando a temperatura de 30 a 90 °C.

9.11 Termoestabilidade

A solução enzimática foi pré-incubada, sem a presença do substrato, nas temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80, 85 e 90 °C e utilizando os tempos de 15, 30, 60 e 90 minutos. Posteriormente as incubações, foi realizado as atividades enzimáticas, utilizando pH e temperatura ótimas de reação anteriormente determinado.

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1 Avaliação do crescimento de microrganismos em diferentes tipos de meio.

As leveduras selecionadas foram cultivadas, por CES, tendo como substratos palha de milho, farelo de trigo e papelão por 168 horas, afim de realizar uma triagem inicial para observar o crescimento e produção das enzimas. Somente as espécies *Aureobasidium pullulans* LB 3.1 e *Aureobasidium leucospermi* LB 86 foram capazes de crescer em meio sólido, cujo farelo de trigo foi usado como substrato (Tabela 4.). A avaliação foi realizada retirando-se uma embalagem de cultivo a cada 24 horas, extraíndo e centrifugando, para observar o crescimento de biomassa.

10.2 Avaliação da produção de enzimas pelas leveduras *Aureobasidium pullulans* LB 3.1 e *Aureobasidium leucospermi* LB 86

As leveduras selecionadas foram submetidas ao CES utilizando farelo de trigo como substrato, durante o período de 168 horas, sendo realizada a extração a cada 24 horas. Nas amostras foram avaliadas as atividades enzimáticas de celulasas e hemicelulasas.

As leveduras apresentaram atividades de xilanase, β -glicosidase, β -xilosidase. Conforme mostrado na Tabela 5.

Tabela 4. Leveduras utilizadas para o crescimento em diferentes tipos de substratos.

Leveduras	Substratos		
	Farelo trigo	Papelão	Palha de milho
<i>Aureobasidium pullulans</i> LB 3.1	+	-	-
<i>Aureobasidium leucospermi</i> LB	+	-	-
86			
<i>Aureobasidium pullulans</i> G 19.1	-	-	-
<i>Pichia guilliermondii</i> G 4.2	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i> LS 2	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i> LS 4	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i> LS 1	-	-	-
<i>Hanseniaspora</i> sp. G 7.1	-	-	-
<i>Debaryomyces</i> sp. B2	-	-	-
<i>Candida shehatae</i> BR6 1A	-	-	-
<i>Trichosporon multisporon</i>	-	-	-
<i>Pichia ofunaensis</i>	-	-	-
<i>Debaryomyces</i> sp. B 3	-	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp 10.2	-	-	-
levedura LC 01	-	-	-
levedura 18	-	-	-
levedura 20	-	-	-
levedura 13	-	-	-
levedura 11	-	-	-
levedura 23	-	-	-
levedura 22	-	-	-
levedura 17	-	-	-
levedura 3	-	-	-
levedura 9	-	-	-

levedura 7	-	-	-
levedura 14	-	-	-
levedura 12	-	-	-
levedura 25	-	-	-
(+) Cresceram no substrato indicado			
(-) Não cresceram no substrato indicado			

Fonte: Autoria própria

Tabela 5. Atividades enzimáticas pelas leveduras *A. pullulans* LB 3.1 e *A. leucospermi* LB 86.

Enzimas	Levedura	Levedura
	<i>A. pullulans</i> LB 3.1 (U mL ⁻¹)	<i>A. leucospermi</i> LB 86 (U mL ⁻¹)
Xilanase	72,0	5,5
β-xilosidase	6,7	2,0
β-glicosidase	4,0	5,5
Avicelase	-	-
Endoglucanase	-	-
Pectinase	-	-

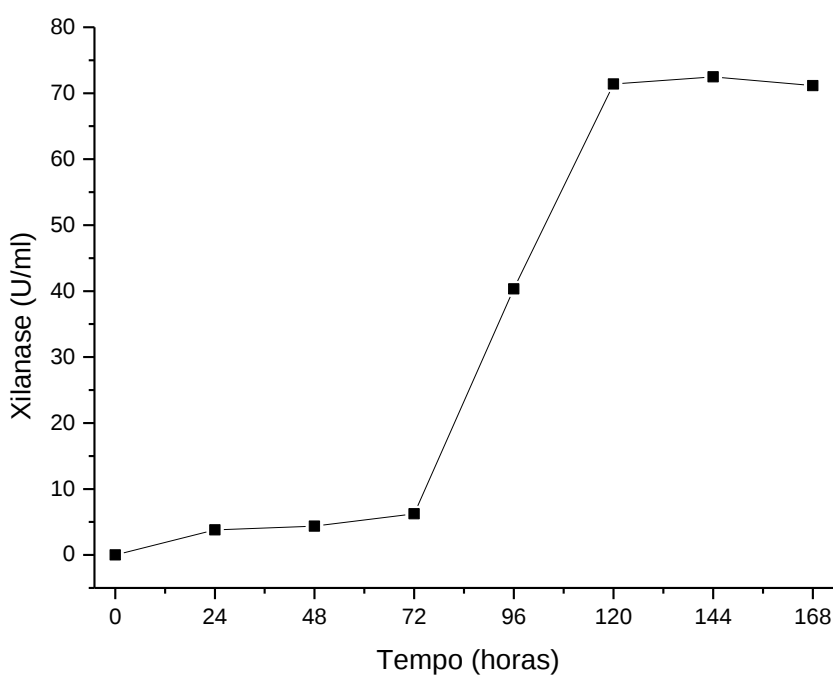
Fonte: Autoria própria

A maior produção de xilanase foi pela levedura *A. pullulans* LB 3.1 no tempo de 120 horas (Figura 10), com 72,0 U mL⁻¹, o que corrobora os dados de Gautério, et al.(2018), com uma produção de 74,9 U mL⁻¹, utilizando farelo e casca de arroz como substrato, porém, é superior a produção de Tanaka et al.(2004), que utilizaram três transformantes secretando xilanases de *A. pullulans* e obtiveram uma produção de 38 e 15 U mL⁻¹. Dessa forma, essa levedura demonstra um potencial de produção dessa enzima, visto que é similar à de *Penicillium oxalicum* (70,0 U mL⁻¹) (Liao et al., 2012) e superior ao *Penicillium janczewskii* (30,39 U mL⁻¹) (TERRASAN et al. al., 2010), *Penicillium glabrum* (25,44 U mL⁻¹) (KNOB et al., 2013), *Thermomyces lanuginosus* (62,7 U mL⁻¹) (Khucharoenphaisan et al., 2010), *Thielaviopsis basicola* (~ 45 U mL⁻¹) (RANI et al., 2012), *Cryptococcus sp* (11,3 U mL⁻¹) (Lopes et al., 2011) e *Cryptococcus laurentii* (2,7 U mL⁻¹) (OTERO et al., 2015).

Com essa produção superior aos encontrados na literatura e baixa produção de β -xilosidase, é um grande fator para a produção de xilo-oligossacarídeos, sem a formação de xilose no meio, o que impede a inibição da atividade de xilanase. (CHRISLOV et al., 1997; OTERO et al., 2015; GAUTÉRIO et al., 2018).

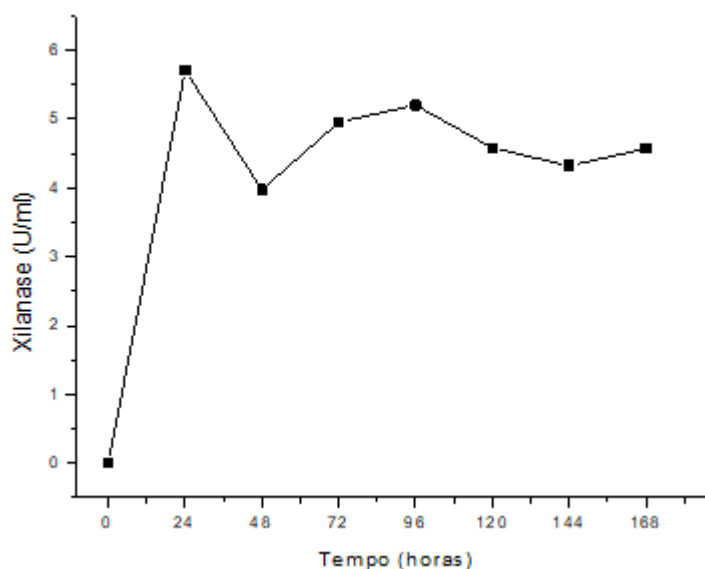
A levedura *A. leucospermi* LB 86 apresentou uma maior produção de xilanase no tempo de 24 horas (Figura 11) de $5,5 \text{ U mL}^{-1}$. Não foram encontrados dados sobre a produção de xilanase por essa levedura na literatura, porém, a quantidade produzida foi maior do que relatado por Otero et al., (2015), que obtiveram $2,7 \text{ U mL}^{-1}$ com *Cryptococcus laurentii*.

Figura 10. Produção de xilanase pela levedura *A. pullulans* LB 3.1 ao longo do CES com farelo de trigo como substrato.



Fonte: Autoria própria

Figura 11 Produção de xilanase pela levedura *A. leucospermi* LB 86 ao longo do CES com farelo de trigo como substrato.

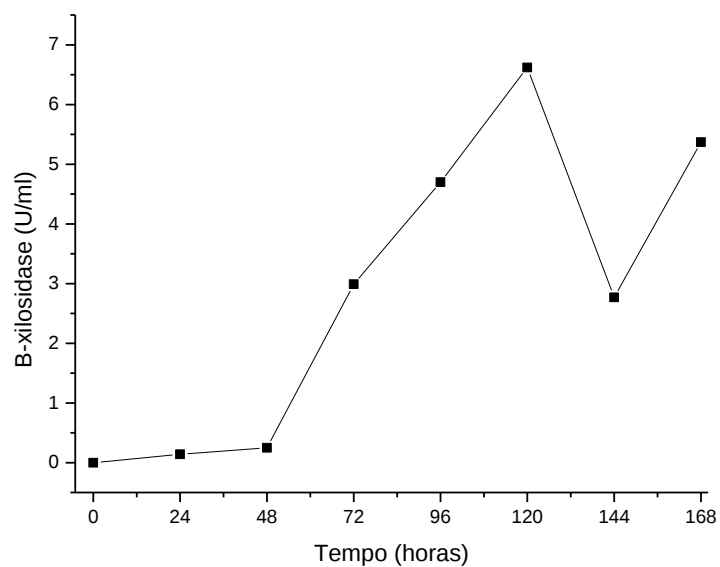


Fonte: Autoria própria

A produção de β -xilosidase pela levedura *A. pullulans* LB 3.1 (Figura 12), foi maior após de 120 h de cultivo com uma produção de $6,7 \text{ U m L}^{-1}$. A levedura *A. leucospermi* LB 86 apresentou maior produção de β -xilosidase após 168 horas de cultivo, com $2,0 \text{ U m L}^{-1}$ (Figura 14.). Essas leveduras apresentaram produção maior comparada àquela descrita por Gautério et al. (2018) para a levedura *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 que foi de $0,19 \text{ U mL}^{-1}$, e por Ohta et al. (2010), que obtiveram uma produção de $0,44 \text{ U mL}^{-1}$ cultivando a levedura *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524.

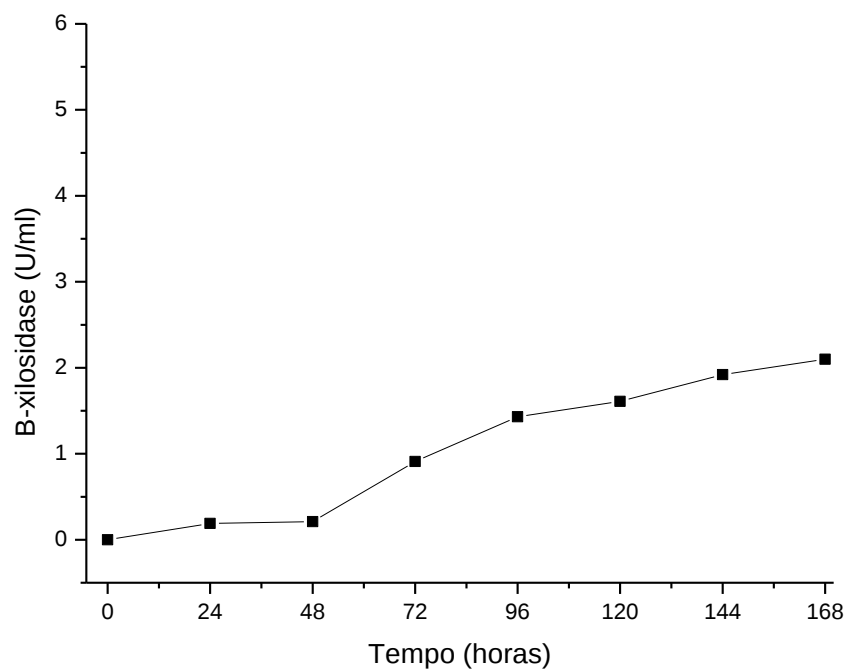
Para a enzima β -glicosidase, observou-se que *A. pullulans* LB 3.1 produziu $4,0 \text{ U mL}^{-1}$ com pico de produção em 120 horas (Figura 15) enquanto *A. leucospermi* LB 86, apresentou produção máxima de $5,5 \text{ U mL}^{-1}$ em 168 horas de cultivo (Figura 14.). Esses resultados mostram que ambas leveduras apresentaram uma produção superior comparado a Leite, et al., (2008) que obtiveram $1,3 \text{ U mL}^{-1}$, utilizando *A. pullulans*, com as mesmas condições de cultivo e substrato. Utilizando outras condições de cultivo com a *A. pullulans*, Iembo et al. (2002) obtiveram uma produção de $0,5 \text{ U mL}^{-1}$. Esse resultado mostra que as leveduras LB 3.1 e LB 86 possuem um potencial de produção, o que necessita de uma caracterização para obter novos resultados.

Figura 12 Produção de β -xilosidase pela levedura *A. pullulans* LB 3.1 ao longo do CES com farelo de trigo como substrato.



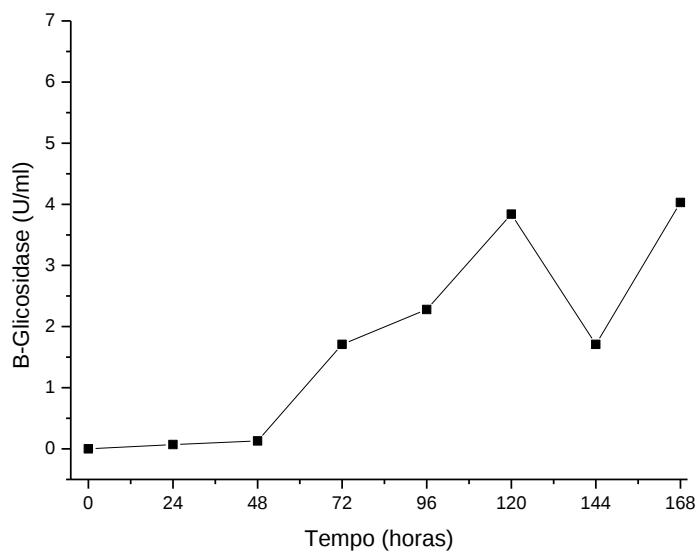
Fonte: Autoria própria

Figura 13. Produção de β -xilosidase pela levedura *A. leucospermi* LB 86 ao longo do CES com farelo de trigo como substrato.



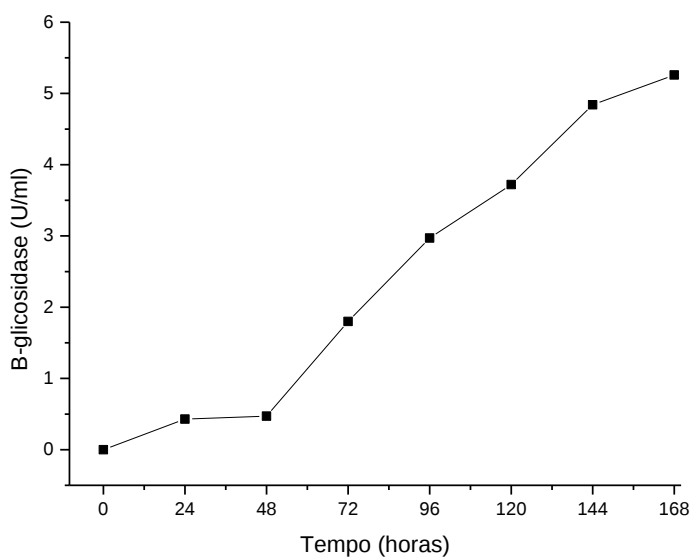
Fonte: Autoria própria

Figura 14. Produção de β -glicosidase pela levedura *A. pullulans* LB 3.1 ao longo do CES com farelo de trigo como substrato.



Fonte: Autoria própria

Figura 15. Produção de β -glicosidase pela levedura *A. leucospermi* LB 86 ao longo CES sólido com farelo de trigo como substrato.



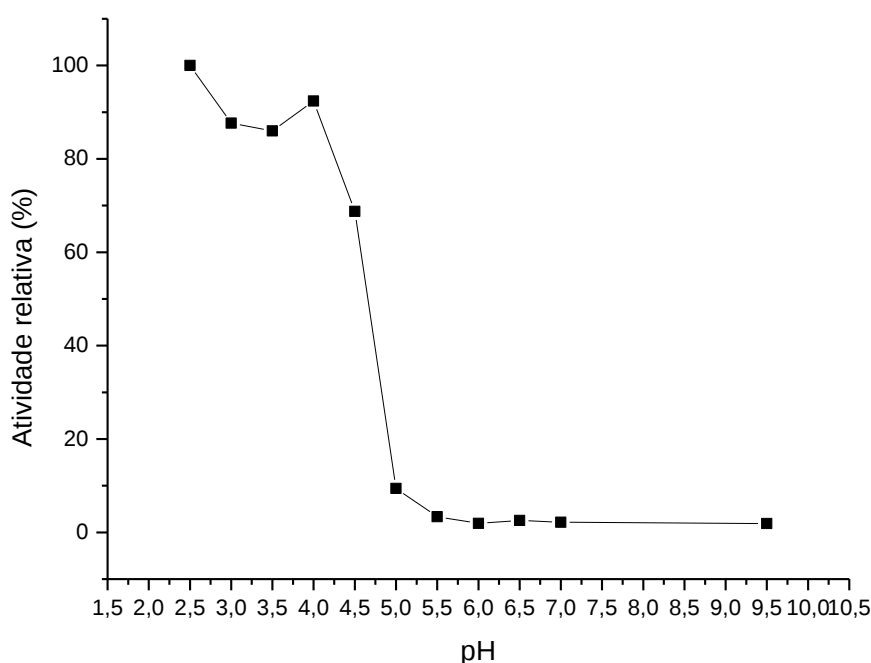
Fonte: Autoria própria

10.3 Avaliação do efeito da temperatura e do pH sobre as atividades de Xilanase e β -xilosidase.

Com relação à influência do pH na atividade enzimática frente a diferentes pHs, observa-se perfis similares para Xilanase (Figura 16) e β -xilosidase (Figura 17) produzidas pela levedura *A. pullulans* LB 3.1, com uma maior atividade na faixa de pH 2,5 a 3,5. Essa característica é observada também para a β -xilosidase de *A. leucospermi* LB 86, cuja maior atividade foi observada em pH 3,5 (Figura 18).

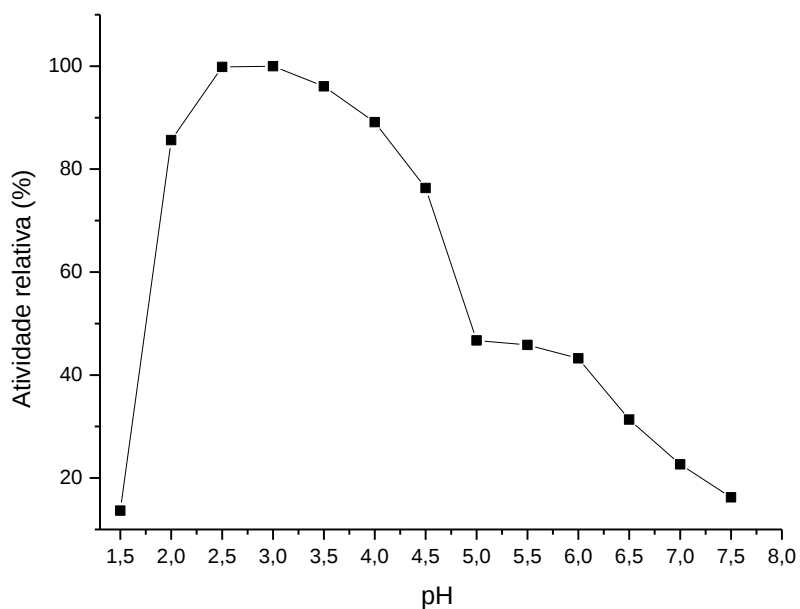
Essa característica acídica é comumente encontrada na literatura para β -xilosidase (OHTA et al., 2010), porém não muito comum para xilanase cujo pH de maior atividade geralmente está entre pH 6,0 e 7,2. (OTERO et al., 2015)

Figura 16. Efeito do pH sobre a atividade de xilanase bruta obtida pelo cultivo da levedura *A. pullulans* LB 3.1.



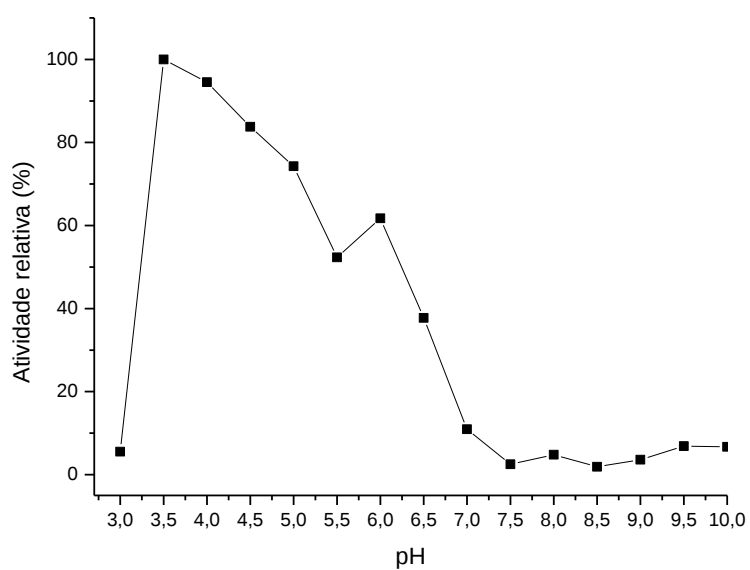
Fonte: Autoria própria

Figura 17. Efeito do pH sobre a atividade de β -xilosidase da solução enzimática bruta obtida pela levedura *A. pullulans* LB 3.1.



Fonte: Autoria própria

Figura 18. Efeito do pH sobre a atividade de β -xilosidase bruta obtida pelo cultivo da levedura *A. leucospermi* LB 86.

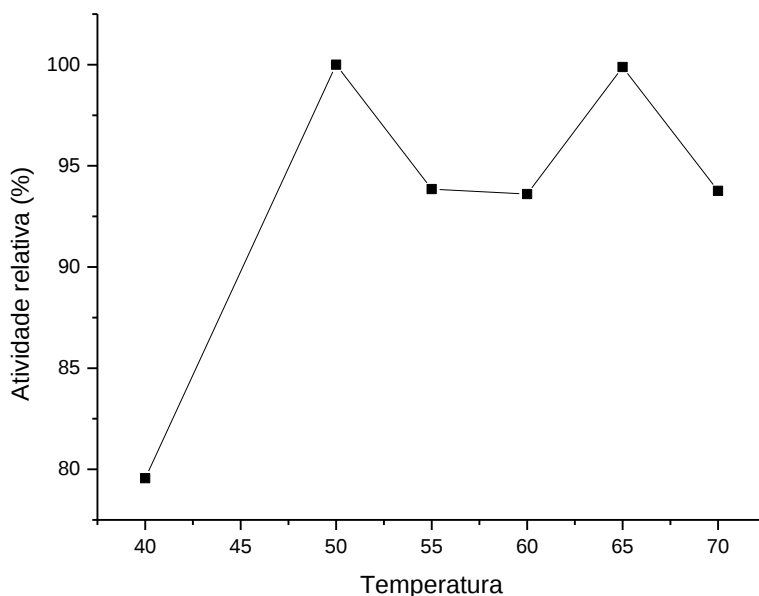


Fonte: Autoria própria

O estudo da influência da temperatura nas atividades das enzimas produzidas pela levedura *A. pullulans* LB 3.1 indicou que a maior atividade ocorreu em 65 C° para xilanase (Figura 19), demonstrando uma temperatura já descrita na literatura, onde Tanaka et al. (2004), utilizando *A. pullulans* obtiveram atividade ótima em 60 C°. Outros autores, como Knob et al. (2013) utilizando *Penicillium oxalicum* e Chanwicha et al. (2014) utilizando *Thermoascus aurantiacus* obtiveram também a temperatura de 60 C° como melhor atividade.

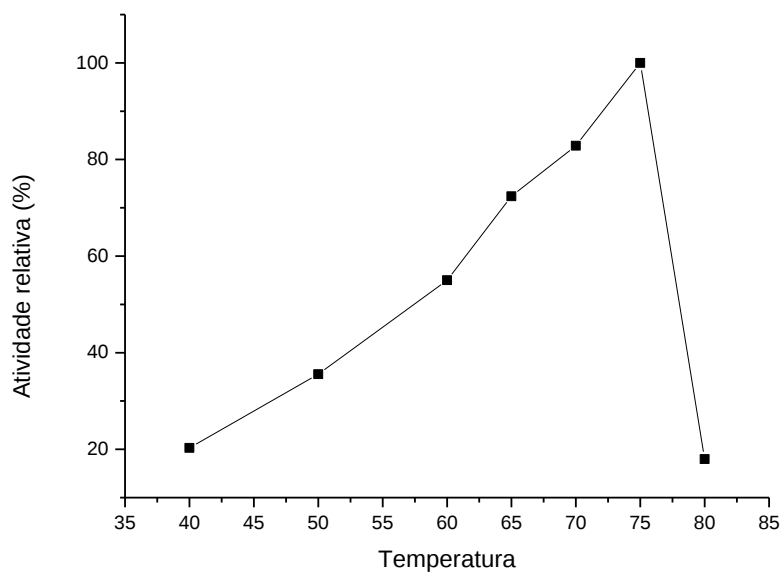
A atividade de β -xilosidase foi de 75 C° para *A. pullulans* LB 3.1 (Figura 20) e 80 C° para a levedura *A. leucospermi* LB 86 (Figura 21). Esses dados mostram que as duas leveduras possuem temperaturas superior ao encontrado na literatura, já que Iembo et al., (2002) e Ohta et al. (2010) obtiveram uma melhor temperatura a 65 °C da atividade ótima dessa enzima produzida por *A. pullulans*.

Figura 19. Efeito da temperatura sobre a atividade de xilanase bruta obtida pelo cultivo da levedura *A. pullulans* LB 3.1.



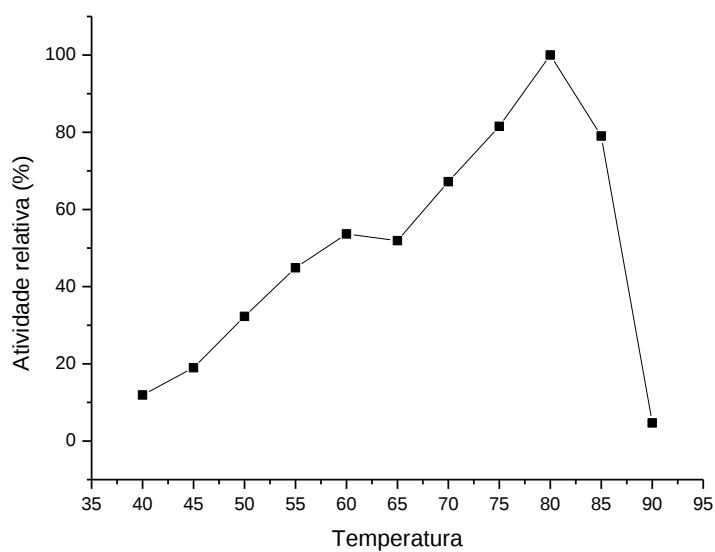
Fonte: Autoria própria

Figura 20. Efeito da temperatura sobre a atividade de β -xilosidase bruta obtida pelo cultivo da levedura *A. pullulans* LB 3.1.



Fonte: Autoria própria

Figura 21. Efeito da temperatura sobre a atividade de β -xilosidase bruta obtida pelo cultivo da levedura *A. leucospermi* LB 86.



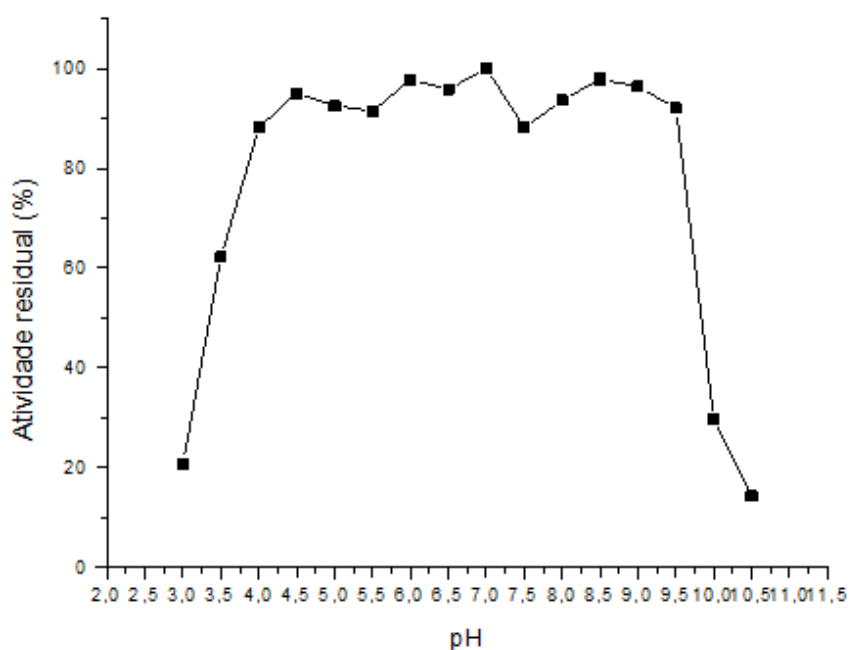
Fonte: Autoria própria

10.4 Avaliação da estabilidade da β -xilosidase após incubação em 4 °C e 25 °C.

Observa-se na figura 21, que a β -xilosidase produzida pela levedura *A. pullulans* LB 3.1 apresentou estabilidade entre os pHs 4,0 e 9,5 a 4 °C. O mesmo perfil foi observado a 25 °C (Figura 23).

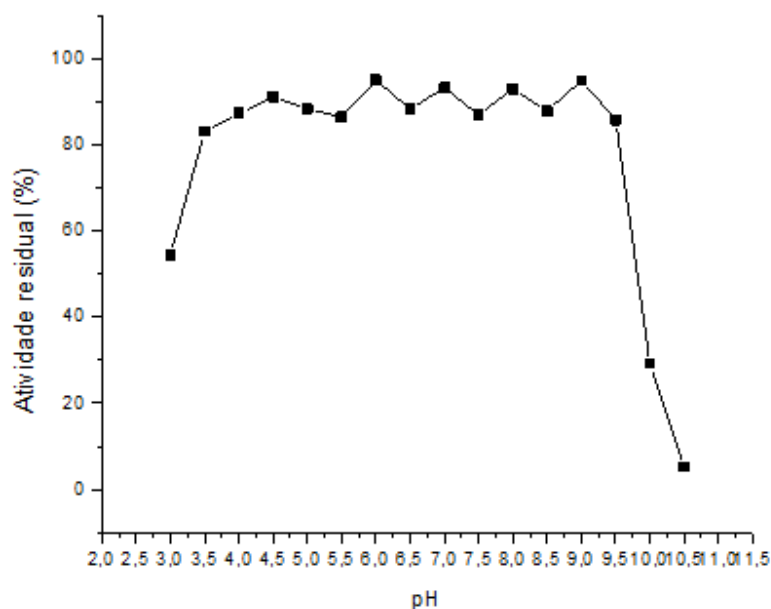
A β -xilosidase de *A. leucorpermi* LB 86 apresentou um perfil semelhante sendo estável na faixa de pH de 4,5 a 8,5 a 4 e 25 °C (Figuras 24 e 25).

Figura 22. Efeito do pH sobre a estabilidade de β -xilosidase de *A. pullulans* LB 3.1, incubada a 4 °C.



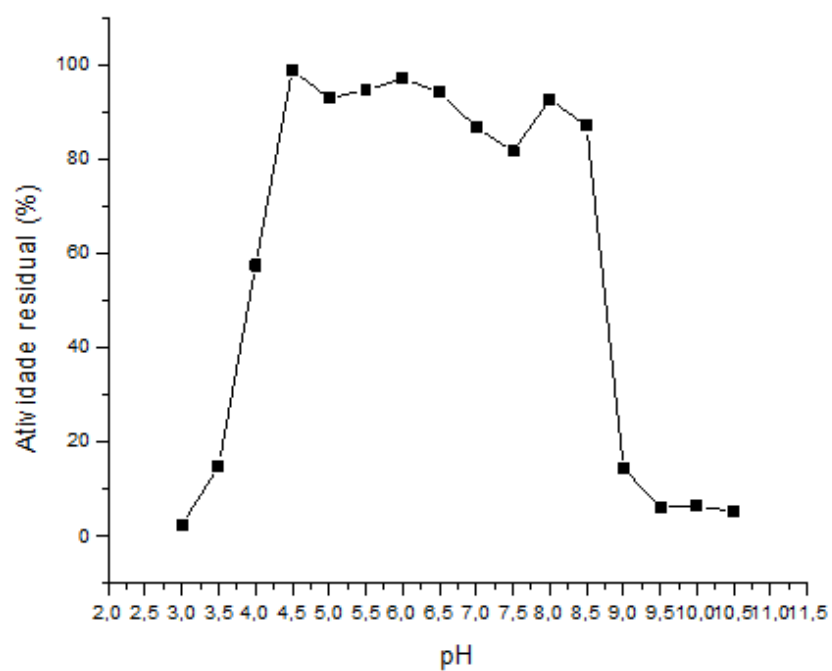
Fonte: Autoria própria

Figura 23. Efeito do pH sobre a estabilidade de β -xilosidase de *A. leucospermi* LB 86, quando incubada a 4 °C.



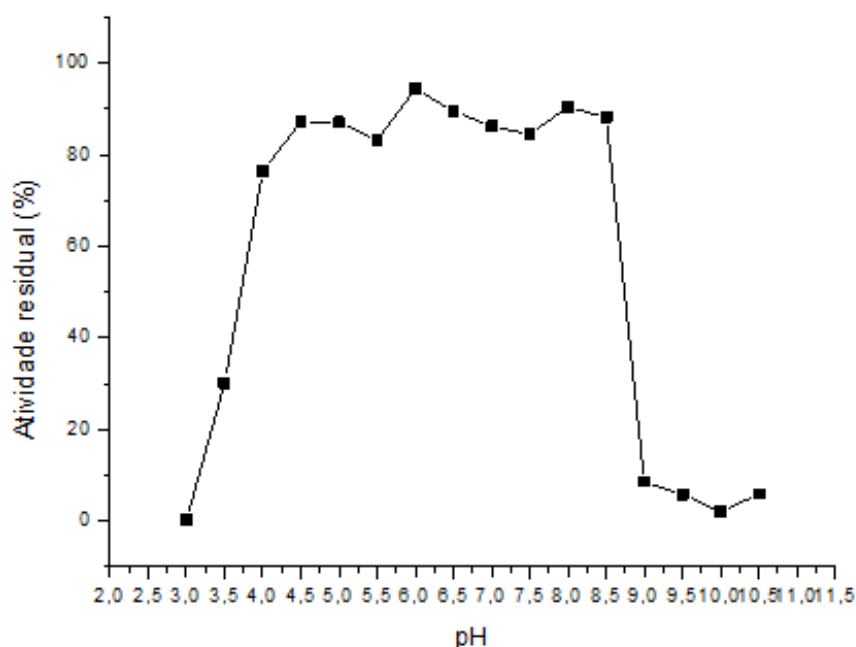
Fonte: Autoria própria

Figura 24. Efeito do pH sobre a estabilidade de β -xilosidase de *A. pullulans* LB 3.1, quando incubada a 25 °C.



Fonte: Autoria própria

Figura 25. Efeito do pH sobre a estabilidade de β -xilosidase de *A. leucospermi* LB 86, quando incubada a 25 °C.



Fonte: Autoria própria

10.5 Avaliação da termoestabilidade da enzima β -xilosidase bruta de *Aureobasidium pullulans* LB 3.1 em diferentes tempos, quando na ausência do substrato.

A termoestabilidade da β -xilosidase de *Aureobasidium pullulans* LB 3.1 foi avaliada nas temperaturas 40, 50, 60, 70, 80, 85 e 90 °C.

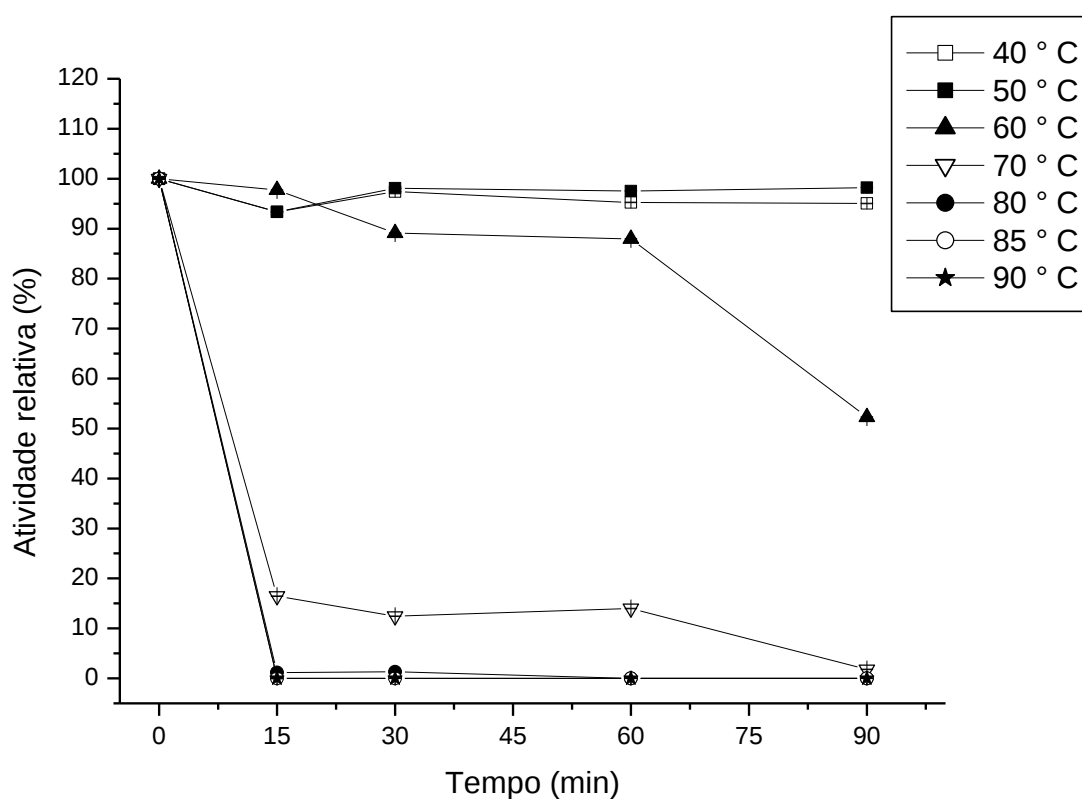
A enzima manteve sua atividade em 90 % quando foi pré-incubada a 60 °C por um período de 60 minutos, e 50 % após incubação em 90 minutos (Figura 26).

Esse resultado demonstra a peculiaridade da estabilidade térmica desta enzima, uma propriedade dificilmente observada em enzimas de leveduras. Em outros trabalhos, é possível observar uma estabilidade térmica inferior ao demonstrado pela β -xilosidase de *Aureobasidium pullulans* LB 3.1

A β -xilosidase de *Pichia stipitis* perdeu 20 % de sua atividade após incubação por 30 minutos a 60 °C (BASARAN et al., 2008).

A β -xilosidase de *S. thermophilum* mostrou-se estável após incubação por 60 minutos a 50 e 60 °C, entretanto em temperaturas superiores notou-se perda gradual de sua atividade enzimática (ZANOELO et al., 2004).

Figura 26 Efeito da termoestabilidade da enzima β -xilosidase bruta de *A. pullulans* LB 3.1 em diferentes tempos, quando na ausência do substrato.



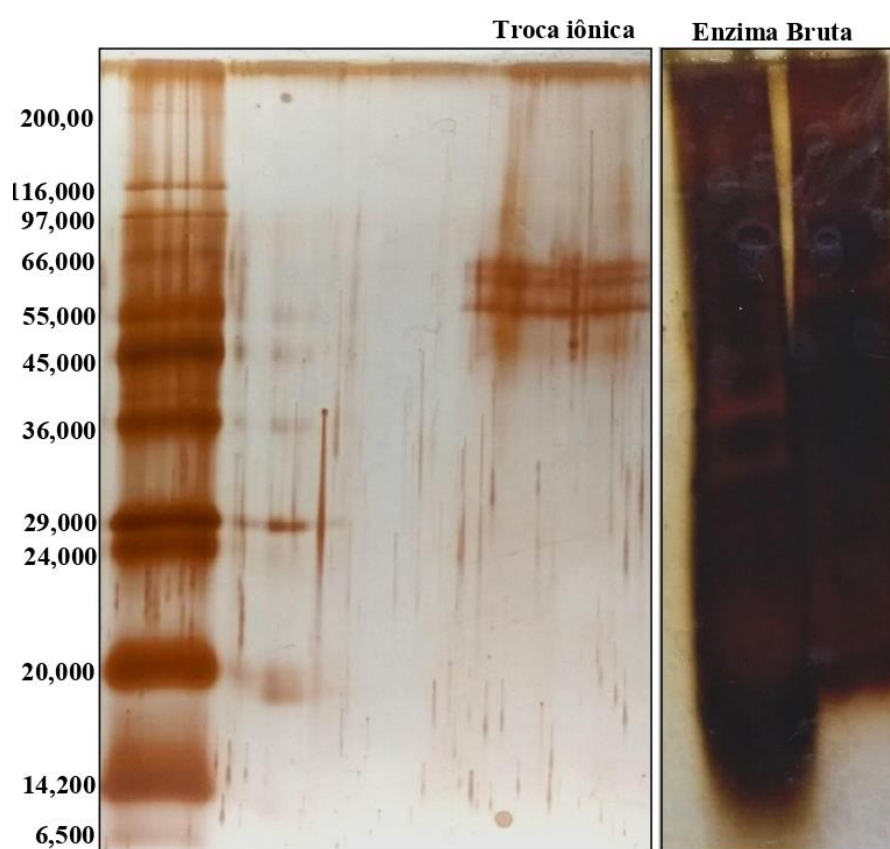
Fonte: Autoria própria

10.6 Purificação parcial da β -xilosidase de *Aureobasidium pullulans* LB 3.1

A purificação parcial da β -xilosidase secretada pela levedura *Aureobasidium pullulans* LB 3.1 foi conduzida em duas etapas cromatográficas, sendo: filtração em gel (Sephadex G-75) e troca iônica (Resource TM Q) conforme citado no item (9.7). Durante a cromatografia de troca iônica, não foi possível identificar a formação de

picos no cromatograma, desse modo, foi avaliada com atividade enzimática de todas as frações coletadas. As amostras posteriormente foram precipitadas com TCA, a fim de retirar o NaCl presente na solução tamponante e concentrar as amostras para análise em gel SDS-PAGE. Figura 27.

Figura 27 SDS-PAGE 10 % da enzima parcialmente purificada e enzima bruta. Marcador de massa molecular SigmaMarker TM Wide Range 6,500 a 200,00 kDa.



Fonte: Autoria própria

A figura mostra três bandas com massa molecular estimada entre 55 e 66 kDa, ao lado observa-se a solução enzimática bruta (extrato fermentativo), o que demonstra uma eficiência na metodologia de purificação. As frações derivadas da troca iônica foram analisadas quanto a capacidade de hidrólise de diferentes substratos. Tabela 6.

Tabela 6 Atividade enzimática para avaliação de possíveis contaminantes.

	Enzimas	U/ml
PNPX Sigma Aldrich	β - xilosidase	29,0
PNPG Sigma Aldrich	β - glicosidase	10,0
PNPA Sigma Aldrich	α -arabinofuranosidase	0
Caseína Sigma Aldrich	Protease	0
Xilana Birchwood	Xilanase	0
Pectina Sigma Aldrich	Pectinase	0
Avicel Sigma Aldrich	Avicelase	0
Amido	Amilase	0

Fonte: Autoria própria

A Tabela 6 mostra a hidrólise de dois substratos diferentes, pNPX e pNPG, podendo indicar a presença de duas enzimas. Entretanto, na literatura, é possível observar β - xilosidases bifuncionais. A β - xilosidase purificada de *S. thermophilum* também apresentou atividades em pNPG (β -glicosidase) e β -galactopiranosídeo (β -galactosidase) (Zanoelo et al., 2014). Outro trabalho realizado por Wakiyama et al., (2008) utilizando β - xilosidase de *A. japonicus*, demonstrou que esta enzima foi capaz de hidrolisar os substratos β -galactopiranosídeo e α -L-arabinofuranosídeo. A β -xilosidase do fungo *G. thermoleovorans* purificada por Wagschal et al. (2008) também exibiu atividade em α -L-arabinofuranosídeo. Em vista disso, a atividade em dois substratos distintos pode indicar a presença de duas diferentes enzimas ou uma enzima bifuncional.

10.7 Caracterização físico-química

10.7.1 Efeito do pH

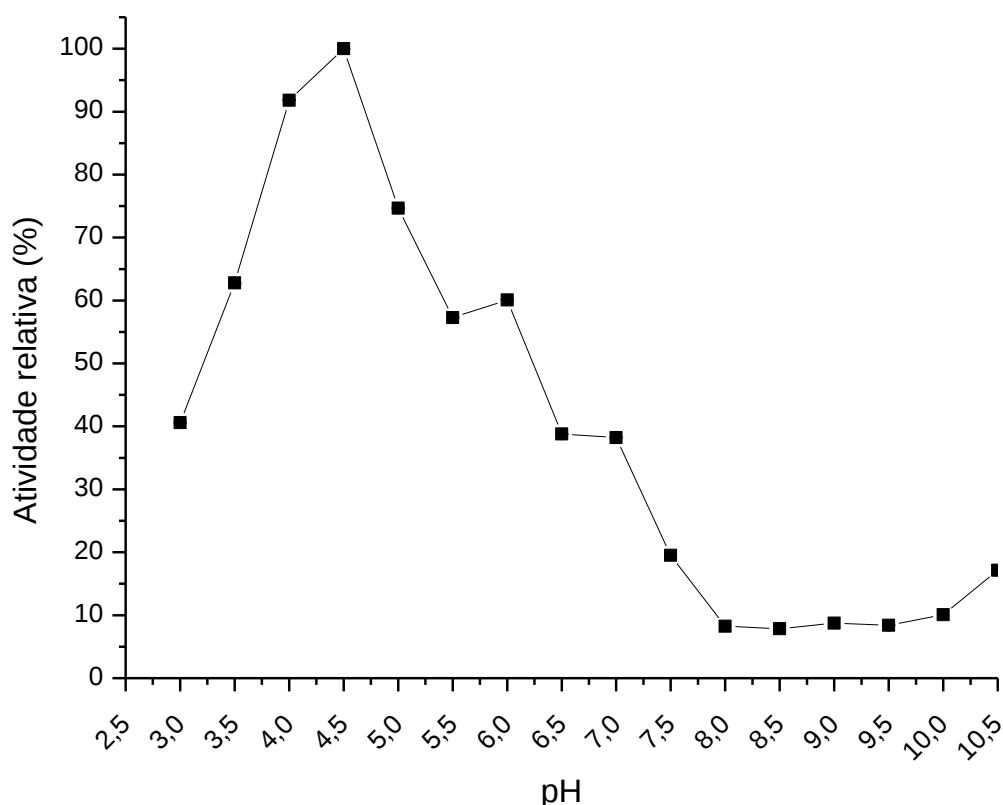
Sob efeito de pH na atividade enzimática, a enzima manteve mais de 50 % da sua atividade entre pH 3,5 - 5,5. A máxima atividade foi alcançada a pH 4,5. Em condições alcalinas, a enzima demonstrou perda progressiva da atividade enzimática, exibindo 40% de sua performance catalítica a pH 7,0 e 10 % de atividade residual na faixa de pH 8-10. (Figura 28)

Esses resultados indicam que a β -xilosidase de *Aureobasidium pullulans* LB 3.1 é uma enzima ácida. Essa propriedade é muito importante para sua aplicação em processos biotecnológicos, como no caso da sacarificação de biomassa pré-

tratado com ácido diluído para produção de etanol. Normalmente após o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica utilizando soluções ácidas, o pH deve ser ajustado até atingir uma condição ideal para a atuação das enzimas envolvidas no processo de sacarificação. O que acrescenta custos ao processo. Portanto, a utilização de enzimas que atuam em pH ácido, como o caso da β -xilosidase de *Aureobasidium pullulans* LB 3.1 é importante no ponto de vista industrial.

Alguns autores descreveram atividade ótima de β -xilosidase próximo ao encontrado neste trabalho, porém, não é comum encontrar produção de β -xilosidase por leveduras. De acordo com De Carvalho (2018), a β -xilosidase do fungo *Colletotrichum graminicola* exibiu maior atividade entre os pH 4,5 e 5,0. A β -xilosidase do fungo *Thermomyces lanuginosus* exibiu maior atividade enzimática a pH 5,5 (CORREA et al., 2016). Basaran (2008) reportou uma β -xilosidase de *Pichia stipitis* cuja maior atividade enzimática foi alcançada entre pH 4,8 e 5,0. Li (2018) também reportou uma β -xilosidase de *Dictyoglomus thermophilum* cuja maior atividade foi a pH 6,0.

Figura 28 Efeito do pH sobre a atividade da β -xilosidase, produzida por *A. pullulans* LB 3.1, após purificação parcial na temperatura ótima de 80° C. A atividade relativa é baseada em um ponto máximo de atividade (29 U/ml).



Fonte: Autoria própria

10.7.2 Efeito da temperatura

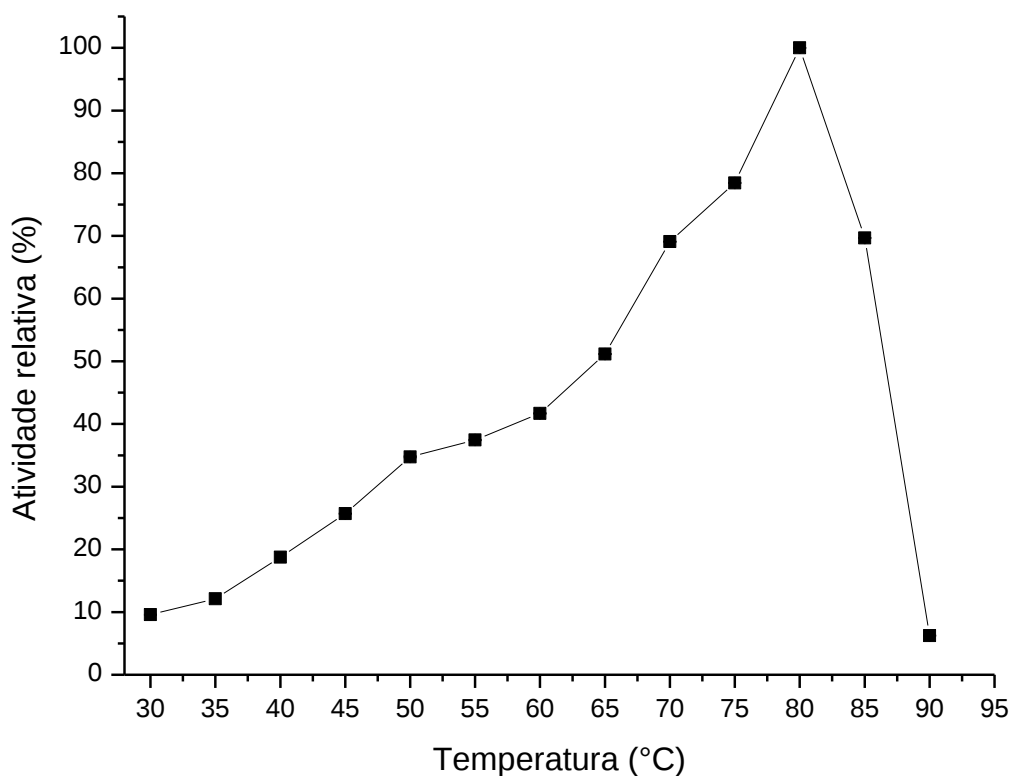
Sob efeito da temperatura na atividade, a β -xilosidase de *Aureobasidium pullulans* LB 3.1 exibiu atividade enzimática acima de 70% entre as temperaturas de 70 °C a 85 °C, tendo sido observado máxima performance catalítica a 80 °C (Figura 29).

A temperatura ótima para atividade da β -xilosidase apresentada aqui mostrou ser superior ao encontrado na literatura. Em estudo com β -xilosidase de *Colletotrichum graminicola*, De Carvalho (2018) reportou máxima atividade enzimática a 65 °C. A atividade ótima de β -xilosidase produzida por *Thermomyces lanuginosus* também foi inferior, ocorrendo a 55 °C (CORREA, 2016). β -xilosidades

de *Aspergillus niger* GS1 (Malvaéz, 2013) e *Penicillium sclerotiorum* (Knob, 2009) exibiram máxima atividade a 60 °C.

Notavelmente, a atividade máxima exibida pela β -xilosidase de *Aureobasidium pullulans* LB 3.1 parcialmente purificada, foi superior ao obtido na primeira etapa do trabalho, com a enzima bruta, a qual demonstrou ótima temperatura de atividade a 75 °C.

Figura 29 Efeito da temperatura sobre a atividade da β -xilosidase, produzida por *A. pullulans* LB 3.1, após purificação parcial em pH 4,0. A atividade relativa é baseada em um ponto máximo de atividade (29 U/ml).



Fonte: Autoria própria

10.7.3 Efeito da termoestabilidade

A termoestabilidade da β -xilosidase de *Aureobasidium pullulans* LB 3.1 foi avaliada nas temperaturas 40, 50, 60, 70, 80, 85 e 90 °C.

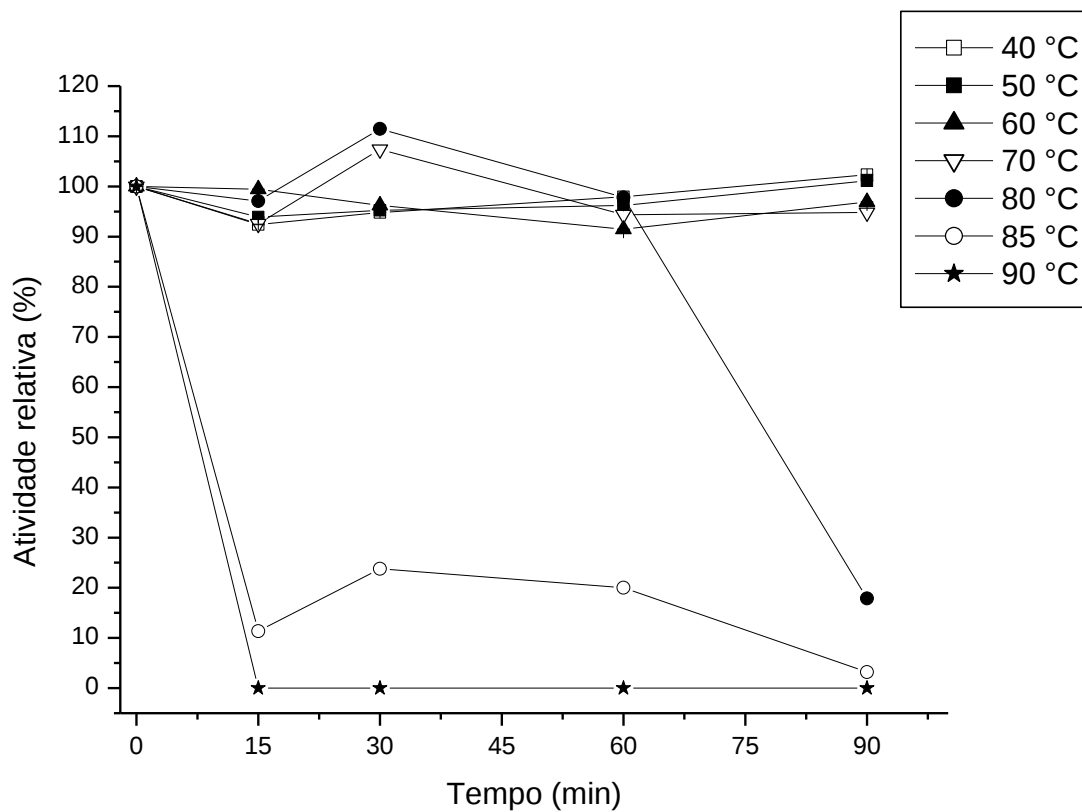
A enzima parcialmente purificada manteve sua atividade em 100 % quando foi pré-incubada a 80 °C por um período de 60 minutos, e 90% após incubação por 90 minutos (Figura 30).

Esse resultado demonstra a peculiaridade da estabilidade térmica desta enzima, uma propriedade dificilmente observada em enzimas de leveduras. Em outros trabalhos, é possível observar uma estabilidade térmica inferior ao demonstrado pela β -xilosidase de *Aureobasidium pullulans* LB 3.1

A β -xilosidase de *Pichia stipitis* perdeu 20 % de sua atividade após incubação por 30 minutos a 60 °C (BASARAN et al., 2008). A β -xilosidase de *Aspergillus niger* GS1 manteve-se estável até 60 °C por um período de 60 minutos. Contudo, quando incubado por 10 minutos a 70 °C foi reportado a perda de 80 % de sua atividade inicial (Malvaéz, 2013).

A β -xilosidase de *S. thermophilum* mostrou-se estável após incubação por 60 minutos a 50 e 60 °C, entretanto em temperaturas superiores notou-se perda gradual de sua atividade enzimática (ZANOELO et al., 2004).

Figura 30 Efeito da temperatura sobre a estabilidade da β -xilosidase parcialmente purificada, produzida por *A. pullulans*, em diferentes tempos, quando em ausência de substrato.



Fonte: Autoria própria

11 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho permitem concluir que:

- As leveduras selecionadas *Aureobasidium pullulans* LB 3.1 e *Aureobasidium leucospermi* LB 86 foram capazes de produzir xilanase e β -xilosidase, quando cultivada em substrato sólido composto por farelo de trigo.

- As leveduras mostraram um grande potencial na produção de xilanase, comparado aos dados encontrados na literatura.

- A produção de β -xilosidase pelas leveduras foi melhor do que os resultados obtidos na literatura, mostrando ter um potencial para a produção da enzima.

- A purificação parcial da β -xilosidase produzida pela levedura *A. pullulans* mostrou resultados superiores ao encontrado na literatura.

- Trabalhos encontrados na literatura utilizou fungo filamentoso para a produção de β -xilosidase, o que dificulta a aplicação na sacarificação. O que confirma a hipótese na utilização desse microrganismo em processos biotecnológicos.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, Tasneem; ABBASI, S. A. Biomass energy and the environmental impacts associated with its production and utilization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 14(3), 2010.
- ADSUL, M. G., GHULE, J. E., SINGH, R., SHAIKH, H., & BASTAWDE, K. B. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 1, p. 67-72, 2004.
- AGBOR, V. B., CICEK, N., SPARLING, R., BERLIN, A., & LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, 29(6), 675–685. 2011.
- ALVES-PRADO, H. F., PAVEZZI, F. C., SIMÕES, R., LEITE, R., OLIVEIRA, V. M. DE, SETTE, L. D., & DASILVA, R.. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 333-346, 2010.
- ALVIRA, P., BALLESTEROS, M., & NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- AZARPIRA, A., RALPH, J., & LU, F. Catalytic alkaline oxidation of lignin and its model compounds: a pathway to aromatic biochemicals. **BioEnergy Research**, v. 7, n. 1, p. 78-86, 2014. BALDRIAN, P.; VALASKOVA, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi *FEMS Microbiology Review*. v. 32, p. 501-521, 2008.
- BANKEEREE, W., LOTRAKUL, P., PRASONGSUK, S., KIM, S. W., & PUNNAPAYAK, H. ENHANCED Production of Cellulase-Free Thermoactive Xylanase Using Corncob by a Black Yeast , *Aureobasidium pullulans* CBS **Korea Science** 135684, 54(6), 822–829, 2016.
- BASARAN, P., & OZCAN, M. Characterization of b -xylosidase enzyme from a *Pichia stipitis* mutante. **Bioresource Technology**, 99, 38–43, 2008.
- BHADRA, BHASKAR ,SARKAR, P. K., & SHIVAJI,. S. Yeasts and Yeast-Like Fungi Associated with Tree Bark: Diversity and Identification of Yeasts Producing Extracellular Endoxylanases **Yeast Biodiversity**, 489–494, 2008.
- BHAT, M.K.; HAZLEWOOD, G.P. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. *In*:Bedford, M.R., Partridge, G.G. (eds). **Enzymes in farm animal nutrition**., New York, USA, p.11–60, 2001.
- BHUTTO, A. W., QURESHI, K., HARIJAN, K., & ABRO, R. Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. **Energy**, 2017.
- BIELY, P, VRSANSKÁ M, KRÁTKÝ Z. Degrading Enzymes of the Yeast *Cryptococcus albidus*: Identification and Cellular Localization. **European journal of biochemistry**, v. 108, n. 1, p. 313-321, 1980.

BLANCHETTE, R. A. & SHAW, C. G. Association among bacteria, yeasts and basidiomycetes during wood decay. **Phytopathology** v. 68, p. 631—637, 1978.

BRETT, C. T. Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. **International review of cytology**, 199, 161-199, 2000.

BUTT, M. S., TAHIR-NADEEM, M., AHMAD, Z., & SULTAN, M. T. Xylanases and Their Applications in Baking Industry, **Food Technology and Biotechnology** 9862(1), 22–31, 2008

CAO, W., SUN, C., LIU, R., YIN, R., & WU, X. Comparison of the effects of five pretreatment methods on enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse. **Bioresource Technology**, v. 111, p.215–221 2012.

CALIARI, Í. P., BARBOSA, SUKARMO, O., TEOFILO, R. F. Estimation of cellulose crystallinity of sugarcane biomass using near infrared spectroscopy and multivariate analysis methods. **Carbohydrate polymers**, v. 158, p. 20-28, 2017.

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

CHANDRA, M. R. G. S., & MADAKKA, M. Comparative Biochemistry and Kinetics of Microbial Lignocellulolytic Enzymes. In: **Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry**. Academic Press, 2019. p. 147-159.

CHRISTOV, L. P., MYBURGH, J., TONDER, A. VAN, & PRIOR, B. A. Hydrolysis of extracted and fibre-bound xylan with *Aureobasidium pullulans* enzymes. **Journal of biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 21-29, 1997.

COUGHLANM, P.; LJUNGDAHLL, G. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. In Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation, **FEMS Symposium**, n. 43, p. 11-30, 1988.

CRESTINI, C. et al. Oxidative strategies in lignin chemistry: A new environmental friendly approach for the functionalisation of lignin and lignocellulosic fibers. **Catalysis Today**, v. 156, p. 8–22, 2010.

DAVISON, B. H., BRANDT, C. C., GUSS, A. M., KALLURI, U. C., PALUMBO, A. V, STOUDE, R. L., RIDGE **Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals**. John Wiley & Sons, 2013.

DIAZ, B. A., MARIA, M., MORETTI, D. S., BEZERRA-BUSSOLI, C., CARREIRA, C., BLANDINO, A., & GOMES, E. Bioresource Technology Evaluation of microwave-assisted pretreatment of lignocellulosic biomass immersed in alkaline glycerol for fermentable sugars production. **Bioresource Technology**, 185, 316–323. 2015

EBRINGEROVÁ, A. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. **Macromolecular Symposia**, v. 232, n. 333, p. 1–12, 2006.

ERIKSSON, K.-E. L.; BERMEK, H. Lignin, Lignocellulose, Ligninase. **Encyclopedia of Microbiology**, p. 373–384, 2009.

FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M. Characterization of Cellulolytic Extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and Its Application in Biomass Saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 1586–1603, 2012.

LARA, C. A., SANTOS, R. O., CADETE, R. M., FERREIRA, C., MARQUES, S., GÍRIO, F., FONSECA, C. Identification and characterisation of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*, **International Journal of General and Molecular Microbiology**, 105(6), p. 1107–1119, 2014.

GAUTÉRIO, GABRIELLE VICTORIA *et al.* Production of xylanolytic enzymes and xylooligosaccharides by *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 in submerged cultivation. **Industrial Crops & Products**, 2018.

GIMENES, L. J.; ROBERTO, D. Fungos Basidiomicetos. **Apostila do Curso de Capacitação de Monitores e Educadores**, 2010.

GÍRIO, F. M., FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C., & MARQUES, S. Bioresource Technology Hemicelluloses for fuel ethanol: **A review Bioresource Technology**, 101(13), 4775–4800. 2010.

GOMES, E.; SILVA, R.; SERZEDELLO, A. Ribonuclease production by *Aspergillus* species. **Review Microbiology**, v. 29, p. 187-192, 1998.

GONZÁLEZ, A.E. , J. A study of yeasts during the delignification and fungal transformation of wood into cattle feed in Chileanrain forest. **Antonie van Leeuwenhoek** 55:221-236, 1989.

GUERRIERO, G., HAUSMAN, J., STRAUSS, J., ERTAN, H., & SIDDIQUI, K. S. Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Engineering in Life Sciences**, 16(1), 1-16, 2016.

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A; ROJAS, O. J. Cellulose Nanocrystals : Chemistry , Self-Assembly , and Applications. **Chemical Reviews**, v. d, p. 3479–3500, 2009.

HATAKEYAMA, H., & HATAKEYAMA, T. Lignin structure, properties, and applications. In *Biopolymers*. **Springer Berlin Heidelberg**, 1-63, 2009.

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A; ROJAS, O. J. Cellulose Nanocrystals : Chemistry , Self-Assembly , and Applications. **Chemical Reviews**, v. d, p. 3479–3500, 2009.

HEILMANN-CLAUSEN, J.; BODDY, L. Inhibition and stimulation effects in communities of wood decay fungi. **Microbiology Ecology**. v. 49, p. 399-406, 2005.

HENDRIKS, A.T.W.M., ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. 100 (1), 10-18, 2009.

HERNÁNDEZ-ORTEGA, A.; FERREIRA, P.; MARTÍNEZ, A. T. Fungal arylalcohol oxidase: A peroxide-producing flavoenzyme involved in lignina degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1395– 1410, 2012.

HORN, S.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biothecnology for Biofuels**, v.5, p. 1-13, 2012.

IEMBO, T., SILVA, R., PAGNOCCA, F. C., & GOMES, E.. Production , Characterization , and Properties of b -Glucosidase and b -Xylosidase from a Strain of *Aureobasidium* sp . **Applied Biochemistry and Microbiology** 1, 38(6), 549–550, 2002.

KAI, D., ZHANG, K., JIANG, L., WONG, H. Z., LI, Z., ZHANG, Z., & LOH, X. J. Sustainable and Antioxidant Lignin – Polyester Copolymers and Nano fi bers for **Potential Healthcare Applications**. 2017.

KARP SG, WOICIECHOWSKI AL, SOCCOL VT, SOCCOL CR. Pretreatment Strategies for 293 Delignification of Sugarcane Bagasse: **A Review. Braziliam Biology Technology**. 56:679-89, 2013

KHATTAB, S. M. R., & WATANABE et al. Bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. In: **Bioethanol Production from Food Crops**. Academic Press, 2019. p. 187-212.

KHUCHAROENPHAISAN, K.; SINMA, K. β -xylanase from *Thermomyces anuginosus* and its biobleaching application. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 13, n.11, p. 513-526, 2010.

KNOB, A.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. B-Xylosidases from filamentous fungi: An overview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 389–407, 2010.

KÖPCKE, V. Improvement on cellulose accessibility and reactivity of different wood pulps. Fibre and Polymer Technology **Wood Chemistry and Pulp Technology**, 2008.

KOUPAIE, E. HOSSEINI *et al.* Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production-A **review. Journal of Environmental Management**, 2019.

KUMAR, A.K., SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources and bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 7, 2017.

LACHANCE, M., BOWLES, J. M., STARMER, W. T., & BARKER, J. S. F. Kodamaea kakaduensis and Candida tolerans, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. **Canadian journal of microbiology**, v. 45, n. 2, p. 172-177, 1999.

LAKSHMIA, S. P. J. HOBBS., RAVELLA, R. S., CHAGANTI., S. Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: A statistical optimization. **Biochemistry. Engineer. J.** 48, 41-47.2009

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

LIAO, H., XU, C., TAN, S., WEI, Z., LING, N., YU, G I. Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Scientific Reports,** v. 5, n. 1, p. 12631, 2015.

LIM, S. F.; MATU, S. U. Utilization of agro-wastes to produce biofertilizer. **International Journal of Energy and Environmental Engineering,** v. 6, n. 1, p. 31–35, 2015.

LOPES F, MOTTA F , ANDRADE CCP, RODRIGUES. Thermo-stable xylanases from non-conventional yeasts. **Journal Microbiology. Biochemistry. Technology.** 3:36-42. 2011.

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

LYND, L.R, LYND, L. R., LASER, M. S., BRANSBY, D., DALE, B. E., DAVISON, B., HAMILTON, R., ... WYMAN, C. E.. , C.E.How biotech can transform biofuels. **Nature. Biotechnoly.** v.26 n.2, p.169–172, 2008

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature,** v. 227, p. 680-685, 1970.

LU, Y., YANG, B., Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. **Applied biochemistry and biotechnology,** 98(1-9), 641-654.2002.

MADADI, M.; TU, Y.; ABBAS, A. Recent Status on Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production Recent Status on Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. **Eletronic Journal of Biology,** v. 13, n. April, p. 135–143, 2017.

DÍAZ-MALVÁEZ, F. I., GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E., & HERNÁNDEZ-ARANA, A. Isolation and properties of α -xylosidase from *Aspergillus niger* GS1 using corn pericarp upon solid state fermentation. **Process Biochemistry,** 48(7), 1018–1024, 2013.

MANAVALAN, T.; MANAVALAN, A.; HEESE, K. Characterization of Lignocellulolytic Enzymes from White-Rot Fungi. **Current Microbiology,** v. 70, n. 4, p. 485–498, 2015.

MACRELI, S, GALBE, M, WALLBERG, O. Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock. **Biotechnology for Biofuels**, 7:26, 2014.

MARGEOT, A., HAHN-HÄGERDAL, EDLUND M, SLADE R, MONOT F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current opinion in biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 372-380, 2009.

MILESSI, T.S.S.; KOPP, W.; et al. Immobilization and stabilization of an endoxylanase from *Bacillus subtilis* (XynA) for xylooligosaccharides (XOs) production. **Catalysis Today**, v.259, p.130-139, 2016

MODEL COMPOUNDS: A Pathway to Aromatic Biochemicals. **Bioenergy Research**, v. 7, n. 1, p. 78–86, 2014.

MORAIS, C.G, LARA, et al. C.A. Sugiyamaella xylanicola sp. nov., a xylan-degrading yeast species isolated from rotting-wood in Brazil. *Int. J. Syst. Evolution. Microbiology*. v. 63, p.2356-2360, 2013.

MORETTI, M. M. S., BOCCHINI, D. A., DA SILVA, R., RODRIGUES, SETTE, A. L., GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, 43 (3) 1062-71, 2012.

MORETTI, M. M. S., MIGLIONI, O., BOSCOLO, M., GOMES, E., Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. **Applied Energy**, 122, p. 189-195, 2014.

MOSET, V., XAVIER, FENG, L., WAHIDHENRIK, R., MOLLER, H. B. Combined low thermal alkali addition and mechanical pre-treatment to improve biogas yield from wheat straw. **Journal of cleaner production**, v. 172, p. 1391-1398, 2018.

OTERO, D. M., TEIXEIRA, L. M., SANZO, A. V. L., ROSA, C. A., KALIL, S. J., & CADAVAL, C. L. Screening of yeasts capable of producing cellulase-free xylanase. **African Journal of Biotechnology**, 14(23), 1961–1969, 2015.

PAYNE, C. M., KNOTT, B. C., MAYES, H. B., HANSSON, H., HIMMEL, M. E., SANDGREN, M. BECKHAM, G. T. Fungal Cellulases, **Chemical Reviews**, V.115, n.3, p1308-1448, 2015.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation. I. **Bioprocesses and products**. *Proc. Biochemistry*., v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PAZ, A.; OUTEIRIÑO, D.; GUERRA, N.P.; Domínguez, J.M. Enzymatic hydrolysis of brewer's spent grain to obtain fermentable sugars. **Bioresource Technology**. 275, 402–409, 2019.

PÉREZ, S.; SAMAIN, D. Structure and engineering of celluloses. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**, vol 64, p.25-116, 2010.

POLIZELLI, M. L.. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

PEREIRA, L., COMELLI, A., PAULA, A., MARCELE, L., HENRIQUE, M., & SILVEIRA, L. Bioresource Technology Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource technology**, 175, 195–202, 2015.

RANI, G. B., CHIRANJEEVI, T., & CHANDEL, A. K. Optimization of selective production media for enhanced production of xylanases in submerged fermentation by *Thielaviopsis basicola* MTC 1467 using L 16 orthogonal array. **Journal Food Science Technology**, 51, 2508–2516. 2012.

SAAKE, B.; LEHNEN, R. Lignin, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 2007.

SAINI, A., AGGARWAL, N. K., SHARMA, A., & YADAV, A. (2015). Actinomycetes: a source of lignocellulolytic enzymes. **Enzyme research**, v. 2015, 2015.

SANCHEZ, OSCAR J.; CARDONA, CARLOS A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SHALLOM, DALIA; SHOHAM, Yuval. Microbial hemicellulases. **Current opinion in microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003.

SCHELLER, HENRIK VIBE; ULVSKOV, PETER. Hemicelluloses. **Annual review of plant biology**, v. 61, 2010. SHALLOM, D., & Å, Y. S. Microbial hemicellulases, 219–228, 2003.

MONTEIRO, P. Q., GHIRALDI, P. H. C., MELATI, R. B., PAGNOCCA, F. C., DE SOUZA, W., ... & BRIENZO, M.. Acid, alkali and peroxide pretreatments increase the cellulose accessibility and glucose yield of banana pseudostem. **Industrial crops and products**, v. 115, p. 62-68, 2018.

SHIVAJI, S.; PRASAD, G. S. Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. In: **Yeast biotechnology: Diversity and applications**. Springer, Dordrecht, 2009. p. 3-18.

BIELY, PETER; SINGH, SUREN; PUCHART, VLADIMÍR. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: state of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260-1274, 2016.

SRIVASTAVA, N., SRIVASTAVA, M., MISHRA, P. K., GUPTA, V. K., MOLINA, G., RODRIGUEZ-COUTO, S., ... & RAMTEKE, P. W. Applications of fungal celulasas in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386, 2018.

SANDGREN, MATS; STÅHLBERG, JERRY; MITCHINSON, COLIN. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 89, n. 3, p. 246-291, 2005.

SUAREZ, C. A. G., CAVALCANTI-MONTAÑO, I. D., DA COSTA MARQUES, R. G., FURLAN, F. F., E AQUINO, P. L. D. M., DE CAMPOS GIORDANO, R., & DE SOUSA. Modeling the kinetics of complex systems: enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 173, n. 5, p. 1083-1096, 2014.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical reviews in biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-64, 2002.

SUN, YE; CHENG, JIAYANG. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

SUKUMARAN, R. K., SURENDER, V. J., SINDHU, R., BINOD, P., JANU, K. U., SAJNA, K. V., & PANDEY, A. Lignocellulosic ethanol in India: prospects, challenges and feedstock availability. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4826-4833, 2010.

TAHERZADEH, MOHAMMAD J.; KARIMI, KEIKHOSRO. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, v. 2, n. 4, p. 707-738, 2007.

TERRASAN, C. R., TEMER, B., SARTO, C., JÚNIOR, F. G. S., & CARMONA, E. C. Xylanase and β -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: production, physico-chemical properties, and application of the crude extract to pulp biobleaching. **BioResources**, v. 8, n. 1, p. 1292-1305, 2013.

THONGEKKAWE, JANTAPORN; KONGSANTHIA, JARUPAN. Screening and identification of cellulase producing yeast from rongkho forest, ubon ratchathani university. **Bioeng. Biosci**, v. 4, n. 3, p. 29-33, 2016.

TOMÁS-PEJÓ, E., ALVIRA, P., BALLESTEROS, M., & NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for lignocellulose-to-bioethanol conversion. In: **Biofuels**. Academic press, 2011. p. 149-176.

VAN DORN, ROXANNA; SHANAHAN, DIANE; CIOFALO, VINCE. Safety evaluation of xylanase 50316 enzyme preparation (also known as VR007), expressed in *Pseudomonas fluorescens*, intended for use in animal feed. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 97, p. 48-56, 2018.

VOUTILAINEN, SANNI. Fungal thermostable cellobiohydrolases. Characterization and protein engineering studies. 2010.

ZHENG, ZUOXING; SHETTY, KALIDAS. Solid-state bioconversion of phenolics from cranberry pomace and role of *Lentinus edodes* β -glucosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 895-900, 2000.

YEOMAN, C. J., HAN, Y., DODD, D., SCHROEDER, C. M., MACKIE, R. I., & CANN, I. K. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. In: **Advances in applied microbiology**. Academic Press, p. 1-55. 2010.

XAVIER, F.D., BEZERRA, G.S., SANTOS, S.F.M., OLIVEIRA, L.S.C., SILVA, F.L.H., SILVA, A.J.O., et al. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. In: **Advances in applied microbiology**. Academic Press, 2010. p. 1-55.

ZANOELO, F. F., DE MORAES, M. D. L. T., TERENCE, H. F., & JORGE, J. A. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 170-176, 2004.

YANG, J., ZHANG, X., YONG, Q., & YU, S.. Three-stage enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover at high substrate concentration. **Bioresource technology**, v. 102, n. 7, p. 4905-4908, 2011.

Ye, Y., Li, X., Cao, Y., Du, J., Chen, S., & Zhao, J. A β -xylosidase hyper-production *Penicillium oxalicum* mutant enhanced ethanol production from alkali-pretreated corn stover. **Bioresource technology**, v. 245, p. 734-742, 2017.

WAGSCHAL, K., FRANQUI-ESPIET, D., LEE, C. C., ROBERTSON, G. H., & WONG, D. W. Cloning, expression and characterization of a glycoside hydrolase family 39 xylosidase from *Bacillus halodurans* C-125. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 146, n. 1-3, p. 69-78, 2008.