Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**“Produção e caracterização bioquímica de enzimas lignocelulolíticas
fúngicas e sua aplicação na sacarificação de biomassa lignocelulósica”**

Ana Lucia Ribeiro Latorre Zimbardi

Tese apresentada à Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo, como
parte das exigências para a obtenção do título
de Doutor em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2014

Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**“Produção e caracterização bioquímica de enzimas lignocelulolíticas
fúngicas e sua aplicação na sacarificação de biomassa lignocelulósica”**

Ana Lucia Ribeiro Latorre Zimbardi

Orientadora: Profa. Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor
em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Zimbardi, Ana Lucia Ribeiro Latorre

Produção e caracterização bioquímica de enzimas lignocelulolíticas fúngicas e sua aplicação na sacarificação de biomassa lignocelulósica. Ribeirão Preto, 2014.

202 p.: il ; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. Área de concentração: Química

Orientadora: Furriel, Rosa dos Prazeres Melo.

1. *Colletotrichum graminicola*. 2. *Pycnoporus sanguineus* 3. Enzimas lignocelulolíticas. 4. Sacarificação da biomassa. 5. Etanol celulósico

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Lucia Ribeiro Latorre Zimbardi

Produção e caracterização bioquímica de enzimas lignocelulolíticas fúngicas e sua aplicação na sacarificação de biomassa lignocelulósica

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof/a. Dr/a. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof/a. Dr/a. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof/a. Dr/a. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof/a. Dr/a. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof/a. Dr/a. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Eduardo pelo amor, amizade, apoio e paciência, sem você nada disso teria acontecido.

A minha filha Paula, companheira, amiga e incentivadora, amo muito você.

Ao meu genro Caio, por sempre me apoiar.

Aos meus irmãos Leandro e Luis pelo apoio e incentivo, pelas eternas conversas e por estarem sempre presentes, ainda que distantes.

Sobretudo, agradeço a Deus por colocar todos vocês na minha vida e também por permitir usufruir de todos estes momentos, aprendendo sempre, sempre e sempre.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel, por compartilhar todo seu conhecimento, pela paciência, por todos os momentos que se dedicou ao meu desenvolvimento acadêmico e principalmente por acreditar em mim.

Ao Prof. Dr. João Atilio Jorge pela possibilidade de compartilhar um pouco do seu enorme conhecimento.

Ao Dr. Douglas Chodi Masui, por conduzir-me nos meus primeiros passos dentro da pesquisa e até hoje por sua amizade e paciência.

Aos meus amigos de laboratório, Luana Parras Meleiro, Sandra Lazari Gentil, Priscila de Fátima Camargo, César Sehn e Flavio Henrique Moreira de Souza, por me ensinarem muito todos os dias, pela amizade e por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos.

Aos técnicos Nilton Rosa Alves, Mércia Virgínia Carlos e Rodrigo Ferreira da Silva pelo suporte técnico e ajuda em meu trabalho.

Aos funcionários da FFCLRP

A FAPESP, Capes e CNPq pelo auxílio financeiro.

“Uma teoria científica é um modelo matemático que descreve e codifica as observações que fazemos. Assim, uma boa teoria deverá descrever uma vasta série de fenômenos com base em alguns postulados simples, como também deverá ser capaz de fazer previsões claras, as quais poderão ser testadas.”

Karl Popper

RESUMO

Atualmente há grande interesse no desenvolvimento de processos enzimáticos eficientes para a hidrólise da biomassa lignocelulósica. O objetivo deste trabalho foi a otimização da produção por fermentação em estado sólido e a caracterização bioquímica, no extrato bruto, das β -glucosidases, β -xilosidases e xilanases produzidas por *Colletotrichum graminicola* e das lacases produzidas por *Pycnoporus sanguineus*. Também foi avaliado o potencial de aplicação dos extratos obtidos em coquetéis enzimáticos para a sacarificação de resíduos agroindustriais. A otimização das condições de cultivo, empregando a Metodologia de Superfície de Resposta, levou à produção de $159,3 \pm 12,7 \text{ U g}^{-1}$, $125,88 \pm 6,4 \text{ U g}^{-1}$, $378,1 \pm 23,3 \text{ U g}^{-1}$ e $138,6 \pm 6,4 \text{ U g}^{-1}$ de β -glucosidases, β -xilosidases, xilanases e lacases, respectivamente. Os meios de cultivo empregados foram constituídos por farelo de trigo suplementado com resíduos agroindustriais. Todas as enzimas produzidas apresentaram pH e temperatura ótimos de reação de 4,5-5,0 e 65°C, respectivamente, bem como boa estabilidade térmica e ao pH. O coquetel composto pelos extratos brutos obtidos em condições otimizadas para a produção de xilanases (ECg) e lacases (EPs), em mistura com um extrato bruto de *Trichoderma reesei* rico em celulases (ETr) foi muito eficiente na sacarificação de palha de cana e papelão, sem pré-tratamento, atingindo rendimentos de 41,4 e 71,1% em glicose, respectivamente. Além disso, este coquetel foi mais eficiente na sacarificação de bagaço de cana explodido e *in natura* bem como de palha de cana *in natura*, quando comparado a um coquetel contendo celulases comerciais (Celluclast®) em mistura com ECg e EPs. Visando estudos futuros da ação individual de cada enzima sobre a biomassa, foi purificada uma β -glucosidase majoritária de *C. graminicola*. A enzima mostrou temperatura e pH ótimos de reação de 5,0 e 65°C, respectivamente, boa estabilidade térmica e ao pH, além da estimulação por xilose, propriedade muito interessante para emprego em coquetéis mistos de celulases e xilanases. Os resultados encontrados sugerem que as enzimas produzidas por *C. graminicola* e *P. sanguineus*, assim como os coquetéis enzimáticos avaliados, apresentam características muito interessantes para aplicações biotecnológicas, particularmente em processos de sacarificação da biomassa para obtenção de etanol celulósico.

Palavras chaves: *Colletotrichum graminicola*, *Pycnoporus sanguineus*, enzimas lignocelulolíticas, sacarificação da biomassa lignocelulósica, etanol celulósico.

ABSTRACT

There is currently a great interest in developing efficient processes for the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. The objective of this study was the optimization of the culture conditions for the production of β -glucosidases, xylanases and β -xylosidases by *Colletotrichum graminicola* and laccases by *Pycnoporus sanguineus* under solid state fermentation, followed by the biochemical characterization of the enzymes in the crude extracts. The potential of application of the extracts to compose enzyme cocktails for the saccharification of agroindustrial residues was also investigated. Optimization of the culture conditions using the Response Surface Methodology led to the production of $159.3 \pm 12.7 \text{ U g}^{-1}$, $125.88 \pm 6.4 \text{ U g}^{-1}$, $378.1 \pm 23.3 \text{ U g}^{-1}$ and $138.6 \pm 6.4 \text{ U g}^{-1}$ of β -glucosidases, β -xylosidases, xylanases and laccases, respectively. The culture media employed consisted mainly of wheat bran, supplemented with agroindustrial residues. All enzymes produced showed optimum pH and temperature of 4.5-5.0 and 65° C, respectively, as well as good thermal and pH stability. A cocktail composed of the crude extracts obtained under optimized conditions for the production of xylanases (ECg) and laccases (EPs), mixed with a *Trichoderma reesei* crude extract (ETr), rich in cellulases, was highly efficient for the saccharification of sugarcane trash and cardboard, without pretreatment, reaching yields of 41.4% and 71.1% in glucose, respectively. Moreover, this cocktail was more efficient than a cocktail composed of commercial cellulases (Celluclast®) in combination with ECg and EPs for the saccharification of raw and steam exploded sugarcane bagasse, as well as raw sugarcane trash. Aiming future studies on the individual action of each enzyme on biomass, a majoritary β -glucosidase from *C. graminicola* was purified. The enzyme showed optima of temperature and pH of 5.0 and 65° C, respectively, good thermal and pH stability, as well as stimulation by xylose, a very interesting property for its application in mixed cellulase-xylanase cocktails. The results suggested that the enzymes produced by *C. graminicola* and *P. sanguineus*, as well as the cocktails employed in this study, have good potential for biotechnological applications, particularly in biomass saccharification processes for cellulosic ethanol production.

Keywords: *Colletotrichum graminicola*, *Pycnoporus sanguineus*, lignocellulolytic enzymes, biomass saccharification, cellulosic ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização estrutural das células vegetais.	18
Figura 2: Estrutura química das moléculas de celulose e celobiose.	19
Figura 3: Estrutura química da molécula de xilana.....	21
Figura 4: Principais monômeros que constituem a molécula de lignina.	22
Figura 5: Enzimas envolvidas na degradação enzimática da celulose	25
Figura 6: Principais enzimas envolvidas na degradação enzimática da xilana.....	27
Figura 7: Sítio catalítico da lacase de <i>Bacillus subtilis</i>	32
Figura 8: Efeito da presença de concentrações crescentes de palha de cana <i>in natura</i> no meio de cultivo sobre a produção de β -glucosidases por <i>C. graminicola</i>	64
Figura 9: Superfícies de resposta para a produção de β -glucosidases.....	68
Figura 10: Superfície de resposta representando os efeitos de pH e temperatura sobre a atividade β -glucosidásica.....	72
Figura 11: Estabilidade térmica das β -glucosidases no extrato bruto	73
Figura 12: Estabilidade ao pH das β -glucosidases no extrato bruto	75
Figura 13: Superfícies de resposta para a produção de β -xilosidases	84
Figura 14: Superfície de resposta representando os efeitos de pH e temperatura sobre a atividade β -xilosidásica.	88
Figura 15: Estabilidade térmica das β -xilosidases no extrato bruto.....	89
Figura 16: Estabilidade ao pH das β -xilosidases no extrato bruto	90
Figura 17: Superfícies de resposta para a produção dexilanasas	101
Figura 18: Superfície de resposta representando os efeitos de pH e temperatura sobre a atividade xilanásica.....	104
Figura 19: Estabilidade térmica da xilanase no extrato bruto	105

Figura 20: Estabilidade ao pH das xilanases no extrato bruto	106
Figura 21: Efeito da adição de sulfato de cobre ao meio de cultivo sobre a produção de lacases	111
Figura 22: Superfícies de resposta para a produção de lacases.....	116
Figura 23: Superfície de resposta representando os efeitos de interação de pH e temperatura sobre a atividade lacásica.	119
Figura 24: Estabilidade térmica das lacases no extrato bruto.....	121
Figura 25: Estabilidade ao pH das lacases no extrato bruto	125
Figura 26: Decurso temporal da hidrólise enzimática da palha de cana <i>in natura</i>	129
Figura 27: Decurso temporal da hidrólise enzimática de papelão.	132
Figura 28: Decurso temporal da hidrólise enzimática do jornal.	134
Figura 29: Decurso temporal da hidrólise enzimática da palha de cana <i>in natura</i>	138
Figura 30: Decurso temporal da hidrólise enzimática de bagaço de cana explodido	140
Figura 31: Decurso temporal da hidrólise enzimática do bagaço de cana <i>in natura</i> .	142
Figura 32: Superfícies de resposta para o rendimento em glicose da hidrólise da palha de cana <i>in natura</i>	151
Figura 36: Eletroforese em condições não-desnaturantes (PAGE) de uma amostra do Pico F-II.....	152
Figura 37: Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de BGCg-2.....	153
Figura 38: Determinação da massa molecular aparente da forma nativa da BGCg-2	153
Figura 39: Superfície de resposta para o modelo de segunda ordem que representa o efeito da temperatura e do pH sobre a atividade da BGCg-2.	156
Figura 40: Estabilidade térmica de BGCg-2.	158
Figura 41: Estabilidade ao pH de BGCg-2.	159

Figura 42: Estimulação da atividade de BGCg-2 por PNP-glc.	162
Figura 43: Estimulação da atividade da BGCg-2 por celobiose.	163
Figura 44: Inibição da atividade PNP-glucosidásica de BGCg-2 por glicose.....	165
Figura 45: Gráfico duplo recíproco para a inibição da atividade PNP-glucosidásica de BGCg-2 por glicose	166
Figura 46: Estimulação da atividade PNP-glucosidásica de BGCg-2 por xilose.....	168

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial 2^4 para a produção de β -glucosidases.....	46
Tabela 2: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial 2^3 para a produção de β -glucosidases.....	46
Tabela 3: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial para a produção de β -xilosidases	47
Tabela 4: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial para a produção de xilanases.....	48
Tabela 5: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial para a produção de lacases	48
Tabela 6: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial 2^2 para as atividades β -glucosidásica e β -xilosidásica	49
Tabela 7: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial 2^2 para a atividade xilanásica.....	49
Tabela 8: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial 2^2 para a atividade lacásica.....	50
Tabela 9: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial 2^3 para a otimização da hidrólise de palha de cana <i>in natura</i>	55
Tabela 10: Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de β -glucosidases	58
Tabela 11: Efeito de diferentes fontes suplementares de carbono sobre a produção de β -glucosidases.....	59

Tabela 12: Efeito de diferentes fontes suplementares de nitrogênio sobre a produção enzimática.....	60
Tabela 13: Condições experimentais e resultados obtidos do planejamento fatorial por DCCR para a produção de β -glucosidases por <i>C. graminicola</i>	62
Tabela 14: Coeficientes de regressão para a produção de β -glucosidases	63
Tabela 15: Condições experimentais utilizadas e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a produção de β -glucosidases por <i>C. graminicola</i>	65
Tabela 16: Coeficientes de regressão para a produção de β -glucosidases	66
Tabela 17: ANOVA para a produção de β -glucosidases por <i>C. graminicola</i>	67
Tabela 18: Condições experimentais utilizadas e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a atividade β -glucosidásica	70
Tabela 19: Coeficientes de regressão para a atividade β -glucosidásica.....	71
Tabela 20: ANOVA para a produção de β -glucosidases por <i>C. graminicola</i>	71
Tabela 21: Efeito de íons e EDTA sobre a atividade β -glucosidásica do extrato bruto	76
Tabela 22: Efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade enzimática.....	77
Tabela 23: Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de β -xilosidases	79
Tabela 24: Efeito de diferentes fontes suplementares de carbono sobre a produção de β -xilosidases.....	80
Tabela 25: Efeito de diferentes fontes suplementares de nitrogênio sobre a produção de β -xilosidase	81
Tabela 26: Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a produção de β -xilosidases por <i>C. graminicola</i>	82
Tabela 27: Coeficientes de regressão para a produção de β -xilosidases	83
Tabela 28: ANOVA para a produção de β -xilosidases por <i>C. graminicola</i>	84

Tabela 29: Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a atividade β -xilosidásica.....	86
Tabela 30: Coeficientes de regressão para a atividade β -xilosidásica.....	86
Tabela 31: ANOVA para atividade β -xilosidásica.....	87
Tabela 32: Efeito de íons e EDTA sobre a atividade β -xilosidásica do extrato bruto ..	91
Tabela 35: Efeito de diferentes fontes suplementares de carbono sobre a produção de xilanases	94
Tabela 36: Efeito de diferentes fontes suplementares de nitrogênio sobre a produção enzimática.....	95
Tabela 37: Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a produção de xilanases por <i>C. graminicola</i>	97
Tabela 38: Coeficientes de regressão para a produção enzimática	98
Tabela 39: ANOVA para a produção enzimática.....	99
Tabela 40: Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a atividade xilanásica	102
Tabela 41: Coeficientes de regressão para a atividade enzimática.....	103
Tabela 42: ANOVA para a atividade xilanásica	103
Tabela 43: Efeito de íons e EDTA sobre a atividade xilanásica	107
Tabela 44: Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de lacases.....	108
Tabela 45: Efeito de diferentes fontes adicionais de carbono sobre a produção de lacases	109
Tabela 46: Efeito de fontes adicionais de nitrogênio sobre a produção enzimática...	110
Tabela 47: Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a produção de lacases por <i>P. sanguineus</i>	113
Tabela 48: Coeficientes de regressão para a produção de lacases.....	114

Tabela 49: ANOVA para a produção de lacases por <i>P. sanguineus</i>	115
Tabela 50: Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a atividade lacásica	118
Tabela 51: Coeficiente de regressão para a atividade lacásica.....	118
Tabela 52: ANOVA para a atividade lacásica.....	119
Tabela 53: Efeito de íons e EDTA sobre a atividade lacase no extrato bruto	123
Tabela 54: Resumo das condições ótimas de cultivo e das principais características bioquímicas das β -glucosidases, β -xilosidases e xilanases de <i>C. graminicola</i> e lacases de <i>P. sanguineus</i>	125
Tabela 55: Total de açúcares redutores e glicose presentes em diferentes resíduos ...	126
Tabela 56: Atividades enzimáticas obtidas nos extratos brutos de <i>C. graminicola</i> , <i>T. reesei</i> e <i>P. sanguineus</i>	128
Tabela 57: Carga enzimática empregada na hidrólise de palha de cana <i>in natura</i> , papelão e jornal.....	128
Tabela 58: Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a otimização das condições de hidrólise enzimática da palha de cana <i>in natura</i>	144
Tabela 59: Coeficientes de regressão para a hidrólise enzimática da palha de cana <i>in natura</i>	145
Tabela 60: Purificação de BGCg-2.....	149
Tabela 61: Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para determinação de pH e temperatura ótimos para a atividade de BGCg-2..	152
Tabela 62: Coeficientes de regressão para a atividade enzimática.....	154
Tabela 63: ANOVA para a atividade enzimática.....	155
Tabela 64: Efeito de íons sobre a atividade da BGCg-2	160

Tabela 65: Especificidade ao substrato da BGCg-2	160
Tabela 66: Efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade de BGCg-2.....	164

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

BSA: Soro albumina bovina

Bis-Tris: Bis (2-hidroxietil) iminotris (hidroximetil) metano

DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional

CMC: Carboximetilcelulose

DEAE: Dietilaminoetil

DNS: Ácido dinitrosalicílico

EDTA: Ácido etileno diamintetraacético

FPA: Filter Paper Activity

GOD: Glicose oxidase

MSR: Metodologia de Superfície de Resposta

OFAT: One Factor at a Time

PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

PDA: Portato Dextrose Agar

PNP-glc: p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo

PNP-xil: p-nitrofenil- β -D-xilanopiranosos

DMAE: Dimetilaminoetil

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

1. Introdução	17
1.1 Lignocelulose.....	17
1.1.1. Celulose.....	18
1.1.2. Hemicelulose.....	19
1.1.3 Lignina	21
1.2. Bioconversão de materiais lignocelulósicos e a produção de etanol celulósico	22
1.3. Degradação enzimática da lignocelulose	23
1.3.1. Complexo celulolítico	23
1.3.1.1. β -glucosidases.....	26
1.3.2. Complexo xilanolítico.....	28
1.3.2. Xilanases.....	29
1.3.2.2. β -xilosidases.....	29
1.4. Degradação enzimática da lignina	30
1.4.1 Lacases.....	30
1.5. Organismos de estudo	32
1.5.1. <i>Colletotrichum graminicola</i>	33
1.5.2. <i>Pycnoporus sanguineus</i>	34
1.6. Planejamento experimental.....	34
1.6.1. Planejamentos fatoriais	35
1.6.2. Análise por Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)	36
2. Objetivos.....	38
3. Material e Métodos.....	39
3.1 Organismos de estudo	39
3.2. Manutenção das linhagens	39
3.3. Ensaio enzimáticos	39
3.3.1. Determinação das atividades β -glucosidásica, β -xilosidásica e α -L-arabinofurosidásica.....	40
3.3.2. Determinação da atividade xilanásica	40
3.3.3. Determinação da atividade celobiásica	41
3.3.4. Determinação das atividades avicelásica e carboximetilcelulásica.....	41
3.3.5. Atividade sobre o papel de filtro (“filter paper activity” – FPA).....	42
3.3.6. Determinação da atividade lacásica	42

3.3.7. Determinação da atividade sobre outros substratos	43
3.4. Determinação preliminar das melhores condições de cultivo para a produção em meio sólido de β -glucosidases, β -xilosidases e xilanases por <i>C. graminicola</i> e lacases por <i>P. sanguineus</i>	43
3.5. Obtenção dos extratos brutos do cultivo de <i>C. graminicola</i> e <i>P. sanguineus</i>	44
3.6. Obtenção do extrato bruto rico em celulases de <i>T. reesei</i>	44
3.7. Otimização da produção de β -glucosidases, β -xilosidases e xilanases por <i>C. graminicola</i> e lacases por <i>P. sanguineus</i> empregando a metodologia de superfície de resposta (MSR)	45
3.7.1. Otimização da produção de β -glucosidases por <i>C. graminicola</i>	46
3.7.2. Otimização da produção de β -xilosidases por <i>C. graminicola</i>	47
3.7.3. Otimização da produção de xilanases por <i>C. graminicola</i>	47
3.7.4. Otimização da produção de lacases por <i>P. sanguineus</i>	48
3.8. Efeitos da temperatura e do pH sobre as atividades lacásica, β -glucosidásica, β -xilosidásica e xilanásica no extrato bruto	49
3.9. Estabilidade térmica e ao pH das β -glucosidases, β -xilosidases e xilanases de <i>C. graminicola</i> e das lacases de <i>P. sanguineus</i>	50
3.10. Purificação de uma β -glucosidase produzida por <i>C. graminicola</i>	50
3.11. Dosagem de proteínas	51
3.12. Análises eletroforéticas	51
3.13. Determinação da massa molecular aparente da β -glucosidase purificada	52
3.14. Determinação dos parâmetros cinéticos	52
3.15. Análises estatísticas e tratamento dos dados.....	53
3.16. Validação experimental das condições otimizadas.....	53
3.17. Estudo da ação sinérgica dos extratos brutos de <i>C. graminicola</i> , <i>T. reesei</i> e <i>P. sanguineus</i> para a hidrólise de palha de cana <i>in natura</i> , papelão, jornal, bagaço de cana <i>in natura</i> e bagaço de cana explodido	54
3.18. Otimização das condições de hidrólise de palha de cana <i>in natura</i> por MSR. 55	
3.19. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de amostras de palha de cana <i>in natura</i> antes e após o tratamento enzimático.....	56
4. Resultados e Discussão	57
4.1. β -glucosidases	57
4.1.1. Otimização da produção de β -glucosidases por <i>C. graminicola</i>	57

4.1.1.1. Seleção preliminar das melhores condições de cultivo para produção enzimática.....	57
4.1.1.1.1. Efeitos de diferentes fontes de carbono.....	58
4.1.1.1.2. Efeito de diferentes fontes suplementares de carbono.....	59
4.1.1.1.3. Efeito de fontes suplementares de nitrogênio.....	60
4.1.1.1.4. Otimização da produção de β -glucosidases por <i>C. graminicola</i> empregando MSR.....	61
4.1.1.2. Caracterização bioquímica das β -glucosidases do extrato bruto do cultivo de <i>C. graminicola</i> em condições ótimas.....	70
4.1.1.2.1. Efeito de temperatura e pH sobre a atividade β -glucosidásica.....	70
4.1.1.2.2. Estabilidade térmica e ao pH das β -glucosidases.....	73
4.1.1.2.3. Efeitos de íons e EDTA sobre atividade β -glucosidásica.....	75
4.1.1.2.4. Efeito de carboidratos sobre a atividade β -glucosidásica no extrato bruto.....	77
4.2. β -xilosidases.....	78
4.2.1. Otimização da produção de β -xilosidases por <i>C. graminicola</i>	78
4.2.1.1. Seleção preliminar das melhores condições de cultivo para a produção de β -xilosidases	78
4.2.1.1.1. Efeito de diferentes fontes de carbono.....	78
4.2.1.1.2. Efeito de fontes suplementares de carbono.....	79
4.2.1.1.3. Efeito de fontes suplementares de nitrogênio.....	80
4.2.1.1.4. Otimização da produção de β -xilosidases por <i>C. graminicola</i> empregando MSR.....	81
4.2.2. Caracterização bioquímica das β -xilosidases no extrato bruto no cultivo de <i>C. graminicola</i> em condições ótimas.....	85
4.2.2.1. Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade β -xilosidásica.....	85
4.2.2.2. Estabilidade térmica e ao pH das β -xilosidases.....	88
4.2.2.3. Efeito de íons e EDTA sobre a atividade β -xilosidásica.....	90
4.2.2.4. Efeito de carboidratos sobre a atividade β -xilosidásica no extrato bruto.....	92
4.3. Xilanases	93
4.3.1. Otimização da produção de xilanases por <i>C. graminicola</i>	93
4.3.1.1. Seleção preliminar das melhores condições de cultivo para a produção de β -xilanases	93
4.3.1.1.1. Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a a produção enzimática.....	93

4.3.1.1.2. Efeito de fontes suplementares de carbono.....	93
4.3.1.1.3. Efeito de fontes suplementares de nitrogênio.....	95
4.3.1.1.4. Otimização da produção de xilanases por MSR.....	96
4.3.2. Caracterização bioquímica das xilanases do extrato bruto do cultivo de <i>C. graminicola</i> em condições ótimas.....	100
4.3.2.1. Efeito da temperatura e do pH sobre atividade xilanásica.....	102
4.3.2.2. Estabilidade térmica e ao pH das xilanases.....	105
4.3.2.3. Efeito de íons e EDTA sobre atividade xilanásica.....	106
4.4. Lacases.....	108
4.4.1. Otimização da produção de lacases por <i>P. sanguineus</i>	108
4.4.1.1. Seleção preliminar das melhores condições de cultivo da produção enzimática.....	108
4.4.1.1.1. Efeito de diferentes fontes de carbono.....	108
4.4.1.1.2. Efeito de diferentes fontes suplementares de carbono.....	109
4.4.1.1.3. Efeito de diferentes fontes suplementares de nitrogênio.....	110
4.4.1.1.4. Efeito da adição de sulfato de cobre ao meio de cultivo sobre a produção de lacases.....	110
4.4.1.1.5. Otimização da produção de lacasse por <i>P. sanguineus</i> empregando MSR.....	112
4.4.2. Caracterização bioquímica das lacases do extrato bruto do cultivo de <i>P. sanguineus</i> em condições ótimas.....	117
4.4.2.1. Efeito da temperatura e do pH sobre atividade lacásica.....	117
4.4.2.2. Estabilidade térmica e ao pH da atividade lacásica do extrato bruto.....	120
4.4.2.3. Efeito de íons e EDTA sobre atividade lacásica.....	123
5. Estudos de hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos empregando os extratos brutos de <i>C. graminicola</i>, <i>P. sanguineus</i> e <i>T. reesei</i>	127
5.1. Hidrólise enzimática da palha de cana <i>in natura</i>	133
5.3. Hidrólise enzimática do jornal	135
5.4. Hidrólise enzimática da palha de cana <i>in natura</i> e de bagaço de cana explodido e <i>in natura</i> empregando um coquetel comercial.	136
5.4.1. Hidrólise da palha de cana <i>in natura</i>	137
5.4.2. Hidrólise enzimática do bagaço de cana explodido	139
5.4.3. Hidrólise enzimática do bagaço de cana <i>in natura</i>	141

5.5. Otimização das condições de hidrólise enzimática de palha de cana <i>in natura</i> empregando <i>MSR</i>	144
6.0. Microscopia eletrônica de varredura.....	148
7.0. Purificação de uma β-glucosidase majoritária produzida por <i>C. graminicola</i>	149
7.1. Propriedades Moleculares de BGCg-2	153
7.2. Temperatura e pH ótimos para a atividade β -glucosidásica de BGCg-2.....	155
7.3. Estabilidade térmica e ao pH de BGCg-2	158
7.4. Efeito de íons e EDTA sobre a atividade de BGCg-2	160
7.5. Especificidade de substrato da BGCg-2	161
7.6. Determinação dos parâmetros cinéticos para a hidrólise de diferentes substratos por BGCg-2.....	163
7.7. Efeito de carboidratos sobre a atividade de BGCg-2.....	165
7.8. Análise cinética do efeito de xilose e glicose sobre a atividade de BGCg-2..	166
8. Referências	169

1. Introdução

Os materiais lignocelulósicos são as fontes de carbono renováveis mais abundantes na natureza, sendo compreendidos majoritariamente por resíduos agroindustriais e urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas (Kumar et al., 2008; Jardine & Peres, 2009).

Os setores agroindustriais produzem grande quantidade de resíduos lignocelulósicos, que, se não aproveitados, representam perdas de biomassa e nutrientes de alto valor, além de elevar os preços dos produtos finais, uma vez que o tratamento, transporte e a disposição final dos resíduos influencia diretamente o custo do processo. Atualmente, conceitos de recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários para garantir a viabilidade econômica e biocompatibilidade das cadeias agroindustriais, assim como reduzir o impacto ambiental que o acúmulo destes resíduos provoca (Wang et al., 2012; Vynios et al., 2009).

Neste contexto, o entendimento dos mecanismos moleculares do processo de biodegradação de resíduos lignocelulósicos, bem como o desenvolvimento de processos industriais eficazes para este propósito, viabilizando a produção de diferentes produtos químicos, entre eles o etanol de segunda geração, representam contribuições importantes (Durand et al., 2003; Zhang et al., 2006; Baldrian & Vendula Valáskova, 2008; Dashtban, et al., 2009; Sivakumar et al., 2010; Ding et al., 2012).

1.1. Lignocelulose

Os materiais lignocelulósicos apresentam-se como uma matriz complexa composta principalmente pelos polímeros de celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1). Quanto à sua composição química, geralmente contém 35-50% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e 5 a 8% de extrativos (terpenos, ácidos graxos, pigmentos, etc) (Somerville et al., 2004; Ogeda & Petri, 2010). No entanto, esta composição varia em função da espécie de vegetal, do estágio de crescimento, do tecido vegetal escolhido, da idade de colheita, etc. Na parede celular vegetal, estes polímeros

estão intimamente associados e/ou ligados quimicamente e, devido a esta íntima associação, a biomassa apresenta um elevado grau de recalcitrância, tornando a sua despolimerização altamente resistente ao ataque químico e biológico (Van Dyk & Pletschke, 2012; Zhao et al., 2012; Hasunuma et al., 2013).

Figura 1: Organização estrutural das células vegetais (adaptado de Kondo et al., 1996).

1.1.1. Celulose

A celulose, o componente mais abundante da parede celular, é um homopolímero não ramificado de resíduos de glicose unidos por ligações *O*-glicosídicas do tipo β -1,4. A configuração β das ligações glicosídicas faz com que a conformação mais estável da molécula seja a forma estendida, dando origem a cadeias longas e retas. Nessa conformação, cada resíduo de glicose apresenta uma rotação de 180° em relação

às unidades vizinhas. Dessa forma, a unidade básica repetitiva da molécula, a celobiose, é constituída por duas moléculas de glicose unidas por ligação β -1,4, com um ângulo de rotação de 180° uma em relação à outra. Tipicamente as cadeias de celulose presentes na parede celular primária de plantas apresentam graus de polimerização na faixa de 100 a 10.000 e são estabilizadas por ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares ao longo da direção das cadeias (Figura 2). As ligações de hidrogênio ajudam a manter e reforçar a conformação linear e plana da cadeia. Várias cadeias alinhadas lado a lado dão origem microfibrilas celulósicas cristalinas de alta resistência tensional, embora algumas regiões amorfas também ocorram. As ligações de hidrogênio inter e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e contribuem para a alta resistência da celulose à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (Kondo, 1996; Somerville et al., 2004; Wyman et al., 2005; Kumar et al., 2008).

Figura 2: Estrutura química das moléculas de celulose e celobiose.

1.1.2. Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos que se associam às microfibrilas de celulose principalmente por ligações de hidrogênio, além de formarem ligações covalentes com a lignina (Scheller & Ulvskov, 2010; Pauly et al., 2013). Comparativamente à celulose, apresentam menor massa molecular e grau de polimerização, aproximadamente de 100 a 300 unidades monossacarídicas por molécula

(Puls & Shuseil, 1993; Somerville et al., 2004; Van Dyk et al., 2012; Pauly et al., 2013). As hemiceluloses são estruturalmente mais parecidas com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. No entanto, diferentemente da celulose, as hemiceluloses apresentam grupos substituintes heterogêneos ou ramificações em sua cadeia principal que lhe conferem uma estrutura amorfa e consequentemente mais solúvel em água, sendo, portanto, mais susceptíveis à hidrólise química sob condições mais brandas (Fengel et al., 1989; Pauly et al., 2013).

A maioria das hemiceluloses consiste de uma cadeia linear de resíduos de monossacarídeos unidos por ligações β -1,4, os quais podem ser pentoses ou hexoses principalmente D-xilose, D-manose e D-glicose. São classificadas geralmente de acordo com os resíduos presentes na molécula, como: D-galactana, D-xilana, L-arabinana (Collins et al., 2005). As ramificações e as cadeias laterais presentes na estrutura das hemiceluloses constituídas de resíduos de D-galactose, ácido 4-O-metil-D-glucurônico, ácido galacturônico, grupos acetil, etc, interagem com a celulose, conferindo estabilidade e flexibilidade ao agregado (Pauly et al., 2013).

Dentre as hemiceluloses, a xilana é o polissacarídeo mais abundante na madeira e nos resíduos agroindustriais (Collins et al., 2004; Burton et al., 2010; Pauly et al., 2013). Sua cadeia principal é constituída por resíduos de xilose unidos por ligação β -1,4 e dependendo da espécie vegetal sua estrutura varia amplamente, desde um homopolímero não ramificado até um heteropolissacarídeo altamente ramificado. As ramificações, que contêm usualmente arabinofuranose, ácido glucurônico ou ácido metilglucurônico, determinam a solubilidade, a conformação e a reatividade da molécula de xilana (Figura 3) (Bajpai, 1997; Pauly et al., 2013).

A estrutura da xilana confere resistência à célula vegetal contra a degradação microbiana devido à presença dos substituintes laterais e à sua interação com outros polissacarídeos da parede celular. Desse modo, a produção de um complexo enzimático, contendo diferentes enzimas com funções especializadas, é uma estratégia que os microrganismos utilizam para alcançar a hidrólise total deste heteropolissacarídeo (Collins et al., 2004; Kheng & Ibrahim, 2005).

Figura 3. Estrutura química da molécula de xilana (adaptado de Collins et al., 2005).

1.1.3. Lignina

A molécula de lignina é um heteropolímero aromático complexo, constituído por unidades fenilpropano, insolúvel em água e de alta massa molecular (600-10000 kDa). Apresenta uma estrutura amorfa e altamente ramificada (Fengel & Wegener, 1989; Perez et al., 2002; Vanholme et al., 2010).

A biossíntese da lignina se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes alcoóis cinâmílicos precursores: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 4). Os anéis aromáticos destes alcoóis são denominados, respectivamente, p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) (Pereira et al., 2003; Vanholme et al., 2010). As madeiras macias (*softwood*) são formadas principalmente por unidades de guaiacil, enquanto as madeiras duras (*hardwood*) são formadas por unidades de guaiacil e siringil (Pérez et al., 2002).

A estrutura macromolecular aromática da molécula de lignina confere rigidez à parede celular e às diferentes regiões do material lignocelulósico, além de proteção contra o ataque de microrganismos e coesão à estrutura celular (Pérez et al., 2002).

Figura 4. Principais monômeros que constituem a molécula de lignina (adaptado de Fengel e Wegener, 1989).

1.2. Bioconversão de materiais lignocelulósicos e a produção de etanol celulósico

De uma maneira geral, a obtenção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica envolve duas etapas. A primeira consiste na hidrólise dos polissacarídeos aos seus monômeros, os quais são fermentados a etanol numa segunda etapa (Margeot et al., 2009; Singhvi et al., 2014). Entretanto, na sua forma natural, os materiais lignocelulósicos são pouco reativos e altamente resistentes à hidrólise, e embora a sacarificação da biomassa possa ser realizada por métodos físico-químicos, o consumo elevado de energia e o uso de reagentes químicos em grande quantidade podem afetar negativamente a viabilidade econômica e a biocompatibilidade do processo como um todo. Por outro lado, a incubação direta de materiais lignocelulósicos em sua forma natural com culturas puras de microrganismos lignocelulolíticos ou preparações de enzimas livres de células resulta usualmente em baixo rendimento. Desta forma, há um interesse crescente no desenvolvimento de processos enzimáticos eficientes para a sacarificação de celulose, hemicelulose e lignina (Lynd et al., 2002; Kumar et al., 2008; Zimbardi et al., 2013; Bhalla et al., 2013; Singhvi et al., 2014; Meleiro et al., 2014).

Resultados recentes vêm mostrando que a baixa acessibilidade das fibras de celulose à ação enzimática, devida à sua interação complexa com hemicelulose e

lignina, assim como a adsorção das enzimas hidrolíticas pela lignina constituem fatores altamente limitantes à eficiência da sacarificação da celulose. Assim, acredita-se que uma maior eficiência do processo de hidrólise da lignocelulose depende de uma ação combinada e sinérgica de celulasas, hemicelulasas e ligninases (Henrissat et al., 1994; Kumar et al., 2008; Zang et al., 2006; Harris et al., 2010; Bhalla et al., 2013; Singhvi et al., 2014). Reforçando esta proposta, estudos recentes demonstraram claramente que coquetéis enzimáticos contendo celulasas e hemicelulasas são mais eficientes no processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica, resultando em maiores rendimentos de açúcares fermentáveis com menor carga enzimática. (Hu et al., 2011; Qing et al., 2010; Gao et al., 2011; Zimbardi et al., 2013). Dessa forma, além das celulasas, que tem sido o foco de inúmeros estudos nas últimas décadas, existe hoje um crescente interesse por enzimas de baixo custo e eficientes nos processos de degradação da hemicelulose e lignina.

Industrialmente, o uso de enzimas lignocelulolíticas ainda é proibitivo, devido ao seu alto custo, que chega a representar 23-40% do custo total de produção de etanol celulósico (Zhang et al., 2006; Dhillon et al., 2011; Chandel et al., 2012). Portanto, é de grande interesse a busca por microrganismos que produzam simultaneamente bons níveis de diferentes enzimas lignocelulolíticas, em meios de baixo custo. O emprego dos extratos brutos do cultivo desses microrganismos pode baratear muito o custo da conversão enzimática da biomassa, viabilizando assim a produção de etanol celulósico.

Atualmente, há também consenso entre os pesquisadores de que o desenvolvimento de processos eficientes para a hidrólise de resíduos lignocelulósicos depende não somente da identificação e produção a baixo custo de enzimas lignocelulolíticas com boas propriedades. Um conhecimento mais profundo acerca da composição e organização dos constituintes da parede celular e dos possíveis mecanismos de ação das enzimas envolvidas na degradação da biomassa tem sido o foco de muitas pesquisas (Somerville et al., 2004; Ding et al., 2012).

1.3. Degradação enzimática da lignocelulose

1.3.1. Complexo celulolítico

Na natureza, a biodegradação da biomassa lignocelulósica envolve a ação simultânea de enzimas produzidas por uma variedade de microrganismos, como fungos e bactérias (Bhat & Bhat, 1997; Pérez et al., 2002; Bhalla et al., 2013; Hasunuma et al., 2012; Sorensen et al., 2013).

Alguns microrganismos produzem enzimas capazes de degradar a celulose e o conjunto dessas enzimas que atuam sinergicamente é denominado “sistema enzimático celulolítico” ou “complexo celulolítico” (Figura 5), (Ögel et al., 2001; Lynd et al., 2002; Zhang et al., 2006; Sorensen et al., 2013; Meleiro et al., 2014).

O sistema enzimático celulolítico compreende as enzimas:

- Endoglucanases (endo-1,4- β -glucosidases: EG, EC 3.2.1.4) que atuam ao acaso sobre o polímero, sobretudo sobre regiões de baixa cristalinidade, liberando principalmente oligossacarídeos, além de celobiose e glicose;
- Exoglucanases ou celobiohidrolases (exo-1,4- β -glucosidases; CBH; EC 3.2.1.91), que atuam na região cristalina da celulose, clivando as ligações glicosídicas a partir das extremidades da molécula, liberando unidades de glicose e celobiose. As celobiohidrolases são classificadas em CBH1 (atuam nos extremos redutores da molécula) e CBH2 (atuam nos terminais não redutores da molécula);
- 1,4- β -glucosidases (EC 3.2.1.21), que atuam sobre celoligossacarídeos curtos e celobiose, liberando glicose.

Figura 5. Enzimas envolvidas na degradação enzimática da celulose (adaptado de Pérez et al., 2002).

Na grande maioria dos complexos celulolíticos conhecidos, as endo- e exo-celulases são inibidas por celobiose e celoligossacarídeos curtos (Bhatia et al., 2002; Lynd et al., 2002; Sorensen et al., 2013; Hasunuma et al., 2013). Assim, as β -glucosidases catalisam o passo limitante da hidrólise da celulose, levando à liberação de glicose e permitindo também a ação eficiente das demais enzimas envolvidas no processo. Entretanto, grande parte das β -glucosidases conhecidas também é inibida por glicose, de modo que existe uma busca constante por enzimas estimuladas ou tolerantes ao produto (Bhatia et al., 2002; Lynd et al., 2002; Zanoelo et al., 2004; Karnchanatat et al., 2007; Bhiri et al., 2008; Yang et al., 2008; Sonia et al., 2008; Souza et al., 2010; Nascimento et al., 2010; Meleiro et al., 2014). Algumas enzimas microbianas tolerantes ou estimuladas por glicose já foram identificadas. Estudos recentes apresentaram a caracterização de algumas β -glucosidases estimuladas por glicose (Zanoelo et al., 2004; Nascimento et al., 2010; Souza et al., 2010; Xu et al., 2011; Uchima et al., 2011), sendo 3 destes trabalhos pertencentes ao nosso grupo de pesquisa.

Outras possibilidades, entretanto, também vêm sendo investigadas para diminuir o efeito inibitório da glicose sobre a hidrólise da celulose, entre elas o uso de excesso de atividade β -glucosidásica, associada a celulases. Entretanto, uma das principais limitações à aplicação industrial de celulases e β -glucosidases é o seu alto custo de produção (Zhang et al., 2006; Gusakov et al., 2007), de modo que há um interesse crescente na identificação de microrganismos bons produtores destas enzimas, capazes de crescer em substratos baratos e abundantes.

1.3.1.1. β -glucosidases

As β -glucosidases catalisam a hidrólise de alquil- e aril- β -glucosídeos, diglucosídeos e oligossacarídeos curtos. Amplamente distribuídas na natureza, ocorrem em todos os reinos vivos, como bactérias (Paavilainen et al., 1993; Sestelo et al., 2004, Xu et al., 2011), fungos (Riccio et al., 1999; Jäger et al., 2001; Yun et al., 2001; Belancic et al., 2003; Sorensen et al., 2013), plantas (Sue et al., 2000; Cameron et al., 2001; Gerardi et al., 2001) e animais (Hays, 1998; Pontoh & Low, 2002).

Dois sistemas de classificação para as β -glucosidases são descritos na literatura (Singhanian et al., 2013). O primeiro é baseado na especificidade da enzima pelo substrato. Nesse sistema, as β -glucosidases são divididas em:

- Aril β -glucosidases: hidrolisam preferencialmente aril-glucosídeos (Meyer & Canevascini, 1981);
- Celobiasas: hidrolisam celobiose (Lusis & Becker, 1973);
- β -glucosidases com ampla especificidade: hidrolisam ambos os tipos de substratos (Schliemann, 1983).

Mas atualmente a classificação mais aceita para as β -glucosidases é baseada tanto na similaridade das seqüências de aminoácidos quanto nos padrões de enovelamento das diferentes enzimas (Henrissat & Bairoch, 1991). De acordo com essa classificação, as glicosil hidrolases são divididas em 133 famílias, e as β -glucosidases estão reunidas nas famílias 1 e 3, com representantes nas famílias 5, 9, 30 e 116 (Teugjas & Våljamäe, 2013). Na família 1 estão incluídas as β -glucosidases de arqueobactérias, mamíferos e plantas, sendo algumas também originárias de fungos. A estrutura tridimensional de várias enzimas desta família já foi resolvida, revelando um padrão comum de disposição de α -hélices e β -folhas, além da presença de vários aminoácidos altamente conservados nas proximidades do sítio ativo (Bhatia et al., 2002; Yoshida et al., 2009). Já na família 3 estão principalmente β -glucosidases de bactérias, leveduras e de origem fúngica (Henrissat, 1996; Cantarel et al., 2009).

1.3.2 Complexo xilanolítico

Comparada à da celulose, a degradação da xilana requer um sistema enzimático mais complexo, uma vez que diferentes tipos de ligações e unidades monoméricas estão presentes em sua estrutura. Assim, a degradação completa da xilana envolve a ação de uma série de hidrolases, que constituem o chamado complexo xilanolítico, que são capazes de atuar sobre a cadeia principal e também sobre as cadeias laterais (Figura 6). As principais enzimas do complexo xilanolítico são: Endo β -1,4-xilanase (1,4- β -xilana xilohidrolase, EC 3.2.1.8), que cliva ligações glicosídicas internas da cadeia principal, ao acaso, diminuindo o grau de polimerização com liberação de xilooligossacarídeos, xilobiose e xilose e 1,4- β -D-xilosidade (β -D-xilosídeo xilohidrolase, EC 3.2.1.37), que atua sobre os xilooligossacarídeos, a partir das extremidades não redutoras, ou sobre xilobiose, liberando xilose. A remoção dos grupos laterais da molécula de xilana é catalisada pelas enzimas: acetil xilana esterase (EC 3.1.1.72), α -D-glucuronidase (EC 3.2.1.139), α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) e ácido ferúlico esterase (EC 3.1.1.73) (Crepin et al., 2004; Li et al., 2002; Collins et al., 2005; Polizeli et al., 2005).

Figura 6. Principais enzimas envolvidas na degradação enzimática da xilana (adaptado de Collins et al., 2005).

1.3.2.1. Xilanases

As xilanases podem ser encontradas em algas marinhas, crustáceos, insetos e em sementes de plantas, além dos microrganismos. Entre os microrganismos produtores de xilanases, os fungos filamentosos são especialmente interessantes devido à sua grande capacidade de secreção destas enzimas (Päes et al., 2012; Guimarães et al., 2013; Kar et al., 2013). Além disso, os níveis de produção de xilanases por diferentes fungos filamentosos são em geral muito maiores do que os descritos para outros microrganismos (Sunna & Antranikian, 1997; Polizeli et al., 2005; Sepahyet al., 2011; Masui et al., 2012; Guimarães et al., 2013; Kar et al., 2013). Atualmente as xilanases têm sido o foco de inúmeras pesquisas devido ao seu potencial de aplicação biotecnológica em diversos setores industriais como: alimentício, papel e celulose, biocombustíveis, etc. (Camassola & Dillon, 2010; Masui et al., 2012; Päes et al., 2012; Juturu & Wu 2012; Guimarães et al., 2013; Knob et al., 2013).

As xilanases são um grupo de enzimas que apresentam características diversas entre si em diferentes níveis: estrutural (presença ou ausência de CBM); bioquímico (pH e temperatura ótimos, estabilidade térmica e ao pH); catalítico (especificidade e afinidade pelo substrato). Na verdade, a maioria dos microrganismos produzem várias xilanases. Por exemplo, certos estudos relatam que *Sporotrichum dimorphosporum* e *Aspergillus niger* produzem 16 e 15 diferentes formas de xilanases, respectivamente (Biely et al., 1985; Päes, et al., 2012). A ocorrência de diferentes formas da enzima provavelmente está relacionada a uma resposta adaptativa destes microrganismos no sentido de otimizar a biodegradação da estrutura complexa deste polissacarídeo.

As xilanases são classificadas nas famílias 5, 7, 8, 10, 11, 16, 26, 52, 43 e 62 das glicosil hidrolases. Aquelas pertencentes às famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43 clivam ligações β -1,4 da cadeia principal, possuem um único sítio catalítico e diferem entre si apenas quanto à estrutura e especificidade de substrato, enquanto as pertencentes às famílias 16, 52 e 62 são enzimas bifuncionais, apresentando dois domínios catalíticos distintos (Biely et al., 1997; Van Petergem et al., 2003; Collins et al., 2005; Vrsanská et al., 2007; Päes et al., 2012). Devido ao grande potencial biotecnológico, muitas estruturas de xilanases produzidas por microrganismos já foram resolvidas e depositadas no PDB (Protein Data Bank) (Päes et al., 2012).

1.3.2.2. β -xilosidases

As β -xilosidases são produzidas principalmente por microrganismos, mas ocorrem também em sementes, algas marinhas, protozoários, insetos e crustáceos (Polizeli et al., 2005; Knob et al., 2010; Juturu & Wu, 2012). Os fungos são amplamente utilizados como produtores de β -xilosidases e são geralmente considerados os melhores produtores destas enzimas.

Diferente das xilanases, as quais são invariavelmente enzimas extracelulares, as β -xilosidases podem ser extracelulares ou estarem associadas à célula, dependendo do microrganismo e até mesmo das condições de cultivo (Lenartovicz et al., 2003; Knob et al., 2010).

Assim como as β -glucosidases, as β -xilosidases são agrupadas em famílias de acordo com a similaridade nas suas seqüências de aminoácidos e padrões de enovelamento. Até o presente momento, β -xilosidases foram incluídas nas famílias 3, 39, 43, 52 e 54 das glicosil hidrolases, porém as de origem fúngica estão presentes, em sua maioria, nas famílias 3 e 43 (Henrissat et al., 2006; Knob et al., 2010; Yang et al., 2014). Alguns membros da família 3 apresentam atividade de transglicosilação na presença de altas concentrações de substrato (Eneyskaya et al., 2003).

Analogamente às celulasas, as endoxilanases são inibidas por xilobiose e xilooligosacarídeos curtos, e as β -xilosidases por xilose (Almeida et al., 1995; Polizeli et al., 2005; Knob et al., 2010). Desta forma, há um grande interesse na busca por β -xilosidases tolerantes a xilose (Zanoelo et al., 2004; Yan et al., 2008; Yang et al., 2013).

As β -xilosidases são amplamente empregadas, em conjunto com as endoxilanases, na bioconversão da xilana em diversos segmentos industriais como alimentício, ração animal, papel e celulose, etc. Além disso, as β -xilosidases são atualmente associadas a celulasas e hemicelulasas em coquetéis enzimáticos para a sacarificação da biomassa, visando à produção de etanol celulósico (Girio et al., 2010).

1.4 Degradação enzimática da lignina

A estrutura complexa e heterogênea da molécula de lignina lhe confere alta resistência à degradação química e enzimática, tornando difícil a sua remoção ou redistribuição (Polizeli et al., 2005; Knob et al., 2010). Embora diferentes tratamentos físico-químicos tenham sido desenvolvidos para esta finalidade, atualmente existe grande interesse em processos enzimáticos para delignificação de materiais celulósicos (Wong, 2009; Martínez et al., 2005; Knob et al., 2010). Alguns fungos degradam eficientemente a lignina, e o processo envolve quatro principais classes de enzimas (Perez et al., 2002; Arora et al., 2010): lignina peroxidases (EC 1.11.1.14) e manganês peroxidases (EC 1.11.1.13), que são hemoproteínas capazes de oxidar subestruturas da lignina na presença de peróxido de hidrogênio, as lacases (EC 1.10.3.2) que são cuproproteínas que catalisam a redução de O_2 a H_2O com oxidação simultânea das subunidades fenólicas da lignina e por fim as glioxal oxidases (EC 1.2.3. 5) e aril álcool oxidases (EC 1.1.3.7), as quais, embora não participem diretamente da degradação da lignina, possuem um papel importante no processo, produzindo peróxido de hidrogênio, que é indispensável à ação das peroxidases (Wong, 2009; Martínez et al., 2005; Arora et al., 2010; Janusz et al., 2013).

1.4.1. Lacases

As lacases são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em fungos, bactérias e plantas. Entretanto, os fungos são os maiores produtores destas enzimas e as lacases fúngicas são as mais estudadas, além de apresentarem maior potencial de aplicação biotecnológica (Mayer & Staples, 2002; Thurston et al., 1994; Gochev et al., 2007; Giardina et al., 2010). Lacases fúngicas são encontradas em diferentes gêneros de ascomicetos, alguns deuteromicetos e principalmente nos basidiomicetos, sendo que os melhores produtores são os basidiomicetos pertencentes ao grupo de fungos de decomposição branca (Mayer & Staples, 2002; Claus 2004; Giardina et al., 2010). Em fungos, as lacases estão envolvidas no controle da patogenicidade, pigmentação de esporos, esporulação, além disso, estas enzimas estão

envolvidas na degradação da lignina (Leonowicz et al., 2001; Mayer & Staples, 2002; Arora et al., 2010).

As lacases catalisam a remoção de um elétron e um próton de grupos hidróxi-fenólicos ou aminoaromáticos formando seus respectivos radicais livres (Leonowicz et al., 2001). A atividade catalítica da enzima está relacionada à presença de quatro átomos de cobre por molécula. (Kumar et al., 2003; Claus, 2004; Wong, 2009). Segundo Mayer & Staples (2002), a estrutura do sítio ativo das lacases (Figura 7) se mostra bem conservada nas enzimas fúngicas, onde estão presentes, invariavelmente, um resíduo de cisteína e 10 resíduos de histidina (Kumar et al., 2003; Claus, 2004; Arora et al., 2010; Giardina et al., 2010; Janusz et al., 2013).

Os átomos de cobre possuem propriedades distintas e desempenham papéis distintos no ciclo catalítico:

- Cobre Tipo 1: sítio onde ocorre a oxidação do substrato; apresenta absorvância em torno de 600 nm, sendo detectável em espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR); confere a coloração azul típica às enzimas multicobre; apresenta coordenação trigonal com duas histidinas e uma cisteína, e o quarto ligante pode ser uma metionina (bactérias), leucina ou fenilalanina (fungos) (Claus 2004);
- Cobre Tipo 2: não é detectável espectrofotometricamente e revela propriedades paramagnéticas em estudos de EPR; atua comoceptor de um elétron e se encontra coordenado a dois resíduos de histidina;
- Cobre Tipo 3: formado por um par de átomos de cobre, que apresenta uma fraca absorvância em 330 nm; os íons não apresentam sinal em EPR e cada um encontra-se coordenado por três resíduos de histidina.

Figura 7. Sítio catalítico da lacase de *Bacillus subtilis* (adaptado de Enguita et al., 2003).

Entre as enzimas multicobre, as lacases são uma subclasse que atua sobre uma variedade de substratos xenobióticos, ou seja, fenóis, anilinas, tióis, etc. (Kumar et al., 2003; Giardina et al., 2010). Consequentemente as lacases possuem um grande potencial de atuação na biotransformação de ligninas e seus derivados, desempenhando um papel importante em processos de biorremediação, como a descontaminação de efluentes papaleiros e têxteis. As lacases possuem ainda aplicação em células a biocombustível e mais recentemente tem sido o foco da atenção de vários grupos de pesquisadores devido ao seu potencial de aplicação na sacarificação da biomassa e produção de etanol celulósico (Duran et al., 2000; Wong et al., 2009; Lomascolo et al., 2011; Saat et al., 2013; Singhvi et al., 2013).

1.5. Organismos de estudo

De um modo geral, os fungos filamentosos são excelentes produtores de enzimas lignocelulolíticas e apresentam usualmente várias isoformas destas enzimas (Matsuo et al., 1987; van Peij et al., 1997; Zhu et al., 1997; Ito et al., 2003; Polizeli et al., 2005). Os

fungos decompositores de materiais lignocelulósicos são os principais microrganismos utilizados industrialmente para a produção de ligninases, hemicelulases e celulases, e os complexos lignocelulolíticos de diferentes espécies têm sido bastante estudados (Baldrian & Gabriel, 2003; Shraddha et al., 2011).

1.5.1. *Colletotrichum graminicola*

Neste trabalho foram estudadas as β -glucosidases, β -xilosidases e xilanases produzidas por uma linhagem do fungo mesófilo *Colletotrichum graminicola* recém-isolada do solo da floresta amazônica. O gênero *Colletotrichum* (Sordariomycetes, Ascomycota) compreende aproximadamente 600 espécies (O'Connell et al., 2012). As espécies fúngicas pertencentes a este gênero são classificadas como fungos endofíticos, os quais habitam o interior dos tecidos aparentemente saudáveis das plantas em algum estágio da vida (Pereira et al., 1993). A sua fitopatogenicidade parece estar vinculada à capacidade de produzir enzimas extracelulares capazes de degradar os componentes da parede celular vegetal (Acosta-Rodrigues et al., 2005).

Diversos estudos sobre a interação entre os fungos do gênero *Colletotrichum* e as plantas hospedeiras têm sido realizados, já que estes microrganismos são modelos experimentais para os estudos dos mecanismos moleculares dos processos de infecção, da resistência do hospedeiro, de transdução de sinais e das interações planta-patógeno (O'Connell et al., 2012; Acosta-Rodrigues et al., 2005; Martinez et al., 2009). Dentre as enzimas mais estudadas podem ser citadas as pectinases e poligalacturonases, responsáveis pelo ataque à pectina presente em folhas e frutos das plantas hospedeiras (Hebert et al., 2004) e as quitinases, que atuam na degradação da quitina presente nas paredes celulares de fungos e insetos (Souza et al., 2003). Além disso, estudos demonstraram a presença de genes que codificam para diversas hidrolases, com potencial para degradar a parede celular (King et al., 2011; O'Connell et al., 2012). Desse modo *C. graminicola* apresenta-se como uma rica fonte de enzimas com potencial de aplicação biotecnológica.

1.5.2. *Pycnoporus sanguineus*

Neste trabalho também foram investigadas as lacases produzidas por uma linhagem de *Pycnoporus sanguineus*, um basidiomiceto pertencente à família Polyporaceae, amplamente distribuído na natureza e encontrado em regiões subtropicais e também em regiões tropicais como a floresta amazônica (Espósito et al., 2004; Lomascolo et al., 2011). Os microrganismos da família Polyporaceae são capazes de hidrolisar polissacarídeos da parede celular vegetal e também a lignina de resíduos lignocelulósicos, sendo chamados vulgarmente de fungos de decomposição branca (*white rot*) (Arora et al., 2010; Lomascolo et al., 2011). Os fungos de decomposição branca são de grande interesse industrial, devido à sua habilidade de degradar uma variedade de compostos aromáticos incluindo os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PHAs), os quais juntamente com outros xenobióticos, são a maior fonte de contaminação do solo (Jaouani et al., 2005; Arora et al., 2010).

Os fungos do gênero *Pycnoporus* tem se mostrado excelentes produtores de várias enzimas de aplicação biotecnológica como quitinases, xilanases, β -glucosidases, α -amilases, exo-galacturonidase, etc (Ohtakara, 1988; Sigoillot et al., 2002; Quiroga et al., 2009; Lomascolo et al., 2011; Falkoskiet et al., 2013). Além disso, diversos estudos demonstraram que *P. sanguineus* é também um excelente produtor de enzimas envolvidas na degradação da lignina como, lacases, lignina peroxidases e manganês peroxidases. (Trovasset et al., 2007; Litthauer et al., 2007; Lu et al., 2007; Alves Garcia et al., 2007; Uzan et al., 2011, Lomascolo et al., 2011; Janusz et al., 2012). A degradação da lignina por estes microrganismos apresenta grande eficiência, quando comparada àquela provocada por diferentes ascomicetos e deuteromicetos (Herpöel et al., 2000; Sharaddha et al., 2011; Falkoski et al., 2012).

1.6. Planejamento experimental

O planejamento de experimentos para determinar e quantificar a influência de diferentes fatores sobre as respostas desejadas é indispensável para que resultados confiáveis possam ser obtidos (Rodrigues & Iemma, 2009). O planejamento

experimental construído para estimar coeficientes, segundo um modelo matemático aproximado, deve reunir certos critérios como:

1. Proporcionar boas estimativas para todos os coeficientes a partir de poucos experimentos, o que significa uma diminuição do trabalho e consequentemente, do tempo e do custo final do processo;
2. Permitir a análise simultânea dos fatores, a fim de verificar e quantificar efeitos sinérgicos e antagônicos entre as variáveis de interesse;
3. Permitir calcular e avaliar o erro experimental, o que é fundamental para especificar o nível de confiança estatística com o qual se pode estimar a reprodutibilidade do resultado desejado;
4. Fornecer condições de avaliação dos coeficientes e do modelo, ou seja, da regressão e da falta de ajuste.

1.6.1. Planejamentos fatoriais

Seja k o número de fatores em estudo, cada qual com N níveis, denota-se um esquema fatorial completo por N^k . O planejamento fatorial mais simples e o mais estudado é aquele em que todas as variáveis são estudadas em dois níveis: superior (+) e inferior (-). O planejamento de dois níveis, tendo k variáveis em estudo, irá requerer a realização de 2^k ensaios diferentes, sendo denominado de fatorial 2^k . A adição de pontos centrais torna possível a execução da inferência estatística, viabilizando o cálculo de resíduos e consequentemente do erro padrão. A adição de pontos axiais permite ajustar as respostas experimentais a um modelo de segunda ordem (Rodrigues & Iemma, 2009).

1.6.2. Análise por Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

A metodologia de superfície de resposta é uma técnica de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais e tem sido utilizada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (Rodrigues & Iemma, 2009; Box et al., 1950). Esta técnica baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que, geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar o sistema até sua otimização.

Diversos são os planejamentos que podem ser usados para montar uma série de experimentos que possibilitem o cálculo dos coeficientes. Uma das classes de planejamento mais utilizadas para ajustar modelos quadráticos é o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (Rodrigues & Iemma, 2009; Haaland, 1989). Este planejamento consiste de um fatorial completo 2^k , replicatas no ponto central e dois pontos sobre os eixos de cada variável a uma distância $\pm \alpha$ do ponto central, onde $\alpha = (2^k)^{\frac{1}{4}}$. O planejamento DCCR é uma das classes de planejamento mais utilizadas para ajustar modelos quadráticos conforme a equação 1, onde k é o número de variáveis.

$$y = \beta_o + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_j b_{ij} x_i x_j + e \quad [1]$$

A avaliação estatística dos modelos empíricos no que diz respeito a apresentarem ou não um grau de ajuste adequado aos dados experimentais pode ser realizada empregando a análise de variância (ANOVA) por meio do coeficiente de correlação R e do teste F (distribuição de Fisher), levando em consideração seus respectivos graus de liberdade e o nível de significância (α) escolhido no ensaio (Rodrigues & Iemma, 2009). Quanto mais próximo o coeficiente de correlação estiver de 1,0 (correlação perfeita), melhor será o ajuste do modelo aos dados experimentais.

O teste F de significância consiste em verificar se o modelo proposto explica uma variação significativa dos dados experimentais, realizada pela comparação do valor de F calculado com o valor de F tabelado para uma distribuição de referência. Para o

modelo ser considerado válido, o valor de F calculado dever ser superior ao tabelado (Rodrigues & Iemma, 2009).

A descrição gráfica do modelo ajustado, também conhecida como superfície de resposta, permite um melhor entendimento das interações entre as variáveis estatisticamente significativas. Além disso, a superfície de resposta define faixas de trabalho para cada uma das variáveis, caracterizando a robustez do processo, ou seja, delimitando a máxima variação permitida das variáveis analisadas que mantém o processo nas condições otimizadas.

2. Objetivos

Este trabalho teve três objetivos principais:

1. Otimizar a produção de β -glucosidases, β -xilosidases e xilanases por *C. graminicola*, bem como de lacases por *P. sanguineus*, caracterizando bioquimicamente as enzimas nos extratos brutos.
2. Avaliar o potencial de utilização dos extratos brutos obtidos em coquetéis enzimáticos, visando à bioconversão eficiente de materiais lignocelulósicos (papel de descarte, bagaço e palha de cana, etc).
3. Purificação e caracterização bioquímica de uma β -glucosidase estimulada por xilose produzida por *C. graminicola*, a fim de conhecer as propriedades de uma enzima potencialmente interessante para a aplicação em processos de sacarificação de materiais lignocelulósicos.

3. Material e Métodos

3.1. Organismos de estudo

As linhagens de *C. graminicola* e *P. sanguineus* empregadas neste estudo foram isoladas do solo da floresta Amazônica e identificadas por pesquisadores que, juntamente com a Profa. Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel (FFCLRP/USP), fizeram parte da equipe do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Adaptações da Biota Aquática da Amazônia (ADAPTA), financiado pelo CNPq/MCT, com a coordenação geral do prof. Dr. Adalberto Luis Val (INPA). A linhagem de *Trichoderma reesei* QM9414 (ATCC 26921) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. João Atílio Jorge (FFCLRP/USP).

3.2. Manutenção das linhagens

As linhagens de *C. graminicola* e *P. sanguineus* foram mantidas por meio de repiques sucessivos em meio sólido inclinado de PDA (Potato Dextrose Agar, Oxoid Ltda) e a linhagem de *T. reesei* foi mantida em meio sólido de farinha de aveia a 4,0% (Quaker). Os meios foram previamente autoclavados a 127 °C e 1,5 atm por 20 minutos. Após o repique, as culturas foram mantidas em estufa a 25°C por até 10 dias, e posteriormente conservadas em geladeira a 4°C por até 30 dias.

3.3. Ensaio enzimáticos

Em todos os experimentos para a determinação da atividade enzimática, controles foram realizados visando à avaliação da hidrólise espontânea dos substratos nas condições dos ensaios. As condições experimentais, como tempos de reação e

unidades de atividade enzimática, empregadas em todos os experimentos foram ajustadas para garantir a estimativa de velocidades iniciais (hidrólise de não mais que 5% do substrato inicial, resposta linear de formação do produto em função do tempo de reação). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de produto por minuto. A atividade específica foi definida como a relação entre o número de unidades de atividade (U) e a massa de proteína total (mg) presente no meio de reação. Os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicata e cada experimento foi repetido utilizando três diferentes extratos brutos ($n=3$).

3.3.1. Determinação das atividades β -glucosidásica, β -xilosidásica e α -L-arabinofurosidásica

As atividades β -glucosidásica, β -xilosidásica e α -L-arabinofurosidásica foram determinadas empregando-se os substratos sintéticos *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (PNP-glc), *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (PNP-xyl) e *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (Sigma-Aldrich Chem. Co.), quantificando-se a liberação do íon *p*-nitrofenolato ($\epsilon_{410\text{nm}, \text{pH } 12} = 17.500 \text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$). A menos que especificado diferentemente, as condições padrão de ensaio foram 65 °C, tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0, contendo os substratos em concentração 2 mmol L⁻¹ em um volume final de 0,6 mL. As reações foram iniciadas pela adição de 50,0 μL das enzimas diluídas convenientemente ao meio reacional e interrompidas pela adição de 1 mL de tetraborato de sódio saturado, em intervalos de tempos convenientes.

3.3.2. Determinação da atividade xilanásica

A atividade xilanásica foi determinada quantificando-se os açúcares redutores liberados empregando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), segundo Miller (1959). O substrato utilizado foi xilana Birchwood (1%, m/v) (Sigma-Aldrich Chem.

Co.) em um volume final de 1,0 mL. A menos que especificado diferentemente, as condições padrão de ensaio foram 65° C e tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0. As reações foram iniciadas pela adição de 500 µL da enzima diluída adequadamente ao meio reacional e interrompidas após intervalos de tempo adequados pela adição de 200µL do reagente DNS a 200 µL do meio reacional. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 5.000 x g e o sobrenadante obtido foi aquecido em banho fervente por 5 minutos. A seguir, a mistura foi resfriada, diluída com 2,0 mL de água destilada e o produto formado foi dosado espectofotometricamente em 540 nm.

3.3.3. Determinação da atividade celobiásica

A atividade celobiásica foi determinada empregando-se o substrato celobiose como substrato. A menos que especificado diferentemente, as condições padrão dos ensaios foram 65°C contendo celobiosose em concentração 10 mmol.L⁻¹ e tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0, em um volume final de 1,0 mL. As reações foram iniciadas pela adição de 50,0 µL da enzima diluída adequadamente ao meio reacional e interrompidas em diferentes intervalos de tempo por aquecimento em banho de água fervente por 5 minutos. Em seguida, a glicose liberada foi estimada pelo do método da glicose-oxidase (Bergmeyer & Bernt, 1974), utilizando o kit Glicose Liquiform 133-1/500 (Labtest Diagnóstica SA). O produto da reação, antipirilquinonimina vermelha, proporcional à glicose liberada, foi detectado em 505 nm.

3.3.4. Determinação das atividades avicelásica e carboximetilcelulásica (CMcase)

Para a determinação das atividades avicelásica e carboximetilcelulásica, as condições padrão de reação foram 1% (m/v) de celulose microcristalina (Avicel®) ou 1% (m/v) de carboximetilcelulose (CMC) de alta viscosidade (Sigma-Aldrich Chem, Co.) em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0, em um volume final de 1,0 mL. A menos que especificado diferentemente, as reações, realizadas a 50°C, foram iniciadas pela adição de 500 µL da enzima diluída adequadamente ao meio reacional.

Nos tempos desejados, alíquotas de 200 μL foram retiradas e adicionadas a 200 μL de DNS (Miller, 1959) para interrupção da reação. Para a determinação da atividade carboximetilcelulásica, a mistura foi mantida em banho fervente por 5 minutos e a seguir, resfriada e diluída com 2,0 mL de água destilada. O produto formado foi dosado espectofotometricamente em 540 nm. A atividade avicelásica foi determinada nas mesmas condições, porém devido à solubilidade parcial do substrato um passo de centrifugação de 6 minutos a 5.000 x g para a retirada do substrato insolúvel foi introduzido previamente ao aquecimento em banho fervente.

3.3.5. Atividade sobre o papel de filtro (“filter paper activity” – FPA)

A atividade FPase foi determinada a 50°C e a mistura de reação foi composta por uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 (1,0 x 3,0 cm) como substrato, suspensa em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0. A esta suspensão foi adicionada a enzima convenientemente diluída em um volume final de reação de 1,0 mL. Alíquotas de 200 μL foram retiradas após os tempos de reação desejados, adicionadas a 200 μL do reagente DNS, aquecidas em água fervente por 5 minutos, resfriadas à temperatura ambiente e diluídas com 2,0 mL de água destilada. A seguir foi medida a absorbância do produto em 540 nm.

3.3.6. Determinação da atividade lacásica

A atividade lacásica foi determinada continuamente empregando-se o substrato sintético ABTS [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] (Sigma-Aldrich Chem. Co.), acompanhando-se a formação do radical ABTS⁺ ($\epsilon_{420\text{nm}} = 34.650 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$). As condições padrão de ensaio foram tampão McIlvaine (McIlvaine, 1921), pH 4,5, contendo ABTS 1 mmol L⁻¹ em um volume final de 1,0 mL. As reações foram realizadas rotineiramente a 65 °C e iniciadas com adição da enzima diluída adequadamente ao meio reacional.

3.3.7. Determinação da atividade sobre outros substratos

A hidrólise de maltose, lactose, sacarose e salicina (Sigma-Aldrich Chem. Co.) foi estimada a 65 °C em tampão acetato de sódio, 50 mmol L⁻¹, pH 5,0, contendo os substratos em concentração final 5 mmol L⁻¹, num volume final de 0,6 mL. A reação foi iniciada por adição da enzima e interrompida após diferentes intervalos de tempo por aquecimento em banho de água fervente por 5 minutos. Em seguida, a glicose liberada foi estimada empregando o método da glicose-oxidase (Bergmeyer & Bernt, 1974).

A hidrólise de trealose (Sigma-Aldrich Chem. Co.) foi estimada nas mesmas condições descritas acima, porém empregando o substrato em concentração final de 1% (m/v). Os açúcares redutores totais liberados foram dosados utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS, Miller 1959).

3.4. Determinação preliminar das melhores condições de cultivo para a produção em meio sólido de β -glucosidases, β -xilosidases e xilanases por *C. graminicola* e lacases por *P. sanguineus*

Para os cultivos de *P. sanguineus* e *C. graminicola*, os inóculos foram realizados empregando-se secções de 0,25 cm² dos micélios cultivados em PDA por frasco de meio de cultura.

A seleção preliminar das melhores condições de cultivo para a produção das enzimas de interesse foi realizada empregando a metodologia OFAT (One Factor at a Time). Para a seleção da melhor fonte de carbono, os microrganismos foram cultivados em meios constituídos de farelo de trigo ou por diferentes resíduos agroindustriais (bagaço de cana explodido, bagaço de cana *in natura*, casca de amendoim, casca de arroz, farelo de soja, palha de milho, palha de cana, serragem, sabugo de milho moído), com umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹ de substrato sólido. Foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 250 mL, respeitando-se o preenchimento de apenas 1/5 do volume total a fim de garantir as condições aeróbicas adequadas para o crescimento dos microrganismos. Os meios foram previamente autoclavados a 127 °C e 1,5 atm por 20

minutos e os cultivos realizados por 192 horas a 25 °C em estufa com umidade constante ao redor de 70 %, verificada com um termo higrômetro (Minipa MT-240).

Depois de identificada a melhor fonte de carbono para a produção de cada enzima, os meios foram suplementados com diferentes fontes de nitrogênio (asparagina, caseína, farinha de soja, glicina, peptona, extrato de levedura, extrato de malte, nitrato de amônio, cloreto de amônio, sulfato de amônio, uréia, etc), bem como fontes suplementares de carbono (casca de amendoim, casca de arroz, palha de milho, glicose, xilose, xilana, celobiose, palha de cana *in natura*, papel filtro, farelo de soja moído, sabugo de milho moído, etc), mantendo-se inalteradas as demais condições de cultivo. Cada experimento foi repetido 3 vezes (n=3) e os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicata. Os resultados foram apresentados como as médias dos valores obtidos.

3.5. Obtenção dos extratos brutos do cultivo de *C. graminicola* e *P. sanguineus*

Após o cultivo, os meios foram suspensos em 30 mL de água deionizada gelada, homogeneizados levemente com um bastão de vidro em banho de gelo, filtrados em peneira de nylon e centrifugados por 20 minutos a 10.000 x g e 4°C. Os sobrenadantes (extratos brutos) obtidos foram mantidos a 4°C para os experimentos posteriores, sem perda apreciável das atividades enzimáticas por até 30 dias.

3.6. Obtenção do extrato bruto rico em celulasas de *T. reesei*

Para obtenção do extrato bruto rico em celulasas, *T. reesei* foi cultivado em meio líquido, com pH inicial 6,0, constituído de uréia (0,03%, m/m), (NH₄)₂SO₄ (0,14%, m/m), KH₂PO₄ (0,2%, m/m), CaCl₂.2H₂O (0,03%, m/m), MgSO₄.7H₂O (0,03%, m/m), FeSO₄.7H₂O (5,0 mgmL⁻¹), MnSO₄ (1,6 mgmL⁻¹), ZnSO₄.7H₂O (1,4 mgmL⁻¹), CoCl₂ (2 mg mL⁻¹), peptona (0,075%, m/m), Tween-80 (0,2%,v/v) e Avicel (0,75%, m/m), mantido a 28°C, 120 rpm por 8 dias. Após o cultivo, o meio de cultivo foi filtrado em espuma sintética, com o auxílio de um funil de Buchner e centrifugado por 20 min a 10.000 x g e 4°C. O extrato bruto (sobrenadante) permaneceu estocado a 4°C para os

experimentos posteriores, sem perda apreciável das atividades enzimáticas por até 30 dias.

3.7. Otimização da produção de β -glucosidases, β -xilosidases e xilanases por *C. graminicola* e lacases por *P. sanguineus* empregando a metodologia de superfície de resposta (MSR)

Após a seleção preliminar das condições para a produção das enzimas de interesse, os meios de cultivo foram otimizados quanto às concentrações das fontes escolhidas e quanto às variáveis: umidade inicial do meio, temperatura e tempo de cultivo. Para este propósito foi empregada a MSR, empregando o delineamento compósito central rotacional (DCCR), fixando-se os valores máximos (+1) e mínimos (-1), por meio de planejamentos fatoriais. Os intervalos experimentais das variáveis independentes analisadas nos experimentos de MSR foram determinados por meio de estudos preliminares, empregando-se a metodologia OFAT. Cada experimento foi repetido 3 vezes (n=3) e os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicata. Os resultados foram apresentados como as médias dos valores obtidos. A umidade inicial do meio de cultivo foi expressa em mL de água deionizada por grama de substrato seco ou teor de umidade em base úmida, determinado experimentalmente de acordo com a equação 2:

$$M_w = \frac{m_{su} - m_{ss}}{m_{su}} \times 100 \quad [2]$$

Onde: M_w (%) = teor de umidade em base úmida; m_{su} = massa do substrato úmido (g), m_{ss} = massa do substrato seco (g).

3.7.1. Otimização da produção de β -glucosidases por *C. graminicola*

A produção de β -glucosidases por *C.graminicola* em meio sólido, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono, foi otimizada quanto à temperatura, tempo de cultivo, umidade inicial do meio e concentração de palha de cana *in natura*, empregando-se um planejamento fatorial 2^4 estudado em 5 níveis, com 16 pontos fatoriais, 8 pontos axiais e 3 pontos centrais, resultando em 27 experimentos. Os valores codificados e reais para as variáveis independentes estão apresentados na Tabela 1.

A seguir foi realizado um segundo estudo para a otimização da produção de β -glucosidases por *C.graminicola* no qual foram otimizadas somente as variáveis: temperatura, tempo de cultivo e umidade inicial do meio. Para isso, utilizou-se um planejamento fatorial 2^3 estudado em 5 níveis, com 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais, o qual resultou em 17 experimentos. Os valores codificados e reais para as variáveis analisadas estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial 2^4 para a produção de β -glucosidases

Variáveis independentes	Níveis				
	$-\alpha$ (-2)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+2)
Tempo (dias)	7	8	9	10	11
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	20	25	30	35	40
Umidade inicial do meio (mL g^{-1})	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Palha de cana <i>in natura</i> (% , m/m)	0,5	1,0	2,0	3,0	7,0

Tabela 2: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial 2^3 para a produção de β -glucosidases

Variáveis independentes	Níveis				
	$-\alpha$ (-1,68)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1,68)
Tempo (dias)	6	8	9	10	11
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	20	25	30	35	40
Umidade inicial do meio (mL g^{-1})	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0

3.7.2. Otimização da produção de β -xilosidases por *C. graminicola*

A otimização da produção de β -xilosidases por *C. graminicola* em meio sólido, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono foi realizada em relação às variáveis: concentração de casca de amendoim moída, tempo de cultivo e umidade inicial do meio. Para o estudo empregou-se um planejamento fatorial 2^3 , estudado em 5 níveis, apresentando 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais, resultando em 17 experimentos. Os valores codificados e reais para as variáveis analisadas estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial para a produção de β -xilosidases

Variáveis independentes	Níveis				
	$-\alpha(-1,68)$	-1	0	+1	$+\alpha(+1,68)$
Casca de amendoim moída (% , m/m)	0,5	1	3	5	7
Tempo (dias)	6	7	8	9	11
Umidade inicial do meio (mL g ⁻¹)	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0

3.7.3. Otimização da produção de xilanases por *C. graminicola*

A otimização da produção de xilanases por *C. graminicola* em meio sólido, empregando farelo de trigo como fonte de carbono, foi realizada em relação às variáveis independentes: temperatura e tempo de cultivo, umidade inicial do meio, concentração de sabugo de milho moído e concentração de sulfato de amônio. No ensaio, empregou-se um planejamento fatorial 2^5 estudado em 5 níveis, com 16 pontos fatoriais, 10 pontos axiais e 6 pontos centrais, resultando em 32 experimentos. Os valores codificados e reais para as variáveis independentes estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial para produção de xilanases

Variáveis independentes	Níveis				
	$-\alpha$ (-2)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+2)
Sabugo de milho moído (% m/m)	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Tempo (dias)	4	6	8	10	12
Umidade inicial do meio (mL g ⁻¹)	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Sulfato de amônio (% m/m)	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9
Temperatura (°C)	20	25	30	35	40

3.7.4. Otimização da produção de lacases por *P. sanguineus*

A otimização da produção de lacases por *P. sanguineus* em meio sólido, empregando farelo de trigo como fonte de carbono, foi realizada em relação às variáveis independentes: temperatura e tempo de cultivo, umidade inicial do meio, concentração de sabugo de milho moído. No ensaio empregou-se um planejamento fatorial 2⁴ estudado em 5 níveis, com 16 pontos fatoriais, 8 pontos axiais e 3 pontos centrais, resultando em 27 experimentos. Os valores codificados e reais para as variáveis independentes estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial para a produção de lacases

Variáveis independentes	Níveis				
	$-\alpha$ (-2)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+2)
Sabugo de milho moído (% m/m)	5	10	15	20	25
Tempo (dias)	6	7	8	9	10
Umidade inicial do meio (mL g ⁻¹)	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0
Temperatura (°C)	15	20	25	30	35

3.8. Efeitos da temperatura e do pH sobre as atividades lacásica, β -glucosidásica, β -xilosidásica e xilanásica no extrato bruto

Os efeitos da temperatura e do pH, assim como de suas possíveis interações, sobre as atividades enzimáticas no extrato bruto foram avaliados empregando-se MSR, por meio de DCCR. Foram realizados planejamentos fatoriais 2^2 , estudados em 5 níveis, fixando-se os valores máximos (+1) e mínimos (-1), apresentando 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios. Os intervalos experimentais das variáveis independentes analisadas nos experimentos de MSR foram determinados por estudos preliminares. As atividades enzimáticas foram quantificadas conforme descrito nos itens 3.3.1, 3.3.2 e 3.3.6. Os valores codificados e reais para as variáveis independentes estão apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial 2^2 para as atividades β -glucosidásica e β -xilosidásica

Variáveis independentes	Níveis				
	$-\alpha(-1,41)$	-1	0	+1	$+\alpha(+1,41)$
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	50	55	65	75	80
pH	4,1	4,5	5,0	5,5	6,9

Tabela 7: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial 2^2 para a atividade xilanásica

Variáveis independentes	Níveis				
	$-\alpha(-1,41)$	-1	0	+1	$+\alpha(+1,41)$
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	55	60	65	70	75
pH	4,1	4,5	5,5	6,5	6,9

Tabela 8: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial 2^2 para a atividade lacásica

Variáveis independentes	Níveis				
	$-\alpha(-1,41)$	-1	0	+1	$+\alpha(+1,41)$
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	50	55	65	75	80
pH	3,4	4,0	4,5	5,5	5,9

3.9. Estabilidade térmica e ao pH das β -glucosidases, β -xilosidases e xilanases de *C. graminicola* e das lacases de *P. sanguineus*

A termoestabilidade das diferentes enzimas no extrato bruto, bem como da β -glucosidase de *C. graminicola* purificada, foi analisada por incubação de alíquotas, diluídas adequadamente em água em diferentes temperaturas (50 a 75°C). Após intervalos de tempo convenientes, alíquotas das soluções incubadas foram retiradas e a inativação foi interrompida por imersão em banho de gelo por 1 minuto. A seguir, as atividades residuais nos extratos brutos foram quantificadas conforme descrito no item 3.3.1, 3.3.2 e 3.3.6.

A estabilidade das diferentes enzimas ao pH foi analisada por diluição de alíquotas em tampão McIlvaine (McIlvaine, 1921) em diferentes pH (2,5-8,0), seguida de incubação a 4°C por 24h. Após este período, as atividades residuais foram quantificadas conforme descrito no item 3.3.1, 3.3.2 e 3.3.6.

3.10. Purificação de uma β -glucosidase produzida por *C. graminicola*

O extrato bruto do cultivo de *C. graminicola* em condições otimizadas para a produção de β -glucosidases foi inicialmente precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 50% por 24 horas em banho de gelo. A seguir, a suspensão foi centrifugada por 15 minutos a $10.000 \times g$ e 4°C , e o sobrenadante obtido foi dialisado exaustivamente contra água, a 4°C , com várias trocas e finalmente contra tampão Bis-Tris 20 mmol L^{-1} , pH 6,5 (Tampão A) por uma noite. A amostra dialisada foi aplicada numa coluna de DMAE-fractogel (10,0

x 2,0 cm) equilibrada em tampão A. Após a aplicação da amostra a coluna foi lavada com o mesmo tampão até não ser mais detectada a eluição de proteínas ($A_{280\text{nm}}$) e atividade PNP-glucosidásica. A seguir a coluna foi eluída com tampão A contendo NaCl 120 mmol L⁻¹, com fluxo de 120 mL/hora, até não ser mais detectada a eluição de proteínas ($A_{280\text{nm}}$) e atividade PNP-glucosidásica. Um pico de atividade β -glucosidásica foi eluído neste passo e as frações com maior atividade foram reunidas e armazenadas a 4°C. A seguir, a coluna foi eluída com um gradiente linear de NaCl (120-350 mmol L⁻¹) em tampão A, com fluxo de 120,0 mL/hora. Frações de 2,0 mL foram coletadas e analisadas para proteína ($A_{280\text{nm}}$) e atividade PNP-glucosidásica. Um segundo pico de atividade β -glucosidásica foi eluído e as frações com maior atividade foram reunidas e concentradas em concentrador Vivaspin 20 de membrana de polietersulfona com corte 10 kDa (GE Healthcare Life Sciences). O tampão da amostra concentrada foi trocado por lavagem para acetado de sódio 20 mmol L⁻¹, pH 5,0 contendo NaCl 150 mmol L⁻¹ (Tampão B) e esta foi aplicada em uma coluna de filtração em gel de Sephacryl S-200 (130,0 x 2,0 cm), equilibrada e eluída com tampão B. Dois picos de atividade β -glucosidase foram separados e as frações com maior atividade foram reunidas, aliqüotadas e armazenadas a 4°C, sendo denominadas BGCg-1 e BGCg-2, segundo a ordem de eluição.

3.11. Dosagem de proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas empregando o método descrito por Read & Northcote (1981), usando soralbumina bovina como padrão.

3.12. Análises eletroforéticas

Eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE) foi realizada em geis em placa numa concentração de poliacrilamida de 7%, de acordo com o método descrito por Davis (1964). Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada em geis em placa, numa concentração de poliacrilamida de

10%, conforme descrito por Laemmli (1970). As proteínas foram reveladas com Coomassie Brilliant Blue R ou nitrato de prata (Blum et al., 1987). A atividade β -glucosidásica no gel, após PAGE, foi determinada empregando a metodologia descrita por Kwon et al. (1994). Brevemente, após a corrida o gel foi imerso em tampão acetato de sódio 100 mmol L⁻¹, pH 5,0, por 30 minutos a temperatura ambiente e a seguir foi incubado sob agitação, a 65°C, no mesmo tampão em concentração 50 mmol L⁻¹ contendo esculina (6,7-dihydroxycoumarina 6-glucosídeo) e cloreto férrico, em concentrações 0,1% (m/v) e 0,03% (m/v), respectivamente. As bandas de atividade foram detectadas no gel pela formação de um precipitado escuro, característico da hidrólise de esculina.

3.13. Determinação da massa molecular aparente da β -glucosidase purificada

A massa molecular aparente da enzima purificada foi estimada por SDS-PAGE, empregando mistura padrão de massas moleculares pré-corada para proteínas entre 7 e 198 kDa (Sigma-Aldrich Chem. Co.). A massa molecular aparente da enzima purificada na forma nativa também foi estimada por filtração em gel em HPLC, utilizando uma coluna Bio-Sil SEC 400 (7,8 x 300 mm), da BIO-RAD. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão fosfato 100 mmol L⁻¹, pH 6,8, contendo NaCl 150 mmol L⁻¹ e azida de sódio 10 mmol L⁻¹, com fluxo de 1,0 mL/min. Frações de 1,0 mL foram coletadas e analisadas para atividade PNP-glucosidásica, conforme descrito no item 3.3.1. O volume morto da coluna ("void") foi determinado usando Blue Dextran e as seguintes proteínas foram utilizadas para a calibração da coluna: gama globulinas (bovina) (158 kDa, Bio-Rad), soroalbumina bovina (BSA) (67 kDa, Sigma), ovalbumina (44 kDa, Bio-Rad) e mioglobina equínea (17 kDa, Bio-Rad).

3.14. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos V (velocidade máxima), K_M (constante de Michaelis-Menten), K_{0,5} (constante de dissociação aparente) e n_H (coeficiente de Hill) foram

calculados por regressão não-linear, empregando o programa SigrafW (Leone et al., 2005). Todos os experimentos de cinética foram repetidos três vezes utilizando diferentes preparações de enzimas, e que cada medida de atividade foi realizada em duplicata. Os parâmetros cinéticos foram apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores calculados para três diferentes experimentos ($n = 3$).

3.15. Análises estatísticas e tratamento dos dados

Para os planejamentos fatoriais, as análises estatísticas dos dados e a obtenção dos modelos que descrevem os efeitos e as regiões estudadas por MSR, empregou-se o software Statistica 12.0 (StatSoft, Inc.). A qualidade do ajuste dos modelos gerados foi avaliada empregando-se análise de variância (ANOVA). A significância estatística de cada equação de modelo polinomial obtida foi avaliada por meio do coeficiente de variação R^2 e validada pelo teste F (distribuição de *Fisher*).

3.16. Validação experimental das condições otimizadas

Para a validação da otimização da produção de cada enzima de interesse, três cultivos foram realizados nas condições ótimas obtidas experimentalmente para cada uma delas. Analogamente, as otimizações de pH e temperatura de reação para as xilanases, β -xilosidases e β -glucosidases do extrato bruto de *C. graminicola*, para as lacases do extrato bruto de *P. sanguineus* e para a β -glucosidase purificada foram validadas por medida em triplicata, realizadas nas melhores condições determinadas.

3.17. Estudo da ação sinérgica dos extratos brutos de *C. graminicola*, *T. reesei* e *P. sanguineus* para a hidrólise de palha de cana *in natura*, papelão, jornal, bagaço de cana *in natura* e bagaço de cana explodido

A hidrólise dos resíduos foi realizada em meio constituído de 1% (m/v) do resíduo em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0, em um volume final de 20,0 mL. Os ensaios foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, herméticamente fechados, a 50°C e sob agitação orbital de 180 rpm. A reação foi iniciada por adição de alíquotas convenientes dos extratos brutos de *C. graminicola* (**ECg**), *T. reesei* (**ETr**) e *P. sanguineus* (**EPs**). Após intervalos de tempo adequados alíquotas do meio reacional foram retiradas e analisadas para açúcares redutores totais, empregando o método do DNS, e glicose total, empregando o método da glicose oxidase. Para os controles, foram utilizados os extratos brutos mantidos por 15 minutos em banho fervente.

O rendimento da hidrólise enzimática de cada resíduo foi avaliado tomando como referência os teores de açúcares redutores e glicose totais liberados pela hidrólise completa de cada um em ácido sulfúrico, estimados segundo método descrito por Sluiter et al. (2008). Para esta determinação foram pesados 5,0 mg de cada substrato, adicionando-se a seguir 100,0 µL de ácido sulfúrico 72% m/v. A mistura de reação foi mantida em banho-maria a 30°C por 45 minutos e a seguir diluída para 4% e autoclavada por 1 hora a 1 atm e 120°C. Após a neutralização com NaOH a 50% m/v, o volume final foi completado para 12 mL e os açúcares redutores e a glicose liberados foram quantificados pelos métodos de DNS e glicose oxidase, respectivamente. Para cada substrato a determinação foi repetida 6 vezes e as dosagens de açúcares redutores totais e glicose foram realizadas em duplicata.

O coquetel comercial Celluclast ® 1.5 L (Novozymes) foi empregado para estudos comparativos entre as celulasas nele presentes e aquelas produzidas por *T. reesei*, quando utilizadas em conjunto com os extratos brutos de *C. graminicola* e *P. sanguineus*, para a hidrólise de palha de cana *in natura*, bagaço de cana explodido e *in natura*.

Palha e bagaço de cana *in natura* foram cedidos pela Companhia Albertina Mercantil e Industrial, Sertãozinho, São Paulo, Brasil. O bagaço de cana explodido foi cedido pelo Grupo Nardini Agroindustrial Ltda, Vista Alegre do Alto, São Paulo,

Brasil. Para obtenção do bagaço explodido, bagaço *in natura* recém produzido foi tratado com vapor d'água a 14 kg cm^{-2} , por 8 minutos, o que foi seguido de uma rápida expansão. A palha de cana *in natura* foi moída em moinho de Facas SL-31 (SOLAB) e peneirada em peneira de 30 mesh. O papelão e o jornal, sem pré-tratamento, foram picados em tiras de $0,5 \times 0,5 \text{ cm}$ cada. A palha de cana, assim como o bagaço de cana *in natura* e explodido empregados nos ensaios foram lavados exaustivamente com água deionizada até que não fossem detectados açúcares redutores, pelo método do DNS. Após a lavagem, os resíduos foram secos em estufa a 40°C e estocados em dessecador para experimentos posteriores.

Para evitar o crescimento de microrganismos, todos os experimentos foram realizados em presença de azida de sódio 10 mmol L^{-1} e/ou tolueno (0,01%, v/v).

3.18. Otimização das condições de hidrólise de palha de cana *in natura* por MSR

As condições de hidrólise de palha de cana *in natura* foram otimizadas empregando-se MSR, por meio de DCCR, fixando-se os valores máximos (+1) e mínimos (-1), empregando-se um planejamento fatorial completo 2^3 . Os valores codificados e reais para as variáveis independentes estudadas estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento fatorial 2^3 para a otimização da hidrólise de palha de cana *in natura*

Variáveis independentes	Níveis				
	$-\alpha$ (-1,68)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1,68)
ETr(mL)	0,5	1,5	2,0	2,5	3,5
EPs (mL)	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
ECg(mL)	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0

ETr: extrato bruto de *T. reesei* ; **EPs:** extrato bruto de *P. sanguineus*; **ECg:** extrato bruto de *C. graminicola*

Após 72 horas de reação, alíquotas do meio reacional foram retiradas e analisadas para açúcares redutores totais, empregando o método do DNS e glicose total,

empregando o método da glicose oxidase. Para os controles foram utilizados os extratos brutos mantidos por 15 minutos em banho fervente. O rendimento da hidrólise enzimática da palha de cana *in natura* foi estimado como descrito no item 3.17.

3.19. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de amostras de palha de cana *in natura* antes e após o tratamento enzimático

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi empregada para a investigação das características morfológicas de amostras de palha de cana *in natura* antes e após serem submetidas ao processo de hidrólise enzimática. As amostras foram fixadas em suportes de alumínio por meio de fita adesiva a base de carbono (Nisshin Em. Co., Ltd.), sendo, posteriormente, recobertas com fina camada de ouro por 200 segundos em um pulverizador Bal-Tec mod, SCD 050 Sputter Coater (Fürstentum Liechtestein). As análises foram realizadas em um equipamento Zeiss mod. EVO50 (Cambridge, UK), mantendo a voltagem de aceleração do feixe eletrônico em 20 kV. O sistema de detecção usado foi o de elétrons secundários.

4. Resultados e Discussão

Como a maioria das enzimas, as β -glucosidases, β -xilosidases, xilanases e lacases fúngicas podem ser produzidas por cultivo submerso ou em meio sólido. Embora muitas pesquisas sejam conduzidas utilizando o cultivo submerso, o qual permite melhor controle das condições de aeração, pH e temperatura, o cultivo em meio sólido tem sido preferido para a produção de enzimas lignocelulolíticas (Kaur et al., 2006; Leite et al., 2008; Yang et al., 2008; Sonia et al., 2008; Liang et al., 2011; Qian et al., 2012; Delabona et al., 2012). Isto se deve ao grande número de vantagens econômicas e de processo, entre as quais se destaca o uso de resíduos agro-industriais, abundantes e de baixo custo (Holker et al., 2004; Kar et al., 2013). Além disso, a fermentação em meio sólido permite obter enzimas em alta concentração ao final do processo, evitando etapas posteriores de processamento (Holker et al., 2004; Qian et al., 2012). Ainda, na maioria dos casos, o simples enriquecimento dos resíduos com fontes suplementares de nitrogênio, minerais ou vitaminas é suficiente para a produção de diferentes enzimas em níveis elevados.

4.1. β -glucosidases

4.1.1. Otimização da produção de β -glucosidases por *C. graminicola*

4.1.1.1. Seleção preliminar das melhores condições de cultivo para a produção enzimática

Nesta etapa, foram avaliadas diferentes fontes de carbono, além de fontes suplementares de carbono e nitrogênio, visando à produção de β -glucosidases por *C. graminicola*. Esta avaliação preliminar foi realizada empregando a metodologia OFAT.

4.1.1.1.1. Efeito de diferentes fontes de carbono

O efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de β -glucosidases por *C. graminicola* está apresentado na Tabela 10. A maior produção enzimática ($109,7 \pm 7,7 \text{ U g}^{-1}$) foi obtida em meio contendo farelo de trigo como fonte de carbono. Níveis de produção cerca de duas vezes menores foram obtidos quando o fungo foi cultivado empregando casca de amendoim ($57,0 \pm 4,1 \text{ U g}^{-1}$), casca de arroz ($47,5 \pm 4,1 \text{ U g}^{-1}$) ou palha de milho ($48,3 \pm 3,9 \text{ U g}^{-1}$) como fontes de carbono. Já a produção em palha de cana e bagaço de cana *in natura* ou explodido foi substancialmente menor, mantendo-se em níveis cerca de 5 a 10 vezes menores que o máximo.

O farelo de trigo tem sido amplamente utilizado como fonte de carbono para o cultivo de microrganismos visando à obtenção de enzimas de interesse biotecnológico (Qian et al., 2012; Masui et al., 2011; Zimbardi et al., 2012). Isto pode ser atribuído à sua composição nutricional, pois este resíduo apresenta cerca de 14% de proteínas, 27% de carboidratos (64% de celulose e 36% de hemicelulose), 6 % de lipídeos, vitamina B, além de cálcio, magnésio, fósforo, potássio e enxofre (Jatinder et al., 2006; Leite et al., 2008; Kar et al., 2012). Além disso, o tamanho e a porosidade das partículas do farelo de trigo são interessantes para a fixação dos microrganismos, absorção de água e excreção das enzimas.

Tabela 10: Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de β -glucosidases

Fonte de carbono	U g ⁻¹	U mL ⁻¹
Farelo de trigo	$109,7 \pm 7,7$	$21,94 \pm 1,9$
Bagaço de cana explodido	$9,5 \pm 1,1$	$1,9 \pm 0,4$
Bagaço de cana <i>in natura</i>	$20,8 \pm 1,8$	$4,2 \pm 0,3$
Palha de cana <i>in natura</i>	$10,2 \pm 1,2$	$2,0 \pm 0,09$
Casca de amendoim	$57,0 \pm 4,1$	$11,4 \pm 1,1$
Casca de arroz	$47,5 \pm 4,1$	$9,5 \pm 0,7$
Palha de milho	$48,3 \pm 3,9$	$9,7 \pm 0,9$

O fungo foi cultivado por 192 h a 25°C, em meio sólido contendo 5 g de diferentes fontes de carbono ou uma massa correspondente a 1/5 do volume total do frasco, com umidade inicial de $2,0 \text{ mL g}^{-1}$ de substrato seco. U g⁻¹ corresponde ao número total de unidades de atividade enzimática produzidas por grama de substrato seco.

4.1.1.1.2. Efeito de fontes suplementares de carbono

O efeito da adição de diferentes fontes suplementares de carbono ao meio de cultivo está apresentado na Tabela 11. Em comparação ao controle (apenas farelo de trigo), as melhores fontes suplementares foram a palha de cana *in natura* e a celobiose, aumentando a produção em 61% e 43%, respectivamente. Níveis de produção semelhantes ao controle foram obtidos quando o fungo foi cultivado em meio suplementado com papel filtro, glicose ou CMC. No entanto, valores cerca de duas vezes menores foram obtidos em meios suplementados com casca de amendoim ($49,2 \pm 4,6$) e palha de milho ($54,9 \pm 5,3$). A mais baixa produção foi obtida quando o microrganismo foi cultivado em meio suplementado com casca de arroz moída, cerca de 30% do controle. A partir deste experimento, a palha de cana foi escolhida como fonte adicional de carbono, o que é muito interessante do ponto de vista de aplicação, dado seu baixo custo e abundância.

Tabela 11: Efeito de diferentes fontes suplementares de carbono sobre a produção de β -glucosidases

Fonte suplementar de carbono (1% m/m)	U g ⁻¹	U mL ⁻¹	%
Controle ^a	101,1 $\pm$ 7,8	20,2 $\pm$ 1,9	100
Casca de amendoim moída	49,2 $\pm$ 4,6	9,8 $\pm$ 0,7	48,7
Casca de arroz moído	33,6 $\pm$ 3,2	6,7 $\pm$ 4,2	33,2
Palha de milho moída	54,9 $\pm$ 5,3	10,9 $\pm$ 1,1	54,3
Palha de cana <i>in natura</i>	162,9 $\pm$ 13,1	32,6 $\pm$ 2,9	161,3
Papel de filtro	97,9 $\pm$ 8,4	19,6 $\pm$ 1,7	96,8
Glicose	91,4 $\pm$ 7,3	18,3 $\pm$ 1,5	90,1
Celobiose	144,8 $\pm$ 10,4	28,9 $\pm$ 2,1	143,2
CMC	84,8 $\pm$ 7,6	16,7 $\pm$ 1,4	83,9

O fungo foi cultivado por 192 h a 25°C, em 5 g de farelo de trigo com umidade inicial do meio de 2,0 mL g⁻¹ de substrato seco, suplementado com diferentes fontes de carbono. As dosagens enzimáticas foram realizadas conforme item 3.3.1. U g⁻¹ corresponde ao número total de unidades de atividade enzimática produzidas por grama de substrato seco.

^aControle: meio de cultivo constituído exclusivamente por farelo de trigo com umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹ de substrato seco.

4.1.1.1.3. Efeito de fontes suplementares de nitrogênio

O efeito da adição de diferentes fontes suplementares de nitrogênio sobre a produção enzimática está apresentado na Tabela 12. Dentre as fontes testadas, nenhuma levou a um aumento da produção da enzima. Além disso, com exceção do extrato de levedura e do farelo de soja moído, as demais fontes inibiram fortemente a produção, atingindo um nível de 36,3% do controle para a glicina. Estes resultados podem ser atribuídos à composição do farelo de trigo, que como citado anteriormente, é uma fonte rica em nitrogênio (Jatinder et al., 2006; Leite et al., 2008; Kar et al., 2012).

Tabela 12: Efeito de diferentes fontes suplementares de nitrogênio sobre a produção enzimática

Fonte suplementar de nitrogênio	(%, m/m)	U g ⁻¹	U mL ⁻¹	%
Controle ^a	-	92,5 ± 8,9	18,5 ± 1,6	100,0
Asparagina	1	42,4 ± 5,1	8,5 ± 0,9	45,8
Glicina	1	33,6 ± 3,2	6,7 ± 0,5	36,3
Caseína	1	39,7 ± 4,8	7,9 ± 0,8	42,9
Peptona	1	40,4 ± 5,2	8,1 ± 0,6	43,7
Extrato de levedura	1	88,4 ± 7,9	17,7 ± 1,1	95,6
Extrato de malte	1	41,6 ± 4,6	8,3 ± 0,9	45,0
Farelo de soja moído	1	87,5 ± 9,6	17,5 ± 1,4	94,6
Uréia	0,8	39,9 ± 3,2	7,9 ± 0,8	43,1
NH ₄ NO ₃	0,8	40,9 ± 3,7	8,2 ± 0,6	44,2
KNO ₃	0,8	41,7 ± 4,2	8,3 ± 0,5	45,1
NaNO ₃	0,8	38,9 ± 4,3	7,8 ± 0,6	42,0
(NH ₄)SO ₄	0,8	44,7 ± 4,0	8,9 ± 0,7	48,3
NH ₄ Cl	0,8	40,7 ± 3,7	8,1 ± 0,9	44,0

O fungo foi cultivado por 192 h a 25°C, em 5 g de farelo de trigo com umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹ de substrato seco, suplementado com diferentes fontes de nitrogênio. As dosagens enzimáticas foram realizadas conforme item 3.3.1. U g⁻¹ corresponde ao número total de unidades de atividade enzimática produzidas por grama de substrato seco.

^a Controle: meio de cultivo constituído exclusivamente por farelo de trigo com umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹ de substrato seco.

4.1.1.1.4. Otimização da produção de β -glucosidases por *C. graminicola* empregando MSR

Conforme descrito no item 3.7.1, após a seleção preliminar das melhores condições de cultivo para a produção de β -glucosidases por OFAT, foi realizado um planejamento fatorial (Tabela 13) para avaliar a influência da temperatura, do tempo de cultivo, da umidade inicial do meio de cultivo e da concentração de palha de cana *in natura* sobre a produção enzimática.

Tabela 13: Condições experimentais e resultados obtidos do planejamento fatorial por DCCR para a produção de β -glucosidases por *C. graminicola*

Ensaio	Variáveis reais e (codificadas)				U g ⁻¹	U mL ⁻¹
	Tempo (dias)	Temperatura (°C)	Palha de cana (% m/m)	Umidade inicial do meio (mL g ⁻¹)		
1	8(-1)	25(-1)	1(-1)	1(-1)	100,3	20,1
2	10(+1)	25(-1)	1(-1)	1(-1)	98,0	19,6
3	8(-1)	35(+1)	1(-1)	1(-1)	109,4	21,9
4	10(+1)	35(+1)	1(-1)	1(-1)	117,4	23,5
5	8(-1)	25(-1)	3(+1)	1(-1)	101,0	20,2
6	10(+1)	25(-1)	3(+1)	1(-1)	100,6	21,1
7	8(-1)	35(+1)	3(+1)	1(-1)	111,0	22,2
8	10(+1)	35(+1)	3(+1)	1(-1)	101,8	20,4
9	8(-1)	25(-1)	1(-1)	2(+1)	129,8	26,0
10	10(+1)	25(-1)	1(-1)	2(+1)	111,4	22,3
11	8(-1)	35(+1)	1(-1)	2(+1)	98,8	19,8
12	10(+1)	35(+1)	1(-1)	2(+1)	101,4	20,3
13	10(-1)	25(-1)	3(+1)	2(+1)	93,6	18,7
14	10(+1)	25(-1)	1(+1)	2(+1)	112,0	22,4
15	10(-1)	35(+1)	1(+1)	2(+1)	101,7	20,3
16	10(+1)	35(+1)	1(+1)	2(+1)	96,6	19,3
17	7(-2)	30(0)	2(0)	1,5(0)	97,6	19,5
18	11(+2)	30(0)	2(0)	1,5(0)	96,6	19,3
19	9(0)	20(-2)	2(0)	1,5(0)	89,7	17,9
20	9(0)	40(+2)	2(0)	1,5(0)	94,6	18,9
21	9(0)	30(0)	0,5(-2)	1,5(0)	111,6	22,3
22	9(0)	30(0)	7(+2)	1,5(0)	113,8	22,8
23	9(0)	30(0)	2(0)	0,5(-2)	100,5	20,1
24	9(0)	30(0)	2(0)	2,5(+2)	99,8	19,9
25	9(0)	30(0)	2(0)	1,5(0)	110,8	22,2
26	9(0)	30(0)	2(0)	1,5(0)	110,1	22,0
27	9(0)	30(0)	2(0)	1,5(0)	105,4	21,1

As dosagens enzimáticas foram realizadas conforme descrito em Material e Métodos. A umidade inicial do meio de cultivo, expressa em teor de umidade em base úmida, correspondeu a 46,9% (1 mL g⁻¹), 55,8% (1.5 mL g⁻¹), 63,5% (2.0 mL g⁻¹), 68,6% (2.5 mL g⁻¹) e 73.0% (3.0 mL g⁻¹). U g⁻¹ corresponde ao número total de unidades de atividade enzimática produzidas por grama de substrato seco.

Os resultados obtidos no planejamento fatorial demonstraram que a maior produção de β -glucosidases foi obtida nas condições do ensaio 9: 25°C, 8 dias, 1% (m/m) de palha de cana *in natura* e umidade inicial do meio de 2,0 mL g⁻¹.

Os coeficientes de regressão para a produção enzimática estão apresentados na Tabela 14. Foram considerados efeitos significativos sobre a produção enzimática os parâmetros com p menor que 5% ($p < 0,05$).

Tabela 14: Coeficientes de regressão para a produção de β -glucosidases

Fatores	Coeficientes	p
Intercepto	116,39	0,0008
(x) Temperatura (L)	-0,77	0,6110
Temperatura (Q)	-5,12	0,0039
(y) Tempo (L)	-3,34	0,0447
Tempo (Q)	-3,62	0,0271
(w) Umidade inicial do meio (L)	2,35	0,0050
Umidade inicial do meio (Q)	-1,00	0,4999
(z) Palha de cana <i>in natura</i> (L)	1,18	0,3816
Palha de cana <i>in natura</i> (Q)	0,02	0,9747
xy	0,17	0,9241
xz	-1,84	0,3383
xw	0,83	0,6055
yz	-1,59	0,4056
yw	1,43	0,3777
zw	0,43	0,7757

Os resultados obtidos demonstraram que a concentração da palha de cana, assim como a interação desta variável com as demais (tempo, temperatura de cultivo e umidade inicial do meio) não tiveram efeito estatisticamente significativo sobre a produção da enzima. No entanto, estudos realizados por OFAT demonstraram um aumento da produção enzimática de 61% após a adição de 1% de palha de cana ao farelo (Tabela 11). Desse modo, foi realizado um estudo para avaliar o efeito da palha de cana sobre a produção enzimática empregando-se maiores concentrações no meio de cultivo (Figura 8). Os resultados demonstraram um aumento de cerca de 50% na

produção da enzima, em relação ao controle (exclusivamente farelo de trigo e água), na presença de 1% (m/m) de palha de cana, a qual se manteve praticamente constante e inalterada até a concentração de 10% (m/m).

Figura 8. Efeito da presença de concentrações crescentes de palha de cana *in natura* no meio de cultivo sobre a produção de β -glucosidases por *C. graminicola*.

O microrganismo foi cultivado por 192 h a 25°C, em 5 g de farelo de trigo com umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹ de substrato seco, suplementado com diferentes concentrações de palha de cana *in natura*. A atividade foi determinada, como descrito em Material e Métodos.

A partir dos dados obtidos, foi realizado um segundo planejamento no qual foram analisadas as variáveis: umidade inicial do meio, tempo e temperatura de cultivo, mantendo-se uma concentração fixa de palha de cana *in natura* de 1% (m/m) no meio de cultivo (Tabela 15).

Tabela 15: Condições experimentais utilizadas e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a produção de β -glucosidases por *C. graminicola*

Ensaio	Variáveis reais e (codificadas)			U g ⁻¹	U mL ⁻¹
	Temperatura (°C)	Tempo (dias)	Umidade inicial do meio (mL g ⁻¹)		
1	25(-1)	8(-1)	1,5(-1)	100,0	20,0
2	35(+1)	8(-1)	1,5(-1)	118,0	23,6
3	25(-1)	10(+1)	1,5(-1)	100,6	20,1
4	35(+1)	10(+1)	1,5(-1)	114,0	22,8
5	25(-1)	8(-1)	2,5(+1)	146,0	29,2
6	35(+1)	8(-1)	2,5(+1)	114,9	23,0
7	25(-1)	10(+1)	2,5(+1)	111,4	22,3
8	35(+1)	10(+1)	2,5(+1)	119,2	23,9
9	20(-1,68)	9(0)	2,0(0)	102,0	20,4
10	40(+1,68)	9(0)	2,0(0)	80,0	16,0
11	30(0)	6(-1,68)	2,0(0)	140,0	28,0
12	30(0)	11(+1,68)	2,0(0)	135,0	27,0
13	30(0)	9(0)	1,0(-1,68)	99,0	19,8
14	30(0)	9(0)	3,0(+1,68)	144,0	28,8
15	30(0)	9(0)	2,0(0)	171,0	34,2
16	30(0)	9(0)	2,0(0)	150,6	30,1
17	30(0)	9(0)	2,0(0)	171,8	34,3

As dosagens enzimáticas foram realizadas empregando PNP-glc (2 mmol L⁻¹), como substrato, conforme descrito em Material e Métodos. A umidade inicial do meio de cultivo, expressa em teor de umidade em base úmida, correspondeu a 46,9% (1 mL g⁻¹), 55,8% (1,5 mL g⁻¹), 63,5% (2,0 mL g⁻¹), 68,6% (2,5 mL g⁻¹) e 73,0% (3,0 mL g⁻¹). U g⁻¹ corresponde ao número total de unidades de atividade enzimática produzidas por grama de substrato seco

A análise dos resultados experimentais obtidos no desenho fatorial 2³ permitiu observar que a melhor produção de β -glucosidases foi obtida nas condições do ensaio 17: 30°C, 9 dias e umidade inicial do meio de 2,0 mL g⁻¹.

Os coeficientes de regressão estão mostrados na Tabela 16. Os dados obtidos demonstraram que os termos de umidade inicial do meio ao quadrado, tempo de cultivo e da temperatura ao quadrado foram estatisticamente significativos. Já os termos lineares

da temperatura e do tempo, assim como as interações entre as variáveis analisadas não foram estatisticamente significativos, portanto não afetaram a produção enzimática.

Tabela 16: Coeficientes de regressão para a produção de β -glucosidases

Fatores	Coeficientes	<i>p</i>
Intercepto	182,19	0,0009
(x) Temperatura (L)	-7,39	0,1985
Temperatura (Q)	-9,45	0,0198
(y) Tempo (L)	11,41	0,1429
Tempo (Q)	-66,88	0,0009
(z) Umidade inicial do meio (L)	17,47	0,0667
Umidade inicial do meio (Q)	-32,69	0,0087
xy	5,73	0,4072
xz	-2,39	0,7022
yz	-10,83	0,1369

Entre os fatores que influenciam a produção enzimática em meio sólido, a umidade inicial do meio é considerada o mais crítico. A umidade ideal do meio varia com o tipo microrganismo, as condições operacionais e também o substrato sólido empregado. Esta variável afeta tanto o crescimento microbiano quanto a produção e a secreção das enzimas. Baixa umidade resulta numa menor absorção de água pelo substrato, reduzindo a área superficial. Além disso, a solubilidade e a difusão dos nutrientes são reduzidas, possivelmente prejudicando o crescimento do microrganismo. Em contraste, níveis elevados de umidade podem causar a agregação de partículas do substrato, reduzindo a porosidade, limitando, portanto a disponibilidade de oxigênio, dificultando o crescimento microbiano e reduzindo a produção de enzimas (Mamma et al., 2008; Dogaris et al., 2009; Delabona et al., 2013).

O modelo de segunda ordem que descreve o comportamento da produção de β -glucosidases, frente à variação do tempo, da temperatura de cultivo e da umidade inicial do meio, foi expresso pela equação 3.

$$\beta - \text{glu} = [182,91 - 7,39 x + 11,41y + 17,47 z - 9,45x^2 - 66,88 y^2 - 32,69 z^2] \quad [3]$$

O modelo obtido pode ser considerado de boa qualidade, pois o teste F indicou um F_{calc} superior ao F_{tab} (Tabela 17). Além disso, a percentagem de variação explicada pelo modelo foi de 99%, a qual pode ser considerada muito boa, por se tratar de um estudo que envolve o cultivo de microrganismos.

Tabela 17: ANOVA para a produção de β -glucosidases por *C. graminicola*

Parâmetros	SQ	MQ	GL	F_{calc}	p
Regressão	14.792,38	1.578,15	9	7,08	0,0039
Resíduos	1.452,74	165,89	8		
Falta de ajuste	1.093,82	179,63	5	1,94	0,0643
Erro puro	3,17	10,30	3		

SQ: soma dos quadrados; MQ: médias dos quadrados; GL: graus de liberdade; $R^2 = 0,99$; $F_{tab} = 3,35$

As superfícies de resposta que demonstram os efeitos e a interação entre os fatores que afetaram a produção de β -glucosidases estão apresentadas na Figura 9. A partir destes gráficos foi possível observar que as melhores condições para a produção enzimática, nos intervalos estudados, estão na faixa entre 1,0 a 2,2 mL g⁻¹ de umidade inicial do meio, de 7 a 10 dias de cultivo e temperatura de 27 a 35°C.

A)

B)

Figura 9. Superfícies de resposta para a produção de β -glucosidases

As superfícies de resposta mostram os efeitos de interação da umidade inicial e da temperatura de cultivo (A) e da umidade inicial e do tempo de cultivo sobre a produção de β -glucosidases (B).

De acordo com o modelo obtido, a produção máxima de β -glucosidases ($156,6 \text{ U g}^{-1}$) ocorreu a $28,13^\circ\text{C}$, em 7,07 dias, com umidade inicial do meio de $2,38 \text{ mL g}^{-1}$, empregando farelo de trigo como fonte de carbono e palha de cana *in natura*, em concentração 1% (m/m) em relação ao farelo de trigo seco, como fonte suplementar de carbono. Deste modo, a produção foi 1,4 vezes maior que a inicialmente obtida ($109,7 \pm 7,7 \text{ U g}^{-1}$). O valor máximo obtido para a validação experimental das condições otimizadas foi $159,3 \pm 12,7 \text{ U g}^{-1}$, em boa correlação com o valor predito, confirmando a validade do modelo.

Surpreendentemente, a produção de β -glucosidases por *C. graminicola*, em condições ótimas de temperatura, umidade inicial e tempo de cultivo diminuiu cerca de 50% na ausência de palha de cana. No entanto, empregando a palha de cana em concentrações de 1 a 10% (m/m) foram obtidos os níveis máximos de produção. Considerando que a palha não se mostrou uma boa fonte de carbono para o crescimento do microrganismo, é possível que, quando crescido em farelo de trigo o fungo degrade parcialmente a palha de cana liberando pequenas quantidades de alguns compostos que estimulam a produção enzimática.

A seleção das melhores condições de cultivo de um microrganismo empregando OFAT pode resultar em considerável aumento da produção de uma determinada enzima. No entanto, demanda muitos experimentos e conseqüentemente, muito tempo. Neste estudo, o emprego da MSR permitiu não somente alcançar uma maior produção de β -glucosidases de modo mais rápido e barato, mas também analisar os efeitos da interação entre as diferentes variáveis testadas sobre a produção enzimática.

Diversos estudos de produção de β -glucosidases foram realizados empregando o farelo de trigo sozinho ou em mistura com diferentes resíduos lignocelulósicos. A produção de β -glucosidases por *C. graminicola* foi similar à relatada na literatura para outros fungos mesófilos. Assim, produções de $105,82 \text{ U g}^{-1}$ e $184,0 \text{ U g}^{-1}$ foram relatadas para *A. fumigatus* e *T. koningi* F 244, quando cultivados em meio contendo farelo de trigo suplementado com sulfato de amônio e peptona, respectivamente (Delabona et al. 2012; Jahromi et al., 2011). Níveis similares de produção também foram obtidos para *Thermoascus aurantiacus* ($101,6 \text{ U g}^{-1}$) e *A. terreus* M11 ($101,6 \text{ U g}^{-1}$), quando cultivados em farelo de trigo e palha de milho, respectivamente, ambos suplementados com sais minerais (Kalogeris et al., 2003a; Gao et al., 2008). No entanto, *A. niger* apresentou uma produção de $508,0 \text{ U g}^{-1}$, quando cultivado em farelo de trigo suplementado com sais minerais (Qian et al., 2012). Dessa forma, *C. graminicola* pode

ser considerado um bom produtor de β -glucosidases, quando cultivado em farelo de trigo, suplementado com palha de cana *in natura*, o que é muito interessante devido ao baixo custo e abundância desses materiais.

4.1.1.2. Caracterização bioquímica das β -glucosidases do extrato bruto do cultivo de *C. graminicola* em condições ótimas

4.1.1.2.1. Efeito de temperatura e pH sobre a atividade β -glucosidásica

Conforme descrito no item 3.8, foi realizado um planejamento fatorial 2^2 para determinar a melhores condições de pH e temperatura para a atividade enzimática (Tabela 18). Os resultados obtidos demonstraram uma maior atividade nas condições do ensaio 10: pH 5,0 e 65 °C.

Tabela 18: Condições experimentais utilizadas e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a atividade β -glucosidásica

Ensaio	Variáveis reais e (codificadas)		
	pH	T (°C)	U mg ⁻¹
1	4,5(-1)	55(-1)	35,7
2	5,5(+1)	55(-1)	35,6
3	4,5(-1)	75(+1)	36,3
4	5,5(+1)	75(+1)	30,9
5	4,1(-1,41)	65(0)	32,5
6	6,9(+1,41)	65(0)	27,6
7	5,0(0)	50(-1,41)	27,8
8	5,0(0)	80(+1,41)	24,9
9	5,0(0)	65(0)	51,1
10	5,0(0)	65(0)	51,2
11	5,0(0)	65(0)	50,2

As dosagens enzimáticas foram realizadas conforme descrito em Material e Métodos, em tampão McIlvaine ajustado para diferentes valores de pH.

Os coeficientes de regressão estão apresentados na Tabela 19. Os termos ao quadrado e lineares de temperatura e pH, assim como a interação entre eles, foram estatisticamente significativos.

Tabela 19: Coeficientes de regressão para a atividade β -glucosidásica

<i>Fatores</i>	<i>Coeficientes</i>	<i>p</i>
Intercepto	-1009,80	0,000010
pH (L)	225,63	0,000011
pH(Q)	-21,11	0,000009
T (L)	15,28	0,000010
T(Q)	-0,11	0,000006
pH.T	-0,26	0,000672

O modelo de segundo grau que descreve a atividade β -glucosidásica frente à variação de pH e temperatura foi descrito pela equação 4:

$$\beta\text{-glu} = [-1009,80 + 225,63 \text{ pH} + 15,28 \text{ T} - 21,11 \text{ pH}^2 - 0,11 \text{ T}^2 - 0,26 \text{ pH.T}] \quad [4]$$

O modelo obtido pode ser considerado de boa qualidade, pois o teste F indicou um F_{calc} muito superior ao F_{tab} (Tabela 20). Além disso, o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,99, demonstrando que 99% da variação total da resposta foi explicada pelo modelo.

Tabela 20: ANOVA para a produção de β -glucosidases por *C. graminicola*

<i>Parâmetros</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>GL</i>	<i>F_{calc}</i>	<i>p</i>
Regressão	980,47	196,094	5	46,11	0,0002
Resíduos	0,212	0,0425	5	-	-
Falta de ajuste	0,203	0,0678	3	14,6	0,0646
Erro puro	0,0093	0,0046	2	-	-

SQ: soma dos quadrados; MQ: médias dos quadrados; GL: graus de liberdade; $R^2 = 0,99$; $F_{tab} = 5,05$

A superfície de resposta gerada pelo modelo está apresentada na Figura 10 e permite observar que as melhores condições para a atividade enzimática estão na região entre pH 4,5 a 5,5 e temperatura de 60 a 67,5°C.

Figura 10. Superfície de resposta representando os efeitos de pH e temperatura sobre a atividade β -glucosidásica.

De acordo com o modelo, a máxima atividade enzimática foi obtida em condições de pH 4,94 e 64,61°C, com um valor predito de 51,16 U mg⁻¹. O valor obtido após a validação das condições otimizadas (51,2 $\pm$ 1,6 U g⁻¹) apresentou excelente correlação com o valor predito, confirmando a validade do modelo.

Os valores de pH e temperatura encontrados para a maioria das β -glucosidases de fungos mesófilos estão na faixa de 4,0 a 6,5 e 50 a 65°C, respectivamente (Sorensen et al., 2013). No entanto, uma β -glucosidase produzida por *Fomitopsis palustres* apresentou temperatura ótima de 70°C, enquanto as β -glucosidases de *P. brasilianum*, *A. niger* (N188) e *Phanerochaete chrysosporium* apresentaram temperatura ótima de apenas 22°C (Sorensen et al., 2013; Teugjas & Våljamäe, 2013). Desse modo, os valores de pH e temperatura ótimos encontrados para a β -glucosidase de *C. graminicola* são semelhante aos descritos para as enzimas de outros fungos mesófilos. Por outro lado, a

temperatura ótima elevada estimada para a atividade β -glucosidásica é interessante para aplicações industriais.

4.1.1.2.2. Estabilidade térmica e ao pH das β -glucosidases

A estabilidade térmica das β -glucosidases está apresentada na Figura 11. A atividade do extrato bruto manteve-se estável por 120 minutos a 50, 55 e 60°C. Além disso, após incubação por 120 minutos a 65 °C, 65% da atividade inicial foi mantida. A enzima apresentou ainda um tempo de meia vida de cerca de 5 minutos a 70°C, atingindo a inativação total após 45 minutos na mesma temperatura (Figura 11).

Figura 11. Estabilidade térmica das β -glucosidases no extrato bruto

O extrato bruto foi incubado em diferentes temperaturas e após intervalos de tempo adequados a atividade residual sobre PNP-glc foi determinada a 65°C. O controle (100%) correspondeu a $48,5 \pm 1,4 \text{ U mg}^{-1}$. Temperaturas de incubação: (○) 50°C, (■) 55 °C, (△) 60 °C, (●) 65 °C, (□) 70 °C.

As β -glucosidases produzidas por *C. graminicola* apresentaram estabilidade térmica superior à usualmente encontrada para as enzimas de outros fungos mesófilos. A análise da termoestabilidade em tampão revelou um tempo de meia vida de 30 min a 60°C para a β -glucosidase produzida por *Sclerotinia sclerotiorum* (Issam et al., 2003), enquanto a de *T. harzianum* C-4 (Yun et al., 2001) manteve-se estável por 1 h a 55°C, com atividade residual de apenas 36% após 15 min. a 60°C. Estudando as β -glucosidases produzidas por *A. phoenicis*, *A. carbonarius* e *A. niger*, Jager et al. (2001) relataram ainda estabilidade a 50°C por 2h, com atividades residuais de 87, 53 e 64% respectivamente. Já as enzimas de *P. verruculosum*, *T. reesei* e *A. japonicus* perderam 80, 57 e 43 % de sua atividade após 1h a 50°C (Korotkova et al., 2009). Finalmente, as enzimas de diferentes isolados de *Stachybotrys* mostraram-se estáveis por períodos de 30-60 min a 50°C (Amouri & Gargouri, 2006; Saibi et al., 2007).

Um dos principais pré-requisitos para o emprego de uma enzima em processos industriais é a termoestabilidade, já que a grande maioria dos processos ocorre em temperaturas elevadas (Li et al., 2012; Hildén et al., 2009). As vantagens da realização de processos em temperaturas mais elevadas incluem o aumento do coeficiente de difusão dos substratos devido à diminuição da viscosidade e a redução do risco de contaminação por microrganismos mesófilos, além de uma maior facilidade de manuseio e transporte (Rakshit, 2003). Neste contexto, as β -glucosidases de *C. graminicola* apresentam um excelente potencial de aplicação em processos biotecnológicos.

A estabilidade ao pH das β -glucosidases do extrato bruto de *C. graminicola* é mostrada na Figura 12. A atividade manteve-se constante e próxima do controle entre pH 4,5 e 5,0, decaindo gradativamente abaixo desta faixa, até atingir 54% do controle em pH 3,0. Por outro lado, a atividade enzimática manteve-se praticamente constante entre pH 5,5 e 8,0, com um valor de atividade residual de cerca de 70 a 80 % do controle.

Figura 12: Estabilidade ao pH das β -glucosidases no extrato bruto

O extrato bruto foi diluído em tampão McIlvaine, na faixa de pH entre 3,0 e 8,0, e mantido a 4°C por 24h. A atividade residual foi determinada a 65°C, como descrito em Material e Métodos. O controle (100%) correspondeu a $48,5 \pm 1,4 \text{ U mg}^{-1}$.

4.1.1.2.3. Efeito de íons e EDTA sobre a atividade β -glucosidásica

O efeito de diferentes íons e EDTA sobre a atividade β -glucosidásica do extrato bruto é apresentado na Tabela 21. A atividade mostrou-se tolerante à presença de Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} e Na^{+} em ambas as concentrações testadas. Em contraste, Pb^{2+} , Hg^{2+} e Cu^{2+} , em concentração 1 mmol L^{-1} , inibiram a atividade enzimática em cerca de 60%, enquanto a inibição por Co^{2+} e Zn^{2+} atingiu cerca de 45%. Já os íons Ag^{+} e Fe^{2+} , na mesma concentração, inibiram fortemente a enzima, com atividades residuais em torno de 14%. O EDTA, quelante de íons divalentes, não apresentou efeito sobre a atividade β -glucosidásica, sugerindo que não há envolvimento de metaloenzimas.

Tabela 21: Efeito de íons e EDTA sobre a atividade β -glucosidásica do extrato bruto

Efetores	Atividade residual (%)	Atividade residual (%)
	(1 mmol L ⁻¹)	(5 mmol L ⁻¹)
Controle	100 $\pm$ 2,7	100 $\pm$ 1,9
CaCl ₂	98 $\pm$ 2,2	88 $\pm$ 1,7
Pb(NO ₃) ₂	37 $\pm$ 0,9	0
Sr(Cl ₂)	92 $\pm$ 1,7	67 $\pm$ 2,7
HgCl ₂	37 $\pm$ 0,7	0
CoCl ₂	55 $\pm$ 1,3	12 $\pm$ 0,2
ZnCl ₂	54 $\pm$ 1,1	23 $\pm$ 0,7
NiCl ₂	67 $\pm$ 1,7	19 $\pm$ 1,2
MgCl ₂	100 $\pm$ 3,1	95 $\pm$ 2,6
AgNO ₃	14 $\pm$ 0,2	ND
FeCl ₂	13 $\pm$ 0,3	ND
NaCl	100 $\pm$ 2,9	89 $\pm$ 1,7
CuSO ₄	40 $\pm$ 1,1	0
EDTA	100 $\pm$ 3,1	97 $\pm$ 3,0

A atividade controle (100%) foi determinada em ausência dos íons testados e correspondeu a 47,9 $\pm$ 0,7 U mg⁻¹).

ND: não detectável pelo método empregado.

A forte inibição pelos íons Pb²⁺, Cu²⁺, Ag⁺ e Fe²⁺ também foi observada para outras β -glucosidases fúngicas (Zanoelo et al., 2044; Meleiro et al., 2014). Já a inibição por íons mercúrio é comum a várias enzimas, incluindo muitas β -glucosidases (Karnchanatat et al., 2007; Sadhasivam et al., 2008; Yang et al., 2008; Liu et al., 2012; Meleiro et al., 2014), sendo atribuída à presença de grupos SH essenciais para a atividade ou estabilização estrutural. A forte inibição por Ag⁺ também sugere que grupos tióis são essenciais para a atividade enzimática (Palma-Fernandes et al., 2002; Knob et al., 2010; Knob et al., 2013).

4.1.1.2.4. Efeito de carboidratos sobre a atividade β -glucosidásica no extrato bruto

O efeito de diversos carboidratos, em concentração 50 mmol L⁻¹ no meio reacional, sobre a atividade enzimática está apresentado na Tabela 22. A atividade foi inibida por glicose (49%) e maltose (46%), mostrando-se insensível aos demais carboidratos testados, com exceção de xilose, que provocou uma estimulação de cerca de 30%.

Tabela 22: Efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade enzimática

Carboidrato (50 mmol L ⁻¹)	Atividade residual (%)
Glicose	49 $\pm$ 1,1
Xilose	130 $\pm$ 3,8
Celobiose	42 $\pm$ 0,9
Galactose	100 $\pm$ 2,2
Maltose	54 $\pm$ 0,9
Sacarose	98 $\pm$ 1,7
Lactose	104 $\pm$ 2,3
L-arabinose	108 $\pm$ 2,6
D-glucosamina	100 $\pm$ 1,9

A atividade controle (100%) foi determinada em ausência de carboidratos livres e correspondeu a 46,9 $\pm$ 1,3 U mg⁻¹.

Similarmente aos nossos resultados, as β -glucosidases de *Scytalidium thermophile* e *H. insolens* foram inibidas por maltose (Souza et al., 2010). Já a inibição das β -glucosidases por glicose é comum, e representa um dos maiores entraves a uma sacarificação eficiente da celulose (Bathia et al., 2002; Lynd et al., 2002; Yang et al., 2008; Kaur et al., 2007; Karnchanatat et al., 2007; Meleiro et al., 2014). Possivelmente a inibição por dissacarídeos que apresentam glicose em sua composição pode ser atribuída a uma competição com o substrato pela ligação ao sítio ativo das enzimas.

Há relatos na literatura de outras β -glucosidases estimuladas por xilose, tais como aquelas produzidas por *H. insolens* (Souza et al., 2010), *H. grisea* var. *thermoidea* (Nascimento et al., 2010), *S. thermophilum* (Zanoelo et al., 2044) e *H. brevis* (Masui et

al., 2011) que foram estimuladas pelo monossacarídeo em concentrações que variaram de 40 a 200 mmol L⁻¹. A estimulação por xilose e a insensibilidade aos outros carboidratos, com exceção da glicose, são características interessantes para a aplicação desta enzima em diferentes processos biotecnológicos, tais como a hidrólise de resíduos lignocelulósicos visando à obtenção de etanol celulósico.

4.2. β -xilosidases

4.2.1. Otimização da produção de β -xilosidases por *C. graminicola*

4.2.1.1 Seleção preliminar das melhores condições de cultivo para a produção de β -xilosidases

4.2.1.1.1. Efeito de diferentes fontes de carbono

O efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de β -xilosidases está apresentado na Tabela 23. A maior produção enzimática foi obtida em meio contendo farelo de trigo como fonte de carbono, atingindo $57,9 \pm 4,6$ U g⁻¹. Níveis menores de produção foram observados quando as demais fontes de carbono foram empregadas, atingindo a menor produção em bagaço de cana *in natura* ($6,9 \pm 0,8$ Ug⁻¹).

Tabela 23: Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de β -xilosidases

Fonte de carbono	U g ⁻¹	U mL ⁻¹
Farelo de trigo	57,9 ± 4,6	11,6 ± 1,8
Bagaço de cana explodido	15,9 ± 1,4	3,2 ± 0,98
Bagaço de cana <i>in natura</i>	6,9 ± 0,8	1,4 ± 0,33
Palha de cana <i>in natura</i>	11,5 ± 1,3	2,3 ± 0,42
Casca de amendoim	9,4 ± 1,2	1,9 ± 0,23
Casca de arroz	13,6 ± 1,5	2,7 ± 0,19
Palha de milho	24,7 ± 2,4	4,9 ± 0,22
Sabugo de milho moído	37,8 ± 3,3	7,6 ± 1,14

O fungo foi cultivado por 192 h a 25°C, em meio sólido contendo 5 g de diferentes fontes de carbono ou uma massa correspondente a 1/5 do volume total do frasco, com umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹ de substrato seco. U g⁻¹ corresponde ao número total de unidades de atividade enzimática produzidas por grama de substrato seco.

4.2.1.1.2. Efeito de fontes suplementares de carbono

O efeito da adição de diferentes fontes suplementares de carbono ao meio de cultivo constituído de 5 gramas de farelo de trigo com umidade inicial do meio de 2,0 mL g⁻¹ sobre a produção enzimática está apresentado na Tabela 24. A melhor fonte suplementar de carbono foi a casca de amendoim moída, aumentando a produção em 42%. Níveis menores de produção foram observados para as demais fontes, atingindo cerca de 39% do controle quando o fungo foi cultivado em celobiose como fonte suplementar de carbono. A partir deste experimento, a casca de amendoim foi escolhida como fonte adicional de carbono, o que é muito interessante do ponto de vista de aplicação, dado seu baixo custo e abundância.

Tabela 24: Efeito de diferentes fontes suplementares de carbono sobre a produção de β -xilosidases

Fonte suplementar de carbono(1% m/m)	U g ⁻¹	U mL ⁻¹	%
Controle (farelo de trigo)	55,5 $\pm$ 5,1	11,1 $\pm$ 0,9	100
Casca de amendoim moída	79,0 $\pm$ 7,7	15,8 $\pm$ 1,1	142,3
Casca de arroz	49,4 $\pm$ 5,1	9,9 $\pm$ 0,7	89,0
Palha de milho	38,8 $\pm$ 3,9	7,8 $\pm$ 0,5	69,9
Sabugo de milho moído	47,5 $\pm$ 4,8	9,5 $\pm$ 0,6	85,6
Palha de cana <i>in natura</i>	40,2 $\pm$ 4,1	8,0 $\pm$ 0,7	72,4
Papel filtro	43,9 $\pm$ 3,8	8,8 $\pm$ 0,6	79,1
Glicose	35,5 $\pm$ 4,3	7,1 $\pm$ 0,5	64,0
Xilose	34,7 $\pm$ 4,5	6,9 $\pm$ 0,4	62,5
Celobiose	34,0 $\pm$ 4,2	6,8 $\pm$ 0,5	61,3
CMC	48,3 $\pm$ 4,2	9,7 $\pm$ 0,8	87,0
Xilana	42,1 $\pm$ 3,9	8,4 $\pm$ 0,6	75,8

O fungo foi cultivado por 192 h a 25°C, em meio sólido contendo 5 g de farelo de trigo em umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹ de substrato seco, suplementado com diferentes fontes adicionais de carbono. As dosagens enzimáticas foram realizadas conforme descrito no item 3.3.1. U g⁻¹ corresponde ao número total de unidades de atividade enzimática produzidas por grama de substrato seco.

4.2.1.1.3. Efeito de fontes suplementares de nitrogênio

O efeito da adição de diferentes fontes suplementares de nitrogênio ao meio de cultivo sobre a produção de β -xilosidases está apresentado na Tabela 25.

Dentre as fontes testadas, a adição ao meio de cultivo do extrato de levedura e da caseína não apresentou efeito significativo sobre a produção da enzima, que se manteve em 92% e 99%, respectivamente, em relação ao controle. Além disso, a asparagina, a glicina e a peptona inibiram a produção em cerca de 20%. As demais fontes suplementares inibiram fortemente produção, atingindo 19,5 $\pm$ 2,8 U g⁻¹ para a uréia.

Tabela 25: Efeito de diferentes fontes suplementares de nitrogênio sobre a produção de β -xilosidase

Fonte suplementar de nitrogênio	(%, m/m)	U g ⁻¹	U mL ⁻¹	%
Controle ^a	-	47,8 ± 5,2	15,2 ± 1,3	100
Asparagina	1	38,8 ± 4,2	7,8 ± 0,9	81,2
Glicina	1	37,1 ± 4,3	7,5 ± 0,8	77,6
Caseína	1	47,4 ± 5,1	7,4 ± 0,6	99,1
Peptona	1	36,1 ± 4,0	7,2 ± 0,7	75,5
Extrato de levedura	1	43,9 ± 4,8	8,8 ± 0,9	91,8
Extrato de malte	1	27,2 ± 3,4	5,5 ± 0,4	56,9
Farelo de soja moído	1	37,7 ± 4,2	7,5 ± 0,5	78,9
Uréia	0,8	19,5 ± 2,8	3,9 ± 0,2	40,8
NH ₄ NO ₃	0,8	23,9 ± 3,1	4,8 ± 0,4	50,0
KNO ₃	0,8	21,1 ± 2,6	4,2 ± 0,3	44,1
NaNO ₃	0,8	26,5 ± 3,1	5,3 ± 0,4	55,4
(NH ₄)SO ₄	0,8	23,7 ± 2,7	4,7 ± 0,5	49,6
NH ₄ Cl	0,8	32,9 ± 3,6	6,6 ± 0,7	68,8

O fungo foi cultivado por 192 h a 25°C, em 5 g de farelo de trigo com umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹ de substrato seco, suplementado com diferentes fontes de nitrogênio. As dosagens enzimáticas foram realizadas conforme item 3.3.1. U g⁻¹ corresponde ao número total de unidades de atividade enzimática produzidas por grama de substrato seco.

^a Controle: meio de cultivo constituído exclusivamente por farelo de trigo com umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹ de substrato seco.

4.2.1.1.4. Otimização da produção de β -xilosidases por *C. graminicola* empregando MSR

Após a seleção preliminar das melhores condições de cultivo para a produção de β -xilosidases por OFAT, foi realizado um planejamento fatorial 2³ (Tabela 26), para avaliar a influência da concentração da casca de amendoim moída, do tempo e da umidade inicial do meio de cultivo sobre a produção enzimática.

Tabela 26: Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a produção de β -xilosidases por *C. graminicola*

Ensaio	Variáveis reais e (codificadas)			U g ⁻¹	U mL ⁻¹
	Casca de amendoim (% m/m)	Tempo (dias)	Umidade inicial do meio (mL g ⁻¹)		
1	1(-1)	7(-1)	1,5(-1)	93,8	18,8
2	5(+1)	7(-1)	1,5(-1)	85,6	17,1
3	1(-1)	7(-1)	1,5(-1)	99,6	19,9
4	5(+1)	7(-1)	1,5(-1)	104,2	20,8
5	1(-1)	9(+1)	2,5(+1)	76,8	15,4
6	5(+1)	9(+1)	2,5(+1)	72,6	15,5
7	1(-1)	9(+1)	2,5(+1)	60,6	12,1
8	5(+1)	9(+1)	2,5(+1)	85,4	17,1
9	0,5(-1,68)	8(0)	2,0(0)	40,2	8,0
10	7(+1,68)	8(0)	2,0(0)	117,4	23,5
11	3(0)	6(-1,68)	2,0(0)	56,0	11,2
12	3(0)	11(+1,68)	2,0(0)	58,6	11,7
13	3(0)	8(0)	1,0(-1,68)	59,6	11,9
14	3(0)	8(0)	3,0(+1,68)	86,0	17,2
15	3(0)	8(0)	2,0(0)	126,0	25,2
16	3(0)	8(0)	2,0(0)	123,0	24,6
17	3(0)	8(0)	2,0(0)	124,6	24,9

As dosagens enzimáticas foram realizadas como descrito em Material e Métodos. A umidade inicial do meio de cultivo, que expressa o teor de umidade em base úmida, correspondeu a 46,9% (1 mL g⁻¹), 55,8% (1.5 mL g⁻¹), 63,5% (2.0 mL g⁻¹), 68,6% (2.5 mL g⁻¹) e 73.0% (3.0 mL g⁻¹). U g⁻¹ corresponde ao número total de unidades de atividade enzimática produzidas por grama de substrato seco.

Os resultados obtidos no planejamento fatorial demonstraram que a maior produção de β -xilosidases foi obtida nas condições do ensaio 15: 8 dias de cultivo, casca de amendoim moída a 3% (m/m) e umidade inicial do meio de 2,0 mL g⁻¹.

Os coeficientes de regressão estão apresentados na Tabela 27. De todas as variáveis estudadas, apenas o efeito linear da casca de amendoim não foi estatisticamente significativo.

Tabela 27: Coeficientes de regressão para a produção de β -xilosidases

Fatores	Coeficientes	<i>p</i>
Intercepto	-1732,78	0.0146
(w) Casca de amendoim (L)	- 5,51	0.2404
Casca de amendoim (Q)	- 3,56	0.0202
(y) Tempo (L)	376,92	0.0144
Tempo (Q)	-21,76	0.0015
(z) Umidade inicial do meio (L)	359,70	0.0185
Umidade inicial do meio (Q)	-48,12	0.0196
wz	5,14	0.0339
yz	4,00	0.0416

O modelo de segunda ordem que descreve o comportamento da produção de β -xilosidases, frente à variação do tempo, da umidade inicial do meio e da percentagem de casca de amendoim foi expresso pela equação 5.

$$\beta\text{-xyl} = [-1732,78 + 376,92 y + 359,70 z - 3,56 w^2 - 21,76 y^2 - 48,12 z^2 + 4,00 yz + 5,14 wz] \quad [5]$$

O modelo obtido pode ser considerado de boa qualidade, pois o teste *F* indicou um F_{calc} superior ao F_{tab} (Tabela 28). Além disso, a percentagem de variação explicada pelo modelo foi de 90%.

Tabela 28: ANOVA para a produção de β -xilosidasespor *C. graminicola*

Parâmetros	SQ	MQ	GL	F_{calc}	<i>p</i>
Regressão	8.927,01	991,89	9	6,17	0,0191
Resíduos	964,56	160,76	8	-	-
Falta de ajuste	1.441,22	240,20	5	99,26	0,0766
Erro puro	2,42	0,5	3	-	-

SQ: soma dos quadrados; MQ: médias dos quadrados; GL: graus de liberdade; $R^2 = 0,90$; $F_{tab} = 3,22$

As superfícies de resposta que mostram os efeitos de interação entre as variáveis que afetaram a produção de β -xilosidases estão apresentadas na Figura 13. A partir dos

gráficos foi possível observar que as melhores condições para a produção enzimática, nos intervalos estudados, estão na faixa entre 1,5 a 2,4 mL g⁻¹ de umidade inicial do meio, 7,0 a 8,5 dias de cultivo e 2,0 a 6,0 % (m/m) de casca de amendoim.

Figura 13. Superfícies de resposta para a produção de β -xilosidases

As superfícies de resposta mostram os efeitos de interação entre a umidade inicial do meio e tempo de cultivo (**A**); percentagem de casca de amendoim e umidade inicial do meio (**B**) sobre a produção enzimática.

De acordo com o modelo obtido, a produção máxima de β -xilosidases ($125,88 \text{ U g}^{-1}$) ocorreu a 25°C em 7,71 dias, com 4,66% (m/m) de casca de amendoim e umidade inicial do meio de $2,1 \text{ mL g}^{-1}$, empregando o farelo de trigo como fonte de carbono, sendo deste modo, 2,2 vezes maior que a inicialmente obtida ($57,9 \pm 4,6 \text{ U g}^{-1}$). O valor máximo obtido na validação experimental das condições otimizadas foi $128,1 \pm 6,4 \text{ U g}^{-1}$, em boa correlação com o valor predito, confirmando a validade do modelo.

Poucos estudos estão descritos na literatura sobre a produção de β -xilosidases empregando meio sólido. Uma produção de β -xilosidases semelhante à obtida por *C. graminicola* foi descrita para *A. niger* KK2 ($193,0 \text{ U g}^{-1}$), quando este fungo foi cultivado em mistura de farelo de trigo e palha de arroz, suplementada com extrato de levedura (Kang *et al.*, 2004). No entanto, níveis menores de produção foram descritos para *T. aurantiacus* ($40,7 \text{ U g}^{-1}$) e *T. reesei* MCG 77 ($7,7 \text{ U g}^{-1}$), em meios de cultivo constituídos de farelo de trigo e polpa de beterraba, respectivamente (Kang *et al.*, 2004). Portanto, o microrganismo *C. graminicola* apresentou uma boa produção de β -xilosidases, quando cultivado em meio constituído apenas de farelo de trigo, suplementado com casca de amendoim moída.

4.2.2. Caracterização bioquímica das β -xilosidases no extrato bruto do cultivo de *C. graminicola* em condições ótimas

4.2.2.1. Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade β -xilosidásica

Como descrito no item 3.8 foi realizado um planejamento fatorial 2^2 para determinar as melhores condições de pH e temperatura para a atividade enzimática (Tabela 29). Os resultados obtidos demonstraram uma maior atividade nas condições do ensaio 9: pH 5,0 e 65°C .

Tabela 29: Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a atividade β -xilosidásica

Ensaio	Variáveis reais e (codificadas)		
	pH	T (°C)	U mg ⁻¹
1	4,5(-1)	60(-1)	30,0
2	5,5(+1)	60(-1)	26,5
3	4,5(-1)	75(+1)	25,6
4	5,5(+1)	75(+1)	23,7
5	4,1(-1,41)	65(0)	28,3
6	6,9(+1,41)	65(0)	19,9
7	5,0(0)	50(-1,41)	28,3
8	5,0(0)	80(+1,41)	19,9
9	5,0(0)	65(0)	32,3
10	5,0(0)	65(0)	32,2
11	5,0(0)	65(0)	31,4

As dosagens enzimáticas foram realizadas conforme descrito em Material e Métodos, em tampão McIlvaine, ajustado para diferentes valores de pH.

Os coeficientes de regressão estão demonstrados na Tabela 30. Os termos lineares e ao quadrado de pH e temperatura, assim como a interação entre eles, foram estatisticamente significativos.

Tabela 30: Coeficientes de regressão para a atividade β -xilosidásica

Fatores	Coeficientes	<i>p</i>
Intercepto	-283,64	0,000001
pH (L)	-63,54	0,000189
pH (Q)	-7,36	0,000068
T (L)	5,20	0,000059
T (Q)	-0,04	0,000035
pH.T	0,11	0,004896

O modelo de segundo grau que descreve a atividade β -xilosidásica frente à variação de pH e temperatura é descrito pela equação 6:

$$\beta\text{-xil} = [-283,64 - 63,54 \text{ pH} - 5,20 T - 7,36 \text{ pH}^2 - 0,04 T^2 + 0,11 \text{ pH} \cdot T] \quad [6]$$

O modelo obtido pode ser considerado de boa qualidade, pois o teste F indicou um F_{calc} muito superior ao F_{tab} (Tabela 31). Além disso, o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,98, demonstrando que 98% da variação total da resposta foi explicada pelo modelo.

Tabela 31: ANOVA para atividade β -xilosidásica

Parâmetros	SQ	MQ	GL	F_{calc}	p
Regressão	202,64	40,53	5	149,06	0,0003
Resíduos	0,135	0,0271	5	-	-
Falta de ajuste	0,122	0,409	3	6,36	0,1388
Erro puro	0,013	0,0064	2	-	-

SQ: soma dos quadrados; MQ: médias dos quadrados; GL: graus de liberdade; $R^2 = 0,99$; $F_{tab} = 5,05$

A superfície de resposta gerada pelo modelo está apresentada na Figura 14 e permite observar que as melhores condições para a atividade enzimática estão na região entre pH 4,5 a 5,5 e temperatura de 55 a 65°C .

Figura 14. Superfície de resposta representando os efeitos de pH e temperatura sobre a atividade β -xilosidásica.

De acordo com o modelo, a atividade β -xilosidásica foi máxima em pH 4,94 e 64,61°C, com um valor predito de 32,59 U mg⁻¹. O valor obtido na validação das condições otimizadas (32,4 $\pm$ 0,8 U g⁻¹) apresentou excelente correlação com o valor predito, confirmando a validade do modelo.

Os valores de pH e temperatura ótimos encontrados para a maioria das β -xilosidases de fungos mesófilos estão na faixa de 4,0 a 6,5 e 40 a 70°C, respectivamente (Knob et al., 2010). Desse modo, os valores de pH e temperatura ótimos obtidos para as β -xilosidases de *C. graminicola* são semelhantes aos descritos na literatura para outras β -xilosidases fúngicas.

4.2.2.2. Estabilidade térmica e ao pH das β -xilosidases

A estabilidade térmica das β -xilosidases está apresentada na Figura 15. A atividade do extrato bruto manteve-se estável por 120 minutos nas temperaturas entre 50 e 65°C. Além disso, após incubação por 60 minutos a 70°C, 70% da atividade inicial foi

mantida. A enzima apresentou ainda um tempo de meia-vida de cerca de 80 minutos nesta mesma temperatura.

Figura 15. Estabilidade térmica das β -xilosidases no extrato bruto

O extrato bruto foi incubado em diferentes temperaturas e após intervalos de tempo adequados a atividade residual sobre PNP-xyl foi determinada a 65°C, como descrito em Material e Métodos. O controle (100%) correspondeu a $33,2 \pm 0,8 \text{ U mg}^{-1}$. Temperaturas de incubação: (■) 50 °C, (△) 55 °C, (○) 60°C, (●) 65 °C, (□) 70 °C.

As β -xilosidases produzidas por fungos mesófilos geralmente apresentam boa termoestabilidade. A enzima de *A. niger* retém 44 % da atividade inicial após 1 hora de incubação a 75°C. *A. brasiliensis* produz uma β -xilosidade que retém 62 % da atividade inicial após 1 hora de incubação a 60°C (Pedersen et al., 2007). Já as β -xilosidases de *A. fumigatus* mantêm 25% de sua atividade inicial após 3 horas de incubação a 75°C (Lenartovicz et al., 2003). Desse modo, as β -xilosidases produzidas por *C. graminicola* apresentaram uma boa estabilidade térmica, o que sugere excelente potencial de aplicação dessa enzima em processos biotecnológicos.

A estabilidade ao pH das β -xilosidases do extrato bruto de *C. graminicola* é mostrada na Figura 16. A atividade manteve-se constante e próxima do controle entre pH 4,0 e 5,0, decaindo gradativamente abaixo e acima desta faixa até atingir 76% e 25% do controle em pH 3,0 e 8,0, respectivamente.

Figura 16. Estabilidade ao pH das β -xilosidases no extrato bruto

O extrato bruto foi diluído em tampão McIlvaine, na faixa de pH entre 3,0 e 8,0, e mantido a 4°C por 24h. A atividade residual foi determinada a 65°C, como descrito em Material e Métodos. O controle (100%) correspondeu a $37,9 \pm 1,9 \text{ U mg}^{-1}$.

4.2.2.3. Efeito de íons e EDTA sobre a atividade β -xilosidásica

O efeito de diferentes íons e EDTA sobre a atividade β -xilosidásica do extrato bruto é mostrado na Tabela 32. A atividade mostrou-se tolerante à presença de Ca^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} e Na^{+} em ambas as concentrações testadas. Em contraste, Pb^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} e Cu^{2+} , em concentração 1 mmol L^{-1} , inibiram a atividade enzimática em cerca de 49 a 68%, enquanto a inibição por Ag^{+} atingiu cerca 77% na mesma concentração. O EDTA, não apresentou efeito sobre a atividade β -xilosidásica, sugerindo que as β -xilosidases presentes não são metaloenzimas.

Tabela 32: Efeito de íons e EDTA sobre a atividade β -xilosidásico extrato bruto

Efetores	Atividade residual (%)	Atividade residual (%)
	(1 mmol L ⁻¹)	(5 mmol L ⁻¹)
Controle	100 $\pm$ 2,3	100 $\pm$ 1,9
CaCl ₂	94 $\pm$ 3,4	90 $\pm$ 1,2
Pb(NO ₃) ₂	35 $\pm$ 1,2	0
Sr(Cl ₂)	90 $\pm$ 0,9	88 $\pm$ 1,8
HgCl ₂	32 $\pm$ 0,4	0
CoCl ₂	87 $\pm$ 1,3	78 $\pm$ 0,9
ZnCl ₂	51 $\pm$ 0,8	27 $\pm$ 0,3
NiCl ₂	59 $\pm$ 1,5	32 $\pm$ 0,7
MgCl ₂	91 $\pm$ 2,6	89 $\pm$ 1,1
AgNO ₃	23 $\pm$ 1,1	ND
FeCl ₂	45 $\pm$ 1,9	ND
NaCl	92 $\pm$ 2,1	90 $\pm$ 3,9
CuSO ₄	39 $\pm$ 0,4	0
EDTA	98 $\pm$ 2,7	97 $\pm$ 2,3

A atividade controle (100%) foi determinada em ausência dos íons testados e correspondeu a 35,9 $\pm$ 1,2 U mg⁻¹.

ND: não detectável pelo método empregado.

A inibição por Zn²⁺, Cu²⁺ e Ag⁺ também foi observada para as β -xilosidases de *F. proliferatum* (Saha, 2003), *S. thermophilum* (Zanoelo et al., 2004) e *Paecilomyces thermophila* (Yang et al., 2008).

A inibição por íons mercúrio é comum a várias β -xilosidases (Venturi et al., 2002; Zanoelo et al., 2004), sendo atribuída à presença de grupos SH essenciais para a atividade ou estabilização estrutural. A forte inibição por Ag⁺ também sugere que grupos tióis são essenciais para a atividade enzimática (Palma-Fernandes et al., 2002; Knob et al., 2010; Knob et al., 2013).

4.2.2.4. Efeito de carboidratos sobre a atividade β -xilosidásica no extrato bruto

O efeito de diversos carboidratos, em concentração 50 mmol L⁻¹ no meio reacional, sobre a atividade enzimática está apresentado na Tabela 33. A atividade não foi afetada pela presença da maioria dos açúcares testados. No entanto, a xilose inibiu a atividade enzimática em 55%.

A maioria das β -xilosidases fúngicas é inibida por xilose (Yang et al., 2014). Possivelmente a inibição pelo monossacarídeo pode ser atribuída a uma competição com o substrato pela ligação ao sítio ativo das enzimas.

Tabela 33: Efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade enzimática

Carboidrato (50 mmol L ⁻¹)	Atividade residual (%)
Glicose	91 $\pm$ 1,2
Xilose	45 $\pm$ 0,7
Celobiose	91 $\pm$ 1,3
Galactose	91 $\pm$ 1,6
Maltose	102 $\pm$ 2,7
Sacarose	95 $\pm$ 1,9
Lactose	96 $\pm$ 2,2
L-arabinose	111 $\pm$ 1,8
D-glucosamina	108 $\pm$ 2,5

A atividade controle (100%) foi determinada em ausência de carboidratos livres e correspondeu a 37,8 $\pm$ 1,2 U mg⁻¹.

4.3. Xilanases

4.3.1. Otimização da produção de xilanases por *C. graminicola*

4.3.1.1. Seleção preliminar das melhores condições de cultivo para a produção enzimática

4.3.1.1.1. Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção enzimática

O efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de xilanases está apresentado na Tabela 34. O maior nível de produção enzimática foi obtido em meio constituído de farelo de trigo como fonte de carbono, atingindo $189,3 \pm 7,7 \text{ U g}^{-1}$. Produções muito menores foram observadas para as demais fontes empregadas. A mais baixa produção foi obtida quando o fungo foi cultivado em casca de amendoim moída ($6,4 \pm 0,7 \text{ U g}^{-1}$). Já, utilizando bagaço de cana explodido e palha de milho como fontes de carbono não se observou crescimento do microrganismo.

Tabela 34: Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de xilanases

Fonte de carbono	U g^{-1}	U mL^{-1}	%
Farelo de trigo	$189,3 \pm 7,7$	$37,9 \pm 3,1$	100
Bagaço de cana explodido	ND	ND	ND
Bagaço de cana <i>in natura</i>	$11,4 \pm 1,1$	$2,3 \pm 1,2$	6,0
Palha de cana <i>in natura</i>	$15,7 \pm 1,6$	$3,1 \pm 0,4$	8,3
Casca de amendoim moída	$6,4 \pm 0,7$	$1,3 \pm 0,1$	3,4
Casca de arroz	$9,6 \pm 1,2$	$1,9 \pm 0,09$	5,1
Palha de milho	ND	ND	ND
Sabugo de milho moído	$15,9 \pm 1,8$	$3,1 \pm 0,2$	8,4

O fungo foi cultivado por 192 h a 25°C, em meio sólido contendo 5 g de diferentes fontes de carbono ou uma massa correspondente a 1/5 do volume total do frasco, com umidade inicial de $2,0 \text{ mL g}^{-1}$ de substrato seco. U g^{-1} corresponde ao número total de unidades de atividade enzimática produzidas por grama de substrato seco.

ND: não detectável pelo método empregado

4.3.1.1.2. Efeito de fontes suplementares de carbono

O efeito da adição de diferentes fontes suplementares de carbono ao meio de cultivo está apresentado na Tabela 35. As melhores fontes suplementares de carbono

foram o sabugo de milho moído e a glicose, aumentando a produção em 25 e 20%, respectivamente. As demais fontes suplementares testadas não apresentaram efeito significativo sobre a produção, com exceção da xilose, que inibiu em 33% a produção de xilanases. Este resultado pode ser atribuído ao fato da xilose ser o produto final da degradação da xilana e, portanto, um repressor da produção de xilanases. Embora a adição de glicose no meio de cultivo tenha aumentado a produção da enzima, o sabugo de milho foi escolhido como fonte suplementar de carbono, devido ao seu baixo custo e abundância.

Tabela 35: Efeito de diferentes fontes suplementares de carbono sobre a produção de xilanases

Fonte adicional de carbono (1%, m/m)	Ug ⁻¹	U mL ⁻¹	%
Controle ^a	193,2 ± 13,8	38,6 ± 2,9	100
Casca de amendoim	178,0 ± 11,3	35,6 ± 3,1	92,1
Casca de arroz	176,1 ± 12,3	35,2 ± 3,3	91,1
Palha de milho	205,6 ± 14,3	41,1 ± 3,9	106,4
Glicose	231,8 ± 15,3	46,4 ± 4,1	120,0
CMC	171,6 ± 13,4	34,3 ± 3,1	88,8
Celobiose	173,4 ± 14,9	34,7 ± 2,9	89,8
Palha de cana <i>in natura</i>	178,4 ± 10,9	35,7 ± 2,7	92,3
Papel de filtro	189,5 ± 12,9	37,9 ± 2,8	98,1
Xilana	204,5 ± 15,4	40,9 ± 3,5	105,8
Xilose	129,5 ± 10,4	25,9 ± 2,1	67,0
Sabugo de milho moído	239,8 ± 15,2	47,9 ± 3,2	124,9

O fungo foi cultivado por 192 h a 25°C, em 5 g de farelo de trigo com umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹ de substrato seco, suplementado com diferentes fontes de carbono. As dosagens enzimáticas foram realizadas conforme 3.8. U g⁻¹ corresponde ao número total de unidades de atividade enzimática produzidas por grama de substrato seco.

^a Controle: meio de cultivo constituído exclusivamente por farelo de trigo com umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹ de substrato seco.

4.3.1.1.3. Efeito de fontes suplementares de nitrogênio

O efeito da adição de diferentes fontes suplementares de nitrogênio sobre a produção de xilanases está apresentado na Tabela 36. Dentre as fontes testadas, a melhor fonte suplementar de nitrogênio foi o sulfato de amônio, em concentração 0,8 % (m/m), levando a um aumento na produção enzimática de cerca de 30%, em relação ao controle. A maioria das demais fontes testadas não apresentou efeito significativo sobre a produção, com exceção da uréia, que inibiu a produção de xilanases em cerca de 36% em relação ao controle.

Tabela 36: Efeito de diferentes fontes suplementares de nitrogênio sobre a produção enzimática

Fontes de Nitrogênio (% , m/m)		U g ⁻¹	U mL ⁻¹	%
Controle ^a	-	152,7 ± 12,2	30,5 ± 2,9	100
Asparagina	1	118,5 ± 10,7	23,7 ± 1,9	77,6
Caseína	1	151,3 ± 11,7	30,3 ± 3,1	99,1
Farelo de Soja	1	127,0 ± 11,6	25,4 ± 2,2	83,2
Glicina	1	124,2 ± 11,0	24,8 ± 2,1	81,3
Peptona	1	182,7 ± 13,7	36,5 ± 3,8	119,6
Extrato de Levedura	1	164,1 ± 12,8	32,8 ± 2,7	107,5
Extrato de malte	1	129,9 ± 11,2	26,0 ± 1,9	85,1
Nitrato de amônio	0,8	125,6 ± 11,3	25,1 ± 2,1	82,3
Nitrato de potássio	0,8	131,3 ± 11,0	26,3 ± 2,8	86,0
Nitrato de sódio	0,8	122,7 ± 10,2	24,5 ± 2,2	80,4
Sulfato de amônio	0,8	198,4 ± 13,5	39,7 ± 4,1	129,9
Cloreto de amônio	0,8	125,6 ± 11,3	25,1 ± 1,9	82,2
Uréia	0,8	97,1 ± 8,7	19,4 ± 0,9	63,6

O fungo foi cultivado por 192 h a 25°C, em 5 g de farelo de trigo com umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹ de substrato seco, suplementado com diferentes fontes de nitrogênio. As dosagens enzimáticas foram realizadas como descrito em Material e Métodos. U g⁻¹ corresponde ao número total de unidades de atividade enzimática produzidas por grama de substrato seco.

^a Controle: meio de cultivo constituído exclusivamente por farelo de trigo com umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹ de substrato seco.

4.3.1.1.4. Otimização da produção de xilanases por MSR

Após a seleção preliminar das melhores condições de cultivo para a produção de xilanases por OFAT, foi realizado um planejamento fatorial 2^{5-1} (Tabela 37), para avaliar a influência da temperatura, do tempo de cultivo, da umidade inicial do meio, das concentrações de sabugo de milho e de sulfato de amônio sobre a produção enzimática.

A análise dos dados demonstrou uma ampla variação na produção da enzima, entre 375,8 U g⁻¹ para o ensaio 25 (8 dias de cultivo, 30°C, umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹, 1% (m/m) de sabugo de milho moído e 0,1% (m/m) de sulfato de amônio) e 0,6 U g⁻¹ para o ensaio 18 (8 dias de cultivo, 40°C, umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹, 1% (m/m) de sabugo de milho e 0,5% (m/m) de sulfato de amônio).

Tabela 37: Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a produção de xilanases por *C. graminicola*

Ensaio	Variáveis reais e (codificadas)					U g ⁻¹
	x	y	z	k	s	
1	25(-1)	6(-1)	1,5(-1)	0,5(-1)	0,7(+1)	110,6
2	25(-1)	6(-1)	1,5(-1)	1,5(+1)	0,3(-1)	70,9
3	25(-1)	6(-1)	2,5(+1)	0,5(-1)	0,3(-1)	166,3
4	35(+1)	6(-1)	2,5(+1)	1,5(+1)	0,7(+1)	140,4
5	25(-1)	10(-1)	1,5(-1)	0,5(-1)	0,3(-1)	161,0
6	35(+1)	10(+1)	1,5(-1)	1,5(+1)	0,7(+1)	128,9
7	25(-1)	10(+1)	2,5(+1)	0,5(-1)	0,7(+1)	146,8
8	35(+1)	10(+1)	2,5(+1)	1,5(+1)	0,3(-1)	190,5
9	35(+1)	6(-1)	1,5(-1)	0,5(-1)	0,3(-1)	39,1
10	35(+1)	6(-1)	1,5(-1)	1,5(+1)	0,7(+1)	43,2
11	35(+1)	6(-1)	2,5(+1)	0,5(-1)	0,7(+1)	146,8
12	35(+1)	6(-1)	2,5(+1)	1,5(+1)	0,3(-1)	156,9
13	35(+1)	10(+1)	1,5(-1)	0,5(-1)	0,7(+1)	16,4
14	35(+1)	10(+1)	2,5(+1)	0,5(-1)	0,3(-1)	22,8
15	35(+1)	10(+1)	2,5(+1)	0,5(-1)	0,3(-1)	197,9
16	35(+1)	10(+1)	2,5(+1)	1,5(+1)	0,7(+1)	122,3
17	20(-2)	8(0)	2,0(0)	1,0(0)	0,5(0)	32,3
18	40(+2)	8(0)	2,0(0)	1,0(0)	0,5(0)	0,6
19	30(0)	4(-2)	2,0(0)	1,0(0)	0,5(0)	25,2
20	30(0)	12(+2)	2,0(0)	1,0(0)	0,5(0)	337,1
21	30(0)	8(0)	1,0(-2)	1,0(0)	0,5(0)	75,4
22	30(0)	8(0)	3,0(+2)	1,0(0)	0,5(0)	290,2
23	30(0)	8(0)	2,0(0)	0(-2)	0,5(0)	370,5
24	30(0)	8(0)	2,0(0)	2(+2)	0,5(0)	373,5
25	30(0)	8(0)	2,0(0)	1,0(0)	0,1(-2)	375,8
26	30(0)	8(0)	2,0(0)	1,0(0)	0,9(+2)	299,0
27	30(0)	8(0)	2,0(0)	1,0(0)	0,5(0)	352,8
28	30(0)	8(0)	2,0(0)	1,0(0)	0,5(0)	337,3
29	30(0)	8(0)	2,0(0)	1,0(0)	0,5(0)	364,7
30	30(0)	8(0)	2,0(0)	1,0(0)	0,5(0)	355,7
31	30(0)	8(0)	2,0(0)	1,0(0)	0,5(0)	349,9
32	30(0)	8(-0)	2,0(0)	1,0(0)	0,5(0)	361,1

x: temperatura (°C); **y:** tempo (dias); **z:** umidade inicial do meio de cultivo (mL g⁻¹); **k:** sabugo de milho moído (% m/m); **s:** concentração de sulfato de amônio (% m/m). A umidade inicial do meio de cultivo expressa em teor de umidade em base úmida correspondeu a 46,9% (1 mL g⁻¹), 55,8% (1.5 mL g⁻¹), 63,5% (2.0 mL g⁻¹), 68,6% (2.5 mL g⁻¹) e 73.0% (3.0 mL g⁻¹). U g⁻¹ corresponde ao número total de unidades de atividade enzimática produzidas por grama de substrato seco.

Os coeficientes de regressão para a produção enzimática estão apresentados na Tabela 38. Os termos lineares e ao quadrado da temperatura, do tempo de cultivo, da umidade inicial do meio e da concentração do sulfato de amônio apresentaram efeito estatisticamente significativo sobre a produção. Já para a concentração do sabugo de milho, apenas o termo ao quadrado foi estatisticamente significativo. Com exceção da interação entre temperatura e umidade, as demais interações não foram estatisticamente significativas.

Tabela 38: Coeficientes de regressão para a produção enzimática

Fatores	Coeficientes	<i>p</i>
Intercepto	373,94	0,0004
(x) Temperatura (L)	-36,80	0,0223
Temperatura (Q)	-195,67	0,0008
(y) Tempo (dias) (L)	61,96	0,0080
Tempo (dias) (Q)	-113,16	0,0023
(z) Umidade inicial do meio (L)	91,43	0,0037
Umidade inicial do meio (Q)	-112,32	0,0024
(k) Sabugo de milho moído (L)	-3,65	0,5807
Sabugo de milho moído (Q)	-26,04	0,0423
(s) Sulfato de amônio (L)	-24,45	0,0486
Sulfato de amônio (Q)	-35,44	0,0235
xy	-19,82	0,1018
xz	40,33	0,0277
xk	-1,03	0,8948
xs	-2,34	0,7632
yz	-1,38	0,8589
yk	0,136	0,9862
ys	-21,60	0,0877
zk	0,819	0,9160
zs	-19,19	0,1075
ks	-18,06	0,1190

x:temperatura (°C); **y:** tempo (dias); **z:** umidade inicial do meio (mL g⁻¹), **k:** concentração dosabugo de milho moído (%m/m); **s:** concentração de sulfato de amônio (%m/m).

O modelo que descreve adequadamente o comportamento da produção frente à variação de tempo, de temperatura, umidade inicial do meio, concentração do sabugo de milho e a concentração do sulfato de amônio foi expresso pela equação (7).

$$Xil = [373,94 - 36,80 x + 61,96 y + 91,43 z - 24,45 s - 40,33 xz - 195,67 x^2 - 113,16 y^2 - 112,32 z^2 - 26,04 k^2 - 35,44 s^2] \quad [7]$$

O modelo obtido pode ser considerado de boa qualidade, pois o F_{calc} foi superior ao F_{tab} (Tabela 39). Além disso, o coeficiente de determinação (R^2) obtido foi de 0,88, demonstrando que 88% da variação total da resposta foi explicada pelo modelo.

Tabela 39: ANOVA para a produção enzimática

Parâmetros	SQ	MQ	GL	F_{calc}	p
Regressão	402.029,40	20.101,47	20	3,40	0,0402
Resíduos	47.279,11	5.909,89	8	-	-
Falta de ajuste	53.966,3	3.597,80	7	19,12	0,0507
Erro puro	376,3	188,20	2	-	-

SQ: soma dos quadrados; MQ: médias dos quadrados; GL: graus de liberdade; $R^2 = 0,88$; $F_{tab} = 2,64$

As superfícies de resposta que demonstram os efeitos da interação entre as variáveis que afetaram a produção de xilanases estão apresentadas na Figura 17. Observa-se que nos intervalos estudados as melhores condições para a produção enzimática se encontram na faixa entre 1,8-2,5 mL g⁻¹ de umidade inicial do meio, de 7,5 a 9,5 dias de cultivo, com 0,4 a 1,3 % (m/m) de sabugo de milho moído, 0,25 a 0,5 % (m/m) de sulfato de amônio, na temperatura de 26-30°C.

A)

B)

Figura 17. Superfícies de resposta para a produção de xilanases

As superfícies de resposta mostram os efeitos de interação entre a concentração de sabugo de milho e sulfato de amônio (A); temperatura e umidade inicial do meio (B); temperatura e tempo de cultivo (C).

De acordo com o modelo obtido, a produção máxima ($396,65 \text{ U g}^{-1}$) ocorreu a $29,7^{\circ}\text{C}$, em 8,66 dias, com umidade inicial do meio de $2,21 \text{ mL g}^{-1}$, $0,87 \text{ (\%, m/m)}$ de sabugo de milho moído e $0,378 \text{ (\%, m/m)}$ de sulfato de amônio. O valor obtido na validação experimental das condições otimizadas foi de $378,1 \pm 23,3 \text{ U g}^{-1}$, demonstrando boa correlação com o valor predito, confirmando a validade do modelo.

Diversos estudos de produção de xilanases foram realizados empregando o farelo de trigo sozinho ou em mistura com diferentes resíduos. Níveis semelhantes de produção foram descritos para *A. niger* ($397,3 \text{ U g}^{-1}$), *A. niveus* ($463,8 \text{ U g}^{-1}$) e *T. reesei* SAF3 ($290,7 \text{ U g}^{-1}$), quando os microrganismos foram cultivados em farelo de trigo puro ou suplementado com sabugo de milho (Kar et al., 2013). No entanto, altos níveis de produção foram relatados para *Fusarium solani* ($1465,8 \text{ U g}^{-1}$), quando cultivado em farelo de trigo em mistura com palha de arroz (Arabi et al., 2011). Dessa forma, *C. graminicola* pode ser considerado um bom produtor de xilanases em um meio bastante simples, constituído de farelo de trigo e sabugo de milho moído.

4.3.2. Caracterização bioquímica das xilanases do extrato bruto do cultivo de *C. graminicola* em condições ótimas

4.3.2.1. Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade xilanásica

Conforme descrito no item 3.8 foi realizado um planejamento fatorial 2^2 para determinar as melhores condições de pH e temperatura para a atividade enzimática (Tabela 40). Os dados obtidos demonstraram uma maior atividade nas condições do ensaio 9: em pH 5,5 e 65 °C.

Tabela 40: Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a atividade xilanásica

Ensaio	Variáveis reais e (codificadas)		
	pH	T (°C)	U mg ⁻¹
1	4,5(-1)	60(-1)	42,4
2	6,5(+1)	60(-1)	37,9
3	4,5(-1)	70(+1)	46,5
4	6,5(+1)	70(+1)	38,3
5	4,1(-1,41)	65(0)	41,7
6	6,9(+1,41)	65(0)	40,9
7	5,5(0)	50(-1,41)	41,3
8	5,5(0)	75(+1,41)	41,0
9	5,5(0)	65(0)	48,9
10	5,5(0)	65(0)	48,5
11	5,5(0)	65(0)	48,3

As dosagens enzimáticas foram realizadas conforme descrito no item 3.3.2 em tampão McIlvaine, ajustado para diferentes valores de pH.

Os efeitos e coeficientes de regressão estão mostrados na Tabela 41. Os termos lineares e ao quadrado de pH e temperatura, assim como suas interações, foram estatisticamente significativos.

Tabela 41: Coeficientes de regressão para a atividade enzimática

Fatores	Coeficientes	<i>p</i>
Intercepto	-675,53	0,000000
pH (L)	42,79	0,000002
pH (Q)	-3,48	0,000000
T (L)	18,32	0,000000
T (Q)	-0,13	0,000000
pH.T	-0,096	0,002283

O modelo de segundo grau que descreve a atividade xilanásica frente à variação do pH e temperatura é descrito pela equação 8:

$$Xil = [-675,53 + 42,79 \text{ pH} + 18,32 \text{ T} - 3,48 \text{ pH}^2 - 0,13 \text{ T}^2 - 0,096 \text{ pH.T}] \quad [8]$$

O modelo obtido pode ser considerado de boa qualidade, pois o F_{calc} foi superior ao F_{tab} (Tabela 42). O coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,98, demonstrando que 98% da variação total da resposta foi explicada pelo modelo.

Tabela 42: ANOVA para a atividade xilanásica

Parâmetros	SQ	MQ	GL	F_{calc}	<i>p</i>
Regressão	187,956	37,591	5	9,78	0,00462
Resíduos	26,906	3,844	7	-	-
Falta de ajuste	0,276	0,092	3	4,79	0,08193
Erro puro	0,076	0,019	4	-	-

SQ: soma dos quadrados; MQ: médias dos quadrados; GL: graus de liberdade; $R^2 = 0,98$; $F_{\text{tab}} = 3,97$.

A superfície de resposta gerada pelo modelo está apresentada na Figura 18 e permitiu observar que as melhores condições para a atividade enzimática estão na região entre pH 4,6 a 5,6 e temperatura de 65 a 70°C.

Figura 18. Superfície de resposta representando os efeitos de pH e temperatura sobre a atividade xilanásica.

De acordo com o modelo, a máxima atividade foi obtida em pH 5,21 e temperatura de 66,91°C com um valor predito de 49,1 U mg⁻¹. O valor obtido na validação das condições otimizadas (49,3 ± 1,4 U mg⁻¹) apresentou excelente correlação com o valor predito, confirmando a validade do modelo.

Os valores de pH e temperatura ótimos para as xilanases produzidas por *C. graminicola* foram muito semelhantes aos descritos na literatura. Diversos estudos mostram que as xilanases de fungos mesófilos apresentam pH e temperatura ótimos que variam de 4,0 a 6,0 e 55 a 70°C, respectivamente (Polizeli et al., 2005; Tanaka et al., 2005; Li et al., 2007; Sudan & Bajaj, 2007; Belancic et al., 1995; Kitamoto et al., 1999). Ainda neste caso, a temperatura ótima elevada estimada para a atividade xilanásica é interessante para aplicações industriais.

4.3.2.2. Estabilidade térmica e ao pH das xilanases

A estabilidade térmica das xilanases está apresentada na Figura 19. A atividade do extrato bruto manteve-se estável por 120 minutos nas temperaturas de 50 a 65 °C. A enzima apresentou ainda um tempo de meia-vida de 37 minutos a 70 °C, atingindo a inativação total após 60 minutos nesta mesma temperatura.

Figura 19. Estabilidade térmica da xilanase no extrato bruto

O extrato bruto foi incubado em diferentes temperaturas e após intervalos de tempo adequados a atividade residual foi determinada a 65°C conforme descrito em Material e Métodos. Temperaturas de incubação: (▼) 50°C, (△) 55 °C, (■) 60 °C, (□) 65 °C, (○) 70 °C. O controle (100%) correspondeu a $47,0 \pm 1,4 \text{ U mg}^{-1}$.

As xilanases de fungos mesófilos usualmente apresentam estabilidade térmica sensivelmente menor que a observada para as enzimas produzidas por *C. graminicola*. As xilanases produzidas por *A. Níger*, *A. ochraceuse* e *A. versicolor* apresentaram tempos de meia-vida de 10, 20 e 17 minutos, respectivamente, a 60°C (Betini et al., 2009). Desse modo, a boa termoestabilidade das xilanases produzidas por *C.*

graminicola também é uma característica bastante atrativa para a aplicação destas enzimas em processos industriais.

A estabilidade ao pH das xilanases do extrato bruto é mostrada na Figura 20. A atividade manteve-se constante e próxima do controle entre pH 5,0 e 6,5, decaindo gradativamente acima e abaixo desta faixa, atingindo aproximadamente 60 e 65% do controle em pH 3,5 e 8,0, respectivamente.

Figura 20. Estabilidade ao pH das xilanases no extrato bruto

O extrato bruto foi diluído em tampão McIlvaine, na faixa de pH entre 3,5 e 8,0, e mantido a 4°C por 24 h. A atividade residual foi determinada a 65°C, como descrito em Material e Métodos. O controle (100%) correspondeu a 41,3 U mg^{-1} .

4.3.2.3. Efeito de íons e EDTA sobre a atividade xilanásica

O efeito de íons e EDTA sobre a atividade xilanásica é mostrado na Tabela 43. A atividade mostrou-se tolerante à presença de Na^+ , Mg^{2+} , Co^{2+} e Sr^{2+} , em concentração 1 mmol L^{-1} . Já os íons Zn^{2+} , Ni^{2+} e Cu^{2+} , na mesma concentração, inibiram a atividade em 23, 27 e 37%, respectivamente. Os íons Ag^+ , Fe^{2+} e Hg^{2+} , em concentração 1 mmol

L^{-1} , inibiram a atividade em cerca de 59, 52 e 77%, respectivamente. Em contraste, a presença de Ca^{2+} estimulou a atividade em cerca de 25%, em ambas as concentrações testadas. O EDTA, não apresentou efeito sobre a atividade xilanásica, sugerindo que não são metaloenzimas.

Tabela 43: Efeito de íons e EDTA sobre a atividade xilanásica

Efeitores	Atividade residual (%)	Atividade residual(%)
	(1 mmol L^{-1})	(5 mmol L^{-1})
Controle	$100 \pm 2,1$	$100 \pm 3,2$
$CaCl_2$	$125 \pm 2,5$	$127 \pm 2,2$
$Pb(NO_3)_2$	$52 \pm 0,5$	0
$Sr(Cl_2)$	$88 \pm 1,6$	$78 \pm 1,9$
$HgCl_2$	$33 \pm 0,9$	0
$CoCl_2$	$97 \pm 2,8$	$19 \pm 0,3$
$ZnCl_2$	$77 \pm 1,7$	$32 \pm 0,7$
$NiCl_2$	$73 \pm 1,4$	$31 \pm 0,9$
$MgCl_2$	$102 \pm 1,9$	$99 \pm 2,9$
$AgNO_3$	$41 \pm 0,3$	ND
$FeCl_2$	$48 \pm 0,2$	ND
$NaCl$	$92 \pm 1,3$	$82 \pm 1,7$
$CuSO_4$	$63 \pm 0,9$	$34 \pm 0,9$
EDTA	$98 \pm 2,2$	$94 \pm 1,9$

A atividade controle (100%) foi determinada na ausência dos íons testados e correspondeu a $45,9 \pm 1,9 U \text{ mg}^{-1}$.

ND: não detectável pelo método empregado.

A inibição da atividade xilanásica por Cu^{2+} e Zn^{2+} também foi descrita para as xilanases produzidas por *P. sclerotiorum*, *A. ficum* e *P. glabrum* (Liu et al., 2007; Knob et al., 2010; Knob et al., 2013). Por outro lado, a inibição por íons Hg^{2+} e por Ag^+ também é comum para as xilanases (Zanoelo et al., 2004; Knob et al., 2013), sugerindo que a presença de grupos SH são essenciais para a atividade ou estabilização estrutural (Knob et al., 2013).

4.4. Lacases

4.4.1. Otimização da produção de lacases por *P. sanguineus*

4.4.1.1. Seleção preliminar das melhores condições de cultivo para a produção enzimática

4.4.1.1.1. Efeito de diferentes fontes de carbono

O efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de lacases está apresentado na Tabela 44. A maior produção enzimática ($29,8 \pm 1,9 \text{ U g}^{-1}$) foi obtida em meio contendo farelo de trigo como fonte de carbono. Níveis menores de produção foram observados quando o fungo foi cultivado em casca de amendoim ($2,1 \pm 0,2 \text{ U g}^{-1}$) e casca de arroz ($1,9 \pm 0,1 \text{ U g}^{-1}$). Para as demais fontes empregadas, não se observou o crescimento do microrganismo.

Tabela 44: Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de lacases

Fonte de Carbono	U g^{-1}	U mL^{-1}
Farelo de trigo	$29,8 \pm 1,9$	$5,9 \pm 0,4$
Bagaço de cana explodido	ND	ND
Bagaço de cana <i>in natura</i>	ND	ND
Casca de amendoim moída	$2,1 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,03$
Casca de arroz	$1,9 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,02$
Farelo de soja moído	ND	ND
Palha de milho <i>in natura</i>	ND	ND
Palha de cana <i>in natura</i>	ND	ND
Pó de serragem	ND	ND

O fungo foi cultivado por 192 h a 25°C, em meio sólido contendo 5 g de diferentes fontes de carbono ou uma massa correspondente a 1/5 do volume total do frasco, com umidade inicial de $2,0 \text{ mL g}^{-1}$ de substrato seco. U g^{-1} corresponde ao número total de unidades de atividade enzimática produzidas por grama de substrato seco.

ND: não detectável pelo método empregado.

4.4.1.1.2. Efeito de diferentes fontes suplementares de carbono

O efeito da adição de diferentes fontes suplementares de carbono ao meio de cultivo está apresentado na Tabela 45. A melhor fonte suplementar foi o sabugo de milho moído, aumentado a produção em 17,8 % em relação ao controle. A adição de casca de amendoim, casca de arroz, palha de cana *in natura* e glicose ao meio de cultivo não apresentou efeito significativo sobre a produção enzimática. No entanto, farelo de soja e a palha de milho inibiram a produção da enzima em 26,8% e 15,4%, respectivamente, em relação ao controle.

Tabela 45: Efeito de diferentes fontes adicionais de carbono sobre a produção de lacases

Fonte de carbono	(%, m/m)	U g ⁻¹ *	U mL ⁻¹	%
Controle ^a	-	30,1 ± 1,78	6,0 ± 0,5	100,0
Casca de amendoim	1	31,9 ± 1,43	6,4 ± 0,7	105,8
Casca de arroz	1	29,6 ± 1,11	5,9 ± 0,6	98,2
Farelo de soja	1	22,1 ± 1,09	4,4 ± 0,3	73,2
Palha de milho	1	25,5 ± 1,32	5,1 ± 0,4	84,6
Palha de cana <i>in natura</i>	1	30,5 ± 1,69	6,1 ± 0,5	101,3
Glicose	1	28,2 ± 1,12	5,6 ± 0,6	93,7
Sabugo de milho	1	35,5 ± 1,74	7,1 ± 0,7	117,8

O fungo foi cultivado por 192 h a 25°C, em 5 g de farelo de trigo com umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹ de substrato seco, suplementado com diferentes fontes de carbono. As dosagens enzimáticas foram realizadas conforme item 3.3.6. U g⁻¹ corresponde ao número total de unidades de atividade enzimática produzidas por grama de substrato seco.

^a Controle: meio de cultivo constituído exclusivamente por farelo de trigo com umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹ de substrato seco.

4.4.1.1.3. Efeito de diferentes fontes suplementares de nitrogênio

O efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio sobre a produção de lacases está apresentado na Tabela 46. As melhores fontes suplementares foram o cloreto de amônio e a peptona, aumentando a produção em 67,8 e 37,4%, respectivamente, em relação ao controle. A adição de nitrato de sódio e farelo de soja inibiu a produção da enzima em 47,8% e 19,6%, respectivamente. Já as demais fontes suplementares testadas, não apresentaram efeito um significativo sobre a produção de lacases.

Tabela 46: Efeito de fontes adicionais de nitrogênio sobre a produção enzimática

Fontes de Nitrogênio	(%, m/m)	U g ⁻¹	U mL ⁻¹	%
Controle ^a	-	33,5 ± 1,7	6,7 ± 0,5	100,0
Asparagina	1	35,3 ± 1,5	7,1 ± 0,6	105,6
Caseína	1	37,3 ± 1,6	7,5 ± 0,6	111,2
Farelo de Soja	1	26,9 ± 1,2	5,4 ± 0,5	80,4
Glicina	1	29,2 ± 1,3	5,8 ± 0,4	87,4
Peptona	1	46,0 ± 2,4	9,2 ± 0,8	137,4
Extrato de	1	35,8 ± 1,9	7,2 ± 0,6	107,0
Extrato de malte	1	39,0 ± 1,9	7,8 ± 0,6	116,4
Farinha de	1	38,2 ± 2,0	7,6 ± 0,6	114,2
Nitrato de amônio	0,8	31,0 ± 1,7	6,2 ± 0,5	92,8
Nitrato de potássio	0,8	33,6 ± 1,5	6,7 ± 0,4	100,5
Nitrato de sódio	0,8	17,6 ± 0,9	3,5 ± 0,2	52,2
Sulfato de amônio	0,8	29,4 ± 1,3	5,9 ± 0,4	87,7
Cloreto de amônio	0,8	56,1 ± 2,7	11,2 ± 0,8	167,8
Uréia	0,8	35,9 ± 2,0	7,2 ± 0,6	107,3

O fungo foi cultivado por 192 h a 25°C, em 5 g de farelo de trigo com umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹ de substrato seco, suplementado com diferentes fontes de nitrogênio. As dosagens enzimáticas foram realizadas conforme item 3.3.6. U g⁻¹ corresponde ao número total de unidades de atividade enzimática produzidas por grama de substrato seco.

^a Controle: meio de cultivo constituído exclusivamente por farelo de trigo com umidade inicial de 2,0 mL g⁻¹ de substrato seco.

4.4.1.1.4. Efeito da adição de sulfato de cobre ao meio de cultivo sobre a produção de lacases

Estudos sobre a regulação da expressão de lacases fúngicas por íons cobre têm sido amplamente descritos na literatura (Singhal et al., 2001; Baldrian et al., 2008; Giardina et al., 2010; Iyer & Chatoo, 2003). Estes estudos relatam aumentos de 8 a 18 vezes na produção da enzima, em presença de CuSO_4 em concentrações que variam de $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ a 25 mmol L^{-1} .

Desse modo, foi realizado um estudo para avaliar o efeito da adição de sulfato de cobre ao meio de cultivo sobre a produção de lacases (Figura 21). A presença de sulfato de cobre em concentração 50 mmol L^{-1} aumentou a produção enzimática em cerca de 17%, atingindo $42,3 \pm 2,1 \text{ U g}^{-1}$. Já, em concentrações abaixo de 50 mmol L^{-1} não se observou aumento na produção da enzima, enquanto, em concentrações maiores ocorreu inibição da produção, que atingiu 66% do controle, para a concentração de 100 mmol L^{-1} .

Figura 21. Efeito da adição de sulfato de cobre ao meio de cultivo sobre a produção de lacases

O fungo foi cultivado a 25°C , em meio sólido constituído de 5g de farelo de trigo por 192 horas na presença de sulfato de cobre em diferentes concentrações. As soluções de sulfato de cobre foram adicionadas ao meio de cultivo em substituição à água, mantendo-se constante a umidade inicial de $2,0 \text{ mL g}^{-1}$ de substrato seco. As dosagens enzimáticas foram realizadas conforme descrito em Material e Métodos. A atividade controle (100%) foi de $36,1 \pm 0,7 \text{ U g}^{-1}$.

4.4.1.1.5. Otimização da produção de lacases por *P. sanguineus* empregando MSR

Conforme descrito no item 3.7.4, após a seleção das melhores condições de cultivo para a produção de lacases por OFAT, foi realizado um planejamento fatorial (Tabela 47) para avaliar a influência da concentração de sabugo de milho, da temperatura, da umidade inicial do meio e do tempo cultivo sobre a produção enzimática.

Tabela 47: Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a produção de lacases por *P. sanguineus*

Ensaio	Variáveis reais e (codificadas)				U g ⁻¹	U mL ⁻¹
	Tempo (dias)	Umidade inicial (mL g ⁻¹)	Temperatura (°C)	Sabugo de milho (% m/m)		
1	7(-1)	3(-1)	20(-1)	10(-1)	47,5	9,5
2	9(+1)	3(-1)	20(-1)	10(-1)	56,7	11,3
3	7(-1)	5(+1)	20(-1)	10(-1)	36,9	7,4
4	9(+1)	5(+1)	20(-1)	10(-1)	42,9	8,6
5	7(-1)	3(-1)	30(+1)	10(-1)	49,1	9,8
6	9(+1)	3(-1)	30(+1)	10(-1)	47,6	9,5
7	7(-1)	5(+1)	30(+1)	10(-1)	68,2	13,4
8	9(+1)	5(+1)	30(+1)	10(-1)	59,7	11,9
9	7(-1)	3(-1)	20(-1)	20(+1)	73,9	14,8
10	9(+1)	3(-1)	20(-1)	20(+1)	77,2	15,4
11	7(-1)	5(+1)	20(-1)	20(+1)	45,7	9,1
12	9(+1)	5(+1)	20(-1)	20(+1)	48,6	9,7
13	7(-1)	3(-1)	30(+1)	20(+1)	65,7	13,1
14	9(-1)	3(-1)	30(+1)	20(+1)	74,7	14,9
15	7(-1)	5(+1)	30(+1)	20(+1)	112,9	22,6
16	9(+1)	5(+1)	30(+1)	20(+1)	95,1	19,0
17	6(-2)	4(0)	25(0)	15(0)	115,2	23,0
18	10(+2)	4(0)	25(0)	15(0)	119,8	23,4
19	8(0)	2(-2)	25(0)	15(0)	33,1	6,7
20	8(0)	6(+2)	25(0)	15(0)	78,3	15,7
21	8(0)	4(0)	15(-2)	15(0)	29,4	5,6
22	8(0)	4(0)	35(+2)	15(0)	54,6	10,9
23	8(0)	4(0)	25(0)	5(-2)	51,6	10,3
24	8(0)	4(0)	25(0)	25(+2)	119,5	23,9
25	8(0)	4(0)	25(0)	15(0)	136,4	27,3
26	8(0)	4(0)	25(0)	15(0)	137,2	27,4
27	8(0)	4(0)	25(0)	15(0)	135,8	26,3

O fungo foi cultivado em 5 g de farelo de trigo, contendo sulfato de cobre 50 mmol L⁻¹ e 0,8 % (m/m) de cloreto de amônio. As dosagens enzimáticas foram realizadas conforme descrito em Material e Métodos. U g⁻¹ corresponde ao número total de unidades de atividade enzimática produzidas por grama de substrato seco.

Os resultados obtidos no planejamento fatorial demonstraram que a maior produção de lacases foi obtida nas condições do ensaio 26: 25°C, 8 dias, umidade inicial do meio de 4,0 mL g⁻¹ e concentração de sabugo de milho moído de 15% (m/m).

Os coeficientes de regressão para a produção enzimática estão mostrados na Tabela 48. Os termos lineares do sabugo de milho e da temperatura e os termos ao quadrado da temperatura do tempo e da umidade tiveram efeito estatisticamente significativo sobre a produção enzimática. Já, com exceção da interação entre temperatura e umidade, as interações entre as outras variáveis analisadas não foram estatisticamente significativas.

Tabela 48: Coeficientes de regressão para a produção de lacases

Fatores	Coeficientes	<i>p</i>
Intercepto	136,4667	0,000000
(x) Sabugo de milho moído (L)	8,1000	0,038567
Sabugo de milho moído (Q)	-6,8250	0,089804
(y) Temperatura (L)	9,7250	0,016379
Temperatura (Q)	-22,3125	0,000059
(z) Umidade inicial do meio (L)	2,8333	0,432317
Umidade inicial do meio (Q)	-25,7000	0,000015
(k) Tempo (L)	5,7667	0,124086
Tempo (Q)	-14,8125	0,001746
xy	3,9000	0,379130
yz	0,2500	0,954284
xk	-0,4875	0,911009
yz	11,2500	0,021807
yk	-2,5125	0,567240
zk	-2,3375	0,594190

O modelo de segunda ordem que descreve o comportamento da produção de lacases frente à variação da percentagem de sabugo de milho, da temperatura, da umidade inicial do meio e do tempo de cultivo foi expresso pela equação 9.

$$\text{Lacase} = [136,47 + 8,10 x + 9,73 y + 11,25 yz - 22,31 y^2 - 25,70 z^2 - 14,81 k^2] \quad [9]$$

O modelo obtido pode ser considerado de boa qualidade, pois o F_{calc} foi muito superior ao F_{tab} (Tabela 49). Além disso, a porcentagem de variação explicada pelo modelo (R^2) foi de 88%.

Tabela 49: ANOVA para a produção de lacases por *P. sanguineus*

Parâmetros	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	$F_{\text{calc.}}$
Regressão	27.002,68	6	4.500,45	25,70
Resíduos	3.502,01	20	175,10	
Total	30.504,69	26	1.173,26	

$$R^2 = 0,88; F_{\text{tab}} = 2,60$$

As superfícies de resposta para os fatores que afetaram a produção de lacases estão apresentadas na Figura 22. A análise dos gráficos permitiu observar que as melhores condições para a produção enzimática estão nas faixas entre 3,5 a 4,5 mL g⁻¹ de umidade inicial do meio, temperatura de cultivo de 25,5 a 27,5°C, 15 a 25%, (m/m) de sabugo de milho e tempo de cultivo de 7,5 a 9,0 dias.

Figura 22. Superfícies de resposta para a produção de lacases

As superfícies de resposta mostram os efeitos de interação entre: percentagem de sabugo de milho moído e umidade inicial do meio (A); tempo e temperatura de cultivo (B).

De acordo com o modelo obtido, a produção máxima de lacases ($139,0 \text{ U g}^{-1}$) ocorreu a $26,6^\circ\text{C}$, em 8,15 dias, com umidade inicial do meio de $4,12 \text{ mL g}^{-1}$, 18,77%

(m/m) de sabugo de milho moído, 50 mmol L⁻¹ de sulfato de cobre e 0,8 % (m/m) de cloreto de amônio, empregando farelo de trigo como fonte de carbono. Assim, a produção foi cerca de 4,7 vezes maior que a inicialmente obtida ($29,8 \pm 1,9$ U g⁻¹). O valor máximo obtido na validação experimental das condições otimizadas foi de $138,6 \pm 13,2$ U g⁻¹, em boa correlação com o valor predito, confirmando a validade do modelo.

Poucos são os estudos que relatam a produção de lacases fúngicas em meio sólido, especialmente utilizando resíduos agroindustriais. *Pycnoporus sanguineus* CY788 apresentou uma produção de 46,5 U g⁻¹ quando cultivado em óleo de palma suplementado com uréia (Vikineswary et al., 2005). Um nível inferior de produção foi descrito para *P. ostreatus* (18,0 U g⁻¹), quando cultivado em farelo de trigo, suplementado com sais minerais (Mantovani et al., 2012). Dessa forma, a linhagem de *P. sanguineus* utilizada neste trabalho pode ser considerada boa produtora de lacases, quando cultivada em meio simples, constituído majoritariamente de farelo de trigo e sabugo de milho, o que é muito interessante do ponto de vista de aplicação industrial.

4.4.2. Caracterização bioquímica das lacases do extrato bruto do cultivo de *P. sanguineus* em condições ótimas

4.4.2.1. Efeito de temperatura e pH sobre a atividade lacásica

Conforme descrito no item 3.8 foi realizado um planejamento fatorial 2² para determinar as melhores condições de pH e temperatura para a atividade enzimática (Tabela 50). Os resultados obtidos demonstraram uma maior atividade nas condições do ensaio 11: pH 4,5 e 65 °C.

Tabela 50: Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a atividade lacásica

Ensaio	Variáveis reais e (codificadas)		
	pH	T (°C)	U mg ⁻¹
1	4,0(-1)	55(-1)	14,0
2	5,5(+1)	55(-1)	15,5
3	4,0(-1)	75(+1)	14,7
4	5,5(+1)	75(+1)	14,0
5	3,4(-1,41)	65(0)	12,9
6	5,9(+1,41)	65(0)	12,5
7	4,5(0)	50(-1,41)	13,1
8	4,5(0)	80(+1,41)	12,4
9	4,5(0)	65(0)	16,3
10	4,5(0)	65(0)	16,5
11	4,5(0)	65(0)	16,9

As dosagens enzimáticas foram realizadas conforme descrito no item 3.3.6, em tampão McIlvaine, ajustado para diferentes valores de pH.

Os coeficientes de regressão estão apresentados na Tabela 51. Apenas os termos ao quadrado de pH e temperatura, assim como o termo linear da temperatura foram estatisticamente significativos.

Tabela 51: Coeficiente de regressão para a atividade lacásica

Fatores	Coeficientes	<i>p</i>
Intercepto	16,66	0,000000
pH (L)	-0,34	0,162645
pH (Q)	-1,89	0,000582
T (L)	0,69	0,002518
T(Q)	-0,45	0,000168
pH.T	-0,55	0,130098

O modelo de segundo grau que descreve a atividade lacásica frente ao pH e temperatura é descrito pela equação 10.

$$\text{Lac} = [16,66 + 0,69 T - 1,89 \text{ pH}^2 - 0,45 T^2] \quad [10]$$

O modelo obtido pode ser considerado de boa qualidade, pois o F_{calc} foi altamente significativo (Tabela 52). Além disso, o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,96, demonstrando que 96% da variação total da resposta foi explicada pelo modelo.

Tabela 52: ANOVA para a atividade lacásica

Parâmetros	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	$F_{\text{calc.}}$
Regressão	46,01	5	9,20	35,39
Resíduos	1,85	7	0,26	
Total	47,86	10	4,79	

$R^2 = 0,96$; $F_{\text{tab}} = 3,97$

A análise da superfície de resposta (Figura 23) permitiu observar que as melhores condições estão na faixa de pH de 3,7 a 5,5 e temperatura de 55 a 67°C.

Figura 23. Superfície de resposta representando os efeitos de interação de pH e temperatura sobre a atividade lacásica.

De acordo com o modelo obtido a atividade máxima ocorreu em pH e temperatura de 4,7 e 63,8°C, com um valor predito de 16,6 U mg⁻¹, e apresentou uma excelente correlação com o valor obtido na validação experimental dos dados (16,1 ± 1,4 U mg⁻¹).

Os valores de pH e temperatura ótimos para lacases produzidas por *P. sanguineus* foram muito semelhantes aos descritos na literatura. Outros estudos demonstram que as lacases de fungos mesófilos apresentam valores de pH e temperatura ótimos que variam de 3,0 a 6,0 e 50 a 70°C, respectivamente (More et al., 2011; Lomascolo et al., 2011; Atalla et al., 2013). No entanto a lacase de *P. sanguineus* MUCL 41582 apresentou uma atividade máxima em pH 2,5 (Lomascolo et al., 2011).

4.4.2.2. Estabilidade térmica e ao pH da atividade lacásica do extrato bruto

A estabilidade térmica das lacases está mostrada na Figura 24. A atividade do extrato bruto manteve-se estável por 120 minutos a 50°C. Após a incubação por 120 minutos a 55, 60 e 65 e 70°C cerca de 78, 68, 53 e 42% da atividade inicial, respectivamente, foi mantida. Além disso, a enzima apresentou um tempo de meia vida de 22 minutos a 75°C, atingindo a inativação total somente após 120 minutos nesta mesma temperatura.

Figura 24. Estabilidade térmica das lacases no extrato bruto

O extrato bruto foi incubado em diferentes temperaturas e após intervalos de tempo adequados a atividade residual sobre ABTS foi determinada conforme descrito em Material e Métodos. Temperaturas de incubação: (■) 50°C, (●) 55 °C, (△) 60 °C, (▼) 65 °C, (○) 70 °C e (◆) 75°C. A atividade controle (100%) correspondeu a $39,6 \pm 2,7 \text{ U mg}^{-1}$.

As lacases produzidas por *P. sanguineus* apresentaram estabilidade térmica sensivelmente superior quando comparadas com lacases de outros fungos mesófilos, (Hilden et al., 2009). Lacases menos termoestáveis foram descritas para os microrganismos *T. harzianum*, *P. coccineus*, *P. sanguineus*, *T. pubescens*, as quais apresentaram tempos de meia-vida de 60 a 159 minutos a 60°C (Jaouani et al. 2005; Danta'n-González et al., 2008; Galhaup et al., 2002; Tong et al., 2007). Já a lacase produzida por *T. harzianum* WL-1 apresentou um tempo de meia vida de 60 minutos a 65°C (Sadhasivam et al., 2007). Enquanto as lacases produzidas por *P. cinnabarinus* e *Steccherinum ochraceum* apresentaram tempos de meia-vida de 60 e 100 minutos, respectivamente, a 70°C. No entanto *Pleurotus* sp produziu uma lacase com tempo de meia vida de 30 min a 75°C (More et al., 2011).

Portanto, a boa termoestabilidade das lacases produzidas por *P. sanguineus* é uma característica bastante atrativa para a aplicação destas enzimas em processos industriais.

A estabilidade ao pH das lacases no extrato bruto está apresentada na Figura 25. A atividade manteve-se constante e próxima do controle em pH 4,5 e 5,0, decaindo para cerca de 90% da atividade máxima entre pH 3,0 e 4,0 e pH 5,0 e 7,0. Acima de 7,0, a atividade decaiu levemente até atingir cerca de 76% do controle em pH 8,0.

Figura 25. Estabilidade ao pH das lacases no extrato bruto

O extrato bruto foi diluído em tampão McIlvaine, na faixa de pH entre 3,0 e 8,0, e mantido a 4°C por 24h. A atividade residual foi determinada a 65°C, como descrito em Material e Métodos. A atividade controle (100%) correspondeu a $41,3 \pm 2,3 \text{ U mg}^{-1}$.

As lacases fúngicas descritas na literatura são estáveis em diferentes intervalos de pH (Lomascolo et al., 2011; Uzan et al., 2011). As lacases produzidas por *P. sanguineus* CIRM-BRFM são estáveis nas faixas de pH 5,0 a 7,0 (Lu et al., 2007; Uzan et al., 2011). No entanto, a enzima produzida por *Pycnoporus sp.* SYBC-L1 apresentou uma faixa de estabilidade de pH 4,0 a 10,0 (Whang et al., 2010; Lomascolo et al., 2011).

4.4.2.3 Efeito de íons e EDTA sobre a atividade lacásica

O efeito de diferentes íons e EDTA sobre a atividade lacásica é mostrado na Tabela 53. A atividade mostrou-se insensível à presença de Ca^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} e Na^+ em ambas as concentrações testadas. No entanto, Hg^{2+} , Ag^+ e Fe^{2+} , na concentração de 1 mmol L^{-1} , inibiram fortemente a atividade enzimática, que atingiu cerca de 17, 27 e 32% da atividade controle, respectivamente. A presença do íon Pb^{2+} , em concentração de 1 mmol L^{-1} , também inibiu a atividade enzimática em 49%. Em contraste, Cu^{2+} estimulou a atividade em 53% em concentração 5 mmol L^{-1} . O EDTA, em ambas as concentrações testadas, inibiu completamente a atividade enzimática.

Tabela 53: Efeito de íons e EDTA sobre a atividade lacase no extrato bruto

Efetores	Atividade residual (%)	Atividade residual (%)
	(1 mmol L^{-1})	(5 mmol L^{-1})
Controle	$100 \pm 2,7$	$100 \pm 1,9$
CaCl_2	$99 \pm 2,1$	$98 \pm 1,8$
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	$51 \pm 0,8$	0
$\text{Sr}(\text{Cl}_2)$	$101 \pm 2,6$	$100 \pm 2,4$
HgCl_2	$17 \pm 0,2$	0
CoCl_2	$91 \pm 1,8$	$87 \pm 1,7$
ZnCl_2	$103 \pm 2,9$	$107 \pm 2,3$
NiCl_2	$102 \pm 1,8$	$80 \pm 1,8$
MgCl_2	$104 \pm 2,4$	$101 \pm 1,4$
AgNO_3	$27 \pm 0,5$	ND
FeCl_2	$32 \pm 0,2$	ND
NaCl	$97 \pm 1,5$	$94 \pm 2,6$
CuSO_4	$111 \pm 2,3$	$153 \pm 3,7$
EDTA	0	0

A atividade controle (100%) foi determinada na ausência dos íons testados e correspondeu a $30,3 \pm 1,6 \text{ U mg}^{-1}$.

ND: não detectável pelo método empregado.

Por se tratar de uma enzima que apresenta íons metálicos no sítio ativo, a inibição da atividade lacásica por EDTA é esperada e muito descrita na literatura (Arora et al., 2010; More et al., 2011; Jaouani et al., 2005). Similarmente aos nossos resultados as lacases de *P. coccineus* (Jaouani et al., 2005) e de *C. paradoxa* (Robles et al., 2002) foram praticamente inibidas completamente por EDTA em concentração de 5 mmol L⁻¹ de EDTA. No entanto, as lacases de *Pleurotus* sp foram inibidas apenas 35%, na presença de EDTA 10 mmolL⁻¹.

A inibição por Fe²⁺ também é comum entre as lacases (Arora et al., 2010). A atividade da lacase de *Trematosphaeria mangrovei* foi totalmente inibida na presença de de Fe²⁺ 1 mmol L⁻¹ (Atalla et al., 2013). Já a lacase de *Pleurotus* sp foi inibida em 60% em presença de Fe²⁺ 2 mmol L⁻¹ (More et al., 2011).

Muitas lacases fúngicas também são inibidas por Hg²⁺ e Ag⁺ (Atalla et al., 2013, Arora et al., 2013). Novamente, a inibição por estes íons sugere a presença de grupos tióis essenciais para a atividade da enzima.

Por fim, a estimulação das lacases por íons cobre tem sido descrita na literatura, tendo sido atribuída à sua presença no sítio ativo da molécula (Sadhasivam et al., 2008).

Analizados em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram bons níveis de produção de β -glucosidases, β -xilosidases e xilanases por *C. graminicola*. Além disso, *P. sanguineus* também apresentou boa produção de lacases. (Tabela 54). A produção destas diferentes enzimas foi realizada, em meios de cultivo simples e baratos, constituído majoritariamente de resíduos lignocelulósicos, e as enzimas produzidas apresentaram elevada temperatura ótima de reação, bem como boa estabilidade térmica e ao pH, propriedades interessantes para aplicações biotecnológicas.

Em particular, todas as enzimas apresentaram boa estabilidade e atividade ótima em pH próximo de 5,0, propriedades essenciais para a sua aplicação em processos de hidrólise de materiais lignocelulósicos, visando à obtenção de diferentes produtos químicos que incluem o etanol de segunda geração.

Tabela 54: Resumo das condições ótimas de cultivo e das principais características bioquímicas das β -glucosidases, β -xilosidases e xilanases de *C. graminicola* e lacases de *P. sanguineus*

Enzimas	Produção Inicial * (U g ⁻¹)	Produção Final * (U g ⁻¹)	Condições ótimas	pH/Temperatura Ótimos	t _{1/2} (min) a70°C
β-glucosidases	109,7 $\pm$ 7,7	159,3 $\pm$ 12,7	Farelo de trigo, 1% (m/m) de palha de cana <i>in natura</i> , 7,07 dias, 28,13°C e 2,38 mL g ⁻¹	5,0/65 °C	6 min
β-xilosidases	57,7 $\pm$ 4,6	128,1 $\pm$ 6,4	Farelo de trigo, 4,66 % (m/m) de casca de amendoim moída, 7,71 dias, 25°C e 2,1 mL g ⁻¹	5,0/65°C	79 min
Xilanases	189,3 $\pm$ 7,7	378,1 $\pm$ 23,3	Farelo de trigo, 0,87% (m/m) de sabugo de milho moído, 0,378 % (m/m) de sulfato de amônio, 8,66 dias, 29,7°C e 2,2 mL g ⁻¹	5,5/65°C	37 min
Lacases	29,6 $\pm$ 1,9	138,6 $\pm$ 13,2	Farelo de trigo, 18,77% (m/m) de sabugo de milho moído, 50 mmol L ⁻¹ de sulfato de cobre, 0,8% (m/m) de cloreto de amônio, 8,15 dias, 26,6°C e 4,12 mL g ⁻¹	4,5/65°C	22 min

* Produção inicial: atividade produzida em meio de cultivo constituído de 5 g de farelo de trigo com 2,0 mL g⁻¹ de umidade inicial do meio

* Produção final: atividade produzida nas condições de cultivo otimizadas para a produção de cada enzima

5. Estudos de hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos empregando os extratos brutos de *C. graminicola*, *P. sanguineus* e *T. reesei*

O sinergismo entre os extratos brutos de *C. graminicola*, *T. reesei* e *P. sanguineus* na hidrólise de resíduos lignocelulósicos foi investigado. Os rendimentos da hidrólise enzimática foram expressos como porcentagem (m/m) do total de açúcares redutores e glicose presentes em cada resíduo como descrito no item 3.17 (Tabela 55).

Tabela 55: Total de açúcares redutores e glicose presentes em diferentes resíduos

Resíduos	Acúcares redutores (%,m/m)	Glicose (%, m/m)
Bagaço de cana- <i>in natura</i>	49,8 ± 5,2	43,2 ± 4,1
Bagaço de cana explodido	41,5 ± 5,3	34,6 ± 3,9
Palha de cana <i>in natura</i>	43,2 ± 4,7	27,8 ± 2,9
Papelão	54,7 ± 7,2	41,8 ± 5,1
Jornal	43,2 ± 6,0	30,4 ± 4,1

As dosagens foram realizadas conforme descrito em Material e Métodos.

Inicialmente, as celulasas de *T. reesei* no extrato bruto foram caracterizadas em relação a temperatura e pH ótimos de atividade, frente aos substratos avicel, CMC e papel filtro Whatman, assim como à sua termoestabilidade. Os resultados revelaram um pH ótimo 4,5 a 5,0 e temperatura ótima de 50-55°C, com um rápido declínio em 60°C. Uma atividade celulásica residual de 70% foi observada após 72 horas a 50°C. Considerando que as β -glucosidases, β -xilosidases e xilanases de *C. graminicola*, e as lacases de *P. sanguineus* mostraram pH ótimo no extrato bruto de 4,5 a 5,0, cerca de 55-65% da atividade máxima a 50°C e alta termoestabilidade na mesma temperatura, os ensaios de hidrólise dos resíduos foram realizados a 50°C e pH 5,0. Também foram realizados alguns ensaios preliminares de hidrólise empregando os extratos brutos de *C. graminicola* cultivado em condições otimizadas para a produção de β -glucosidases (**M- β -glc**), β -xilosidases (**M- β -xil**) ou xilanases (**M-xil**), em misturas com os extratos brutos de *T. reesei* (rico em celulasas) e *P. sanguineus* (rico em lacases). Os rendimentos máximos, em glicose, da hidrólise de palha de cana *in natura*, papelão e jornal foram: 20, 60, 15% para (**M- β -glc**), 19, 49 e 18% para (**M- β -xil**) e 36, 70 e 33% para (**M-xil**),

respectivamente. Desse modo, como o extrato bruto otimizado para a produção de xilanases apresentou melhores rendimentos em glicose para todos os substratos empregados, o mesmo foi empregado em todos os experimentos posteriores de hidrólise.

Os extratos brutos do cultivo de *C. graminicola* (**M-Xil**), *T. reesei* e *P. sanguineus* foram caracterizados quanto aos níveis das diferentes atividades enzimáticas de interesse, na condição a ser empregada para a hidrólise dos resíduos (pH 5,0 e 50°C) (Tabela 56). O extrato de *T. reesei* mostrou bons níveis de atividades FPA, CMCase e Avicelase, contrastando com os baixos níveis observados para o extrato de *C. graminicola*. Por outro lado, o extrato de *C. graminicola* apresentou bons níveis das atividades celobiásica, β -xilosidásica e xilanásica, além de baixos níveis de atividade α -arabinofuranosidásica. Já o extrato de *P. sanguineus* apresentou bons níveis da atividade lacase e baixos níveis de todas as demais atividades testadas.

As cargas enzimáticas empregadas nos coquetéis testados para a sacarificação da palha de cana *in natura*, papelão e jornal estão mostradas na Tabela 57.

Tabela 56: Atividades enzimáticas obtidas nos extratos brutos de *C. graminicola*, *T. reesei* e *P. sanguineus*

Extrato bruto	FPA (FPU mL ⁻¹)	Avicelase (U mL ⁻¹)	CMcase (U mL ⁻¹)	Celobiase (U mL ⁻¹)	PNP-xilosidase (U mL ⁻¹)	Xilanase (U mL ⁻¹)	α -L-Arabino- furanosidase	Lacase U mL ⁻¹)
<i>C. graminicola</i>	0,08 ± 0,02	0,044 ± 0,008	0,28 ± 0,04	7,63 ± 0,9	15,0 ± 0,8	34,50 ± 4,9	0,11 ± 0,02	0
<i>P. sanguineus</i>	0,022 ± 0,002	0,34 ± 0,01	0,55 ± 0,03	0,84 ± 0,04	0,031 ± 0,012	1,48 ± 0,07	0,081 ± 0,004	6,69 ± 0,12
<i>T. reesei</i>	0,21 ± 0,04	0,30 ± 0,05	3,70 ± 0,5	0,0005 ± 0,0001	0,0031 ± 0,0009	1,9 ± 0,05	0,181 ± 0,050	0

As atividades enzimáticas foram determinadas a 50°C, em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0, conforme descrito em Material e Métodos

Tabela 57: Carga enzimática empregada na hidrólise de palha de cana *in natura*, papelão e jornal

Extrato bruto	FPA (U g ⁻¹)	Avicelase (U g ⁻¹)	CMcase (U g ⁻¹)	Celobiase (U g ⁻¹)	PNP- xilosidase (U g ⁻¹)	Xilanase (U g ⁻¹)	α -L-Arabino- furanosidase (U g ⁻¹)	Lacase (U g ⁻¹)
<i>C. graminicola</i>	2,4	1,32	8,4	228,0	150,0	1035,0	3,3	0
<i>P. sanguineus</i>	0,33	5,1	8,2	12,6	0,46	22,2	1,2	100,3
<i>T. reesei</i>	10,0	15,0	185,0	0,02	0,15	95,0	0	0
Coquetel	12,4	21,4	201,6	240,6	150,6	1152,2	4,5	100,3

5.1. Hidrólise enzimática da palha de cana *in natura*

O decurso temporal da hidrólise de palha de cana *in natura* empregando os extratos brutos de *T. reesei* (**ETr**), *C. graminicola* (**ECg**) e *P. sanguineus* (**EPs**) está apresentado na Figura 26.

Figura 26. Decurso temporal da hidrólise enzimática da palha de cana *in natura*.

(□) **EPs**; (Δ) **ECg**; (○) **ETr**; (■) coquetel **EPs/ECg/ETr**. Os controles foram realizados com os extratos brutos previamente inativados por aquecimento.

O tratamento com **ECg** resultou em um rendimento máximo de hidrólise de apenas 26,0% de açúcares redutores e 18,0% de glicose, após 72 horas. Empregando **ETr**, obteve-se 26,5 e 24% de açúcares redutores e glicose, respectivamente, após 72

horas. A hidrólise com **EPs** apresentou um rendimento de apenas 7,0% de açúcares redutores e 3,4% de glicose. No entanto, um efeito sinérgico foi observado quando se empregou a mistura **EPs/ECg/ETr**, atingindo-se um rendimento de 45,1% de açúcares redutores e 36,2% de glicose, respectivamente, em apenas 24 horas. Além disso, o rendimento máximo alcançado foi de 49,9% de açúcares redutores após 72 horas.

O baixo rendimento em glicose obtido quando empregado **ECg** reflete os baixos níveis de celulases presentes, pois a hidrólise ineficiente da celulose resulta em baixa produção de celobiose e, consequentemente, baixa liberação de glicose por ação das β -glucosidases, embora estas estejam presentes em altos níveis. Já, os açúcares redutores produzidos refletem possivelmente a ação das xilanases e β -xilosidases, gerando oligossacarídeos e xilose.

Os teores de açúcares redutores obtidos empregando-se **ETr** podem ser atribuídos a ação das celulases, gerando celooligossacarídeos. Entretanto, isso não explica a produção de glicose, que deve refletir os baixos níveis de atividade celobiásica em **ETr**. No entanto, um platô de açúcares redutores foi observado após 48 horas de reação, sugerindo um acúmulo de celobiose, que pode ter inibido as endo e exoglucosidases, como descrito por outros autores (Lynd et al., 2002; Suwannarangsee et al., 2012).

A ação das lacases presentes no **EPs** sobre o substrato possivelmente permitiu a exposição dos polissacarídeos. No entanto, os baixos rendimentos em açúcares redutores e glicose obtidos refletem os baixos níveis de celulases e hemicelulases presentes.

Já a eficiência do coquetel empregado na hidrólise da palha de cana *in natura* pode ser explicada pela presença de bons níveis de β -glucosidases, β -xilosidases e xilanases (*C. graminicola*), celulases (*T. reesei*) e lacases (*P. sanguineus*). Aparentemente, a degradação da molécula de lignina pelas lacases expõe a hemicelulose, permitindo a ação eficiente das hemicelulases, expondo assim as fibras de celulose à ação das celulases, resultando em uma maior eficiência na hidrólise da celulose e liberação de bons níveis de celobiose. A hidrólise da celobiose pelas β -glucosidases gera então bons níveis de glicose e diminui a concentração do dissacarídeo, potente inibidor das celulases. Simultaneamente, a degradação de xilooligossacarídeos a xilose libera as celulases da ação destes compostos inibitórios. Esta atuação sinérgica dos três extratos brutos leva assim a uma maior eficiência da sacarificação da palha de cana *in natura* e consequentemente a um melhor rendimento

em açúcares fermentáveis. Portanto, os resultados obtidos estão de acordo com o consenso da comunidade científica de que o sucesso da sacarificação de materiais lignocelulósicos depende do uso de coquetéis multienzimáticos (Dyk & Pletschke, 2012; Dashtban et al., 2009).

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a hidrólise da palha de cana *in natura* realizada empregando uma mistura dos extratos brutos de *T. reesei* e *C. graminicola* apresentou um rendimento máximo de 24,6% em açúcares redutores e 25,5% em glicose, após 24 horas (Zimbardi et al., 2013). Portanto, a suplementação desse coquetel com lacases levou a aumentos de 1,8 e 1,4 vezes nos rendimentos em açúcares redutores e glicose, respectivamente, mostrando claramente a sua importância no que diz respeito a aumentar a eficiência do processo de hidrólise da celulose presente em resíduos lignocelulósicos, em concordância com outros estudos.

Apesar da importância da utilização de resíduos lignocelulósicos para a produção de etanol celulósico, poucos estudos sobre a hidrólise enzimática da palha de cana *in natura* são descritos na literatura. Além disso, a maioria destes trabalhos empregam a palha de cana submetida a diferentes pré-tratamentos, o que permite uma maior acessibilidade da celulose e da hemicelulose à ação enzimática (Sindhu et al., 2011; Chandel et al., 2012; Krishnan et al., 2010; Sant'Ana et al., 2010). Rendimentos em glicose de cerca de 80 a 90% foram obtidos empregando a palha de cana pré-tratada (Sindhu et al., 2011; Chandel et al., 2012). Em contraste, apenas um estudo descreve a hidrólise enzimática empregando o resíduo sem pré-tratamento, reportando um rendimento máximo em glicose de 23,5% após 72 horas, empregando um coquetel comercial (Sant'Ana et al., 2010). Desse modo, a alta eficiência do nosso coquetel, quando comparado ao coquetel empregado por Sant'Ana da Silva et al. (2010), pode ser atribuído a alta carga de xilanases, β -xilosidases e β -glucosidases, presentes no extrato bruto de *C. graminicola*, já que cargas similares de FPU (15 FPU g^{-1}) foram empregadas em ambos os estudos.

É bem conhecido que a íntima associação entre a celulose, hemicelulose e lignina torna a parede celular vegetal altamente recalcitrante. O uso de misturas enzimáticas pode vencer essa recalcitrância, permitindo a utilização dos polissacarídeos presentes nos resíduos lignocelulósicos, como fonte de açúcares fermentáveis. Assim, atualmente, o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos baratos e eficientes para a hidrólise da biomassa lignocelulósica encontra-se entre as mais importantes linhas de

pesquisa e desenvolvimento visando à produção economicamente viável de etanol celulósico (Dashtban et al., 2009; Dyk & Pletschke, 2012; Sivakumar, 2012).

5.2. Hidrólise enzimática do papelão

O decurso temporal da hidrólise enzimática do papelão está apresentado na Figura 27.

Figura 27. Decurso temporal da hidrólise enzimática de papelão.

(□) EPs; (Δ) ECg; (○) ETr; (■) coquetel EPs/ECg/ ETr. Os controles foram realizados com os extratos brutos previamente inativados por aquecimento.

O tratamento de papelão com **ECg** resultou em um rendimento máximo de hidrólise de apenas 29,6% em açúcares redutores e 16,3% em glicose, após 72 horas. Em contraste, empregando **ETr**, obteve-se 61,7% e 31,8% em açúcares redutores e glicose respectivamente, após o mesmo período. A hidrólise com **EPs** apresentou rendimentos de apenas 11,7% em açúcares redutores e 5,2% em glicose. No entanto, um grande efeito sinérgico foi observado para a hidrólise deste resíduo quando se empregou a mistura **EPs/ECg/ ETr**, atingido um rendimento máximo de 98,8% em açúcares redutores e 71,1% em glicose, respectivamente, em apenas 72 horas.

O baixo rendimento em açúcares redutores e glicose, obtido quando empregado **ECg** deve-se certamente aos baixos níveis de celulases presentes. Já o rendimento maior em açúcares redutores, reflete possivelmente a ação das xilanases e β -xilosidases.

O tratamento do papelão com **EPs** possivelmente a expõe a xilana e a celulose à ação das celulases e xilanases, no entanto, devido aos baixos níveis destas enzimas, assim como das β -glucosidases e β -xilosidases no extrato bruto, os rendimentos obtidos em açúcares redutores e glicose foram muito baixos. Além disso, possivelmente, as celulases e as xilanases foram inibidas pelos xilooligossacarídeos e celooligossacarídeos formados.

Os resultados obtidos empregando coquetel **EPs/ECg/ ETr** mostram claramente o efeito sinérgico das diferentes enzimas presentes na hidrólise do substrato.

Rendimentos em glicose para a hidrólise enzimática de papelão foram relatados por outros pesquisadores. Wang et al. (2012) relataram um rendimento máximo de 60% de glicose após 72 horas de reação, para a hidrólise de papelão sem pré-tratamento, utilizando um coquetel de enzimas comerciais. Rendimentos máximos de glicose de 50% a 60% foram relatados também para a hidrólise de papelão submetido a diferentes pré-tratamentos (Yanez et al., 2004; Wang et al., 2012). Entretanto, o emprego de pré-tratamentos para a sacarificação da lignocelulose necessariamente implica na elevação do custo final do processo, além de, muitas vezes, levar à formação de subprodutos indesejáveis. Portanto, o emprego do coquetel **EPs/ECg/ ETr** na hidrólise do papelão, sem um pré-tratamento, levou a rendimentos superiores em açúcares redutores e glicose, quando comparado a literatura, viabilizando possivelmente o processo de obtenção de etanol celulósico a partir deste resíduo.

5.3. Hidrólise enzimática do jornal

O decurso temporal da hidrólise de jornal não tratado, empregando os extratos brutos de *T. reesei*, *C. graminicola* e *P. sanguineus*, está apresentado na Figura 28.

Figura 28. Decurso temporal da hidrólise enzimática do jornal.

(□) EPs; (Δ) ECg; (○) ETr; (■) coquetel EPs/ECg/ ETr. Os controles foram realizados com os extratos brutos previamente inativados por aquecimento.

O tratamento do jornal com o extrato bruto de *C. graminicola* resultou em um rendimento máximo de hidrólise de apenas 11,0% em açúcares redutores e 5,6% em glicose, após 72 horas. Empregando o extrato bruto de *T. reesei*, obteve-se 39,6% e

17,3% em açúcares redutores e glicose, respectivamente, após 72 horas. Já a hidrólise com o extrato bruto de *P. sanguineus* apresentou um rendimento de apenas 2,0% em açúcares redutores e 3,2% em glicose. No entanto, quando se empregou uma mistura dos extratos brutos atingiu-se um rendimento máximo de 66,5% em açúcares redutores, após 24 horas e 33,0% em glicose, após 72 horas.

Em comparação, rendimentos máximos de 27-60% em glicose, após 72 horas de reação, foram relatados por outros autores, quando empregado jornal sem pré-tratamento, utilizando um coquetel de enzimas comerciais (Chang et al., 2001; Meleiro et al., 2014). No entanto, empregando-se jornal submetido a diferentes pré-tratamentos, rendimentos máximos de 55% em glicose foram relatados (Kuhad et al., 2010; Wang et al., 2012).

A recalcitrância do jornal à ação enzimática é geralmente atribuída ao alto teor de lignina, hemiceluloses e compostos inorgânicos (tintas) presentes neste resíduo (Meleiro et al., 2014). Embora o coquetel empregado neste estudo apresente altas cargas de hemicelulases e lacases, a presença de íons como Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{2+} , presentes nas tintas empregadas no jornal pode ter inibido a ação enzimática, pois de um modo geral, as enzimas empregadas apresentam alta sensibilidade à diferentes íons tornado desse modo, o processo de sacarificação deste resíduo menos eficiente.

5.4. Hidrólise enzimática da palha de cana *in natura* e de bagaço de cana explodido e *in natura* empregando um coquetel comercial.

Com a finalidade de avaliar o real potencial de aplicação do coquetel desenvolvido neste trabalho, foram realizados estudos comparativos em que as celulasas de *T. reesei* foram substituídas por um coquetel comercial de celulasas (Celluclast®).

As cargas enzimáticas empregadas foram:

- Coquetel **EPs/ECg/ETr**: 13,6 FPU g⁻¹, 176,2 U g⁻¹ CMcase, 19,8 U g⁻¹ avicelase, 403,3 U g⁻¹ celobiase, 285,0 U g⁻¹β-xilosidase, 3075,0 U g⁻¹ xilanase por grama de substrato seco;

- Coquetel **EPs/ ECg/Celluclast®**: 13,6 FPU g⁻¹, 399,2 U g⁻¹ CMcase, 48,8 U g⁻¹ avicelase, 427,7 U g⁻¹ celobiase, 286,0 U g⁻¹ β-xilosidase, 3094,0 U g⁻¹ xilanase por grama de substrato seco.

5.4.1. Hidrólise da palha de cana *in natura*

O decurso temporal da hidrólise de palha de cana *in natura* é mostrado na Figura 29. O uso do coquetel **EPs /ECg /Celluclast®** resultou em rendimentos máximos de 32 e 28% em açúcares redutores eglicose, respectivamente (Figura 29A). Em contraste, rendimentos máximos de 50%, em açúcares redutores e 36% em glicose em apenas 24 horas, foram obtidos empregando o coquetel **EPs/ECg/ETr** (Figura 29B).

Embora o coquetel **EPs/ECg/Celluclast®** tenha apresentado em sua composição altos níveis de atividades CMcásica e avicelásica, o coquetel **EPs/ECg/ETr** foi mais eficiente na hidrólise da palha de cana *in natura*.

A)

B)

Figura 29. Decurso temporal da hidrólise enzimática da palha de cana *in natura*.
 (A): ($\triangle$) Celluclast®, ($\blacktriangle$) ECg, ($\blacksquare$) EPs ($\bullet$), coquetel EPs/ECg/Celluclast®. (B):
 (∇) ETr, ($\blacktriangle$) ECg, ($\blacksquare$) EPs; ($\bullet$) coquetel EPs/ECg/ETr.

5.4.2. Hidrólise enzimática do bagaço de cana explodido

O decurso temporal da hidrólise do bagaço de cana explodido é mostrado na Figura 30. O uso do *coquetel* EPs/ECg/Celluclast® resultou em máximos rendimentos de 53 e 35% em açúcares redutores e glicose, respectivamente, após 48 horas (Figura 30A). No entanto, o coquetel EPs/ECg/ETr apresentou máximos rendimentos de 77% em açúcares redutores e 50% em glicose, em apenas 24 horas (Figura 30B).

A)

Figura 30. Decurso temporal da hidrólise enzimática de bagaço de cana explodido

(A): ($\triangle$) Celluclast®, ($\blacktriangle$) ECg, ($\blacksquare$) EPs ($\bullet$), coquetel EPs/ECg/Celluclast®; (B): (∇) ETr, ($\blacktriangle$) ECg, ($\blacksquare$) EPs; ($\bullet$) coquetel EPs/ECg/ETr

5.4.3. Hidrólise enzimática do bagaço de cana *in natura*

O decurso temporal da hidrólise do bagaço de cana *in natura* é mostrado na Figura 31. O uso do coquetel EPs/ECg/Celluclast® resultou em rendimentos máximos de 65 e 46% em açúcares redutores e glicose, em 24 horas, respectivamente (Figura

31A). O coquetel **EPs/ECg/ETr** apresentou rendimentos máximos de 71% em açúcares redutores e 41% em glicose, em 24 horas (Figura 31B).

A)

Figura 31. Decurso temporal da hidrólise enzimática do bagaço de cana *in natura*

(A): (△) Celluclast®, (▲) ECg, (■) EPs (●), coquetel EPs/ECg/Celluclast®;

(B): (▽) ETr, (▲) ECg, (■) EPs; (●) coquetel EPs/ECg/ETr.

De um modo geral o coquetel **EPs/ECg/ETr** foi mais eficiente quando comparado ao coquetel **EPs/ECg/Celluclast®** na hidrólise dos resíduos empregados. Este resultado se deve possivelmente às diferenças nas características bioquímicas das enzimas presentes no extrato bem como à especificidade de substrato, estabilidade térmica e ao pH e possivelmente uma menor inibição das enzimas do coquetel **EPs/ECg/ETr** frente ao acúmulo de produtos produzidos no decorrer da reação (Dyk & Pletschke, 2012), levando a um maior rendimento no processo de sacarificação. Além disso, Saloheimo et al. (2002) relataram a presença em *T. reesei* de uma proteína com

função semelhante à expansina, denominada “swollenina”. As soleninas são encontradas em plantas e agem rompendo as ligações de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose e outros polissacarídeos, sem ação hidrolítica. A ação desta classe de proteínas provoca um deslizamento entre as fibras de celulose e a expansão da parede celular o que leva a uma maior eficiência na atuação das enzimas do complexo celulolítico (Chen et al., 2010).

Analisados conjuntamente, os resultados obtidos demonstraram um excelente potencial do coquetel **EPs/ECg/ETr** para a sacarificação da palha de cana *in natura*, bagaço de cana *in natura* e explodido e consequentemente para uma aplicação em processos de produção de etanol celulósico a partir destes resíduos.

Atualmente, têm se observado um crescente desenvolvimento da agroindústria canavieira gerando grandes incentivos à recuperação total ou parcial dos resíduos gerados da cana-de-açúcar, para a produção de etanol celulósico. Esta ação levaria a um aumento substancial da produtividade em etanol por hectare de cana plantada, minimizando, potencialmente a concorrência entre as culturas de cana e de alimentos pela ocupação das terras férteis, no Brasil e em outros países.

5.5. Otimização das condições de hidrólise enzimática de palha de cana *in natura* empregando MSR

Em termos energéticos, a palha de cana representa 1/3 da energia potencial da cana-de-açúcar, a qual, atualmente é subaproveitada (Ripoli et al., 2010; Bizzo et al., 2014). Desse modo, embora a palha de cana represente uma significativa fonte de biomassa para a produção de etanol celulósico, poucos estudos sobre a hidrólise deste resíduo tem sido relatados.

Em função dos resultados promissores obtidos neste estudo para a sacarificação deste resíduo (item 5.1), foi realizado um estudo para a otimização das proporções dos extratos brutos de *T. reesei*, *P. sanguineus* e *C. graminicola*, no coquetel enzimático empregando MSR. Os resultados obtidos no planejamento experimental estão apresentados na Tabela 58.

Tabela 58: Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para a otimização das condições de hidrólise enzimática da palha de cana *in natura*

Run	Variáveis reais e (codificadas)			Açúcares reductores (%)	Glicose (%)
	ECg (mL)	EPs (mL)	ETr (mL)		
1	4,0(-1)	2,0(-1)	1,5(-1)	21,1	19,1
2	8,0(+1)	2,0(-1)	1,5(-1)	24,2	16,3
3	4,0(-1)	4,0(+1)	1,5(-1)	41,0	20,0
4	8,0(+1)	4,0(+1)	1,5(-1)	30,2	17,8
5	4,0(-1)	2,0(-1)	2,5(+1)	52,3	41,4
6	8,0(+1)	2,0(-1)	2,5(+1)	28,7	23,6
7	4,0(-1)	4,0(+1)	2,5(+1)	33,0	13,6
8	8,0(+1)	4,0(+1)	2,5(+1)	24,7	17,9
9	2(-1,68)	3,0(0)	2,0(0)	16,6	22,3
10	10(+1,68)	3,0(0)	2,0(0)	22,5	18,9
11	6,0(0)	1(-1,68)	2,0(0)	21,2	11,2
12	6,0(0)	5(+1,68)	2,0(0)	30,5	17,6
13	6,0(0)	3,0(0)	0,5(-1,68)	39,6	27,3
14	6,0(0)	3,0(0)	3,5(+1,68)	16,9	21,3
15	6,0(0)	3,0(0)	2,0(0)	21,9	25,7
16	6,0(0)	3,0(0)	2,0(0)	20,0	26,4
17	6,0(0)	3,0(0)	2,0(0)	22,3	26,9

A hidrólise da palha de cana *in natura* foi realizada em meio constituído de 1% (m/v) do resíduo em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0, por 72 horas. Os açúcares reductores e a glicose liberados durante a hidrólise enzimática foram quantificados conforme descrito em Material e Métodos.

A melhor condição para a hidrólise foi obtida no ensaio 5: **ECg** (4,0 mL); **EPs** (2,0 mL) e **ETr** (2,5 mL), atingindo cerca de 51,3% em açúcares reductores e 41,4 % em glicose. A carga enzimática empregada no ensaio 5 foi: 1000 U g⁻¹ de xilanase, 160,0 U g⁻¹ de celobiase, 40 U g⁻¹ de CMcase, 10 U g⁻¹ de avicelase, 300 U g⁻¹ dePNP-xilosidase, 200 U g⁻¹ de lacase e 20 U g⁻¹ de FPA.

A análise dos coeficientes (Tabela 59) demonstrou que o efeito linear de **ECg**, assim como, a interação entre **ECg** e **EPs** influenciaram significativamente a hidrólise do substrato. Além disso, o efeito linear de **ETr**, o efeito ao quadrado de **ECg** e a interação entre estes extratos brutos também foram estatisticamente significativos.

Tabela 59: Coeficientes de regressão para a hidrólise enzimática da palha de cana *in natura*

Fatores	Coeficientes	P
Intercepto	23,43	0,000651
(x) ETr (L)	1,02	0,006010
ETr (Q)	-0,23	0,186641
(y) EPs (L)	1,18	0,073058
EPs (Q)	1,76	0,066901
(z) ECg (L)	-6,64	0,002058
ECg (Q)	1,48	0,013021
xy	-7,33	0,003487
xz	-3,33	0,016526
yz	-0,087	0,859010

A análise dos gráficos de superfície de resposta (Figura 32) permitiu verificar um potencial aumento no rendimento em glicose em menores volumes de **ECg**, ou seja, menores cargas de xilanases, β -glucosidases e β -xilosidases, assim como em maiores volume de **ETr** (maiores cargas de celulasas), mantendo praticamente a mesma carga de lacases empregada. Já para o rendimento em açúcares redutores, os resultados foram inconclusivos.

Figura 32. Superfícies de resposta para o rendimento em glicose da hidrólise da palha de cana *in natura*. (A): efeito de interação entre **EPs e **ECg**; (B): efeito da interação entre **ETr** e **ECg**.**

Os dados obtidos no planejamento experimental mostraram um aumento de 14% e 16% no rendimento em glicose e em açúcares redutores respectivamente, em relação ao coquetel empregado na hidrólise da palha descrito no item 4.6.1 (45,1% de açúcares

redutores e 36,2% de glicose). Dessa forma, estudos mais detalhados devem ser realizados no sentido de ajustar as proporções dos extratos utilizados, maximizando o rendimento da hidrólise. Além disso, também devem ser realizados estudos para a otimização das condições de sacarificação, empregando, por exemplo, maiores concentrações de substrato. Por outro lado, serão elaborados coquetéis utilizando as enzimas purificadas, para uma possível análise da contribuição individual de cada uma para a sacarificação dos diferentes substratos.

6.0. Microscopia eletrônica de varredura

Amostras da palha de cana *in natura* não tratadas ou submetidas ao tratamento enzimático nas condições do ensaio 5, conforme a Tabela 58, foram analisadas por MEV (Figura 33). Observa-se que a amostra da palha não submetida à ação das enzimas apresentou partículas maiores com uma estrutura uniforme e homogênea (Figuras 33A e 33C). Já as imagens da amostra submetida a tratamento enzimático mostram partículas de menor tamanho, além de uma morfologia mais heterogênea e menos compacta (Figura 33B e 33D). Estes resultados sugerem a desestruturação e fragmentação das fibras durante o processo.

Figura 33. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da palha de cana *in natura* não tratada (A e C) e submetida a tratamento enzimático (B e D).

7.0. Purificação de uma β -glucosidase majoritária produzida por *C. graminicola*

A purificação de uma β -glucosidase de *C. graminicola* e sua caracterização bioquímica teve como objetivo um estudo futuro da ação desta enzima, associada a outras, em coquetéis enzimáticos. Como já mencionado anteriormente, atualmente é consenso que o desenvolvimento de um processo eficiente e economicamente viável para a produção de etanol celulósico requer necessariamente um conhecimento

profundo das propriedades das enzimas envolvidas na hidrólise da lignocelulose (Henrissat, 1996; Zang et al., 2004).

Uma etapa inicial de precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio mostrou-se eficiente como método de partida, resultando numa purificação de 1,2 vezes, com rendimento de 72,5% (Tabela 60).

Tabela 60: Purificação de BGCg-2

Etapa	U mg ⁻¹	U Totais	Proteína Total (mg)	Rendimento (%)	Fator de Purificação
Extrato bruto	9,30	480,0	51,8	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ (60%)	11,58	348,0	31,1	72,5	1,2
Pico D-I	89,1	78,4	0,8	18,6	9,6
Pico D- II	94,3	198,0	2,1	41,2	10,1
Pico D-II após ultrafiltração	94,0	179,0	1,8	37,3	10,1
Pico F-I	32,8	12,3	0,45	2,5	3,5
Pico F-II (BGCg-2)	143,5	92,4	0,90	19,2	15,43

Após a precipitação, uma β -glucosidase majoritária foi purificada com sucesso por meio de dois passos cromatográficos sequenciais. O primeiro passo, em coluna de DMAE fractogel, permitiu a separação de dois picos de atividade (Pico D-I e Pico D-II), conforme mostrado na Figura 34. A seguir, uma cromatografia de exclusão molecular da amostra correspondente ao pico D-II resultou novamente na separação de dois picos de atividade, denominados Pico F-I e Pico F-II (Figura 35). Ao final do procedimento, a enzima foi purificada 15,4 vezes, com rendimento de 19,2%, atingindo uma atividade específica de 143,5 U mg⁻¹.

A análise da amostra correspondente ao pico F-II por PAGE revelou uma única banda protéica (Figura 36 A), coincidente com uma única banda de atividade β -glucosidásica (Figura 36 B), confirmando a pureza da preparação enzimática. A proteína purificada, denominada de BGCg-2, foi estocada em geladeira e não apresentou perda significativa de atividade nestas condições por até 2 meses.

Figura 34. Perfil cromatográfico da atividade β -glucosidásica de *C. graminicola* em coluna de DMAE-Fractogel.

A coluna (10,0 x 2,0 cm), equilibrada em tampão A, foi lavada exaustivamente até a eluição completa de proteínas não ligadas, e então com NaCl 120 mmol L⁻¹ em tampão A. A seguir, foi aplicado um gradiente linear de NaCl de 120 a 350 mmol L⁻¹ em tampão A. Frações de 2,0 mL foram coletadas, com um fluxo de 80 mL/hora, e analisadas para atividade PNP-glucosidásica (■) e absorbância em 280 nm (○). As frações com maior atividade (setas), correspondentes ao pico D-II foram reunidas.

Figura 35. Perfil cromatográfico da amostra correspondente ao pico D-II em coluna de filtração em gel de Sephacryl S-200

A amostra correspondente ao pico D-II foi aplicada numa coluna de filtração em gel de Sephacryl S-200 (130,0 x 2,0 cm), equilibrada e eluída com tampão B, com fluxo de 120 mL/h. Frações de 2,0 mL foram coletadas e analisadas para atividade PNP-glucosidásica (■) e absorbância em 280 nm (○). As frações com maior atividade, correspondentes ao pico F-II, foram reunidas e posteriormente aliquotadas e mantidas a 4° C.

Figura 36. Eletroforese em condições não-desnaturantes (PAGE) de uma amostra do Pico F-II.

A amostra foi submetida a PAGE em géis a 7% de acrilamida, conforme descrito em Material e Métodos. (A) Banda proteica revelada com Coomassie Brilliant Blue R; (B) Atividade β -glucosidásica no gel.

7.1. Propriedades Moleculares de BGCg-2

A eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) da enzima purificada está apresentada na Figura 37. A análise de BGCg-2 revelou uma única banda proteica, correspondente a uma massa molecular aparente de aproximadamente 70 kDa, confirmando a pureza da preparação. A análise por filtração em gel em HPLC revelou uma massa molecular aparente de cerca de 63 kDa para a enzima nativa (Figura 38). Este valor está em boa concordância com o valor encontrado por SDS-PAGE, sugerindo que a mesma é monomérica. A maioria das β -glucosidases fúngicas é monomérica (Bathia et al., 2002; Meleiro et al., 2014). Entretanto, β -glucosidases diméricas, triméricas e tetraméricas também foram descritas (Yang et al., 2008; Gueguen et al., 1995; Saha & Bothast, 2002).

Figura 37. Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de BGCg-2

Uma amostra da enzima purificada (40 μ g) foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, em condições desnaturantes, conforme descrito em Material e Métodos. A banda protéica foi revelada com nitrato de prata.

Figura 38. Determinação da massa molecular aparente da forma nativa da BGCg-2

Uma amostra da BGCg-2 foi aplicada em uma coluna Bio-Sil SEC 400, equilibrada e eluída com tampão fosfato 100 mmol L⁻¹, pH 6,8, contendo NaCl 150 mmol L⁻¹ e azida de sódio 10 mmol L⁻¹, com fluxo de 1,0 mL/min. Os padrões de massa molecular utilizados foram: gama-globulina (158 kDa), soroalbumina bovina (67 kDa), ovalbumina (44 kDa) e mioglobulina (17 kDa).

7.2. Temperatura e pH ótimos para a atividade β -glucosidásica de BGCg-2.

Os efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade de BGCg-2 foram analisados empregando-se MSR. A análise dos dados obtidos no planejamento experimental (Tabela 61) revelou uma maior atividade β -glucosidásica no ensaio 9: pH 5,0 e 65 °C.

Tabela 61: Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para determinação de pH e temperatura ótimos para a atividade de BGCg-2

Ensaio	Variáveis reais e codificadas		U mg ⁻¹
	Temperatura (°C)	pH	
1	55(-1)	4,5(-1)	72,1
2	75(1)	4,5(-1)	99,6
3	55(-1)	5,5(1)	49,0
4	75(1)	5,5(1)	84,0
5	65(0)	4,0(-1,41)	60,0
6	65(0)	6,5(+1,41)	46,0
7	50(-1,41)	5,0(0)	60,2
8	80(+1,41)	5,0(0)	17,4
9	65(0)	5,0(0)	108,2
10	65(0)	5,0(0)	106,4
11	65(0)	5,0(0)	107,8

As dosagens enzimáticas foram realizadas empregando PNP-glc (2 mmol L⁻¹) como substrato, em tampão McIlvaine, conforme descrito em Material e Métodos.

A análise dos efeitos (Tabela 62) indicou que os termos lineares e ao quadrado do pH e temperatura, assim como suas interações, foram estatisticamente significativos.

Tabela 62: Coeficientes de regressão para a atividade enzimática

<i>Fatores</i>	<i>Coefficientes</i>	<i>P</i>
Intercepto	105,21	0,000000
pH (L)	2,89	0,000022
pH (Q)	-7,77	0,000000
Temperatura (L)	0,77	0,002030
Temperatura (Q)	-25,43	0,000000
pH.T	6,92	0,000009

O modelo de segunda ordem que descreve o comportamento da atividade enzimática frente ao pH e temperatura foi expresso pela equação 11.

$$\beta\text{-glu (U mg}^{-1}\text{)} = [105,21 + 2,89 \text{ pH} + 0,77 \text{ T} + 6,92 \text{ pH.T} - 7,77 \text{ pH}^2 - 25,43 \text{ T}^2] \quad [11]$$

A análise dos dados indicou que o modelo obtido foi adequado para avaliar o efeito de pH e temperatura sobre a atividade enzimática, uma vez que o F_{calc} foi superior ao F_{tab} (Tabela 63). O coeficiente de determinação (R^2) de 0,87 indicou que 87% da variação da resposta foi explicada pelo modelo.

Tabela 63: ANOVA para a atividade enzimática

Parâmetros	SQ	MQ	GL	F_{calc}	P
Regressão	6361,63	1272,33	5	6,49	0,0043
Resíduos	980,04	196,00	5	-	-
Falta de ajuste	5,43	276,9	4	1,94	0,0750
Erro puro	4,37	2,43	5	-	-

SQ: soma dos quadrados; MQ: médias dos quadrados; GL: graus de liberdade; $R^2 = 0,87$; $F_{tab} = 2,69$

A análise da superfície de resposta (Figura 39), permitiu definir um intervalo de pH (4,7-5,3) e temperatura (62,5-67,5 °C) ótimos para a atividade da BGCg-2.

Figura 39. Superfície de resposta para o modelo de segunda ordem que representa o efeito da temperatura e do pH sobre a atividade da BGCg-2.

A análise estatística dos dados demonstrou que a temperatura e o pH ótimos para a atividade β -glucosidásica foram 65,4 °C e 5,10, respectivamente, com um valor máximo de atividade estimado de 105,51 U mg⁻¹. O valor experimental obtido após validação dos dados foi de $108,2 \pm 9,5$ U mg⁻¹ e apresentou boa correlação com o valor predito. Além disso, estes valores foram bem similares aos encontrados para as β -glucosidases do extrato bruto.

Similarmente ao observado para a enzima de *C. graminicola*, diversos estudos mostraram que o pH ótimo de atividade para a maioria das β -glucosidases fúngicas está na faixa de 4,0-6,0 (Bathia et al., 2002; Issam et al., 2003; Amouri and Gargouri, 2006; Bhiri et al., 2008; Korotkova et al., 2009; Teugjas Våljamäe, 2013).

Por outro lado, a temperatura ótima descrita para as β -glucosidases da maioria dos fungos mesófilos está na faixa de 50-60°C (Karnchanatat et al., 2007; Amouri & Gargouri, 2006; Saibi et al., 2009; Elshafei et al., 2011; Teugjas Våljamäe, 2013), embora as enzimas de *P. canescense* e *Fomitopsis palustris* tenham apresentado temperaturas ótimas de 70°C (Dubrovskaya et al., 2011; Yoon, et al., 2008). Já entre os fungos termófilos, os valores de temperaturas ótimas de reação encontram-se entre 50 e 75 °C (Kaur et al., 2007; Yang et al., Venturi et al., 2002; Nascimento et al., 2010; Meleiro et al., 2014). Desse modo, BGCg-2 apresentou uma temperatura ótima de

reação bastante elevada, semelhante às descritas para as enzimas de fungos termófilos, uma característica bastante interessante no que diz respeito à sua aplicação industrial.

7.3. Estabilidade térmica e ao pH de BGCg-2

A estabilidade térmica da BGCg-2 é mostrada na Figura 40. BGCg-2 mostrou-se estável por 120 min a 50°C, apresentando uma atividade residual de cerca de 80% a 55 e 60°C, após 60 minutos. A enzima apresentou um tempo de meia vida de cerca de 4 minutos a 70°C, atingindo a inativação total após 15 minutos na mesma temperatura. (Figura 39). Estes resultados foram bem similares aos encontrados para as β -glucosidases do extrato bruto.

Estudos de estabilidade térmica das β -glucosidases de fungos mesófilos mostraram que estas enzimas usualmente são estáveis entre 45 e 65 °C (Ramani et al., 2012; Karnchanatat et al., 2007, Ramani et al., 2012), similarmente aos resultados encontrados para BGCg-2. A boa termoestabilidade da enzima também é um fator interessante para aplicação biotecnológica.

Figura 40. Estabilidade térmica de BGCg-2.

O extrato bruto foi incubado em diferentes temperaturas e após intervalos de tempo adequados a atividade residual foi determinada a 65°C, como descrito em Material e métodos. O controle (100%) correspondeu a $131,3 \pm 8,5$ U mg⁻¹. Temperaturas de incubação: (■) 50 °C; (●) 55 °C; (□) 60 °C; (▼) 65 °C; (△) 70°C.

A estabilidade ao pH de BGCg-2 está apresentada na Figura 41. A atividade manteve-se próxima do controle entre pH 5,0 e 6,0, decaindo de maneira suave abaixo de pH 5,0, até atingir 75% do controle em pH 3,0. Entretanto, em valores de pH maiores que 6,0 e menores que 3,0, uma queda abrupta da atividade residual foi observada, atingindo cerca de 40% do controle em pH 2,5 ou 8,0. Esta faixa de estabilidade é interessante para a aplicação da enzima em processos de hidrólise de materiais lignocelulósicos, geralmente realizados em pH 4,5 a 5,0.

Figura 41. Estabilidade ao pH de BGCg-2.

A enzima purificada foi diluída em tampão McIlvaine, na faixa de pH entre 2,5 e 8,0 e mantida a 4°C por 24h. A atividade residual sobre PNP-glc foi determinada conforme descrito em Material e Métodos. O controle (100%) correspondeu a $120,3 \pm 7,8 \text{ U mg}^{-1}$.

7.4. Efeito de íons e EDTA sobre a atividade de BGCg-2

O efeito de diferentes íons e EDTA sobre a atividade PNP-glucosidásica da enzima purificada está apresentado na Tabela 64. BGCg-2 mostrou-se tolerante à presença de Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} e Na^{+} nas concentrações testadas. Em contraste, íons Pb^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} , em concentração 1 mmol L^{-1} , inibiram a atividade enzimática em 33-63%, enquanto os íons Ag^{+} e Fe^{2+} , na mesma concentração, inibiram fortemente a enzima, com atividades residuais em torno de 14%. O EDTA não apresentou efeito sobre a atividade enzimática, sugerindo que não se trata de uma metaloenzima.

A inibição por Hg^{2+} é comum a várias enzimas, incluindo muitas β -glucosidases (Peralta et al., 1990; Venturi et al., 2002; Zanoelo et al., 2004; Karnchanatat et al., 2007; Kaur et al., 2007; Bhiri et al., 2008; Yang et al., 2008; Liu et al., 2012; Meleiro et al.,

2014), sendo atribuída à presença de grupos SH essenciais para a atividade ou estabilização da estrutura da molécula. A forte inibição por Ag^+ também sugere que grupos tióis são essenciais para a atividade (Palma-Fernandes et al., 2002). O efeito de Cu^{2+} sobre a atividade das β -glucosidases fúngicas é bem variável, desde a ausência de qualquer influência (Yun et al., 2001; Saibi et al., 2007) até a inibição praticamente completa (Issam et al., 2003; Bhiri et al., 2008). Alguns estudos relatam ainda forte inibição por Ag^+ , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} e Cu^{2+} , assim como insensibilidade ao EDTA para diversas β -glucosidases fúngicas (Souza et al., 2010; Venturi et al., 2002; Zanoelo et al., 2004; Yang et al., 2008; Meleiro et al., 2014).

Tabela 64: Efeito de íons sobre a atividade da BGCg-2

Efetores	Atividade residual (%) (1 mmol L ⁻¹)	Atividade residual (%) (5 mmol L ⁻¹)
Controle	100 ± 2,1	100 ± 2,5
CaCl ₂	98 ± 1,6	87 ± 1,1
Pb(NO ₃) ₂	37 ± 0,5	0
Sr(Cl ₂)	92 ± 1,2	78 ± 1,5
HgCl ₂	37 ± 0,7	0
CoCl ₂	55 ± 0,8	12 ± 0,3
ZnCl ₂	54 ± 0,7	10 ± 0,2
NiCl ₂	67 ± 1,1	23 ± 0,4
MgCl ₂	100 ± 1,9	95 ± 1,2
AgNO ₃	14 ± 0,1	ND
FeCl ₂	13 ± 0,09	ND
NaCl	100 ± 1,8	87 ± 1,1
CuSO ₄	40 ± 0,9	11 ± 0,9
EDTA	100 ± 2,7	97 ± 1,4

A atividade foi determinada como descrito em Material e Métodos. A atividade controle (100%) foi determinada na ausência dos íons testados e correspondeu a $119,0 \pm 10 \text{ U mg}^{-1}$.

7.5. Especificidade de substrato da BGCg-2

A especificidade de substrato da BGCg-2 foi analisada empregando diferentes substratos sintéticos (PNP-glc, ONP-gal, PNP-gal, PNP-xil e salicina), além de vários substratos naturais (Tabela 65). A enzima hidrolisou todos os substratos com ligações glicosídicas em configuração β , independente da presença de glicose, indicando alta especificidade para o tipo de ligação e não para o resíduo de glicose. Entretanto, não foram hidrolisados substratos poliméricos, mesmo apresentando monômeros de glicose ligados entre si por ligações glicosídicas em configuração β , como CMC e Avicel. Propriedades similares foram descritas para outras β -glucosidases fúngicas (Wright et al., 1992; Perez-Ponset al., 1995; Zanoelo et al., 2004; Nascimento et al., 2010; Souza et al., 2010; Uchima et al., 2011; Jabbour et al., 2012; Pei et al., 2012; Uchiyama et al., 2013).

Tabela 65: Especificidade ao substrato da BGCg-2

Substrato	Atividade (%)	Tipo de ligação
PNP-glc	100 $\pm$ 2,9	Glicose β -1
Celobiose	26,7 $\pm$ 0,1	Glicose β -1,4
PNP-gal	8,9 $\pm$ 0,05	Galactose β -1
ONP-gal	2,5 $\pm$ 0,02	Galactose β -1
PNP-xil	0,5 $\pm$ 0,002	Xilose β -1
Salicina	11,1 $\pm$ 0,7	Glicose β -1
Lactose	2,5 $\pm$ 0,03	Galactose β -1,4
CMC	ND	Glicose β -1,4
Avicel	ND	Glicose β -1,4
Maltose	ND	Glicose α -1,4
Trealose	ND	Glicose α -1,1
Sacarose	ND	Glicose α -1,2

A atividade foi determinada a 65°C conforme descrito em Material e Métodos. A hidrólise dos substratos, em concentração final 5 mmol.L⁻¹ foi acompanhada por até 2 horas. O controle (100%) correspondeu a 129,8 $\pm$ 9,8 U mg⁻¹.

ND: não detectável nas condições de medida.

7.6. Determinação dos parâmetros cinéticos para a hidrólise de diferentes substratos por BGCg-2

A enzima foi capaz de hidrolisar uma grande variedade de substratos: PNP-glc, celobiose, PNP-xil, PNP-gal, ONP-gal, salicina e lactose. Visando o emprego da enzima em processos de hidrólise da celulose, o estudo cinético foi limitado ao substrato natural celobiose, e ao substrato sintético PNP-glc. Curvas simples de saturação foram observadas para a estimulação da atividade de BGCg-2 por PNP-glc e celobiose (Figuras 42 e 43). Os parâmetros cinéticos determinados para a hidrólise de PNP-glc foram $V = 113,40 \pm 5,91 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 1,06 \pm 0,51 \text{ mmol L}^{-1}$, e a estimulação ocorreu segundo cinética Michaeliana. Para o substrato natural celobiose, a atividade máxima atingiu $48,51 \pm 1,93 \text{ U mg}^{-1}$ e a estimulação ocorreu com cooperatividade positiva ($n_H = 1,63$), com um valor de $K_{0,5} = 6,18 \pm 0,8 \text{ mmol L}^{-1}$.

Figura 42. Estimulação da atividade de BGCg-2 por PNP-glc.

A atividade foi determinada a 65°C em tampão acetato de sódio, pH 5,0, e a reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, conforme descrito em Material e Métodos.

Figura 43. Estimulação da atividade da BGCg-2 por celobiose.

A atividade foi determinada a 65°C, em tampão acetato de sódio, pH 5,0, e a reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, conforme descrito em Material e Métodos.

A análise dos parâmetros cinéticos determinados mostra que BGCg-2 hidrolisou o PNP-glc com uma atividade específica ($113,40 \pm 5,91 \text{ U mg}^{-1}$) cerca de 2,4 vezes maior que aquela estimada para a hidrólise da celobiose ($48,51 \pm 1,93 \text{ U mg}^{-1}$). Além disso, a afinidade aparente da enzima por PNP-glc ($1,06 \pm 0,51 \text{ mmol.L}^{-1}$) foi cerca de 5,8 vezes maior que a estimada para a celobiose ($6,18 \pm 0,8 \text{ mmol L}^{-1}$).

A eficiência de utilização dos substratos, avaliada pela razão $k_{\text{cat}} / K_{\text{M}}$, mostrou que o PNP-glc ($k_{\text{cat}} / K_{\text{M}} = 106,98 \text{ L.mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) é um melhor substrato para BGCg-2, comparado à celobiose ($k_{\text{cat}} / K_{\text{M}} = 7,84 \text{ L.mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Similarmente aos nossos resultados, a maioria das β -glucosidases fúngicas conhecidas apresentam maior

afinidade aparente por PNP-glc quando comparado à celobiose, além de maior eficiência catalítica para a hidrólise do substrato sintético (Teugjas & Våljamäe, 2013).

7.7. Efeito de carboidratos sobre a atividade de BGCg-2

O efeito de diversos carboidratos, em concentração final 50 mmol L⁻¹ no meio reacional, sobre a atividade PNP-glucosidásica de BGCg-2 está apresentado na Tabela 66.

Tabela 66: Efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade de BGCg-2

Carboidrato (50 mmol L ⁻¹)	Atividade residual (%)
Glicose	44 ± 2,3
Xilose	128 ± 6,3
Manose	107 ± 7,9
Frutose	97 ± 8,7
Ribose	94 ± 6,9
Galactose	109 ± 6,2
Lactose	68 ± 4,9
L-Sorbose	93 ± 6,9
L-Arabinose	106 ± 5,1
Maltose	65 ± 4,3
Sacarose	100 ± 8,2

A atividade foi determinada como descrito em Material e Métodos, A atividade controle (100%) foi determinada em ausência de carboidratos livres e correspondeu a 117,3 ± 8,5 U mg⁻¹

A atividade da enzima mostrou-se insensível à maioria dos carboidratos testados, ocorrendo uma inibição parcial por glicose (56%), lactose (32%) e maltose (35%), Possivelmente, a inibição pelos dissacarídeos, que apresentam glicose em sua composição se deve a uma possível competição com o substrato pela ligação ao sítio ativo. Similarmente aos nossos resultados, as β -glucosidases de *S. thermophile* e *H. insolens* foram inibidas por maltose (Bhat et al., 1993; Souza et al., 2010).

Curiosamente, a atividade de BGCg-2 foi estimulada em cerca de 28% por xilose em concentração 50 mmol.L⁻¹.

Considerando o atual interesse no emprego de coquetéis enzimáticos contendo simultaneamente celulases e hemicelulases para a hidrólise de resíduos lignocelulósicos (Hu et al., 2011; Qing et al., 2010, Gao et al., 2011), esta pode ser uma propriedade bastante interessante de BGCg-2 visando a uma aplicação na sacarificação de resíduos agroindustriais.

7.8. Análise cinética do efeito de xilose e glicose sobre a atividade de BGCg-2

O efeito de concentrações crescentes de glicose sobre a atividade PNP-glucosidásica de BGCg-2 está apresentado na Figura 44. A enzima manteve cerca de 50% de sua atividade inicial em presença de glicose em concentração 20 mmol L⁻¹. Entretanto, acima de 100 mmol L⁻¹ a atividade atingiu valores desprezíveis, comparados ao controle. A análise da inibição empregando o gráfico dos duplos recíprocos (Lineweaver e Burk, 1934) revelou seu caráter competitivo (Fig. 45), com um valor de K_i estimado em 5,49 mmol L⁻¹ (inserção da Fig 45).

Figura 44. Inibição da atividade PNP-glucosidásica de BGCg-2 por glicose

A atividade foi determinada a 65 °C, em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0, contendo PNP-glc 2 mmol L⁻¹ e glicose em diferentes concentrações, como descrito em Material e Métodos.

Figura 45. Gráfico duplo recíproco para a inibição da atividade PNP-glucosidásica de BGCg-2 por glicose

O efeito da concentração de PNP-glc (0,01 – 2,5 mmol L⁻¹) sobre a atividade enzimática foi avaliado em presença de diferentes concentrações fixas de glicose. A atividade foi determinada a 65°C, em tampão acetato 50 mmol.L⁻¹, pH 5,0, em um volume final de 0,6 mL. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, como descrito em Material e Métodos. Concentrações de glicose: (●) 0 mmol L⁻¹, (■) 15,0 mmol L⁻¹; (○) 25,0 mmol L⁻¹ e (▼) 40 mmol L⁻¹. **Inserção:** Gráfico secundário para estimativa do K_I para a glicose.

Com poucas exceções, a inibição das β-glucosidases por glicose é comum (Zanoelo et al., 2004; Souza et al., 2010; Souza et al., 2013; Teugas & Våljamäe, 2013)

e representa um dos maiores entraves a uma sacarificação eficiente da celulose (Bhat et al., 1993; Kaur et al., 2007; Bathia et al., 2002; Lynd et al., 2002; Yang et al., 2008; Kaur et al., 2007; Karnchanatat et al., 2007; Bhirit et al., 2008; Bohlin et al., 2010; Sørensen et al., 2013).

O efeito de xilose sobre a atividade de BGCg-2 está apresentado na Figura 46. Concentrações crescentes do monossacarídeo até 300 mmol L⁻¹ estimularam a atividade até 163,3 U mg⁻¹, um valor cerca de 60% acima do controle. Acima desta concentração, a atividade enzimática diminuiu gradativamente, atingindo um valor próximo do controle em presença de xilose 600 mmol L⁻¹, chegando a cerca de 10% do controle em presença de xilose 1 mol L⁻¹.

Figura 46. Estimulação da atividade PNP-glucosidásica de BGCg-2 por xilose

A atividade foi determinada a 65 °C, em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0, contendo PNP-glc 2 mmol L⁻¹ e xilose em diferentes concentrações, como descrito em Material e Métodos.

A xilose estimulou a atividade das β-glucosidases produzidas por *H. insolens* (Souza et al., 2010; Souza et al., 2013), *H. grisea* var. *thermoidea* (Nascimento et al., 2010), *S. thermophilum* (Zanoelo et al., 2004) em cerca de 100%, em concentrações de 40 a 100 mmol L⁻¹, e um valor próximo do controle foi atingido em presença de xilose

500 mmol L⁻¹. Uma estimulação da atividade de cerca de 70% na presença de xilose 200 mmol L⁻¹ também foi descrita para as β -glucosidases produzidas por *H. brevis* (Masui et al., 2010), e um valor próximo do controle foi atingido em presença de xilose 700 mmol L⁻¹. Por outro lado, a presença de xilose inibiu a atividade da β -glucosidase produzida por *Sporotrichum thermophile*, em concentração 10 mmol L⁻¹ (Bhat et al., 1993). Considerando o atual interesse no emprego de coquetéis enzimáticos para a hidrólise de resíduos lignocelulósicos e produção de etanol celulósico, a estimulação da atividade β -glucosidásica por este monossacarídeo é uma propriedade bastante interessante (Hu et al., 2011; Qing et al., 2010; Gao et al., 2011).

8. Referências

Acosta-Rodrigues, I.; Piñón-Escobedo, C.; Zavala-Páramo, Ma. G.; López-Romero, E.; Cano-Camacho, H. (2005). Degradation of cellulose by the bean-pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Production of extracellular cellulolytic enzymes by cellulose induction. *Antonie van Leeuwenhoek*, **87**: 301-310.

Adsul, M.G.; Singhvi, M.S.; Gaikawari, S.A.; Gokhale, D.V. (2011). Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* **102**: 4304-4312.

Alves, G. T.; Fontes, S. M.; Ulhoa, J. C. (2007). Studies on the *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 laccase purified by hydrophobic interaction chromatography. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**: 311–318.

Amouri, B.; Gargouri, A. (2006). Characterization of a novel β -glucosidase from a *Stachybotrys* strain. *Biochem. Eng. J.* **32**: 191-197.

Arabi, M.I.; Bakri, Y.; Jawhar, M. (2011). Extracellular xylanase production by *Fusarium* species in solid state fermentation. *Pol. J. Microbiol.* **60**: 209-12.

Arora, D.S.; Sharma, R.K. (2010). Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochem. Biotechnol.* **160**: 1760-1788.

Atalla, M.; Zeinab, H.K.; Eman, R.H.; Amani, A.Y.; Abeer, A.A.E.A.; Saudi, A. (2013). Characterization and kinetic properties of the purified *Trematosphaeria mangrovei* laccase enzyme. *J. Biol. Sci.* **20**: 373–381.

Bajpai P (2004). Biological bleaching of chemical pulps. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2**: 1-58.

Baldrian, P.; Gabriel, J.; (2003). Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in presence of cadmium. *FEMS Microbiol. Lett.* **220**: 235-240.

- Baldrian, P.; Valášková, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 501-521.
- Barnett, H. L.; Hunter, B. B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 4nd ed.; APS Press: St. Paul, MN, USA, 1998.
- Belancic, A.; Scarpa, J.; Peirano, A.; Diaz, R.; Steiner, J.; Eyzaguirre, J. (1995). *Penicillium purpurogenum* produces several xylanase purification and properties of two of the enzymes. *J. Biotechnol.* **41**: 71–79.
- Belancic, A.; Gunata, Z.; Vallier, M.J.; Agosin, E. (2003). β -Glucosidase from the Grape Native Yeast *Debaryomyces vanriijiae* : Purification, Characterization, and Its Effect on Monoterpene Content of a Muscat Grape Juice. *J. Agr. Food Chem.* **51**: 1453-1459.
- Bergmeyer, H.U.; Bernt, E. In: Bergmeyer, H.U. editor. *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie-Academic Press; New York, 1974, Vol. **3** pp. 1205-1215.
- Betini, J.H.; Michelin, M.; Peixoto-Nogueira, S.C.; Jorge, J.A.; Terenzi, H.F.; Polizeli M.L. (2009). Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **32**: 819-24.
- Biely, P.; Vrsanska, M.; Tenkanen, M.; Kluepfel, D. (1997). Endo- β -1,4 xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.* **57**:151–166.
- Biely, P.; Kratky, Z.; Vrsanska, M.; Urmanicova, D. (1980). Induction and inducers of endo-1,4-L-xylanase in the yeast *Cryptococcus albidus*. *Eur. J. Biochem.* **108**: 323-329.
- Bhiri, F.; Chaabouni, S.E.; Limam, F.; Ghrir, R.; Marzouki, N.; (2008). Purification and biochemical characterization of extracellular β -glucosidases from the

hypercellulolytic Pol6 mutant of *Penicillium occitanis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **149**: 169-182.

Bhalla, A.; Bansal, N.; Kumar, S.; Bischoff, K.; Sani, R.K. (2013). Improved lignocelluloses conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresour. Technol.* **128**: 751-759.

Bhat, M.K.; Gaikwad, J.S.; Maheshwari, R. (1993). Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile* and its influence on cellulase activity. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2825-2832.

Bhat, M.K.; Bhat, S. (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial application. *Biotechnol. Adv.* **15**: 583-620.

Bhatia Y, Mishra S, Bisaria VS (2002). Microbial beta-glucosidases: cloning, properties, and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **22**: 375-407.

Bhiri, F.; Chaaabouni, S.E.; Liman, F.; Ghrir, R.; Marzouki, N. (2008). Purification and biochemical characterization of extracellular beta-glucosidases from the hypercellulolytic Pol6 mutant of *Penicillium occitanis*. *Appl Biochem Biotechnol.* **149**:169-82.

Bohlin, C.; Olsen, S.N.; Morant, M.D.; Patkar, S.; Borch, K.; Westh, P. (2010). A Comparative Study of Activity and Apparent Inhibition of Fungal beta-Glucosidases. *Biotechnol Bioeng.* **107**: 943–952.

Box, G.E.P.; Wilson, K.B. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal Roy. Statist. Soc. Ser. B-Metho.* **13**: 1-45.

Burton, R.; Gidley, M.J.; Fincher, G.B. (2010). Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology* **6**: 724-734.

- Camassola, M.; Dillon, A.J. (2010). Cellulases and xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown on sugar cane bagasse in solid-state fermentation. *Appl Biochem Biotechnol.* **162**: 1889-1900.
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2007). Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **103**: 2196–2204.
- Camerom, R.G.; Baker, R.A.; Grohmann, K. (2001). Purification and characterization of β -glucosidase from *Citrus sinensis* var. Valencia fruit tissue. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 4457-4462.
- Cantarel, B.L.; Coutinho, P.M.; Rancurel, C.; Bernard T.; Lombard, V.; Henrissat B. (2009). The carbohydrate-active enzymes databases (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37** (database issue).
- Chandel, A.K.; Silva, S.S.; Carvalho, W.; Singh, O.V. (2012). Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **87**, 11-20.
- Chen, X.; Ishida, N.; Tokada, N.; Nakamura, R.; Maruyama, J.; Takahashi, H.; Kitamoto, K. (2010). Promotion of Efficient Saccharification of Crystalline Cellulose by *Aspergillus fumigatus* Swol. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 2556-2561, 2010.
- Claus, H. (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron.* **35**: 93-96
- Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G. (2004). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev.* **29**: 3-23.
- Crepin, V.F.; Fauld, C.B.; Connerton I.F. (2004). Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 647-652.

- Dashtban, M.; Maki, M.; Leung, K.T.; Mao, C.; Qin, W. (2010). Cellulases activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Crit. Rev. Biotechnol.* **4**: 1-8.
- Davis, B.J. (1964). Disc electrophoresis - II Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**:404-427.
- De Almeida, E.M.M.; De Lourdes Polizeli, T.M.M.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A. (1995). Purification and biochemical characterization of b-xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *FEMS Microbiol. Lett.* **130**: 171–175.
- De Almeida Siqueira, E.M.; Mizuta, K.; Giglio, J.R. (1997). *Pycnoporus sanguineus*: a novel source of α -amylase. *Mycol. Res.* **2**:188–190.
- Delabona, P.S.; Pirola, R.D.P.B.; Codima, C.A.; Tremacoldic, C.R.; Rodrigues, A.; Farinas, C.S. (2013). Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading production characterization. *Ind. Crops. Prod.* **42**: 236-242.
- Dhillon, G.S.; Oberoi, H.S.; Kaur, S.; Bansal, S.; Brar, S.K. (2011). Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Ind. Crop Prod.* **34**: 1160.
- Dogaris, I.; Vakontios, G.; Kalogeris, E.; Mamma, D.; Kekos, D. (2009). Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. *Ind. Crop. Prod.* **29**: 404–411.
- Dubrovskaya, Y.V.; Sova, V.V.; Slinkina, N.N.; Anastyuk, S.D.; Pivkin, M.V.; Zvyagintseva, T.N. (2011). Extracellular β -glucosidase of the *Penicillium canescens* Marine Fungus. *Appl. Biochem. Microbiol.* **48**: 401-408.

- Duran, N.; Esposito, E. (2009). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis Environ.* **28**: 83-99.
- Durand, A. (2003). Bioreactores desings for solid state fermentation. *Biochem Eng. J.* **13**: 113-125.
- Eneyskaya, E.V.; Ivanen, D.R.; Bobrov, K.S.; Isaeva-Ivanova, L.S.; Shabalin, K.A.; Savel'ev, A.N.; Golubev, A.M.; Kulminskaya, A. A. (2007). Biochemical and kinetic analysis of the GH3 family β -xylosidase from *Aspergillus awamori* X-100. *Arch. Biochem. Biophys.* **457**: 225-234.
- Enguita, F. J.; Martins, L. O.; Henriques, A. O.; Carrondo, M. A. (2003). Crystal structure of a bacterial endospore coat component: A laccase with enhanced thermostability properties. *J. Biol. Chem.* **278**: 19416–19425.
- Falkoski, D. L.; Guimarães, V. M.; Almeida, M .N. ; Acelino Couto Alfenas, A. C.; Jorge Luiz Colodette, J. L.; Rezende, S. R. (2012). Characterization of Cellulolytic Extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and Its Application in Biomass Saccharification. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**:1586–1603.
- Farinas, C.S.; Loyo, M.M.; Baraldo Jr. A.; Tardioli, P.W.; Bertucci Neto, V.; Couri, S. (2010). Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. *New Biotechnol.* **27**: 810-815.
- Fengel, D.; Wegener, G. (1989). Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Ed. Gruyter. Berlin. New York, USA.
- Gao, J.; Weng, H.; Xi, Y.; Zhu, D.; Han, S. (2008). Purification and characterization of a novel endo- β -1,4-glucanase from the thermoacidophilic *Aspergillus terreus*. *Biotechnol. Lett.* **30**: 323–327.

Gao, D.; Uppugundla, N.; Chundawat, S.P.; Yu, X.; Hermanson, S.; Gowda, K., Brumm, P., Mead, D., Balan, V., Dale, B.E. (2011). Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. *Biotechnol. Biofuels*, **4**:1-11.

Gueguen, Y.; Chemardin, P.; Arnaud, A.; Galzy, P. (1995). Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Botrytis cinerea*. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 900–906.

Gerardi, C.; Blando, F.; Santino, A.; Zacheo, G. (2001). Purification and characterization of β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium*) fruit. *Plant. Sci.* **160**: 795-805.

Giardina, P.; Faraco, V.; Pezzella, C.; Piscitelli, S. V.; Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Sife Sci.* **67**: 369-385.

Girio, F.M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L.C.; Marques, S.; Boge l-Lucasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol a review. *Bioresour. Technol.* **101**: 4775-4800 .

Gochev, V.K.; Krastanov, A.I. (2007). Fungal laccases. *Bulgarian Journal of Agricultural Science.* **13**: 75 – 83.

Gueguen, Y.; Chemardin, P.; Arnaudm, A. (1995). Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Botrytis cinerea*. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 900–906.

Guimaraes, L.H.S.; Nogueira, P.S.; Michelin, M.; Rizzatti, A.C.S.; Sandrim, V.C.; Zanoela, .F.F.; Aquino, A.C.M.M.; Junior, A.B.; Polizeli, M.L.T.M. (2006). Screening of filamentous fungi for production production of enzymes of biotechnological interest. Brazil. *J. Microbiol.* **37**: 474–480.

- Guimarães, N.C.A.; Sorgatto, M.; Peixoto-Nogueira, S.C.; Betini, J.H.A.; Zanoelo, F.F.; Marques, M.R.; Polizeli, M.L.T.; Giannesi, G. (2013). Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substract. *Springer Plus* **2**: 380.
- Gusakov, A.V.; Salanovich, T.N.; Antonov, A.I.; Ustinov, B.B.; Okunev, O.N. Burlingame, R.; Emalfarb, M.; Baez, M.; Sinitsyni, A.P. (2007). Design of Highly Efficient Cellulase Mixtures for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* **7**:1028-1038.
- Haaland, P.D. (1989). Biotechnology experimental design experiments statistical methods and graphic . *Methods.* **105**: 259.
- Harris, D.; De Bolt, S. (2010). Synthesis regulation and utilization of lignocellulosic biomass. *Plant Biotech J.* **8**: 244–262.
- Harris, P.V.; Welner, D.; McFarland, K.C.; Navarro, R.E.; Poulsen, J.C. (2010). Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61 structure and function of a large enigmatic family. *Biochemistry.* **49**: 3305-3316.
- Hasunuma, T.; Okazaki, F.; Okai, N.; Hara, K.Y.; Ishii, J.; Kondo, A. (2013). A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresour. Technol.* **47**: 1287-1294.
- Hasunuma, T.; Kondo, A. (2012). Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. *Biotechnol Adv.* **30**:1207-18.
- Hays, W. S.; VanderJagt, D. J.; Bose, B.; Serianni, A.S.; Glew, R.H. (1998). Catalytic mechanism and specificity for hydrolysis and transglycosylation reactions of cytosolic β -glucosidase from guinea pig liver. *J. Biol. Chem.* **273**: 34941-34948.

Henrissat B.; Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**: 695-696.

Henrissat, B.; Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**: 637–644.

Herpoel, I.; Moukha, S.; Lesage-Meessen, L.; Sigoillot, J.C.; Asther, M. (2000). Selection of *Picnoporus cinnabarinus* for laccase production. *FEMS Microbiol Lett.* **183**: 301-306.

Hölker U.; Höfer, M.; Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 175–186.

Hoh, Y.; Yeoh, H.H.; Tan, T.K. (1992). Properties of Beta-Glucosidase Purified from *Aspergillus Niger* mutants USDB-0827 and USDB-0828. *Appl Microiol Biot.* **37**: 590-593.

Hu, J.; Arantes, V.; Saddler, J.N. (2011). The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: Is it an additive or synergistic effect. *Biotechnol. Biofuels* **36**:2–36.

Issam, S.M.; Mohamed, G.; Farid, L.; Sami, F.; Thierry, M.; Dominique, L.M.; Nejib, M. (2003). Production, purification, and biochemical characterization of two β -glucosidases from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl Biochem Biotech.* **111**: 29-39.

Ito, T.; Yokoyama, E.; Sato, H.; Ujita, M.; Funuguma, T.; Furukawa, K.; Hara, A. (2003). Xylosidases associated with the cell surface of *Penicillium herquei* IFO 4674. *J. Biosci. Bioeng.* **96**: 354-359.

Iyer, G.; Chattoo, B.B. (2003). Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus *magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiology Letters.* **227**: 121-126.

- Jabbour, D.; Klippel, B.; Antranikian, G. (2012). A novel thermostable and glucose-tolerant β -glucosidase from *Fervido bacterium islandicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **93**: 1947-1956.
- Jäger, S.; Brumbauer, A.; Fehér, E.; Réczey, K.; Kiss, L. (2001). Production and characterization of β -glucosidases from different *Aspergillus* strains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 455-461.
- Janusz, G.; Kucharzyk, K.H.; Pawlik, A.; Staszczak, M. (2013). Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme Microb. Technol.* **52**: 1-12.
- Jardine, J.G.; Peres, M.R. (2009). Considerações sobre o bioetanol lignocelulósico para subsidiar a elaboração de conteúdo da Árvore de Conhecimento Agroenergia. Embrapa Informática Agropecuária, **95**.
- Jahromi, M.F.; Liang, J.B.; Rosfarizan, M.; Goh, Y.M.; Shokryazdan, P.; Ho, Y.W. (2011). Efficiency of rice straw lignocelluloses degradability by *Aspergillus terreus* ATCC 74135 in solid state fermentation. *Afr. J. Biotechnol.* **10**: 4428–4435.
- Jatinder, K.; Chadha, B.S.; Saini, H.S. (2006). Regulation of cellulase production in two thermophilic fungi *Melanocarpus* sp. MTCC 3922 and *Scytalidium thermophilum* MTCC 4520. *Enzyme Microb. Technol.* **38**: 931–936.
- Juturu, V.; Wu, J.C. (2012). Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. *Biotechnol Adv.* **30**:1219-27.
- Kalogeris, E.; Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Macris, B.J. (1998). Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isozymes. *J. Biotechnol.* **60**: 155–163.
- Kamiyama, J.; Yasui, Y.T. (1995). Purification and some properties of *Aspergillus pulverlentus* β – xylosidase with transxylosylation capacity. *J. Ferment Bioeng.* **79**: 17–22.

Kang, S.W.; Park, Y.S.; Lee, J.S.; Hong, S.I.; Kim, S.W. (2004). Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* **91**: 153–156.

Kar, S.; Gauri, S.S.; Das, A.; Maity, A.J.C.; Mandal., A.; Mohapatra, P.K.D.; Pati, B.R. (2012). Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **36**: 57-58.

Karnchanatat, A.; Petsom, A., Sangvanich, P. Piaphukiew, J.; Whalley, A.J.; Reynolds, C.D.; Sihanonth, P. (2007). Purification and biochemical characterization of an extracellular beta-glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.: Fr.) Rehm. *FEMS Microbiol. Lett.* **270**: 162-170.

Kaur, J.; Chadha, B.S.; Kumar, B.A.; Kaur, G.S. (2007). *Electron. J. Biotechnol.* **10**: 260–270.

Kheng, P.; Ibrahim, C.O. (2005). Xylanase production by a local fungal isolate *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate Song klanakaran. *J. Sci. Technol.* **27**: 325-336.

Krishnan, C.; Sousa, L.C.; Jin, M.; Chang, L.; Dale, B.E.; Balan, V. (2010) Alkali-Based AFEX Pretreatment for the Conversion of Sugarcane Bagasse and Cane Leaf residues to Ethanol. *Biotechnol. Bioeng.*, **107**, 441-450.

King, B.C. (2011). Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. *Biotechnol. Biofuels.* **4**: 4.

Kitamoto, N.; Yoshino, S.; Ohmiya, K.; Tsukagoshi, N. (1999). Purification and characterization of overexpressed *Aspergillus oryzae* xylanase XynF1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 1791–1794.

- Knob, A.; Carmona, E.C. (2010). Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: anovel acidophilic xylanase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **162**: 429–443.
- Knob, A.; Beitel., S.M.; Fortkamp, D.; Terrasan, C.R.F.; Almeida, A.F. (2013). Production, Purification, and Characterization of a Major *Penicillium glabrum* Xylanase Using Brewer's Spent Grain as Substrate. *BioMed Research International* **2013**:1-8.
- Kondo, T.; Nojiri, M. (1996). Application of region selective substituted methylcelluloses to characterize the reaction mechanism of cellulose. *Macromolecules.* **29**: 239-2395.
- Korotkova, O.G.; Semenova, M.V.; Morozova, V.V.; Zorov, I.N.; Sokolova, L.M.; Bubnova, T.M.; Okunev, O.N.; Sinitsyn, A.P. (2009). Isolation and properties of fungal beta-glucosidases. *Biochemistry (Mosc).* **74**: 569–577.
- Kuhad, R.C.; Mehta, G.; Gupta, R.; Sharma, K.K. (2010). *Biomass and Bioenergy.* **34**: 1189–1194.
- Kumar, S.; Ramo'n, D. (1996). Purification and regulation of the synthesis of a b-xylosidase from *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**: 287–293.
- Kumar, J.A.; Sing, B.; Peter, C. (2003). Biomass power cost and optimum plant size in western. *Biomass Bioenerg.* **24**: 445 – 464.
- Kumar, R.; Singh, S.; Singh, O.V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 377-391.
- Kumar, A.; Gupta, R.; Shrivastava, B.; Khasa, Y.P.; Kuhad, R.C. (2012). Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. *J. Mol. Catal. Enzym. B.* **74**: 170–177.

Kuhad, R.C.; Mehta, G.; Gupta, R.; Sharma, K.K. (2010). *Biomass Bioenerg.* **34**: 1189–1194.

Kwon, K.S.; Lee, J.; Kang, H.G.; Hah, Y.C. (1994). Detection of β -glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. *Appl Environ Microbiol.* **60**: 4584–4586.

Leite, R.S.R.; Alves-Prado, H.F.; Cabral, H.; Pagnocca, F.C.; Gomes, E.; Da Silva, R. (2008). Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme Microb. Technol.* **43**: 391–395.

Leite, R.S.R.; Gomes, E.; da Silva, R. (2007). Characterization and comparison of thermostability of purified β -glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process. Biochem.* **42**:1101–1106.

Leite R.S.R.; Alves-Prado, H.F.; Cabral, H.; Pagnocca, F.C.; Gomes, E.; Da Silva, R. (2008). Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme Microb. Technol.* **43**:391–395.

Leone, F.A.; Baranauskas, J.Á.; Furriel, R.P.M.; Borin, I.A. (2005). SigrafW: an easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **33**: 399–403.

Leonowicz, A.; Matuszewska, A.; Luterek, J.; Ziegenhagen, D.; Wojtas–Wasilewska, M.; Cho, N.S.; Hofrichter, M.; Rogalski, J. (1999a). Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Gen. Biol.* **27**: 175–185.

Leonowicz, A.; Matuszewska, A.; Luterek, J.; Ziegenhagen, D.; Wojtas–Wasilewska, M.; Malarczyk, E.; Ginalska, G.; Fink–Boots, M.; Cho, N.S. (1999b). Cooperation of fungal laccase and glucose 1 oxidase in transformation of Björkman lignin and some phenolic compounds. *Fungal Gen. Biol.* **53**: 376–380.

- Lenartovicz, V.; De Souza, C.G.M.; Moreira, F.G.; Peralta, R.M. (2003). Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable β -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochem.* **38**: 1775-1780.
- Levin, L.; Ramos, A.M.; Parisi, M.; Gally, M. (2007). Screening of *Colletotrichum* (Ascomycota) isolates, causal agents of soybean Anthracnose for laccase production. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica.* **42**: 71-77.
- Li, Y.K.; Yao, H.J.; Cho, Y.T. (2002). Effective induction, purification and characterization of *Trichoderma koningii* G-39 β -xylosidase with high transferase activity. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**: 119-125.
- Lynd, L.R.; Weimer, P.J. van Zyl WH, Pretorius IS (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 506-77.
- Litthauer, D.; Vuuren, M.J.; Tonder, A.; Wolfaardt, F.W. (2007). Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). *Enzyme Microb. Technol.* **40**: 563 – 568.
- Li, Y.; Z. Liu.; Cui, F.; Zhao, Y.X.H. (2007). Production of xylanase from a newly isolated *Penicillium* sp. ZH-30. *World J. Microbiol Biotechnol.* **23**: 837–843.
- Li, X.; Zhao, J.; Shi, P.; Yang, P.; Wang, Y.; Luo, H.; B, Yao, B..(2013). Molecular cloning and expression of a novel β -glucosidase gene from *Phialophora* sp. G5. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **169**: 941-949.
- Lomascolo, A.; Uzan-Boukhris, E.; Herpoël-Gimbert, I.; Sigoillot, J.; Lesage-Meessen, C. (2011). Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **92**:1129–1149.

- Lu, L.T.; Tian, H.M.; Cheng, Y.Q.; Jiang, Z.Q.; Yang, S.Q. (2006). Purification and characterization of a thermostable cellulose free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces thermophila* J18. *Enzyme Microbiol. Technol.* **38**: 780–787.
- Lu, L.; Zhao, M.; Zhang, B.B.; Yu S.Y.; Bian, X. J.; Wang, W.; Wang, Y. (2007). Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 1232–1239.
- Lusis AJ, Becher RR (1973). The β -glucosidase system of the thermophilic fungus *Chaetomium thermophile* var. *coprophile*. *Biochim. Biophys. Acta* **329**: 5-16.
- Ma, S.J.; Leng, B.; Xu, X.Q.; Zhu, X.Z.; Shi, Y.; Tao, Y.M. (2011). *Afr. J. Biotechnol.* **10**: 19607–19614.
- Mamma, D.; Kourtoglou, E.; Christakopoulos, P. (2008). Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresour. Technol.* **99**: 2373–2383.
- Mantovani, T.R.A., Meirelles, L.D.P.; Valle, J.S.; Linde, G.A.; Colauto, N.B. (2012). Substratum formulation for laccase and mycelial biomass production of *Pleurotus ostreatus*. *Semina: Ciências Agrárias* **33**: 1681-1692.
- Margeot, A.; Hahn Hagerdal, B.; Edlund, M.; Slade, R.; Monot, F. (2009). New Improvements for Lignocellulosic Ethanol. *Current Opinion in Biotechnology.* **20**: 372–380.
- Masui, D.C.; Zimbardi, A.L.R.L.; Souza, F.H.M.; Guimarães, L.H.S.; Furriel, R.P.M.; Jorge, J.A. (2012). Production of a xylose-stimulated β -glucosidase and a cellulase-free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var *thermoidea* under solid state fermentation. *World J. Microbiol Biotechnol.* **28**: 2689–2701.

- Mathur, G.A.; Sharma, B.M.; Chauhan, R.S. (2013). Enhanced production of laccase from *Coriolus* sp. using PlacketteBurman design. *Journal of pharmacy*. **6**: 151-154.
- Matsuo, M.; Fujie, A.; Win, M.; Yasui, T. (1987). Four types of β -xylosidases from *Penicillium wortmanni* IFO 7237. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2367-2379.
- Mayer, A.M.; Staples, R.C. (2002). Laccase new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. **60**: 551-565.
- McIlvaine, T.C. (1921). A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* **49**: 183-186.
- Meleiro, L.P.; Zimbardi, A.L.R.L.; Souza, F.H.M.; Masui, D.C.; Silva, T.M.; Jorge, J.A.; Furriel, R.P.M. (2014). A novel β -glucosidase from *Humicola insolens* with High Potential for Untreated Waste Paper Conversion to Sugars. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **173**: 391-408.
- Meyer HP, Canevascini G (1981). Separation and some properties of two intracellular β -glucosidases of *Sporotrichum thermophile*. *Appl Envirom Microbiol* **41**: 924-931.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- More, S.S.; Renuka P.S.; Pruthvi K.; Swetha, M.; Malini, S.; Veena, S. (2011). Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus* sp.M.2 *Enzyme Research*. **2011**.1-7.
- Nair, S.G.; Sindhu, R.; Shashidhar, S. (2008). Purification and biochemical characterization of two xylanases from *Aspergillus sydowii* SBS 45. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **149**: 229–243.

Nascimento C.V.; Souza, F.H.M.; Masui, D.C.; Leone F.A.; Peralta, R.M.; Jorge, J.A.; Furriel, R.P.M. (2010). Purification and biochemical properties of a glucose-stimulated β -D-glucosidase produced by *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. *J. Microbiol.* **48**: 53-62

O'Connell, R.J.; Thon, M.R.; Hacquard, S.; Amyotte, S.G.; Kleemann, J.; Torres, M.F.; Damm, U.; Buiate, E.A.; Epstein, L.; Alkan, N.; Altmüller, J.; Alvarado-Balderrama, L.; Bauser, C.A.; Becker, C.; Birren, B.W.; Chen, Z.; Choi, J.; Crouch, A.A.; Duvick, J.P.; Farman, M.A.; Gan, P.; Heiman, Henrissat, B.; Howard, R.; Kabbage, M.; Koch, C.; Kracher, B.; Kubo, Y.; D Law, A.; Lebrun, M.; Lee, Y.; Miyara, I.; Moore, N.; Neumann, U.; Nordström, K.; Panaccione, D.; Ralph, P.; Place, M.; Proctor, R. H.; Prusky, D.; Rech, G.; Reinhardt, R.; Rollins, J.A.; Rounsley, S.; Schardl, C. L.; Schwartz, D.C.; Shenoy, N.; Shirasu, K.; Sikhakolli, U.R.; Stüber, K.; Sukno, S.A.; Sweigard, J.A.; Takano, Y.; Takahara, H.; Trail, F.; Does, H.; M, L. Voll, Will, I.; Young, S.; Zeng, Q.; Zhang, J.; Zhou, S.; Dickman, M.B.; Schulze-Lefert, P.; Themaat, E.V.L.; Ma, L.; Young, L.J.V.S.; Zeng, Q.; Jingze Zhang, J.; Zhou, S.; Dickman, M.B; Lefert, P.S.; Themaat, E.V.L. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics* **44**: 1060-1067.

Ogeda, T.L.; Petri, D.F.S. (2010). Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova*. 7: 1549-1558.

Ogel, Z.B.; Yarangumeli, K.; Dundar, H.; Ifrij, I. (2001). Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanase production. *Enzyme Microb. Technol.* **28**: 689-695.

Ohtakara, A. (1988). Chitinase and β -N-Acetylhexosaminidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Methods Enzymol.* **161**:462–470

Paavilainen, S.; Hellman, J.; Korpela, T. (1993). Purification, characterization, gene cloning and sequencing of a new β -glucosidase from *Bacillus circulans* subsp. *Alkalophilus*. *Appl Environ Microbiol.* **59**: 927-932.

- Paës, G.; Berrin, J.; Beaugrand, J. (2011). GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotech. Adv.* **30**: 564-592.
- Parry, N. J.; Beever, D.E.; Owen, E.; Vandenberghe, I.; Beeumen, J.V.; Bhat, M.K. (2001). *Biochem. J.* **353**: 117–127.
- Pauly, N.; Gille, S.; Liu, L.; Mansoori, N.; Souza, A.; Schultink, A.; Xiong, G. (2013). Hemicellulose biosynthesis. *Planta* **238**: 627-642.
- Pedersen, M.; Lauritzen, H.K.; Frisvad, J.C.; Meyer, A.S. (2007). Identification of thermostable β -xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*. **29**: 743-748.
- Pei, J.; Pang, Q.; Zhao, L.; Fan, S.; Shi, H. (2012). *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* β -glucosidase a glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose. *Biotechnol Biofuels*. **5**:31.
- Peralta, R.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A. (1990). *Biochim. Biophys. Acta*. **1033**: 243–249.
- Pereira, H.; Graça, J.; Rodrigues, J.C.; Bamett, J.R.; Jeronimidis, G. (2003). Wood chemistry in and Wood Quality and its Biological Basis. CRC Press Blackwell Publishing Oxford. **3**: 53-83.
- Pereira, J.O.; Azevedo, J.L.; Petrini, O. (1993). Endophytic fungi of stylosanthes a first report. *Mycologia* **85**: 362-364.
- Perez, J.; Muñoz-Dorado, J.; de la Rubia, T.; Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: a overview. *Int. Microbiol.* **5**: 53-63.
- Perez-Pons, J.A.; Rebordosa, X.; Querol, E. (1995). Properties of a novel glucose-enhanced β -glucosidase purified from *Streptomyces sp.* (ATCC 11238). *Biochim. Biophys. Acta* **1251**: 145-153.

- Polizeli, M.L.; Rizzatti, A.C.S.; Monti, R.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A.; Amorin, D.S. (2005). Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**: 577–591.
- Pontoh, J.; Low, N.H. (2002). Purification and characterization of β -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Bioch Molec.* **32**: 679-690.
- Puls, J.; Schuseil, J.; (1993). Chemistry of hemicelluloses, relationship between hemicellulose structure and enzyme required for hydrolysis. In: Coughland, M.P.; Hazlewood GP (eds) Hemicelluloses and hemicellulases. Portland Press, London, pp. 1-27.
- Qian, L.C.; Fu, S.J.; Zhou, H.M.; Sun, J.; Weng, X.Y. (2012). Optimization of Fermentation Parameters for β -glucosidase Production by *Aspergillus niger*. *J. Animal and Veterinary Advances* **11**: 583-591.
- Qing, Q.; Yang, B.; Wyman, C.E. (2010). Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Biores. Technol.* **101**: 9624–9630.
- Quiroga, E.N.; Sgariglia, M.A.; Molina, C.F.; Sampietro, D.R.; Soberon, JR.; Vattuone, M.A. (2009). Purification and characterization of an exopolysaccharidase from *Pycnoporus sanguineus*. *Mycol. Res.* **113**:1404–1410.
- Read, S.M.; Northcote, D.H. (1981). Minimization of variation in the response to different protein of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* **116**: 53-64.
- Riccio, P.; Rossano, R.; Vinella, M.; Domizio, P.; Zito, F.; Sansevrino, F.; D'Elia, A.; Rosi, I. (1999). Extraction and immobilization in one step of two β -glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme Microb. Technol.* **24**: 123-129.

Rodrigues, M.; Iemma, A.F. (2009). Planejamento de experimentos e otimização de processos. 2ª. Ed. – Campinas, SP: Caso do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor.

Sadhasivam, S.; Savitha, S.; Swaminathan, K.; Lin, F.H. (2008). Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum*. WL1. *Biochemistry*. **43**: 736–742.

Saha, B.C.; Bothast, R.J. (1996). Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3165–3170.

Saha, B.C.; Arabi, M.I.E.; Jawhar, M.; Bakri, Y. (2003). Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol.* **30**: 279–291.

Saha, B.C. (2003). Purification and properties of an extracellular bxylosidase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Bioresour. Technol.* **90**: 33–38.

Saibi, W.; Amouri, B.; Gargouri, A. (2007). Purification and biochemical characterization of a transglucosylating β -glucosidase of *Stachybotrys* strain. *Appl Microbiol Biotechnol.* **77**: 293–300.

Saloheimo, M.; Paloheimo, M.; Hakola, S.; Pere, J.; Swanson, B.; Nyysönen, E.; Bhatia, A.; Ward, M.; Penttillä, M. (2002). Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur. J. Biochem.* **269**: 4202–4211.

Sant’Ana da Silva, A.; Inoue, H.; Endo, T.; Yano, S.; Bon, E.P.S. (2010). Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresour. Technol.* **10**: 7402–7409.

Schadeck, R.J.G.; Buchi, D.F.; Leite, B. (1998). Ultrastructural aspects of *Colletotrichum graminicola* conidium germination, apressorium formation and penetration on cellophane membranes: focus on lipid reserves. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **30**: 555–561.

Scheller, H.V.; Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Ann. Rev. Plant. Biol.* **61**: 263-289.

Schliemann (1983). β -D-glucosidase (EC 3.2.1.21) der Mikroorganismen. *Pharmazie* **38**: 481-483.

Sepahy. A.A.; Ghazi, S.; Sepahy, M.A. (2011). Cost-effective production and optimization of alkaline xylanase by indigenous *Bacillus mojavenensis* AG137 fermented on agricultural waste. *Enzyme Res.* **2011**: 593–624.

Sestelo, A.B.F.; Poza, M.; Villa, T.G. (2004). β -glucosidase activity in a *Lactobacillus plantarum* wine strain. *World J Microbiol Biothechnol.* **20**: 633-637.

Shraddha, R.S.; Simran, S.; Mohit, K.; Ajay, K. (2011). Laccase microbial sources production purification and potential biotechnological. *Appl. Enzyme Research.* **1**: 1-11.

Shraddha et al.; Shekher, R.; Sehgal, S.; Kamthania, M.; Kumar, A. (2011). Laccase microbial sources, production, purification and potential biotechnological applications. *Enzyme research* **201**: 1-11.

Sigoillot, C.; Lomascolo, A.; Record, E.; Robert, J.L.; Asther, M.; Sigoillot, J.C. (2002). Lignocellulolytic and hemicellulolytic system of *Pycnoporus cinnabarinus* isolation and characterization of a cellobiose dehydrogenase and a new xylanase. *Enzyme Microb. Technol.* **31**: 876-883.

Singvi, M.; Digambar, S.C.; Gokhale, V. (2014). Lignocellulose processing: a current challenge. *RSC Adv.* **4**: 8271.

Sindhu, R.; Kuttiraja, M.; Binod, P.; Janu, K.U.; Sukumaran, R.K.; Pandey, A. (2011). Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* **102**:10915–10921.

Singhania, R. R.; Patel, A. K.; Sukumaran, R. K.; Larroche, C.A.; Pandey, A. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* **127**: 500-507.

Sivakumar, R. (2010). Isolation, screening and optimization of production medium for thermostable laccase production from ganoderma. *Int. J. Eng. Sci. Technol.* **2**: 7133-7141.

Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton Crocker, D. (2008). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. In: *Laboratory Analytical Procedure (LAP)* Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory.

Somerville, C.; Bauer, S.; Brininstool, G.; Facette, M.; Hamann, T.; Milne, J.; Osborne, E.; Paredes, A.; Persson, S.; Raab, T. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*. **306**: 2206–2211.

Sonia, K.G.; Chadha, B.S.; Badhan, A.K.; Saini, H.S.; Bhat, M.K. (2008). Identification of glucose tolerant acid active β -glucosidases from thermophilic and thermotolerant fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 599-604.

Sorensen, H.R.; Meyer, A.S.; Pedersen, S. (2003). Enzymatic hydrolysis of water-soluble wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue. *Enzyme Microb. Tech.* **36**: 773-784.

Sørensen, A. Lübeck, M. Lübeck, P.; Ahring, B. (2013). Fungal Beta- Fungal Beta-Glucosidases: A Bottleneck in Industrial Use of Lignocellulosic Materials *Biomolecules* **3**: 612-631.

Souza, F.H.M.; Nascimento, C.V.; Rosa, J.C.; Masui, D.C.; Leone, F.A.; Jorge, J.A.; Furriel, R.P.M. (2010). Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. *Process Biochem.* **45**: 272-278.

- Sudan, R.; Bajaj, B.K. (2007). Production and biochemical characterization of xylanase from an alkalitolerant novel species *Aspergillus niveus* RS2. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 491–500.
- Sue, M.; Ishihara, A.; Iwamura, H. (2000). Purification and characterization of a β -glucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings. *Plant. Sci.* **155**: 67-74.
- Suwannarangsee, S.; Bunterngrsook, B.; Arnthong, J.; Paemanee, A.; Thamchaipenet, A.; Eurwilaichitr, L.; Laosiripojana, L.; Champreda, V. (2012). Optimization of synergistic biomass-degrading enzyme systems for efficient rice straw hydrolysis using an experimental mixture design. *Bioresour. Technol.* **119**: 252–261.
- Tanaka, H.; Toshihide, N.; Sachio, H.; Kazuyoshi, O. (2005). Purification and properties of an extracellular endo 1,4 xylanase from *Penicillium citrinum* and characterization of the encoding gene. *J. Biosc. Bioeng.* **100**: 623–630.
- Teugjas, H.; Våljamäe, P. (2013). Product inhibition of cellulases studied with ¹⁴C-labeled cellulose substrates. *Biotechnol. Biofuels.* **6**:104.
- Thurston, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology.* **140**: 19-26.
- Trovaslet, M.; Enaud, E.; Guiavarc'h, Y.; Corbisier, A.M.; Vanhulle, S. (2007) Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. *Enzyme Microb. Technol.* **41**:368–376.
- Uchima, C. A.; Tokuda, G.; Watanabe, H.; Kitamoto, K.; Arioka, M. (2011). Heterologous expression and characterization of a glucose-stimulated β -glucosidase from the termite *Neotermes kosshunensis* in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **89**: 1761–1771.

- Uzan, E.; Nousiainen, P.; Balland, V.; Sipila, J.; Piumi, F.; Navarro, D.; Asther, M.; Record, E.; Lomascolo, A. (2011). High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology from gene cloning to enzyme characterization and applications. *J. Appl. Microbiol.* **108**: 2199-2213.
- Uzan, E.; Portet, B.; Lubrano, C.; Milesi, S.; Favel, A.; Lesage-Meessen, L.; Lomascolo, A. (2011). *Pycnoporus* laccase-mediated bioconversion of rutin to oligomers suitable for biotechnology applications. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **90**:97–105.
- Van Dyk, J.S.; Pletschke, B.I. (2012). A review of lignocelluloses bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzyme-factors affecting enzymes conversion and synergy. *Biotechnol Adv.* **30**: 1458-1480.
- Van Peij, N.N.; Brinkmann, J.; Vrsanká, M.; Visser, J.; De Graaff, L.H. (1997). B-xylosidase activity, encoded by *xlnD*, is essential for complete hydrolysis of xylan by *Aspergillus niger* but not for induction of the xylanolytic enzyme spectrum. *Eur. J. Biochem.* **245**: 164-173.
- Vanholme, R.; Demedts, B.; Morreel, K.; Ralph, J.; Boerjan, W. (2010). Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology* **153**: 895-905.
- Venturi, L.L.; Polizeli, M.L.; Terenzi, H.F.; Furriel, R.P.M.; Jorge, J.A. (2002). Extracellular β -D-glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum*: Production, purification and some biochemical properties. *J. Basic Microbiol.* **42**, 55–66.
- Vikineswary, S.; Abdullah, N.; Renuvathani, M.; Sekaran, M.; Pandey, A.; Jones, E.B.G. (2006). Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresour. Technol.* **97**:171-177.

Vrsanská, et al. (2007). Mode of action of glycoside hydrolase family 5 glucuronoxylan xylanohydrolase from *Erwinia chrysanthemi*. *FEBS Journal*. **274**: 1666-77.

Xin, F.; Geng, A.; Chen, M.L.; Gum, M.J.M. (2010). Enzymatic Hydrolysis of Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)—Pretreated Newspaper for Cellulosic Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Appl. Biochem. Biotechnol*. **162**: 1052–1064.

Xu, H.; Xiong, A.S.; Zhao, W.; Tian, Y.S.; Peng, R.H.; Chen, J.M.; Yao, Q.H.; (2011). Characterization of a Glucose-, Xylose-, Sucrose-, and D-Galactose-Stimulated α -Glucosidase from the Alkalophilic Bacterium *Bacillus halodurans* C-125. *Curr Microbiol*. **62**: 833–839.

Wang, L.; Sharifzadeh, M.; Templer, R.; Murphy, R.J. (2012). Technology performance and economic feasibility of bioethanol production from various waste papers. *Energy Environ. Sci*. **5**: 5717–5730.

Wang, L.; Templer, R.; Murphy, R.J. (2012). High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. *Applied Energy*. **99**: 23–31.

Whang, F.; Guo, C.; Liu, H.Z.; Liu C.Z. (2008). Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. **83**: 97–104.

Wong, D.W.S. (2009). Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Appl. Biochem Biotechnol* **157**: 174-209.

Wright, R.M.; Yablonsky, M.D.; Shalita, Z.P.; Goyal, A.K.; Eveleigh, D.E. (1992). Cloning, characterization, nucleotide sequence of a gene encoding *Microbispora* BglB, a thermostable β -glucosidase expressed in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol*. **58**: 3455-3465.

- Wymanet, C. E. (2005). What is and is not vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends in Biotechnology*. **24**: 153-157.
- Yáñez, R.; Alonso, J.L.; Parajó, J.C. (2004). Production of hemicellulosic sugar and glucose for residual corrugate cardboard. *Process Biochem*. **39**: 1543–1551.
- Yang, S.; Jiang, Z.; Yan, Q.; Zhu, H. (2008). Characterization of a thermostable extracellular β -glucosidase with activities of exoglucanase and transglycosylation from *Paecilomyces thermophila*. *J. Agric. Food Chem*. **56**: 602-608
- Yeasmin, S.; Kim, C.H.; Park, H.J.; Sheikh, M.I.; Lee, J.Y.; Kim, J.W.; Back, K.K.; Kim, S.H. (2011). Cell surface display of cellulase activity free xylanase enzyme on *Saccharomyces cerevisia*. *Appl. Biochem Biotechnol*. **164**: 294–304.
- Yoon, J.J.; Kim, K.Y.; Cha, C.J. (2008). Purification and characterization of thermostable β -glucosidase from the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* grown on microcrystalline cellulose. *J. Microbiol*. **46**: 51.
- Yoshida, K.; Saitoh, H.; Fujisawa, S. (2009). Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell*. **21**: 1573-1591.
- Yun, S.I.; Jeong, S.C.; Chung, K.D.; Choi, S.H. (2001). Purification and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. *Biosci Biotechnol Biochem*. **65**: 2028-2032.
- Zang, Y.H.P.; Himmel, M.E.; Mielenz J.R. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv*. **24**: 452-481.
- Zanoelo, F.F.; Polizeli, M.L.T.M.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A. (2004). Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. **31**: 170-176.

Zanoelo FF, Polizeli MLTM, Terenzi HF, Jorge JA (2004). β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. FEMS Microbiol Letters **240**:137-43.

Zhao, X. Zhang, L.; Liu, D. (2012). Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels Bioprod. Bioref.* **6**: 465-482.

Zhu, H.; Cheng, K.J.; Forsberg, C.W. (1997). A truncated β -xylosidase from the anaerobic fungus *Neocallimastix patriciarum* 27. *Can. J. Microbiol.* **40**: 484-490.

Zimbardi, A.L.R.L.; Sehn, C., Meleiro, L.P.; Souza, F.H.M.; Masui, D.C.; Nozawa, M.S.F.; Guimarães, L. H. S.; Jorge, J.A.; Furriel, R.P.M. (2013). Optimization of β -Glucosidase, β -Xylosidase and Xylanase Production by *Colletotrichum graminicola* under Solid-State Fermentation and Application in Raw Sugarcane Trash Saccharification. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 2875-2902.