

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis

Thais Santos Pinheiro

**PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR *Aspergillus tubingensis* AN1257
EM TORTA DE CAROÇO DE ALGODÃO EM BIORREATOR INSTRUMENTADO**

Diamantina

2019

Thais Santos Pinheiro

**PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR *Aspergillus tubingensis* AN1257
EM TORTA DE CAROÇO DE ALGODÃO EM BIORREATOR INSTRUMENTADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Biocombustíveis.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lílian de Araújo Pantoja

Diamantina

2019

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P654p

Pinheiro, Thais Santos

Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus tubingensis* AN1257 em torta de caroço de algodão em biorreator instrumentado / Thais Santos Pinheiro, 2019.

86 p. : il.

Orientador: Alexandre Soares dos Santos

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. Fungo filamentoso. 2. Fermentação submersa. 3. Holocelulases. 4. Etanol de segunda geração. 5. Hidrólise enzimática. I. Santos, Alexandre Soares dos. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 660.6

THAIS SANTOS PINHEIRO

Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus tubingensis* AN1257 em torta de caroço de algodão em biorreator instrumentado

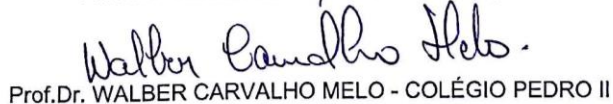
Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM BIOCOMBUSTÍVEIS,
nível de MESTRADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRA EM BIOCOMBUSTÍVEIS

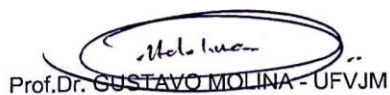
Orientador (a): Prof. Dr. Alexandre
Soares Dos Santos

Data da aprovação : 24/05/2019


Prof. Dr. ALEXANDRE SOARES DOS SANTOS - UFVJM


Prof. Dr.^a VERÔNICA FERREIRA MELO - JFRJ


Prof. Dr. WALBER CARVALHO MELO - COLÉGIO PEDRO II


Prof. Dr. GUSTAVO MOLINA - UFVJM

DIAMANTINA

AGRADECIMENTOS

Uma jornada se finda, e sinto muita gratidão por todo este processo.

Primeiramente, ao Universo que me guiou até a cidade de Diamantina e me fez ser maior. À Diamantina, pelo acolhimento e pelas belas pessoas que fizeram parte dessa caminhada.

Aos meus pais, Alexandre e Socorro, pela compreensão e confiança que me fizeram mais forte. Ao meu irmão Xande, pela orientação e presença. Por todo amor e suporte, eu vos honro.

Ao Ronnie, meu exemplo de docência e de dedicação ao que se ensina e se aprende, gratidão por ser meu compreensivo companheiro, e me ensinar a ser mais humana e cientista.

Ao meu orientador, professor Alexandre Soares, por permitir o início dessa jornada e conduzi-la com dedicação. Por estimular a busca às explicações/respostas. Por toda confiança, muito obrigada! À professora Lílian Pantoja, minha coorientadora, pelas orientações, disponibilidade e dedicação, grata pela amizade e zelo.

A Amandinha, pelo companheirismo e amizade desde o primeiro “sorriso”. Gratidão por todos os aprendizados e crescimento, pela compreensão nos dias de dificuldade, pelas trocas de ideias e ideais. Ao Zé, amigo querido, pelos cafés regados a trocas de concepções e distrações, trazendo leveza a todo o processo, muito grata.

Às meninas do LabBBio, Marina, Myrlene e Fernanda, muito obrigada por toda paciência, solidariedade, troca de conhecimentos e risos. A Rafa, agradeço toda a disponibilidade, questionamentos, ensinamentos e auxílio. Aos amigos Ilva e Lipe, gratidão pelos ensinamentos e bondade.

A Juscilene, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, por facilitar nosso dia-a-dia com toda ajuda, receptibilidade e amizade.

Ao amigo Afonso Bertucci, pela oportunidade e ensinamentos nas fronteiras das bioenergias.

À Estefânia, pela boa convivência, risos e amizade.

Muito obrigada!

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

1 Coríntios 13:2

RESUMO

A produção das holocelulases – enzimas utilizadas no processo produtivo do bioetanol de segunda geração – apresenta desafios com relação à diversificação da matéria-prima utilizada, englobando aspectos que incluem a investigação de microrganismos celulolíticos eficientes, o uso de substratos lignocelulósicos acessíveis e a determinação das condições ideais para a produção em larga escala. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de bioprocessos para a produção de enzimas holocelulolíticas por *Aspergillus tubingensis* AN1257 utilizando torta de caroço de algodão como fonte de carbono, seguido da caracterização e avaliação da eficiência hidrolítica do extrato enzimático. O extrato enzimático foi obtido por fermentação submersa, em biorreator instrumentado, utilizando 1,5 L de meio base contendo 1,25% (m/v) de torta de caroço de algodão e inóculo de *A. tubingensis* AN1257 na concentração de 1×10^5 conídios mL⁻¹. O bioprocessos foi conduzido a 30°C, sem o controle do pH, agitação a 200 rpm, e aeração de 1,3 VVM, durante 192 horas. A influência do pH na produção enzimática foi avaliada em três condições: (i) sem o controle do pH, (ii) pH 5,0 e, (iii) pH 6,0. A influência da concentração inicial da fonte de carbono na produção enzimática foi avaliada por meio da adição de torta de caroço de algodão nas concentrações de 1,25, 1,65, 2,05 e 2,50% (m/v). As atividades enzimáticas para FPases, CMCCase, β-glucosidase e xilanase foram determinadas durante a fermentação, a cada 24 horas. O extrato enzimático bruto (AN1257) também foi avaliado quanto a sacarificação da torta de macaúba, bagaço de cana-de-açúcar, torta de caroço de algodão, torta de girassol e torta de mamona, e comparada ao extrato comercial Cellic® CTec2 e ao extrato Mix, composto por extrato AN1257 e Cellic® CTec2. A fermentação realizada sem o controle do pH resultou em maior atividade enzimática de FPases, β-glucosidase e xilanasas, apresentando valores de 0,073 U mL⁻¹, 3,6 U mL⁻¹ e 19,8 U mL⁻¹, respectivamente. Contudo, a atividade máxima de CMCCase foi obtida em pH 5,0, com valor de 0,093 U mL⁻¹. As atividades máximas de FPases e β-glucosidase foram observadas em meio contendo 1,65% da biomassa, apresentando valores de 0,13 U mL⁻¹ e 4,4 U mL⁻¹, respectivamente. A CMCCase apresentou atividade máxima em 2,05% da biomassa, com valor de 0,092 U mL⁻¹. As xilanasas apresentaram atividade máxima durante o processo fermentativo em 1,25% da biomassa, com valor de 19,8 U mL⁻¹. A sacarificação de materiais lignocelulósicos pelo extrato AN1257 demonstrou resultados promissores, particularmente em biomassas com maior conteúdo hemicelulósico, resultando em hidrolisados com maiores concentrações de açúcar redutor em comparação com o uso de preparado comercial. As condições ótimas avaliadas para a aplicação do extrato enzimático bruto foram temperaturas de 40 a 50°C e valor

de pH 4,0. O desenvolvimento deste trabalho idealiza novas possibilidades tecnológicas para a consolidação da produção de enzimas holocelulolíticas em larga escala, a partir da utilização de resíduos agroindustriais da cadeia bioenergética e da linhagem *A. tubingensis* AN1257, micro-organismo holocelulolítico promissor para a produção de tais enzimas.

Palavras-chave: Fungo filamentoso. Fermentação submersa. Holocelulases. Etanol de segunda geração. Hidrólise enzimática. Resíduos lignocelulósicos.

ABSTRACT

Holocellulases are extensively used in second generation bioethanol production, and their production presents challenges regarding diversification of raw material, comprising aspects that include screening of efficient cellulolytic microorganisms, use of accessible lignocellulosic substrates and determination of ideal conditions for large-scale production. In this sense, this work had the objective of developing a bioprocess for holocellulolytic enzymes production by *Aspergillus tubingensis* AN1257 using cottonseed cake as a carbon source, plus characterization and validation of enzyme extract hydrolytic efficiency. Enzymes were obtained by submerged fermentation in an instrumented bioreactor using 1.5 L of base medium containing 1.25% (w/v) cottonseed cake and inoculum of *A. tubingensis* AN1257 at concentration of 1×10^5 conidia mL^{-1} . Bioprocess was conducted during 192 hours, at 30°C, with no pH control, agitation at 200 rpm, and aeration of 1.3 VVM. pH influence on enzyme production was evaluated under three conditions: (i) with no pH control, (ii) pH 5.0 and (iii) pH 6.0. Influence of initial carbon source concentration on enzyme production was evaluated by addition of 1.25, 1.65, 2.05 and 2.50% (w/v) cottonseed cake to fermentation medium. FPases, CMCase, β -glucosidase and xylanases enzyme activities assays were performed during fermentation, each 24 hours. Crude enzyme extract (AN1257) was also evaluated for saccharification of macauba presscake, sugarcane bagasse, cottonseed cake, sunflower cake and castor bean cake, and then it was compared to commercial extract Cellic® CTec2 and to a blend extract, composed of AN1257 and Cellic® CTec2. Fermentation with no pH control resulted in higher FPases, β -glucosidase and xylanases activities, presenting values of 0.073 U mL^{-1} , 3.6 U mL^{-1} and 19.8 U mL^{-1} , respectively. CMCase presented maximum activity at pH 5.0, with a value of 0.093 U mL^{-1} . FPases and β -glucosidase maximum activities were observed in medium containing 1.65% biomass, presenting values of 0.13 U mL^{-1} and 4.4 U mL^{-1} , respectively. CMCase presented maximum activity of 0.092 U mL^{-1} , in 2.05% biomass. Xylanases maximum activity was 19.8 U mL^{-1} , during fermentation using 1.25% biomass. Lignocellulosic residues saccharification by AN1257 showed promising results, particularly in biomasses with higher hemicellulosic content, resulting in hydrolysates with higher reducing sugar concentrations compared to the use of commercial preparation. Optimal conditions evaluated for application of crude enzyme extract were temperatures range from 40 to 50°C and pH 4.0. The development of this work idealizes new technological possibilities for consolidation of holocellulolytic enzymes production, starting from using agroindustrial residues of bioenergetic chain and the

strain *A. tubingensis* AN1257, a promising holocellulolytic microorganism for such enzymes production.

Keywords: Filamentous fungus. Submerged fermentation. Holocellulases. Second generation ethanol. Enzymatic hydrolysis. Lignocellulosic residues.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Representação do crescimento das hifas fúngicas a partir dos produtos de hidrólise da estrutura polimérica das plantas, gerados pela ação de enzimas hidrolíticas e oxidativas. .25
- Figura 2 – Estrutura do tecido das plantas: (a) células adjacentes; (b) S1, S2, S3 - camadas da parede celular secundária, P – parede primária, ML – lamela média; (c) distribuição da parede secundária.27
- Figura 3 – Estrutura da celulose: fibras, microfibrilas, fibras elementares, regiões cristalinas e amorfas.28
- Figura 4 – Representação esquemática da ação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico na hidrólise da celulose.....29
- Figura 5 – Degradação da xilana por meio da ação de enzimas xilanolíticas: endoxilanasase, β -xilanosidase e enzimas acessórias (α -L-arabinofuranosidase, α -D-glucuronidase e acetilxilanas esterases).....30
- Figura 6 – Monômeros dos fenilpropanóides precursores estruturais da lignina.31
- Figura 7 – Representação de biorreator agitado, utilizado em fermentações submersas.34
- Figura 8 – Fluxograma representativo dos processos utilizados para a produção de enzimas pelo *A. tubingensis* AN1257 e suas respectivas caracterizações bioquímicas.37
- Figura 9 – Comportamento do pH do meio fermentativo (30°C, agitação de 200 rpm e aeração de 1,3 VVM) contendo 1,25% (m/v) de torta de caroço de algodão utilizando *A. tubingensis* AN1257 como agente fermentativo.....55
- Figura 10 – Produção de (A) FPases, (B) CMCCase, (C) β -glucosidase e (D) xilanases por *A. tubingensis* AN1257 durante fermentação submersa conduzida sem controle do pH e em pH 5,0 e 6,0, em meio base contendo 1,25% (m/v) de torta de caroço de algodão como fonte de carbono.57
- Figura 11 - Concentração de proteínas totais determinada durante os ensaios conduzidos em 1,25% de torta de caroço de algodão (1,25, 1,65, 2,05 e 2,50%), em diferentes valores de pH, utilizando *A. tubingensis* AN1257 como agente fermentativo.58
- Figura 12 - Atividade enzimática de (A) FPases, (B) CMCCase, (C) β -glucosidase e (D) xilanases obtidas por fermentação submersa sem o controle do pH, utilizando *A. tubingensis* AN1257

| | |
|---|----|
| como agente fermentativo e diferentes concentrações de torta de caroço de algodão (1,25, 1,65, 2,05 e 2,50 %) como fonte de carbono. | 61 |
| Figura 13 – Concentração de proteínas totais determinada durante os ensaios conduzidos em meios de fermentação contendo diferentes concentrações de torta de caroço de algodão (1,25, 1,65, 2,05 e 2,50%), utilizando <i>A. tubingensis</i> AN1257 como agente fermentativo. | 63 |
| Figura 14 – Produtividade das enzimas FPases, CMCase, β -glucosidase e xilanases determinada através da relação entre as atividades enzimáticas observadas em cada ensaio e a concentração de torta de caroço de algodão utilizada no meio fermentativo como fonte de carbono em diferentes concentrações (1,25, 1,65, 2,05 e 2,50%). | 64 |
| Figura 15 – Termoestabilidade das enzimas holocelulolíticas produzidas por <i>A. tubingensis</i> AN1257 em fermentação submersa em torta de caroço de algodão, incubadas durante 24 horas em pH 5,0. | 68 |
| Figura 16 – Estabilidade das enzimas holocelulolíticas produzidas por <i>A. tubingensis</i> AN1257 em fermentação submersa em torta de caroço de algodão, incubadas durante 24 horas à temperatura de 25°C. | 69 |
| Figura 17 – Efeito da temperatura na atividade das enzimas holocelulolíticas produzidas por <i>A. tubingensis</i> AN1257, por fermentação submersa em meio contendo 1,25% torta de caroço de algodão. | 70 |
| Figura 18 - Efeito do pH na atividade das enzimas holocelulolíticas produzidas por <i>A. tubingensis</i> AN1257 por fermentação submersa em meio contendo 1,25% torta de caroço de algodão. | 71 |
| Figura 19 – Bandas proteicas reveladas para o extrato enzimático produzido por <i>A. tubingensis</i> AN1257 concentrado por <i>salting-out</i> . (A) perfil de proteínas em SDS-PAGE revelado por Azul de Coomassie; (B) zimograma utilizando 0,1% de carboximetilcelulose, revelado por Vermelho Congo. (1) inserção de 20 μ L da amostra; (2) inserção de 30 μ L da amostra. | 73 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Produção de algodão e geração do caroço de algodão no Brasil, 2017/18..... | 32 |
| Tabela 2 – Composição do meio de Mandels e Sternberg (1976), utilizado na obtenção da solução de conídios do <i>A. tubingensis</i> AN1257. | 43 |
| Tabela 3 – Composição do meio fermentativo utilizado no processo de fermentação submersa para produção de enzimas holocelulolíticas por <i>A. tubingensis</i> AN1257. | 44 |
| Tabela 4 – Unidades de atividade enzimática adicionadas aos ensaios de sacarificação dos materiais lignocelulósicos. | 50 |
| Tabela 5 – Composição química da torta de caroço de algodão <i>in natura</i> | 53 |
| Tabela 6 – Máxima atividade enzimática determinada nos extratos enzimáticos produzidos por <i>A. tubingensis</i> AN1257 utilizando 1,25% (m/v) de torta de caroço de algodão no meio de fermentação sem o controle do pH. | 54 |
| Tabela 7 – Atividades enzimáticas de FPases e CMCCase determinadas no extrato enzimático bruto produzido por <i>A. tubingensis</i> AN1257 por fermentação submersa em 1,25% (m/v) de torta de caroço de algodão. | 56 |
| Tabela 8 – Atividades enzimáticas de CMCCase presente no extrato enzimático bruto produzido por <i>A. tubingensis</i> AN1257 por fermentação submersa em 1,25, 1,65, 2,05 e 2,50% (m/v) de torta de caroço de algodão, em 72, 96 e 120 horas de fermentação. | 59 |
| Tabela 9 – Atividades enzimáticas de FPases e CMCCase determinadas em extratos enzimáticos produzidos por fungos filamentosos por fermentação submersa em substratos lignocelulósicos. | 60 |
| Tabela 10 – Atividades xilanolíticas obtidas em 72 horas de fermentação submersa utilizando biomassas lignocelulósicas como substrato e fungos filamentosos como agente fermentativo. | 62 |
| Tabela 11 – Atividades enzimáticas de FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases presentes no extrato enzimático bruto produzido durante a fermentação conduzida em meio contendo 1,65% de torta de caroço de algodão e no extrato enzimático concentrado por <i>salting-out</i> | 72 |
| Tabela 12 - Atividades específicas (U mg ⁻¹) de FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases presentes no extrato enzimático bruto produzido durante a fermentação conduzida em meio | |

contendo 1,65% de torta de caroço de algodão e no extrato enzimático concentrado por *salting-out*..... 72

Tabela 13 – Concentração de glicose e açúcares redutores após 48 horas de sacarificação enzimática das biomassas torta de macaúba, bagaço de cana-de-açúcar, torta de caroço de algodão, torta de girassol e torta de mamona..... 74

Tabela 14 – Composição química das biomassas utilizadas durante o processo de sacarificação: torta de macaúba, bagaço de cana-de-açúcar, torta de caroço de algodão, torta de mamona e torta de girassol..... 75

LISTA DE ABREVIATURAS

1G – primeira geração

2G – segunda geração

AN1257 – extrato enzimático bruto

AR – açúcares redutores

AST – açúcares solúveis totais

ATP – adenosina trifosfato

BDA – meio de cultura constituído por batata, dextrose e ágar

DNS – ácido-3,5-dinitrosalicílico

FDA – fibras solúveis em detergente ácido

FDN – fibras solúveis em detergente neutro

FES – fermentação em estado sólido

FPU – unidade enzimática de FPase

F_{Sm} – fermentação submersa

g FPU⁻¹ – grama por unidade enzimática de FPase

GOD-POD – glicose-oxidase/peroxidase

LabBBio – Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação

NA – não se aplica

U g_{biomassa}⁻¹ - Unidade de atividade enzimática por grama de torta de caroço de algodão adicionada ao meio fermentativo para a produção enzimática

VVM – Volume de ar por volume de meio

SUMÁRIO

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 21 |
| 2. | OBJETIVOS..... | 23 |
| 2.1. | Objetivo Geral | 23 |
| 2.2. | Objetivos Específicos | 23 |
| 3. | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 25 |
| 3.1. | Importância dos fungos filamentosos na produção de bioetanol de segunda geração..... | 25 |
| 3.1.1. | <i>Aspergillus tubingensis</i> AN1257 | 26 |
| 3.2. | Produção de enzimas holocelulolíticas em substratos lignocelulósicos..... | 27 |
| 3.2.1. | <i>Celulose e enzimas celulolíticas</i> | 27 |
| 3.2.2. | <i>Hemicelulose e enzimas hemicelulolíticas</i> | 29 |
| 3.2.3. | <i>Lignina e enzimas hidrolíticas</i> | 31 |
| 3.2.4. | <i>Aproveitamento da torta de caroço de algodão na produção de enzimas holocelulolíticas</i> | 32 |
| 3.3. | Sistemas fermentativos utilizados em bioprocessos de produção enzimática..... | 33 |
| 3.4. | Perspectivas e desafios à produção do bioetanol de segunda geração | 35 |
| 4. | METODOLOGIA | 37 |
| 4.1. | Obtenção e caracterização da torta de caroço de algodão | 38 |
| 4.1.1. | <i>Lipídios totais</i> | 38 |
| 4.1.2. | <i>Umidade</i> | 38 |
| 4.1.3. | <i>Cinzas totais</i> | 39 |
| 4.1.4. | <i>Fibras em detergente ácido</i> | 39 |
| 4.1.5. | <i>Fibras em detergente neutro</i> | 40 |
| 4.1.6. | <i>Celulose</i> | 40 |
| 4.1.7. | <i>Hemicelulose</i> | 41 |
| 4.1.8. | <i>Lignina</i> | 41 |
| 4.1.9. | <i>Açúcares solúveis totais (AST) e amido</i> | 42 |
| 4.2. | Processo fermentativo para a produção de enzimas holocelulolíticas | 42 |
| 4.2.1. | <i>Obtenção e manutenção da cultura de Aspergillus tubingensis AN1257</i> | 42 |
| 4.2.2. | <i>Reativação da cultura e obtenção da suspensão de conídios do A. tubingensis AN1257</i> | 43 |
| 4.2.3. | <i>Produção de enzimas holocelulolíticas por A. tubingensis AN1257</i> | 43 |

| | |
|---|----|
| 4.2.3.1. Determinação da atividade enzimática de FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases | 44 |
| 4.2.3.2. Quantificação de proteínas totais..... | 46 |
| 4.3. Avaliação do efeito da temperatura sobre a estabilidade e a atividade enzimática ... | 46 |
| 4.4. Avaliação do efeito do pH sobre a estabilidade e a atividade enzimática | 47 |
| 4.5. Concentração do extrato enzimático bruto | 47 |
| 4.6. Determinação do perfil de proteínas presentes no extrato enzimático por eletroforese | 48 |
| 4.7. Determinação do perfil de celulases secretadas por zimograma | 49 |
| 4.8. Eficiência hidrolítica do extrato enzimático bruto na sacarificação de biomassas lignocelulósicas | 50 |
| 4.9. Análise estatística | 51 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 53 |
| 5.1. Caracterização química da torta de caroço de algodão..... | 53 |
| 5.2. Efeito do pH na produção das enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases por <i>A. tubingensis</i> AN1257 | 53 |
| 5.3. Efeito da concentração inicial da fonte de carbono na produção das enzimas FPases, CMCases, β -glucosidases e xilanases por <i>A. tubingensis</i> AN1257 | 59 |
| 5.4. Influência da temperatura e do pH sobre a estabilidade e a atividade das enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases | 66 |
| 5.5. Concentração das enzimas do extrato enzimático por <i>salting-out</i> | 72 |
| 5.6. Perfil de proteínas e de celulases presentes no extrato enzimático..... | 73 |
| 5.7. Eficiência hidrolítica do extrato enzimático bruto na sacarificação de biomassas lignocelulósicas | 74 |
| 6. CONCLUSÃO | 77 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 79 |

1. INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas holocelulolíticas na hidrólise de materiais lignocelulósicos para liberação de açúcares fermentescíveis consiste no maior gargalo a solidificação do processo produtivo do bioetanol de segunda geração (2G), devido ao alto custo de produção destas enzimas com fins comerciais. As alternativas que viabilizam a geração de etanol 2G em larga escala incluem a produção enzimática *on-site*, isto é, realizada na planta industrial em que as enzimas serão aplicadas, mediante a diversificação dos resíduos lignocelulósicos utilizados como matéria-prima e das linhagens de micro-organismos produtores de holocelulases.

O bioetanol consiste em uma fonte renovável de energia sustentável com potencial para substituir os combustíveis fósseis na matriz energética mundial, tornando-se, assim, alvo das políticas energéticas globais nas últimas décadas. O bioetanol de primeira geração (1G), produzido a partir de biomassas amiláceas e sacaríneas, envolve tecnologias produtivas completamente estabelecidas, contudo apresenta aspectos desfavoráveis no que tange a competição com culturas alimentícias e a demanda por extensa área agricultável. Desta forma, o etanol 2G, produzido a partir de resíduos lignocelulósicos, mostra-se como alternativa na produção de biocombustíveis avançados, pois além de não competir com culturas alimentares, dispõe de menor custo associado às matérias-primas, e de elevada produtividade sem o aumento da área cultivada (DUTTA; DAVEREY; LIN, 2014; FLORÊNCIO; BADINO; FARINAS, 2017).

Os extratos enzimáticos comerciais, utilizados na produção de etanol 2G, consistem em coquetéis estáveis com elevada eficiência e atividade específica, resultando em alto rendimento hidrolítico na transformação de biomassas específicas, particularmente bagaço de cana-de-açúcar e palha de milho, em açúcares fermentescíveis. No entanto, sua produção envolve etapas dispendiosas, financeira e energeticamente, incluindo os processos de concentração, purificação e transporte das enzimas à indústria, o que inviabiliza a geração econômica e sustentável de bioetanol 2G. Neste contexto, a produção industrial de enzimas *on-site* tem despertado interesse, visto que seu processo produtivo utiliza resíduos agroindustriais com baixo valor agregado, bem como, envolve menor número de etapas na produção e dispensa o transporte até a indústria. Contudo, a produção enzimática *on-site* não fornece rendimento hidrolítico satisfatório, dependendo, ainda, da determinação das condições e fatores tecnológicos para a consolidação do bioprocessos.

O estabelecimento das condições ideais do processo fermentativo, bem como, a seleção de micro-organismo celulolítico e do material lignocelulósico empregado no bioprocessos são fatores primordiais para a viabilidade da produção enzimática *on-site*. Os

resíduos lignocelulósicos provenientes da produção do biodiesel sobressaem como alternativa, possibilitando a integração das cadeias bioenergéticas. A prospecção de micro-organismos holocelulolíticos evidenciou os fungos filamentosos, dentre eles o gênero *Aspergillus*, como excelentes produtores extracelulares de celulasas e hemicelulasas em biomassa lignocelulósica. A espécie *A. tubingensis* tem demonstrado resultados interessantes na produção destas enzimas, entretanto os trabalhos desenvolvidos com a espécie são limitados, o que expõe a carência de estudos com o micro-organismo, particularmente com relação aos mecanismos de crescimento e de produção enzimática.

Desta forma, este trabalho pretende contribuir para a consolidação do processo produtivo do bioetanol 2G, mediante o aumento da escala de bioprocessos de produção de holocelulasas desenvolvido anteriormente, utilizando a linhagem *A. tubingensis* AN1257 como agente fermentativo e a torta de caroço de algodão como fonte de carbono. O desenvolvimento deste estudo foi pautado na necessidade de fortalecimento dos elos da cadeia produtiva dos biocombustíveis, proposto pelas políticas públicas, tais como o RenovaBio, iniciativa que reconhece a eficiência dos biocombustíveis de segunda geração no aproveitamento da fração energética da biomassa.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de bioprocesso para a produção de enzimas holocelulolíticas por fermentação submersa, bem como a caracterização do extrato enzimático e o estudo da eficiência hidrolítica das enzimas.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial da linhagem silvestre *Aspergillus tubingensis* AN1257 em produzir as enzimas FPases (celulases totais), CMCCase, β -glucosidase e xilanases por fermentação submersa, em biorreator instrumentado, utilizando 1,5 L de meio fermentativo contendo torta de caroço de algodão como fonte de carbono;
- Avaliar o efeito do pH na produção das enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases por *A. tubingensis* AN1257;
- Avaliar o efeito da concentração inicial da torta de caroço de algodão, utilizada como fonte de carbono, na produção das enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases por *A. tubingensis* AN1257;
- Avaliar a influência da temperatura e do pH na estabilidade das enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases produzidas por *A. tubingensis* AN1257;
- Determinar a temperatura e o pH ótimos de reação das enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases produzidas por *A. tubingensis* AN1257;
- Determinar o perfil das enzimas celulases presentes no extrato enzimático produzido por *A. tubingensis* AN1257 por zimograma;
- Avaliar o potencial hidrolítico do extrato enzimático produzido por *A. tubingensis* AN1257 na sacarificação dos resíduos lignocelulósicos: torta de macaúba, bagaço de cana-de-açúcar, torta de caroço de algodão, torta de girassol e torta de mamona.

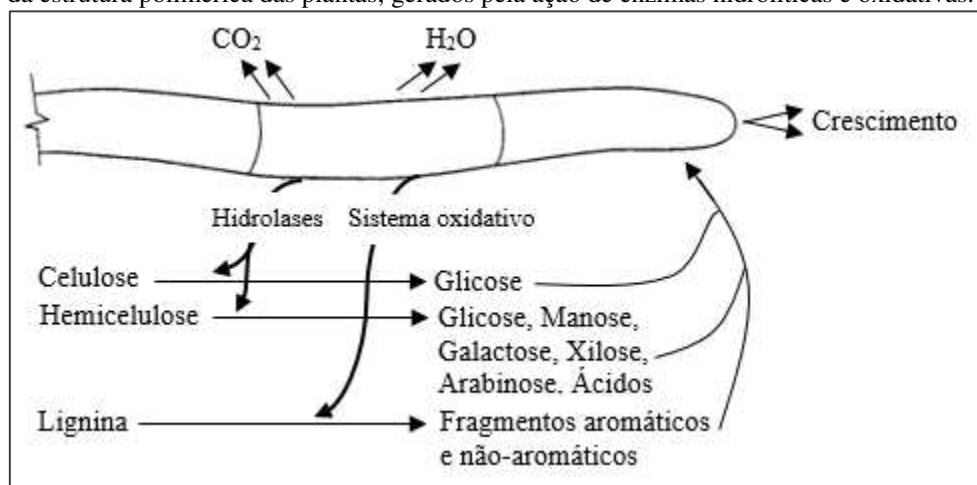
3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Importância dos fungos filamentosos na produção de bioetanol de segunda geração

Os fungos filamentosos são micro-organismos versáteis com a capacidade de crescer em uma variedade de substratos (FERREIRA *et al.*, 2016). Devido à rica disponibilidade de biomassa de plantas na natureza, estes micro-organismos obtêm sua energia, prioritariamente, da degradação de carboidratos, incluindo materiais lignocelulósicos. Evolutivamente, são adaptados à utilização de celulose e hemicelulose, o que os tornam excelentes produtores de enzimas degradadoras da parede celular das plantas, particularmente celulases e hemicelulases, utilizadas na hidrólise de biomassas para a liberação de açúcares fermentescíveis, os quais são utilizados na produção de bioetanol 2G (LYND *et al.*, 2002).

Os gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Aspergillus*, dentre outros, degradam a celulose, a hemicelulose e a lignina extracelularmente, produzindo as enzimas necessárias diretamente no meio de crescimento. Esta característica intrínseca aos fungos filamentosos é de grande interesse industrial, pois elimina a necessidade de rompimento da célula em um processo produtivo (SANTOS *et al.*, 2016). A degradação extracelular ocorre devido ao desenvolvimento morfológico das hifas fúngicas, as quais promovem seu crescimento apical a partir da absorção de produtos provenientes da hidrólise de substratos por enzimas lignocelulósicas secretadas, não complexadas a celulose, representado na Figura 1.

Figura 1 – Representação do crescimento das hifas fúngicas a partir dos produtos de hidrólise da estrutura polimérica das plantas, gerados pela ação de enzimas hidrolíticas e oxidativas.



Fonte: KIRK; CULLEN, 1998. Adaptado.

A espécie *Trichoderma reesei* sobressai entre as espécies fúngicas estudadas devido à alta eficiência na produção extracelular de celulases e hemicelulases, sendo largamente aplicada na produção de coquetéis enzimáticos utilizados na geração de etanol 2G. Contudo, a

utilização do complexo celulolítico produzido por esta espécie apresenta limitações devido à baixa expressão de β -glucosidases, enzima-chave para a completa hidrólise da celulose (YAO *et al.*, 2015). Tal deficiência pode ser contornada através do adequado equilíbrio na proporção das enzimas celulolíticas presentes no coquetel, o qual pode ser alcançado através da aplicação de ferramentas de mutações gênicas ao micro-organismo ou pela combinação do seu extrato enzimático com extratos provenientes de outros fungos celulolíticos.

O gênero *Aspergillus* consiste em um grupo de fungos com grande número de espécies, patogênicas ou com grande relevância industrial, a citar o *A. niger* e *A. tubingensis*. Estes micro-organismos tem sido amplamente estudados devido à relevância dos seus metabólitos, os quais são utilizados para a produção de antibióticos, ácidos orgânicos, medicamentos e enzimas (FERREIRA *et al.*, 2016; SAMSON *et al.*, 2014). Além disso, o gênero demonstra potencialidade para a produção de xilanases e celulases, especialmente as β -glucosidases (AHMED *et al.*, 2015; JUNIOR *et al.*, 2014; ORIENTE *et al.*, 2015).

3.1.1. *Aspergillus tubingensis* AN1257

A espécie *Aspergillus tubingensis*, classificada no filo Ascomycota e classe Eurotiomycetes, foi descrita pela primeira vez por Raou Mosseray (BATHOORN *et al.*, 2013; MOSSERAY, 1934). De acordo com Vries *et al.* (2017) e Vries e Visser (2001), o *A. tubingensis* apresenta a mesma linhagem ancestral que o *A. niger*, *Aspergillus* section *Nigri*, uma espécie promissora na produção de enzimas holocelulolíticas.

Estudos relacionados à biodiversidade de espécies do gênero *Aspergillus* demonstraram que o *A. tubingensis* não produz ocratoxina, uma toxina capaz de afetar a saúde humana e animal (CHIOTTA *et al.*, 2013; CHO *et al.*, 2016; HORN *et al.*, 2013). Além disso, outros estudos demonstraram que a espécie é capaz de produzir diversas enzimas, incluindo glicoamilases, oxidases e enzimas do complexo pectinase (MANGER-JACOB *et al.*, 2005; NIVALA *et al.*, 2013; ROZEBOOM *et al.*, 2013), o que a torna importante para bioprocessos da indústria química e alimentícia. As pesquisas relacionadas à produção de enzimas aplicáveis aos processos produtivos de biocombustíveis por *A. tubingensis* são escassas, contudo, Choque *et al.* (2018) demonstraram que a espécie representa uma excelente alternativa para a produção de metabólitos através da fermentação em escala industrial.

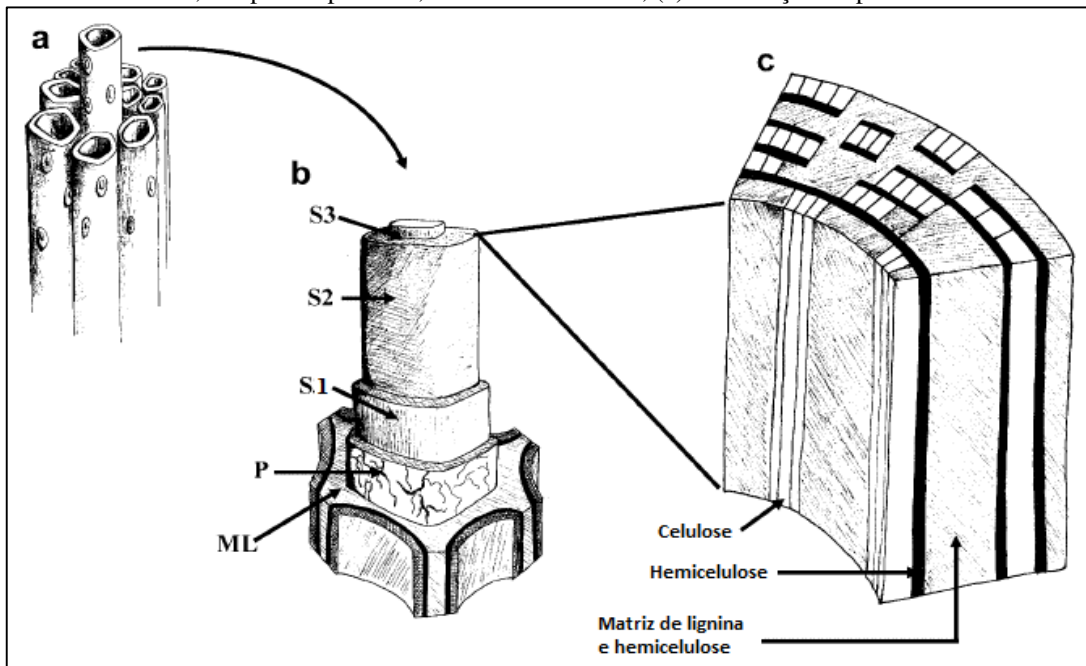
O potencial celulolítico da espécie foi analisado por Vries *et al.* (2017), mediante o cultivo do *A. tubingensis* em biomassas lignocelulósicas. Os autores observaram que a expressão dos genes relacionados à degradação de polissacarídeos da parede celular das plantas foi superior à expressão gênica de enzimas degradadoras de outros açúcares (VRIES *et al.*,

2017). Em outros trabalhos, Santos (2015) e Santos (2013) desenvolveram estudos com o objetivo de selecionar micro-organismos produtores de enzimas holocelulolíticas em substratos lignocelulósicos. Os autores notaram que a linhagem *A. tubingensis* AN1257 produzira os maiores níveis de atividade de celulases e xilanases dentre as linhagens utilizadas, o que ressalta a relevância da espécie para a produção de enzimas holocelulolíticas.

3.2. Produção de enzimas holocelulolíticas em substratos lignocelulósicos

A expressão gênica das holocelulases nos fungos filamentosos é induzida pela composição dos materiais lignocelulósicos, particularmente, pelo conteúdo de carboidratos estruturais presentes na parede celular das plantas. A composição da parede celular das biomassas, representada na Figura 2, varia de acordo com a espécie, apresentando teor de celulose de 40,6 a 51,2%, hemiceluloses de 28,5 a 37,2%, e lignina de 13,6 a 28,1% (PAULY; KEEGSTRA, 2008).

Figura 2 – Estrutura do tecido das plantas: (a) células adjacentes; (b) S1, S2, S3 - camadas da parede celular secundária, P – parede primária, ML – lamela média; (c) distribuição da parede secundária.



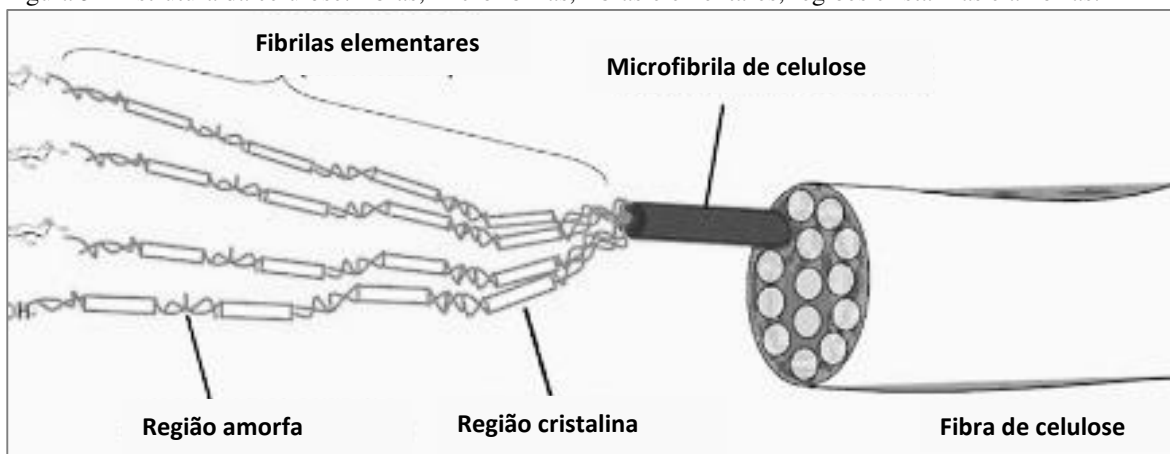
Fonte: PÉREZ *et al.*, 2002. Adaptado.

3.2.1. Celulose e enzimas celulolíticas

A celulose consiste no componente predominante da parede celular das plantas e no biopolímero mais abundante da natureza, fato que a torna um dos principais alvos de pesquisas em biocombustíveis renováveis. O polissacarídeo, ilustrado na Figura 3, é um polímero linear, formado por conjunto de microfibrilas, as quais se organizam em arranjos

cristalinos com 15 a 40 cadeias glicosídicas, compostas por até 25.000 unidades repetitivas de D-glucopiranosose, conectadas por ligações glicosídicas β -1,4 (JUTURU; WU, 2014). A estrutura da celulose apresenta regiões cristalinas e amorfas aleatoriamente, sendo as primeiras altamente organizadas e compactas, estabilizadas por ligações de hidrogênio, conferindo resistência à degradação, e as segundas, cadeias não-organizadas, susceptíveis à degradação enzimática e à absorção de água (PÉREZ *et al.*, 2002).

Figura 3 – Estrutura da celulose: fibras, microfibrilas, fibras elementares, regiões cristalinas e amorfas.



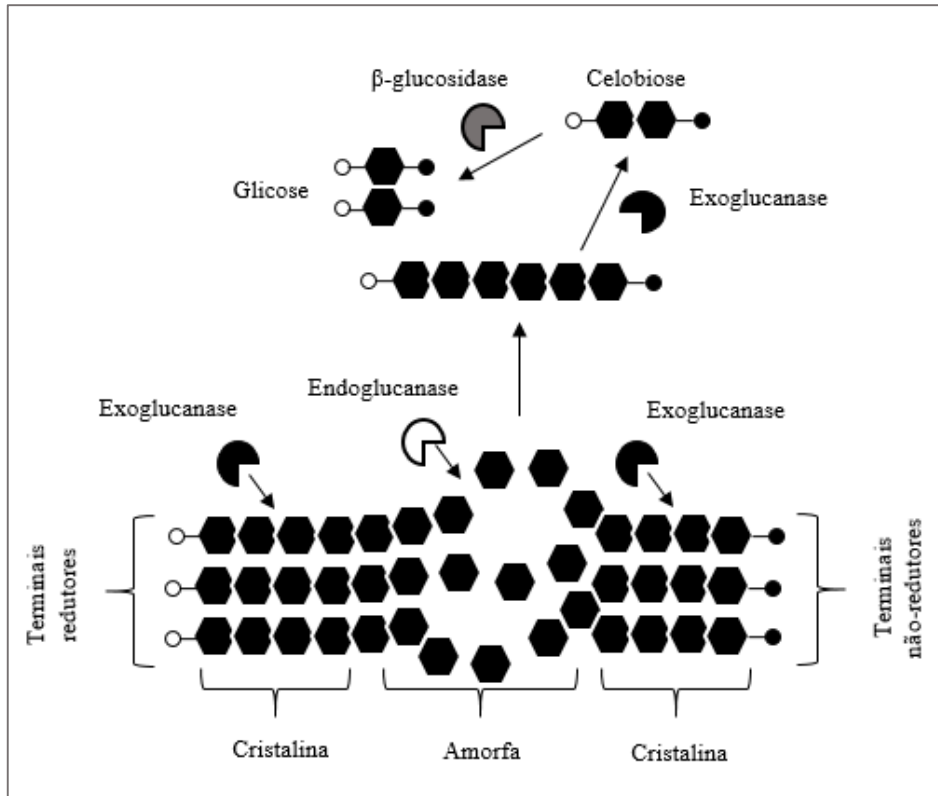
Fonte: LAVOINE *et al.*, 2012. Adaptado.

A degradação enzimática da celulose em monômeros de açúcares por fungos filamentosos está condicionada à produção extracelular de um conjunto de enzimas, denominadas celulasas. As enzimas celulolíticas, tradicionalmente divididas em endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases, estão inseridas no grupo de enzimas glicosil hidrolases (EC 3.2.1) e classificadas em diversas famílias. A classificação destas enzimas sugere a existência de diferentes estruturas enzimáticas com especificidade para um mesmo substrato, decorrente da evolução estrutural associada à heterogeneidade dos polissacarídeos de biomassa das plantas (LYND *et al.*, 2002).

As enzimas do complexo celulolítico agem sinergisticamente na hidrólise das ligações glicosídicas (β -1,4), conforme ilustrado na Figura 4. As CMCases (endo-1,4- β -glucanases, EC 3.2.1.4) hidrolisam as ligações glicosídicas internas da celulose aleatoriamente, a partir da ligação de um módulo não-catalítico à região amorfa da celulose. A ligação do módulo não-catalítico forma um complexo alinhado entre o substrato e o domínio catalítico enzimático, o qual cliva as pontes de hidrogênio, permitindo a liberação de novos terminais redutores e não-redutores (ARANTES; SADDLER, 2010). As exoglucanases ou celobiohidrolases (exo-1,4- β -glucanases, EC3.2.1.91) são as únicas enzimas capazes de

degradar a celulose cristalina. Estas enzimas agem nos terminais existentes ou gerados pelas CMCase, liberando moléculas de celobiose, a qual é degradada em duas moléculas de glicose pela ação das β -glucosidases (EC 3.2.1.21) (ARANTES; SADDLER, 2010).

Figura 4 – Representação esquemática da ação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico na hidrólise da celulose.



Fonte: SAJITH *et al.*, 2016. Adaptado.

A atuação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico permite a completa degradação da celulose, contudo, a proporção das enzimas presentes em um extrato enzimático para se atingir a sinergia máxima não é conhecida, visto que o processo de degradação da celulose é bastante complexo e as enzimas celobiohidrolases e β -glucosidases são inibidas por retroalimentação (ZHANG; ZHANG, 2013).

3.2.2. Hemicelulose e enzimas hemicelulolíticas

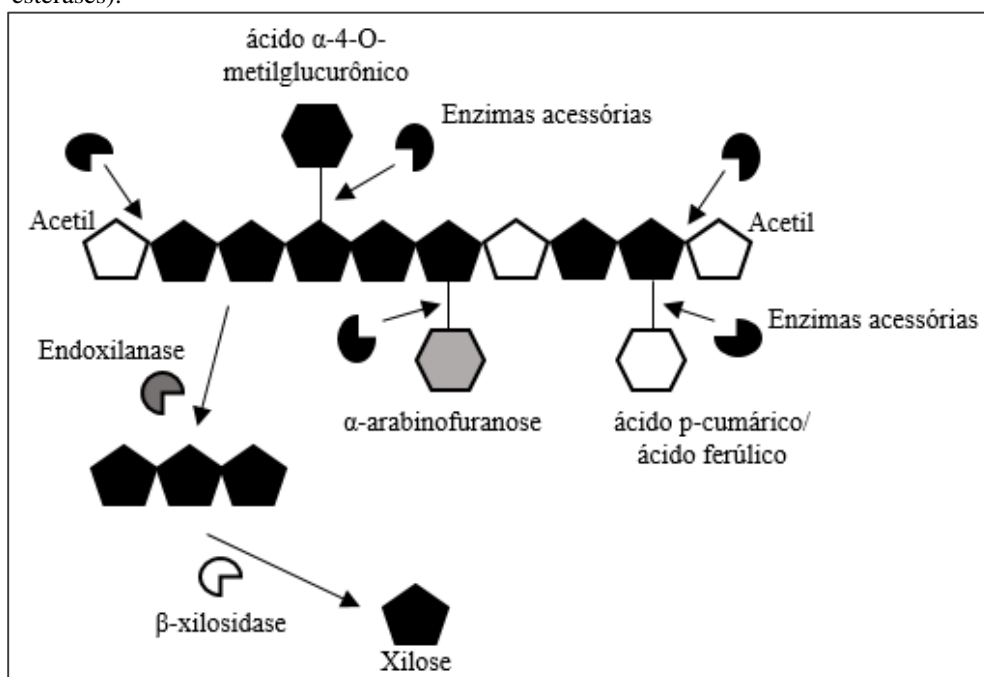
As moléculas de hemicelulose possuem estrutura amorfa e hidrofílica, apresentando menor número de resíduos que a molécula de celulose, de 150 a 200 monômeros de açúcares. Entretanto, sua estrutura é bastante complexa, apresentando composição variada de acordo com cada espécie, incluindo polissacarídeos de xilana, xiloglucana, glucomanana, galactoglucomanana e arabinogalactana, com considerável grau de ramificações em suas

cadeias (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; KIRK; CULLEN, 1998; YANG; WYMAN, 2008).

A xilana, heteropolímero composto principalmente por unidades de D-xilopiranosil unidos por ligações β -1,4, consiste no segundo polissacarídeo natural mais abundante na natureza e no componente majoritário da hemicelulose (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). A cadeia principal da xilana pode apresentar substituições formando grupos laterais que influenciam sua solubilidade e susceptibilidade à hidrólise enzimática. Os grupos substitutos da cadeia lateral variam de acordo com a espécie e incluem os compostos ácido 4-O-metilglucurônico, arabinose, acetil, ácido ferúlico e cumárico (CHIMPHANGO; ZYL; GORGENS, 2012).

As enzimas xilanolíticas, também inseridas no grupo de enzimas das hidrolases (EC 3.), agem sinergisticamente na hidrólise do material lignocelulósico, degradando a complexa estrutura da xilana (LI *et al.*, 2015; PÉREZ *et al.*, 2002). O complexo xilanolítico, representado na Figura 5, compreende as enzimas acessórias e as xilanases, divididas em endoxilanases (endo- β -1,4-D-xilano xilanohidrolases, EC 3.2.1.8) e β -xilosidases (exo- β -1,4-xilosidases, EC 3.2.1.37).

Figura 5 – Degradação da xilana por meio da ação de enzimas xilanolítica: endoxilanase, β -xilosidase e enzimas acessórias (α -L-arabinofuranosidase, α -D-glucuronidase e acetilxilana esterases).



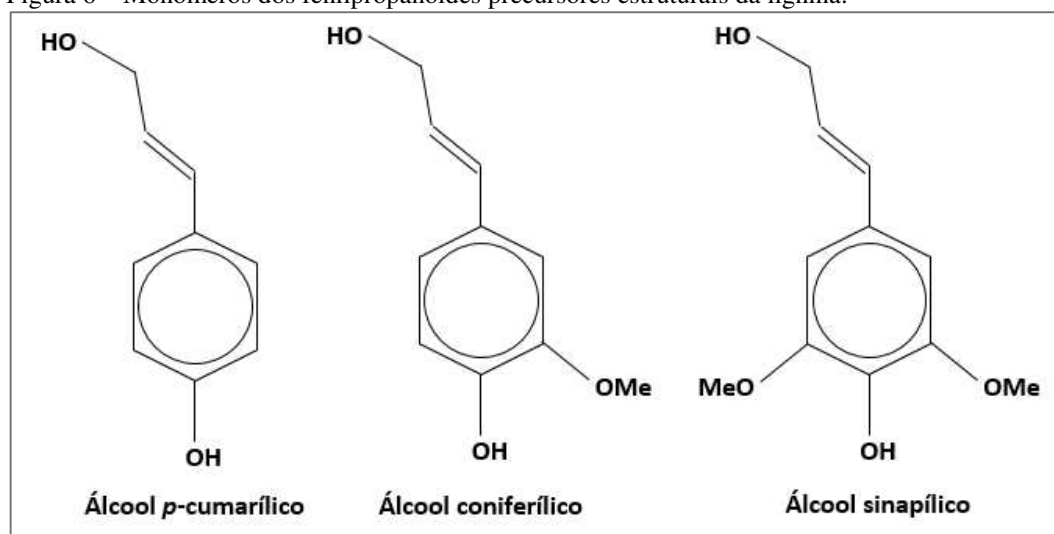
Fonte: Próprio autor.

As endoxilanas despolimerizam a cadeia da xilana de forma aleatória, liberando oligossacarídeos de cadeias curtas, no entanto, posteriormente, podem hidrolisar os oligossacarídeos formados em xilose. As β -xilosidases hidrolisam oligossacarídeos curtos em xilose, o que as tornam enzimas de extrema importância na degradação das xilanas pois mitigam a inibição das endoxilanas por retroalimentação (LI *et al.*, 2017; MANDAL, 2015). As enzimas acessórias (α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α -D-glucuronidase (EC3.2.1.131) e acetilxilana esterases (EC 3.1.1.72)) hidrolisam os grupos laterais da cadeia da xilana, auxiliando a atuação das xilanas, uma vez que a presença destes grupos podem impedir a formação do complexo enzima-substrato, diminuindo a eficiência xilanolítica (LI *et al.*, 2017).

3.2.3. Lignina e enzimas hidrolíticas

A lignina é um heteropolímero amorfo, hidrofóbico, com estrutura tridimensional altamente ramificada, constituída por várias unidades de fenilpropanos (FIG. 6), a qual confere suporte estrutural à planta e resistência a micro-organismos e ao estresse oxidativo. A degradação da lignina ocorre pela ação das enzimas peroxidases e lacases e, diferente da celulose e hemicelulose, não resulta em carboidratos assimiláveis pelos fungos filamentosos (KIRK; CULLEN, 1998). Contudo, sua hidrólise é de extrema importância visto que a recalcitrância originada da sua ligação com estes polissacarídeos dificulta a degradação da biomassa (PÉREZ *et al.*, 2002).

Figura 6 – Monômeros dos fenilpropanóides precursores estruturais da lignina.



Fonte: Próprio autor.

3.2.4. Aproveitamento da torta de caroço de algodão na produção de enzimas holocelulolíticas

A seleção do substrato lignocelulósico utilizado como fonte de carbono durante a fermentação consiste em importante etapa para a produção enzimática, uma vez que a matéria orgânica utilizada oferece os nutrientes necessários ao crescimento dos fungos e, induz a expressão das celulasas e xilanases (HANSEN *et al.*, 2015; YOON *et al.* 2014). Os resíduos lignocelulósicos provenientes da cadeia do biodiesel (tortas de dendê, algodão, macaúba, girassol, mamona e pinhão-manso) possuem potencial de utilização na produção de enzimas por fungos filamentosos, devido ao conteúdo de celulose e hemicelulose (SANTOS, 2015). Neste contexto, em estudos realizados com fungos filamentosos, Santos (2013) e Santos (2015) verificaram que a torta de caroço de algodão apresenta potencial para utilização na produção de enzimas holocelulolíticas, ressaltando os benefícios de utilizar este subproduto da cadeia energética.

O algodoeiro (*Gossypium spp*) é amplamente cultivado para a extração das fibras, que possuem alto valor comercial na indústria têxtil. O Brasil é o quarto maior produtor de algodão do mundo, com previsão de expansão na área plantada, apresentando 1.174.700 hectares plantados, nos quais são produzidos 5.012.900 toneladas de algodão (TAB. 1) (CONAB, 2019). A ampliação no cultivo do algodão geraria maior quantidade de resíduos e um possível problema ambiental, visto que os métodos de disposição dos resíduos requerem grande área e oferecem alto risco de contaminação do solo por pesticidas (HASSALL AND ASSOCIATES, 2005), fazendo-se necessária a exploração de novas alternativas para o aproveitamento destes rejeitos.

Tabela 1 – Produção de algodão e geração do caroço de algodão no Brasil, 2017/18.

| Regiões | Algodão | | Produção de caroço de algodão (mil t) |
|---------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|
| | Área plantada (mil ha) | Produção (mil t) | |
| Norte | 7,6 | 30,7 | 18,8 |
| Nordeste | 295,2 | 1.363,7 | 817,5 |
| Centro-Oeste | 841,2 | 3.497,6 | 2.098,0 |
| Sudeste | 30,7 | 120,9 | 72,8 |
| Sul | - | - | - |
| Brasil | 1.174,7 | 5.012,9 | 3.007,1 |

Fonte: CONAB, 2019. Adaptado.

Além das fibras, a planta do algodão disponibiliza o caroço, que vem ganhando espaço no mercado devido às diversas possibilidades de utilização como suplementação na alimentação humana, animal e na produção do biodiesel a partir da extração do óleo. O óleo do

caroço de algodão apresenta excelente balanço de ácidos graxos e baixa acidez, características relevantes para a indústria do biodiesel, contudo representa apenas 3% da matéria-prima utilizada na produção de biodiesel no Brasil (ABRAPA, 2012). A torta e o farelo do caroço de algodão, subprodutos da extração do óleo do caroço, contêm alta quantidade de proteínas, o que as tornam interessantes para a alimentação animal, entretanto sua utilização ainda é limitada devido ao conteúdo de gossipol, um alcaloide tóxico a monogástricos e poligástricos (ABRAPA, 2012).

Desta forma, a utilização da torta de caroço de algodão na produção de enzimas holocelulolíticas utilizadas na cadeia do bioetanol surge como alternativa no aproveitamento deste resíduo, uma vez que a biomassa apresenta conteúdo significativo de fibras para tal finalidade: 46,96% de fibras em detergente neutro (FDN) e 28,69% de fibras de detergente ácido (FDA) (CARRERA *et al.*, 2012). Ademais, a utilização de resíduos provenientes da produção do biodiesel fortalece a integração e a competitividade da cadeia bioenergética, processo estritamente necessário à consolidação do mercado dos biocombustíveis.

A utilização do algodão de forma completa e integrada - produção de fibras, biodiesel, bioetanol e suplementação animal - cria processos sustentáveis com baixa geração de resíduos e emissão de gases do efeito estufa, um modelo econômico-ambiental desejado. Contudo, os estudos para a otimização da produção de biocombustíveis a partir do algodão ainda são modestos em relação a outros resíduos agrícolas, tais como bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, dentre outros (McINTOSH *et al.*, 2014), sendo a inserção da biomassa como matéria-prima na cadeia bioenergética uma forma de valorização da cultura.

3.3. Sistemas fermentativos utilizados em bioprocessos de produção enzimática

As estratégias de melhoria na produtividade e atividade específica das enzimas incluem a definição das variáveis utilizadas durante o crescimento dos fungos filamentosos em biorreatores e a utilização de sistemas tecnológicos específicos. De acordo com Hansen *et al.* (2015), as condições ótimas estabelecidas em um sistema de fermentação podem não conferir produtividade máxima a outro sistema, porém, algumas estirpes podem ser adaptadas especificamente para o tipo de fermentação desejada.

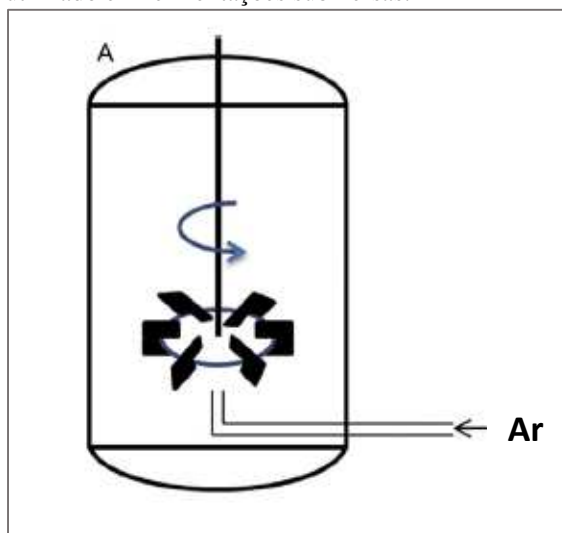
A fermentação por estado sólido (FES) utiliza substrato em ausência, ou próximo à ausência, de água livre, com umidade suficiente para suportar o crescimento dos fungos, sendo conduzida em suporte inerte impregnado pelo meio de crescimento ou diretamente em material orgânico natural. A quantidade de água constitui parâmetro chave na condução do processo

fermentativo, visto que é responsável pela transferência de massa de água e solutos através da parede celular dos micro-organismos (PANDEY, 2003).

As principais vantagens na utilização do processo de FES consistem na menor demanda energética e hídrica, bem como na aplicação de condições fermentativas similares ao hábitat natural dos fungos filamentosos, o que permite a produção de elevada quantidade de enzimas com baixo custo operacional (SINGHANIA *et al.*, 2010). No entanto, a tecnologia apresenta obstáculos ao estabelecimento em larga escala, tais como: a possibilidade de formação de aglomerados, a dificuldade na transferência de calor e massa, o reduzido controle de contaminações, e a dispendiosa purificação do produto (HANSEN *et al.*, 2015). As desvantagens oferecidas pela FES podem ser suplantadas pela fermentação submersa (FSm), utilizando substrato na presença de excesso de água (HANSEN *et al.*, 2015).

A FSm conduzida em larga escala utiliza, geralmente, biorreator do tipo agitado (FIG. 7), o qual permite o controle dos parâmetros que influenciam o crescimento dos fungos filamentosos e a produtividade enzimática, tais como temperatura de fermentação, agitação, aeração, pH do meio, espuma e disponibilidade de nutrientes (SINGHANIA *et al.*, 2010). O processo fermentativo submerso resulta em produtividade enzimática inferior à FES, entretanto a tecnologia tornou-se mais vantajosa do ponto de vista industrial devido ao melhor monitoramento das condições fermentativas. Além disso, a FSm permite a recuperação das celulasas purificadas de forma simplificada (HANSEN *et al.*, 2015), corroborando para a utilização de tal tecnologia.

Figura 7 – Representação de biorreator agitado, utilizado em fermentações submersas.



Fonte: HANSEN *et al.*, 2015. Adaptado.

3.4. Perspectivas e desafios à produção do bioetanol de segunda geração

O bioetanol de segunda geração (2G) desempenha papel importante no combate à crise energética global, assim como, aos impactos ambientais decorrentes da utilização do petróleo (ADITIYA *et al.*, 2016; LIAO *et al.*, 2015a). A inserção do biocombustível na matriz energética nacional promove mudanças nos processos de produção de bioetanol no Brasil, uma vez que as tecnologias envolvidas na produção de etanol de primeira geração (1G) apresentam-se estabelecidas e próximas dos seus limites teóricos (NYKO *et al.*, 2010; SIMS; TAYLOR; SADDLER, 2008). O processo produtivo e o mercado do etanol 1G encontram-se solidificados e envolvem poucos riscos (LENNARTSSON; ERLANDSSON; TAHERZADEH, 2014), entretanto, o suprimento de matéria-prima pode ser fator limitante considerando a competição com culturas alimentares e a projeção de aumento na demanda energética do país (EPE, 2017).

O processo produtivo do etanol 2G não apresenta limitações com relação ao suprimento de biomassas, contudo ainda apresenta obstáculos. A produção do biocombustível nas usinas existentes (Bioflex e Raízen, no Brasil e Poet-DSM, nos Estados Unidos) foi comprometida pela falta de pesquisas prévias, necessitando maiores investimentos tecnológicos para a melhoria do funcionamento dos equipamentos e diminuição dos custos de alguns insumos (MARQUES, 2018). Neste cenário, existe a necessidade de redução dos custos associados a sua produção, e de melhorias na performance das rotas de conversão hidrolítica e fermentativa.

A redução dos custos associados à produção das enzimas holocelulolíticas e ao transporte da matéria-prima consiste no principal entrave econômico à solidificação da produção do etanol 2G. A produção enzimática depende do domínio das condições fermentativas ideais utilizadas em bioprocessos *on-site* (FERREIRA *et al.*, 2016, LIAO *et al.*, 2015a). Ao passo que, o transporte da matéria-prima lignocelulósica pode onerar o custo do processo produtivo, impossibilitando a competitividade econômica do etanol 2G com a cadeia de suprimentos do etanol 1G (CHENG; TIMILSINA, 2011).

O aperfeiçoamento da eficiência hidrolítica e fermentativa do processo de produção do etanol 2G depara-se com a recalcitrância do substrato e com a alta concentração de pentoses proveniente da hidrólise de materiais lignocelulósicos. A recalcitrância consiste em barreira física originada pela estrutura lignocelulósica da parede celular, podendo ser superada através da utilização de etapas de pré-tratamentos aplicadas às biomassas (CHENG; TIMILSINA, 2011; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

As tecnologias de transformação dos açúcares fermentescíveis em etanol envolvem a utilização de micro-organismos fermentadores, com destaque a levedura *Saccharomyces*

cerevisiae, espécie eficiente na fermentação de hexoses. Todavia, as rotas metabólicas deste micro-organismo não utilizam as pentoses, provenientes da hemicelulose, o que diminui o rendimento do processo de fermentação dos açúcares. Dentre as possíveis soluções, pesquisadores salientam a utilização de micro-organismos fermentadores de pentoses, tal como *Scheffersomyces stipitis*, contudo, estes micro-organismos geralmente são sensíveis aos inibidores formados, incluindo o próprio etanol (AGBOBO *et al.*, 2007). Ademais, a utilização das pentoses provenientes da hidrólise dos materiais lignocelulósicos pode ser realizada mediante o uso de linhagens de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas para a transformação de pentoses (LENNARTSSON; ERLANDSSON; TAHERZADEH, 2014), ou ainda, na produção de outros compostos além do etanol (MADHAVAN *et al.*, 2012).

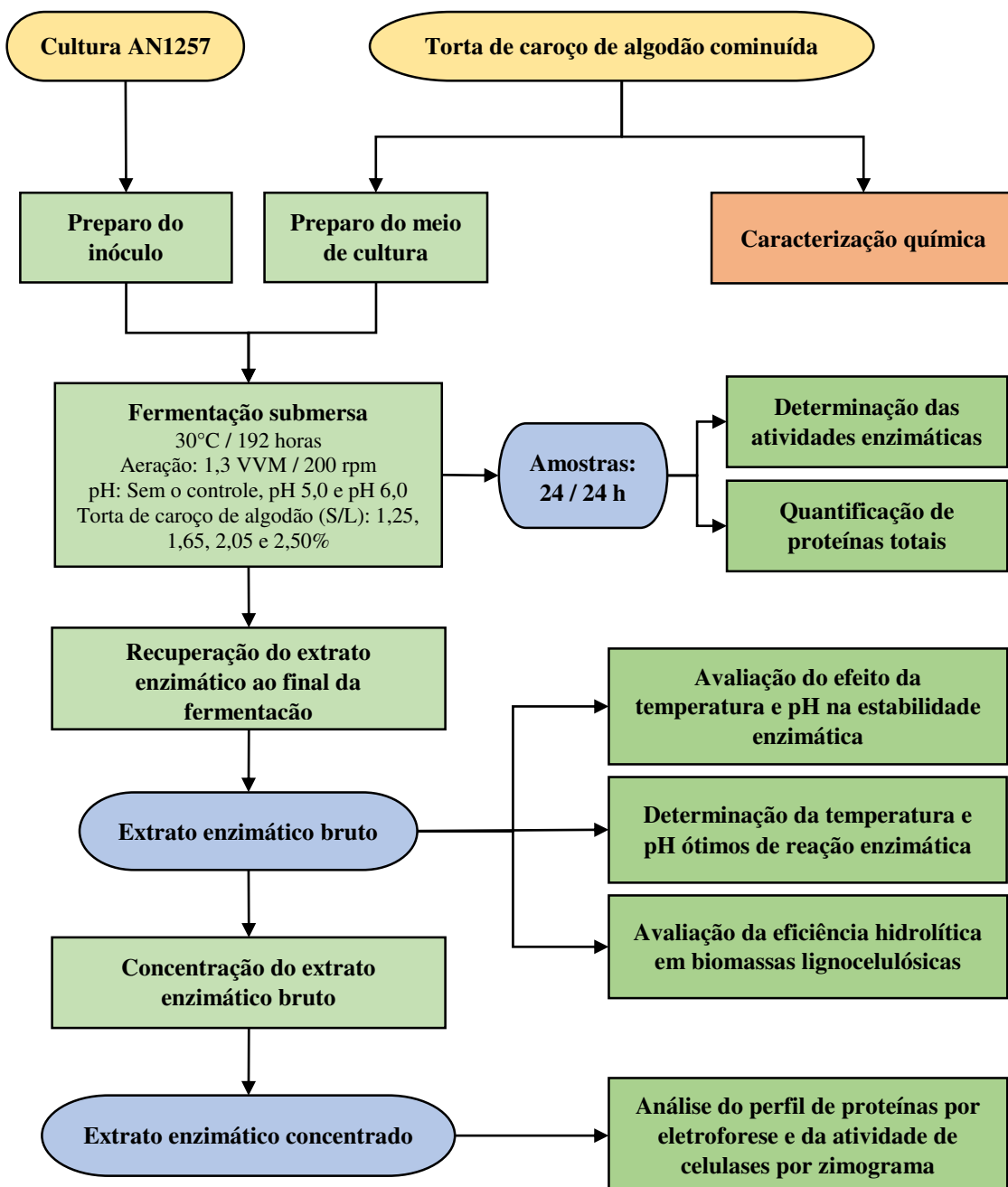
Baseado nas dificuldades encontradas para a consolidação do processo produtivo de etanol 2G, Santos (2013) desenvolveu estudos objetivando a produção eficiente de enzimas holocelulolíticas, com foco na investigação de micro-organismos celulolíticos e de biomassas lignocelulósicas potenciais, provenientes da cadeia do biodiesel. O autor verificou que a produção de enzimas holocelulolíticas, em escala laboratorial, a partir do cultivo da linhagem *Aspergillus tubingensis* AN1257 em torta de caroço de algodão apresentou resultados interessantes (SANTOS, 2013), amparando a realização de estudos posteriores para o aumento da escala do processo. Contudo, Musoni *et al.* (2015) advertem que a integração dos procedimentos de aumento de escala para a produção dos metabólitos fúngicos consiste em um dos maiores gargalos para as tecnologias de fermentação, devido à dificuldade de reprodução das condições ideais obtidas em escala laboratorial.

Neste contexto, esta dissertação pretende contribuir para o desenvolvimento de tecnologias que sustentem o estabelecimento dos biocombustíveis 2G no cenário nacional, com agregação de valor à cadeia energética, partindo do aumento na escala de bioprocessos de produção de enzimas holocelulolíticas.

4. METODOLOGIA

O desenvolvimento deste trabalho teve início com o cultivo do *A. tubingensis* AN1257 e preparo da torta de caroço de algodão, para posterior fermentação e produção das enzimas FPases, CMCase, β -glucosidase e xilanasas. As etapas envolvidas encontram-se esquematizadas na Figura 8, e descritas nos subitens apresentados a seguir.

Figura 8 – Fluxograma representativo dos processos utilizados para a produção de enzimas pelo *A. tubingensis* AN1257 e suas respectivas caracterizações bioquímicas.



4.1. Obtenção e caracterização da torta de caroço de algodão

A torta de caroço de algodão, utilizada no processo de fermentação para obtenção das enzimas FPases, CMCase, β -glucosidase e xilanases, foi doada pela Indústria de Óleo, Rações e Plásticos Montes Claros LTDA, localizada no município de Montes Claros/MG. Após a moagem em moinho de facas (tipo Willie), a torta foi submetida à caracterização química quanto aos teores de lipídios totais, umidade, cinzas totais (AOAC, 1992), fibras em detergente ácido (FDA), fibras em detergente neutro (FDN), celulose, hemicelulose, lignina (VAN SOEST, 1967; VAN SOEST; MOORE, 1966), açúcares solúveis totais e amido (McCREADY *et al.*, 1950), descritas a seguir.

4.1.1. Lipídios totais

A extração dos lipídios foi realizada em aparelho extrator tipo Soxhlet, a partir da pesagem de 1,0 g da amostra e sucessivas lavagens com éter etílico. Os lipídios extraídos foram coletados em balão de fundo chato de 250mL previamente desumidificado e pesado, seguido de secagem em estufa à 70°C até total evaporação do solvente remanescente na amostra coletada. O balão contendo a amostra desumidificada foi resfriado em dessecador e submetido a pesagem. A quantificação dos lipídios totais foi realizada em triplicata e o teor de lipídios foi expresso em porcentagem, calculado conforme Equação 1.

$$L = \frac{P_f - P_i}{A} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Sendo:

L = teor de lipídios totais (%)

P_f = massa final do balão contendo os lipídios (g)

P_i = massa inicial do balão vazio (g)

A = massa da amostra (g)

4.1.2. Umidade

O teor de umidade da biomassa foi determinado a partir da pesagem de 1,0 g da amostra em placa de Petri previamente desumidificada e pesada, a qual foi mantida em estufa a 105°C até peso constante. Após resfriamento em dessecador, a placa de Petri contendo a amostra seca foi submetida a pesagem, e por diferença de massa, obtido o teor de umidade. A análise foi realizada em triplicata e o resultado expresso em porcentagem, conforme Equação 2.

$$U = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100$$

Equação 2

Sendo:

U = teor de umidade (%)

P_i = massa da placa de Petri com a amostra úmida (g)

P_f = massa da Placa de Petri após secagem, com amostra seca (g)

4.1.3. Cinzas totais

A quantificação do conteúdo de cinzas totais foi realizada a partir da transferência de 0,5 g da amostra para cadinho de porcelana previamente calcinado e pesado. A amostra contida em cadinho foi carbonizada e, então, levada à mufla à 550°C por aproximadamente 5 horas. O cadinho contendo a amostra foi resfriado em dessecador seguido de pesagem, e por diferença de massa, obtido o teor de cinzas. A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em porcentagem, de acordo com Equação 3.

$$C = \frac{P_f - P_i}{A} \times 100$$

Equação 3

Sendo:

C = teor de cinzas (%)

P_f = massa final do cadinho contendo as cinzas (g)

P_i = massa inicial do cadinho, vazio (g)

A = massa da amostra (g)

4.1.4. Fibras em detergente ácido

As fibras em detergente ácido (FDA) foram determinadas a partir da pesagem de 0,25 g da amostra em tubo macro de vidro borossilicato de 100 mL, adicionado de 25 mL de solução detergente ácido e digerida em bloco digestor à 100°C por uma hora. A amostra digerida foi vertida em cadinho de vidro sinterizado, previamente calcinado e pesado, e submetida a sucessivas lavagens com água quente, até pH neutro, para posteriormente lavagem com 10 mL de acetona. O cadinho contendo a amostra lavada foi submetido à secagem em estufa à 105°C por 30 minutos, seguido de resfriamento e pesagem. A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em porcentagem, calculados de acordo com a Equação 4.

$$FDA = \frac{P_f - P_i}{A} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Sendo:

FDA = teor de fibra em detergente ácido (%)

P_f = massa final do cadinho após digestão, lavagem e secagem (g)

P_i = massa inicial do cadinho vazio (g)

A = massa da amostra (g)

4.1.5. *Fibras em detergente neutro*

As fibras em detergente neutro (FDN) foram determinadas a partir da pesagem de 0,25 g da amostra em tubo macro de vidro borossilicato de 100 mL, adicionado de 25 mL de solução detergente neutra e digerida em bloco digestor à 100°C por uma hora. A amostra digerida foi vertida em cadinho de vidro sinterizado, previamente calcinado e pesado, e submetida a sucessivas lavagens com água quente, até pH neutro, para posteriormente lavagem com 10 mL de acetona. O cadinho contendo a amostra lavada foi submetido à secagem em estufa à 105°C por 30 minutos, seguido de resfriamento e pesagem. A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em porcentagem, calculados de acordo com a Equação 5.

$$FDN = \frac{P_f - P_i}{A} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Sendo:

FDN = teor de fibra em detergente ácido (%)

P_f = massa final do cadinho após digestão, lavagem e secagem (g)

P_i = massa inicial do cadinho vazio (g)

A = massa da amostra (g)

4.1.6. *Celulose*

A determinação do teor de celulose foi realizada a partir da amostra obtida na análise de FDA. Para tanto, foi adicionada a esta 30 mL de solução de ácido sulfúrico a 72%, seguida de homogeneização e sucessivas lavagens com água quente até pH neutro. A seguir, o cadinho contendo a amostra lavada foi submetido a secagem em estufa à 105°C por 30 minutos, seguido de resfriamento e pesagem. O teor de celulose, expresso em porcentagem, foi calculado conforme Equação 6.

$$Cel = \frac{P_i - P_f}{A} \times 100$$

Equação 6

Sendo:

Cel = teor de celulose (%)

P_i = massa do cadinho antes da adição de ácido sulfúrico (g)P_f = massa do cadinho após adição do ácido sulfúrico e secagem (g)

A = peso da amostra

4.1.7. Hemicelulose

O teor de hemicelulose foi determinado por diferença das massas obtidas das amostras ao final das análises de FDA e FDN. O teor de hemicelulose foi expresso em porcentagem, de acordo com a Equação 7.

$$Hem = \frac{FDN - FDA}{A} \times 100$$

Equação 7

Sendo:

Hem = teor de hemicelulose (%)

FDN = massa obtida na quantificação de FDN

FDA = massa obtida na quantificação de FDA

A = peso da amostra

4.1.8. Lignina

O teor de lignina foi obtido a partir da amostra resultante da determinação do teor de celulose submetida à incineração em mufla a 550°C por aproximadamente 8 horas, seguida de resfriamento em dessecador e pesagem. O conteúdo de lignina, expresso em porcentagem, foi calculado conforme Equação 8.

$$Lig = \frac{P_i - P_f}{A} \times 100$$

Equação 8

Sendo:

Lig = teor de lignina (%)

P_i = massa do cadinho após quantificação de celulose (g)P_f = massa do cadinho após incineração em mufla (g)

A = peso da amostra (g)

4.1.9. Açúcares solúveis totais (AST) e amido

A quantificação do teor de açúcares solúveis totais e amido foi realizada a partir de 20 mg de amostra contida em microtubo tipo Eppendorf®, adicionada de 1,5 mL de etanol a 80%, seguida de homogeneização e incubação em banho-maria a 90°C por 15 minutos. A seguir, procedeu-se a centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, recuperando o sobrenadante e transferindo-o para um balão volumétrico de 50 mL. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e o sobrenadante avolumado com água destilada para posterior dosagem de AST.

A determinação do teor de amido foi realizada a partir do precipitado proveniente da determinação de AST, adicionado de 1,5 mL de solução de ácido perclórico a 30%, em microtubo tipo Eppendorf®, seguido de homogeneização e repouso por 30 minutos. Após esta etapa, procedeu-se a centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante recuperado e transferido para um balão volumétrico de 50 mL. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e o sobrenadante avolumado com água destilada para posterior dosagem de amido.

A quantificação dos teores de AST e amido foi realizada a partir de 0,5 mL da amostra contida em tubo de ensaio de 10 mL, seguida da adição de 2,5 mL de solução de antrona a 0,1%, preparada em solução de ácido sulfúrico a 76%. A seguir, a reação foi incubada em banho-maria a 100°C por 10 minutos, e após resfriamento em banho de água com gelo, submetida a leitura em espectrofotômetro a 620 nm. Uma curva analítica utilizando D-glicose como padrão, com concentração variando de 0,0 a 0,1 g L⁻¹, foi construída e submetida simultaneamente aos mesmos procedimentos que a amostra. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em g L⁻¹.

4.2. Processo fermentativo para a produção de enzimas holocelulolíticas

As etapas envolvidas no preparo e condução do processo fermentativo para produção das enzimas FPases, CMCase, β-glucosidase e xilanases por *A. tubingensis* AN1257 encontram-se descritas a seguir.

4.2.1. Obtenção e manutenção da cultura de *Aspergillus tubingensis* AN1257

O fungo filamentosso *Aspergillus tubingensis* AN1257, proveniente do banco de culturas cedido pela Prof^a. Dr^a. Ana Paula de Figueiredo Conte Vanzela, do Departamento de Farmácia/UFVJM, foi isolado de amostras de vegetais localizadas na região de

Diamantina/MG. A linhagem foi mantida no Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação (LabBBio) - UFVJM, por cultivos tubo a tubo realizados a cada dois meses, em meios de cultura ágar batata dextrose (BDA), e conservada sob refrigeração a $4\pm 1^\circ\text{C}$.

4.2.2. Reativação da cultura e obtenção da suspensão de conídios do *A. tubingensis* AN1257

A cultura de *A. tubingensis* foi reativada em placas de Petri contendo meio BDA, incubadas a 30°C por 7 dias. Após este período, procedeu-se à suspensão dos conídios através da adição de 5 mL de meio Mandels e Sternberg (TAB. 2), seguida de raspagem das células com auxílio da alça de Drigalski. A suspensão obtida foi coletada e filtrada em gaze estéril para retenção dos fragmentos miceliais, e o filtrado submetido a contagem de conídios em Câmara de Neubauer.

Tabela 2 – Composição do meio de Mandels e Sternberg (1976), utilizado na obtenção da solução de conídios do *A. tubingensis* AN1257.

| Componentes | Quantidade (g) |
|------------------------------------|----------------|
| Sulfato de amônio | 1,400 |
| Fosfato de potássio monobásico | 2,000 |
| Cloreto de cálcio | 0,302 |
| Sulfato de magnésio heptahidratado | 0,385 |
| Sulfato de ferro heptahidratado | 0,005 |
| Sulfato de manganês hidratado | 0,0012 |
| Sulfato de zinco heptahidratado | 0,0014 |
| Cloreto de cobalto hexahidratado | 0,020 |
| Ureia | 0,300 |
| Extrato de levedura | 0,250 |

O meio foi preparado utilizando 1000 mL de água destilada, e esterilizado a 1 atm, a 121°C por 15 minutos.

4.2.3. Produção de enzimas holocelulolíticas por *A. tubingensis* AN1257

A produção das enzimas holocelulolíticas foi realizada por fermentação submersa, mediante o aumento da escala de bioprocesso otimizado anteriormente em Erlenmeyers contendo 25 mL de meio fermentativo (SANTOS, 2013). Para tanto, a fermentação foi realizada em biorreator instrumentado (Tec-Bio-V), operado por batelada simples, com volume nominal de 4,5 litros e volume operacional de 3,0 litros, contendo 1,5 L de meio base (TAB. 3). A linhagem de *A. tubingensis* AN1257 foi utilizada como agente do bioprocesso, com inóculo na concentração de 1×10^5 conídios mL^{-1} , e a torta de caroço de algodão como fonte de carbono, na concentração de 1,25% (m/v). O processo fermentativo foi conduzido sem o controle do pH, sob temperatura de 30°C , agitação de 200 rpm (turbina tipo Smith com 6 pás) e aeração de 1,3 VVM (ar atmosférico), por um período de 192 horas.

Tabela 3 – Composição do meio fermentativo utilizado no processo de fermentação submersa para produção de enzimas holocelulolíticas por *A. tubingensis* AN1257.

| Componentes | Quantidade (g L⁻¹) |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| Cloreto de sódio | 0,100 |
| Sulfato de magnésio heptahidratado | 0,200 |
| Fosfato de potássio monobásico | 0,400 |
| Fosfato de potássio dibásico | 0,100 |
| Ureia | 0,900 |
| Torta de caroço de algodão | 12,500 |

Após a condução do bioprocessamento sem o controle do pH (Ensaio 01), a influência do pH na produção enzimática foi avaliada em mais duas condições: (a) em pH 5,0±0,2 (Ensaio 02), e (b) em pH 6,0±0,2 (Ensaio 03). O pH do meio fermentativo nos Ensaios 02 e 03 foi ajustado por meio da utilização de solução de hidróxido de sódio 1M e ácido sulfúrico 1M. Posteriormente, foi avaliada a influência da concentração inicial da fonte de carbono na produção enzimática por meio de bioprocessamento conduzido sem o controle do pH, com adição de torta de caroço de algodão no meio fermentativo, nas concentrações de 1,25, 1,65, 2,05 e 2,50% (m/v).

A produção enzimática foi monitorada a cada 24 horas, a partir da retirada de alíquotas de 6 mL, em triplicata, através da determinação da atividade enzimática de FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases. As alíquotas foram submetidas à centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante, extrato enzimático bruto (AN1257), reservado para análises posteriores.

4.2.3.1. Determinação da atividade enzimática de FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases

A atividade das celulases (FPases, CMCCase e β -glucosidase) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Ghose (1987) e das xilanases, através da metodologia desenvolvida por Bailey, Biely e Poutanen (1992). As metodologias foram adaptadas para determinação em microplaca de poliestireno. Os ensaios enzimáticos consistiram em 7 repetições.

I - FPases (Celulases totais)

A atividade enzimática de FPases foi determinada utilizando papel-filtro Whatman nº1 (cortado em tiras de 2x0,3 cm) como substrato, adicionado de 50 μ L de solução tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0, e 50 μ L do extrato AN1257, seguido de incubação em estufa

a 50°C, por 1 hora. Os açúcares redutores liberados pela reação foram quantificados por método colorimétrico descrito por Miller (1959), adaptado segundo Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013), por meio da adição de 100 µL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) à reação enzimática, seguida de incubação em banho-maria a 70°C por 25 minutos, resfriamento em banho de água e gelo e leitura em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Asys Tech) a 540 nm. Uma curva analítica utilizando *D*-glicose como padrão, com concentração variando de 0,0 a 1,0 g L⁻¹, foi construída e submetida simultaneamente aos mesmos procedimentos que a amostra.

Uma unidade de atividade enzimática de FPases foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores por minuto, por mililitro de extrato enzimático (U mL⁻¹).

II - CMCase

A atividade enzimática de CMCase foi determinada utilizando 50 µL de solução de carboximetilcelulose a 1% preparada em solução tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 como substrato, adicionada de 50 µL do extrato AN1257, seguido de incubação à temperatura de 50°C por 30 minutos. Os açúcares redutores liberados pela reação foram quantificados por método colorimétrico descrito no Item I (pág. 44). Uma curva analítica utilizando *D*-glicose como padrão, com concentração variando de 0,0 a 1,0 g L⁻¹, foi construída e submetida simultaneamente aos mesmos procedimentos que a amostra.

Uma unidade de atividade enzimática de CMCase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores por minuto, por mililitro de extrato enzimático (U mL⁻¹).

III - β-glucosidase

A atividade enzimática de β-glucosidase foi determinada utilizando 50 µL de solução de celobiose a 0,51%, preparada em solução tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,0, como substrato, adicionada de 50 µL do extrato AN1257. Em seguida, foi realizada a incubação em estufa a 50°C por 10 minutos, seguida de banho-de-água fervente durante 1 minuto e resfriamento em gelo tipo escama. Posteriormente, a glicose liberada pela reação foi quantificada por método colorimétrico proposto por Lloyd e Whelan (1969), adaptado, a partir de 10 µL da amostra proveniente da reação enzimática, adicionados de 300 µL do reagente GOD-POD (glicose-oxidase/peroxidase), em microplaca de poliestireno. Logo após, procedeu-se à incubação em banho-maria à temperatura de 37°C por 10 minutos, seguido de resfriamento

em gelo tipo escama e leitura da absorbância em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Asys Tech) a 510 nm. Uma curva analítica utilizando D-glicose como padrão, com concentração variando de 0,0 a 0,7 g L⁻¹, foi construída e submetida simultaneamente aos mesmos procedimentos que a amostra.

Uma unidade de atividade enzimática de β -glucosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose por minuto, por mililitro de extrato enzimático (U mL⁻¹).

IV - Xilanases

A atividade enzimática das xilanases foi determinada a partir de 50 μ L de solução de xilana *beechwood* (Sigma-Aldrich) a 1,4%, preparada em solução tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,0, adicionada de 50 μ L do extrato AN1257, seguida de incubação em estufa a 50°C, por 5 minutos. Os açúcares redutores liberados pela reação foram quantificados por método colorimétrico descrito no Item I (pág. 44). Uma curva analítica utilizando D-xilose como padrão, com concentração variando de 0,0 a 1,0 g L⁻¹, foi construída e submetida simultaneamente aos mesmos procedimentos que a amostra.

Uma unidade de atividade enzimática de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de xilose por minuto, por mililitro de extrato enzimático (U mL⁻¹).

4.2.3.2. Quantificação de proteínas totais

O teor de proteínas totais do extrato enzimático bruto foi quantificado a partir de 50 μ L da amostra contida em tubos de ensaio de 10 mL, adicionados de 2,5 mL do reagente de Bradford (1976), seguido de homogeneização manual vigorosa e repouso por 2 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Uma curva analítica utilizando albumina do soro bovino como padrão, com concentração variando de 0,0 a 0,5 g L⁻¹, foi construída e submetida simultaneamente aos mesmos procedimentos que a amostra. A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em g L⁻¹.

4.3. Avaliação do efeito da temperatura sobre a estabilidade e a atividade enzimática

O efeito da temperatura sobre a estabilidade e atividade enzimática foi avaliado utilizando o extrato AN1257 produzido durante a fermentação em 2,05% de torta de caroço de algodão, conforme descrito a seguir.

A termoestabilidade das enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases foi determinada a partir da diluição do extrato AN1257 em solução tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,0, em tubos Falcon, na proporção 1:1. Em seguida, o extrato diluído foi submetido à incubação em banho-maria sob diferentes temperaturas (0, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C), durante 24 horas. Neste período, foram retiradas alíquotas em 0, 2, 4, 6, 9, 12 e 24 horas de incubação para determinação das atividades enzimáticas conforme metodologias descritas anteriormente (Item 4.2.3.1, pág. 44). O experimento foi realizado em triplicata.

A influência da temperatura na velocidade reacional das enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases foi analisada a partir da diluição do extrato AN1257 em solução tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,0, na proporção 1:1. As atividades enzimáticas foram determinadas conforme metodologias descritas anteriormente (Item 4.2.3.1, pág. 44), entretanto, foram utilizadas diferentes temperaturas durante a incubação da reação: 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4. Avaliação do efeito do pH sobre a estabilidade e a atividade enzimática

O efeito do pH sobre a estabilidade e atividade enzimática foi avaliado utilizando o extrato AN1257 produzido durante a fermentação em 2,05% de torta de caroço de algodão conforme descrito a seguir.

A estabilidade das enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases ao pH foi determinada a partir da diluição do extrato AN1257 em solução tampão citrato 0,05M, nos valores de pH 3, 4, 5, 6, 7 e 8 (McILVAINE, 1921), na proporção 1:1. Em seguida, o extrato diluído foi submetido à incubação em banho-maria, a 25°C, durante 24 horas. Neste período, foram retiradas alíquotas em 0, 2, 4, 6, 9, 12 e 24 horas de incubação para determinação das atividades enzimáticas conforme metodologias descritas anteriormente (Item 4.2.3.1, pág. 44). O experimento foi realizado em triplicata.

A influência do pH na velocidade reacional das enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases foi determinada conforme metodologias descritas anteriormente (Item 4.2.3.1, pág. 44), substituindo o tampão acetato de sódio (pH 4,8) por tampão citrato 0,05M, pH 3, 4, 5, 6, 7 e 8 (McILVAINE, 1921). O experimento foi realizado em triplicata.

4.5. Concentração do extrato enzimático bruto

As enzimas presentes no extrato enzimático bruto produzido durante a fermentação em meio contendo 1,65% de torta de caroço de algodão foram concentradas por meio do efeito de *salting-out* descrito por Wingfield (2001). O processo de concentração foi realizado a partir

de 100 mL do extrato AN1257 contido em balão de fundo chato de 250 mL, adicionado de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) até 90% de saturação, mantido a aproximadamente 4°C sob agitação contínua. O pH da solução foi controlado durante o processo, utilizando tris hidroximetil aminometano. A solução resultante foi submetida à centrifugação a 7000 rpm por 10 minutos e, posteriormente, o precipitado enzimático (*pellets*) foi ressolubilizado em solução tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,8 e o sobrenadante reservado. A fim de constatar a eficiência do processo, as atividades de FPases, CMCase, β-glucosidase e xilanases foram determinadas no extrato AN1257, bem como no sobrenadante e nos *pellets* ressuspensos.

4.6. Determinação do perfil de proteínas presentes no extrato enzimático por eletroforese

O perfil de proteínas presentes no extrato enzimático concentrado por *salting-out* foi analisado através de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo com o método proposto por Laemmli (1970). A corrida eletroforética foi realizada por fonte de eletroforese GSR Mod. STD 300, utilizando gel separador a 12%, gel concentrador a 4%, e voltagem de 100 V. Para tanto, 150 µL do extrato enzimático concentrado foi adicionado a 250 µL de tampão de amostra diluído 5X, com posterior homogeneização. Em seguida, foi inserido 20 µL e 30 µL da solução nos poços 1 e 2 do gel concentrador, respectivamente, em sistema de eletroforese vertical utilizando tampão de corrida Tris-Glicina. Ao término da corrida, o gel foi imerso em solução corante Coomassie® Azul Brilhante por 20 minutos e, posteriormente incubado em solução descolorante por 12 horas. As soluções utilizadas para o experimento em eletroforese encontram-se descritas a seguir.

a. Tampão de amostra 5X

A solução tampão de amostra foi preparada por meio da dissolução de 20 mL de glicerol P.A em 40 mL de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, seguida da adição de 10 g de dodecil sulfato de sódio, 0,078 g de β-mercaptoetanol e 0,05 g de azul de bromofenol. A solução foi homogeneizada e, em seguida avolumada com água deionizada em balão volumétrico de 100 mL.

b. Tampão de corrida Tris-Glicina

O tampão de corrida foi preparado a partir da completa dissolução de 3,0285 g de trizma-base em água deionizada, seguida da adição de 14,413 g de glicina e 1 g de dodecil

sulfato de sódio. A solução foi homogeneizada e, em seguida avolumada em balão volumétrico de 1 L.

c. Gel concentrador – 4%

O gel concentrador foi preparado por meio da adição de 700 µL de solução de Acrilamida : Bis-Acrilamida a 30% (29 : 1) , 1,25 mL de solução Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 contendo 0,4% de dodecil sulfato de sódio, 25 µL de solução de persulfato de amônio a 10% e 20 µL de TEMED a 3,0 mL de água deionizada.

d. Gel separador – 12%

O gel separador foi preparado a partir da adição de 4,0 mL de solução de Acrilamida : Bis-Acrilamida a 30% (29 : 1), 2,5 mL de solução Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 contendo 0,4% de dodecil sulfato de sódio, 60 µL de solução de persulfato de amônio a 10% e 13 µL de TEMED a 3,43 mL de água deionizada, seguida de homogeneização.

e. Solução corante

A solução corante foi preparada por meio da dissolução de 0,25 g de Coomassie® Azul Brilhante R-250 em 112,50 mL de metanol, seguida da adição de 25 mL de ácido acético glacial. A solução foi avolumada com água deionizada em balão volumétrico de 250 mL.

f. Solução descolorante reveladora de proteínas

A solução descolorante foi preparada a partir da adição de 17,5 mL de ácido acético glacial à 75 mL de metanol, avolumada, em seguida, com água deionizada em balão volumétrico de 250 mL.

4.7. Determinação do perfil de celulasas secretadas por zimograma

O perfil de celulasas presentes no extrato enzimático concentrado por *salting-out* foi analisado por zimograma, de acordo com método desenvolvido por Peterson, Grinyer e Nevalainen (2011), em gel SDS-PAGE (Item 4.6, pág. 48) adicionado de 0,1% (m/v) de carboximetilcelulose. Após a eletroforese, os géis foram imersos em solução de Tween 20 a 2,5% durante 1 hora e submetidos à lavagem com água deionizada por três vezes. Posteriormente, os géis foram incubados em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0, à temperatura de 50° C durante 1 hora, seguidos de lavagem com água deionizada, imersão em

solução vermelho congo a 0,1% por 15 minutos, e posterior imersão em solução de NaCl 1M até o aparecimento dos halos de atividade enzimática. Em seguida, foi adicionada solução de HCl 0,1 M sobre a solução de NaCl para uma melhor visualização dos halos.

4.8. Eficiência hidrolítica do extrato enzimático bruto na sacarificação de biomassas lignocelulósicas

A eficiência hidrolítica do extrato enzimático bruto (AN1257), produzido por *A. tubingensis* AN1257 durante fermentação em meio contendo 1,25% de torta de caroço de algodão, foi avaliada através da sacarificação das biomassas lignocelulósicas: torta de macaúba, bagaço de cana-de-açúcar, torta de caroço de algodão, torta de girassol e torta de mamona. Os resultados obtidos para o extrato AN1257 foram comparados a outros três ensaios, conforme descritos a seguir: (i) utilizando o complexo celulolítico comercial, Cellic® CTec2 (Sigma-Aldrich) diluído 1500 vezes; (ii) utilizando o extrato Mix, solução composta por Cellic® CTec2 diluído 1500 X e AN1257, na razão 1:1; e (iii) grupo controle, sem adição de solução enzimática. As unidades de atividade enzimática de FPases e xilanases adicionadas aos ensaios descritos acima encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Unidades de atividade enzimática adicionadas aos ensaios de sacarificação dos materiais lignocelulósicos.

| Extrato enzimático | FPU | Xilanases (U) |
|--------------------|------|---------------|
| AN1257 | 0,95 | 60,47 |
| Cellic® CTec2 | 0,82 | 47,38 |
| Mix | 0,97 | 53,15 |
| Controle | 0,00 | 0,00 |

As biomassas utilizadas no processo de sacarificação foram previamente lavadas com água destilada, submetidas à secagem em estufa a 65°C durante 24 horas, e posteriormente moídas. Em seguida, 0,7 g da biomassa moída foi adicionada a frascos Erlenmeyers de 50 mL, e esterilizados em autoclave, à temperatura de 121°C durante 15 minutos. Posteriormente, 9 mL da solução enzimática e 5 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0) foram adicionados aos frascos contendo a amostra esterilizada, perfazendo uma razão de 5% (m/v). O processo de sacarificação foi conduzido em estufa incubadora (Nova Ética) sob agitação de 150 rpm, à temperatura de 50°C e avaliado mediante a determinação de açúcares redutores (MILLER, 1959) e de glicose (LLOYD; WHELAN, 1969), expressos em g FPU⁻¹, após 24 e 48 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

4.9. Análise estatística

Os resultados das atividades enzimáticas das enzimas FPases, CMCase, β -glucosidase e xilanases produzidas por *A. tubingensis* AN1257 por fermentação submersa utilizando torta de caroço de algodão foram comparados por análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando-se o software R (R Core Team, 2018).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização química da torta de caroço de algodão

A caracterização química da torta de caroço de algodão apresentou um considerável teor de FDA (28,59%), FDN (42,82%), celulose (22,61%) e hemicelulose (14,22%) (TAB. 5), demonstrando relevância para utilização como matéria-prima na produção de etanol 2G. Além disso, os teores de celulose e hemicelulose observados caracterizam a biomassa como substrato potencial para a produção extracelular de enzimas holocelulolíticas por fungos filamentosos, visto que sua indução ocorre na presença de polissacarídeos hemicelulósicos e/ou de seus produtos de hidrólise (DELABONA *et al.*, 2016).

Tabela 5 – Composição química da torta de caroço de algodão *in natura*.

| Parâmetros (g 100g _{amostra} ⁻¹) | Torta de caroço de algodão <i>in natura</i> |
|--|--|
| Umidade | 2,01±0,20 |
| Lipídios | 10,34±0,75 |
| Amido | 2,04±0,43 |
| AST | 7,46±1,93 |
| FDA | 28,59±3,33 |
| FDN | 42,82±2,58 |
| Celulose | 22,61±1,66 |
| Hemicelulose | 14,22±3,24 |
| Lignina | 8,38±1,21 |
| Cinzas | 5,18±0,17 |

AST: Açúcares solúveis totais; FDA: Fibras em detergente ácido; FDN: Fibras em detergente neutro.

5.2. Efeito do pH na produção das enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases por *A. tubingensis* AN1257

As atividades enzimáticas máximas obtidas no Ensaio 01 (fermentação conduzida em meio contendo 1,25% de torta de caroço de algodão, sem o controle do pH) foram de 0,073 U mL⁻¹ para FPases, 0,086 U mL⁻¹ para CMCCase, 3,62 U mL⁻¹ para β -glucosidase e 19,82 U mL⁻¹ para xilanases. Conforme os dados expostos na Tabela 6, a atividade enzimática máxima de β -glucosidase observada no Ensaio 01 foi superior ao valor encontrado por Santos (2013) em 25 mL de meio fermentativo, contudo Santos (2013) obteve valores superiores ao Ensaio 01 para as atividades de FPases, CMCCase e xilanases. A diferença observada entre as atividades enzimáticas obtidas no Ensaio 01 e por Santos (2013) deve estar atrelada principalmente à morfologia de crescimento do fungo durante os ensaios, visto que no Ensaio

01 foi observado, visualmente, o crescimento em micélios dispersos, enquanto Santos (2013) relata o crescimento em micélios densificados (*pellets*).

Tabela 6 – Máxima atividade enzimática determinada nos extratos enzimáticos produzidos por *A. tubingensis* AN1257 utilizando 1,25% (m/v) de torta de caroço de algodão no meio de fermentação sem o controle do pH.

| Enzimas | Ensaio 01 | | Santos, 2013 | |
|---------------|---|--------------------------|---|--------------------------|
| | Atividade enzimática máxima (U mL ⁻¹) | Tempo de fermentação (h) | Atividade enzimática máxima (U mL ⁻¹) | Tempo de fermentação (h) |
| FPases | 0,073 | 168 | 0,43 | |
| CMCase | 0,086 | 144 | 2,92 | 100 |
| β-glucosidase | 3,62 | 144 | 1,89 | |
| Xilanases | 19,82 | 72 | 41,80 | |

Ensaio 01: fermentação em 1,5 L de meio base; Santos (2013): fermentação em 25 mL de meio base.

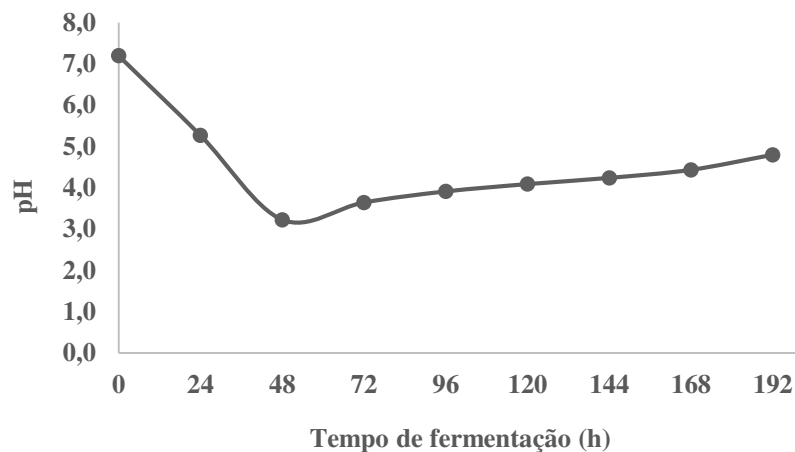
De acordo com Gibbs, Seviour e Schmid (2000) e Musoni *et al.* (2015), os fungos filamentosos podem crescer em formato de *pellets* ou em filamentos miceliais dispersos, sendo a morfologia uma característica particular à produção de metabólitos. Tal afirmação é corroborada por Papagianni (2004), ao relatar que o crescimento micelial em filamentos dispersos favorece a produção de enzimas pécticas, enquanto o crescimento em formato de *pellets* propicia a produção de ácido cítrico. A distinção morfológica observada nos ensaios pode ter sido influenciada pela inclusão de aeração no sistema fermentativo e pela intensidade e forma de agitação. Segundo Li *et al.* (2002), Musoni *et al.* (2015) e Papagianni (2004), a aeração reflete no crescimento celular e na produção enzimática, enquanto a agitação pode causar a fragmentação das células, bem como mudanças na morfologia de crescimento do micro-organismo, impactando na produção de metabólitos.

No Ensaio 01, foi observada a variação no pH do meio fermentativo durante o bioprocessamento, conforme ilustrado na Figura 9. Após o início do processo, notou-se uma redução significativa no pH do meio, atingindo o valor mínimo de 3,2 em 48 horas de fermentação. Em seguida, ocorreu um aumento gradativo no pH, sendo observado o valor de 4,8 ao final do processo. A diminuição no pH do meio de cultivo pode ser explicada pela produção de metabólitos pelo micro-organismo, tais como os ácidos orgânicos provenientes do catabolismo incompleto dos carboidratos (COSTA *et al.*, 2017; GUPTA; GAUTAM; MODI, 2010; JIMÉNEZ-QUERO *et al.*, 2017). A produção de metabólitos é influenciada pelas características e composição do meio de cultura, e pode afetar o pH durante a fermentação, o qual reflete nas reações enzimáticas (COSTA *et al.*, 2017; PAPAGIANNI, 2004).

De acordo com Cochrane (1958), os fungos filamentosos são tolerantes aos valores de pH de 4,0 a 9,0, contudo o crescimento e esporulação ocorrem preferencialmente em valores

de pH ácido a neutro. Diante deste fato, a variação no pH observada durante o Ensaio 01 mostrou a necessidade da realização de novos ensaios conduzidos em valores de pH ácido ($5,0\pm 0,2$ e $6,0\pm 0,2$), a fim de analisar a produção das enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases por *A. tubingensis* em condições ambientais distintas.

Figura 9 – Comportamento do pH do meio fermentativo (30°C, agitação de 200 rpm e aeração de 1,3 VVM) contendo 1,25% (m/v) de torta de caroço de algodão utilizando *A. tubingensis* AN1257 como agente fermentativo.



O perfil de produção das enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases durante o Ensaio 01 (sem o controle do pH), Ensaio 02 (pH $5,0\pm 0,2$) e Ensaio 03 (pH $6,0\pm 0,2$) está demonstrado na Figura 10. Dentre os ensaios realizados, a fermentação conduzida em pH 6,0 resultou nas menores atividades enzimáticas para as enzimas analisadas.

A máxima atividade enzimática de FPases foi obtida no Ensaio 01 (Figura 10-A), apresentando valor de $0,073 \text{ U mL}^{-1}$ em 168 horas de fermentação, contudo, em 72 horas de fermentação no Ensaio 02, observou-se uma atividade de $0,063 \text{ U mL}^{-1}$ (TAB. 7). A produção de FPases observada no Ensaio 02 pode constituir uma vantagem econômica para aplicação industrial, visto que em menor tempo de processo (72 horas de fermentação), foi obtida uma atividade enzimática equivalente a 86% da atividade máxima obtida no Ensaio 01.

Na Tabela 7 e Figura 10-B, observa-se que as atividades enzimáticas de CMCCase obtidas em 120 horas de fermentação nos Ensaios 01 e 02 apresentaram valores próximos ($0,080$ e $0,084 \text{ U mL}^{-1}$, respectivamente), não diferindo significativamente a 5%. Entretanto, ressalta-se que a máxima atividade foi observada em 72 horas de fermentação no Ensaio 02, apresentando valor de $0,093 \text{ U mL}^{-1}$.

Tabela 7 – Atividades enzimáticas de FPases e CMCCase determinadas no extrato enzimático bruto produzido por *A. tubingensis* AN1257 por fermentação submersa em 1,25% (m/v) de torta de caroço de algodão.

| Ensaio | FPases (U mL ⁻¹) | | CMCase (U mL ⁻¹) | | |
|-------------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|
| | 72 h | 168 h | 96 h | 120 h | 144 h |
| 01 - Sem controle do pH | 0,048 ^a | 0,073 ^a | 0,077 ^a | 0,080 ^a | 0,086 ^a |
| 02 - pH 5,0±0,2 | 0,063 ^b | 0,057 ^b | 0,093 ^b | 0,084 ^a | 0,073 ^b |
| 03 - pH 6,0±0,2 | 0,041 ^c | 0,020 ^c | 0,026 ^c | 0,029 ^b | 0,044 ^c |

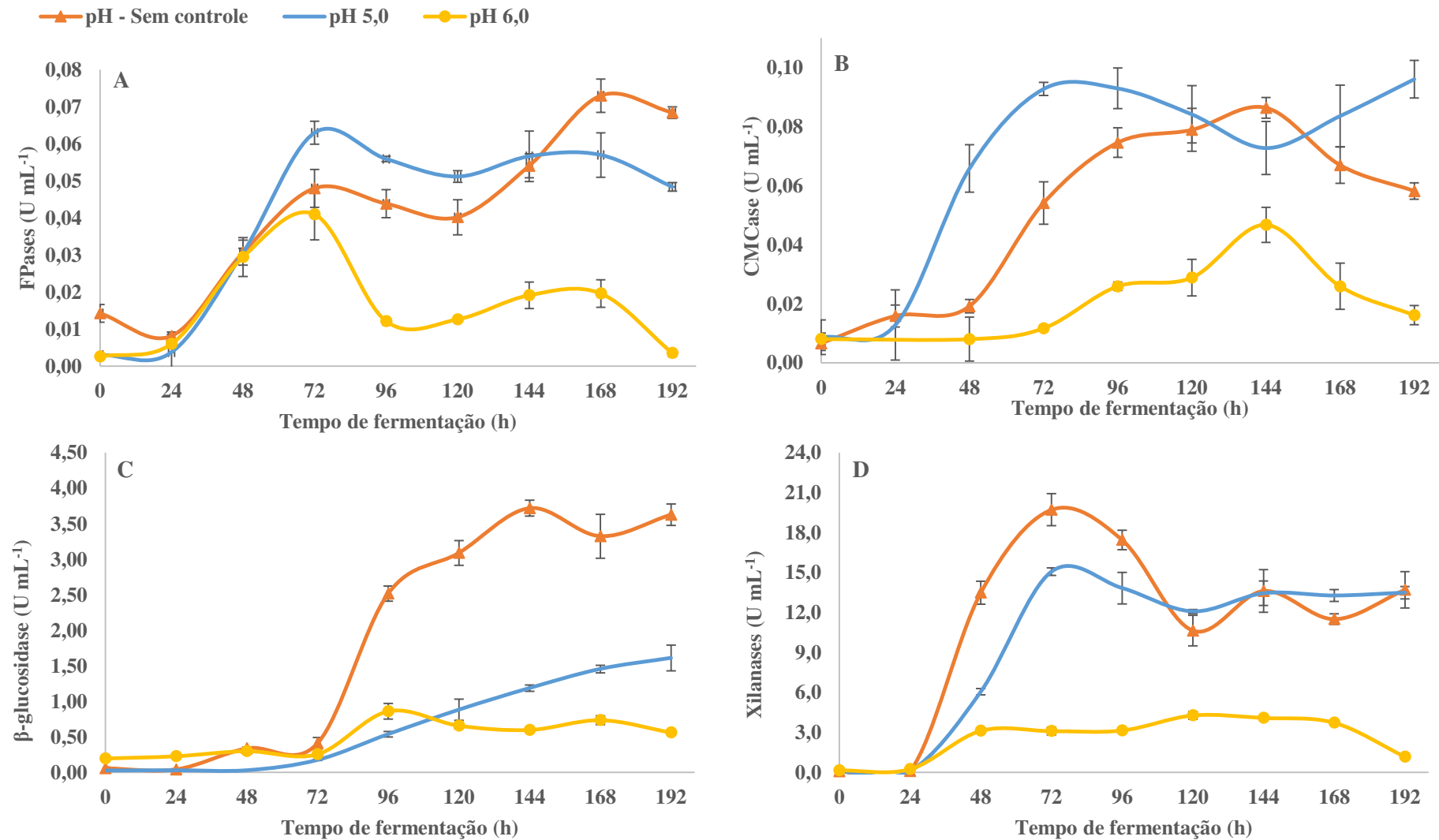
Letras diferentes na mesma coluna indicam a existência de diferença entre as médias dos tratamentos a 5% de significância pelo Teste de Tukey.

A enzima β -glucosidase demonstrou atividade enzimática máxima de 3,62 U mL⁻¹ durante a fermentação sem o controle do pH (Ensaio 01), apresentando valor seis vezes superior às atividades obtidas em pH 5,0 e 6,0, com valores de 1,19 U mL⁻¹ e 0,60 U mL⁻¹, respectivamente (FIG. 10-C). Segundo dos Reis *et al.* (2014), a produção da β -glucosidase é favorecida por pH ácido, desta forma, a obtenção de atividade enzimática superior no Ensaio 01, pode estar atrelada ao pH do meio, uma vez que em 72 horas de fermentação, momento em que a produção da enzima foi iniciada, o pH apresentava valor próximo de 4,0 (FIG. 9).

Na Figura 10-C, observa-se ainda que a produção de β -glucosidase por *A. tubingensis* AN1257 foi iniciada somente após 72 horas de fermentação, atingindo seu máximo entre 96 e 144 horas, diferente do ocorrido para as enzimas FPases, CMCCase e xilanases, que demonstraram atividade após 24 horas de fermentação. Este fato pode ser explicado pela existência de diferentes rotas de regulação da expressão de celulasas em micro-organismos, visto que a produção da β -glucosidase em materiais lignocelulósicos geralmente ocorre após a ação enzimática das celobiohidrolases e CMCCase. Essas enzimas hidrolisam a cadeia da celulose liberando polissacarídeos de cadeias menores, incluindo a celobiose, dissacarídeo indutor da secreção de β -glucosidases (YAO *et al.*, 2015).

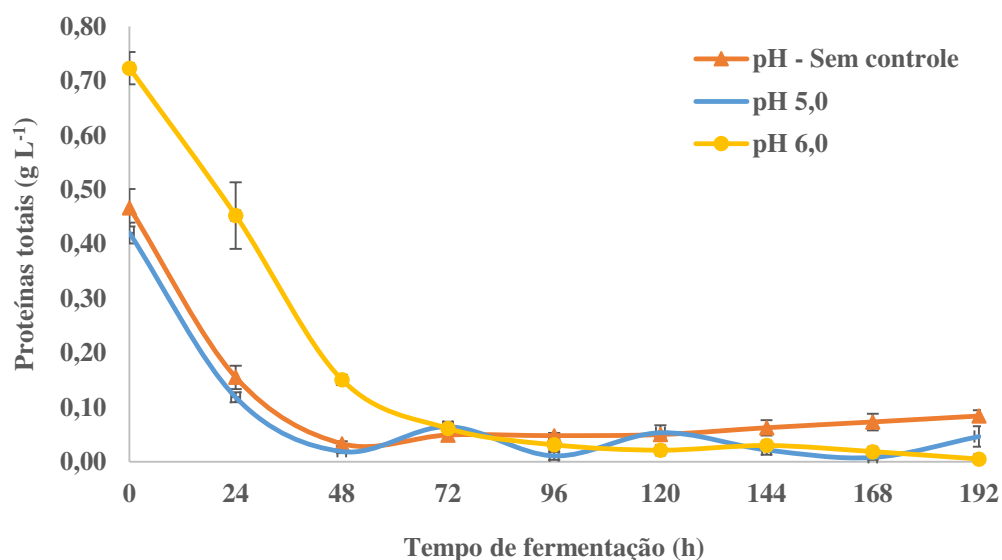
As fermentações conduzidas sem o controle do pH e em pH 5,0 resultaram nos maiores valores de atividade de xilanases, 19,82 e 15,07 U mL⁻¹, respectivamente, após 72 horas de fermentação. Após 120 horas de bioprocessamento, ambos os ensaios apresentaram atividade xilanólítica constante, com valor de aproximadamente 13,40 U mL⁻¹ (FIG. 10-D). A similaridade observada entre os dois ensaios pode estar relacionada ao valor do pH do meio fermentativo, visto que no Ensaio 01, o pH tendeu a 5,0 após 120 horas de fermentação (FIG. 9), valor similar ao pH mantido durante o Ensaio 02.

Figura 10 – Produção de (A) FPases, (B) CMCCase, (C) β -glucosidase e (D) xilanases por *A. tubingensis* AN1257 durante fermentação submersa conduzida sem controle do pH e em pH 5,0 e 6,0, em meio base contendo 1,25% (m/v) de torta de caroço de algodão como fonte de carbono.



A concentração de proteínas totais presentes no extrato enzimático bruto foi determinada concomitantemente com a análise do perfil de produção das enzimas FPases, CMCase, β -glucosidase e xilanases. Na Figura 11, observa-se que a maior concentração de proteínas totais foi determinada no início dos processos fermentativos. O teor de proteínas solúveis obtido no início do bioprocessamento pode ser proveniente da torta de caroço de algodão adicionada ao meio fermentativo, visto que não há outra fonte de proteínas adicionada ao meio em concentração suficiente para os resultados encontrados. Em seguida, foi observada a diminuição da concentração de proteínas totais no extrato enzimático, o que pode estar relacionado ao metabolismo do *A. tubingensis* AN1257, que depende da utilização de proteínas para o seu crescimento (SINGHANIA *et al.*, 2014). No Ensaio 01, foi observado um aumento gradual na concentração de proteínas totais no extrato enzimático após 48 horas de fermentação, o qual está relacionado à produção enzimática obtida durante este ensaio, conforme Figura 10.

Figura 11 - Concentração de proteínas totais determinada durante os ensaios conduzidos em 1,25% de torta de caroço de algodão (1,25, 1,65, 2,05 e 2,50%), em diferentes valores de pH, utilizando *A. tubingensis* AN1257 como agente fermentativo.



Os resultados obtidos nos Ensaio 01, 02 e 03 demonstram que o pH do meio fermentativo afeta a produção das enzimas FPases, CMCase, β -glucosidase e xilanases por *A. tubingensis*, em fermentação submersa. Tal fato decorre da influência do pH na expressão gênica, na morfologia dos fungos filamentosos, e na conformação das enzimas, impactando diretamente no crescimento fúngico e na produção de metabólitos (GUPTA; GAUTAM; MODI, 2010; MRUDULA; MURUGAMMAL, 2011; PAPAGIANNI, 2004). Estes dados são

importantes do ponto de vista tecnológico, pois apontam a característica acidófila do gênero *Aspergillus*, descrita por Cochrane (1958) e Polizeli *et al.* (2005), auxiliando na definição das condições a serem aplicadas nos bioprocessos para a produção das enzimas holocelulolíticas em larga escala.

5.3. Efeito da concentração inicial da fonte de carbono na produção das enzimas FPases, CMCase, β -glucosidases e xilanases por *A. tubingensis* AN1257

Os resultados da produção enzimática de FPases, CMCase, β -glucosidase e xilanases por *A. tubingensis* AN1257 em fermentação submersa utilizando as concentrações de 1,25, 1,65, 2,05 e 2,50% (m/v) de torta de caroço de algodão encontram-se na Figura 12. Dentre os tratamentos analisados, o cultivo da linhagem *A. tubingensis* AN1257 em meio contendo 2,50% de torta de caroço de algodão demonstrou as menores atividades enzimáticas de FPases, CMCase, β -glucosidase e xilanases observadas. Tal resultado sugere que o aumento da concentração de substrato no meio fermentativo pode inibir a produção enzimática nas condições estabelecidas.

A maior produção de FPases foi observada no meio contendo 1,65% de torta de caroço de algodão, demonstrando atividade enzimática máxima de $0,13 \text{ U mL}^{-1}$, em 120 horas de fermentação (FIG. 12-A). As atividades enzimáticas de CMCase obtidas durante as fermentações em meios contendo 1,25, 1,65 e 2,05% de torta de caroço de algodão apresentaram valores similares, conforme observado na Tabela 8 e Figura 12-B. Contudo, a atividade máxima de CMCase foi observada durante a fermentação em meio contendo 2,05% da biomassa, apresentando valores de $0,089$ e $0,092 \text{ U mL}^{-1}$ em 96 e 120 horas de fermentação, respectivamente.

Tabela 8 – Atividades enzimáticas de CMCase presente no extrato enzimático bruto produzido por *A. tubingensis* AN1257 por fermentação submersa em 1,25, 1,65, 2,05 e 2,50% (m/v) de torta de caroço de algodão, em 72, 96 e 120 horas de fermentação.

| Concentração da biomassa (%) | CMCase (U mL^{-1}) | | |
|------------------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------|
| | 72 horas | 96 horas | 120 horas |
| 1,25 | $0,058 \pm 0,004^a$ | $0,077 \pm 0,005^a$ | $0,077 \pm 0,003^a$ |
| 1,65 | $0,058 \pm 0,007^a$ | $0,061 \pm 0,008^b$ | $0,076 \pm 0,002^a$ |
| 2,05 | $0,054 \pm 0,003^a$ | $0,089 \pm 0,0041^c$ | $0,092 \pm 0,004^b$ |
| 2,50 | $0,023 \pm 0,003^b$ | $0,030 \pm 0,001^d$ | $0,032 \pm 0,011^c$ |

Letras diferentes na mesma coluna indicam a existência de diferença entre as médias dos tratamentos a 5% de significância pelo Teste de Tukey.

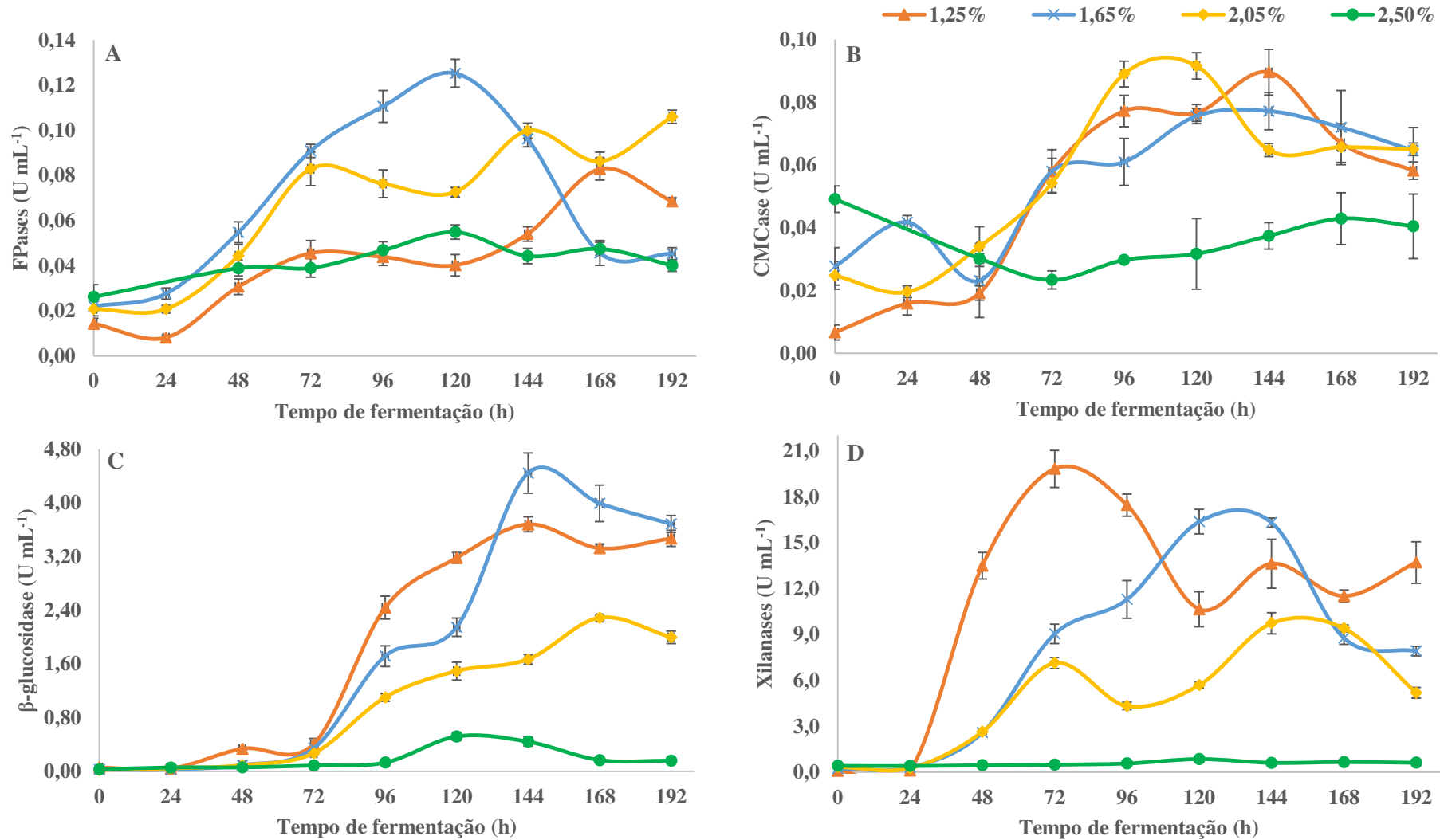
As atividades enzimáticas de FPases e CMCCase obtidas durante os ensaios desenvolvidos neste trabalho demonstraram valores similares aos resultados descritos por El-Nahrawy *et al.* (2017) ao cultivar *A. tubingensis* em meio fermentativo à base de palha de arroz, e por Anasontzis *et al.* (2017) ao utilizar farelo de trigo como substrato durante a fermentação submersa por *A. tubingensis* (TAB. 9). Contudo, na Tabela 9 observa-se também, que em relação às demais espécies fúngicas, o *A. tubingensis* apresenta baixa eficiência na produção das enzimas FPases e CMCCase. Este resultado não surpreende, visto que a espécie apresenta a mesma linhagem ancestral que o *A. niger* (VRIES *et al.*, 2017), um micro-organismo com limitações na hidrólise da celulose, devido à baixa expressão gênica de endoglucanases (LIU *et al.*, 2013).

Tabela 9 – Atividades enzimáticas de FPases e CMCCase determinadas em extratos enzimáticos produzidos por fungos filamentosos por fermentação submersa em substratos lignocelulósicos.

| Espécies | Enzimas | Atividade (U mL ⁻¹) | Fonte |
|------------------------------|---------|---------------------------------|---------------------------------|
| <i>A. tubingensis</i> | | 0,12 | Anasontzis <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>A. tubingensis</i> | | 0,13 | O autor |
| <i>A. sydowii</i> | FPases | 1,06 | Matkar <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>P. echinulatum</i> | | 1,81 | dos Reis <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>P. janthinellum</i> | | 3,10 | Singhania <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>A. terreus</i> | | 0,05 | Sohail, Ahmad e Khan, 2016 |
| <i>A. tubingensis</i> | CMCase | 0,06 | El-Nahrawy <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>A. tubingensis</i> | | 0,09 | O autor |
| <i>A. sydowii</i> | | 1,01 | Matkar <i>et al.</i> , 2013 |

As atividades máximas de β -glucosidase foram observadas em 144 horas de fermentação (FIG. 12-C), apresentando o valor de 4,45 U mL⁻¹ para a fermentação em 1,65% de torta de caroço de algodão, e de 3,62 U mL⁻¹ em 1,25% da biomassa. Todavia, no tempo de 120 horas de fermentação, a atividade enzimática obtida no processo utilizando 1,25% de torta de caroço de algodão foi superior ao obtido na fermentação em 1,65% da biomassa, com valores de 3,18 U mL⁻¹ e 2,14 U mL⁻¹, respectivamente.

Figura 12 - Atividade enzimática de (A) FPases, (B) CMCCase, (C) β -glucosidase e (D) xilanases obtidas por fermentação submersa sem o controle do pH, utilizando *A. tubingensis* AN1257 como agente fermentativo e diferentes concentrações de torta de caroço de algodão (1,25, 1,65, 2,05 e 2,50 %) como fonte de carbono.



Os resultados de produção de β -glucosidase obtidos nestes ensaios são interessantes do ponto de vista industrial, pois ao utilizar menor quantidade de substrato e menor tempo de fermentação (1,25% da biomassa em 120 horas) foi obtido aproximadamente 70% da atividade enzimática máxima observada para β -glucosidase (144 horas de fermentação, utilizando 1,65% de torta de caroço de algodão). Além disso, as atividades enzimáticas observadas neste trabalho foram superiores aos valores obtidos por Santos (2013) utilizando a mesma linhagem fúngica (*A. tubingensis* AN1257) e a mesma fonte de carbono (torta de caroço de algodão), em menor volume fermentativo, o que reflete a possibilidade de ampliação do volume do bioprocesso estabelecido para a produção de β -glucosidase em escala industrial.

A produção de enzimas xilanolíticas em meio fermentativo contendo 1,25 e 1,65% de torta de caroço de algodão resultou nas maiores atividades enzimáticas dentre os ensaios realizados, demonstrando valores de 19,82 U mL⁻¹ e 16,38 U mL⁻¹, respectivamente (FIG. 12-D). A atividade enzimática máxima de xilanases observada neste trabalho apresentou resultados similares a estudos desenvolvidos com outros fungos filamentosos, conforme Tabela 10, o que reflete o potencial de aplicação da linhagem *A. tubingensis* AN1257 na produção destas enzimas.

Tabela 10 – Atividades xilanolíticas obtidas em 72 horas de fermentação submersa utilizando biomassas lignocelulósicas como substrato e fungos filamentosos como agente fermentativo.

| Espécies | Biomassas | Xilanases (U mL ⁻¹) | Fonte |
|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| <i>P. oxalicum</i> | Espiga de milho | 35,00 | Liao <i>et al.</i> , 2015b |
| <i>A. niger</i> | Farelo de trigo | 28,20 | Suleman <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>A. tubingensis</i> | Farelo de trigo | 20,00 | Anasontzis <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>A. tubingensis</i> | Torta de caroço de algodão | 19,82 | O autor |
| <i>A. niger</i> | Espiga de milho | 18,40 | Suleman <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>A. fumigatus</i> * | Palha de arroz | 15,19 | Liu <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>A. niger</i> | Bagaço de cana-de-açúcar | 14,30 | Suleman <i>et al.</i> , 2016 |

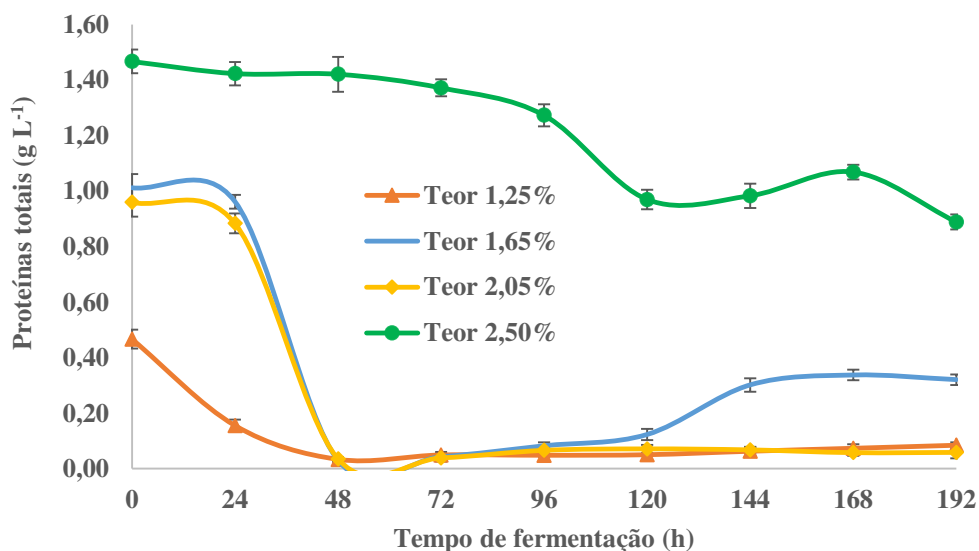
*48 horas de fermentação

A concentração de proteínas totais presentes no extrato enzimático bruto foi determinada concomitantemente com a análise do perfil de produção das enzimas FPases, CMCcase, β -glucosidase e xilanases durante os processos fermentativos. Na Figura 13, observa-se que os ensaios fermentativos conduzidos em 1,25, 1,65, 2,05 e 2,50% de torta de caroço de algodão apresentaram maior concentração de proteínas solúveis no início do processo, seguido da redução na sua concentração. Os resultados obtidos assemelham-se aos observados nos ensaios conduzidos em diferentes valores de pH, discutidos anteriormente, em que a maior concentração de proteínas totais observada no início do processo deve-se à adição de torta de

caroço de algodão ao meio fermentativo, assim como, a redução de proteínas, após o início da fermentação, é consequência do metabolismo do micro-organismo.

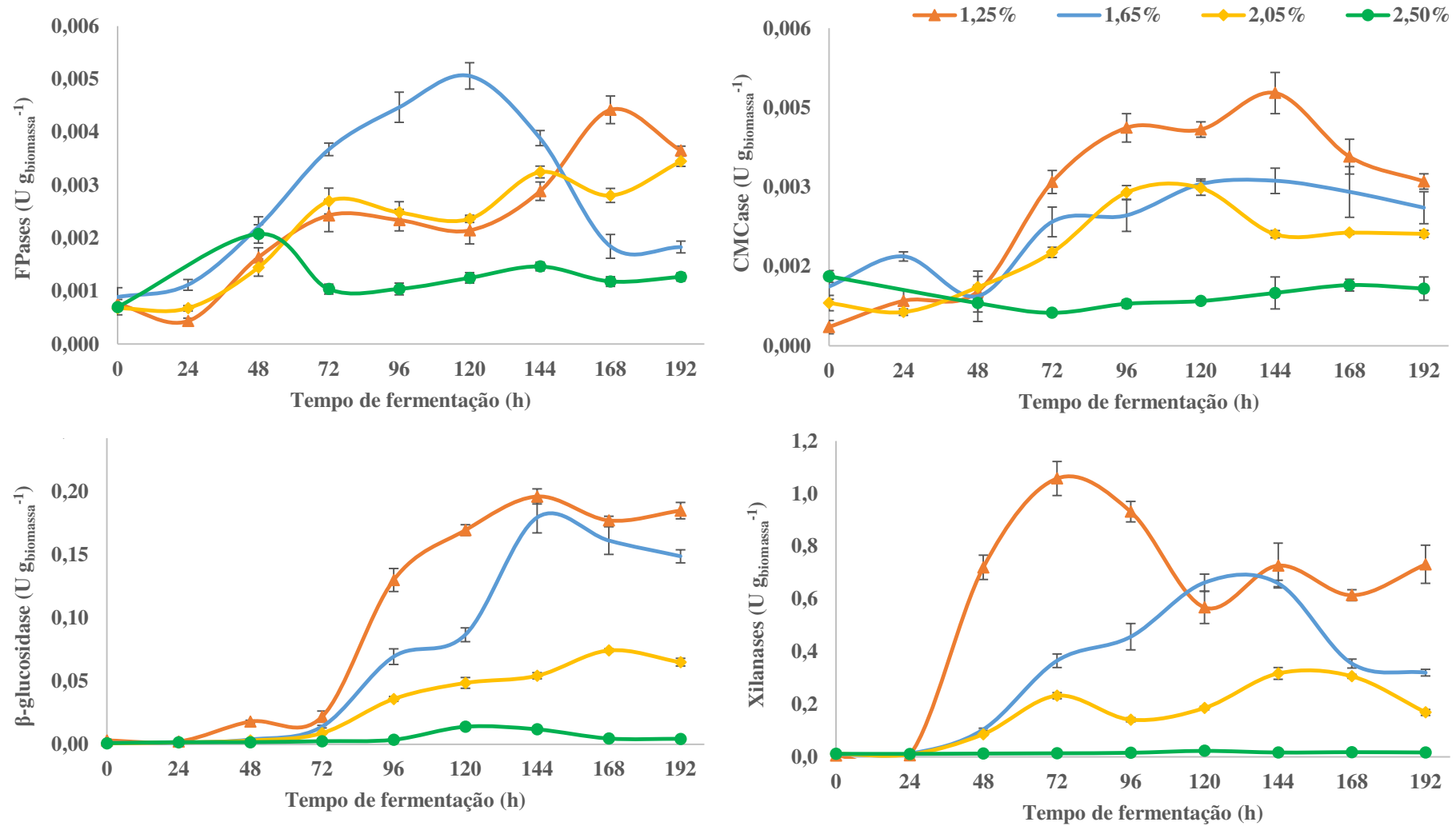
O aumento na concentração de proteínas totais no extrato enzimático bruto, observada nos meios contendo 1,25, 1,65 e 2,05% de torta de caroço de algodão, após 48 horas de bioprocessamento, corresponde ao aumento da produção das enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases, demonstrado na Figura 12. Na fermentação conduzida em 1,65% de torta de caroço de algodão observou-se aumento na concentração de proteínas totais após 120 horas de fermentação, que pode estar associado ao aumento da atividade enzimática de β -glucosidase observado neste ensaio após este período (FIG. 12-C).

Figura 13 – Concentração de proteínas totais determinada durante os ensaios conduzidos em meios de fermentação contendo diferentes concentrações de torta de caroço de algodão (1,25, 1,65, 2,05 e 2,50%), utilizando *A. tubingensis* AN1257 como agente fermentativo.



A produtividade enzimática associada à matéria-prima foi obtida para os ensaios fermentativos utilizando 1,25 a 2,50% de torta de caroço de algodão, através da relação entre as atividades enzimáticas determinadas em cada ensaio e a quantidade de substrato utilizado como fonte de carbono (FIG. 14). A fermentação conduzida em 1,25% de torta de caroço de algodão resultou em maior produtividade para as enzimas CMCCase, β -glucosidase e xilanases, contudo o melhor desempenho produtivo para FPases foi obtido durante a fermentação conduzida em 1,65% do substrato. Estes resultados são significativos para a produção em larga escala, visto que a utilização de menores concentrações de substrato no bioprocessamento resultou em melhor rendimento enzimático.

Figura 14 – Produtividade das enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases determinada através da relação entre as atividades enzimáticas observadas em cada ensaio e a concentração de torta de caroço de algodão utilizada no meio fermentativo como fonte de carbono em diferentes concentrações (1,25, 1,65, 2,05 e 2,50%).



$U\ g_{biomassa}^{-1}$: Unidade de atividade enzimática por grama de torta de caroço de algodão adicionada ao meio fermentativo para a produção enzimática.

O aumento da concentração inicial do substrato utilizado como fonte de carbono para o crescimento da linhagem *A. tubingensis* AN1257 resultou na redução da produtividade enzimática, e na desaceleração da produção de β -glucosidase e xilanases, conforme observado na Figura 12 e Figura 14. Estes resultados podem ser decorrentes da repressão catabólica causada pela maior disponibilidade de açúcares livres no meio fermentativo e por mudanças na morfologia de crescimento do fungo durante a fermentação.

A presença de compostos de carbono facilmente assimiláveis pelos fungos no meio fermentativo, tais como a glicose proveniente da torta de caroço de algodão, pode inibir a expressão gênica de celulases e hemicelulases, mesmo na presença de material lignocelulósico (AHMED; BIBI, 2018; YAO *et al.*, 2015; ZNAMEROSKI *et al.*, 2012). Além disso, as condições do meio, incluindo a concentração do substrato lignocelulósico, podem ocasionar mudanças na morfologia do fungo durante o crescimento, refletindo na viscosidade do meio de cultivo da fermentação submersa, bem como na taxa de absorção de oxigênio, influenciando a produção das enzimas (FERREIRA *et al.*, 2016; GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000; PAPAGIANNI, 2004).

O aumento da viscosidade do meio fermentativo foi observado visualmente entre 48 e 72 horas de fermentação, sobretudo durante os bioprocessos conduzidos em 2,05 e 2,50% de torta de caroço de algodão. Contudo, após 72 horas de bioprocessamento, foi observada a redução da viscosidade do meio fermentativo. O aumento da viscosidade após 48 horas de fermentação está relacionado ao rápido crescimento micelial no início do processo, ao passo que a diminuição da viscosidade em momento posterior resulta da desintegração do micélio primário (micélio completamente formado, com poucas ramificações) e da formação do micélio secundário (micélio altamente ramificado) (LI *et al.*, 2013; SINGHANIA *et al.*, 2014). De acordo com Li *et al.* (2013), o micélio secundário está envolvido na secreção das enzimas celulolíticas, o que pode explicar o aumento da atividade enzimática celulolítica após 48 horas de fermentação (FIG. 12).

A cobertura do canal aerador do biorreator pelos micélios provenientes do crescimento do *A. tubingensis* AN1257 foi observada nas fermentações em meio com 2,05 e 2,50% de torta de caroço de algodão, o que pode ter originado a menor produção enzimática observada nestes ensaios. A inclusão do sistema de aeração objetiva o fornecimento de oxigênio para a atividade respiratória do micro-organismo, desta forma, a obstrução do canal ocasiona a diminuição do oxigênio disponível no meio, levando à baixa performance dos processos biotecnológicos e de produção enzimática (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000). De acordo

com Ferreira *et al.* (2016) e Lennartsson, Erlandsson e Taherzadeh (2014), a produção de enzimas demanda alto gasto energético pelas células, requerendo um processo ativo de geração de adenosina trifosfato (ATP), o qual é dependente da presença de oxigênio.

Os resultados obtidos nestes ensaios contribuem para o aperfeiçoamento dos bioprocessos, evidenciando a importância de se estabelecer as condições particulares para a produção de metabólitos com máxima eficiência, tais como temperatura, pH, fonte de energia e nutrientes (PAPAGIANNI, 2004). A produção de enzimas hidrolíticas pela linhagem *A. tubingensis* AN1257, em especial xilanases e β -glucosidase, apresentou resultados interessantes, sendo influenciada pelas condições fisiológicas e morfológicas de crescimento dos micro-organismos, bem como pela concentração da fonte de carbono utilizada e pelo tempo de fermentação. Tais resultados permitem direcionar a produção enzimática, aplicando-se o tempo e a concentração de substrato necessários à obtenção da enzima desejada.

5.4. Influência da temperatura e do pH sobre a estabilidade e a atividade das enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases

A avaliação da termoestabilidade enzimática demonstrou que as enzimas FPases e β -glucosidase mantiveram aproximadamente 80% de sua atividade quando incubadas sob temperaturas até 40°C durante 24 horas (FIG. 15-A e FIG. 15-C). Contudo, em temperaturas iguais ou superiores à 60°C, as FPases apresentaram aproximadamente 55% de atividade residual, enquanto a atividade enzimática de β -glucosidase foi totalmente perdida. A CMCCase demonstrou estabilidade às temperaturas de 0 a 80°C após 24 horas de incubação, permanecendo com atividade residual superior a 70% nas temperaturas utilizadas (FIG. 15-B). As xilanases demonstraram estabilidade às temperaturas iguais ou inferiores a 40°C, entretanto, demonstraram atividade irrelevante em duas horas de incubação em temperaturas iguais ou superiores à 60°C (FIG. 15-D).

As enzimas FPases e CMCCase demonstraram estabilidade aos valores de pH de 3,0 a 8,0 durante 24 horas de incubação a 25°C, apresentando a menor perda de atividade enzimática nos pHs 3,0 e 4,0 (FIG. 16-A e FIG. 16-B). A β -glucosidase manteve de 60 a 70% de sua atividade quando incubada nos pHs de 3,0 a 5,0 no período de 24 horas, entretanto nos valores de pH 7,0 e 8,0, apresentou atividade irrelevante após duas horas de incubação (FIG. 16-C). As xilanases demonstraram estabilidade reduzida em valores de pH 7,0 e 8,0 após 24 horas de incubação, contudo, manteve-se estável durante 12 horas em pH 6,0 (FIG. 16-D). Nos valores de pH 3,0 - 5,0, as xilanases permaneceram com mais de 80% de sua atividade enzimática inicial, com destaque para o pH 4,0.

Os resultados da termoestabilidade das FPases em temperaturas superiores à 60°C e das xilanases a 50°C demonstraram que estas enzimas apresentaram uma perda de aproximadamente 50% na atividade após seis horas de incubação, contudo, posteriormente, a atividade enzimática permaneceu constante. A perda parcial da atividade enzimática também foi notada durante os ensaios de estabilidade ao pH para as enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases, particularmente quando incubadas em valores de pH maiores ou igual a 6,0. Tais observações sugerem a presença de isoenzimas celulolíticas e xilanolíticas no extrato enzimático produzido por *A. tubingensis* AN1257, verificada pela estabilidade de parte da atividade enzimática inicial após um período de incubação.

Os resultados dos ensaios para a determinação da influência da temperatura sobre a atividade enzimática demonstraram que a maior velocidade de reação das enzimas FPases foi obtida em temperaturas de 40 a 60°C, enquanto a CMCCase foi obtida em temperaturas entre 60 e 80°C (FIG. 17). As enzimas β -glucosidase e xilanases demonstraram maior velocidade reacional nas temperaturas entre 70 e 80°C (FIG. 17). Os ensaios para a determinação da influência do pH demonstraram que os valores de pH entre 3,0 e 5,0 proporcionam uma maior velocidade de reação para as enzimas estudadas (FIG. 18). Contudo, ao relacionar estes resultados com a estabilidade enzimática, nota-se que a temperatura ótima de reação das enzimas situa-se na faixa de 40 a 50°C e que o pH ótimo apresentou o valor de 4,0.

A temperatura e o pH do meio reacional são variáveis que influenciam significativamente a eficiência hidrolítica das enzimas, desta forma o estudo do efeito destes parâmetros na atividade enzimática consiste em particularidade relevante para aplicação industrial. De acordo com os resultados obtidos para as enzimas em estudo, as condições ideais para utilização do extrato enzimático bruto em processos industriais compreende as temperaturas entre 40 e 50°C, e pH 4,0. Tais valores vão de encontro às condições de crescimento requeridas pela espécie *A. tubingensis*, micro-organismo com características mesófilas e acidófilas (POLIZELI *et al.*, 2005).

Figura 15 – Termoestabilidade das enzimas holocelulolíticas produzidas por *A. tubingensis* AN1257 em fermentação submersa em torta de caroço de algodão, incubadas durante 24 horas em pH 5,0.

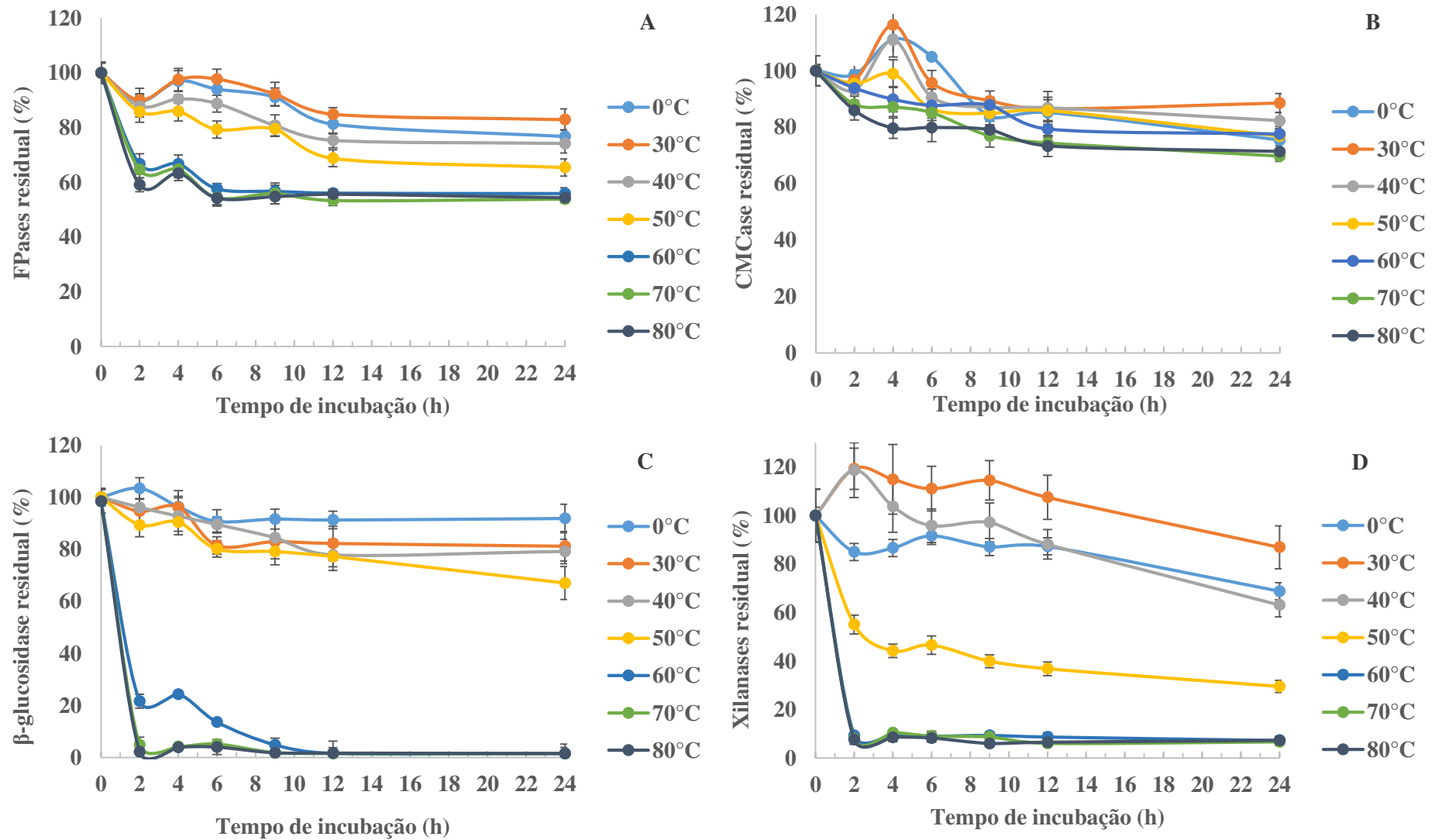


Figura 16 –Estabilidade das enzimas holocelulolíticas produzidas por *A. tubingensis* AN1257 em fermentação submersa em torta de caroço de algodão, incubadas durante 24 horas à temperatura de 25°C.

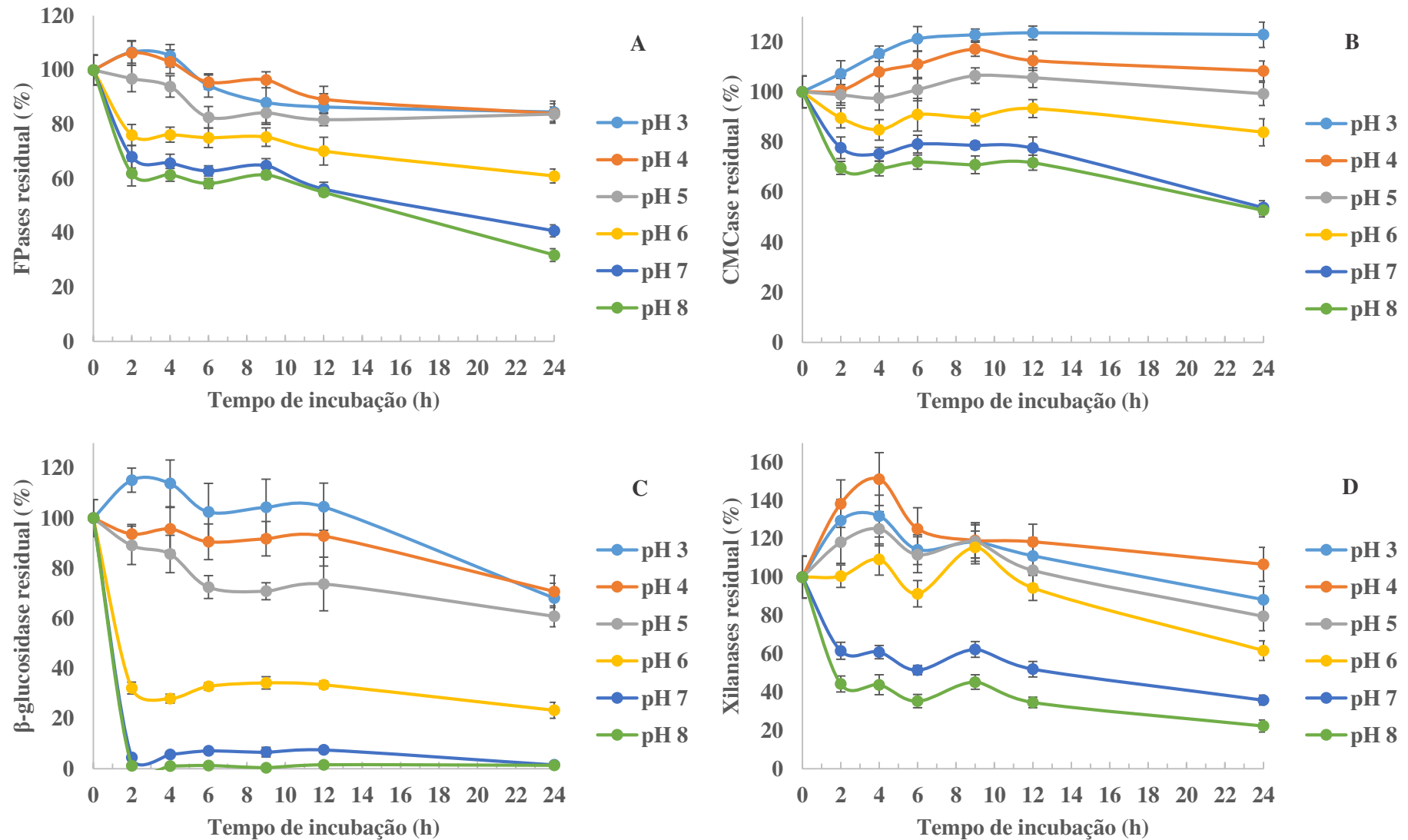


Figura 17 – Efeito da temperatura na atividade das enzimas holocelulolíticas produzidas por *A. tubingensis* AN1257, por fermentação submersa em meio contendo 1,25% torta de caroço de algodão.

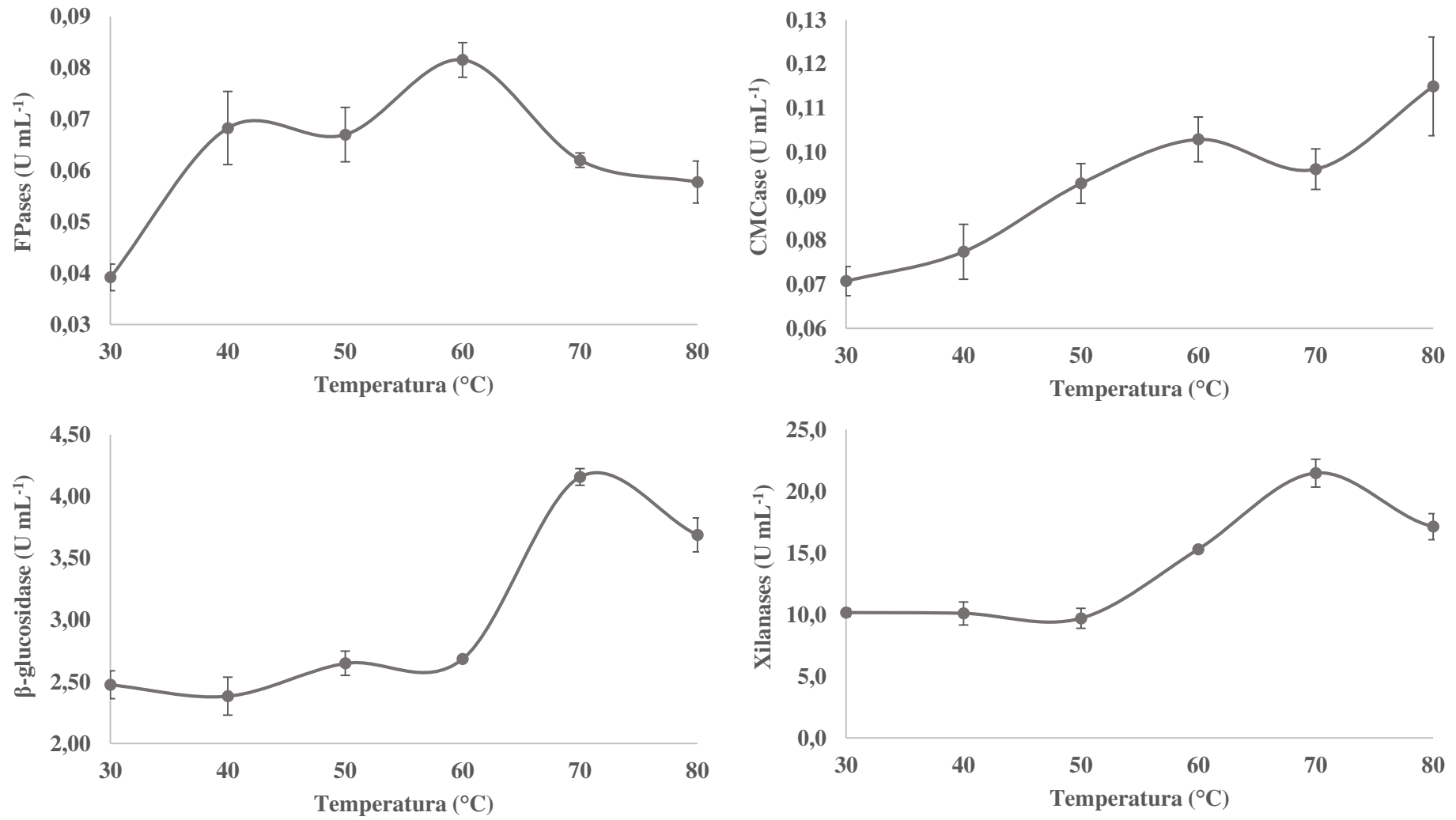
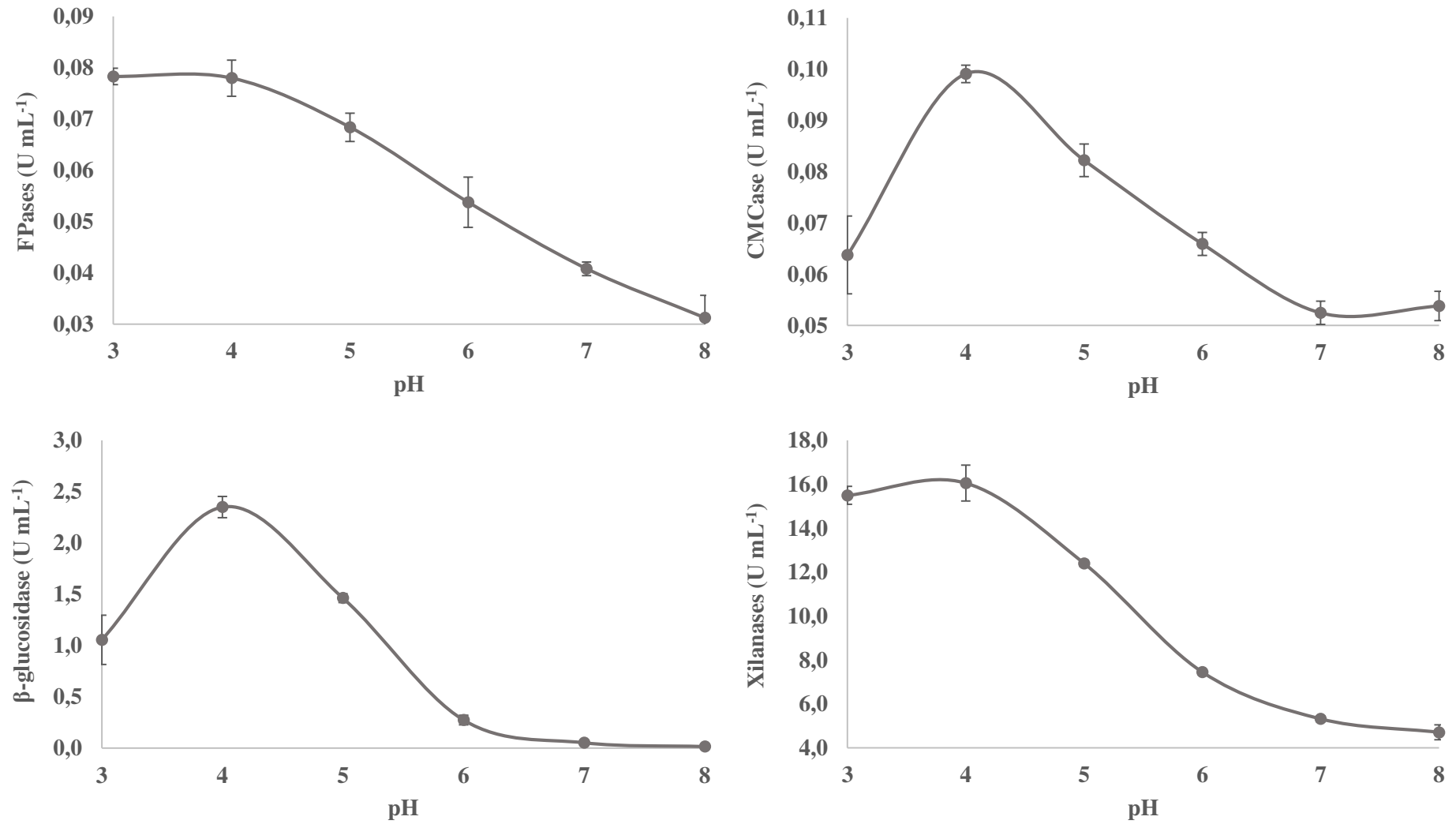


Figura 18 - Efeito do pH na atividade das enzimas holocelulolíticas produzidas por *A. tubingensis* AN1257 por fermentação submersa em meio contendo 1,25% torta de caroço de algodão.



5.5. Concentração das enzimas do extrato enzimático por *salting-out*

O processo de concentração das enzimas presentes no extrato enzimático bruto, produzido durante a fermentação em meio contendo 1,65% de torta de caroço de algodão, resultou no aumento da atividade enzimática (TAB. 11) e da atividade específica (TAB. 12) das enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases. A determinação das atividades enzimáticas nos extratos bruto e concentrado evidenciou que as enzimas xilanases e β -glucosidase apresentaram maior rendimento em atividade enzimática, com concentração de 26 e 22 vezes, respectivamente. A CMCCase demonstrou aumento de sua atividade enzimática em 15 vezes, entretanto, apresentou uma perda de aproximadamente 36% na sua atividade. Tal perda pode ser inerente ao processo de purificação, ou pode indicar a existência de uma estrutura molecular mais susceptível à desnaturação pelo processo de *salting-out*.

Tabela 11 – Atividades enzimáticas de FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases presentes no extrato enzimático bruto produzido durante a fermentação conduzida em meio contendo 1,65% de torta de caroço de algodão e no extrato enzimático concentrado por *salting-out*.

| Extrato enzimático | Atividade enzimática (U mL ⁻¹) | | | |
|--------------------|---|--------|----------------------|-----------|
| | FPases | CMCase | β -glucosidase | Xilanases |
| Bruto | 0,037 | 0,074 | 3,010 | 6,953 |
| Concentrado | 0,556 | 1,157 | 79,083 | 149,756 |

Os dados contidos na Tabela 12 demonstram que após a purificação parcial por *salting-out*, as enzimas FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases aumentaram sua atividade específica em 2,41, 2,49, 3,43 e 4,19 vezes, respectivamente, denotando um aumento no nível de pureza das enzimas presentes no extrato enzimático bruto. Este resultado repercute na capacidade catalítica das enzimas, aumentando sua especificidade pelo substrato.

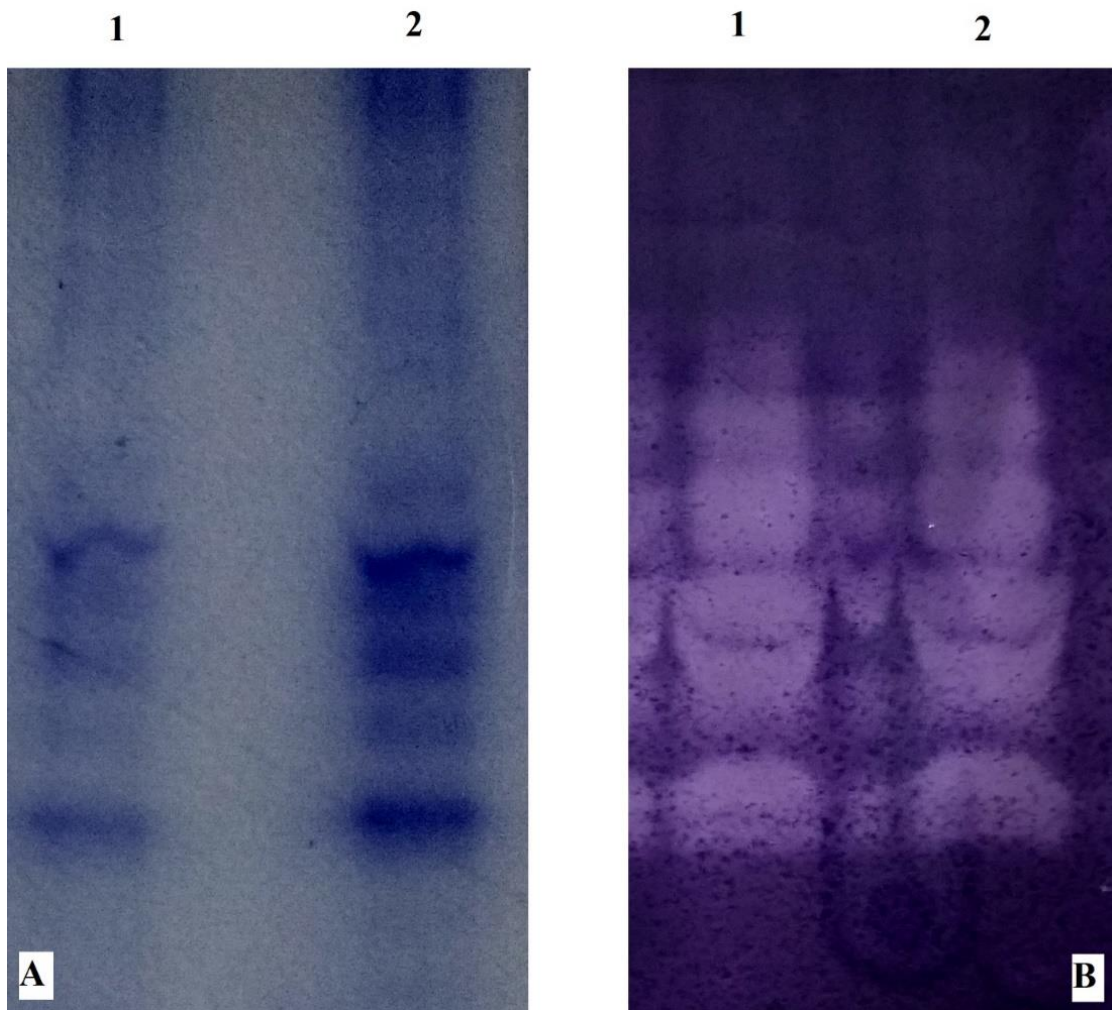
Tabela 12 - Atividades específicas (U mg⁻¹) de FPases, CMCCase, β -glucosidase e xilanases presentes no extrato enzimático bruto produzido durante a fermentação conduzida em meio contendo 1,65% de torta de caroço de algodão e no extrato enzimático concentrado por *salting-out*.

| Extrato enzimático | Proteínas totais (g L ⁻¹) | Atividade específica (U mg ⁻¹) | | | |
|------------------------------|--|---|-------------|----------------------|-------------|
| | | FPase | CMCase | β -glucosidase | Xilanases |
| Bruto | 0,213 | 0,17 | 0,35 | 32,55 | 14,09 |
| Concentrado | 1,340 | 0,41 | 0,86 | 111,79 | 59,04 |
| Índice de purificação | | 2,41 | 2,49 | 3,43 | 4,19 |

5.6. Perfil de proteínas e de celulases presentes no extrato enzimático

As bandas reveladas em gel SDS-PAGE demonstraram a presença de proteínas com diferentes pesos moleculares no extrato enzimático concentrado, conforme Figura 19-A. Além disso, a análise do perfil de celulases produzidas por *A. tubingensis* AN1257, realizada por zimograma, revelou uma grande diversidade de atividade celulolítica (FIG. 19-B), o que indica a existência de múltiplas isoformas dessas enzimas no secretoma do *A. tubingensis* AN1257. Estes resultados abrem as possibilidades para a realização de novos estudos com foco na purificação e caracterização destas enzimas.

Figura 19 – Bandas proteicas reveladas para o extrato enzimático produzido por *A. tubingensis* AN1257 concentrado por *salting-out*. (A) perfil de proteínas em SDS-PAGE revelado por Azul de Coomassie; (B) zimograma utilizando 0,1% de carboximetilcelulose, revelado por Vermelho Congo. (1) inserção de 20 μL da amostra; (2) inserção de 30 μL da amostra.



5.7. Eficiência hidrolítica do extrato enzimático bruto na sacarificação de biomassas lignocelulósicas

Os resultados da hidrólise enzimática das biomassas lignocelulósicas (torta de macaúba, bagaço de cana-de-açúcar, torta de caroço de algodão, torta de girassol e torta de mamona), expressos por gramas de glicose e açúcares redutores liberados por unidade de atividade enzimática em papel filtro (g FPU⁻¹), encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 – Concentração de glicose e açúcares redutores após 48 horas de sacarificação enzimática das biomassas torta de macaúba, bagaço de cana-de-açúcar, torta de caroço de algodão, torta de girassol e torta de mamona.

| Biomassas | Extratos enzimáticos | Glicose (g FPU ⁻¹) | AR (g FPU ⁻¹) |
|----------------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Torta de macaúba | Controle | NA | NA |
| | AN1257 | 0,0672 ^a | 0,0773 ^a |
| | Cellic® CTec2 | 0,0618 ^a | 0,0637 ^b |
| | Mix | 0,0813 ^b | 0,0965 ^c |
| Bagaço de cana-de-açúcar | Controle | NA | NA |
| | AN1257 | 0,0136 ^a | 0,0312 ^a |
| | Cellic® CTec2 | 0,0470 ^b | 0,0590 ^b |
| | Mix | 0,0398 ^b | 0,0565 ^b |
| Torta de caroço de algodão | Controle | NA | NA |
| | AN1257 | 0,0020 ^a | 0,0103 ^a |
| | Cellic® CTec2 | 0,0051 ^b | 0,0082 ^b |
| | Mix | 0,0047 ^c | 0,0142 ^c |
| Torta de girassol | Controle | NA | NA |
| | AN1257 | 0,0005 ^a | 0,0188 ^a |
| | Cellic® CTec2 | 0,0019 ^b | 0,0103 ^b |
| | Mix | 0,0018 ^c | 0,0229 ^c |
| Torta de mamona | Controle | NA | NA |
| | AN1257 | 0,0003 ^a | 0,0041 ^a |
| | Cellic® CTec2 | 0,0016 ^b | 0,0062 ^b |
| | Mix | 0,0019 ^c | 0,0040 ^c |

AR: açúcares redutores. NA: não se aplica. Controle: tratamento sem adição de extrato enzimático. AN1257: extrato enzimático bruto produzido por *A. tubingensis* AN1257 em fermentação submersa em 1,25% de torta de caroço de algodão. Cellic® CTec2: extrato enzimático comercial. Mix: solução enzimática contendo 50% (v/v) de extrato AN1257 e 50% (v/v) de extrato Cellic® CTec2. Letras diferentes na mesma coluna indicam a existência de diferença entre as médias dos tratamentos de cada biomassa, a 5% de significância pelo Teste de Tukey.

A utilização do extrato enzimático Cellic® CTec2 no processo de sacarificação das biomassas resultou em maior liberação de glicose por FPU, com exceção da torta de macaúba e de mamona. A torta de macaúba, torta de caroço de algodão e torta de girassol apresentaram maior liberação de açúcares redutores (g FPU⁻¹) durante a sacarificação pelo extrato AN1257 e Mix, comparados ao Cellic® CTec2 (TAB. 13). Este resultado advém da provável presença de uma variedade de enzimas no extrato AN1257, bem como da existência de maior sinergia entre as holocelulases presentes neste extrato ao agirem em biomassas com maior conteúdo

hemicelulósico. De acordo com Hu *et al.* (2013), a hidrólise das moléculas de hemicelulose aumenta a exposição das fibrilas da celulose, facilitando a acessibilidade a este substrato, o que proporciona maior taxa de conversão dos polissacarídeos contidos na biomassa.

Dentre os ensaios realizados, observou-se que as maiores concentrações de glicose e açúcares redutores foram obtidas durante a sacarificação da torta de macaúba pelo extrato Mix, com valores de 0,081 e 0,097 g FPU⁻¹, respectivamente (TAB. 13). Estes resultados estão atrelados não somente ao aumento na sinergia proporcionado pela combinação das celulases presentes no extrato Cellic® CTec2 com as hemicelulases provenientes do extrato AN1257, como também à composição química da biomassa. A torta de macaúba possui alto teor de amido (TAB. 14), o qual pode ter sido hidrolisado durante o processo de sacarificação, uma vez que o extrato enzimático produzido pelo *A. tubingensis* pode conter amilases e amiloglucosidades (MANGER-JACOB *et al.*, 2005)

Tabela 14 – Composição química das biomassas utilizadas durante o processo de sacarificação: torta de macaúba, bagaço de cana-de-açúcar, torta de caroço de algodão, torta de mamona e torta de girassol.

| Parâmetros (g 100 g _{amostra} ⁻¹) | Macaúba | Bagaço de cana-de-açúcar | Algodão | Mamona | Girassol |
|---|------------|-----------------------------|------------|------------|------------|
| Amido | 23,16±0,95 | 3,81±0,48 | 2,04±0,43 | 5,74±0,22 | 4,04±0,38 |
| Celulose | 11,49±1,08 | 43,09±0,18 | 22,61±1,66 | 12,59±0,96 | 23,22±0,30 |
| Hemicelulose | 9,60±0,79 | 33,58±0,22 | 14,22±3,24 | 6,05±0,18 | 20,55±1,22 |
| Lignina | 4,33±0,12 | 10,20±0,52 | 8,38±1,21 | 5,68±0,48 | 9,77±0,67 |

Os resultados da eficiência hidrolítica obtidos neste trabalho são explicados pela variedade de enzimas presentes no extrato enzimático AN1257 e pelas características estruturais das biomassas utilizadas (CATETO; HU; RAGAUSKAS, 2011; MADADI; TU; ABBAS, 2017). A adição de xilanases (GOLDBECK *et al.*, 2016; HU; ARANTES; SADDLER, 2011; HU *et al.*, 2013) e β -glucosidase (YAO *et al.*, 2016) a extratos enzimáticos celulolíticos promove a cooperação sinérgica entre as enzimas, aumentando significativamente a hidrólise dos polissacarídeos presentes nos materiais lignocelulósicos, o que pôde ser observado ao se utilizar o extrato Mix. Além disso, a composição da parede celular, o tamanho e a estrutura ramificada da xilana presente na hemicelulose (HU; ARANTES; SADDLER, 2011; HU *et al.*, 2013), bem como a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose (FLORÊNCIO; BADINO; FARINAS, 2017) podem restringir a acessibilidade das enzimas às ligações glicosídicas.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a linhagem *A. tubingensis* AN1257 consiste em uma espécie promissora para a produção de enzimas holocelulolíticas, particularmente β -glucosidases e xilanases. A produção das enzimas FPases, CMCase, β -glucosidase e xilanases por fermentação submersa foi influenciada pelo pH, bem como pela concentração inicial da torta de caroço de algodão, utilizada como fonte de carbono no meio fermentativo. Desta forma, as melhores condições fermentativas para a produção destas enzimas, considerando os parâmetros estudados neste trabalho, consistem na utilização de 1,25% de torta de caroço de algodão em bioprocessamento sem o controle do pH.

A caracterização do extrato enzimático bruto demonstrou que a linhagem *A. tubingensis* AN1257 expressa variedade de proteínas e isoformas de celulasas quando cultivada por fermentação submersa utilizando torta de caroço de algodão. Além disso, foi constatado que as condições ideais para aplicação industrial do extrato enzimático bruto estão compreendidas nas temperaturas de 40 a 50°C e no valor de pH 4,0.

A aplicação do extrato enzimático bruto em processos de sacarificação de resíduos lignocelulósicos demonstrou resultados promissores comparados ao extrato enzimático comercial Cellic® CTec2, particularmente em biomassas com maior conteúdo hemicelulósico. Além disso, a utilização do extrato AN1257 em conjunto com coquetéis celulolíticos demonstrou maior cooperação sinérgica entre as enzimas, resultando em eficiência hidrolítica superior ao Cellic® CTec2.

O desenvolvimento deste trabalho idealiza novas possibilidades tecnológicas para a consolidação da produção de enzimas holocelulolíticas, a partir da utilização da espécie *A. tubingensis* e de resíduos agroindustriais da cadeia bioenergética em bioprocessos industriais. A aplicação conjunta da linhagem *A. tubingensis* AN1257 e da torta de caroço de algodão na produção de enzimas holocelulolíticas não se exaure com este trabalho, visto que os resultados obtidos justificam o desenvolvimento de novas pesquisas. A utilização de biorreator instrumentado permite o controle das condições de cultivo, dentre elas, a intensidade de agitação e de aeração, assim como, a tensão de oxigênio dissolvido, parâmetros atuantes na morfologia de crescimento do fungo e na produção de metabólitos, que podem ser explorados em estudos futuros para a produção em larga escala.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADITIYA H. B.; MAHLIA T. M. I.; CHONG W. T.; HADI NUR; SEBAYANG A. H. Second generation bioethanol production: a critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. [S.l.], v.66, p.631-653, 2016.
- AGBOBO F. K.; COWARD-KELLY G.; TORRY-SMITH M.; WENGER K.; JEFFRIES T. W. The effect of initial cell concentration on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. [S.l.], v.137-140, p.653-662, 2007.
- AHMED A.; BIBI A. Fungal cellulase; production and applications: minireview. **LIFE: International Journal of Health and Life Sciences**. [S.l.], v.4, n.1, p.19-36, 2018.
- AHMED S. A.; EL-SHAYEB N. M. A.; HASHEM A. M.; SALEH S. A. A.; ABDEL-FATTAH A. F. Chemical modification of *Aspergillus niger* β -glucosidase and its catalytic properties. **Brazilian Journal of Microbiology**. [S.l.], v.46, n.1, p.23-28, 2015.
- ANASONTZIS G. E.; THUY N. T.; HANG D. T. M.; HUONG H. T.; THANH D.T.; HIEN D. D.; THANH V. N.; OLSSON L. Rice straw hydrolysis using secretomes from novel fungal isolates from Vietnam. **Biomass and Bioenergy**. [S.l.], v.99, p.11-20, 2017.
- ARANTES V.; SADDLER J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**. [S.l.], v.3, n.4, 2010.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. Washington: AOAC, 1992.
- BAILEY M. J.; BIELY P.; POUTANEN K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**. [S.l.], v.23, p.257-270, 1992.
- BATHOORN E.; SALAZAR N. E.; SEPEHRKHOUY S.; MEIJER M.; de COCK H.; HAAS P. Involvement of the opportunistic pathogen *Aspergillus tubingensis* in osteomyelitis of the maxillary bone: a case report. **BMC Infectious Diseases**. [S.l.], v.13, n.1, p.59, 2013.
- BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. [S.l.], v.72, p.248-254, 1976.
- ABRAPA - BRAZILIAN ASSOCIATION OF COTTON PRODUCERS. The brazilian cotton chain: challenges and strategies. **Abrapa Biennial 2011/2012**, 2012.
- CARRERA R. A. B.; VELOSO C. M.; KNUPP L. S.; SOUZA Jr A. H.; DETMANN E.; LANA R. P. Protein co-products and by-products of the biodiesel industry for ruminants feeding. **Revista Brasileira de Zootecnia**. [S.l.], v.41, n.5, p.1202-1211, 2012.
- CATETO C.; HU G.; RAGAUSKAS A. Enzymatic hydrolysis of organosolv Kanlow switchgrass and its impact on cellulose crystallinity and degree of polymerization. **Energy & Environmental Science**. [S.l.], v.4, p.1516-1521, 2011.
- CHENG J. J.; TIMILSINA G. R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: a review. **Renewable Energy**. [S.l.], v.36, p.3541-3549, 2011.

CHIMPHANGO A. F. A.; ZYL W. H. V.; GÖRGENS J. F. Isolation, characterization and enzymatic modification of water soluble xylans from *Eucalyptus grandis* wood and sugarcane bagasse. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. [S.l.], v.87, p.1419–1429, 2012.

CHIOTTA M. L.; PONSONE M. L.; SOSA D. M.; COMBINA M.; CHULZE S. N. Biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* populations in Argentinian vineyards and ochratoxin A contamination. **Food microbiology**. [S.l.], v.36, n.2, p.182–90, 2013.

CHO S. M.; JEONG S. E.; LEE K. R.; SUDHANI H. P. K.; KIM M.; HONG S.; CHUNG S. H. Biodegradation of ochratoxin a by *Aspergillus tubingensis* isolated from meju. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. [S.l.], v.26, n.10, p.1687-1695, 2016.

CHOQUE E.; KLOPP C.; VALIERE S.; RAYNAL J.; MATHIEU F. Whole-genome sequencing of *Aspergillus tubingensis* G131 and overview of its secondary metabolism potential. **BMC Genomics**. [S.l.], v.19, n.1, p.200, 2018.

COCHRANE V. W. **Physiology of fungi**. New York: Wiley; 1958. Disponível em: <<https://archive.org/details/physiologyoffung00coch>>. Acesso em: 25 mar 2019.

COLLINS T.; GERDAY C.; FELLER G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**. [S.l.], v.29, p.3–23, 2005.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Série histórica das safras: algodão (10/05/2019)**. 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras>>. Acesso em: 14 mai. 2019.

COSTA P. dos S.; ROBL D.; COSTA I. C.; LIMA D. J. da S.; COSTA A. C.; PRADELLA J. G. da C. Potassium biphthalate buffer for ph control to optimize glycosyl hydrolase production in shake flasks using filamentous fungi. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. [S.l.], v.34, n.2, p.439-450, 2017.

DELABONA P. da S.; LIMA D. J.; ROBL D.; RABELO S. C.; FARINAS C. S.; PRADELLA J. G. da C. Enhanced cellulase production by *Trichoderma harzianum* by cultivation on glycerol followed by induction on cellulosic substrates. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. [S.l.], v.43, p.617-626, 2016.

dos REIS L.; SCHNEIDER W. D. H.; FONTANA R. C.; CAMASSOLA M.; DILLON A. J. P. Cellulase and xylanase expression in response to different pH levels of *Penicillium echinulatum* S1M29 medium. **Bioenergy Research**. [S.l.], v.7, n.1, p.60-67, 2014.

DUTTA K.; DAVEREY A.; LIN J. Evolution retrospective for alternative fuels: first to fourth generation. **Renewable Energy**. [S.l.], v.69, p.114-122, 2014.

EL-NAHRAWY S.; METWALLY M.; EL-KODOOS R. Y. A.; BELAL E. B.; SHABANA S. A.; EL-REFAI I. M. Optimization of culture conditions for production of cellulase by *Aspergillus tubingensis* KY615746. **Environment Biodiversity and Soil Security**. [S.l.], v.1, p.177-189, 2017.

EPE - Empresa de Pesquisa Energética. **Projeção da demanda de energia elétrica para os próximos 10 anos (2017-2026)**. Série: Estudos da demanda. Nota técnica DEA 001/17, 2017.

FERREIRA J. A.; MAHBOUBI A.; LENNARTSSON P. R.; TAHERZADEH M. J. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: present status and future prospects. **Bioresource Technology**. [S.l.], v.215, p.334–345, 2016.

FLORENCIO C.; BADINO A. C.; FARINAS C. S. Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. **Química Nova**. [S.l.], v.40, n.9, p.1082-1093, 2017.

GHOSE T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**. [S.l.], v.59, n.2, p.257-268, 1987.

GIBBS P. A.; SEVIOUR R. J.; SCHMID F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**. [S.l.], v.20, n.1, p.17-48, 2000.

GOLDBECK R.; GONCALVES T. A.; DAMÁSIO A. R. L.; BRENELLI L. B.; WOLF L. D.; PAIXÃO D. A. A.; ROCHA G. J. M.; SQUINA F. M. Effect of hemicellulolytic enzymes to improve sugarcane bagasse saccharification and xylooligosaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**. [S.l.], v.131, p.36–46, 2016.

GUPTA A.; GAUTAM N.; MODI D. R. Optimization of α -amylase production from free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research**. [S.l.], v.1, n.1, p.001-008, 2010.

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

HASSALL AND ASSOCIATES. Value of research investment relating to the waste classification of cotton gin trash. **Off Farm Series: Final Report**. Narrabri, Australia, 2005.

HORN B. W.; OLARTE R. A.; PETERSON S. W.; CARBONE I. Sexual reproduction in *Aspergillus tubingensis* from section *Nigri*. **Mycologia**. [S.l.], v.105, n.5, p.1153–63, 2013.

HU J.; ARANTES V.; PRIBOWO A.; SADDLER J. N. The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a “cellulase mixture” but is highly substrate specific. **Biotechnology for Biofuels**. [S.l.], v.6, p.112, 2013.

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

JIMÉNEZ-QUERO A.; POLLET E.; ZHAO M.; MARCHIONI E.; AVEROUS L.; PHALIP V. Fungal fermentation of lignocellulosic biomass for itaconic and fumaric acid production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. [S.l.], v.27, n.1, p.1-8, 2017.

JUNIOR A. B.; BORGES D. G.; TARDIOLI P. W.; FARINAS C. S. Characterization of β -glucosidase produced by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation and partially purified using manae-agarose. **Biotechnology Research International**. [S.l.], v.2014, 8 pages, 2014. Article ID 317092.

- JUTURU V.; WU J. C. Microbial cellulases: engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. [S.l.], v.33, p.188–203, 2014.
- KIRK K.; CULLEN D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white rot fungi. In: YOUNG R. A.; AKHTAR M. **Environmental friendly technologies for pulp and paper industry**. New York, USA. Wiley, p.273–307, 1998.
- LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. [S.l.], v.227, p.680-685, 1970.
- LAVOINE N.; DESLOGES I.; DUFRESNE A.; BRAS J. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: a review. **Carbohydrate Polymers**. [S.l.], v.90, p.735-764, 2012.
- LENNARTSSON P. R.; ERLANDSSON P.; TAHERZADEH M. J. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. **Bioresource Technology**. [S.l.], v.165, p.3–8, 2014.
- LI C.; YANG Z.; ZHANG R.; ZHANG D.; CHEN S.; MA L. Effect of pH on cellulase production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis. **Journal of Biotechnology**. [S.l.], v.168, p.470–477, 2013.
- LI H.; WU H.; XIONG L.; CHEN X.; WANG C.; QI G.; HUANG C.; GUO H.; LUO M.; LIU J.; LONG M.; CHEN X. The hydrolytic efficiency and synergistic action of recombinant xylan-degrading enzymes on xylan isolated from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Polymers**. [S.l.], v.175, p.199-206, 2017.
- LI H.; WU J.; JIANG F.; XUE Y.; LIU J.; GAN L. ALI N.; LONG M. Functional expression and synergistic cooperation of xylan-degrading enzymes from *Hypocrea orientalis* and *Aspergillus niger*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. [S.l.], v.90, n.11, p.2083–2091, 2015.
- LI Z. J.; SHUKLA V.; WENGER K. S.; FORDYCE A. P.; PEDERSEN A. G.; MARTEN M. R. Effects of increased impeller power in a production scale *Aspergillus oryzae* fermentation. **Biotechnology Progress**. [S.l.], v.18, p.437-444, 2002.
- LIAO H.; FAN X.; MEI X.; WEI Z.; RAZA W.; SHEN Q.; XU Y. Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification. **Biomass and bioenergy**. [S.l.], v.7, n.4, p.122-134, 2015a.
- LIAO H.; ZHENG H.; LI S.; WEI Z.; MEI X.; MA H.; SHEN Q.; XU Y. Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Scientific Reports**. [S.l.], v.5, n.12631, 2015b.
- LIU D.; LI J.; ZHAO S.; ZHANG R.; WANG W.; MIAO Y.; SHEN Y.; SHEN Q. Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of different carbon sources. **Biotechnology for Biofuels**. [S.l.], v.6, n.149, 2013.
- LLOYD J. B.; WHELAN W. J. An improved method for enzymic determination of glucose in the presence of maltose. **Analytical Biochemistry**. [S.l.], v.30, p.467-470, 1969.

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

MADADI M.; TU Y.; ABBAS A. Recent status on enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass for bioethanol production. **Electronic Journal of Biology**. [S.l.], v.13, n.2, p.135-143, 2017.

MADHAVAN A.; SRIVASTAVA A.; KONDO A.; BISARIA V. S. Bioconversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Critical Reviews in Biotechnology**. [S.l.], v.32, p.22-48, 2012.

MANDAL A. Review on microbial xylanases and their applications. **International Journal of Life Sciences**. [S.l.], v.4, n.3, p.178-187, 2015.

MANDELS, M.; STERNBERG D. Recent advances in cellulase technology. **Journal of Fermentation Technology**. [S.l.], v.54, p.267-286, 1976.

MANGER-JACOB F.; MÜLLER T.; JANSSEN M.; HÖFER M.; HÖLKER U. Isolation and sequencing of a new glucoamylase gene from an *Aspergillus niger* aggregate strain (DSM 823) molecularly classified as *Aspergillus tubingensis*. **Antonie van Leeuwenhoek**. [S.l.], v.88, n.3-4, p.267-275, 2005.

MARQUES F. Bioenergia: obstáculos no caminho <https://revistapesquisa.fapesp.br/2018/06/18/obstaculos-no-caminho/>. **Pesquisa FAPESP**. [S.l.], n.268, p.58-63, 2018. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/2018/06/18/obstaculos-no-caminho/>>. Acesso em: 07 jun. 2019.

MATKAR K.; CHAPLA D.; DIVECHA J.; NIGHOJKAR A.; MADAMWAR D. Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**. [S.l.], v.78, p.24-33, 2013.

McCREADY R. M.; GUGGOLZ A.; SILVEIRA V.; OWENS H. S. Determination of starch and amylase in vegetables; application to peas. **Analytical Chemistry**. Washington, v.22, p.1156-1158, 1950.

McILVAINE T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**. [S.l.], v.49, p.183-186, 1921.

McINTOSH S.; VANCOV T.; PALMER J.; MORRIS S. Ethanol production from cotton gin trash using optimised dilute acid pretreatment and whole slurry fermentation processes. **Bioresource Technology**. [S.l.], v.173, p.42-51, 2014.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. [S.l.], v.31, p.426-428, 1959.

MOSSERAY, R. *Aspergillus tubingensis* (Schöber) Mosseray. **La Cellule**. v.43, p.245-247, 1934. Disponível em: <<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Link=T&TableKey=1468261600000063&Rec=12099&Fields=All>>. Acesso em: 02 mar 2019.

MRUDULA S.; MURUGAMMAL R. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**. [S.l.], v.42, p.1119-1127, 2011.

MUSONI M.; DESTAIN J.; THONART P.; BAHAMA J.; DELVIGNE F. Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: from traditional methods to engineered systems. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**. [S.l.], v.19, n.4, p.430-442, 2015.

NIVALA O.; MATTINEN M.; FACCIO G.; BUCHERT J.; KRUIUS K. Discovery of novel secreted fungal sulfhydryl oxidases with a plate test screen. **Applied microbiology and biotechnology**. [S.l.], v.97, n.21, p.9429–9437, 2013.

NYKO, D.; GARCIA J. L. F.; MILANEZ A. Y.; DUNHAM F. B. A corrida tecnológica pelos biocombustíveis de segunda geração: uma perspectiva comparada. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n.32, p.5-48, 2010.

ORIENTE A.; TRAMONTINA R.; ANDRADES D. de; HENN C.; SILVA J. L. C.; SIMÃO R. C. G.; MALLER A.; POLIZELI M. L. T. M.; KADOWAKI M. K. Characterization of a novel *Aspergillus niger* β -glucosidase tolerant to saccharification of lignocellulosic biomass products and fermentation inhibitors. **Chemical Papers**. [S.l.], v.69, n.8, p.1050-1057, 2015.

PANDEY A. Solid-state fermentation, **Biochemical Engineering Journal**. [S.l.], v.13, p.81-84, 2003.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. **Biotechnology Advances**. [S.l.], v.22, p.189-259, 2004.

PAULY M.; KEEGSTRA K. Harnessing plant biomass for biofuels and biomaterials: cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. **The Plant Journal**. [S.l.], v.54, p.559-568, 2008.

PÉREZ J.; MUÑOZ-DORADO J.; RUBIA T. de la; MARTÍNEZ J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**. [S.l.], v.5, n.2, p.53-63, 2002.

PETERSON R.; GRINYER J.; NEVALAINEN H. Extracellular hydrolase profiles of fungi isolated from koala faeces invite biotechnological interest. **Mycological Progress**. [S.l.], v.10, p.207–218, 2011.

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

POOVAIAH C. R.; NAGESWARA-RAO M.; SONEJI J. R.; BAXTER H. L.; STEWART JR C. N. Altered lignin biosynthesis using biotechnology to improve lignocellulosic biofuel feedstocks. **Plant Biotechnology Journal**. [S.l.], v.12, p.1163–1173, 2014.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2018. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 02 jul 2018.

ROZEBOOM H. J.; BELDMAN G.; SCHOLS H. A.; DIJKSTRA B. W. Crystal structure of endo-xylogalacturonan hydrolase from *Aspergillus tubingensis*. **The FEBS journal**. [S.l.], v.280, n.23, p.6061–6069, 2013.

SAJITH S.; PRIJI P.; SREEDEVI S.; BENJAMIN S. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. **Journal of Nutrition & Food Sciences**. [S.l.], v.6, n.1, 2016.

SAMSON R. A.; VISAGIE C. M.; HOUBRAKEN J.; HONG S. B.; HUBKA V.; KLAASSEN C. H. W.; PERRONE G.; SEIFERT K. A.; SUSCA A.; TANNEY J. B.; VARGA J.; KOCSUBÉ S.; SZIGETI G.; YAGUCHI T.; FRISVAD J. C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in mycology**. [S.l.], v.78, p.141-173, 2014.

SANTOS J. A. dos; VIEIRA J. M. F.; VIDEIRA A.; MEIRELLES L. A.; RODRIGUES A.; TANIWAKI M. H.; SETTE L. D. Marine-derived fungus *Aspergillus cf. tubingensis* LAMAI 31: a new genetic resource for xylanase production. **AMB Express**. [S.l.], p.6-25, 2016.

SANTOS, R. S. dos. **Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por fungos filamentosos utilizando resíduos da cadeia do biodiesel como fonte de carbono**. 2013. 107 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciências Exatas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2013.

SANTOS, R. S. dos. **Produção de hidrolases holocelulolíticas por fermentação em estado sólido com uso de fungos filamentosos e coprodutos da agroindústria de óleos vegetais como fontes de carbono**. 2015. 168 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2015.

SIMS R.; TAYLOR M.; SADDLER J. From 1st to 2nd generation biofuel technologies: an overview of current industry and RD&D activities. **IEA Bioenergy**. 2008.

SINGHANIA R. R.; SAINI J. K.; SAINI R.; ADSUL M.; MATHUR A.; GUPTA R.; TULI D. K. Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *Penicillium janthinellum* cellulases. **Bioresource Technology**. [S.l.], v.169, p.490–495, 2014.

SINGHANIA R. R.; SUKUMARAN R. K.; PATEL A. K.; LARROCHE C.; PANDEY A. advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial celulasas. **Enzyme and Microbial Technology**. [S.l.], v.46, p.541-549, 2010.

SOHAIL M.; AHMAD A.; KHAN S. A. Production of cellulase from *Aspergillus terreus* MS105 on crude and commercially purified substrates. **3 Biotech**. [S.l.], v.6, n.103, 2016.

SULEMAN M.; BUKHARI I. H.; AUJLA M. I.; FAIZ A. U. Production and characterization of xylanase from *Aspergillus Niger* using wheat bran, corn cobs and sugar cane bagasse as carbon sources with different concentrations. **Journal of bioresource management**. [S.l.], v.3, n.1, 2016.

TAHERZADEH M. J.; KARIMI K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**. [S.l.], v.9, p.1621–1651, 2008.

VAN SOEST P. J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its applications to forage. **Journal of Animal Science**. [S.l.], v.26.p.119-128. 1967.

VAN SOEST P. J.; MOORE L. A. New chemical method for analysis of forages for the purpose of predicting nutritive value. Proc. IX inter. Grass. Gong. São Paulo, p.783-789, 1966.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGAO, F. A. S. de. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento. Embrapa Agroindústria Tropical**. 2013. ISSN 1679-6543.

VRIES R. P. de; RILEY R.; WIEBENGA A.; AGUILAR-OSORIO G.; AMILLIS S. *et al.* Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically importante fungal genus *Aspergillus*. **Genome Biology**. [S.l.], v.18, n.28, 2017.

VRIES R. P. de; VISSER J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and molecular biology reviews**. [S.l.], v.65, p.497–522, 2001.

WINGFIELD P. T. Protein precipitation using ammonium sulfate. **Current Protocols in Protein Science**. [S.l.], APPENDIX 3: Appendix-3F, 2001.
doi:10.1002/0471140864.psa03fs13.

YANG B.; WYMAN C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**. [S.l.], v.2, p.26-40, 2008.

YAO G.; LI Z.; GAO L.; WU R.; KAN Q.; LIU G.; QU Y. Redesigning the regulatory pathway to enhance cellulase production in *Penicillium oxalicum*. **Biotechnology for biofuels**. [S.l.], v.8, n.71, 2015.

YAO G.; WU R.; KAN Q.; GAO L.; LIU M.; YANG P.; DU J.; LI Z.; QU Y. Production of a high-efficiency celulase complex via β -glucosidase engineering in *Penicillium oxalicum*. **Biotechnology for biofuels**. [S.l.], v.9, n.78, 2016.

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

ZHANG X.; ZHANG Y. P. Cellulases: characteristics, sources, production, and applications. **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**. [S.l.], p.131-146, 2013.

ZNAMEROSKI E. A.; CORADETTI S. T.; ROCHE C. M.; TSAI J. C.; IAVARONE A. T.; CATE J. H. D.; GLASS N. L. Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellodextrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. [S.l.], v.109, n.16, p.6012-6017, 2012.