**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

MATHEUS MAITAN VIEIRA

Produção e caracterização de enzimas celulolíticas a partir de resíduos agroindustriais pelo *Aureobasidium pullulans* LB 83 e sua respectiva análise proteômica

**Lorena
2020**

MATHEUS MAITAN VIEIRA

Produção e caracterização de enzimas celulolíticas a partir de resíduos agroindustriais pelo *Aureobasidium pullulans* LB 83 e sua respectiva análise proteômica

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de concentração de Microbiologia Aplicada

Orientador: Dr. Anuj Kumar Chandel

Versão Corrigida

Lorena

2020

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Vieira, Matheus Maitan

Produção e caracterização de enzimas celulolíticas a partir de resíduos agroindustriais pelo *Aureobasidium pullulans* LB 83 e sua respectiva análise proteômica / Matheus Maitan Vieira; orientador Anuj Kumar Chandel - Versão Corrigida. - Lorena, 2020.
121 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2020

1. Sacarificação enzimática. 2. Bioprocessos. 3. Enzimas celulolíticas. 4. Sacarificação. 5. Proteômica.
I. Título. II. Chandel, Anuj Kumar, orient.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, que sem eles eu não estaria aqui, com todo apoio e dedicação que tiveram que fizeram com que eu chegasse nessa etapa acadêmica da minha vida.

Aos meus padrinhos, em especial minha madrinha Anamaria, que foi voar longe junto com os pássaros que ela amava, meu muito obrigado por serem meus pais sempre que foi preciso.

Ao professor doutor Anuj Kumar, que me orientou nesse período, com profissionalismo, competência e dedicação. Foi um grande mestre que me guiou por todo experimento, mesmo nos momentos mais difíceis ele se propunha a estar presente.

Ao professor Doutor Silvio Silvério da Silva, o qual sem ele não teria vindo para Universidade de São Paulo – Escola de Engenharia de Lorena. Obrigado por me guiar e ser um grande amigo, além de depositar sua confiança em meu trabalho, principalmente nos estágios que fiz contigo.

Ao meu grande amigo Dr. Felipe, que foi um irmão que tive nessa trajetória, sempre tentando me animar nos meus dias e sempre acreditando no meu trabalho em momentos no qual nem eu mesmo acreditava.

A minha estudante de iniciação científica, Elen Kadoguchi, que me ajudou na maioria dos experimentos e me trouxe muitas dúvidas das quais foram importantes para esse trabalho.

Aos professores e colegas do LBIOS, pela amizade, apoio, preocupação e sinceridade demonstrado. Em especial quando estive com problemas médicos, todos se propuseram a modificar rotina para me ajudar a manter as necessidades de estudo.

Ao meu colega Jesus, por ter estado ao meu lado em momentos difíceis e descontraídos, sempre me fazendo ver que tinha opções para meus problemas.

A todos funcionários da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, que estiveram presentes nesse processo. Em especial o professor Doutor Júlio César, que fez o possível para que eu concluísse da melhor maneira possível.

À bolsa de estudos CAPES pelo apoio financeiro.

À usina Ipiranga Agroindustrial, por ceder matérias necessários para essa pesquisa.

“É como nas grandes histórias sr. Frodo. As realmente importantes. Eram cheias de perigo e escuridão. E às vezes nem se queria saber o final. Por que como o fim poderia ser feliz? Como o mundo poderia voltar a ser o que sempre foi quando tanta coisa ruim acontecia? Mas no final é algo que passará, essa sombra, até mesmo a escuridão acabará. Um novo dia virá. E quando o sol nascer, ele brilhará ainda mais. Essas eram as histórias que ficavam com a gente, que significavam alguma coisa, mesmo quando eu era pequeno demais para entender por quê. Mas eu acho, sr. Frodo, que eu entendo. Agora eu já sei. As pessoas daquelas histórias tiveram muitas chances para desistir, mas não desistiram. Elas foram em frente porque estavam se agarrando a alguma coisa. Que há algo de bom neste mundo, sr. Frodo. Algo pelo qual vale a pena lutar”.

J.R.R. Tolkien – In: O Senhor dos Anéis – As duas torres

RESUMO

Vieira, M. M. **Produção e caracterização de enzimas celulolíticas a partir de resíduos agroindustriais pelo *Aureobasidium pullulans* LB 83 e sua respectiva análise proteômica** 2020. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

Com a crescente demanda por combustíveis renováveis e bioprodutos, objetivando o desenvolvimento sustentável, a biomassa lignocelulósica tornou-se um importante composto a ser aplicado em bioprocessos devido ao seu baixo custo e alta disponibilidade. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de enzimas celulolíticas a partir do microrganismo *Aureobasidium pullulans* utilizando diferentes resíduos lignocelulósicos. Esses sub-produtos foram submetidos a pré-tratamento alcalino para redução de lignina e uso como fonte de carbono para estudo da produção de celulase sob cultivo submerso. O potencial de produção de celulase de *A. pullulans* foi avaliado pelo método de placas, utilizando 0,5% (m/v) de fontes de carbono (Carboximetilcelulose (CMC) e xilooligossacarídeos (XOS)). As zonas hidrolíticas foram de 2,36 e 2,49 para CMC e XOS, respectivamente, indicando seu possível uso para investigações posteriores. A CMC foi utilizada na fermentação inicial como fonte de carbono para obtenção do tempo ótimo de fermentação e atividade enzimática, sequentemente foram usados outros substratos como fontes primárias de carbono. Diferentes fontes de nitrogênio sintético e não sintético foram testadas para otimização da produção de celulase. Por fim a concentração de células, pH e temperatura também foram usadas como parâmetro. Verificou-se que bagaço de cana-de-açúcar, fontes de nitrogênio não sintéticas combinadas e inóculo de $1,6 \times 10^6$ UFC a 50°C da reação enzimática e pH 5,5 possuía a melhor atividade (8,84 para CMCase e 3,457 para FPase). Os resultados demonstram a potencialidade desse microrganismo de produzir enzimas celulolíticas viáveis para estudos na área de análises proteômicas e possíveis aplicações industriais. Nas análises proteômicas foram identificadas a proporção de proteínas totais e CAZymas. O total de 464 proteínas, das quais 38 correspondiam a CAZymas (8,18% do total de proteínas). Dentre as CAZymes foram encontrados 21 glicosídeo hidrolases (55,26%), 12 glicosídeo hidrolases com módulo de ligação de carboidratos (31,58%), 4 carboidratos esterases (10,53%), uma glicosil transferase (2,63%), como demonstrado no gráfico da Figura 23. Isso sugere que o *Aureobasidium pullulans* é um microrganismo muito versátil na produção de suas proteínas e, principalmente, CAZymas, que ao comparado a outros trabalhos com microrganismos observa-se que possui menos proporção em relação a proteína total, porém sua atividade maior sugere que trata-se de enzimas com maior atividade de reação no substrato lignocelulósico.

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais. Enzimas celulolíticas. Otimização de produção de enzimas. Análises proteômicas.

ABSTRACT

Vieira, M.M. **Production and characterization of cellulolytic enzymes from agro-industrial residues by *Aureobasidium pullulans* LB 83 and its respective proteomic analysis.** 2020. 121p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

With the growing demand for renewable fuels and bioproducts, aiming at sustainable development, lignocellulosic biomass has become an important compound to be applied in bioprocesses due to its low cost and high availability. The objective of this work was to study the production of cellulolytic enzymes from the microorganism *Aureobasidium pullulans* using different lignocellulosic residues. These by-products were subjected to alkaline pretreatment to reduce lignin and use as a carbon source to study cellulase production under submerged culture. The cellulase production potential of *A. pullulans* was evaluated by the plate method, using 0.5% (m/v) of carbon sources (Carboxymethylcellulose (CMC) and xylooligosaccharides (XOS)). The hydrolytic zones were 2.36 and 2.49 for CMC and XOS, respectively, indicating their possible use for further investigations. CMC was used in the initial fermentation as a carbon source to obtain the optimum fermentation time and enzymatic activity, followed by the use of other substrates as primary carbon sources. Different sources of nitrogen synthetic and non-synthetic were tested to optimize cellulase production. Finally, cell concentration, pH and temperature were also used as a parameter. It was found that sugarcane bagasse, combined non-synthetic nitrogen sources and inoculum of 1.6×10^6 CFU at 50°C of the enzymatic reaction and pH 5.5 had the best activity (8.84 for CMCase and 3.457 for FPase). The results demonstrate the potential of this microorganism to produce cellulolytic enzymes for studies in the area of proteomic analysis and industrial applications. In the proteomic analyzes, the proportion of total proteins and CAZymes was identified. A total of 464 proteins were obtained, of which 38 corresponded to CAZymes (8.18% of the total proteins). Among CAZymes, 21 glycoside hydrolases (55.26%), 12 glycoside hydrolases with carbohydrate binding module (31.58%), 4 carbohydrate esterases (10.53%), one glycosyl transferase (2.63%) were found. This suggests that *Aureobasidium pullulans* is a very versatile microorganism in the production of its proteins and, mainly, CAZymes, which when compared to other studies with microorganisms it is observed that it has less proportion in relation to the total protein, however its greater activity suggests that it enzymes with greater reaction activity in the lignocellulosic substrate.

Keywords: Agro-industrial waste. Cellulolytic enzymes. Optimization of enzyme production. Proteomic analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da biomassa lignocelulósica.	23
Figura 2 - Representação da estrutura química da celulose.	24
Figura 3 - Componentes da fração hemicelulose.	26
Figura 4 - Unidade básica fenil-propânica e álcoois precursores da lignina.	26
Figura 5 - (A) Imagem própria do <i>Aureobasidium pullulans</i> cultivado em YMA. (B) Imagem do <i>Aureobasidium pullulans</i> cultivado em PDA.	34
Figura 6 - Ação mecânica processual de todas as três celulasas no polímero de celulose. Hidrólise das fibras de celulose individuais para quebrá-lo em açúcares menores por exocelulase, ruptura das interações não covalentes presentes na estrutura cristalina de celulose por Endocelulase e β -glucosidase finalmente hidrolisam os dissacarídeos ou celobiose em glicose.	38
Figura 7 - Esquema da síntese dos recentes focos na indústria para obtenção de açúcares fermentescíveis.	45
Figura 8 - (1) Transferência de 1 mL para pré-inóculo em 15 mL de caldo dextrose Sabouroud por 24 horas (2). Transferência para Erlenmeyer contendo 100 mL do meio mínimo Mandel, a 30 °C durante 120 horas sob agitação de 200 rpm (3). Amostras foram retiradas a cada 24 horas com 5 minutos de repouso do Erlenmeyer para decantação e retirado 1 mL para o teste de ação enzimática de acordo (4) Leitura em espectrofotômetro a 540nm (5). As análises de atividades enzimáticas em triplicata.	57
Figura 9 - Reação utilizada para a determinação espectrofotométrica de açúcares, onde o DNS é convertido em seu análogo reduzido.	58
Figura 10 - Método de revelação padronizado para carboximetilcelulose, utilizando CMC e XOS como fonte de carbono. O padrão de crescimento foi bem próximo, assim como a formação do halo de degradação.	65
Figura 11 - Atividade enzimática (U/mL) em função do tempo (horas) de bioprocesso a partir do uso de CMC como biomassa no processo de fermentação submersa para produção de enzimas do complexo celulolítico, utilizando o <i>Aureobasidium pullulans</i>	67
Figura 12 - Atividade enzimática (U/mL) em função do tempo (horas) de bioprocesso a partir do uso de diferentes biomassas: (13A) Sabugo de milho, (13B) palha de cana-de-açúcar, (13C) bagaço de cana-de-açúcar, como fonte de carbono no processo de fermentação submersa para produção de enzimas do complexo celulolítico, utilizando o microrganismo <i>Aureobasidium pullulans</i>	69
Figura 13 - Atividade enzimática (U/mL) em função do tempo de bioprocesso a partir do uso de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e diferentes fontes de nitrogênio inorgânicas: (13A) Ureia, (13B) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (13C) peptona, como única fonte de nitrogênio no processo de fermentação submersa para produção de enzimas do complexo celulolítico, utilizando o microrganismo <i>Aureobasidium pullulans</i>	74
Figura 14 - Atividade enzimática (U/mL) em função do tempo (horas) de bioprocesso a partir do uso de fontes de nitrogênio orgânicos: (14A) farelo de soja, (14B) farelo de milho, (14C) farelo de arroz, como única fonte de nitrogênio no processo de fermentação submersa para produção de enzimas do complexo celulolítico, utilizando o microrganismo <i>Aureobasidium pullulans</i>	76
Figura 15 - Atividade enzimática em função do tempo de bioprocesso a partir do uso de concentrações iniciais de células de <i>Aureobasidium pullulans</i> : (16A) $0,8 \times 10^6$ CFU, (16B) $1,6 \times 10^6$ CFU, (16C) $3,2 \times 10^6$ CFU, na fermentação submersa usando o bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e o as fontes de nitrogênio nas concentrações como descrito no meio Mandel.	78
Figura 16 - Atividade enzimática em função do tempo de bioprocesso tendo como fator que interfere na reação enzimática o pH: (17A) 4,5, (17B) 5,0, (17C) 5,5, (17D) 6,0, na fermentação submersa	

usando o bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e o as fontes de nitrogênio nas concentrações como descrito no meio Mandel.....	79
Figura 17 - Atividade enzimática em função do tempo de bioprocesso tendo como fator que interfere na reação a temperatura: (18A) 40 °C, (18B) 45 °C, (18C) 50 °C, (18D) 55 °C, (18E) 60 °C na fermentação submersa usando o bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e o as fontes de nitrogênio nas concentrações como descrito no meio Mandel.	81
Figura 18 - Sacarificação em relação aos tratamentos e tempo, tendo como fator diferentes tratamentos em relação ao seus respectivos FPU (U/ml): (A) 10 FPU <i>A. pullulans</i> ; (B) 7,5 FPU <i>A. pullulans</i> + 2,5 FPU Ctec-2; (C) 5,0 FPU <i>A. pullulans</i> + 5,0 FPU Ctec-2; (D) 2,5 FPU <i>A. pullulans</i> + 7,5 FPU Ctec-2; (E) 10 FPU Ctec-2.....	84
Figura 19 – Fotografia retirada a partir do programa ImageLab da amostra de SDS-PAGE das enzimas brutas extraídas de <i>A. pullulans</i> extraídas a partir da fermentação da melhor atividade de CMC e FPU usando bagaço de cana-de-açúcar no tempo de 60 horas.	87
Figura 20 – Gráfico demonstrando a proporção (%) do secretoma bruto de <i>A. pullulans</i> analisadas por LC/MS-MS na central Central Analítica do Instituto de Química da USP São Paulo, com total de 464 proteínas, sendo 38 correspondentes a CAZymas (8,18% do total de proteínas). Dentre as CAZymeas foram encontrados 21 glicosídeo hidrolases (55,26%), 12 glicosídeo hidrolases com módulo de ligação de carboidratos (31,58%), 4 carboidratos esterases (10,53%), uma glicosil transferase (2,63%).....	88
Figura 21 - Gráfico demonstrando a proporção (%) do secretoma bruto de <i>A. pullulans</i> analisadas por LC/MS-MS na central Central Analítica do Instituto de Química da USP São Paulo. Proteínas separadas de acordo com a base de dados CAZy e seus respectivos representantes (glicosil hidrolases (GH), glicosídeo hidrolases com módulo de ligação de carboidratos (CBM), carboidratos esterases (CE) e glicosil-transferase (GT).	90
Figura 22 - Ação do glicosídeo hidrolase com H ₂ O formando hemiacetal com aglicônio livre correspondente.....	91
Figura 23 - Gráfico demonstrando a proporção (%) do secretoma bruto de <i>A. pullulans</i> analisadas por LC/MS-MS na central Central Analítica do Instituto de Química da USP São Paulo. Proteínas separadas de acordo com a base de dados CAZy e seus respectivos representantes de acordo com sua função molecular.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química parcial de algumas biomassas lignocelulósicas evidenciando a porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina, e suas respectivas referências.	24
Tabela 2 - Índice enzimático e suas respectivas fontes de carbono no teste de placas contendo meio mínimo Kasana e carboximetilcelulose e XOS como fonte de carbono para a produção de CMCase e hemicelulase.	65
Tabela 3 - Composição dos principais componentes químicos lignocelulósicos do sabugo de milho na literatura.	71
Tabela 4 - Composição dos principais componentes químicos lignocelulósicos do bagaço de cana-de-açúcar na literatura.	71
Tabela 5 - Composição dos principais componentes químicos lignocelulósicos de palha de cana-de-açúcar na literatura	72
Tabela 6 - Concentração de proteínas, açúcares totais e açúcares redutores de farelo de soja, farelo de milho e farelo de arroz, empregados neste presente trabalho.....	76
Tabela 7 – Atividades enzimáticas das enzimas brutas extraídas de <i>A. pullulans</i> extraídas a partir da fermentação da melhor atividade de CMC e FPU usando bagaço de cana-de-açúcar no tempo de 60 horas. Sendo os substratos do complexo pNP (p-nitrofenil). Os substratos usados foram pNP-β-D-arabinofuranoside (pNP-A), pNP-β-D-celobioside (pNP-C), pNP-β-D-glucoside (pNP-G) e pNP-β-D-xiloside (pNP-X).	82
Tabela 8 - Controles das sacarificações, tendo como base o uso de tratamento sem enzimas (Controle 1) ou sem biomassa (Controle 2).	84
Tabela 10 - Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura tendo como critérios lignina total, glucana, xilana, arabinosil e cinzas, em porcentagem.....	86
Tabela 11 - Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino (4% de NaOH em solução) tendo como critérios lignina total, glucana, xilana, arabinosil e cinzas, em porcentagem.	86
Tabela 12 - Total de celulose e hemicelulose resultantes da caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura tendo como critérios Celulose e hemicelulose total da amostra, em porcentagem	86
Tabela 13 - Relação das enzimas encontradas a partir do secretoma bruto de <i>A. pullulans</i> usando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, tendo como foco sua função putativa e a relação com as enzimas CAZy.	93

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Equação para cálculo de extrativos	54
Equação 2 - Equação do teor de cinzas	54
Equação 4 - Equação para cálculo de lignina solúvel	56
Equação 5 - Equação para cálculo de lignina insolúvel	56
Equação 6 - Equação para a determinação de lignina total:	56
Equação 7 - Cálculo do índice Enzimático (autoria própria)	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1.	Biomassa lignocelulósica: fonte de matéria-prima para bioprocessos.....	22
2.2.	A natureza química da biomassa lignocelulósica	23
2.2.1.	Celulose	24
2.2.2.	Hemicelulose	25
2.2.3.	Lignina	26
2.3.	Pré-tratamentos da biomassa vegetal	27
2.3.1.	Sacarificação enzimática	28
2.4.	Características gerais de processos fermentativos	30
2.4.1.	Processos Fermentativos para Produção Enzimática	31
2.4.1.1.	Fermentação submersa para a produção de celulase	32
2.5.	Características enzimáticas	32
2.6.	<i>Aureobasidium</i> sp.....	33
2.6.1.	Enzimas de <i>Aureobasidium pullulans</i>	35
2.6.2.	Enzimas celulolíticas	36
2.6.3.	Celulases	36
2.6.3.1.	Estrutura.....	38
2.6.3.2.	Fontes e propriedades	39
2.7.	Análises Proteômicas e Secretômicas de celulases.....	41
2.7.1.	Análises proteômicas	41
2.7.2.	Comparação entre cepas funcionais	42
2.7.3.	Comparações de biomassa lignocelulósicas utilizadas em análises secretômicas como parâmetro	43
2.7.4.	Análise proteômica comparativa entre meios de cultura	43
2.7.5.	Novos métodos proteômicos para análise de secretoma	44
2.7.6.	Metassecretoma	45
2.7.7.	Desafios e perspectivas	45
3.	OBJETIVOS	48
3.2.	Geral	48
3.3.	Específico.....	48
4.	MATERIAL E MÉTODOS	48

4.2.	Microrganismo.....	48
4.3.	Biomassas	49
4.3.1.	Fontes de carbono	49
4.2.1.1.	Pré-tratamento alcalino	49
4.4.	Fontes de nitrogênio.....	50
4.4.1.	Fontes de nitrogênio sintéticas	50
4.4.2.	Fontes de nitrogênio não sintéticas	50
4.4.2.1.	Pré-tratamento ácido	50
4.5.	Teste de índice enzimático em placas	51
4.6.	Avaliação do extrato enzimático bruto usando CMC como fonte de carbono	51
4.7.	Processos fermentativos	51
4.7.1.	Estudo da Fonte de carbono	52
4.7.2.	Estudo da Fonte de nitrogênio	52
4.7.2.1.	Fonte de nitrogênio sintético	52
4.7.2.2.	Fonte de nitrogênio não sintético	53
4.7.3.	Estudo da Concentração inicial celular (UFC)	53
4.8.	Teste da enzima bruta em diferentes condições de temperatura e pH.....	53
4.9.	Caracterização do material lignocelulósico	54
4.9.1.	Extrativos	54
4.9.2.	Cinzas	54
4.9.3.	Análise de celulose e hemicelulose	55
4.9.4.	Determinação de lignina	55
4.10.	Métodos analíticos	56
4.10.1.	Cálculo do índice enzimático	56
4.10.2.	Atividade de carboximetilcelulase (CMCase)	56
4.10.3.	Testes de atividade enzimática	57
4.10.3.1.	Determinação da atividade de enzimas celulolíticas	58
4.10.3.2.	Determinação da curva padrão pelo Método de Miller	58
4.10.3.3.	Preparo do DNS	58
4.10.3.4.	Determinação da curva padrão dos açúcares redutores	58
4.10.3.5.	Determinação de atividade FPase	59
4.10.4.	Atividade enzimática em diferentes pH	59
4.10.5.	Atividade enzimática em diferentes temperaturas	59
4.10.6.	Ensaio de sacarificação	60
4.10.7.	Teste de enzimas auxiliares	60
4.11.	Análises proteômicas.....	61

4.11.1. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE)	61
4.11.2. Digestão das bandas encontradas em poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE).....	62
4.11.3. Análise de bioinformática	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.2. Avaliação de produção de celulasas pelo uso de lugol	64
5.3. Avaliação do extrato enzimático bruto usando CMC como fonte de carbono	67
5.4. Estudo da produção de celulasas	69
5.4.1. Fonte de carbono como parâmetro	69
5.2.1. Fonte de nitrogênio como parâmetro.....	73
5.4.1.1. Fonte de nitrogênio sintético como parâmetro.....	73
5.4.1.2. Fonte de nitrogênio não sintético como parâmetro.....	75
5.4.2. Concentração de células como parâmetro	77
5.5. Utilização dos parâmetros definidos para reação enzimática em diferentes pH e temperaturas	78
5.5.1. Reação enzimática em diferentes pH	79
5.5.2. Reação enzimática em diferentes temperaturas	80
5.6. Enzimas auxiliares	82
5.7. Ensaio de sacarificação.....	83
5.8. Caracterização	85
5.9. Análises bioinformática aplicada a análises proteômicas.....	86
5.9.1. Análise SDS-PAGE e digestão dos blocos selecionados.....	86
5.9.2. Análise de bioinformática dos blocos SDS-PAGE.....	88
6. CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS.....	102

1 INTRODUÇÃO

Com a crescente tendência mundial em desenvolver produtos sustentáveis em processos os quais minimizem os problemas para com o meio ambiente, o uso de biomassa vegetal surge como potencial substrato renovável para o desenvolvimento sustentável. Dentre eles, a biomassa lignocelulósica ganhou destaque nos últimos anos por estar em grande abundância e ser um material de baixo custo. As indústrias que usam estes materiais para produção fazem parte de um sistema empresarial sustentável. Dentre os principais subprodutos gerados na agricultura brasileira, destaca-se o bagaço de cana-de-açúcar (para cada tonelada estima-se produção de 280 kg de tal subproduto), palha de cana de açúcar e sabugo de milho (para cada tonelada estima-se 180 kg deste subproduto), que possuem elevada produção, baixo custo e alta disponibilidade.

A cana-de-açúcar possui papel fundamental, sob o aspecto econômico e social. Historicamente, este cultivo é produzida desde o início da colonização, para a produção de bebidas alcólicas, açúcar, e alimentação animal. Na década de 1980, com o programa Proálcool passou a ser utilizada na produção de combustíveis renováveis para conter o preço dos combustíveis fósseis, possuindo safra de 633,26 milhões de toneladas na safra 2017/2018. Já a cultura de milho no Brasil atingiu 97,81 milhões de toneladas, na safra 2016/2017. A palha do milho também constitui de um subproduto excedente, porém ainda possui usos no campo após a colheita, sendo assim o sabugo de milho como o principal foco de matéria prima renovável. O maior exemplo é a biorrefinaria da cana-de-açúcar, que produz etanol em uma planta e manda o bagaço e a palha para uma segunda planta, para produção de etanol 2G, o que permite maior produtividade. Assim, as biorrefinarias tanto de etanol quando a de demais produtos poderiam se beneficiar a partir do açúcar gerado a partir de biomassa lignocelulósica, podendo entrar em um cenário economicamente mais favorável.

De fato, o mercado global de produtos químicos biorenováveis foi de US \$ 6,8 bilhões em 2015, sendo que pode chegar a US \$ 12,2 bilhões até 2021 (www.rnrmarketresearch.com), sendo que os EUA registraram vendas diretas de bioquímicos de 126 bilhões de dólares em 2013. Existem atualmente várias indústrias com instalações piloto para demonstrar a produção de bioprodutos usando bagaço de cana, palha de cana ou palha de milho. Além de etanol (1G ou 2G) outros produtos de origem bioquímica desempenham papel fundamental na bioeconomia, como etileno (BRASKEM Inc., Brasil), iso-butanol (GEVO Inc COLORADO, EUA), farneseno (AMYRIS Inc, Brasil), epicloridrina (PTT, MAPA TA PHUT, TAILÂNDIA), p-xileno (VIRENT, MA-DISON,

WI, EUA), ácido acrílico e ácido adípico (ADM e BASF, GERMANY), 5-HMF (AVA BIOCHEM, Alemanha), tornando importante o maior número de pesquisas nesta área correlata (CHANDEL *et al.*, 2018). Entretanto, o principal desafio relacionado a indústria renovável é a conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis. Dentre os principais processos de conversão ressalta-se a hidrólise enzimática, processo considerado vantajoso e correto para com o meio ambiente, uma vez que a reação não é específica no substrato e não gera compostos tóxicos à fermentação. Adicionalmente, os microrganismos englobam capacidade de assimilação de matéria orgânica e produção de enzimas necessárias para a degradação do substrato, como o material lignocelulolítico. Constata-se que as celulasas constituem de enzimas com diferentes especificidades para degradação de celulose, sendo produzida por vegetais, alguns animais, bactérias e fungos convertendo substratos celulósicos insolúveis em açúcares solúveis que são então assimilados pelas células. Estas especialidades são divididas em três componentes de celulasas responsáveis pela quebra da celulose, sendo estas as endoglucanases (responsáveis pela hidrólise das regiões internas da molécula de celulose), exoglucanases (atuante nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose) e β -glicosidases (que hidrolisam celobiose e alguns oligossacarídeos solúveis em glicose). De fato, além da configuração dos bioprocessos, a escolha do microrganismo é um fator chave para o sucesso. Em setores industriais, verifica-se que a preferência por fungos e leveduras para decomposição de matéria orgânica em geral e, em particular, os substratos de celulose, apesar de celulasas bacterianas estejam se mostrando competitivas em relação à eficiência na hidrólise celulósica. Entre estes microrganismos, ressalta-se a levedura *Aureobasidium pullulans* por suas características de fácil repique e rápido crescimento, bem como sua variedade de produção de produtos. Dentre as enzimas já relatadas as quais esse microrganismo pode excretar, verifica-se a frutofuranosidase, xilanase, glicoamilase e celulase, tornando a mesma destacada no campo da microbiologia aplicada. A pesquisa na área de produção de celulasas se iniciou com Gilbon (1986), devido a muitas cepas não apresentarem atividade de celulase, ou produzirem quantidade de enzima insuficiente.

Entretanto, poucos estudos apontam concentrações molares exequíveis de enzimas celulolíticas individualizadas produzidas a partir de microrganismos degradadores de lignocelulose, reduzindo a viabilidade de um coquetel enzimático por não apresentar informações exatas sobre a ação enzimática da mesma. Para este propósito, deve-se obter a composição qualitativa e quantitativa do secretoma fungico, devido ao seu perfil cinético e interações complexas com o substrato, sendo ainda um desafio para o uso de enzimas

celulolíticas a ser superado pela biotecnologia industrial aplicada à biomassa. Devido a este fato, a análise proteômica atua como uma ferramenta valiosa na descoberta de novas enzimas ou complexos enzimáticos, dentre eles as enzimas celulolíticas, que são associadas a desconstrução da estrutura lignocelulósica. Com o crescente desenvolvimento de metodologias que ajudem a elucidar o papel das proteínas em vários processos biológicos, estes métodos passaram a ter maior importância na descrição de proteínas ativas e componentes acessórios na degradação de polissacarídeos de paredes celulares de plantas.

A maior parte dos estudos científicos dos processos *sugar-plataform* são baseadas na sacarificação de fontes de carbono pré-tratados, com o objetivo de gerar a máxima quantidade de açúcar para processos subsequentes de fermentação. Tal processo leva em conta aspectos econômicos como quantidade, qualidade e produtividade das enzimas utilizadas. Com isso houve um crescente número de estudos científicos no conceito de sacarificação enzimática. Sacarificação analítica enzimática é usada para avaliar um conjunto de amostras de matéria-prima, um conjunto de métodos de pré-tratamento ou um conjunto de preparações enzimáticas. O objetivo não é a sacarificação exaustiva como nos estudos preparatórios, mas sim detectar diferenças na suscetibilidade à sacarificação enzimática. A sacarificação enzimática da celulose é levada longe demais, pode ser difícil detectar diferenças na suscetibilidade enzimas celulolíticas, entretanto se a sacarificação enzimática for superficial e a se a fração de celulose convertida for muito baixa, pode ser difícil avaliar corretamente o valor da fração celulósica convertida.

O *screening* de novas cepas degradadoras de lignocelulose para uso em biorefinarias também é um foco das pesquisas em análises proteômicas (KUHAD *et al.*, 2016). Inúmeras cepas já foram isoladas e identificadas pelo seu secretoma, elucidando mecanismos de conversão lignocelulósico. Análises proteômicas comparativas de vários microrganismos lignocelulolíticos têm sido frequentemente realizadas para desenvolver coquetéis enzimáticos lignocelulósicos mais eficientes (ALFARO *et al.*, 2014). Os estudos tem foco na comparação de diferentes linhagens, matérias-primas, meios de cultura, concentração celular e atividade em diversos parâmetros físico-químicos (como pH e temperatura). Com isso pode ser obtido um conjunto de dados completo para o desenvolvimento de diretrizes práticas que selecionam o melhor coquetel enzimático com base nos dados do nível proteômico (GUO *et al.*, 2018).

Nesse contexto, o presente trabalho visa estudar a produtividade observando a influência das condições do processo de fermentação submersa para a produção de enzimas celulolíticas do microrganismo *Auereobasidium pullulans*, com foco na atividade de

hidrólise de carboximetilcelulase e papel filtro visando análises proteômicas do seu secretoma bruto.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biomassa lignocelulósica: fonte de matéria-prima para bioprocessos

Um potencial fonte renovável de carbono que pode substituir matérias-primas é a biomassa (LYND *et al.*, 2002), sendo que possuem vantagens nesse contexto por serem de baixo custo e alta disponibilidade no mercado. De acordo com sua origem elas podem ser divididas em cinco grupos (BALAT *et al.*, 2008):

- 1) Resíduos agroindustriais, resíduos provenientes de culturas agrícolas que não são, necessariamente, usadas para obtenção do produto final, como bagaço de cana, palha de milho, palha de trigo, sorgo, entre outros;
- 2) Madeiras, principalmente pela serragem obtida em serralherias;
- 3) Resíduos de celulose, vindas da reciclagem de papel;
- 4) Herbáceas, constituídos por materiais usados, principalmente, da alimentação animal.
- 5) Biomassa residual a partir de sólidos industriais.

Estes campos consistem em subprodutos, como por exemplo no continente asiático onde a palha de arroz e a palha de trigo são gerados 667,6 milhões de toneladas e 145,2 milhões de toneladas, respectivamente (SARKAR *et al.*, 2012). A maior parte desses subprodutos são utilizados para cogeração de energia e na ração animal, entretanto ainda existe uma grande quantidade que não é utilizada, constituindo-se em excedentes. Por exemplo os Estados Unidos da América 90% da palha de milho são deixados nos campos, já na Europa Ocidental onde é proibido a queima no campo, menos de 1% de palha de milho é recolhida para o processamento industrial, bem como cerca de 5% é utilizado como alimento e forragem para animais (BANERJEE, 2010). No Brasil o principal subproduto lignocelulósico é o bagaço de cana-de-açúcar, sendo um material fibroso obtido após a extração do suco de cana-de-açúcar nos processos de produção de usinas sucroalcoleiras. A produção anual do bagaço de cana-de-açúcar no Brasil é estimada em uma produção anual de 660 milhões de toneladas (CONAB, 2018), uma vez que 270 kg por tonelada de cana-de-açúcar processada (CARDONA *et al.*, 2010; SOCCOL *et al.*, 2010). Destes subprodutos são gerados energia termoelétrica nas usinas (cerca de 92 % do resíduo gerado é usado na queima para geração de energia), entretanto se os 8% restantes fossem convertidos em etanol de

segunda geração, pode-se esperar um adicional de 2200 L por hectare de terra plantada, o que tornaria o etanol por hectare brasileiro de 6000 L para 8200 L (SOCCOL *et al.*, 2010).

2.2.A natureza química da biomassa lignocelulósica

O termo estrutura lignocelulósica refere-se à parte do vegetal que forma a parede celular (lamela média, paredes primária e secundária), constituída por uma matriz rígida e fibrosa. Os compostos lignocelulósicos são formados por micro fibrilas de celulose inseridos em uma matriz de hemicelulose, pectina, lignina e uma menor quantidade de proteínas estruturais (SCHLITTLER; PEREIRA, 2008). A Figura 1 apresenta a composição da parede celular de biomassa lignocelulósica.

Figura 1 - Estrutura da biomassa lignocelulósica.

Fonte: Adaptado de Rubin (2008)

Como pode ser visualizada na Figura 1, a celulose e a hemicelulose são predominantes nestes biopolímeros e representam fontes em potencial de açúcares passíveis de serem fermentados. Na Tabela 1 pode ser observado a composição química parcial de diferentes biomassas lignocelulósicas:

Tabela 1 - Composição química parcial de algumas biomassas lignocelulósicas evidenciando a porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina, e suas respectivas referências.

Biomassas lignocelulósicas	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
Farelo de cevada	23	32,7	24,4	Cruz <i>et al.</i> (2000)
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3	Cruz <i>et al.</i> (2000)
Bagaço de cana-de-açúcar	40,19	26,42	25,15	Neureither <i>et al.</i> (2002)
Palha de arroz	43,5	22	17,2	Mussato (2002)
Palha de trigo	33,81	31,83	20,12	Cândido (2002)
Casca de aveia	30,51	28,63	23,09	Felipe <i>et al.</i> (2003)
Palha de sorgo	34	44	20	Herrer <i>et al.</i> (2004)
Hardwoods stems	50	40	20	Sun (2002)
Softwood stems	45	35	25	Sun (2002)
Forrageiras	45	31,4	12	Sun (2002)
<i>Bambusa vulgaris</i>	59,5	22,8	19,7	Barrichello (2000)

Fonte: Adaptado de Couto *et al.* (2004)

2.2.1. Celulose

A celulose, conforme representado pela Figura 2, é um homopolissacarídeo linear formado de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1-4). As cadeias de celulose agregam-se formando fibrilas e apresentam pontes de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila intra e intercadeias, o que resulta na cristalinidade da celulose. Essas regiões cristalinas, nas quais as cadeias estão ordenadas paralelamente, são separadas por regiões menos ordenadas, conhecidas como amorfas (GALDEANO, 2001). Na região cristalina, as fibras têm maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação (absorção de solvente) que na região amorfa, onde a fibra possui sua maior flexibilidade (VÁSQUEZ *et al.*, 2007).

Figura 2 - Representação da estrutura química da celulose.

Fonte: Adaptado de Chawla e Knatt (2015)

O índice de cristalinidade e o grau de polimerização são propriedades importantes para a classificação dos polímeros celulósicos. O grau de polimerização informa a frequência relativa de ligações glicosídicas internas e terminais, disponíveis para atuação de celulasas.

Pode ser definido com base no número médio de monômeros e no peso médio do polímero, assim como inferido a partir de sua viscosidade. Já o índice de cristalinidade está associado à reatividade do substrato e pode ser quantificado pelo método de difração de raios X (D'ALMEIDA, 1988). Estas características, juntamente com o envoltório de lignina, conferem a macromolécula celulose grande resistência à hidrólise, o que representa um grande desafio para a utilização dos materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas, como a produção de etanol de segunda geração (ARANTES; SADDLER, 2010).

2.2.2. Hemicelulose

As hemiceluloses (xilanas, arabinanas, arabinoxilanas, mananas e galactomananas) consistem em polissacarídeos de baixa massa molecular (100-200 unidades glicosídicas), que diferentemente da celulose não contém regiões cristalinas, entretanto são altamente associadas devido a ligação de celulose e lignina. Devido a sua variedade de ligações, de ramificações e diferentes unidades monoméricas, esta estrutura é complexa em relação a celulose (SILLS *et al.*, 2011). Este polímero é composto de cadeias ramificadas de açúcares, cujas as unidades incluem aldopentoses, como D-xilose e L-arabinose, e aldo-hexoses, como D-glicose, D-manose e D-galactose. Hemiceluloses possuem acetatos e substituintes na cadeia principal e ramificações, como L-arabinofuranosila, ácido D-glicurônico, ácido D-galactourônico e ácido α -D-4-O-metilglicurônico. Isso fez com que a estrutura hemicelulósica apresentasse uma complexidade maior e com maior configuração, conforme apresentado na Figura 3 (BON *et al.*, 2008).

A principal hemicelulose estudada é a xilana, por ser o segundo polímero mais abundante na parede celular. Tal heteropolissacarídeo é formado por uma cadeia principal de resíduos de D-xilopiranosose unidos por ligações do tipo β -1,4 contendo cadeias laterais nas posições 2 e 3 de resíduos de beta-L-arabinofuranose, ácido D-glucurônico ou grupamento acetil (COUGHLAN; HAZLEWOOD, 1993). As xilanas são nomeadas de acordo com a ramificação presente na cadeia central, sendo classificadas em arabinoxilanas, glucuronoxilanas, arabinoglucuronoxilanas e glucuronoarabinoxilanas (COUGHLAN; HAZLEWOOD, 1993).

Figura 3 - Componentes da fração hemicelulose.

Fonte: Adaptado de Morais, 2005

2.2.3. Lignina

A forma tridimensional da lignina é uma macromolécula formada por unidades de *p*-propilfenol, com metoxila no anel aromático, unidas por ligações do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si. Sua estrutura baseia-se em quatro principais compostos (Figura 4), sendo: unidade fenilpropânica, álcool trans-para-cumárico, álcool-trans-coniferílico e álcool-trans-sinapílico, também chamados de monolignóis (Figura 4) (SUHAS *et al.*, 2007).

Figura 4 - Unidade básica fenil-propânica e álcoois precursores da lignina.

Fonte: Adaptado de Fengel e Wegener, 1984

Diferentemente da celulose e hemicelulose a lignina não está relacionada a estrutura do carboidrato. Entretanto desempenha papel de aumentar a resistência do vegetal em relação a ação enzimática, dificultando o acesso à celulose. Junto com a pectina e hemicelulose, a lignina atua no preenchimento dos espaços nas fibras de celulose (FERRAZ, 2001).

Por mais que pesquisas revelem que a composição das moléculas de lignina seja diferente nas plantas, a estrutura tridimensional dessas moléculas ainda permanece parcialmente desconhecidas. Outro fator importante é que as vegetais com maior quantidade de lignina possuem uma maior rigidez e impermeabilidade, assim como a cana-de-açúcar (SUHAS *et al.*, 2007; VANHOLME *et al.*, 2010).

2.3. Pré-tratamentos da biomassa vegetal

A biomassa lignocelulósica apresentam resistência a degradação por enzimas. A biomassa “in natura” possui lignina em sua composição, além de uma cristalinidade e polimerização dos demais componentes que impedem a quebra e, consequentemente, a hidrólise da parede celular. A maioria dos trabalhos apresenta a quantidade de ferulato na lignina e seu grau de ligação com a hemicelulose ocasiona tal recalcitrância, entretanto ainda não se tem um acordo da comunidade científica sobre a causa principal da lignina causar essa resistência (KUMAR; SHARMA, 2017).

Objetivando reduzir esta resistência do material lignocelulósico, bem como separar os principais constituintes da biomassa vegetal, o pré-tratamento é uma etapa fundamental para o uso de materiais lignocelulósicos em bioprocessos, aumentando a acessibilidade da enzima na biomassa, facilitando a ação da mesma. Por exemplo diferentes estudos apresentam a vantagem da remoção da lignina colocando uma relação direta com a quebra da celulose a partir de enzimas (LINI *et al.*, 2018), fazendo as mesmas apresentem maior ação na conversão dos polímeros em açúcares fermentescíveis (ZHENG *et al.*, 2018).

Os pré-tratamentos mais comuns são os físicos como os de ação mecânica (lascamento, moagem, esmerilhamento, lascamento, etc.), extrusão mecânica, irradiação de micro-ondas, ultrassonicação, pirólise, cavitação hidrodinâmica, etc. (RUIRUI *et al.*, 2010; PULIGUNDLA *et al.*, 2016; KUMAR; SHARMA, 2017; TERAN-HILARES *et al.*, 2017). Já os pré-tratamentos químicos envolvem o uso de diferentes produtos químicos para a separação dos principais constituintes, como por exemplo ácido diluído, álcali moderado, ozonólise, organosolv e líquidos iônicos. (SILLS; GOSSETT, 2011; BEHERA *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016; TERAN-HILARES *et al.*, 2017; LINI *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*,

2018). Outra classe de pré-tratamento é o físico-químico, em processo como a explosão de vapor, água quente líquida, oxidação úmida, pré-tratamento de sulfito, pré-tratamento à base de amônia, explosão de CO₂ e outros (SHARMA *et al.*, 2015; XU *et al.* 2016; MITTAL *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2018). No pré-tratamento biológico, por sua vez, utiliza-se biocatalizadores (microrganismos e enzimas) com propriedades específicas (PAYE *et al.*, 2016; MULAT *et al.*, 2018). Adicionalmente, estudos apontam a nanotecnologia para pré-tratamentos, sendo os mais comuns a aplicação de nanopartículas funcionalizadas com ácido e o pré-tratamento alcalino híbrido de cisalhamento nanoescala (PENA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013; 2014; de OLIVEIRA *et al.*, 2017).

2.3.1. Sacarificação enzimática

A sacarificação da biomassa a partir de enzimas é vantajosa devido a reação ser específica no substrato e não gerar compostos tóxicos à fermentação. As hidrólises enzimáticas são conduzidas em condições determinadas de temperatura e pH, sendo normalmente temperatura entre 45-55 °C e o pH entre 4-6, demandando menor custo e energia em relação aos processos químicos (principalmente ácidos) (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006). Entretanto, o alto custo das enzimas torna a sacarificação enzimática um dos maiores desafios na produção de açúcares fermentescíveis em escala industrial, fazendo com que haja maiores estudos para reduzir o seu custo de produção e maximização da atividade dessas enzimas.

Atualmente as pesquisas visam obter novos microrganismos produtores de celulasas e hemicelulasas os quais utilizam substrato de resíduos agroindustriais para produção de enzimas, realizando *screening* enzimático. A etapa posterior baseia-se em otimizar a produção dessas enzimas a fim de obter a melhor atividade enzimática para um substrato específico, onde são estudados a temperatura, pH, agitação e concentração de enzimas, a fim de obter-se coquetéis enzimáticos. Um coquetel enzimático depende do tipo de substrato a ser hidrolisado e de suas propriedades (temperatura, pH, inibição pelos produtos secundários gerados e ligação direta com a biomassa), além da atividade sinérgica na despolimerização de celulase e hemicelulase do material lignocelulósico. Entretanto a quantidade de enzimas em um coquetel enzimático em relação a sua capacidade de hidrólise deve ser levada em consideração (VAN; DYK; PLETSCHE, 2012), uma vez que enzimas pouco robustas e com pequena atividade enzimática podem ter menor eficiência ao comparado com outras mais robustas, porém com maior atividade. Para a hidrólise da biomassa lignocelulósica ainda não se tem proporções exatas sobre a quantidade de enzimas necessárias em um

coquetel, devendo-se levar em consideração o sinergismo, adequação a biomassa e sua composição, e tipo de pré-tratamento (ALMEIDA, 2013). Adicionalmente a presença de enzimas acessórias passa a ser muito importante para formular um bom coquetel enzimático, devido a elas aumentarem a eficiência por sinergia, elevando a sacarificação enzimática.

Estudos apontam que as hemicelulases podem contribuir para uma maior eficiência de hidrólise de biomassa, ao atuar sobre resíduos de hemicelulose liberando mais açúcares fermentescíveis (BERLIN *et al.*, 2007). A determinação da concentração de hemicelulases nos coquetéis enzimáticos ainda não é um consenso na indústria e no meio acadêmico, devido a enzima ser específica para uma determinada composição da biomassa. Por exemplo as endoglucanases e exoglucanases podem influenciar na sacarificação enzimática devido aos produtos finais de hidrólise, uma vez que a celobiose e a glicose são inibidores de celulasas e hemicelulases (DUFF; MURRAY, 1996). Olofsson *et al.* (2008) sugerem que a sacarificação e a fermentação simultânea podem amenizar a inibição enzimática, devido aos produtos inibidores serem consumidos na mesma etapa de produção (BALLESTEROS *et al.*, 2004). Contudo esse processo apresenta desvantagens, sendo a principal delas a aplicação de um pH e temperatura as quais sejam exequíveis tanto para a hidrólise enzimática quanto para o microrganismo (SILVA, 2010).

De fato, a lignina tem sido um dos maiores fatores limitantes para a hidrólise enzimática, devido a sua redução da atividade de celulasas e hemicelulases por serem uma barreira física e estarem ligadas ao complexo carboidrato-lignina bem como sua distribuição na biomassa lignocelulósica evitando a distribuição homogênea de celulose e hemicelulose no complexo (VAN; DYK; PLETSCHKE, 2012). Neste contexto, a etapa de pré-tratamento é fundamental para a hidrólise enzimática, a fim de remover o máximo possível de lignina para o aumento da digestibilidade enzimática. Novas tecnologias para sacarificação enzimática são estudadas atualmente a fim de elucidar pesquisas no âmbito sinérgico das celulasas, como no âmbito de função dos módulos de ligação a carboidratos (MLC), caracterização química do substrato e da enzima (FALKOSKI *et al.*, 2012). Em suma, todos os estudos envolvidos para produção e melhoramento da ação de celulasas são importantes para o melhoramento da produção de bioprodutos a partir de açúcares do material lignocelulósico, ressaltando a produção, aplicação, ação de celulasas de diferentes microrganismos, diferentes substratos e diferentes condições de fermentação.

2.4. Características gerais de processos fermentativos

Os processos mais usados na indústria para produção de enzimas por microrganismos são fermentação no estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSb), diferenciando-se no parâmetro humidade presente no meio (CASTRO; PEREIRA, 2010). A base para fermentação em estado sólido consiste no crescimento de microrganismos sobre suportes com pouca disponibilidade de água livre no meio de cultura, consistido apenas pelo material sólido, em um material que provém fonte de carbono e energia e enriquecido com solução de nutrientes livres (BHANU-PRAKASH *et al.*, 2008; DIORIO *et al.*, 2008). Os microrganismos produtores de enzimas possuem requerimentos bem específicos no que se diz a disponibilidade de água, que são essenciais para seu crescimento. Dependendo do microrganismo, a demanda de atividade de água é diferente, fazendo com que eles cresçam de forma distintas quando submetidos em fermentações sólidas ou fermentações líquidas (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000). De fato, a água disponível é um fator crucial na fermentação, sendo necessária na difusão de nutrientes do meio de cultura e sua absorção pelo microrganismo, manutenção de estruturas proteicas, amparo da estrutura lamelar e permeabilidade da membrana plasmática, além de fazer excisão de metabólitos (CASTRO; PEREIRA, 2010). A fermentação submersa consiste no substrato estar em partícula e estar dissolvido ou suspenso no meio de cultura, apresentando vantagens como fácil controle dos parâmetros como pH, temperatura, presença de luz, controle de substratos, dentre outros.

Esse processo pode gerar muito resíduo em relação a quantidade de produto gerado nessa configuração a água varia entre 95-99% da massa total do material a ser fermentado (SANTOS, 2012). Esse tipo de fermentação apresenta como principais vantagens, o fácil acompanhamento da formação do produto e consumo do substrato e o controle dos parâmetros fermentativos como pH, temperatura, oxigenação e esterilidade (MITCHELL, 2000; HOLKER; LENZ, 2004).

Dentre as características primordiais para um processo fermentativo, o pH do meio age na proporção de enzimas secretadas e sua estabilidade pelo microrganismo e sua morfologia (PANDEY, 2003). As reações metabólicas do microrganismo são altamente dependentes do pH, sendo as suas variações dentro do processo e a composição do meio de cultura são de suma importância, tanto para FSm quanto para FES, fazendo com que tenha-se uma faixa de pH que o microrganismo pode suportar e um pH ótimo para a secreção enzimática ser a melhor possível (PERAZZO; NETO, 1999; DOELLE *et al.*, 2002; PANDEY, 2003).

Outro fator importante para os processos fermentativos é a temperatura, que influencia no crescimento microbiano e, conseqüentemente, na formação de bioprodutos. A energia gerada pelo calor pode ser primordial no metabolismo e afetar a produção devido a tolerância do microrganismo a determinada temperatura e sua atividade ótima na mesma (PINTO, 2003), sendo que em alguns casos (como na FES) é necessário a remoção do calor (SATO; SUDO, 1999) e a homogeneização do oxigênio dissolvido dentro do processo (PALMA, 2003).

2.4.1. Processos Fermentativos para Produção Enzimática

Enzimas são cadeias compostas por polímeros de aminoácidos interconectados que fazem reações de biocatálise (ROSA, 2002). Sua atividade consiste em elevar ou reduzir a velocidade da reação sem participar diretamente desde que seja termodinamicamente possível. Harger *et al.* (1982) define enzimas como biocatalisadores de estrutura proteica globular terciária ou quaternária, as quais não suportam tanta variação de temperatura, cuja função é reduzir a barreira energética de uma reação, fazendo com que acelerem a velocidade de uma reação química termodinamicamente possível. Enzimas também atuam nas vias metabólicas, em várias funções de diversos organismos, sendo essenciais para o metabolismo, principalmente no que diz de proteção de uma infecção do hospedeiro, deterioração de alimentos e de matéria-orgânica (RASUL *et al.*, 2015).

Para a produção de enzimas deve-se propiciar um “meio indutor”, contendo um ambiente favorável à sua produção (tais como temperatura, pH, agitação e substrato) que é específico para cada microrganismo (CONTESINI *et al.*, 2010; IFTIKHAR *et al.*, 2010; LI; ZONG, 2010). Bactérias e leveduras, por serem unicelulares, possuem uma produção maior em meio líquido devido a sua facilidade de absorver nutrientes, diferente de fungos filamentosos, que tem capacidade maior de produção quando em estado sólido que é bem próxima a forma o qual é encontrado na natureza (SHARMA *et al.*, 2001; LI; ZONG, 2010), entretanto em condições laboratoriais deve-se considerar a dificuldade de um meio sólido de separação de produto e metabólitos que podem inibir a produção de enzimas, além da temperatura gerada pelas reações bioquímicas do microrganismo e a agitação que pode danificar os micélios (LI; ZONG, 2010).

Produção de enzimas é uma etapa de alto custo para a hidrólise enzimática de materiais celulósicos, principalmente em escala industrial, também devido ao valor agregado da biomassa a ser utilizada na produção destes biocatalizadores, tornando o meio de cultura primordial na eficiência e custo benefício do processo fermentativo

(FERNANDES, 2006; DAMASO *et al.*, 2008). Industrialmente a Fsb apresenta maior versatilidade no controle de temperatura, oxigênio dissolvido, além de agregar valor à subprodutos lignocelulósicos para produção dos bioprodutos (PINTO *et al.*, 2005).

2.4.1.1.Fermentação submersa para a produção de celulase

Um dos principais desafios da fermentação para produção de enzimas tem sido reduzir o tempo de fermentação com uma maior produtividade, os quais são dependentes da temperatura e o pH ótimo de ação, específico a cada enzima produzida (RYU *et al.*, 1979). Outro fator é a inibição da ação enzimática por glicose e celobiose, causando repressões metabólicas no microrganismo reduzindo sua produção enzimática (FENNINGTON, 1984; KAWAMORI, 1985). Por outro lado, fonte de carbono também constitui um fator importante para produção de enzimas devido ao seu custo, levando a pesquisas migrarem para o âmbito de utilização de resíduos lignocelulósicos como bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana-de-açúcar, sabugo de milho, resíduos da indústria de papel e outros materiais (RECZEY *et al.*, 1996; SZABO *et al.*, 1996; ROMERO *et al.*, 1999; BELGHITH *et al.*, 2001; HECK *et al.*, 2002; WEN *et al.*, 2005). Adicionalmente o fator morfológico e a concentração de células ou hifas, no caso de fungos filamentosos, é importante para a produtividade de enzimas como bioprodutos. Entretanto ainda não há um consenso da comunidade científica nessa relação, mesmo que o comportamento dos microrganismos seja essencial (GUTIÉRREZ *et al.*, 2003), sendo os fatores físico-químicos mais estudados por interferirem tanto na produtividade quanto na variação (GRIMM *et al.*, 2005).

2.5.Características enzimáticas

A biossíntese de enzimas pode ocorrer concomitantemente ao crescimento celular, ou seja, quanto maior a biomassa maior a quantidade de enzimas produzidas, e quando não há uma concomitância entre aumento na produção de enzimas e formação de novas células que ocorre, principalmente, devido a estresses ambientais do organismo (SCHIMIDELL, 2001). O tipo de metabolismo (catabolismo ou anabolismo) é determinado pelo tipo de enzima encontrado na célula, além dos substratos e a energia de ativação a ser usada por essa enzima (PROZYN INDÚSTRIA E COMÉRCIO, 2012). Enzimas são definidas como um complexo de proteínas (denominado haloenzima) que possuem uma estrutura polimérica definida, contendo um centro ativo (apoenzima) podendo conter um grupo não proteico, denominado coenzima ou cofator (BEESON *et al* 2015; KÜES, 2015). O poder de reação das enzimas baseia-se em suas condições específicas de pH, temperatura, força iônica do meio e o

substrato específico (MEDIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008). As enzimas tendem a ser específicas em relação ao substrato, formando a relação enzima-substrato de forma singularizada para formação do produto. Essa singularidade deve-se a estrutura da proteína ter cadeias e arranjos peptídicos que formam a cinética enzimática, dando especificidade ao arranjo da molécula em relação ao substrato (KIELING, 2002). Essa especificidade da reação fez com que a comunidade científica dividisse as enzimas em classes: oxiredutases (reação de oxido-redução), transferases (reações de transferência de grupos entre moléculas), hidrolases (reações de hidrólise), liases (formando ou desfazendo ligações duplas), isomerases (reações de isomerização) e ligases (catálise da ligação de duas moléculas com hidrólise simultânea de ATP) (LARTIGUE, 1975; KENNEDY; CABRAL, 1987; WHITAKER, 1994; KÜES, 2015).

As enzimas hidrolíticas são as mais comuns em processos industriais, por ter alta capacidade na degradação de materiais lignocelulósicos, como nas indústrias têxteis (amilases, celulasas, pectinases), alimentícia (celulase, lactase, lipase, pectinase, protease) e papel (lipase, xilanase) (OLIVEIRA *et al.*, 2006). As enzimas em microrganismos podem ser subdivididas em dois tipos: extracelulares (eliminadas para fora da célula) e intracelulares (retidas no interior da célula) (KENNEDY; CABRAL, 1987).

As enzimas também podem ser degradadas por diversos fatores, como presença de proteases no coquetel enzimático, temperatura, presença de luz entre outros. Consequentemente, a indústria comercializa com aditivos protetores da enzima, como inibidores de protease, mantendo em temperaturas baixas e embalagem apropriadas, evitando a inativação do produto em estoque (ZANIN; MORAES, 2004).

2.6. *Aureobasidium* sp

O microrganismo *Aureobasidium pullulans* (Figura 5) é um fungo, leveduriforme, que pode ser encontrado em diversos ambientes. Este microrganismo possui uma grande importância na biotecnologia para a produção de diferentes enzimas, pululana, além de ser usado no controle biológico de doenças de plantas, especialmente doenças de armazenamento (COOKE *et al.*, 1959; RALE *et al.*, 1979; DOMASCH *et al.*, 1980).

O *Aureobasidium pullulans* foi taxonomicamente caracterizado primeiramente por Hoog e Yurlova (1994), com base em sua morfologia e fisiologia nutricional (diferenças de crescimento com galactitol, glucono- δ -lactona, creatina e creatinina e liquefação de gelatina). Tal espécie apresenta variabilidade em suas propriedades morfológicas e fisiológicas, sendo que três variedades têm sido descritas de maneira mais abrangente por

Viala e Boyer (1891) com *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans*, Hermanides-Nijhof (1977) com *A. pullulans* var. *melanogenum*, ambos com distinção pela descoloração da cultura e Yurlova e de Hoog (1997) com *A. pullulans* var. *aubasidani* com produção de EPS (glucanos com ligações α -1,4-D-, β -1,6-D- e β -1,3-D-glicosídicas).

Figura 5 - (A) Imagem própria do *Aureobasidium pullulans* cultivado em YMA. (B) Imagem do *Aureobasidium pullulans* cultivado em PDA

Fonte: Dayari et al. (2011)

Este fungo é um organismo oligotrófico que pode ser encontrado em ambientes aquáticas, como a filosfera (ANDREWS *et al.*, 1994), banheiros, e alimentos (SAMSON *et al.*, 2004). Também pode ser encontrado em ambientes osmoticamente estressados, como águas hipersalinas (GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2000), e rochas (URZI *et al.*, 1999). Devido à produção de grandes quantidades de propágulos semelhantes a leveduras, este fungo se dispersa globalmente, embora tenha sido pouco relatado em ambientes frios, também devido a maioria das investigações sobre a ocorrência e diversidade de fungos no frio serem em solos antárticos congelados e ao *permafrost* siberiano (ABYZOV, 1993, BABJEVA; RESHETOVA, 1998, DEEGENAARS; WATSON, 1998; GOLUBEV, 1998; MA *et al.*, 1999, 2000, 2005; PRICE, 2000; MARGESIN *et al.*, 2002; ONOFRI *et al.*, 2004; VISHNIAC, 2006; VISHNIAC; ONOFRI, 2003).

Durante estudos feitos por Butinar *et al.* (2007, 2008) e Sonjak *et al.* (2006), fungos do tipo *Aureobasidium* sp foram encontrados entre as micóticas dominantes. Adicionalmente possuem capacidade adaptativa conhecida a baixa atividade de água (aw) e condições oligotróficas, mostrando que o gelo de origem criocarstica e as formações de gelo

subglacial em ambiente glaciares polietérmicos constituem um potencial habitat natural dessa levedura (ZALAR *et al.*, 2008).

Devido à produção de melanina, é popularmente conhecido como “fermento preto”. Ele começou a ser classificado em fungos imperfeitos, família *Moniliales* (BUTINAR *et al.*, 2008) e recentemente como ascomicetos, embora não tenha sido encontrado um estágio perfeito. Outra classificação denomina-os da família *Dothideales*, demonstrando que ainda não existe uma terminação fixa sobre a terminologia deste organismo, devido a sua grande variação morfológica. Este organismo apresenta polimorfismo em que pode crescer como um fermento ou como um micélio, o que depende das condições ambientais. Uma delas é a formação de clamidósporos de cor escura. Por exemplo, Ramos e Garcia (1975) descreveram o ciclo vegetativo do *A. pullulans* e as condições ideais para conversão de uma forma a outra, sendo que as colônias são inicialmente lisas e, eventualmente, tornam-se lodosas. O processo de crescimento celular começa com coloração amarela, creme, rosa claro ou castanho claro, as colônias tornam-se enegrecidas devido a produção de clamidósporo numa fase posterior. Já as hifas são hialinas e de paredes finas (entre 2-16/micromilímetros de largura), com células largas e longas, formando um micélio resistente e compacto, também podem ser reconhecidos por conídios e pela presença de cadeias lobadas de paredes grossas de clamidiosporos.

A. pullulans é industrialmente importante devido sua capacidade de produzir um polissacarídeo "pululana" (BENDER, 1959) e pelo seu revestimento em embalagem, como ingrediente alimentar, lentes de contato, fabricação de condensadores dielétricos, emulsificações de cosméticos (SUGIMOTO *et al.*, 1977; HIMI *et al.*, 1981), substrato modelo para desramificação de amido (GOLDSTEIN *et al.*, 1980). Devido a sua mudança morfológica dependente de condições ambientais, este microrganismo pode ser usado como indicador ambiental devido a perturbações químicas, físicas e microbiológicas (MOWELL *et al.*, 1985; COONEY *et al.*, 1989).

2.6.1. Enzimas de *Aureobasidium pullulans*

Dentre as enzimas mais estudadas de *Aureobasidium pullulans*, verifica-se a frutofuranosidase, xilanase, glicoamilase e outras enzimas, como no caso do estudo a celulase. Tal fato agrega-se importância para o microrganismo em microbiologia aplicada, sendo que sucrase [beta-d-Fructo-hidrolase de D-frutofuranosido, invertase E.C. (3.2.1.26)] é geralmente produzido pela lise da levedura células. No entanto, muitas leveduras e fungos secretam sacarase para o meio. Na ausência de surfactantes, este fungo chega a ter 290 vezes

mais rendimento com monopalmitato de sacarose e Tween 80 do que aqueles em culturas cultivada em sacarose (REESE *et al.*, 1971). Até o trabalho de Gilbon (1986) a literatura pertinente não havia apresentado atividade de celulase, sendo que muitas cepas desse microorganismo não produzem quantidade de enzima suficiente para um estudo na área.

2.6.2. Enzimas celulolíticas

O custo da enzima é primordial para viabilidade da comercialização deste produto, derivando quase 50% do custo total da hidrólise do material lignocelulósico (EVELEIGH, 1987). As vantagens de seu uso na indústria são sua ampla atividade específica para substrato sem realizar reações paralelas indesejáveis, não fazendo necessário altas temperaturas e grandes variações de pH, o que não confere nas hidrólises não enzimáticas (PARK, 2003).

Em geral os microrganismos produtores de tais enzimas secretam uma variedade de enzimas celulolíticas, chamado de complexo de celulases, que agem de maneira distinta na biomassa de forma sinérgica, garantindo uma melhor hidrólise da celulose a fim de torna-la um monômero metabolizável para a célula (BEGUIN, 1990). A principal enzima é a celulase, que possui uma variedade dividida de acordo com sua reação, assim como explicado no item 2.6.3.

2.6.3. Celulases

A capacidade dos microrganismos de assimilar matéria orgânica depende da sua habilidade em produzir as enzimas necessárias para a degradação do substrato (TUOMELA *et al.*, 2000). De fato, microrganismos capazes de degradar celulose produzem uma gama de enzimas com diferentes especificidades, que trabalham em conjunto, conhecidas como celulases.

Celulases são enzimas que hidrolisam as ligações do tipo β -1,4 glicosídicas da celulose um abundante componente da parede de células vegetais, sendo classificadas de acordo com a *Enzyme Commission* (EC) com o código 3.2.1.x. Esse grupo de enzimas hidrolisam as ligações glicosídicas na matriz celulósica gerando como produtos primários glicose, celobiose e celo-oligossacarídeos (SINGHANIA *et al.*, 2010).

A transformação bioquímica da molécula de celulose durante sua biodegradação por microrganismos é catalisada por um sistema de enzimas extracelulares que compõem o complexo celulolítico (celulase) (ACHARYA; CHAUDHARY, 2012). Os três componentes de celulases são responsáveis pela despolimerização da celulose, sendo este as endoglucanases (EnG), exoglucanases (ExG) e β -glicosidases (BG) (SINGHANIA *et al.*,

2010). Estas três classes de enzimas, em conjunto, apresentam especificidade por ligações β -1,4 e sinergismo na atuação, sendo tal mecanismo de hidrólise o mais aceito (SINGHANIA *et al.*, 2010).

As endoglucanases (EnG) são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose. Tais enzimas hidrolisam as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, clivando ligações β -1,4 na região central da molécula e liberando açúcares e oligossacarídeos (LYND *et al.*, 2002).

O grupo das exoglucanases é constituído pelas celobiohidrolases do tipo I e II (CBHs I e II) e pelas glucanohidrolases (GHs). Essas enzimas, embora pouco reportadas, possuem especificidade de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois são capazes de liberar glicose diretamente do polímero (LYND *et al.*, 2002). Essas enzimas atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose (CAO; TAN, 2002). As celobiohidrolases do tipo I hidrolisam terminais redutores, enquanto que as do tipo II hidrolisam terminais não redutores.

As enzimas β -glicosidases, conhecidas também como celobiasas, possuem propriedade de hidrolisar celobiose e alguns oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND *et al.*, 2002; LYND; ZHANG, 2002). Segundo Lynd *et al.* (2002), quando atuam conjuntamente, as enzimas celulolíticas apresentam um rendimento melhor que a soma dos rendimentos individuais. De acordo com os autores, as enzimas celulolíticas não atuam individualmente no substrato celulósico e, conseqüentemente, não hidrolisam a celulose de maneira eficiente, sendo necessária uma ação de sinergismo. O esquema da Figura 6 apresenta a classificação das celulasas de acordo com o local onde agem na matriz celulósica.

Em bactérias anaeróbias, ocorre a presença de celulosossomos, termo introduzido primeiramente a partir do estudo da bactéria anaeróbica *Clostridium thermocellum* (DESV AUX, 2005). Os celulosossomos são definidos como um complexo multienzimático, que possui celulasas que atuam de modo agrupado. Os microrganismos que secretam os celulosossomos sobre o substrato são tipicamente encontrados em ambientes anaeróbicos, como trato digestivo de ruminantes (LYND *et al.*, 2002). A presença de celulosossomos em bactérias garante a adesão direta e específica no substrato de interesse, permitindo melhor eficiência na competição por nutrientes com outros microrganismos presentes na mesma biota e a proximidade entre a célula e a celulose (DESV AUX, 2005).

Figura 6 - Ação mecânica processual de todas as três celulasas no polímero de celulose. Hidrólise das fibras de celulose individuais para quebrá-lo em açúcares menores por exocelulase, ruptura das interações não covalentes presentes na estrutura cristalina de celulose por Endocelulase e β -glucosidase finalmente hidrolisam os dissacarídeos ou celobiose em glicose.

Fonte: Chandel *et al.* (2012).

2.6.3.1. Estrutura

As celulasas possuem massas molares que abrangem um intervalo de 34 kDa a 250 kDa, pois podem ser sintetizadas como monômeros ou na forma de estrutura quaternária constituídas por várias unidades peptídicas (VAN; TILBEURGH; CLAEYSSSENS, 1985). A maioria das endoglucanases tem peso molecular entre 25 a 50 kDa, exoglucanases entre de 41 a 68 kDa, enquanto que as β -glucosidases são maiores, variando entre 165 e 182 kDa. Estudos envolvendo *Phanerochaete chrysosporium* apresentaram variação para esta espécie pode apresentar entre 28 e 37 kDa (endoglucanases) e 114 kDa (β - glucosidase) (ERIKSSON *et al.*, 1990).

A estrutura dessas enzimas é constituída por uma sequência complexa e específica de aminoácidos, sendo dividida em três regiões: o domínio catalítico (DC), que constitui a parte da molécula em que ocorre a catálise e abrange cerca de 90% do número total de aminoácidos da sequência peptídica; a região de ligação (RL), a qual contém uma pequena quantidade de aminoácidos altamente glicosilados, cuja função é ligar o domínio catalítico a uma terceira região constituída pelo módulo de ligação a carboidratos (MLC). Os MLCs são pequenos polipéptidos estáveis que podem conter de quarenta a cento e vinte aminoácidos e são localizados, na cadeia de aminoácidos da enzima (CASTRO, A; PEREIRA, Jr. N. 2010). As principais funções dos MLCs são: manter a enzima próxima ao substrato, de forma a aumentar a taxa de degradação do polissacarídeo; aumentar a especificidade da enzima na

atuação de regiões seletivas da molécula do substrato e romper interações químicas da cadeia do substrato, especialmente se essa apresenta elevada cristalinidade (LYND *et al.*, 2002).

2.6.3.2. Fontes e propriedades

As celulasas são encontradas em plantas, insetos, bactérias, fungos e arqueas (WATANABE; TOKUDA, 2010). Em um ecossistema típico de degradação de celulose, uma variedade de bactérias e fungos trabalha em conjunto com outros microrganismos para converter substratos celulósicos insolúveis em açúcares solúveis que são então assimilados pelas células (LYND *et al.*, 2002).

Em bactérias, existe a presença de microrganismos decompositores da celulose, tanto aeróbios como anaeróbios (SINGH; HAYASHI, 1995; LYND *et al.*, 2002). Em bactérias aeróbias, são descritos como produtores de celulasas o gênero *Cellulomonas*, espécies *Bacillus*, tais como *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus cereus* (SINGH; HAYASHI, 1995). Entre as bactérias anaeróbias estão os gêneros *Acetivibrio*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, capazes de formar celulosomas (LYND *et al.*, 2002; DESVAUX, 2005).

Os fungos são os microrganismos mais bem conhecidos como capazes de decompor a matéria orgânica em geral e, em particular, os substratos de celulose (MARCO, 2012). Atualmente, as celulasas comerciais ainda são derivadas de fungos, embora as celulasas bacterianas estejam se mostrando competitivas em relação à eficiência na hidrólise da celulose. O *Trichoderma reesei* é o mais conhecido produtor de celulasas em escala industrial e tem sido estudado desde sua descoberta, durante a Segunda Guerra Mundial, é considerado um poderoso fungo para a degradação de celulose cristalina, pelas características de poderem secretar grandes quantidades de celulase (acima de 100 g/L) com alta atividade específica (WILSON, 2009; GUSAKOV, 2011). Outras espécies, como *Humicola insolens*, são utilizadas como produtores de enzimas comerciais com diferentes propósitos (SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005).

Dentro de centenas de espécies de Zygomycetos, apenas certos membros do gênero *Mucor* tem apresentado atividade celulásica significativa. Em contraste, gêneros pertencentes às subdivisões Ascomycetos (*Bulgaria Chaetomium e Helotium*), Basidiomicetos (*Coriolus, Phanerichaete, Poria, Schizophyllum e Serpula*) e Deuteromicetos (*Aspergillus, Cladosporium, Fusarium, Penicillium e Trichoderma*) contêm um grande número de espécies celulolíticas (MARCO, 2012). Com o intuito de se utilizar as celulasas em processos industriais sob suas condições de melhor atuação, é imprescindível

que suas propriedades sejam determinadas, especialmente nos fatores cinéticos e físico-químicos (CASTRO; PEREIRA, 2010). De forma geral, as celulasas produzidas por fungos filamentosos apresentam valores ótimos de pH na faixa ácida (3,6-5,0), enquanto que bactérias chegam a produzir celulasas altamente ativas em valores de pH alcalinos (CASTRO; PEREIRA, 2010). Já as temperaturas ótimas para atuação encontram-se acima de 40 °C (CASTRO; PEREIRA, 2010).

Em relação a propriedades cinéticas, os valores das constantes K_m – Constante de Michaelis-Menten; e $V_{máx}$ – Velocidade máxima; em geral variam em ordem de grandeza, possivelmente devido à heterogeneidade das metodologias de quantificação, à forma de apresentação de seus valores, ao substrato utilizado e, principalmente, à origem do extrato enzimático utilizado (SHIN *et al.*, 2000; AIELLO; FERRER; LEDESMA, 1996).

As celulasas possuem uma ampla faixa de aplicações, sendo que sua utilização teve seu uso mais intenso nos primeiros anos da década de 80, primeiramente na indústria de alimentação animal, seguido na aplicação na indústria de alimentos. Subsequentemente, estas enzimas foram aplicadas na indústria têxtil e de lavanderia. Atualmente, as enzimas do complexo celulolítico estão classificadas em terceiro lugar como as enzimas que mais movimentam o mercado de enzimas devido às variadas aplicações no processamento de algodão, na reciclagem de papel, na extração de suco, no uso como enzimas detergentes e produção de aditivos para a alimentação animal. (SINGHANIA *et al.*, 2010).

Existe ainda uma tendência mundial para a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, buscando açúcares fermentescíveis para a produção de bioetanol em larga escala (ZHANG *et al.*, 2006). O uso de celulasas para este fim tem como entrave o custo de produção, que pode ser superado utilizando microrganismos geneticamente modificados (bactérias, leveduras e fungos) para a produção das enzimas (MARTIN, 2007). A expectativa é de que o mercado de celulasas seja superior a 400 milhões de dólares por ano, com a possível utilização dessas enzimas na hidrólise de palha de milho, para a produção de etanol de biomassa, nos Estados Unidos da América (ZHANG *et al.*, 2006).

Dentre outras aplicações de celulasas estão seu uso na indústria de alimentos, juntamente com hemicelulasas e pectinases, tais como: em processos de maceração enzimática; fermentação de cerveja e produção de vinho; extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais; produção de néctares de frutas e purês; alteração das propriedades sensoriais de frutas e vegetais e; extração de óleos. Estas enzimas também são plenamente usadas como aditivos na indústria de ração animal, indústria têxtil e indústrias de polpa e papel, assim como na agricultura e para propósitos de pesquisa (BHAT, 2000).

2.7. Análises Proteômicas e Secretômicas de celulases

Poucos estudos apontam a exata concentração molar de enzimas celulolíticas individualizadas produzidas a partir de microrganismos degradadores de lignocelulose, causando um efeito negativo na viabilidade de um coquetel enzimático (ADAV *et al.*, 2013). De acordo com Bows *et al.* (2008) para o estabelecimento de processos eficientes de utilização de materiais lignocelulosicos como matéria prima é fundamental uma compreensão precisa da composição qualitativa e quantitativa do secretoma fungico, devido ao seu perfil cinético e interações complexas com o substrato. Segundo esses autores e Ribeiro *et al.* (2012) a compreensão dos complexos enzimáticos ainda é um desafio para o uso de enzimas celulolíticas, sendo ainda um dos obstáculos a serem superados da biotecnologia industrial aplicada à biomassa. Nesse sentido, a análise proteômica serve como uma ferramenta valiosa na descoberta de novas enzimas ou complexos enzimáticos, dentre eles as enzimas celulolíticas, que são associadas a melhor desconstrução da estrutura lignocelulósica (BOUWS *et al.*, 2008; SALVACHUA *et al.*, 2013). Com o crescente desenvolvimento de metodologias que ajudem a elucidar o papel das proteínas em vários processos biológicos passaram a ter maior importância na descrição de proteínas ativas e componentes acessórios na degradação de polissacarídeos de paredes celulares de plantas (RIBEIRO *et al.*, 2012).

2.7.1. Análises proteômicas

O *screening* de novas cepas degradadoras de lignocelulose para uso em biorefinarias também é um foco das pesquisas em análises proteômicas (KUHAD *et al.*, 2016). Inúmeras cepas já foram isoladas e identificadas pelo seu secretoma, elucidando mecanismos de conversão lignocelulósica. Análises proteômicas comparativas de vários microrganismos lignocelulolíticos têm sido frequentemente realizadas para desenvolver coquetéis enzimáticos lignocelulósicos mais eficientes (ALFARO *et al.*, 2014). Os estudos tem foco na comparação de diferentes linhagens, matérias-primas, meios de cultura, concentração celular e atividade em diversos parâmetros físico-químicos (como pH e temperatura). Com isso pode ser obtido um conjunto de dados completo para o desenvolvimento de diretrizes práticas que selecionam o melhor coquetel enzimático com base nos dados do nível proteômico (GUO *et al.*, 2018).

2.7.2. Comparação entre cepas funcionais

As estratégias para obtenção de enzimas degradadoras de lignocelulose de microrganismos podem variar consideravelmente (MANAVALAN *et al.*, 2012; JI *et al.*, 2013). Em alguns casos podem variar significativamente entre cepas do mesmo microrganismo, sendo ele selvagem (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2014) ou cepas mutantes como *Trichoderma reesei* Rut C30 (COUTURIER *et al.*, 2012) e CL847 (JOURDIER *et al.*, 2013). Em geral os microrganismos não exibem um padrão secretor universal para enzimas lignocelulolíticas (GUO, 2018). Em relação a dados qualitativos e quantitativos de uma cultura Borin *et al.* (2015) e Gong *et al.* (2015) descobriram que *Aspergillus niger* secreta mais enzimas degradadoras de biomassa do que *Trichoderma reesei* sob as mesmas condições de teste. Entretanto, sob mesmas condições de cultivo o *Penicillium oxalicum* secreta mais celulasas que as demais anteriores (GLASS *et al.*, 2013), sendo que o *Aspergillus niger* secreta mais enzimas para conversão de xiloglucano do que *Penicillium oxalicum* e *Trichoderma reesei* (GONG *et al.*, 2015).

Em outros casos podemos ver que a composição secretômica enzimática entre microrganismos pode variar, como o secretoma de *Trichoderma asperellum* contendo hemicelulasas e β -glucosidasas mais diversas do que a [*Trichoderma reesei* (Marx *et al.*, 2013). Outro exemplo é do Adav *et al.* (2012a) descobriram que as glicosil hidrolases que são secretadas por *Trichoderma reesei* durante a degradação da celulose e lignocelulose exibiram significativamente maior expressão do que *Phanerochaete chrysosporium*.

Hori *et al.* (2013) observaram diferenças entre os secretomes de sete cepas de fungos que foram cultivadas em condições idênticas, incluindo as de fungos de podridão branca (*Bjerkandera adusta*, *Ganoderma* spp, *Phlebia brevispora*, *Dichomitus squalens* e *Trametes versicolor*) e fungos de podridão parda (*Fomitopsis pinicola* e *Wolfiporia cocos*). O fungo de podridão branca *Trametes versicolor* secretou menos enzimas hidrolíticas, porém apresentando mais lacase do que o *Coniophora puteana* (IRBE *et al.*, 2014). Portanto, fungos de podridão branca e fungos de podridão parda devem ter estratégias diferentes para o uso de enzimas hidrolíticas na degradação da celulose (HORI *et al.*, 2013). O resultado condiz com os trabalhos de Resch *et al.* (2013), Blume *et al.* (2013), Schneider *et al.* (2016), Adav *et al.* (2012a) que também identificaram diferenças entre as estratégias de de diferentes microrganismos para o uso de enzimas celulolíticas. Em geral, não é possível tirar conclusões dos estudos comparativos sobre como diferentes cepas selecionariam suas estratégias para secretar enzimas que degradam a lignocelulose.

2.7.3. Comparações de biomassa lignocelulósicas utilizadas em análises secretômicas como parâmetro

Várias biomassas lignocelulósicas têm efeitos diferentes na excreção de enzimas lignocelulolíticas por uma cepa específica (ADAV *et al.*, 2013b). Mäkelä *et al.* (2017) compararam os secretomas de *Podospora anserina* cultivada em cascas de sementes de algodão, cascas de soja e palha de trigo pré-tratada com ácido e observaram que os cascos de soja forneciam melhor substrato para a produção de coquetéis enzimáticos para degradação de materiais da parede celular vegetal. O mesmo pode-se dizer com Bengtsson *et al.* (2016), Bhalla *et al.* (2015), Kolbusz *et al.* (2014), Ma *et al.* (2016), onde o secretoma de seus microrganismos produzia secretomas diferentes em resposta a várias lignocelulósicas biomas que sofreram diversos tipos de tratamento. Estudos comparativos dos secretomas para cepas específicas cultivadas com diferentes fontes de lignoceluloses apresentaram diversas composições e não podem concluir informações generalizadas para a maioria das cepas até o presente.

2.7.4. Análise proteômica comparativa entre meios de cultura

Vários perfis enzimáticos podem ser obtidos a partir de uma única cepa que é cultivada em vários meios de cultivo. Larsbrink *et al.* (2017), Costa *et al.* (2016), Oliveira *et al.* (2015), Munir *et al.* (2015) e Rubio *et al.* (2016) mostraram em diferentes microrganismos e meios de cultivo que uma única cepa pode variar na produção de enzimas e, conseqüentemente, a composição secretômica dependendo das condições químicas e físicas do cultivo. Os estudos comparativos enfocando os efeitos do meio de cultura nos secretomas por uma única cepa não revelaram conclusão geral sobre o papel de composições dos meios de cultura em atividades de enzimas degradadoras de lignocelulose. A falta de conhecimento suficiente do desempenho enzimático sob várias condições de cultivo dificulta a comparação das produções ótimas de enzimas de várias linhagens e matérias-primas. O tempo de cultivo também está relacionada ao proteoma extracelular (exoproteoma). Zeiner *et al.* (2017) propuseram que a secreção sequencial de enzimas degradadoras de lignocelulose de *Alternaria alternata* e *Paraconiothyrium sporulosum* é concomitante com disponibilidade de recursos na fase de declínio de crescimento celular. Basotra *et al.* (2016) descobriram que a secreção sequencial de enzimas ligninolíticas por *Mycothermus thermophilus* ocorreu apenas dentro de 24 horas após o teste, enquanto Hori *et al.* (2014) realizaram uma análise proteômica comparativa do secretoma de *Ceriporiopsis subvermispora* em três, cinco e sete dias de incubação usando nano-LCMS/MS, e

observaram que a secreção da enzima era peroxidases, ariloxidase alcoólica e glicosídeo hidrolase no terceiro dia, endoxilânase, endoglucanase e celobiohidrolase no quinto dia e enzimas degradadoras de celulose, polissacarídeo lítico monooxigenase e celobiose desidrogenase no sétimo dia. Saykhedkar (2012) obteve resultados semelhantes de uma análise de enzimas degradantes.

Poucos estudos sobre a dependência de “espécies” enzimáticas e atividades sobre as condições de cultivo foram realizadas até o momento. Os secretomas de algumas cepas importantes que produzem enzimas lignocelulolíticas foram comparados a várias temperaturas e valores de pH. Tiwari *et al.* (2013, 2014) otimizaram cinco parâmetros (fonte de carbono, nitrogênio orgânico e inorgânico, surfactante e pH) para a secreção de enzimas hidrolíticas de *Phoma exigua* ITCC 2049 e observaram diferenças na composição do secretoma em todos os casos.

Atualmente acredita-se que análises proteômicas detalhadas revelaram ainda não geraram conclusões gerais sobre a dependência das condições de cultivo e dos secretomes secretados por várias linhagens. Em geral, os estudos de otimização propuseram condições ótimas específicas de cultivo que não são generalizadas para todas as espécies de microrganismos para secreção de enzimas lignocelulósicas.

2.7.5. Novos métodos proteômicos para análise de secretoma

A triagem e purificação de proteínas é trabalhosa, demorada e requer uma série de etapas para remover as proteínas contaminantes do secretoma (BERRIN *et al.*, 2017). Novos métodos foram desenvolvidos para purificar proteínas secretoras e remover proteínas contaminantes (proteínas intracelulares bacterianas) (GÖTZ *et al.*, 2015; HAON *et al.*, 2015; BENGTSSON *et al.*, 2016; RAI *et al.*, 2016a; SCHIMPF *et al.*, 2016). Os papéis das misturas enzimáticas dependem fortemente da abundância de cada enzima. No entanto, estimar com precisão a abundância das proteínas de várias amostras é uma tarefa assustadora. Um novo método para estimar a abundância de proteínas lignocelulolíticas através de múltiplas amostras através da multiplexação iTRAQ e determinação de emPAI tem sido desenvolvido (ADAV *et al.*, 2013c), porém até o presente momento não se encontram artigos que define o método. É de extremo interesse projetar a mistura enzimática ideal para a hidrólise da celulose e pode ser usado para comparar diretamente a abundância de proteínas em várias amostras (ADAV *et al.*, 2013c).

Novos métodos de triagem e identificação aceleram a análise proteômica para detalhar perfis de enzimas degradadoras de lignocelulose de várias amostras. Esforços adicionais para

adotar os novos métodos para triagem de novas estirpes e análise comparativa de vários coquetéis enzimáticos com base no entendimento do nível proteômico são necessários para melhor compreensão das próprias análises proteômicas.

2.7.6. Metasecretoma

Por definição metasecretoma é a análise do conjunto de proteínas totais e secretadas que compõem o secretoma de um consorcio ou comunidade microbiana (JIMENEZ *et al.*, 2015). A análise secretômica da comunidade microbiana degradadora da lignocelulose oferece inúmeras vantagens sobre a cultura de cepas puras convencionais, para quantificar com precisão as alterações na expressão de proteínas microbianas durante a degradação da biomassa lignocelulósica (BIANCO *et al.*, 2015). Jiménez *et al.* (2015) analisou o metasecretoma de uma comunidade microbiana degradadora de lignocelulose que se originou em um pré-inóculo único, mas posteriormente cresceu em várias fontes de carbono (palha de trigo, xilana e xilose), identificando, assim, diferentes tipos de glicosil hidrolases em cada uma das biomassas. Sendo assim pode-se inferir que o tipo de biomassa é preponderante para especificidade de do secretoma produzido por cada microrganismo.

2.7.7. Desafios e perspectivas

Os esforços atuais de pesquisa e desenvolvimento sobre aspectos proteômicos para coquetéis de enzimas degradadoras de lignocelulose podem ser demonstrados na Figura 7.

Figura 7 - Esquema da síntese dos recentes focos na indústria para obtenção de açúcares fermentescíveis.

Fonte: Adaptado SATARI *et al.* (2018)

Demonstração de plantas de biorrefinarias em todo o mundo operam principalmente com unidades de pré-tratamento biológico e unidades de sacarificação otimizadas. Os desafios para aplicações de enzimas em larga escala envolvem principalmente a alta demanda por energia para processos associados de pré-tratamento e custos de produção e aplicação de enzimas. Biomassa lignocelulósica origina-se em vários tipos de resíduos de plantas e pode ter estruturas, composições químicas muito diferentes e propriedades (RAMBO *et al.*, 2015; RINAN *et al.*, 2017; MANCINI *et al.*, 2018; SATARI *et al.*, 2018). A indústria de biorrefinaria deve combinar enzimas eficazes para matérias-primas lignocelulósicas (SKVARIL *et al.*, 2017), que podem variar de espécies de qualidade (WEI *et al.*, 2015). A triagem eficaz é um tópico emergente no refino de biomassa (LI *et al.*, 2017a), com o objetivo de igualar até mesmo os coquetéis de enzimas com especificações desconhecidas (KUBICEK; KUBICEK, 2016).

Espécies de fungos e algumas cepas bacterianas podem secretar enzimas que degradam a lignina (DASHTBAN *et al.*, 2010; KNEZEVIC *et al.*, 2013; BROWN; CHANG, 2014). Lacase, glucanase e celobiase são necessárias para o pré-tratamento biológico de enzimas externas da biomassa lignocelulósica, incluindo peroxidases (GUO *et al.*, 2018). A produção de enzimas externas degradadoras de lignina é de alto custo (KONG *et al.*, 2017) e a dosagem de enzimas externas para a hidrólise eficaz é tipicamente alta (ZABED *et al.*, 2017). O cultivo de cepas efetivas que aumentam a produção de enzimas ligninolíticas de determinado meio de cultura é sempre um tópico de interesse de pesquisa (LI *et al.*, 2017b, 2017c). No entanto, o uso de enzimas purificadas para fornecer coquetéis bem projetados para uma matriz lignocelulósica deslignificante ou o fungo de cultivo direto nessa matriz lignocelulósica é conduzido como exigido pelo aplicativo. O uso atual de enzimas de alta carga exige estratégias para reduzir a concentração e recuperação de enzimas. Como a despolimerização enzimática das redes de lignina geralmente não é um processo rápido (BAKER *et al.*, 2017), as enzimas que degradam a lignina só podem ser usadas diretamente se a matéria-prima for armazenada durante um tempo longo (portanto, é necessária uma grande quantidade) e o custo externo da enzima é baixo. Além disso, as enzimas secretadas por cepas funcionais podem variar com a forma de biomassa lignocelulósica no estágio de cultivo. A estratégia de secreção de cepas degradadoras de lignocelulose sugere a ausência de um coquetel enzimático universal que seja eficaz para a maioria das biomassas. Para fins práticos, portanto, a maioria dos estudos agora se baseia no pré-tratamento químico/físico seguido de sacarificação enzimática para produzir monômeros.

Estudos proteômicos detalhados de secretomas que são gerados por cepas funcionais devem fornecer informações úteis sobre a identificação de coquetéis enzimáticos eficazes e robustos para fins industriais (CATTANEO *et al.*, 2014; INOUE *et al.*, 2014). Por exemplo, Ravalason *et al.* (2012) sugeriram que a suplementação de celulase comercial GC220 por um sistema de enzimas secretoras pode melhorar a conversão de celulose por *Fusarium verticillioides*. Adav *et al.* (2012a) propuseram uma nova mistura de enzimas que continham diferentes configurações de glucanases para otimizar a hidrólise da biomassa lignocelulósica. Suwannarangsee *et al.* (2012) propuseram uma nova abordagem para otimizar o complexo enzimático ternário sinérgico. No entanto, uma análise sistemática com um conjunto de dados relativamente abrangente é necessária para realizar uma triagem prática de alto rendimento.

3. OBJETIVOS

3.2.Geral

Verificar coquetel enzimático celulolítico do microrganismo *Auereobasidium pullulans* em sua atividade de hidrólise de carboximetilcelulase e papel filtro visando a produção de enzimas a partir de resíduos agroindustriais e, posteriormente, verificar seu material secretômico a partir de análises por SDS-PAGE e LC/MS-MS.

3.3.Específico

- Verificar a potencialidade do uso do microrganismo *A. pullulans* para produção exocelular enzimas celulolíticas.
- Estudar a atividade enzimática do microrganismo *A. pullulans* utilizando diferentes fontes de carbono (carboximetilcelulose, bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana-de-açúcar e sabugo de milho) nitrogênio e concentração celular no processo fermentativo.
- Estudar, em processo utilizando variáveis de processo definidas, condições de temperatura e pH na reação das atividades enzimáticas do microrganismo *A. pullulans*.
- Analisar enzimas secretadas a partir de da abordagem ômica usando base de dados do UniProt e CAZy.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.2. Microrganismo

Foi utilizado o *Aureobasidium pullulans* LB 35 cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Fernando C. Pagnocca (UNESP) ao Laboratório de Bioprocessos e Produtos sustentáveis (LBIOS), sob coordenação do Prof. Silvio Silvério da Silva.

A levedura foi mantida em placas contendo o meio YMA (extrato de levedura, malte e ágar) composto por: glicose 1,0%, extrato de malte 0,3%, extrato de levedura 0,3%, peptona 0,5%, ágar 2%. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. Os repiques em meio YMA sólidos foram realizados em capela asséptica e mantidos em estufa

a 30 °C. Após o crescimento e das colônias, foram mantidos refrigerados a 4 °C e utilizados para preparo do inóculo em meio líquido.

4.3.Biomassas

As biomassas do presente estudo foram avaliadas em relação a sua potencialidade como fonte de carbono (bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana-de-açúcar e sabugo de milho) e nitrogênio (farelo de soja, farelo de milho e farelo de arroz).

4.3.1. Fontes de carbono

O bagaço de cana-de-açúcar e a palha de cana-de-açúcar foram gentilmente cedidos pela Usina agroindustrial Ipiranga, situada no município de Descalvado-SP, ao Laboratório de Bioprocessos e Produtos sustentáveis (LBIOS), sob coordenação do Prof. Silvio Silvério da Silva. O sabugo de milho foi provindo de Juiz de Fora-MG.

Primeiramente as fontes de carbono *in natura* foram secas em estufa a 60 °C *overnight*, e sua humidade foi medida a fim de se obter humidade menor que 10%.

4.2.1.1. Pré-tratamento alcalino

Visando a redução da lignina e recalcitrância bem como aumento da digestibilidade enzimática pelo aumento da porosidade da matéria-prima, realizou-se pré-tratamento alcalino destas biomassas.

As biomassas *in natura* sem alteração de granulometria foram pré-tratados com uma solução de hidróxido de sódio em autoclave a 121 °C e 1 atm. As condições de reação empregadas foram: 30 g de matéria *in natura*, volume de solução conforme a relação sólido-líquido de 1:10 (m/v), por 40 minutos e concentração de NaOH de 4% (FASANELLA, 2009).

Para essa etapa foram pesados 30 g de bagaço seco (umidade menor que 10%) em frascos Erlenmeyer e adicionados solução de 4% de hidróxido de sódio, na proporção de 1:10 (massa/volume). O material foi homogeneizado e colocado em autoclave a 121 °C por 40 minutos. Após o término do pré-tratamento as biomassas foram filtradas sob bomba a vácuo até a retirada da maior parte do líquido presente. Posteriormente, o material pré-tratado, foi lavado com mais água destilada até o desaparecimento da coloração amarela a fim de remover o restante da lignina presente, até pH neutro medido por fitas de pH (Merck). Após este procedimento, foram submetidas a secagem na temperatura ambiente e moagem a fim de obter tamanho menor que 20 mesh, em um moinho de facas.

4.4.Fontes de nitrogênio.

As fontes de nitrogênio foram separadas em dois grupos: as sintéticas e não sintéticas, a fim de se obter uma melhor comparação dos que são presentes como reagentes em laboratório com as fontes de nitrogênio providas de subprodutos agroindustriais.

4.4.1. Fontes de nitrogênio sintéticas

As fontes de nitrogênio uréia e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ da empresa SIGMA-ALDRICH e a peptona da empresa KASVI foram usados no experimento de fontes de nitrogênio sintéticas por não serem resíduos agrícolas e providas de indústria de produtos laboratoriais.

4.4.2. Fontes de nitrogênio não sintéticas

As fontes de nitrogênio farelo de soja e farelo de milho foram adquiridas na Cooperativa de Laticínios Serramar em Lorena-SP. O farelo de arroz foi cedido pela empresa Beneficiadora de Arroz Irmãos Ligabo em Canas-SP. Os farelos foram armazenados em sacos plásticos individualmente e mantidos no refrigerados a 4 °C, para evitar sua contaminação de microrganismos e insetos. No momento do uso eram retiradas e secas em estufa a 60 °C *over night* até reduzir a umidade para menor que 10%. O teor de umidade foi determinado a partir de balança analítica sob temperatura de 105 °C por 20 minutos com exposição do material à radiação infravermelha.

4.4.2.1.Pré-tratamento ácido

Os farelos de arroz, milho e soja, após terem seu teor de umidade determinados, foram submetidos à hidrólise ácida com 1% H_2SO_4 (m/v) e relação sólido-líquido com 20% de teor de sólidos, com base em massa seca. A hidrólise foi realizada em frascos Erlenmeyer a 121 °C por 15 minutos. No caso do farelo de arroz, também teve seu teor de lipídeos reduzido pela extração com etanol 96%, na proporção de 1:5 (s/l), sendo a mistura agitada e mantida em repouso por 15 minutos. Após esse processo, o material foi filtrado e o farelo foi seco a 60 °C, sendo posteriormente hidrolisado, conforme as condições citadas. Por fim foram moídos em moinho de facas até o tamanho ser menor que 20 mesh.

4.5. Teste de índice enzimático em placas

Para a determinação da atividade de CMCase e xilanase o *Aureobasidium pullulans*, foi previamente cultivado em caldo dextrose Sabouroud em shaker 30 °C e 200 rpm e posteriormente inoculado em placas de Petri contendo Ágar Meio Kasana (KASANA *et al*, 2008), que consistiu em 0,2% NaNO₃, 0,1% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄, 0,05% KCl, 0,02% de peptona e 1,7% de ágar, adicionado, ainda, de 0,1% (p/v) de Extrato de levedura, 0,5% (p/v) de fonte de carbono (CMC e XOS). As placas inoculadas foram incubadas por 72 horas a 30 °C e a cada 24 horas foi retirada uma medida. O controle foi feito nas condições de uma placa contendo microrganismo, porém sem fonte de carbono e em placa sem microrganismo com a fonte de carbono.

Após o tempo de incubação, as placas que apresentaram crescimento de colônias foram verificadas quanto a atividade de CMCase e xilanase (XOS). Para isso as mesmas foram cobertas com uma solução de lugol, e o tamanho do halo foi determinado e utilizado para a determinação do Índice Enzimático (IE) (MELO, 2000).

4.6. Avaliação do extrato enzimático bruto usando CMC como fonte de carbono

Para o experimento das atividades enzimáticas ao longo do tempo (Figura 2), foi transferido 1 mL do estoque de isolados para um pré-inóculo em 50mL de caldo dextrose Sabouroud em agitação 30 °C e 200 rpm por 48 horas. Posteriormente foi transferido $1,6 \times 10^8$ UFC para Erlenmeyer contendo 100 mL do meio mínimo Mandel com 1% da fonte de carbono (corboximetilcelulose) e mantido a 30 °C durante 96 h sob agitação a 200 rpm. Amostras foram retiradas a cada 24 horas com 5 minutos de repouso para decantação e retirado 2 mL do sobrenadante para o teste de Ghose (1987).

4.7. Processos fermentativos

A otimização da produção de celulasas foi usada três diferentes parâmetros: fonte de carbono, fonte de nitrogênio (sintético e não sintético) e concentração de células do inóculo. As fontes de carbono consistiam em o bagaço de cana-de-açúcar, a palha de cana-de-açúcar e o sabugo de milho, por serem resíduos agroindustriais e possuírem diferentes concentrações de celulase, lignina e hemicelulose. As fontes de nitrogênio sintéticas foram baseadas de acordo com o meio Mandels, onde foram testados cada fração da fonte de nitrogênio (Ureia, peptona e (NH₄)₂SO₄) separadamente. O tamanho do inóculo ocorreu com $0,8 \times 10^6$, $1,6 \times 10^6$ e $3,2 \times 10^6$, devido sua grande variedade na quantidade de células presentes em cada situação.

4.7.1. Estudo da Fonte de carbono

Foram selecionadas três fontes de carbono, sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar e palha de cana-de-açúcar. Foi transferido 1mL do estoque de isolados para um pré-inóculo em 50 mL de caldo dextrose Sabouroud em shaker 30 °C e 200 rpm por 48 horas. Posteriormente transferido $1,6 \times 10^8$ UFC para Erlenmeyer contendo 100 mL do meio mínimo Mandel com 1% da fonte de carbono (sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar e palha de cana-de-açúcar) e mantido a 30 °C durante 96 h sob agitação a 200 rpm. Amostras foram retiradas a cada 24 horas com 5 minutos de repouso para decantação e retirado 1mL do sobrenadante para o teste de açúcar redutor de acordo com Ghose (1987).

4.7.2. Estudo da Fonte de nitrogênio

Foram selecionadas diferentes fontes nitrogênio, sendo separadas por sintético e não sintético. Para as sintéticas foram selecionados ureia, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e peptona, assim como no meio Mandel, porém adicionadas ao meio de cultura de forma isolada, com a fração equimolar definida assim como no meio já descrito. As não sintéticas, por sua vez, foram selecionadas farelo de soja, farelo de milho e farelo de arroz na concentração de 1,8 g/L, assim como nas fontes de nitrogênio sintéticos que obtiveram um total de 1,8 g/L de peso total. A fonte de carbono utilizada foi o bagaço de cana-de-açúcar devido ao resultado do item anterior, o tamanho do inóculo foi selecionado $1,6 \times 10^8$ UFC.

4.7.2.1. Fonte de nitrogênio sintético

As fontes de nitrogênio sintéticas foram selecionadas de acordo com o meio Mandel de forma isolada, a quantidade de cada componente foi feita através da correção em peso da fração equimolar de cada componente. Da mesma forma que o item anterior, foi transferido 1 mL do estoque de isolados para um pré-inóculo em 50 mL de caldo dextrose Sabouroud em shaker 30 °C e 200 rpm por 48 horas. Posteriormente transferido $1,6 \times 10^8$ UFC para Erlenmeyer contendo 100 mL do meio mínimo Mandel, com apenas uma fonte de nitrogênio, com 1% da fonte de carbono (bagaço de cana-de-açúcar) e mantido a 30 °C durante 96 h sob agitação a 200 rpm. Amostras foram retiradas a cada 24 horas com 5 minutos de repouso para decantação e retirado 1 mL do sobrenadante para o teste de açúcar redutor de acordo com Ghose (1987).

4.7.2.2. Fonte de nitrogênio não sintético

As fontes de nitrogênio não sintéticas, foram selecionadas farelo de soja, farelo de milho e farelo de arroz na concentração de 1,8 g/L, assim como nas fontes de nitrogênio sintéticos que obtiveram um total de 1,8 g/L de peso total. Da mesma forma que o item anterior, foi transferido 1 mL do estoque de isolados para um pré-inóculo em 50 mL de caldo dextrose Sabouroud em agitação 30 °C e 200 rpm por 48 horas. Posteriormente transferido $1,6 \times 10^8$ UFC para Erlenmeyer contendo 100 mL do meio mínimo Mandel, com apenas uma fonte de nitrogênio, com 1% da fonte de carbono (bagaço de cana-de-açúcar) e mantido a 30 °C durante 96 h sob agitação a 200 rpm. Amostras foram retiradas a cada 24 horas com 5 minutos de repouso para decantação e retirado 1 mL do sobrenadante para o teste de açúcar redutor de acordo com Ghose (1987).

4.7.3. Estudo da Concentração inicial celular (UFC)

A concentração de células foi determinada a partir do bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, e o meio Mandel com a combinação das três fontes de nitrogênio assim como na referência devido ao item anterior mostrar melhores resultados. O tamanho do inóculo foi pré-definido como $0,8 \times 10^8$ UFC, $1,6 \times 10^8$ UFC e $3,2 \times 10^8$ UFC a fim de avaliar a quantidade de células necessárias para o processo. Da mesma forma que o item anterior, foi transferido 1mL do estoque de isolados para um pré-inóculo em 50 mL de caldo dextrose Sabouroud em agitação 30 °C e 200 rpm por 48 horas. Posteriormente transferido $1,6 \times 10^8$ UFC para Erlenmeyer contendo 100 mL do meio mínimo Mandel, com apenas uma fonte de nitrogênio, com 1% da fonte de carbono (bagaço de cana-de-açúcar) e mantido a 30 °C durante 96 h sob agitação a 200 rpm. Amostras foram retiradas a cada 24 horas com 5 minutos de repouso para decantação e retirado 1 mL do sobrenadante para o teste de açúcar redutor de acordo com Ghose (1987).

4.8. Teste da enzima bruta em diferentes condições de temperatura e pH

Nessa etapa do processo verificou-se a ação do extrato enzimático bruto em diferentes condições de pH e temperatura. As enzimas brutas do *Aureobasidium pullulans* foram caracterizadas quanto à sua atividade sob diferentes pHs (4,5-6) e temperatura (40-60 °C). A termoestabilidade da enzima foi determinada de 40-70 °C por até 3 h.

4.9. Caracterização do material lignocelulósico

As biomassas lignocelulosicas, foram caracterizados quanto a frações poliméricas estruturais, cinzas e extrativos, baseado nos procedimentos analíticos estabelecidos pelo National Renewable Energy Laboratory - NREL (SLUITER *et al.*, 2011).

4.9.1. Extrativos

A granulometria dos materiais foi ajustada a 20 Mesh mediante peneiramento. Para determinação de extrativos, 1,4 g de cada biomassa em triplicata foram colocados em envelopes de papel filtro, os quais foram levados a um extrator Soxhlet para tratamento com etanol por 6 h. Após este tempo, os materiais foram secos a 105 °C até peso constante e a umidade foi determinada. Para determinação de extrativos foi utilizada a equação 1:

Equação 1 - Equação para cálculo de extrativos

$$\%Extrativos = \frac{m_{PFA} - m_{PF}}{m_{amostra}} \times 100$$

Onde m_{PF} e m_{PFA} e correspondem à massa seca do papel filtro com amostra antes e após remoção de extrativos e secagem, respectivamente, e m_{amostra} equivale à massa seca de cada amostra.

4.9.2. Cinzas

Aproximadamente 1 g de cada biomassa após remoção de extrativos em triplicata foram pesados em cadinhos de porcelana, os quais foram colocados em uma mufla a 500 °C por 24 h até peso constante. O teor de cinzas foi calculado segundo a equação 2:

Equação 2 - Equação do teor de cinzas

$$\%Cinzas = \frac{m_{cinzas}}{m_{amostra}} \times 100$$

Onde m_{cinzas} e m_{amostra} correspondem à massa das cinzas após processo na mufla e massa seca de cada amostra.

4.9.3. Análise de celulose e hemicelulose

Após remoção de extrativos, 0,3 g de cada biomassa em triplicata foram colocados em tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 3 mL de H₂SO₄ 72 % (m/m) e colocados em banho termostatizado a 30 °C por 1h. Com ajuda de um bastão de vidro o conteúdo de cada tubo foi misturado a cada 5 min durante o processo. Após 1h, o conteúdo dos tubos foi passado a frascos Erlenmeyer de 250 mL com adição de 84 mL de água destilada, os quais foram a seguir colocados em autoclave a 120 °C, 1 atm. por 1h. Após 1h e esfriamento do conteúdo dos frascos Erlenmeyer, este foi filtrado em funil de vidro sinterizado (no. 3). O filtrado foi utilizado para preparação de amostras para análises de glicose, xilose, arabinose e ácido acético por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da série Agilent 1200 (Agilent Technologies, Inc., EUA) equipada com uma coluna detector de índice de refração RID-6A e coluna HPX-87H (300x7,8mm) (Bio-Rad, EUA). Os teores de celulose e hemicelulose foram determinados empregando as equações 3 e 4, respectivamente.

Equação 3 - Equação do teor de celulose

$$\%Celulose = \frac{C_{glicose} \times Vol \times Fc}{m_{amostra}} \times 100$$

Equação 4 - Equação do teor de hemicelulose

$$\%Hemicelulose = \frac{(C_{glicose} \times Vol \times Fc) + (C_{xil} \times Vol \times Fc) + (C_{ara} \times Vol \times Fc) + (C_{AA} \times Vol \times Fc)}{m_{amostra}} \times 100$$

Onde C_{Glicose}, C_{xil}, C_{ara}, e C_{AA} correspondem às concentrações de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, respectivamente. Fc, Fc_{xil}, Fc_{ara} e Fc_{AA} correspondem aos fatores de conversão da celulose em glicose (0,9), da hemicelulose em xilose (0,88), em arabinose (0,88) e em ácido acético (0,983), respectivamente. Vol equivale ao volume de filtrado e m_{amostra} à massa seca de cada amostra no tubo de ensaio.

4.9.4. Determinação de lignina

O filtrado foi utilizado para quantificação de lignina solúvel, mediante diluição das amostras e leitura da absorbância a 205 nm, utilizando fotômetro Eppendorf Biospectrometer® (Eppendorf AG, Alemanha). O teor de lignina solúvel foi determinado conforme a equação:

Equação 3 - Equação para cálculo de lignina solúvel

$$\%Lignina\ solúvel = \frac{ABS \times Vol \times Dil}{\epsilon \times m_{amostra} \times Passo\ ótico} \times 100,$$

Onde ABS corresponde à absorbância a 205 nm, Vol ao volume do filtrado e Dil à Diluição. ϵ correspondente à absortividade da biomassa a 205 nm (foi utilizado a absortividade do bagaço de cana, que é 25 Lg-1cm-1). $m_{amostra}$ equivale à massa seca de cada amostra no tubo de ensaio e Passo ótico ao comprimento da cubeta usada no espectrofotômetro (1 cm). O material sólido retido foi utilizado para determinação de lignina insolúvel, mediante secagem a 105 °C por 24 h até peso constante. O teor de lignina foi determinado com base na equação:

Equação 4 - Equação para cálculo de lignina insolúvel

$$\%Lignina\ insolúvel = \frac{mCA - mCV}{m_{amostra}} \times 100,$$

Onde mCA e mCV correspondem à massa do funil com amostra após secagem e do funil vazio. A mostra equivale à massa seca de cada amostra no tubo de ensaio.

Equação 5 - Equação para a determinação de lignina total:

$$\%Lignina\ total = \%Lignina\ solúvel + (\%lignina\ insolúvel - \%cinzas)$$

4.10. Métodos analíticos

4.10.1. Cálculo do índice enzimático

O Índice Enzimático (IE) para cada enzima observada foi calculado dividindo o tamanho das colônias (mm) pelo tamanho dos halos (mm) formados (KASANA *et al.*, 2008).

Equação 6 - Cálculo do índice Enzimático (autoria própria)

$$\text{ÍNDICE ENZIMÁTICO (IE)} = \frac{\text{Tamanho das Colônias (mm)}}{\text{Tamanho dos halos (mm)}}$$

4.10.2. Atividade de carboximetilcelulase (CMCase)

A retirada da amostra foi realizada a cada 24 horas, depois do repouso de 5 minutos do Erlenmeyer para decantação, retirado 2 mL e centrifugado a 10.000 rpm a 4 °C, e então

retirado 1mL do sobrenadante (extrato enzimático bruto) para análise, segundo descrito no item 4.6.3.

A atividade de Carboximetilcelulase foi determinada através da adição de 1mL do extrato enzimático bruto em 1mL de solução 1% de carboximetilcelulose, em tampão acetato 0,05M, pH 5,0, depois incubado a 50 °C, por 30 minutos. Periodicamente, o sistema substrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. (DNS, MILLeBR). Então foi resfriado em banho de gelo por 5 minutos e adicionado 16 mL da solução de tartarato duplo de sódio e potássio. Por fim foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm, após zerar o aparelho com o branco composto por DNS reagido com o substrato sem enzima bruta, que foi substituída por água destilada. Todo processo está exemplificado na Figura 7 abaixo. Para cada fonte de carbono, foram realizadas as análises de atividades enzimáticas em triplicata.

Figura 8 - (1) Transferência de 1 mL para pré-inóculo em 15 mL de caldo dextrose Sabouroud por 24 horas (2). Transferência para Erlenmeyer contendo 100 mL do meio mínimo Mandel, a 30 °C durante 120 horas sob agitação de 200 rpm (3). Amostras foram retiradas a cada 24 horas com 5 minutos de repouso do Erlenmeyer para decantação e retirado 1 mL para o teste de ação enzimática de acordo (4) Leitura em espectrofotômetro a 540nm (5). As análises de atividades enzimáticas em triplicata.

Fonte: Ghose (1987)

As atividades enzimáticas foram plotadas em Excel, sendo a concentração da glicose (mg/L) no eixo Y a unidade de atividade enzimática (μ moles de açúcar redutor produzido por minuto por mL de enzima (U/mL)), seguindo a análise estatística proposta por Triola (2005)

4.10.3. Testes de atividade enzimática

Nessa etapa do estudo as amostras de extrato enzimático bruto foram analisadas seguindo o protocolo de Ghose *et al.* (1987) usando o método de Miller *et al.* (1959) para quantificar os açúcares redutores pela mudança de cor e leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

4.10.3.1. Determinação da atividade de enzimas celulolíticas

Nas determinações da atividade de carboximetilcelulase a glicose foi utilizada como padrão segundo o método do açúcar redutor de acordo com Miller (1959).

4.10.3.2. Determinação da curva padrão pelo Método de Miller

O método de Miller (1959) é bastante usado para quantificar os açúcares redutores, baseando-se na capacidade do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) de reduzir-se a ácido 3-amido-5-dinitrosalicílico (Figura 8), que é altamente colorido, na presença de glicose. Tal composto gerado tem capacidade de absorver a luz, tornando possível uma relação entre a medida colorimétrica e a concentração de açúcares redutores presentes.

Figura 9 - Reação utilizada para a determinação espectrofotométrica de açúcares, onde o DNS é convertido em seu análogo reduzido.

Fonte: Adaptado de Ebrapa (2007)

Para isso foi usado o protocolo para determinação de açúcares totais pelo método de DNS da EMBRAPA, onde foi feito uma solução padrão de 0 até 10 mg/L para glicose (EMBRAPA, 2007).

4.10.3.3. Preparo do DNS

Para o preparo do reagente DNS, foi pesado 10,6 g de ácido 3,5 dinitrossalicílico e 19,8 g de NaOH e dissolvido em 1416 mL de água deionizada. Em seguida adicionado 7,6 mL de fenol (a 50 °C) e 8,3 g de meta-bissulfito de sódio e homogeneizada a solução obtida manualmente.

4.10.3.4. Determinação da curva padrão dos açúcares redutores

Para a determinação dos açúcares redutores, foi pipetado 1 mL das soluções das concentrações de glicose (de 0,1g/L a 1g/L) em um tubo de ensaio e adicionado 1 mL do

reagente DNS. Depois submeteu-se a agitação (com a finalidade de manter o açúcar em suspensão). Então foi aquecido em banho-maria a 50 °C por 30 minutos e resfriado em banho de gelo por 5 minutos e adicionado 16 mL da solução de tartarato duplo de sódio e potássio. Por fim foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm, após zerar o aparelho com o branco, composto por água destilada.

4.10.3.5. Determinação de atividade FPase

A atividade FPase, ou seja, atividade de papel de filtro, abrange uma mistura de exoglucanases e endoglucanases, determinada a partir da degradação de uma tira de papel de filtro Whatman n° 1 medindo 1,0 cm x 6,0 cm. No tubo contendo o ensaio reacional foi adicionado 1,0 mL de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 a 50mM, 0,5 mL de extrato enzimático e uma tira de papel filtro. No outro tubo o controle da reação foi efetuado adicionando 1 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático, no terceiro tubo foi adicionado 1,5 mL de solução tampão e uma tira de papel filtro, este foi comparado ao controle. As amostras foram incubadas em banho-maria a 50 °C por uma hora e a reação foi interrompida com a adição de 3 mL DNS. Os tubos foram alocados em água fervente por 5 minutos, logo após foram adicionados 20 mL de água destilada para posterior medição de absorbância em de 540 nm. Os valores de atividade foram estimados segundo recomendação de Ghose *et al.* (1987). Considerou-se 1 unidade internacional (UI) equivalente a 1 μ mol de glicose liberada por min, que corresponde a 0,18 mg de glicose por minuto.

4.10.4. Atividade enzimática em diferentes pH

A atividade enzimática de extrato bruto foi realizada com solução tampão McIlvaine (fosfato dissódico e ácido cítrico) com os valores de pH 4,5 a 6. A estabilidade frente a diferentes pHs foi avaliada incubando-se 1 mL da amostra a 60 °C por 30 minutos na presença dos diferentes pHs. Amostras foram retiradas a cada 24 horas com 5 minutos de repouso para decantação e retirado 1 mL do sobrenadante para o teste de açúcar redutor de acordo com Ghose (1987).

4.10.5. Atividade enzimática em diferentes temperaturas

A partir da condição otimizada (fonte de carbono bagaço de cana-de-açúcar, $1,6 \times 10^6$ UFC e as fontes de nitrogênio sintéticos do meio Mandel). A fermentação teve duração de 96 horas, onde a cada 24 horas foi retirado uma alíquota de 2 mL para os testes de influência da temperatura na hidrólise enzimática. Amostras foram retiradas a cada 24 horas com 5

minutos de repouso para decantação e retirado 1mL do sobrenadante para o teste de açúcar redutor de acordo com Ghose (1987) adaptado com faixa de temperatura de 40 °C a 60 °C numa escala de 5°C.

4.10.6. Ensaio de sacarificação

O secretoma bruto obtido do *Aureobasidium pullulans* foi avaliado quanto às suas capacidade de hidrólise de biomassa pré-tratada de bagaço da cana-de-açúcar. O secretoma bruto do microrganismo foi medido em tampão citrato-fosfato (50 mM, pH 5,0), a 50 °C sob agitação a 150 rpm. As amostras das biomassas lignocelulósicas foram submetidas a pré-tratamento com hidróxido de sódio e utilizados como substratos para o experimento de hidrólise enzimática. O procedimento de sacarificação foi realizado em erlenmeyes de 500ml com 100ml de mistura de reação, que inclui amostras dos bagaços pré-tratados a 5% de carga em peso seco contendo as diluições enzimáticas apropriadas das enzimas e suplementada com Ctec-2 (NOVOZYME Inc. Curitiba, Brasil) até atingirem 10 FPU por grama de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado alcalinamente. A hidrólise ocorreu por 72 horas. Experimentos controle nas foram realizados nas mesmas condições usando substratos sem enzimas (enzima em branco) e enzimas sem substratos (substrato em branco) (BERRIN *et al.*, 2012). A concentração de açúcares redutores nos hidrolisados foi analisada com o método DNS usando o monômero glicose como padrão (BERRIN *et al.*, 2012; MILLER, 1959). Com o total de açúcares redutores produzidos e a caracterização da biomassa pré-tratada, obtivemos o rating da hidrólise em porcentagem seguido a equação abaixo:

$$\text{Hidrolise (\%)} = \frac{\text{Açúcares totais obtidos (g/L)}}{\text{Carboidratos totais disponíveis disponíveis (g/l)}} \times 0.98 \times 100$$

4.10.7. Teste de enzimas auxiliares

Foram realizadas reações da enzima de interesse na presença de diferentes substratos comerciais para comprovar sua atividade de arabinanase, glucopiranosidase, xilopiranosidase e celobiase. Inicialmente foi avaliada a atividade sobre 2 mM de pNP-A (4-nitrofenol arabinofuranosídeo), ou pNP-G (4-Nitrophenyl β-D-glucopiranosídeo), ou pNP-C (*p*-nitrofenil-β-D-celobiosídeo), ou pNP-X (4-Nitrofenil β-D-xilopiranosídeo) utilizando 2,6 μg da enzima a 37 °C, em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5 por 1 hora. Após, a reação foi neutralizada com adição de 100 μL de bicarbonato de sódio 2 M e analisada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 410 nm.

4.11. Análises proteômicas

Para a obtenção das amostras que foram enviadas a Analítica do Instituto de Química (USP-São Paulo), foi preciso separar as proteínas em blocos devido a quantidade e características das bandas serem muito próximas. Primeiramente foram feitas a eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE) e posteriormente a digestão das bandas encontradas em poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE).

4.11.1. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE)

Foi seguido o protocolo do Laboratório de Biologia Sintética e Molecular da Universidade de São Paulo na Escola de Engenharia de Lorena, onde consistia em:

- Misturar as amostras proteicas com tampão de amostra q.s.p. 1X (loading buffer2X). Ferver as amostras 96 °C por 5 minutos.
- Montar as placas – Mini protean III- Bio Rad.
- Preparar o gel de resolução (Tabela 18.3 – Maniatis).
- Aplicar o gel de resolução (5% de gel tris-glicina SDS-Poliacrilamida) no aparato até o nível desejado (no mínimo 0,5 cm abaixo do pente).
- Aplicar água Milli-Q para nivelar o gel.
- Após polimerização, retirar a água e secar com papel de filtro.
- Aplicar o gel de empacotamento (15% de gel tris-glicina SDS-Poliacrilamida) e inserir o pente.
- Montar o aparato de eletroforese contendo o tampão de corrida. - Realizar eletroforese (100 V a 200 V).
- A seguir, o gel pode ser submetido ao ensaio de western blot ou corado com coomassie blue por 30 minutos a temperatura ambiente seguido de tratamento com o descorante.
- Após coloração por coomassie blue, acondicionar o gel no "bastidor" entre duas folhas de papel celofane humedecidas em água.
- Manter a temperatura ambiente até secagem do gel.

As soluções usadas foram: Tampão de Amostra 2X (Loading buffer-2X) Tris/HCl pH 6,8 100mM SDS 4,0% Azul de bromofenol 0,2% Glicerol 20,0%. Antes do uso, adicionar dithiotreitol q.s.p. 200mM (estoque: 1 M armazenado a -20 °C). Tampão de corrida 10X Tris 250mM glicina pH 8,3 2,5M SDS 1%. Corante coomassie blue. Descorante Coomassie

blue 2,5g Metanol 450mL Metanol 450mL Ácido acético glacial 100mL Ácido acético glacial 100mL Água Milli-Q 450mL Água Milli-Q 450mL. Para a solução de 15% de gel tris-glicina SDS-Poliacrilamida foi usado 3,4 mL de H₂O, 7,5 mL de mix de acrilamida, 3,8 mL de 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,15 de 10% de SDS, 0,15 de 10% de persulfato de amônia e 0,006 mL de TEMED. Para a solução de 5% de gel tris-glicina SDS-Poliacrilamida foi usado 2,1 mL de H₂O, 0,5 mL de mix de acrilamida, 0,38 mL de 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,3 de 10% de SDS, 0,3 de 10% de persulfato de amônia e 0,003 mL de TEMED.

4.11.2. Digestão das bandas encontradas em poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE)

A digestão do gel seguiu-se pela quantidade de bandas mais expressivas na corrida do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Foram separados em seis blocos como mostra a Figura 9. Depois seguido o protocolo de digestão in gel do Laboratório de Espectrometria de Massas-LNBio (Anal.Chem., 1996 68:850-858 modificado). Tal protocolo consistia em:

- Reagentes:
 1. Destain (para remover o SDS): metanol 50% + ácido acético 2,5% em água purificada.
 2. Bicarbonato de amônio 100mM: 100mM de bicarbonato de amônio em água purificada (PM=79,06; 158mg em 20mL de água purificada).
 3. Bicarbonato de amônio 50mM: 50mM de bicarbonato de amônio em água purificada (PM=79,06; 79 mg em 20mL de água purificada).
 4. Acetonitrila (100%). 5. Ditiotreitól (DTT) 10mM: 1.5 mg de DTT em 1mL de bicarbonato de amônio 100mM.
 5. Iodoacetamida (IAA) 50mM: 9,2mg de IAA em 1mL de bicarbonato de amônio 100mM e proteger da luz.
 6. Solução de Tripsina: 20ng/μL (Sequencing Grade Modified Trypsin, V5111-Promega): solubilizar em bicarbonato de amônio 50mM, aliquotar e armazenar a -20°C.
 7. Solução de extração 1: ácido fórmico 5% (em água purificada).
 8. Solução de extração 2: ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%. 2.
 9. Solução de tripsina: 20 μg de tripsina em 1000 μL de bicarbonato de amônio 50mM gelado. Concentração final da tripsina 20ng/μL.

Primeiramente foram-se cortadas as bandas do gel em blocos, posteriormente descolorados com 0,5mL da solução 1 (destain) e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. Consequente feito a remoção da solução e adicionado mais 0,5mL da solução 1 (destain) por 1 hora à temperatura ambiente. Repetindo esse passo (total de 3 horas, trocando a cada hora a solução de destain). O seguinte passo foi feita a desidratação com remoção da solução de destain e desidratação do gel adicionando 200 μ L de acetonitrila (100%), por 5 minutos duas vezes. Depois foi feita a evaporação do que restou de acetonitrila em evaporador (2 a 3 minutos) e a redução adicionado 30 μ L da solução de DTT 10mM e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente, dando um spin rápido e removendo a solução de DTT. Posteriormente a alquilação adicionada 30 μ L da solução de IAA 50mM e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz, seguido de um spin rápido e remoção a solução de IAA. Tal amostra foi lavada com 100 μ L de bicarbonato de amônio 100mM por 10 minutos e, em seguida, removeu-se esta solução para a desidratação do gel com 200 μ L de acetonitrila (100%), incubado por 5 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente, remoção da acetonitrila. O próximo passo foi a reidratação com 200 μ L de bicarbonato de amônio 100mM por 10 minutos, seguido de um spin rápido e remoção da solução de bicarbonato de amônio, seguido de desidratação do gel com 200 μ L de acetonitrila (100%), incubando por 5 minutos a temperatura ambiente e remover a acetonitrila, e repetido este passo. Sequentemente foi-se evaporado o que restou de acetonitrila em evaporador (2 a 3 minutos). Adicionou-se de 30-50 μ L da solução de tripsina e reidrata-o por 30 minutos em banho de gelo, seguido de um spin rápido, removendo o excesso de solução de tripsina e adicionar 5 a 20 μ L de bicarbonato de amônio 50mM para cobrir o gel, deixado overnight a 37°C. Por fim feita a extração com 30 μ L da solução 1 de extração, deixando incubado por 10 minutos a temperatura ambiente, dando um spin rápido e colocando o sobrenadante em outro tubo. Adicionando-se 12 μ L da solução 2 de extração e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente, com posterior spin rápido e coletado o sobrenadante no tubo que fora previamente separado (e já contém o extrato do passo anterior). Este passo foi repetido duas vezes até ser evaporado em evaporador (~40 minutos) de forma a restar aproximadamente 1 μ L (não evaporando totalmente a amostra) e armazenado a -20°C.

Depois de todos esses passos a amostra foi condicionada e enviada a Analítica do Laboratório do Instituto de Química da USP-São Paulo para sua análise em LC/MS-MS.

4.11.3. Análise de bioinformática

A Analítica do Laboratório do Instituto de Química da USP-São Paulo enviou os dados obtidos após as amostras passarem por LC/MS-MS. Com tais resultados, primeiramente, foram separadas as proteínas repetidas de acordo com o “prot_desc”, que consiste no código da proteína na base de dados do UniProt obtidas a partir da sua sequência de aminoácidos. Cada código foi pareado, separadamente com tal base de dados a fim de obter-se sua função putativa, seu peptídeo sinal e sua função molecular.

A partir desses dados foi-se pareado cada sequência de aminoácidos com a base de dados do dbCAN (<http://bcb.unl.edu/dbCAN2/blast.php>), onde foi-se obtido informações sobre se tratava de uma enzima CAZy ou não, sendo posteriormente separadas em suas funções e analisadas separadamente de acordo com a literatura e com as informações da base de dados CAZy (<http://www.cazy.org/>).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2. Avaliação de produção de celulasas pelo uso de lugol

Comumente, a seleção de microrganismos produtores de celulase é realizada utilizando a carboximetilcelulose (CMC) como fonte única de carbono e a revelação feita com vermelho do Congo ou Hexadeciltrimetil amônio. Esta metodologia geralmente é lenta, chegando a 40 minutos e sua visualização muitas vezes não é completa. Uma metodologia de revelação utilizando uma solução de lugol foi proposta por Kasana *et al.* (2008), que reduz esse tempo. Um dos desafios na produção de bioprodutos é a determinação enzimas celulolíticas que sejam efetivas frente a celulose de bagaço de cana-de-açúcar bem como a submissão dos microrganismos a uma fonte de carbono complexa como o bagaço de cana-

de-açúcar, diferentemente da CMC. Na Figura 10 verifica-se os resultados da determinação de atividade celulolítica total utilizando carboximetilcelulose e xilooligossacarídeos (CMC e XOS) respectivamente a 0,2% como fonte única de carbono e a revelação realizada com uma solução de Lugol. Verifica-se formação nítida de halos de hidrolise ao redor das colônias em 24, 48 e 72 horas respectivamente.

Figura 10 - Método de revelação padronizado para carboximetilcelulose, utilizando CMC e XOS como fonte de carbono. O padrão de crescimento foi bem próximo, assim como a formação do halo de degradação.

Fonte: Kasana et al. (2008)

O padrão de crescimento foi bem próximo, assim como a formação do halo de degradação. Na Figura 10, observa-se os halos de hidrolise de mesmos isolados frente ao meio de cultura contendo CMC 0,2% (Figura 4.5.A) ou XOS a 0,2% (Figura 4.5.B). Verifica-se que o XOS quando utilizado com fonte única de carbono gera resultados semelhantes àqueles obtidos pela metodologia utilizando CMC como proposta por Kasana *et al.* (2008). Na Tabela 2 observa-se os resultados para a produção de CMCase e hemicelulase, respectivamente, e seus respectivos índices enzimáticos para o *Aureobasidium pullulans*.

Tabela 2 - Índice enzimático e suas respectivas fontes de carbono no teste de placas contendo meio mínimo Kasana e carboximetilcelulose e XOS como fonte de carbono para a produção de CMCase e hemicelulase.

Índice enzimático e suas respectivas fontes de carbono		
Tempo (h)	Fonte de carbono XOS (índice enzimático)	Fonte de carbono CMC (índice enzimático)
24	2,03 ± 0,04	2,05 ± 0,12

Continua

Conclusão

C48	$2,85 \pm 0,58$	$2,01 \pm 0,03$
72	$2,49 \pm 0,03$	$2,36 \pm 0,09$

Fonte: Autoria própria

Tais resultados demonstram que o *Aureobasidium pullulans* possui um Índice enzimático maior que 1, o que possibilita seguir para a atividade enzimática. Isso só ocorre quando há crescimento de microrganismos e que os mesmos estão produzindo enzimas extracelulares que quebram as fontes de carbono (CMC e XOS), tornando possível um halo para medição de tal índice. Um aumento acentuado no contraste de cor da zona hidrolisada e não hidrolisada do meio é obtido por inundação com iodo de Gram, que melhorou a aparência da zona de depuração já nitidamente discernível, produzindo complexo preto-azulado com celulose (polissacarídeo) e não com a glicose (monossacarídeo) (KASANA *et al.*, 2008).

O fundamento teórico da formação da zona lise nos corantes que se ligam ao polissacarídeo e formam um complexo visível se baseia na celulase produzida pelo *Aureobasidium pullulans* na placa que decompõem o polissacarídeo corboximetilcelulose (CMC), e como resultado a área cercada pela colônia foi exaurida com olissacarídeos e substituída por monossacarídeos e dissacarídeos menores. Para estes corantes mono e dissacarídeos não podem ser ligados de forma eficiente e resultam em uma zona clara visível (GOHEL *et al.*, 2014). Estudos feitos por Florencio *et al.* (2014) apresentaram que o IE de vários microrganismos, dentre eles com *Trichoderma reesei*, com IE=2,98, foi o melhor avaliado porém com atividade enzimática 0,2 UI/mL. Já o *T. harzianum* apresentou EI= 1,63 e sua atividade enzimática foi 0,26 UI/mL. No trabalho feito por Narasimha *et al.* (2006) e Reddy *et al.* (2017) com *Bacillus cereus* verificou-se EI=2,0, porém não foram feitos estudos posteriores sobre sua atividade enzimática. (PEREIRA *et al.*, 2012) também com celulases teve uma grande variação dentre seus índices enzimáticos e obteve índices enzimáticos maiores (1,6 a 28,3).

A partir desse resultado pode-se continuar com os experimentos conseguintes. O fato de o microrganismo produzir enzima extracelular (IE>1) fez com que ela possa ter sido usada nos testes de atividades enzimáticas, devido a facilidade de separação da biomassa e células das enzimas pela centrifugação.

5.3. Avaliação do extrato enzimático bruto usando CMC como fonte de carbono

Para a fermentação submersa e o teste utilizando como fonte de carbono a CMC, foram usados o meio líquido Mandel (PATEL *et al.*, 2007), com o pH foi ajustado para 5,5. Cada frasco continha $1,6 \times 10^6$ CFU de *Aureobasidium pullulans*. Na Figura 11 é apresentado a atividade enzimática em função do tempo de bioprocesso a partir do uso de CMC como biomassa no processo de fermentação submersa para produção de enzimas do complexo celulolítico, utilizando o *Aureobasidium pullulans*. É visto que seu maior resultado acontece em 60 h, com 7,419 U/mL para CMCase e 3,122 U/mL para FPase.

Figura 11 - Atividade enzimática (U/mL) em função do tempo (horas) de bioprocesso a partir do uso de CMC como biomassa no processo de fermentação submersa para produção de enzimas do complexo celulolítico, utilizando o *Aureobasidium pullulans*.

Fonte: Autoria própria

Verificou-se que o maior valor de atividade enzimática ocorreu em 60 h, sendo que a partir desse resultado pode-se continuar com os posteriores. Foi observado que com o CMC como substrato, os experimentos possuem um comportamento na linha em que 60 h atinge seu ponto máximo tanto com CMCase quanto com FPase e com comportamento muito similar em ambos. Este comportamento indica que possivelmente as posteriores fermentações serão feitas nesse período, 96 horas, e poderia variar entre 24 horas para mais ou para menos. Acharya e Chaudhary (2012) também conduziram um experimento preliminar usando CMC como substrato e pH 5,5, e observaram que é um apropriado controle para início dos demais experimentos, por ser um substrato simples, apresentando uma visão possível de produção de enzimas do complexo celulolítico. Entretanto, os demais

autores não reportam grandes índices enzimáticos comparado a este trabalho, sendo o maior índice para CMC pelo *Bacillus sp.* MVS3 com 0,079 UI/mL para CMCase e 0,255 UI/mL para FPase. (KALE; ZANWAR 2016). Em uma outra investigação, Kale e Zanwar (2016) compararam quatro microrganismos: *Trichoderma sp.*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus flavus* e suas atividades enzimáticas quando usado CMC como substrato. Os autores observaram que todos apresentavam maior hidrólise no sétimo dia, com 15,0 U/mL, 15,0 U/mL, 13,3 U/mL e 10,0 U/mL dos respectivos fungos. Este fato indica que o tipo de microrganismo é fundamental para os estudos de enzimas, devido a diferentes tipos de genes que os fazem produzir os diversos tipos de celulasas com suas variações. A triagem e isolamento de produtores de celulase de novos microrganismos é importante por serem fontes de novos genes de celulase com diversas propriedades. As celulasas são geralmente produzidas por microrganismo saprófitos, ou seja, que decompõem matéria orgânica vegetal, ou por patógenos de plantas. Celulasas de bactérias não possuem tanta atividade em comparação ao de fungos, que são secretadas fora das células e são mais robustos (JUTURU; WU, 2014). Outros estudos também demonstram a capacidade da CMC produzir celulasas quando em conjunto com outras fontes de carbono. Muthukrishnan *et al.*, (2017) fizeram um estudo usando *Penicillium citrinum* usando corboximetilcelulose associado a outras fontes de carbono, como maltose, glicose, sacarose, frutose e lactose, e observaram maior produtividade quando usado a maltose (159 U/mL). Já no trabalho desenvolvido por Petitmange *et al.* (1992), foi observada atividade enzimática próxima de 11 U/mL para CMCase em 48 horas e não observou FPase significativa no experimento. Em outro exemplo, Sureshkumar e Prathaban (2015) testaram a capacidade de CMCase de *Streptomyces lividans*, nas mesmas condições que este estudo, e observaram uma atividade de 9,62 U/mL após 72 horas, bem como que há diferença quando as condições do meio mudam, como fonte de carbono, fonte de nitrogênio, temperatura e pH, concluindo que são essenciais para a compreensão do comportamento da enzima e o melhoramento das condições para maior atividade enzimática.

Esses resultados ao comparados com o presente estudo indica o quão importante é o microrganismo para produção de celulase, além de demonstrar que é preciso conduzir otimização dos parâmetros para sua produção, tendo em vista que pode a variabilidade da atividade enzimática.

5.4. Estudo da produção de celulases

Com os dados a partir dos itens anteriores pode-se prosseguir com os demais testes, devido a atividade enzimática ser relativamente maior que alguns casos na literatura. Nesse item foi observado as diferentes condições com o propósito de obter-se um melhoramento da produtividade de celulase. Foi estabelecido 96 horas como período ideal para os demais estudos e todos os parâmetros selecionados apresentaram diferentes resultados em relação ao seu índice enzimático.

A reação enzimática geral é feita pela taxa de transferência de massa da enzima externa, difusão das enzimas na superfície do substrato e reação catalizadora da enzima em sequência (PRATTO *et al.*, 2016). Entretanto foi necessário estudar suas variáveis, como fonte de carbono, fonte de nitrogênio orgânico ou inorgânico e tamanho do inóculo, na fermentação e pH e temperatura nas reações enzimáticas.

5.4.1. Fonte de carbono como parâmetro

Para a fermentação submersa e o teste de fonte de carbono foram utilizando o meio líquido Mandel (PATEL *et al.*, 2007), com o pH ajustado para 5,5, sendo que cada frasco continha diferentes fontes de carbono (bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana-de-açúcar e sabugo de milho), sendo inoculado com $1,6 \times 10^6$ CFU de *Aureobasidium pullulans*.

Na Figura 12 é apresentado a atividade enzimática em função do tempo de bioprocessamento a partir do uso de diferentes biomassas: (13A) Sabugo de milho, (13B) palha de cana-de-açúcar, (13C) bagaço de cana-de-açúcar, como fonte de carbono no processo de fermentação submersa para produção de enzimas do complexo celulolítico, utilizando o microrganismo *Aureobasidium pullulans*.

Verificou-se que os maiores níveis de atividade ocorreram em 60 h com o substrato de bagaço de cana-de-açúcar, apresentando 7,419 U/mL para CMCase e 2,269 U/mL para FPase depois de 60 horas. O uso do substrato da palha de cana-de-açúcar obteve atividade enzimática de 6,814 U/mL para CMCase e 0,67 para FPase, verificando ser menor que o anterior. Já o sabugo de milho apresentou uma CMCase menor comparado com os demais (6,14 U/mL), entretanto, sua FPase (2,24 U/mL) demonstra que ele pode ser interessante para outras enzimas do complexo celulolítico, não sendo interessante para degradação de carboximetilcelulose.

Figura 12 - Atividade enzimática (U/mL) em função do tempo (horas) de bioprocessamento a partir do uso de diferentes biomassas: (13A) Sabugo de milho, (13B) palha de cana-de-açúcar, (13C) bagaço de cana-de-açúcar,

como fonte de carbono no processo de fermentação submersa para produção de enzimas do complexo celulolítico, utilizando o microrganismo *Aureobasidium pullulans*.

Fonte: Autoria própria

Ao compararmos os três gráficos verifica-se que em 60 h tanto o sabugo de milho quanto o bagaço de cana-de-açúcar possuem sua atividade máxima de CMCase e FPase, sendo que este último substrato possui uma atividade enzimática maior. Já a palha de cana-de-açúcar teve tal atividade máxima em 72 horas, o que sugere ser mais difícil para o microrganismo associar tal fonte de carbono. Canilha *et al.* (2012), Garadimani *et al.* (2015) e Li *et al.* (2014) fizeram um levantamento da composição química do bagaço e da palha de cana-de-açúcar e sabugo de milho (Tabela 3-5), reportando que o primeiro possui, em geral, uma quantidade de celulose maior que o segundo, com isso houve uma maior associação pelo microrganismo na celulose, o que o fez produzir maior quantidade de celulase e, consequentemente, obteve maior atividade enzimática quando a fermentação foi conduzida a partir dessa fonte de carbono. Já ao compararmos a estrutura química do bagaço de cana-de-açúcar com o sabugo de milho, notabiliza-se que as mesmas possuem quantidade de celulose em geral muito próximas, porém a quantidade de lignina difere. Em um trabalho

conduzido por Isaac *et al.* (2018) os autores apresentam maior rendimento em glicose a partir da hidrólise enzimática (3 g de amostra do pré-tratado alcalino e controle, 40 mL de tampão citrato (50 mM, pH 4.8)). O substrato, embebido em tampão citrato, foi implementado com cargas de celulase (20 FPU/g do substrato seco de Dyadic) e surfactante (Tween 20) (0,10 g/g de substrato). A hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar in natura foi realizada a 50 °C e 150 rpm em um agitador por 48 h de apenas 5%. Já Antunes *et al.*, (2018) realizando pré-tratamento alcalino de bagaço de cana-de-açúcar visando a redução da composição de lignina, submeteram a amostra de biomassa pré-tratada a hidrólise enzimática verificando 87,4% de rendimento de conversão de celulose em glicose. Esta verificação corrobora com a ideia que a lignina limita a hidrólise enzimática a partir de restrição de acessibilidade como barreira física ou pelo complexo lignina-carboidrato, e pela inibição de sua ligação com as enzimas (ZENG *et al.*, 2014; MCCANN; CARPITA, 2015). De fato, verifica-se que ao reduzir a composição de lignina do substrato bagaço de cana-de-açúcar pode-se verificar uma maior disponibilidade de celulose para o microrganismo produzir celulases. Observa-se a Tabela 3, onde é possível verificar a concentração dos principais componentes químicos de alguns materiais lignocelulósicos, como sabugo de milho, bagaço e palha de cana de açúcar,.

Tabela 3 - Composição dos principais componentes químicos lignocelulósicos do sabugo de milho na literatura.

Sabugo de milho			
Componente (%)	Jager <i>et al.</i> (2014)	Raju (2015)	Li <i>et al.</i> (2014)
Celulose	38,3	41,5	40,16
Hemicelulose	45,2	13	42,25
Lignina	13,4	35,2	10,78
Cinzas	3,1	1,33	6,81

Fonte: Adaptado de Jager *et al.* (2014), Raju, (2015) e Li *et al.* (2014)

Tabela 4 - Composição dos principais componentes químicos lignocelulósicos do bagaço de cana-de-açúcar na literatura.

Bagaço de cana-de-açúcar			
	Pitarelo <i>et al.</i> (2007)	Canilha <i>et al.</i> (2011)	Rocha <i>et al.</i> (2011)
Componente (%)			
Celulose	41,1	45	45,5

Continua

Conclusão

Hemicelulose	22,7	25,8	27
Lignina	31,4	19,1	21,1
Cinzas	2,4	1	2,2

Fonte: Adaptado de Pitarelo *et al.* (2007), Canilha *et al.* (2011) e Rocha *et al.* (2011)

Tabela 5 - Composição dos principais componentes químicos lignocelulósicos de palha de cana-de-açúcar na literatura .

Palha de cana-de-açúcar			
	Pitarelo <i>et al.</i> (2007)	Moriva (2007)	Saad <i>et al.</i> (2008)
Componente (%)			
Celulose	34,4	36,1	31,6
Hemicelulose	18,4	28,3	26,9
Lignina	40,7	26,2	26,2
Cinzas	11,7	11,7	2,1

Fonte: Adaptado de Pitarelo *et al.* (2007), Motiya, (2007) e Saad *et al.* (2008)

Biomassas lignocelulósicas são materiais complexos constituídos de vários componentes, dentre os principais deles celulose, hemicelulose e lignina, o que os faz apresentar um alto teor de açúcares totais depois da hidrólise enzimática (FERNANDEZ *et al.*, 1996). Vários componentes dos materiais lignocelulósicos podem induzir a produção de celulase quando usado uma fonte de carbono para o crescimento do fungo, tais como bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana-de-açúcar, serragem de madeira e outros. A variação da atividade celulolítica dentre os fungos é significativa na natureza (MORAIS *et al.*, 2016), possuindo diferentes resultados dentre a espécie no âmbito taxonômico. O presente trabalho apresenta resultados que para o *Aureobasidium pullulans* o melhor resultado é o de bagaço de cana-de-açúcar. Estudos como o de Florencio *et al.* (2016) demonstraram que o fungo *trichoderma reesei* apresenta 1,6 UI/mL para CMCase quando usado o bagaço de cana-de-açúcar, valor inferior ao encontrado a esse trabalho. Porém em investigações como de Lima Filho *et al.* (2003), os quais avaliaram a atividade da FPase de *Colletotrichum sp.* a quantidade de 4,89 (U/mL) máxima de FPase foi observada, sendo o valor pouco superiores ao atual trabalho.

Devido ao bagaço de cana-de-açúcar apresentar a maior atividade enzimática (7,419 U/mL para CMCase e 2,269 U/mL para FPase) depois de 60 h em comparação aos demais, foi estabelecido que os demais experimentos continuariam a usar tal fonte de carbono a fim de obter-se parâmetros maximizados para os demais experimentos.

5.2.1. Fonte de nitrogênio como parâmetro

O nitrogênio é um dos parâmetros mais importantes depois da fonte de carbono, sendo fundamental nas rotas metabólicas de microrganismos e para sua produção de enzimas. Diversos autores (ZAKARIASHVILI; ELISASHVILI, 1993; REDDY; D'SOUZA, 1994; SUN *et al.*, 2004; KAPICH *et al.*, 2004; KACHLISHVILI *et al.*, 2005; GAUTAM *et al.*, 2011) reportam a importância do nitrogênio na produção de enzimas, o qual pode ser assimilado de duas formas: assimilação do meio extracelular para o intracelular e o uso em rotas metabólicas., sendo que tais rotas produzem aminoácidos que são utilizados na produção de vários compostos, dentre eles as enzimas (ABUD, 2005).

Dentre as diversas formas de adicionar nitrogênio em um meio de cultura cita-se a adição de peptona, aminoácidos, sais de compostos de nitrogênio e fontes de nitrogênio orgânicos (farelo de soja, milho e arroz). Sais de amônio possuem vantagem por conduzirem um crescimento microbiano adequado sem acumular nitratos e nitritos (FRANÇA; RODRIGUES, 1985). Entretanto, amônia, glutamina e asparagina também podem ser boas fontes de nitrogênio, diferente da prolina, leucina e ureia (SANCHEZ; DEMAINE, 2002). Autores como Galani *et al.* (1985) e Pinheiro (2001) também reportam que adição de NH_4Cl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ podem ser boas fontes de nitrogênio. Entretanto, todos os estudos foram conduzidos com microrganismos diferentes, indicando que a variação da forma de assimilação de nitrogênio ocorre de acordo com a espécie, o que conduz a fazer testes relacionados a influência do tipo de nitrogênio na fermentação. De fato, a regulação do microrganismo microbiano é de grande importância para microbiologia industrial, sendo fundamental por direcionar rotas metabólicas, alterando a síntese de enzimas de forma positiva por fazer parte da composição enzimática, ou negativa por poder afetar na síntese de diversas proteínas (NETO *et al.*, 2005).

5.4.1.1. Fonte de nitrogênio sintético como parâmetro

Para a fermentação submersa, os testes relacionados a fonte de nitrogênio foram utilizados fontes de nitrogênio inorgânicas isoladamente que estão presentes no meio líquido Mandel (PATEL *et al.*, 2007), sendo a ureia, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e peptona, e seu pH ajustado para 5,5.

Na Figura 13 é apresentado a atividade enzimática em função do tempo de bioprocesso a partir do uso de fontes de nitrogênio não sintéticos: (13A) Ureia, (13B) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (13C) peptona, como única fonte de nitrogênio no processo de fermentação submersa para produção de enzimas do complexo celulolítico, utilizando o microrganismo *Aureobasidium*

pullulans. As atividades máximas aconteceram também durante 60 h, sendo que pra Uréia foi de CMCase de 3,374 U/mL e para FPase 1,644 U/mL, o Sulfato de Amônia obteve CMCase de 4,42 U/mL e FPase de 1,381 U/mL e a peptona obteve CMCase de 4,17 U/mL e FPase de 1,282 U/mL.

Figura 13 - Atividade enzimática (U/mL) em função do tempo de bioprocesso a partir do uso de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e diferentes fontes de nitrogênio inorgânicas: (13A) Ureia, (13B) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (13C) peptona, como única fonte de nitrogênio no processo de fermentação submersa para produção de enzimas do complexo celulolítico, utilizando o microrganismo *Aureobasidium pullulans*.

Fonte: Autoria própria

A representação da fonte de nitrogênio indicada na Figura 13, sugere que independentemente de qual seja, o perfil de atividade enzimática não se altera de forma significativa. Em todos os casos apenas uma fonte de nitrogênio não apresentou significância ao comparado com as três juntas de acordo com o meio Mandel descrito por Patel *et al.* (2007). Entretanto, o meio com a composição que obteve maior índice foi o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4,42 U/mL), sendo que a peptona obteve uma atividade enzimática (4,17 U/mL) e que a ureia (3,374 U/mL).

No artigo de Kazeen (2016) a produção de celulase por *Bacillus. licheniformis* 2D55 foi avaliada com diferentes fontes de nitrogênio orgânicos e inorgânicos (conduzidas a 60 °C, pH 3,5, 180 rpm e contendo bagaço de cana-de-açúcar não tratada e casca de arroz pré-

tratada a 7% (p/v), uréia (1 g/L), peptona (11,0 g/L), $\text{Mg}(\text{SO}_4)_2$ (0,4 g/L), CaCl_2 (0,03 g/L), Tween 80 0,2% (p/v) e 3% de inoculo), onde a CMCase foi elevada em 12,7 U/mL na presença de ureia, enquanto o resto dos substratos não diferiram em comparação com o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Entretanto a atividade de FPase diferiu quando o nitrato de amônio era única fonte de nitrogênio (A atividade da FPase foi 7,1 U/mL). O próprio autor diverge com o resultado da atividade de celulase KIBGE-IB2 de *B. Licheniformis*, apresentado por Karim *et al.* (2015) onde não foi elevada pelo nitrogênio inorgânico. Por outro lado, o trabalho de Sadhu *et al.* (2013) os *Bacillus sp.* apresentaram maior atividade com cloreto de amônio. Verifica-se que cada espécie possui uma preferência específica na utilização de compostos inorgânicos para produção de celulase.

5.4.1.2. Fonte de nitrogênio não sintético como parâmetro

Para a fermentação submersa, os testes relacionados a fonte de nitrogênio orgânicos foram usados a partir de resíduos agroindustriais isoladamente, sendo: farelo de soja, farelo de milho e farelo de arroz.

As atividades máximas ocorreram também durante 60 h, sendo que para farelo de soja foi de CMCase de 6,865 U/mL e para FPase 2,449 U/mL, o farelo de milho e o farelo de arroz apresentando CMCase de 3,692 U/mL e FPase de 1,407 U/mL e CMCase de 3,842 U/mL e FPase de 1,425 U/mL, respectivamente. Na Figura 14 é apresentado a atividade enzimática em função do tempo de bioprocessamento a partir do uso de fontes de nitrogênio orgânicos: (14A) Farelo de soja, (14B) farelo de milho, (14C) farelo de arroz, como única fonte de nitrogênio no processo de fermentação submersa para produção de enzimas do complexo celulolítico, utilizando o microrganismo *Aureobasidium pullulans*.

No presente trabalho, verificou-se que o perfil de produção de celulases apresenta o mesmo comportamento, com atividade máxima em 60 h., porém, sua maior atividade foi observada quando suplementado com farelo de soja. No trabalho de Martiniano *et al.* (2017), o qual foi utilizado a mesma biomassa vegetal do presente estudo, conforme demonstrado na Tabela 6, pode-se observar a quantidade de proteínas e de açúcares totais de farelo de arroz (13,42 g/L e 28,02 g/L), farelo de milho (7,82 g/L e 175,72 g/L) e farelo de soja (13,52 g/L e 38,61 g/L). Tais resultados ao comparado com o presente estudo indicam que a fonte de proteína é importante para a produção de extrato enzimático bruto, entretanto, não sendo o único fator, tendo em vista que estes farelos possuem quantidades de proteínas (g/L) bem próximos. Em um outro exemplo, o trabalho de Ilmén *et al.* (1997) questionou a ação do nitrogênio como indutor ao sugerir que a indução de nitrogênio não altera a nível

genético a produção de enzimas, alterando apenas a massa celular e, consequentemente, a produção de enzimas. Fontes de nitrogênio não sintético tem sido usado na literatura a fim de melhorar as condições de síntese de celulase (AHAMED; VERMETTE, 2008), devido ao seu baixo custo e por ser, assim como o bagaço de cana-de-açúcar, um subproduto agroindustrial (MACIEL, 2006).

Figura 14 - Atividade enzimática (U/mL) em função do tempo (horas) de bioprocesso a partir do uso de fontes de nitrogênio orgânicos: (14A) farelo de soja, (14B) farelo de milho, (14C) farelo de arroz, como única fonte de nitrogênio no processo de fermentação submersa para produção de enzimas do complexo celulolítico, utilizando o microrganismo *Aureobasidium pullulans*.

Fonte: Autoria própria

Tabela 6 - Concentração de proteínas, açúcares totais e açúcares redutores de farelo de soja, farelo de milho e farelo de arroz, empregados neste presente trabalho

Fontes de nitrogênio não sintéticos			
	Proteínas (g/L)	Açúcares totais (g/L)	Açúcares redutores (g/L)
Farelo de soja	13,52	38,61	12,48
Farelo de milho	7,82	175,72	47,01
Farelo de arroz	13,42	28,02	14,42

Fonte: Martiniano (2017)

A partir dos resultados apresentados, bem como a escassez de trabalhos da literatura pertinente empregando os nutrientes não sintéticos testados para produção de enzimas celulolíticas, foi selecionado as condições de nitrogênio sintéticos combinados, assim como no meio Mandel, para os estudos posteriores.

5.4.2. Concentração de células como parâmetro

Para a fermentação submersa dos testes relacionados ao tamanho do inóculo foram utilizados 3 tamanhos: (16A) $0,8 \times 10^6$ CFU, (16B) $1,6 \times 10^6$ CFU, (16C) $3,2 \times 10^6$ CFU.

A atividade enzimática em função do tempo de bioprocessamento a partir do uso de concentrações iniciais de células de *Aureobasidium pullulans*: (16A) $0,8 \times 10^6$ CFU, (16B) $1,6 \times 10^6$ CFU, (16C) $3,2 \times 10^6$ CFU, na fermentação submersa usando o bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e o as fontes de nitrogênio nas concentrações como descrito no meio Mandel. Os valores de CMC_{ase} e FP_{ase} de $0,8 \times 10^6$ CFU foram 6,654 e 2,928 respectivamente, para $1,6 \times 10^6$ CFU foram 8,745 e 3,144 respectivamente, e para $3,2 \times 10^6$ CFU foram 9,023 e 3,302 respectivamente.

Na Figura 15 é apresentado a atividade enzimática em função do tempo de bioprocessamento a partir do uso de concentrações iniciais de células de *Aureobasidium pullulans*: (15A) $0,8 \times 10^6$ CFU, (15B) $1,6 \times 10^6$ CFU, (15C) $3,2 \times 10^6$ CFU, na fermentação submersa usando o bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e o as fontes de nitrogênio nas concentrações como descrito no meio Mandel.

O aumento no número de células nas mesmas condições de tratamentos apresentou ter uma diferença entre $0,8 \times 10^6$ UFC (com 6,654 U/mL para CMC_{ase} e 2,92 U/mL para FP_{ase}) e $1,6 \times 10^6$ UFC (com 8,745 U/mL para CMC_{ase} e 3,144 U/mL para FP_{ase}). Entretanto, esse aumento não foi tão expressivo a elevação do número de células para $3,2 \times 10^6$ UFC (com 9,02 U/mL para CMC_{ase} e 3,3 U/mL para FP_{ase}), sendo menor que 10%, ou seja, ao dobrar-se o número de células, não se verificou significantes diferenças na produção das enzimas. De fato, definiu-se que a atividade enzimática ideal foi com $1,6 \times 10^6$ UFC, devido ao equilíbrio possivelmente ser mantido entre o tamanho do inóculo e a disponibilidade de substratos, enquanto o declínio no rendimento da enzima em tamanho maior do inóculo pode ter ocorrido devido à formação de substâncias que inibem a produção das enzimas pelo próprio microrganismo em frascos agitados. De acordo com Buragohain *et al.* (2016) e Omojasola *et al.* (2009) o subsequente aumento no tamanho do inóculo ocasiona maior competição por fontes de carbono resultando em uma rápida depleção de macro e micronutrientes e, assim, inibe seu crescimento e produção de enzimas. De fato, a

produção de enzimas reduziu devido ao agrupamento de células levando à depleção de nutrientes resultando uma diminuição na atividade metabólica (KASHYAP *et al.*, 2002; SHAH *et al.*, 2014).

Figura 15 - Atividade enzimática em função do tempo de bioprocesso a partir do uso de concentrações iniciais de células de *Aureobasidium pullulans*: (16A) $0,8 \times 10^6$ CFU, (16B) $1,6 \times 10^6$ CFU, (16C) $3,2 \times 10^6$ CFU, na fermentação submersa usando o bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e o as fontes de nitrogênio nas concentrações como descrito no meio Mandel.

Fonte: Autoria própria

5.5. Utilização dos parâmetros definidos para reação enzimática em diferentes pH e temperaturas

Nessa etapa do trabalho foi definida a fonte de carbono que continha maior atividade enzimática nos parâmetros: fonte de carbono, fonte de nitrogênio e tamanho do inóculo. Definiu-se o bagaço de cana-de-açúcar, que demonstrou atividade máxima após 60 h com 8,893 U/mL de CMCase e 3,165 U/mL para FPase, as três fontes de nitrogênio combinadas (assim como no meio Mandel) e a concentração de inóculo de $1,6 \times 10^6$ CFU com as melhores atividades enzimáticas (ressalta-se que $3,2 \times 10^6$ CFU não apresentaram diferença significativa comparado ao anterior (8,745 U/mL para CMCase e 3,144 para FPase com $1,6 \times 10^6$ CFU e 9,023 U/mL para CMCase e 3,302 para FPase com $3,2 \times 10^6$ CFU). O efeito de fatores como temperatura, pH e íons metálicos são considerados parâmetros importantes que influenciam as atividades enzimáticas. Segundo Tholudur *et al.* (1999), a produção de

celulases em culturas está associada ao crescimento e é influenciada por vários fatores e suas interações podem afetar a produtividade da celulase, sendo que com isso foi-se avaliado a atividade da enzima celulolítica bruta em diferentes condições de pH e temperatura. O pH é altamente dependente da temperatura em uma reação enzimática, devido ao aumento do produto iônico na solução. Alguns substratos podem interferir na reação por proteger a enzima da desnaturação pelo calor, contudo a partir de certa temperatura e ponto de exposição, as enzimas podem começar a desnaturar-se pelo calor (MADIGAN, 2004).

5.5.1. Reação enzimática em diferentes pH

A fermentação submersa foi realizada nas mesmas condições das demais: Cada frasco continha 1 g de bagaço de cana-de-açúcar, conduzidos em shaker a 30 °C e 200 rpm por 96 horas. A reação enzimática foi realizada seguindo diferentes pH: (17A) 4,5, (17B) 5,0, (17C) 5,5, (D) 6,0. A reação com o pH teve seu número máximo com valor de 5,5 com CMCase e FPase de 8,84 e 3,457 respectivamente. O pH 4,5 teve CMCase e FPase de 5,827 e 2,944 respectivamente, pH 5,0 com CMCase e FPase 7,327 e 3,05 respectivamente, sendo que o pH 6 teve CMCase e FPase 5,341 e 3,141 respectivamente.

Na Figura 16 é apresentado a atividade enzimática em função do tempo de bioprocessamento, em diferentes níveis de pH: (16A) 4,5, (16B) 5,0, (16C) 5,5, (16D) 6,0, na reação após a fermentação submersa usando o bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e o as fontes de nitrogênio nas concentrações como descrito no meio Mandel.

O pH é um parâmetro de grande importância para a quantificação da atividade enzimática. As enzimas são proteínas com cadeias laterais de aminoácidos com sítios ativos que funcionam como ácidos ou bases fracas em funções críticas que dependem do seu estado de ionização, que participam das interações que mantêm a estrutura enzimática. A remoção ou adição de um próton pode eliminar uma interação iônica essencial para a estabilização da enzima (LEHNINGER *et al.*, 2000). O pH ótimo para CMCase e FPase de *Aureobasidium pullulans* nas condições definidas de produção foi de pH 5,5, obtendo 8,84 e 3,45 respectivamente. Estudos pertinentes a estabilidade do pH será feita posteriormente, a fim de mensurar os limites de para seu uso que pode sofrer uma desnaturação irreversível em sua estrutura gerando uma permanente perda de atividade Whitaker (1994).

Figura 16 - Atividade enzimática em função do tempo de bioprocessamento tendo como fator que interfere na reação enzimática o pH: (17A) 4,5, (17B) 5,0, (17C) 5,5, (17D) 6,0, na fermentação submersa usando o bagaço de

cana-de-açúcar como fonte de carbono e o as fontes de nitrogênio nas concentrações como descrito no meio Mandel.

Fonte: Autoria própria

Ao compararmos com outros trabalhos Yin *et al.* (2010) estudaram um isolado de *Cellulomonas sp.* YJ5 verificando atividade enzimática ótima com pH 7 e faixa de estabilidade de pH de 7,5-10,5. Já o trabalho de Kim *et al.* (2009) com celulase de *Bacillus subtilis* A-54 apresentou atividade máxima com pH de 6,5 e estabilidade de 6,5-8. De acordo com estudos anteriores, as celulases são ativas na faixa de pH de 6,0 a 7,0 de *A. Níger* (AKIBA *et al.*, 1995), 5,0 a 7,0 da *Lysobacter sp.* e de 5,0 a 6,5 de *Bacillus sp.* No trabalho de Turk *et al.* (2012), os autores apresentam atividade máxima com pH 7,5, o que é importante no tratamento de polpa de celulose, devido ao seu processamento ser feito em condições alcalina. A presente enzima do estudo apresentou atividade ótima de pH 5,5, verificando sua possível utilização em tratamentos enzimáticos de resíduos agroindustriais, principalmente de bagaço de cana-de-açúcar, desde que seu pH seja alterado para uma maior atividade possível.

5.5.2. Reação enzimática em diferentes temperaturas

A fermentação submersa foi feita nas mesmas condições das demais, conforme item 5.3.1. A reação enzimática foi conduzida seguindo diferentes temperaturas: (18A) 40 °C,

(18B) 45 °C, (18C) 50 °C, (18D) 55 °C, (18E) 60 °C. Para a reação a 40 °C o valor de CMCase e FPase foi 3,262 e 1,404, a 45 °C foi de 5,827 e 2,502, a 50 °C de 8,84 e 3,457, e a 55 °C de 8,169 e 2,265, respectivamente. A 60 °C verificou-se a menor reação com o valor de CMCase e de FPase de 4,314 e 1,231 respectivamente.

Na Figura 17 é apresentado a atividade enzimática em função do tempo de bioprocessamento tendo conduzido em diferentes temperaturas: (17A) 40 °C, (17B) 45 °C, (17C) 50 °C, (17D) 55 °C, (17E) 60 °C, obtidos a partir da fermentação submersa usando o bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e o as fontes de nitrogênio nas concentrações como descrito no meio Mandel.

Uma vez que a enzima apresenta atividade catalítica altamente dependente da temperatura, pode-se concluir que o aumento da temperatura tem três efeitos: aumento da reação, (como em grande parte das reações químicas), a estabilidade da enzima (onde ele reage em atividade máxima) e decréscimo de atividade devido a sua desativação térmica (rompendo as ligações que fazem as estruturas responsáveis pela sua atividade (FURIGO E PEREIRA, 2001). Deste modo, a enzima possui uma atividade ótima de reação. Em temperaturas baixas as estruturas enzimáticas tendem a ser muito rígidas sendo que em altas pode desnatura-se, fazendo que tenha uma temperatura ideal para a reação catalítica (MADIGAN, 2004). O trabalho de da Silva *et al.* (2016), com enzimas obtidos a partir do *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 termofílico em condições de fermentação submersa e em estado sólido, ambos em pH 5,5, demonstra que a temperatura ótima de reação pode variar entre ambas fermentações (65 °C e 60 °C respectivamente). Por outro lado, analisando as enzimas obtidas pelo SmC, de *Pycnoporus sanguineus* apresentam temperatura ótima de 60°C nas mesmas condições no trabalho de Falkolski *et al.* (2012) e valores entre 60 e 70 °C para as endoglucanases de *Trichoderma atroviride* 676 e *Penicillium sp* (GRIGOREVSKI-LIMA *et al.*, 2013; PICART *et al.*, 2007), sugerindo que para cada condição e para cada microrganismo tem-se uma temperatura diferente para atividade ótima de suas enzimas, o que corrobora com o presente trabalho onde o *Aureobasidium pullulans* possui a atividade máxima com 50 °C.

Figura 17 - Atividade enzimática em função do tempo de bioprocessamento tendo como fator que interfere na reação a temperatura: (18A) 40 °C, (18B) 45 °C, (18C) 50 °C, (18D) 55 °C, (18E) 60 °C na fermentação submersa usando o bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e o as fontes de nitrogênio nas concentrações como descrito no meio Mandel.

Fonte: Autoria própria

5.6. Enzimas auxiliares

As atividades enzimáticas das enzimas brutas extraídas de *A. pullulans* extraídas a partir da fermentação da melhor atividade de CMC e FPU usando bagaço de cana-de-açúcar no tempo de 60 horas é exibido na Tabela 7, onde foram avaliadas usando substratos do complexo pNP (p-nitrofenil). Os substratos usados foram pNP-β-D-arabinofuranoside (pNP-A), pNP-β-D-celobioside (pNP-C), pNP-β-D-glucoside (pNP-G) e pNP-β-D-xiloside (pNP-X).

Tabela 7 – Atividades enzimáticas das enzimas brutas extraídas de *A. pullulans* extraídas a partir da fermentação da melhor atividade de CMC e FPU usando bagaço de cana-de-açúcar no tempo de 60 horas. Sendo os substratos do complexo pNP (p-nitrofenil). Os substratos usados foram pNP-β-D-arabinofuranoside (pNP-A), pNP-β-D-celobioside (pNP-C), pNP-β-D-glucoside (pNP-G) e pNP-β-D-xiloside (pNP-X).

Substratos	pNP-A		pNP-C		pNP-G		pNP-X	
Atividade (U/mL)	0,259	0,331	1,258	1,409	6,538	5,698	1,573	1,857

Continua

Conclusão

Média da atividade (U/mL)	0,285	1,333	6,118	1,715
---------------------------	-------	-------	-------	-------

Fonte: Autoria própria

Os resultados demonstram uma atividade maior quando usado a pNP-G como substrato, com atividade média de 6,118 U/mL, valor maior que os demais substratos. Isso pode ser explicado pela β -glucosidase geralmente ser responsável pela a regulação de todo o processo celulolítico e é um fator limitante da taxa durante a hidrólise enzimática de celulose, como as atividades endoglucanase e exoglucanase são frequentemente inibidas pela celobiose (HARHANGI *et al.*, 2002). Outro fator importante é a pNP-C estar com 1,333 U/mL, valor menor que pNP-G, que deve-se a β -glucosidase não apenas produzir glicose a partir de celobiose, mas também reduz a inibição da celobiose, permitindo enzimas endoglucanase e exoglucanase serem mais eficientes (KAUR *et al.*, 2006), aumentando a quantidade de açúcares redutores. Schneider *et al.* (2016) analisou a atividade enzimática produzidas a partir do *Penicicillium echinulatum* a partir de amostras selvagem (2HH) e mutante (S1M29), onde a atividade enzimática (U/mg) foi cultivada em quatro fontes de carbono (bagaço de cana-de-açúcar, celulose, glicerol e glicose), os resultados divergiram do presente estudo quando a atividade de pNPG cultivada em bagaço de cana-de-açúcar não pode ser observada, ademais as atividades pNPC, pNPX e pNPA não passaram de valor 1 (U/mg). Entretanto Bronnenmeier *et al.* (1995) utilizando *Thermotoga maritima* e xilana como substrato obteve atividade enzimática de 47,0 U/mL para pNPX, valor muito maior que os demais substratos (pNPG, pNPC e pNPA) o que deve-se ao fato da xilana ser o substrato principal fazendo com que o microrganismo tenha poucas opções de fonte de carbono, fazendo com que produza mais enzimas degradadoras de tal substrato. Além disso, nesse mesmo estudo, obtiveram uma atividade enzimática no substrato pNPG maior que a pNPC, que também pode ser explicado pelo fato da β -glucosidase ser responsável pela a regulação do processo celulolítico e diminuir a ação da celobiose (HARHANGI *et al.*, 2002).

5.7. Ensaio de sacarificação

A sacarificação enzimática foi dividida em cinco variações de acordo com a atividade da enzima bruta em conjunto com a enzima Ctec-2, mantendo 10 FPU como padrão (Figura 18). A amostra (A) foi usada apenas a enzima bruta concentrada do *A. pullulans* com valor de 10 FPU. A amostra (B) foi utilizada 7,5 FPU do microrganismo e 2,5 FPU da Ctec-2. A amostra (C) foi utilizada 7,5 FPU do microrganismo e 2,5 FPU da Ctec-2. A amostra (C) foi

utilizada 5,0 FPU do microrganismo e 5,0 FPU da Ctec-2. A amostra (D) foi utilizada 2,5 FPU do microrganismo e 7,5 FPU da Ctec-2. A amostra (E) foi utilizada 10 FPU da Ctec-2. A amostra (C) apresentou melhor resultado de açúcares redutores produzidos (Tabela 8), sendo a amostra que teve uma proporção de 5 FPU tanto da enzima bruta concentrada quando da enzima comercial Ctec-2. Tal aumento de atividade de ambas enzimas combinadas pode ser explicada pela variação qualitativa de enzimas celulolíticas, quanto maior a variação enzimática maior será a probabilidade das enzimas se ligarem e proporcionarem a hidrólise do material celulolítico.

Figura 18 - Sacarificação em relação aos tratamentos e tempo, tendo como fator diferentes tratamentos em relação ao seus respectivos FPU (U/ml): (A) 10 FPU *A. pullulans*; (B) 7,5 FPU *A. pullulans* + 2,5 FPU Ctec-2; (C) 5,0 FPU *A. pullulans* + 5,0 FPU Ctec-2; (D) 2,5 FPU *A. pullulans* + 7,5 FPU Ctec-2; (E) 10 FPU Ctec-2.

Fonte: Autoria própria

Tabela 8 - Controles das sacarificações, tendo como base o uso de tratamento sem enzimas (Controle 1) ou sem biomassa (Controle 2).

Açúcares redutores/Tempo	Controle 1			Controle 2		
	24	48	72	24	48	72
	0,523	0,555	0,521	0,412	0,423	0,532
	0,501	0,423	0,523	0,312	0,54	0,501
	0,425	0,412	0,315	0,412	0,527	0,497
Media	0,501	0,423	0,521	0,412	0,527	0,501

Fonte: Autoria própria

Após 72 h de sacarificação da biomassa pré-tratada, foi-se obtido 92,45% de conversão de biomassa total em açúcares redutores totais.

A remoção de lignina é importante para a melhoria da hidrólise enzimática, pois limita a hidrólise por ligação improdutivo com celulases, impedindo a acessibilidade da celulase em relação à carboidrato total disponível no substrato pré-tratado (Ascencio *et al.*, 2019). Entre todas as enzimas dos ensaios de hidrólise, a combinação de enzimas C apresentou os melhores resultados com 92,45% de rendimento de hidrólise seguido pela combinação de enzimas D e E, mostrando 86,3% e 85,90% de eficiência hidrolítica após 72 h de hidrólise enzimática. Combinação enzimática A produziu hidrólise enzimática mínima com 73,38% de rendimento. A baixa hidrólise enzimática pela combinação de enzimas A e B, onde foram maior proporção de enzima bruta de *A. pullulans*, do que de Ctec-2. A combinação de enzima C, onde ambos (CTec 2 e enzima bruta de *A. pullulans*) estavam em igual proporção, mostraram máximo rendimento de hidrólise. Esses resultados mostram claramente que as enzimas auxiliares presentes o extrato enzimático bruto de *A. pullulans* desempenha um papel vital na hidrólise de substâncias alcalinas pré-tratadas do bagaço da cana-de-açúcar. Combinações de enzimas isoladas CTec 2 (E) ou extrato de enzima bruta de *A. pullulans* (A) não foram suficientes para a completa sacarificação do bagaço de cana. O coquetel de celulase de uma única espécie microbiana ou mesmo coquetel comercial, por exemplo, Cellic® CTec 2 pode não ter todos os requisitos enzimas para a hidrólise da biomassa de lignocelulose. Celulases, com base nos microrganismos e condições de cultivo, podem mostrar grandes diferenças na composição, em especial o efeito direto nos rendimentos da hidrólise McMillan *et al.*, 2011. Por exemplo, Giese *et al.*, (2017) observaram diferenças na sacarificação da cana pré-tratada com ácido e álcalis de bagaço de cana-de-açúcar quando as preparações enzimáticas específicas foram aplicadas. Adição de celobiase a experimentos de hidrólise Celluclast® 1,5 L e Cellulase AF28918 aumentaram a liberação de glicose em 47 e 30%, respectivamente.

5.8.Caracterização

Os resultados da Tabela 10 e Tabela 11, in natura e após pré-tratamento alcalino respectivamente, demonstram a quantidade de lignina total (solúvel e insolúvel), glucana, xilana, arabinosil e cinzas. Os resultados demonstraram uma variância menor que 10%.

Ao comparar a caracterização de amostra do bagaço de cana-de-açúcar com do pré-tratamento alcalino (4%) com a in natura pode-se observar uma diminuição na concentração de lignina total e do arabinosil, consequentemente um aumento da concentração de glucana. A xilana também houve um aumento, porém não significativo (variância menor que 10%).

Tabela 9 - Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* tendo como critérios lignina total, glucana, xilana, arabinosil e cinzas, em porcentagem.

	Lignina total	Glucana	Xilana	Arabinosil	Cinzas	Total
A	30,878	39,917	22,327	9,728	3,459	106,3089
B	33,421	40,623	20,642	10,795	3,665	109,1463
C	31,619	41,023	24,525	9,123	3,518	109,8078

Fonte: Autoria própria

Tabela 10 - Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino (4% de NaOH em solução) tendo como critérios lignina total, glucana, xilana, arabinosil e cinzas, em porcentagem.

Amostra	Lignina total	Glucana	Xilana	Arabinosil	Cinzas
A	6,78	66,65	27,80	6,24	1,53
B	7,35	62,25	26,72	6,88	0,79
C	8,38	54,88	23,77	6,08	0,69
Media	7,58	60,77	25,78	6,16	0,74

Fonte: Autoria própria

Tabela 11 - Total de celulose e hemicelulose resultantes da caracterização do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* tendo como critérios Celulose e hemicelulose total da amostra, em porcentagem

Celulose (%)	Hemicelulose (%)
60,77	31,94

Fonte: Autoria própria

Esses resultados condizem com Carrasco *et al.* (1994) e Mussatto *et al.* (2007), onde o tratamento alcalino com NaOH foi o método mais eficiente para deslignificar resíduos agrícolas aumentando a área de superfície interna, diminuindo o grau de polimerização e cristalinidade, separando as ligações estruturais entre lignina e carboidratos pelo rompimento da estrutura da lignina. A desvantagem dessa técnica é que ela também degrada uma fração da hemicelulose (Suleiman, 2016). Outros tipos de pré-tratamento, por outro lado, causam pouco efeito na redução do teor de lignina podendo reduzir o teor de celulose. O ácido diluído sob vapor, por exemplo, é o método mais amplamente utilizado para a decomposição da hemicelulose, mas as limitações desse método incluem a ruptura incompleta da matriz lignina-carboidrato e a geração de compostos que podem inibir os microrganismos (SUN *et al.*, 2002; CARVALHEIRO *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2009).

5.9. Análises bioinformática aplicada a análises proteômicas

5.9.1. Análise SDS-PAGE e digestão dos blocos selecionados

As análises SDS-PAGE foram analisadas a partir das enzimas brutas extraídas de *A. pullulans* extraídas a partir da fermentação da melhor atividade de CMC e FPU usando bagaço de cana-de-açúcar no tempo de 60 horas, onde foram avaliadas usando substratos

CMC e papel filtro, em triplicata. Observa-se uma quantidade incontável de bandas, o que dificulta na seleção para digestão. Devido a esse fator foram divididos entre seis blocos de acordo com as bandas mais expressivas. O bloco (1) foi estimado em um valor acima de 97 kDa, o bloco (2) variou entre um pouco acima de 97 kDa e um pouco abaixo de 65 kDa, o bloco (3) variou entre 65 kDa e 45 kDa, o bloco (4) variou entre um pouco abaixo de 45 kDa e um pouco acima de 30 kDa, o bloco (5) variou de um pouco acima de 30 kDa até um pouco abaixo de 20.1 kDa, por fim o bloco (6) variou de um pouco abaixo de 20.1 kDa a um pouco abaixo de 14.4 kDa, como exemplificado na Figura 19.

Figura 19 – Fotografia retirada a partir do programa ImageLab da amostra de SDS-PAGE das enzimas brutas extraídas de *A. pullulans* extraídas a partir da fermentação da melhor atividade de CMC e FPU usando bagaço de cana-de-açúcar no tempo de 60 horas.

Fonte: Autoria própria

Pelo perfil de uma quantidade alta de bandas, devido a amostra representar o secretoma total do microrganismo, foi feita análise por espectrometria de massas (LC/MS-MS) para confirmar os tipos de enzimas celulolíticas presentes na enzima bruta após fermentação usando bagaço de cana-de-açúcar nas melhores condições de acordo com o item 5.5.

5.9.2. Análise de bioinformática dos blocos SDS-PAGE

As amostras de secretoma bruto de *A. pullulans* analisadas por LC/MS-MS na central Central Analítica do Instituto de Química da USP São Paulo, obtiveram um total de 464 proteínas (Tabela em anexo), das quais 38 correspondiam a CAZymes (8,18% do total de proteínas). Dentre as CAZymes foram encontrados 21 glicosídeos hidrolases (55,26%), 12 glicosídeos hidrolases com módulo de ligação de carboidratos (31,58%), 4 carboidratos esterases (10,53%), uma glicosil transferase (2,63%), como demonstrado na Figura 20.

Figura 20 – Gráfico demonstrando a proporção (%) do secretoma bruto de *A. pullulans* analisadas por LC/MS-MS na central Central Analítica do Instituto de Química da USP São Paulo, com total de 464 proteínas, sendo 38 correspondentes a CAZymas (8,18% do total de proteínas). Dentre as CAZymeas foram encontrados 21 glicosídeo hidrolases (55,26%), 12 glicosídeo hidrolases com módulo de ligação de carboidratos (31,58%), 4 carboidratos esterases (10,53%), uma glicosil transferase (2,63%).

Fonte: Autoria própria

De acordo com o gráfico, é possível visualizar que as proteínas CAZymas representam um total de 8% do total de proteínas encontradas. Isso ocorre porque a fábrica de células microbianas depende do secretoma e suas subproteínas segregadas e enzimas e ajuda os fungos em muitas vias necessárias, sendo uma delas a digestão. O secretoma não determina sozinho as moléculas orgânicas sintetizadas dos fungos, mas também a patogenicidade de uma cepa específica (GENESAN *et al.*, 2016). O secretoma constitui um conjunto completo de proteínas secretadas, que pode chegar a 30% do proteoma total de um organismo, incluindo classes funcionalmente diversas de moléculas (citocinas, quimiocinas, hormônios, enzimas digestivas, anticorpos, proteinases extracelulares, morfogênios, toxinas, e peptídeos antimicrobianos) Finkelstein, 1987), como também é visualizado no presente estudo.

Algumas dessas proteínas estão envolvidas em diversos processos biológicos vitais, incluindo adesão celular, migração, comunicação célula-célula, diferenciação, proliferação, morfogênese, sobrevivência e defesa (FLEISHMANN *et al.*, 1995), o que condiz com o presente estudo por possuir proteínas que não são celulolíticas mas de funcionalidade vital para célula.

Expressões de genes específicos na cepa microbiana utilizando diferentes fontes de carbono envolvem uma complexa rede genética e diferem quanto ao tipo e complexidade das fontes de carbono. Essa rede pode ser estudada a partir de três formas: o perfil de transcrição ou expressão gênica, análises proteômicas (expressões proteicas) e metabolômica. (FINKELSTEIN, 1987). Para degradar tais fontes de carbono os microrganismos degradam os substratos complexos de forma externa, secretando um grande número de enzimas hidrolíticas extracelulares, levando-o a secretar um “coquetel” específico para cada fonte de carbono (FOWLER *et al.*, 1990).

Em alguns trabalhos como Mendoza (2013), usando *Trichoderma harzianum* e bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, foi observado que o secretoma expressou um total de 205 proteínas, das quais 107 foram exclusivos dessa matéria prima, em comparação as demais fontes de carbono (glicose, celulose e xilana), observando uma quantidade de 46,83% de proteínas CAZy, sendo suas atividades enzimáticas (U/mL) de CMCase $0,18 \pm 0,02$ e FPase de $0,71 \pm 0,41$. Ao compararmos com o resultado do presente trabalho, observa-se que foram obtidos mais proteínas no total com *A. pullulans* (464 proteínas), sendo apenas 38 representam enzimas CAZy (8%), porém observa-se que a atividade enzimática nas condições do presente trabalho usando a mesma fonte de carbono obteve-se 7,41 U/mL, o que sugere que o microrganismo usado é mais versátil e possui uma sinergia maior entre suas enzimas celulolíticas para a degradação da celulose em comparação a tese apresentada.

No presente estudo observou-se que as condições do item 5.5., obtiveram os melhores resultados, sugerindo um melhor complexo ou coquetel enzimático celulolítico secretado pelo *A. pullulans*. Tal complexo foi denominado separado de acordo com as CAZymas e seus respectivos representantes (glicosil hidrolases (GH), glicosídeo hidrolases com módulo de ligação de carboidratos (CBM), carboidratos esterases (CE) e glicosil-transferase (GT), como demonstrado na Figura 21.

Figura 21 - Gráfico demonstrando a proporção (%) do secretoma bruto de *A. pullulans* analisadas por LC/MS-MS na central Central Analítica do Instituto de Química da USP São Paulo. Proteínas separadas de acordo com a base de dados CAZy e seus respectivos representantes (glicosil hidrolases (GH), glicosídeo hidrolases com módulo de ligação de carboidratos (CBM), carboidratos esterases (CE) e glicosil-transferase (GT)).

Fonte: Autoria própria

De acordo com a base de dados CAZy (<http://www.cazy.org/>), obteve-se informações sobre os domínios funcionais, os encontrados no presente estudo são glicosil hidrolases (GH), glicosídeo hidrolases com módulo de ligação de carboidratos (CBM), carboidratos esterases (CE) e glicosil-transferase (GT).

É visto que as GHs possuem maioria (55,26%) por ser a de maior importância na degradação celulolítica. Isso ocorre porque a ação enzimática para degradação da celulose precisa de três enzimas circunstanciais: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, agindo de forma simultânea no polímero, os quais são denominados no CAZy como glicosil hidrolases (DASHTBAN *et al.*, 2010; VLASENKO *et al.*, 2010; HORN *et al.*, 2012). Todas essas celulasas são hidrolases, pois clivam as ligações glicosídicas pela adição de uma molécula de água (DAVIES; HENRISSAT, 1995). De acordo com a própria base de dados, as GH são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação glicosídica dos glicosídeos, levando à formação de um açúcar hemiacetal ou hemicketal e o aglicônio livre correspondente. As glicosidas-hidrolases também são referidas como glicosidases e, às vezes, também como glicosil-hidrolases. As hidrolases de glicosídeo podem catalisar a hidrólise de glicosídeos ligados à O, N e S (PARK *et al.*, 2017).

As hidrolases de glicosídeos podem ser classificadas de várias maneiras diferentes, sendo a capacidade de uma hidrolase de glicosídeo clivar um substrato no final (Exo-) ou no meio de uma cadeia (Endo-) (DAVIES *et al.*, 1995), como demonstrado na Figura 22.

Figura 22 - Ação do glicosídeo hidrolase com H₂O formando hemiacetal com aglicônio livre correspondente.

Fonte: Park *et al.* (2017)

Em relação as glicosil transferases, carboidrato esterases e atividades auxiliares ainda não há uma definição sobre a separação entre GH e tais enzimas. O trabalho de Ribeiro *et al.* (2012) defende que deve-se separar GH das demais enzimas. Já de Gouvêa *et al.* (2018) defende que deve-se separar de acordo com o protocolo CAZy, onde cada enzima representaria um foco no estudo. Já Manavalan *et al.* (2012) separa as enzimas do seu estudo em função a ontologia do gene.

No presente trabalho observou-se 55,26% de GH, 31,58% de GH com CBM, 10,53% de CE, 2,63% de GT e nenhuma de AA e PL com o extrato bruto com atividades enzimáticas de 7,41 U/mL de CMC (1%) e 6,118 U/mL de β -glucosidase, sendo que Gouvêa *et al.* (2018) obteve 566 CAZymas sendo 40% de GH, 10% de CE, 7% de CBM, 5% de GT, 5% de AA e 2% de PL, sendo o máximo obtido em 72 horas 0,03 U/mL para CMCase e 0,8 U/mL para β -glucosidase. Ao compararmos os dois resultados vimos que, por mais que o autor citado possua mais proteínas totais, o estudo em questão obteve maior proporção de GH, o que sugere sua maior atividade enzimática e que o estudo de análises proteômicas a partir do secretoma bruto faz-se necessário para compreender a forma como tais complexos enzimáticos auxiliam na degradação da celulose.

Com isso pode-se dizer que o presente microrganismo consegue degradar diferentes porções do polímero de celulose presente no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado alcalinamente, que foi a principal fonte de carbono usada na sua produção. Tal característica é observada em vários trabalhos de acordo com Berret *et al.*, (2020), onde foi comparado o perfil enzimático de vários organismos de diversos artigos, onde concluiu-se que há uma grande variedade na produção das enzimas, principalmente CAZymas, dependendo do microrganismo e dos parâmetros usados (fonte de nutrientes, minerais e condições físicas)

Dentre as CAZymas encontradas também são separadas de acordo com sua função putativa, assim como a função molecular e suas famílias de módulos de ligação catalítica e de carboidratos estruturalmente relacionados (ou domínios funcionais) de enzimas que degradam, modificam ou criam ligações glicosídicas (Figura 23). A

Arabinanase/levansucrase/invertase, Alfa-1,4 glucano fosforilase, Family 51 glicosídeo hidrolase, proteína da família GDSL lipase/acilhidrolase, proteína que contém domínio GH115_C, Glucana 1,3-beta-glucosidase, Glucana 1,4-alfa-maltohexaosidase, Glucanase b, glucoamilase, glicosídeo hidrolase, segregação vacuolar putativa de proteína e glucosidase com seis grampos com 2,7% cada do total de CAZymas. Outras proteínas encontradas são a de domínio GH115_C com 5,4%, 1,4-beta-D-xilosidase, Alfa-glucosidase, Arabinanase/levansucrase/invertase, com 8,1% cada, Beta-glucosidase e GDSL lipase/acilhidrolase com 10,81% e glicosídeo hidrolase com 24,32%.

Figura 23 - Gráfico demonstrando a proporção (%) do secretoma bruto de *A. pullulans* analisadas por LC/MS-MS na central Central Analítica do Instituto de Química da USP São Paulo. Proteínas separadas de acordo com a base de dados CAZy e seus respectivos representantes de acordo com sua função molecular.

Fonte: Autoria própria

Pode-se observar 16 enzimas de acordo com suas funções putativas tendo como base de dados o CAZy. Cada uma delas possui uma função específica ou diversas funções na degradação do polímero celulolítico e podem ser associadas ao seu módulo catalítico (Subdividido em várias classes de enzimas e suas famílias que catalisam a decomposição, biossíntese e/ou modificação de glicoconjugados, oligo e polissacarídeos) e seus módulos

associados (Famílias de módulos encontrados anexados aos módulos catalíticos). Os diferentes tipos de famílias enzimáticas podem elucidar no processo de compreensão da ação catalítica das enzimas. Na Tabela 13 observa-se a relação das enzimas putativas e suas famílias CAZy do presente estudo.

Tabela 12 - Relação das enzimas encontradas a partir do secretoma bruto de *A.pullulans* usando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, tendo como foco sua função putativa e a relação com as enzimas CAZy.

Função putativa	Família GH	Família CBM	Família CE	Família GT
Arabinanase/levansucrase/invertase	GH43			
1,4-beta-D-Xilosidase	GH3	CBM6		
Alfa-1,4 glucana fosforilase				GT35
Alfa-glucosidase	GH31			
Arabinanase/levansucrase/invertase	GH43	CBM13		
Beta-glucosidase	GH3			
Glicosídeo hidrolase da família 51	GH51			
Proteína da família GDSL lipase/acilhidrolase			CE16	
Proteína que contém domínio GH115_C	GH115			
Glucan 1,3-beta-glucosidase	GH55			
Glucana 1,4-alfa-maltohexaosidase	GH13			
Glucanase b	GH64	CBM6		
Glucoamilase	GH15	CBM20		
Glicosídeo hidrolase	GH 51/GH5/GH3/GH 17			
Proteína putativa de segregação vacuolar	GH51			
Glicosidase de seis grampos	GH142			

Fonte: Autoria própria

A arabinanase/levansucrase/invertase, de acordo com a base de dados CAZy possui família GH43, cuja reação enzimática ocorre pelo mecanismo de inversão (PITSON *et al.*, 1996; Kersters-Hilderson (1976), sendo elas atividades de β -xilosidase (EC 3.2.1.37); α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55); xilanase (EC 3.2.1.8); α -1,2-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.-); exo- α -1,5-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.-); exo- α -1,5-L-arabinanase (EC 3.2.1.-); β -1,3-xilosidase (EC 3.2.1.-); exo- α -1,5-L-arabinanase (EC 3.2.1.-); endo- α -1,5-L-arabinanase (EC 3.2.1.99); exo- β -1,3-galactanase (EC 3.2.1.145); β -D-galactofuranosidase (EC 3.2.1.146). As principais atividades relatadas para esta família de glicosídeos hidrolases são α -L-arabinofuranosidases (FLIPPHI *et al.*, 1993), endo- α -L-arabinanases (ou arabinanases endo-processivas) (FLIPPHI *et al.*, 1993; MCKIE *et al.*, 1994) e β -D-

xilosidases (SHALLOM *et al.*, 2005). Uma enzima com exo α -1,3-galactanase também foi descrita (ICHINOSE *et al.*, 2005). Um número significativo de enzimas nesta família exibe a atividade da α -L-arabinofuranosidase e da β -D-xilosidase usando aril-glicosídeos como substratos. É provável que a atividade natural dessas enzimas seja conferida pelo componente do grupo de saída do substrato. De fato, as atividades de arabinofuranosidase já relatadas visavam glicanos muito diferentes. Assim, a enzima arabinoxilana α -L-arabinofuranohidrolase de *Bacillus subtilis* remove especificamente as cadeias laterais de arabinofuranose que estão ligadas tanto α -1,2 quanto α -1,3 aos resíduos de xilose da espinha dorsal (BOURGOIS *et al.*, 2007), enquanto o arabinoxilan arabinofuranoidrolase-D3 (AXHd3) de *Bifidobacterium adolescentis* removerá uma arabinofuranose ligada a α -1,3 dos xilanos, onde o resíduo xilose é substituído em α -1,2 e α -1,3 por arabinose (BROEK *et al.*, 2005). Por outro lado, algumas arabinofuranosidases são exo- α -1,5-L-arabinanases (MATSUO *et al.*, 2000). Tal enzima apresenta uma maior especificidade no geral, com isso pôde-se observar uma grande quantidade de diversidade na literatura. De acordo com a base de dados CAZy a base geral catalítica, um aspartato, o ácido geral catalítico, um glutamato e um aspartato, modula o pKa do ácido geral, gerando um resíduo catalítico (NURIZZO *et al.*, 2002).

A 1,4-beta-D-xilosidase, Beta-glucosidase e um Glicosídeo hidrolase possuem família GH3, sendo uma das mais estudadas na literatura devido sua alta distribuição secretômica podendo serem encontradas em bactérias, fungos e plantas (HARVEY *et al.*, 2000), MCDONALD *et al.*, 2015). Sua reação química ocorre com um deslocamento duplo de Koshland (MCDONALD *et al.*, 2015, DUCATTI *et al.*, 2016), sendo sua atividade de β -glucosidase (EC 3.2.1.21); xilana 1,4- β -xilosidase (EC 3.2.1.37); β -glucosilceramidase (EC 3.2.1.45); β -N-acetilhexosaminidase (EC 3.2.1.52); α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55); glucana 1,4- β -glucosidase (EC 3.2.1.74); isoprimeverose-produtora oligoxiloglucana hidrolase (EC 3.2.1.120); coniferina β -glucosidase (EC 3.2.1.126); exo-1,3-1,4-glucanase (EC 3.2.1.-); β -N-acetilglucosaminide fosforilases (EC 2.4.1.-); β -1,2-glucosidase (EC 3.2.1.-); β -1,3-glucosidase (EC 3.2.1.-); xiloglucana-especifica exo- β -1,4-glucanase/exo-xiloglucanase (EC 3.2.1.155). Tais enzimas desempenham uma série de funções, incluindo degradação da biomassa celulósica, remodelação da parede celular de plantas e bactérias, metabolismo energético e defesa de patógenos. Em muitos casos tais enzimas se tornam multifuncionais, com especificidades de substrato duplas ou amplas em relação a resíduos de monossacarídeos, posição de ligação e comprimento da cadeia do substrato (LEE *et al.*, 2003). É visto que tal enzima são multigênicas, ou seja, codificadas

por vários genes (HENRISSAT *et al.*, 2001; GEISLER *et al.*, 2006; GOODSTEIN *et al.*, 2012). Com isso sua filogenia torna-se altamente complexa, podendo ser realizada em subfamílias (STAM *et al.*, 2006, LOMBARD *et al.*, 2010, ASPEBORG *et al.*, 2012).

A Alfa-glucosidase possui família GH31, sendo uma das duas famílias de glicosídeo hidrolases de acordo com a base de dados CAZy, por conter α -glucosidase e ser importante no metabolismo primário dos seres vivos. Possuem atividades de α -glucosidase (EC 3.2.1.20); α -galactosidase (EC 3.2.1.22); α -manosidase (EC 3.2.1.24); α -1,3-glucosidase (EC 3.2.1.84); sucrase-isomaltase (EC 3.2.1.48) (EC 3.2.1.10); α -xilosidase (EC 3.2.1.177); α -glucana liase (EC 4.2.2.13); isomaltosiltransferase (EC 2.4.1.-); oligossacarídeo α -1,4-glucosiltransferase (EC 2.4.1.161); sulfoquinovosidase (EC 3.2.1.-). As enzimas da família GH31 retêm α -glicosidases, como foi demonstrado pela primeira vez por uma combinação de medição polarimétrica e de açúcares redutores (CHIBA *et al.*, 1979). Pensa-se que as enzimas GH31 (exceto as α -glucanas-liases) sigam o mecanismo de duplo deslocamento clássico de Koshland (FRANDSEN *et al.*, 1998).

A família glicosídea hidrolase 51, possui família GH51 de acordo com a base de dados CAZy. Possui atividade nas famílias endoglucanase (EC 3.2.1.4); endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8); β -xilosidase (EC 3.2.1.37); α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55); liquenase/endo- β -1,3-1,4-glucanase (EC 3.2.1.73). A maioria das hidrolases glicosídicas dessa família hidrolisam a ligação glicosídica entre as cadeias laterais de L-arabinofuranosídeos das hemiceluloses, como arabinoxilano, arabinogalactano e L-arabinano. Algumas enzimas da família exibem atividade da β -1,4-endoglucanase em relação à carboximetilcelulose e xilano (ECKERT; SCHNEIDER, 2003). As L-arabinofuranosídeses GH51 são enzimas de retenção e seguem um mecanismo de retenção Koshland clássico. Devido às rápidas taxas de mutarotação e tautomerização da arabinose, o curso estereoquímico da reação foi monitorado na presença de metanol e seguido por espectroscopia de RMN (PITSON *et al.*, 1996; DEBECHE *et al.*, 2002; SHALLOM *et al.*, 2002; SHALLOM *et al.*, 2002).

A família da proteína de domínio GH115_C, como o próprio nome sugere, possui família GH115 de acordo com a base de dados CAZy. Possui atividade de xilana α -1,2-glucuronidase (3.2.1.131); α -(4-O-metil)-glucuronidase (3.2.1.-). Possuem atividade de α -glucuronidase. De acordo com a base de dados CAZy, membros desta família catalisam a clivagem de cadeias laterais do ácido 4-O-metil D-glucurônico de polissacarídeos xilanos nativos (EC 3.2.1.131), removendo o ácido glucurônico das regiões terminais e internas dos xilooligossacarídeos e xilanos (RYABOYA *et al.*, 2009; KHANDKE *et al.*, 1989; Tenkapen

e Sjukanaho, 2000). Embora o GH115 tenha sido estabelecido com base na análise bioquímica e sequencial da *Pichia stipitis* (4-O-metil)- α -glucuronidase (RYABOYA *et al.*, 2009), a sequência de proteína N-terminal disponível da enzima *S. commune* (Tenkapien e Sjukanaho, 2000) permitiu a tentativa de atribuição de esta enzima para GH115 [1], que foi posteriormente confirmada pela sequência completa de proteínas (CHONG *et al.*, 2011). Usando o ácido aldopentaurônico reduzido (MeGlcA3Xyl4-ol) como substrato, a análise por espectroscopia de ^1H -RMN, Kolenová *et al.* (2010) revelou que as enzimas da *S. commune* e da *P. stipitis* liberam o β -anômero do ácido 4-O-metil-D-glucurônico (MeGlcA) como o produto formado pela primeira vez, sugerindo um mecanismo de inversão de uma etapa.

A Glucan 1,3-beta-glucosidase possui família GH55 de acordo com a base de dados CAZy. Possui atividade exo- β -1,3-glucanase (EC 3.2.1.58); endo- β -1,3-glucanase (EC 3.2.1.39). A maioria dos membros consiste nas exo-glucan-1,3- β -glucosidases (EC 3.2.1.58), que clivam a ligação β -1,3-glicosídica terminal na extremidade não redutora de β -1, 3-glucanos ou β -1,3/1,6-glucanos (β -1,3-glucano possuindo cadeias laterais únicas de β -1,6-glucósido, também conhecidas como laminarina). Muitos produzem gentiobiose (β -D-glucopiranosil-1,6-D-glicose), além de glicose durante a degradação do β -1,3/1,6-glucano (PITSON *et al.*, 1995; BARA *et al.*, 2003). Devido à atividade da laminarina, os membros do GH55 podem ser referidos como "laminarinases". No entanto, o substrato fisiológico para essas enzimas pode ser a parede celular de fungos, cujo componente principal também é o β -1,3/1,6-glucano. As enzimas da família 55 são enzimas inversoras, como mostra a análise 1NMR em ExgS de *Aspergillus phoenicis* (KASAHARA *et al.*, 1992). Esses resultados são consistentes com muitos relatos clássicos de exo- β -1,3-glucanases produtoras de gentiobiose de fungos (NELSON, 1970; NAGASAKI *et al.*, 1977). Tais enzimas ainda não possuem seus genes descritos na literatura.

A Glucan 1,4-alfa-maltohexaosidase consiste em uma das famílias mais bem descritas na literatura, possuindo cerca de 97983 sequências inclusas no GenBank. As principais atividades de acordo com a base de dados CAZy são α -amilase (EC 3.2.1.1); pululanase (EC 3.2.1.41); ciclomaltodextrina glucanotransferase (EC 2.4.1.19); ciclomaltodextrinase (EC 3.2.1.54); trehalose-6-phosphate hidrolase (EC 3.2.1.93); oligo- α -glucosidase (EC 3.2.1.10); maltogenico amilase (EC 3.2.1.133); neopululanase (EC 3.2.1.135); α -glucosidase (EC 3.2.1.20); formadora de maltotetraose α -amilase (EC 3.2.1.60); isoamilase (EC 3.2.1.68); glucodextranase (EC 3.2.1.70); maltohexose-formador α -amylase (EC 3.2.1.98); maltotriose-formador α -amilase (EC 3.2.1.116); enzima de ramificação (EC 2.4.1.18); trehalose sintase (EC 5.4.99.16); 4- α -glucanotransferase (EC 2.4.1.25);

maltopentose-formador α -amilase (EC 3.2.1.-); amilosucrase (EC 2.4.1.4); sucrose fosforilase (EC 2.4.1.7); malto-oligosiltrehalose trehalohidrolase (EC 3.2.1.141); isomaltulose sintase (EC 5.4.99.11); malto-oligosiltrehalose sintase (EC 5.4.99.15); amilo- α -1,6-glucosidase (EC 3.2.1.33); α -1,4-glucan: fosfato α -maltosiltransferase (EC 2.4.99.16); amino ácido transportador; sucrose 6(F)-fosfato fosforilase (EC 2.4.1.329); glucosilglicerol fosforilase (EC 2.4.1.359); ; Glucosilglicerate fosforilase (EC 2.4.1.352). A família GH13 é a principal família de hidrolase de glicosídeo que atua em substratos contendo ligações α -glucósido (SVENSSON, 1994; JANECEK, 1997; KURIKI; IMANAKA, 1999; MACGREGOR *et al.*, 2001; MAAREL *et al.*, 2002), hidrolases, transglicosidases e isomerases (MACGREGOR *et al.*, 2001); transportadores de aminoácidos animais, que não possuem atividade de glicosidase (JANECEK *et al.*, 1997; FORT *et al.*, 2007). As enzimas são encontradas em uma ampla variedade de organismos de todos os reinos, podendo ser subdivididas em até 40 subfamílias (JANECEK *et al.*, 1997; STAM *et al.*, 2006). Tal variedade favoreceu em uma maior especificidade do substrato e do produto e na diversidade de sequências. Seu mecanismo baseia-se na ação de retenção (KIMURA; CHIBA, 1983) podendo seguir o mecanismo de duplo deslocamento clássico de Koshland. Alguns dos membros do GH13 usam um ataque múltiplo ou mecanismo de processo (ROBYT; FRENCH, 1967; MAZUR; NAKATANI, 1993; KRAMHOFT *et al.*, 2005) envolvendo várias clivagens de ligações glicosídicas a serem executadas no mesmo encontro enzima-substrato. Bozonner *et al.* (2007), Nielsen *et al.* (2008), Nielsen *et al.* (2009) e Ragunath *et al.* (2008) demonstraram que as enzimas GH13 interagem com substratos poliméricos em locais de superfície situados a uma certa distância do local ativo. A interação com substratos insolúveis, como grânulos de amido ou glicogênio, pode ocorrer nesses locais (NIELSEN *et al.*, 2008; NIELSEN *et al.*, 2009; TIBBOT *et al.*, 2000), bem como pelo envolvimento de módulos de do amido (PENNINGA *et al.*, 1996; RODRIGUEZ *et al.*, 2000; SUMITANI *et al.*, 2000).

Glucanase b de acordo com a base de dados CAZy possui atividade β -1,3-glucanase (EC 3.2.1.39), sem GH64. Tal característica de possuir apenas uma atividade fez com que ela fosse pouco estudada na literatura, sendo abundantes em *Streptomyces* sp (NAKABAYASHI *et al.*, 1998; PALUMBO *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2009). Seguem um mecanismo de inversão operando assim por um mecanismo de deslocamento único (NISHIMURA *et al.*, 2001).

A Glucoamilase, de acordo com a base de dados CAZy, consiste na família GH15, onde sua atividade consiste em glucoamilase (EC 3.2.1.3); glucodextranase (EC 3.2.1.70);

α,α -trehalase (EC 3.2.1.28); dextran dextrinase (EC 2.4.1.2). As hidrolases glicosídicas desta família são enzimas de ação exoativa que hidrolisam os resíduos finais não redutores dos α -glicosídeos. Atualmente, a atividade mais comumente caracterizada é a glucoamilase (EC 3.2.1.3), também conhecida como amiloglucosidase. Em fungos apresentam flexibilidade de substrato e são capazes de degradar não apenas as ligações α -1,4-glicosídicas, mas também as ligações α -1,6-, α -1,3- e α -1,2 um grau mais baixo (MAEGHER; REILLY, 1989). Sua atividade indica que são enzimas inversoras, como demonstrado (WEIL *et al.*, 1954) e seguem um mecanismo clássico de deslocamento de uma etapa de Koshland.

As enzimas glicosídeas hidrolases encontradas no presente estudo possuíram quatro tipos diferentes de família CAZy: GH51, GH5, GH3 (já descrita anteriormente) e GH17. A família GH51 também é encontrada na proteína de segregação vacuolar putativa, possuindo atividade de endoglucanase (EC 3.2.1.4); endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8); β -xilosidase (EC 3.2.1.37); α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55); liquenase / endo- β -1,3-1,4-glucanase (EC 3.2.1.73). Tais enzimas hidrolisam a ligação glicosídica entre as cadeias laterais de L-arabinofuranosídeos das hemiceluloses, como arabinoxilano, arabinogalactano e L-arabinano. Algumas enzimas da família exibem atividade da β -1,4-endoglucanase em relação à carboximetilcelulose e xilano (ECKBERT; SCHENEIDER, 2003). São enzimas de retenção e seguem um mecanismo de retenção Koshland clássico (PITSON *et al.*, 1996; DEBECHE *et al.*, 2002). Outra família dessa mesma enzima é a GH5, sendo uma das maiores famílias de glicosídeos CAZy (1,2), que possui atividades de endo- β -1,4-glucanase/cellulase (EC 3.2.1.4); endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8); β -glucosidase (EC 3.2.1.21); β -manosidase (EC 3.2.1.25); β -glucosilceramidase (EC 3.2.1.45); glucana β -1,3-glucosidase (EC 3.2.1.58); exo- β -1,4-glucanase/celodextrinase (EC 3.2.1.74); glucana endo-1,6- β -glucosidase (EC 3.2.1.75); manana endo- β -1,4-mannosidase (EC 3.2.1.78); celulose β -1,4-celobiosidase (EC 3.2.1.91); estéril β -glucosidase (EC 3.2.1.104); endoglicoceramidase (EC 3.2.1.123); chitasanase (EC 3.2.1.132); β -primeverosidase (EC 3.2.1.149); xiloglucana-específica endo- β -1,4-glucanase (EC 3.2.1.151); endo- β -1,6-galactanase (EC 3.2.1.164); β -1,3-mananase (EC 3.2.1.-); arabinoxilana-específica endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.-); manana transglicosilase (EC 2.4.1.-); liquenase/endo- β -1,3-1,4-glucanase (EC 3.2.1.73); β -glicosidase (EC 3.2.1.-); endo- β -1,3-glucanase/laminarinase (EC 3.2.1.39); β -N-acetilhexosaminidase (EC 3.2.1.52); chitasanase (EC 3.2.1.132); β -D-galactofuranosidase (EC 3.2.1.146); β -galactosilceramidase (EC 3.2.1.46); ; β -rutinosidase/ α -L-ramnose-(1,6)- β -D-glucosidase (EC 3.2.1.-); α -L-arabinofuranosidase

(EC 3.2.1.55). Por possuírem pouca variedade de especificidades nessa família, é uma enzima versátil em relação ao seu substrato (GILKES *et al.*, 1991; JOHN *et al.*, 2010; ASPEBORG *et al.*, 2012). Sua ação segue o mecanismo de duplo deslocamento de Koshland (HENRISSAT *et al.*, 1995). Por último dessa enzima pela classificação putativa temos a classificação GH17, que possui atividade nas famílias gluca endo-1,3- β -glucosidase (EC 3.2.1.39); liqueninase (EC 3.2.1.73); ABA-específica β -glucosidase (EC 3.2.1.175); β -1,3-glucanosyltransglycosylase (EC 2.4.1.-); β -1,3-glucosidase (EC 3.2.1.-). Tal família é comum em bactérias, fungos e plantas, e incluem dois grupos principais de enzimas com especificidades de substratos relacionadas, as endoidrolases de 1,3- β -D-glucano (EC 3.2.1.39) e Endo-hidrolases de 1,3; 1,4-p-D-glucano (EC 3.1.2.73). Possuem sequências de aminoácidos bastante distintas e estruturas 3D em comparação com as endohidrolases de 1,3- β -D-glucana e endohidrolases de 1,3; 1,4- β -D-glucana que possuem especificidades de substrato semelhantes. Os produtos de reação liberados são principalmente 1,3 ou 1,4- β -D-tri- e tetrassacarídeos (G4G3Gred e G4G4G3Gred), mas também liberam oligossacarídeos mais altos de até 10 ou mais resíduos contíguos de 1,4- β -D-glucosil com um único resíduo 1,3-p-D-glucosil terminal (WOODWARD; FINCHER, 1982). A sua catálise ocorre através do mecanismo de retenção de Koshland (CHEN *et al.*, 1995).

A enzima Glicosidase com seis grampos possui denominação CAZy de GH 142. É uma das enzimas menos estudadas do grupo das glicosil hidrolases, sendo apenas recentemente caracterizada sua função catalítica (NDEH *et al.*, 2017; LUIS *et al.*, 2018) e sua estrutura por cristal (SAITO *et al.*, 2020). Tal enzima representa uma lacuna no conhecimento das glicosil hidrolases, sendo necessário maiores estudos sobre seu funcionamento e estrutura que são ainda pouco discutidos.

A enzima arabinanase/levansucrase/invertase, também possui uma porção CBM13, que consiste em módulos de aproximadamente 150 resíduos que sempre aparecem como uma repetição interna tríplice. Já as enzimas 1,4-beta-D-xilosidase e Glucanase b possuem família CBM6, que consiste em módulos de aprox. 120 resíduos. Sua função é a ligação e direcionamento de carboidratos, aumentando a atividade do domínio catalítico adjacente em substratos insolúveis. Os módulos associados mais comuns são enzimas como xilanases, liquenases, β -agarases, laminarinases, desacetilases (MCCARTNEY *et al.*, 2004). Já a glucoamilase possui família CBM20, que possui função granular de ligação ao amido pela interação com as ciclodextrinas alterando sua superfície, aumentando assim a taxa amilolítica (SOUTHALL *et al.*, 1999; JANEČEK *et al.*, 2019/2011; VU *et al.*, 2019).

A enzima Alfa-1,4 glucana fosforilase, de acordo com a base de dados CAZy possui família GT35, que possui função de ser biossintetizante de dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos, catalisando a transferência de porções de açúcar de moléculas doadoras para moléculas específicas, formando ligações glicosídicas. As glicosiltransferases podem ser classificadas como enzimas retentoras ou inversoras, de acordo com a estereoquímica dos substratos e produtos da reação (SINNOT *et al.*, 1990; LAIRSSON *et al.*, 2008).

A enzima da proteína da família GDSL lipase/acilhidrolase possui família CE16, como todo carboidrato esterase, possui função de catalisar des-O ou des-N-acilação dos sacárideos substituídos. Como um éster = ácido + álcool, consideramos duas classes de substratos para as esterases de carboidratos: aquelas nas quais o açúcar desempenha o papel de "ácido" e aquelas nas quais o açúcar se comporta como o álcool (JENSEN *et al.*, 1948; ALDRIDGE, 1953; BERGMAN *et al.*, 1960; LI *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008). No caso a CE16 atua como acetilesterase (EC 3.1.1.6) ativa em vários ésteres de acetila de carboidratos (LI *et al.*, 2007).

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente na etapa de trabalho, em que o foco foi a produção do melhor coquetel enzimático celulolítico nas melhores condições de cultivo e reação, além de analisar suas proteínas secretadas a partir da perspectiva ômica, sugerem que:

- A metodologia proposta por Kasana *et al.* (2008) demonstra que o microrganismo *Aureobasidium pullulans* é um potencial produtor de enzimas celulasas e hemicelulasas, podendo ser usado para estudos de atividade enzimática.
- A fermentação submersa usando meios sintéticos de fonte de carbono (carboximetilcelulase) e fonte de nitrogênio (uréia, peptona e sulfato de amônia) pode ser empregada para avaliar a atividade CMCase e FPase usando o protocolo de Ghose (1987).
- A fermentação submersa usando meios sintéticos de fontes de nitrogênio (uréia, peptona e sulfato de amônia) pode ser empregada para avaliar a atividade CMCase e FPase usando o protocolo de Ghose (1987), entretanto seu uso separadamente não demonstra resultados em relação a tais fontes associadas.
- A fermentação submersa usando meios contendo fonte de carbono (bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana-de-açúcar e sabugo de milho) e fontes de nitrogênio (farelo de soja, farelo de milho e farelo de arroz) a partir de

subprodutos agrícolas pode ser empregada para avaliar a atividade CMCase e FPase usando o protocolo de Ghose (1987), contudo os resultados demonstram que o meio proposto por Mandel (1969) com a combinação das fontes de nitrogênio sintéticas ainda demonstram melhores resultados na atividade enzimática e que o bagaço de cana-de-açúcar possui melhor atividade em relação as demais fontes de carbono sintéticas ou não sintéticas.

- Com a fermentação submersa usando as melhores condições de cada item (bagaço de cana-de-açúcar e fontes de nitrogênio combinadas de acordo com o meio Mandel) e concentração de células de $1,6 \times 10^6$ UFC/mL é a melhor condição para produção de enzimas e, conseqüentemente, maior atividade enzimática.
- A partir do uso de bagaço de cana-de-açúcar, fontes de nitrogênio do meio Mandel em conjunto, pré-inóculo de concentração celular a $1,6 \times 10^6$ UFC/mL, pH 5,5 e temperatura de 50 °C pôde-se ser feito a sacarificação nas melhores condições possíveis.
- Os resultados da sacarificação com diferentes coquetéis de enzimas sugerem que o secretoma enzimático bruto de *A. pullulans*, em conjunto com Ctec-2, é a melhor forma de produção de açúcares redutores em relação as demais proporções.
- O teste de enzimas auxiliares demonstra a atividade de acordo com o substrato. Dentre as demais atividades e relacionando com a análise proteômica podemos ver que a pNP-β-D-glucoside (pNP-G) está mais ativa, o que condiz com as análises proteômicas onde a maior parte possui atividade de β-glucosidase.
- Os dados de análise proteômica sugerem que o microrganismo produz muitas proteínas para seu funcionamento, tendo como foco do trabalho as enzimas CAZy. Tais enzimas condizem com as atividades encontradas no método de Ghose (1989).

REFERÊNCIAS

- ABUD, A. K. S. Estudo do controle de qualidade do processo de produção de L-asparaginase por *Zymomonas mobilis*. (Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) COPPE - Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2005.
- ABYZOV, S.S. Microorganisms in the Antarctic ice. In: Friedmann EI (ed.): **Antarctic Microbiology**, Wiley-Liss, New York: p.265–297, 1993.
- ACHARYA S; CHAUDHARY A. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, p.844–56, 2012.
- ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus* sp. MVS3 isolated from Indian hot spring. **Brazilian Archives of Biology and Technology** v.55, n.4, p.497–503, 2012.
- ADAV, S. S.; CHAO, L. T.; SZE, S. K. Protein abundance in multiplexed samples (PAMUS) for quantitation of *Trichoderma reesei* secretome. **Journal of Proteomics**, v.83, p.180-196, 2013.
- AHAMED A; VERMETTE P. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. **Journal of Biochemical Engineering**. v.42, p.41-46, 2008.
- AKIBA; SHUNICHI; KIMURA; YOSHIHARU; YAMAMOTO, KENJI; KUMAGAI; HIDEHIKO. Purification and characterization of a protease-resistant cellulase from *Aspergillus niger*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v.79, 1995. doi:125-130. 10.1016/0922-338(95)94078-6.
- ALDRIDGE, W.N. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing *p*-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate and a method for their determination. **Biochemical Journal**. V.53, p. 110–117, 1953. [PMID: 13032041]
- ALMEIDA, M.N. Complexo celulolítico e hemicelulolítico do fungo endofítico *Fusarium verticillioides* e sua aplicação para sacarificação do bagaço de cana. (Tese de doutorado.) Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil, 2013.
- ANDREWS J.H. HARRIS R.F.; SPEAER R.N.; LAU G.W.; NORDHEIM E.V. Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. **Canadian Journal of Microbiology** v.40, p.6–17, 1994.
- ANTUNES, F. A.F.; CHANDEL; A.K., BRUMANO, L.P.P; TERÁN-HILARES R.; PERES, G.F.D.; AYABE, L.E.S; SORATO, V.S.; SANTOS, J.C.; DA SILVA, S.S. A novel process intensification strategy for second-generation ethanol production from sugarcane bagasse in fluidized bed reactor. **Renewable Energy** v.124, p.189–96, 2018.
- ARANTES, V; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4, 2010.
- ASPEBORG, H.; COUTINHO, P.M.; WANG, Y; BRUMER, H; HENRISSAT, B. Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). **BMC Evolutional Biology**. V.12, p.186., 2012. DOI:10.1186/1471-2148-12-186
- BABJEVA, I.; RESHETOVA, I; Yeast resources in natural habitats at polar circle latitude. **Food Technology and Biotechnology** v.36, p.1–5, 1998.

- BAILEY, M. J.; TATHTIHARJU, J. Efficient cellulose production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer – controlled feeding strategy. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 62, p.156–162, 2003.
- BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**. v.34, p.551-573, 2008.
- BALLESTEROS, M.; OLIVA, J.M.; NEGRO, M.J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**. v.39, p. 1843–1848, 2004.
- BANERJEE, S; MUDLIAR, S.; SEN, R.; GIRI, B.; SATPUTE, D.; CHAKRABARTI, T.; Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. **Biofuels, bioproducts and Biorefining**. v.4, p.77-93, 2010.
- BARA, M.T.; LIMA, A.L.; ULHOA, C.J. Purification and characterization of an exo-beta-1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. **FEMS Microbiol Letter**. v.219, p.81-85, 2003.
- BARSNES, H.; VAUDEL, M.; COLAERT, N.; HELSENS, K.; SICKMANN, A.; BERVEN, F. S.; MARTENS, L. Compomics-utilities: an open-source Java library for computational proteomics. **BMC Bioinformatics**, 2011.
- BEESON, W.T.; VU, V.V.; SPAN, E.A.; PHILLIPS, C.M.; MARLETTA, M.A. Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases. **Annual Review of Biochemistry**. v.84, p.923–946, 2015.
- BEGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 219-248, 1990.
- BELGHITH, H.; ELLOUZ – CHAABOUNI, S.; GARGOURI, A. Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Po16) cellulases. **Journal Biotechnology**, v. 89, p. 257–262, 2001.
- BENDER, H.; LEHMAN, J; WALLENFELS, K. Biochimistry Biophysics. **Acta**, v.36, p.309-316, 1959.
- BERGMANN, F; RIMON, S. Fractionation of C-esterase from the hog's kidney extract. **Biochemistry Journal**. v.77. p.209-214, 1960.
- BERLIN A.; MAXIMENKO V.; GILKES N.; SADDLER J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**. v.97, p.287-296, 2007.
- BERRIN, J. G.; NAVARRO, D.; COUTURIER, M.; OLIVE, C.; GRISEL, S.; HAON, M.; TAUSSAC, S.; LECHAT, C.; COURTECUISSÉ, R.; FAVEL, A.; COUTINHO, P. M.; LESAGE-MEESSEN, L. Exploring the natural fungal biodiversity of tropical and temperate forests toward improvement of biomass conversion. **Applied Environmental Microbiology**, v.78, p. 6483-6490, 2012.
- BHANU PRAKASH, G.V.S.; PADMAJA. V.; SIVA KIRAN, R. R. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. **Bioresouce Technology**, v. 99, p. 1530-1537, 2008.
- BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology advances**. v.18., 2000. doi.: 355-83. 10.1016/S0734-9750(00)00041-0.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT (Portugal), 2008.

BOUWS, H.; WATTENBERG, A.; ZORN, H. Fungal secretomes-nature's toolbox for white biotechnology. **Applied Microbiology. Biotechnology**, v.80, p.381-388, 2008.

BOZONNET, S.; JENSEN, M.T.; NIELSEN, M.M.; AGHAJARI, N.; JENSEN, M.H.; KRAMHØFT, B.; WILLEMOËS, M.; TRANIER, S.; HASER, R.; SVENSSON, B. The 'pair of sugar tongs' site on the non-catalytic domain C of barley alpha-amylase participates in substrate binding and activity. **FEBS Journal**, v.274. p.5055-5067, 2007.

BURAGOHAIN, P.; SHARMA, N.; E SHRUTI, P. Use of Wheat Straw for Extracellular Cellulase Production from *Aspergillus niger* F8 Isolated from Compost. **Journal of Biofuels**. v.7, p.37, 2016.

BUTINAR, L.; SPENCER-MARTINS, I.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.91, p.277-289, 2007.

BUTINAR, L.; STRMOLE, T.; SPENCER-MARTINS, I.; GUNDE-CIMERMAN, N. Relative incidence of ascomycetous yeasts in Arctic coastal environments. **Microbial Ecology**. 2008.

CANILHA, L.; CHANDEL, A.K.; MILESSI, T. S.S.; ATUNES, F.A.F.; FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A; da SILVA, S.S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, Article ID 989572, 15 pages, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/989572>.

CAO, Y.; TAN, H. Preparation and Properties of Microporous Cellulose Membranes from Novel Cellulose/Aqueous Sodium Hydroxide Solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, n.1, p.920-926, 2006.

CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p.4754-4766, 2010. ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.097>.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, JR. N. Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial residues. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHANDEL, A. K.; DA SILVA, S. S.; CARVALHO, W.; SINGH, O. V. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal Chemical Technology Biotechnology**. v.87, p.11-20, 2012. doi:10.1002/jctb.2742

CHEN, L.; SADEK, M.; STONE, B.A.; BROWNLEE, R.T.; FINCHER, G.B.; HØJ, P.B. Stereochemical course of glucan hydrolysis by barley (1-->3)- and (1-->3, 1-->4)-beta-glucanases. **Biochimical Biophysics Acta**. v.1253, p.112-6, 1995.

CHERRY, J.R.; FIDANTSEF, A.L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p.438-443, 2003.

CHIBA, S.; HIROMI, K.; MINAMIURA, N.; OHNISHI, M.; SHIMOMURA, T.; SUGA, K.; SUGANUMA, T.; TANAKA, A.; TOMIOKA, S.; YAMAMOTO, T. Quantitative study on anomeric forms of glucose produced by alpha-glucosidases. **Journal of Biochemistry**. v.85, p.1135-41, 1979. PUBMED ID:376499 | HUBMED [Chiba1979]

CHONG, S.L.; BATTAGLIA, E.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B.; TENKA, J. The α -glucuronidase Agu1 from *Schizophyllum commune* is a member of a novel glycoside hydrolase

family (GH115). *Applied Microbiol Biotechnology*. v.90, p.1323-32, 2011. DOI:10.1007/s00253-011-3157-y

CLAUSER, N.M.; GUTIERREZ, S.; AREA, M.C.; FELISSIA, F.E.; VALLEJOS, M.E., Small-sized biorefineries as strategy to add value to sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Research and Design**. v.107, p.137-146, 2016.

CONTESINI, F.J.; LOPES, D.B.; MACEDO, G.A.; NASCIMENTO, M.G.; CARVALHO, P.O. *Aspergillus sp.* lipases: potencial biocatalyst for industrial use. *Journal Molecular Catalysis B. Enzymatic*, v. 67, p. 163, 2010.

COOKE. W. B. **Mycopathology Mycology Applied**, v.12, p.1-45, 1959.

COONEY, J. J.; DE ROME, L.; LAURENCE, O; GADD, G. M. J. Effects of organotin and organolead compounds on yeasts. **Industrial Microbiology** v. 4, p. 279-284, 1989.

COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. (Eds). Hemicellulose and hemicellulases. **Portland Press**, London, p.127-143, 1993.

COUTO, L. C.; COUTO, L.; Watzlawick, L. F.; CÂMARA, D. Vias de valorização energética da biomassa. **Biomassa & Energia**. v.1, p.71-92, 2004.

DAMASO, M.C.T.; PASSIONOTO, M.A.; FREITAS, S.C.; FREIRE, D.M.G.; LAGO, R.C.A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 39, p. 676, 2008.

DAVARI; MAHDI; ARZANLOU, MAHDI; AHARI A.; BABAI. Identification of some fungi involved in biodegradation of petroleum Pollutants in Northwest of Iran. **Rostaniha**. v.12, p. 1-12, 2011.

De OLIVEIRA, J.A.R.; DA SILVA MARTINS, L.H.; KOMESU, A; NETO, J.M. Nanotechnology applications on lignocellulosic biomass pretreatment. *Nanotechnology for Bioenergy and Biofuel Production*. **Springer International Publisher**, Cham, Switzerland, p.19-37, 2017.

DEBECHE, T.; BLIARD, C.; DEBEIRE, P.; O'DONOHUE, M.J. Probing the catalytically essential residues of the α -L-arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*. **Protein Engineering**. v.15, p.21-8. 2002. DOI:10.1093/protein/15.1.21 | PUBMED ID:11842234 | HUBMED [Debeche2002]

DEEGENAARS, M.L.; WATSON K., Heat shock response in psychrophilic and psychrotrophic yeast from Antarctica. **Extremophiles**. v.2, p.41-49, 1998.

DESVAUX, M. *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. **FEMS microbiology reviews**, v.29, p.741-764, 2005.

DIORIO, L. A.; MERCURI, A. A.; NAHABEDIAN, D.E.; FORCHIASSIN, F. Development of a bioreactor system for the decolorization of dyes by *Coriolus versicolor f. antarcticus*. **Chemosphere**, v.72, p. 150-156, 2008.

DOMASCH. K. H.; GAINS, W.; ANDERSON, T. H. Compendimn of Soil Fungi. **Academic Press, London**, v.1, p. 130-134, 1980.

DUCATTI, D.R.; CARROLL, M.A.; JAKEMAN. D.L. On the phosphorylase activity of GH3 enzymes: A β -N-acetylglucosaminidase from *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and a glucosidase from *Saccharopolyspora erythraea*. **Carbohydrate Res**. v. 435, p. 106-112, 2016. DOI:10.1016/j.carres.2016.09.015

DUFF, S. J. B., MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**. v.55, p.1-33, 1996.

ECKERT, K.; SCHNEIDER, E. A thermoacidophilic endoglucanase (CelB) from *Alicyclobacillus acidocaldarius* displays high sequence similarity to arabinofuranosidases belonging to family 51 of glycoside hydrolases. **Euro Journal of biotechnology** v. 270, p. 3593-602, 2003. DOI:10.1046/j.1432-1033.2003.03744.x

EMBRAPA. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos, ISSN 1679-6543. Dezembro, 2013.

Eriksson, K; Blanchette, R.A.; Ander, P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. **Berlin: Springer-Verlag**; 1990.

EVELEIGH, D.E. Cellulase: a perspective. **Philosophical Transactions Royal Society of London**. Series A, London, v. 321, p. 435-447, 1987.

FALKOSKI, D.L.; GUIMARÃES, V.M.; ALMEIDA, M.N.; ALFENAS, A.C.; COLODETTE, J.L.; de REZENDE, S.T. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.166, p.1586-1603, 2012.

FASANELLA, C. C. Ação das enzimas ligninolíticas produzidas *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente. 79p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastructure reactions. New York: W. De Gruyter, p.613, 1989.

FENNINGTON, G.; NEUBAUER, D.; STUTZENBERGER, F. Cellulase biosynthesis in a catabolite repression-resistant mutant of *Thermomonospora curvata*. **Applied Environmental Microbiology**. v.47, n.1, p.201-204, 1984.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. (Tese de Doutorado) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, 2006.

FERNANDEZ, ERIC O.; RAYMOND, A. YOUNG. Properties of cellulose pulps from acidic and basic processes. **Cellulose**, v. 3, n.1, p. 21–44, 1996.

FERRAZ, A. Aplicações da biotecnologia na produção de papel e celulose. **Biotecnologia Industrial**. v.3, p.465-484, 2001.

FLORENCIO, C.; CUNHA, F.M.; BADINO, A.C.; FARINAS C.S.; XIMENES, E.; LADISCH, C.R. Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: Enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 90, p. 53-60, 2016, ISSN 0141-0229, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.04.011>.

FORT, J; De La BALLINA, L.R.; BURGHARDT, H.E.; FERRER-COSTA, C; TURNAY, J; FERRER, J.; ORTA, C; USÓN, I.; ZORZANO, A; FERNÁNDEZ-RECIO, J; OROZCO, M; LIZARBE, M.A.; FITA, I; PALACÍN, M. The structure of human 4F2hc ectodomain provides a model for homodimerization and electrostatic interaction with plasma membrane. **Journal of biological chemistry**. v.282, p.31444-52. DOI:10.1074/jbc.M704524200.

FRANÇA, F. P.; RODRIGUES, C. S. Fermentação alcoólica desenvolvida por *Zymomonas Mobilis* CP-3. **Revista latino-americana de microbiologia**, v. 27, p. 27-30, 1985.

FRANDSEN, T.P.; SVENSSON, B. Plant alpha-glucosidases of the glycoside hydrolase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. **Plant Molecular Biology**, v.37, p.1-13, 1998. DOI:10.1023/a:1005925819741

FRIGHETTO, R.T.S; VALARINI, P.J. eds. Embrapa Meio Ambiente, p.89-98, 2000.

FURIGO, J.R.; A.; PEREIRA, E. B. **Enzimas e suas aplicações: Cinética enzimática**. (Apostila) 39f. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

GALANI, I.; DRAINAS, C.; TYPAS, M. A. Growth Requirements and the Establishment of a Chemically Defined Minimal Medium in *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 7, p. 673-678, 1985.

GALDEANO, M. C. **Caracterização e aplicação de casca de aveia modificada por tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino associado à extrusão**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.

GARADIMANI, K.R.; RAJU, G. U.; KODANCH, K. G. Study on Mechanical Properties of Corn Cob Particle and E-Glass Fiber Reinforced Hybrid Polymer Composites. **American Journal of Material Sciences** v.5, p.86–91, 2015.

GAUTAM S. P.; P. S. BUNDELA; A. K. PANDEY; JAMALUDDIN KHAN, M. K; AWASTHI; S. SARSAIYA, Optimization for the Production of Cellulase Enzyme from Municipal Solid Waste Residue by Two Novel Cellulolytic Fungi. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 8, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/810425>.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987. doi10.1351/pac198759020257.

GIESE, E.; DUSSAN, K.; PIEROZZI, M.; CHANDEL, A.; PAGNOCCA, F.; Da SILVA, S. Cellulase Production by *Trichosporon laibachii*. **Orbital-The Electronic Journal of Chemistry**, 2017. DOI: 9. 10.17807/orbital.v9i4.1024.

GILBON, A.; HUITRON, C.; FARIAS, F. G.; ULLOA, M. Scanning Electron Microscopy of a True Cellulolytic Strain of *Aureobasidium* Grown on Crystalline Cellulose. **Mycologia**, v.78, p.804-809, 1986.

GILKES, N.R.; HENRISSAT, B.; KILBURN, D.G.; MILLER, R.C. J.R.; WARREN, R.A. Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. **Microbiol Review**. v.55, p.303-15, 1991.

GOHEL; HARDIK, R.; CHINTAN, N.; CONTRACTOR; SANDIP, K; GHOSH; VINCENT J BRAGANZA. A comparative study of various staining techniques for determination of extra cellular cellulase activity on carboxy methyl cellulose (CMC) agar plates. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.3, n.5, p.261–66, 2014.

GOLDSTEIN, W. Enzymes in Industry (GERHARTZ, W., ed.) **VCH Publishers**, New York, p. 97-100. 1990.

GOTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J. M.; TEROL, J.; WILLIAMS, T. D.; NAGARAJ, S. H.; NUEDA, M. J.; ROBLES, M.; TALON, M.; DOPAZO, J.; CONESA, A. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research**. v. 36, p. 3420-3435. 2008.

GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C.; GUSAKOV, A.V.; SALANOVICH, T.N.; ANTONOV, A.I.; USTINOV, B.B.; OKUNEV, O.N.; BURLINGAME, R.; EMALFARB, M.; BAEZ, M.; SINITSYN, A.P. Morphology and productivity Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology Bioengineering**, v. 97, p.1028–1038, 2007.

GUNDE-CIMERMAN N.; ZALAR P.; HOOG G.S.; De PLEMENITAS, A. Hypersaline water in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts. **FEMS Microbiology Ecology** v.32, p. 235–240, 2000.

GUNDRY, R. L.; WHITE, M. Y.; MURRAY, C. I.; KANE, L. A.; FU, Q.; STANLEY, B. A.; VAN EYK, J. E. Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. **Current Protocols of Molecular Biology** v.10, p.10.25.1-10.25.23, 2009.

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

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDEN, G.; ZACCHI, G. Bioethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends Biotechnology** v.24, p. 549–556. 2006.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. **Amilase Fúngica**. In: Bioquímica das Fermentações, p.56, 1982.

HARTMEIER, W. **Immobilized biocatalysts**. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1988.

HARVEY, A.J.; HRMOVA, M.; DE GORI, R.; VARGHESE, J.N.; FINCHER, G.B. Comparative modeling of the three-dimensional structures of family 3 glycoside hydrolases. **Proteins**. v.41, p.257–69, 2000. DOI:10.1002/1097-0134(20001101)41:2<257::aid-prot100>3.0.co;2-c.

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal Microbiology**. v. 33, p. 213-218, 2002.

HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.M.; DAVIES, G.J. A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**. v.47, p.55-72, 2001.

HENRISSAT, B; CALLEBAUT, I; FABREGA, S; LEHN, P; MORNON, J.P.; DAVIES, G. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. **Proceedings National Academy Science USA**. v.92, p.7090-4, 1995. DOI:10.1073/pnas.92.15.7090.

HERMANIDES-NIJHOF, E.J. *Aureobasidium* and allied genera. **Studies in Mycology** v.15, p.141–222, 1977.

HILL, H. D.; STRAKA, J. G. Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. **Analytical Biochemistry**, v.170, p.203-208, 1988.

HIMI, T.; KUROCHI, Y.; FUKADA, T.; MIZUTANI, Y.; LTO, T.; KURIAKI, M. Nippon Kontakuto Rensu Gakkai Kaishi. **Journal of Japan Contact Lens Society**, v.24, p.266-270, 1981.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 301- 306, 2005.

HOOG, G.S.; YURLOVA, N. A. **Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium and hormonema***. Antonie van Leeuwenhoek, v.65, p.41–54, 1994.

IFTIKHAR, T.; NIAZ, M.; ZIA, M.A.; HAQ, I. Production of extracellular lipases by *Rhizopus oligosporus* in a stirred fermentor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1124, 2010.

ILMÉN, MARJA; SALOHEIMO; ANU, L.; ONNELA, M; PENTTILÄ, MERJA. Regulation of Cellulase Gene Expression in the Filamentous Fungus. **Applied and environmental microbiology**, v.63, p.1298-306, 1997.

ISAAC, A.; ANTUNES, F. A. F.; CONTI, R.; MONTORO, L. A.; MALACHIAS, A.; MASSARA, P.; KITTEN, G.; MARKOETTER, H.; MANKE, I.; DA SILVA, S. S. **Unveiling 3D physicochemical changes of sugarcane bagasse during sequential acid/alkali pretreatments by synchrotron phase-contrast imaging**. Industrial Crops and Products, v.114, p.19–27, 2018.

JANECEK S. Alpha-Amylase family: molecular biology and evolution. **Progresses Biophysics Molecular Biology**. v.67, p.67-97, 1997.

JANEČEK, Š.; MAREČEK, F.; MACGREGOR, E.A.; SVENSSON, B. Starch-binding domains as CBM families-history, occurrence, structure, function and evolution. **Biotechnology Advances**. v.37, p.107451, 2019. DOI:10.1016/j.biotechadv.2019.107451

JANECEK, S.; SVENSSON, B; HENRISSAT, B. Domain evolution in the alpha-amylase family. **Journal of Molecular Evolution**. v.45, p.322-31, 2007.

JANSEN, E.F.; NUTTING, M.D.F.; BALLS, A.K. The reversible inhibition of acetylcholinesterase by diisopropyl fluorophosphate and tetraethyl pyrophosphate. **Journal of Biological Chemistry**. v. 175, p.975–987, 1948.

KACHLISHVILI, E.; PENNINCKX, M.J.; TSIKLAKI, N.; ELISASHVILI, V. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** v.22, p.391-397, 2005.

KALE, R. A.; ZANWAR, P. H. Isolation and Screening of Cellulolytic Fungi IOSR. **Journal of Biotechnology and Biochemistry II** v.2, n.6: p.2455–264, 2016.

KAPICH, A.N.; PRIOR, B.A.; BOTHA, A.; GALKIN, S.; LUNDELL, T.; HATAKKA, A. Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. **Enzyme Microbial Technology** v.34, p.187–195, 2004.

KARIM, A.; NAWAZ, M. A, AMAN, A.; QADER, E. S. A. U. Hyper production of cellulose degrading endo (1,4) β -D-glucanase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB2. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v.8, n. 2, p.160–65, 2015.

KASAHARA, S.; NAKAJIMA, T.; MIYAMOTO, C; WADA, K; FURUICHI, Y; ICHISHIMA, E. Characterization and mode of action of exo-1,3- β -D-glucanase from *Aspergillus saitoi*. **Journal of Ferment Bioengineering**. v.74 n.4, p.238-240, 1992.

KASANA, R. C.; SALWAN, R. R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A. Rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**. v.57, p.503-507, 2008.

- KASHYAP, D. R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001.
- KAWAMORI, M; MORIKAWA, Y.; SHINSHA, Y.; TAKAYAMA, K.; TAKASAWA, S. Preparation of mutants resistant to catabolite repression, **Agriculture Biology Chemistry**, v. 49, p. 2875 – 2879, 1985.
- KAZEEM, M. O.; SHAH, U. K. M.; BAHARUDDIN, A. S.; RAHMAN, N. A. A. Enhanced cellulase production by a novel thermophilic *Bacillus licheniformis* 2D55: Characterization and application in lignocellulosic saccharification. **BioResources**, v.11, n.2, p.5404–23, 2016.
- KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. Enzyme immobilization. **Enzyme Technology eds**, v.7A, p. 347-406, 1987.
- KHANDKE, K.M.; VITHAYATHIL, P.J.; MURTHY, S.K. Purification and characterization of an alpha-D-glucuronidase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. **Archea Biochemichal Biophysics**. v.274, p.511-517, 1989. DOI:10.1016/0003-9861(89)90464-5
- KIELING, D. D. **Enzimas: Aspectos Gerais**, Trabalho (Disciplina de Engenharia Bioquímica), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
- KIM, D. Physico-chemical conversion of lignocellulose: Inhibitor effects and detoxification strategies: A mini review. **Molecules**, v.23, p.309, 2018. doi: 10.3390/molecules23020309.
- KIM, S.; PEVZNER, P. A. MS-GF+ makes progress towards a universal database search tool for proteomics. **Natural Communication**. v.5, p.5277, 2014.
- KIMURA, A.; CHIBA, S. *Quantitative study of anomeric forms of maltose produced by α - and β -amylases*. **Agricultural Biological Chemistry** v.47, n.8, p.1747-53, 1983.
- KOLENOVÁ, K. RYABOVA, O; VRSANSKÁ, M; BIELY, P. Inverting character of family GH115 α -glucuronidases. **FEBS letters**. v.584, p.4063-8, 2010. DOI:10.1016/j.febslet.2010.08.031
- KRAMHØFT, B; BAK-JENSEN, K.S.; MORI, H; JUGE, N; NØHR, J. SVENSSON, B. Involvement of individual subsites and secondary substrate binding sites in multiple attack on amylose by barley alpha-amylase. *Biochemistry*. v. 44, p.1824-32, 2005. DOI:10.1021/bi048100v.
- KÜES, U.; NELSON, D.; LIU, C.; YU, G.; ZHANG, J.; LI, J.; WANG, X. C.; SUN, H. Genome analysis of medicinal *Ganoderma* spp. with plant-pathogenic and saprotrophic life-styles. **Phytochemistry**, v.114, p.18–37, 2015. Doi: 10.1016/j.phytochem.2014.11.019.
- KUMAR, A.K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: A review. **Bioresour and Bioprocess**, v.4, n.1, p.7, 2017. doi: 10.1186/s40643-017-0137-9.
- KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** v.35, p.377-391, 2008.
- KURIKI, T.; IMANAKA, T. The concept of the alpha-amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. **Journal Bioscience Bioengineering**. v.87, p.557-65, 1999. DOI:10.1016/s1389-1723(99)80114-5.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** v.227, p.680-685, 1970.

LARTIGUE, D. J. Immobilized enzymes for industrial reactors. **Basic enzymology**. In: MESSING, R. A. New York: Academic Press Inc, p. 11-38. 1975.

LEE, R.C.; HRMOVA, M.; BURTON, R.A.; LAHNSTEIN, J.; FINCHER, G.B. Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from barley with α -L-arabinofuranosidase and β -D-xylosidase activity. Characterization, primary structures, and COOH-terminal processing. **Journal Biological Chemistry**. v.278, p.5377-87, 2003. DOI:10.1074/jbc.M210627200.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**, 2. ed, São Paulo: Sarvier, 839p, 2000.

LI, H.; PU, Y.; KUMAR, R.; RAGAUSKAS, A. J.; WYMAN C. E. Investigation of lignin deposition on cellulose during hydrothermal pretreatment, its effect on cellulose hydrolysis, and underlying mechanisms. **Biotechnology and Bioengineering**, v.111, p.485–492, 2014. 10.1002/bit.25108.

LI, N.; ZONG, M.H. Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 43, 2010.

LIMA FILHO, R.M.; OLIVEIRA, S.M.A.; MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.6, p.620-625, 2003.

LIMA, A. L. G.; DE OLIVEIRA, M. M. Q.; NASCIMENTO, R.; BON, E. P. S; COELHO, R. Production and Partial Characterization of Cellulases and Xylanases from *Trichoderma atroviride* 676 Using Lignocellulosic Residual Biomass. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.169, n.4, p.1373-85., 2013. doi:10.1007/s12010-012-0053-6.

LINI, F.Z.; WIDJAJA, T.; HENDRIANIE, N.; ALTWAY, A.; NURKHAMIDAH, S.; TANSIL, Y. The effect of organosolv pretreatment on optimization of hydrolysis process to produce the reducing sugar. **MATEC Web of Conferences** v.154, 2018. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201815401022>.

LOMBARD, V.; BERNARD, T.; RANCUREL, C.; BRUMER, H.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B. A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics. **Biochemistry Journal**. v.432, p.437-444, 2010. DOI:10.1042/BJ20101185.

LUIS, A.S; BRIGGS, J.; ZHANG, X.; FARNELL, B.; NDEH, D; LABOUREL, A. Dietary pectic glycans are degraded by coordinated enzyme pathways in human colonic Bacteroides. **Natural Microbiology**. v.3, p.210–219, 2018. doi:10.1038/s41564-017-0079.

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

MA, L.J.; CATRANIS, C.M.; STARMER, W.T.; ROGERS, S.O. Revival and characterization of fungi from ancient polar ice. **Mycologist**, v.13, p.70–73, 1999.

MA, L.J.; CATRANIS, C.M.; STARMER, W.T.; ROGERS, S.O. The significance and implications of the discovery of filamentous fungi in glacial ice. In: **Castello, J.D.; Rogers, S.O. eds: Life in Ancient Ice, Princeton University Press, Princeton and Oxford**, p.159-180, 2005.

MA, L.J.; ROGERS, S.O; CATRANIS, C.M.; STARMER, W.T. Detection and characterization of ancient fungi entrapped in glacial ice. **Mycologist**, v.92, p.286–295, 2000.

MACDONALD, S.S.; BLAUKOPF, M; WITHERS, S.G. N-acetylglucosaminidases from CAZy family GH3 are really glycoside phosphorylases, thereby explaining their use of histidine as an acid/base catalyst in place of glutamic acid. **Journal of Biological Chemistry**. v.290, p.4887-4895, 2015. DOI:10.1074/jbc.M114.621110.

MACGREGOR, E.A.; JANECEK, S; SVENSSON, B. Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. **Biochim Biophys Acta**. v.1546, p.1-20, 2001. DOI:10.1016/s0167-4838(00)00302-2.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10ª ed. São Paulo: Prentice Hall, 608p, 2004.

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

MARGESIN, R.; ZACKE, G.; SCHINNER, F. Characterization of heterotrophic microorganisms in Alpine glacier cryoconite. **Arctic, Antarctic, and Alpine Research**. v.52, p.229–237, 2004.

MARX, I. J.; VAN WYK, N.; SMIT, S.; JACOBSON, D.; VILJOEN-BLOOM, M.; VOLSCHENK, H. Comparative secretome analysis of *Trichoderma asperellum* S4F8 and *Trichoderma reesei* Rut-C30 during solid-state fermentation on sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, v.6, p.172, 2013.

MAZUR, A.K.; NAKATANI, H. Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic alpha-amylase hydrolysis of amylose and amylopectin. **Arch Biochem Biophys**. v. 306, p.29-38, 1993. DOI:10.1006/abbi.1993.1476

MEAGHER, M.M.; REILLY, P.J. Kinetics of the hydrolysis of di- and trisaccharides with *Aspergillus niger* glucoamylases I and II. **Biotechnology Bioengineering**. v.34, p.689-93, 1989. DOI:10.1002/bit.260340513.

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

MITCHEL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, M. Biochemical aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v.68, p. 61-138, 2000.

MITCHELL, A.; CHANG, H. Y.; DAUGHERTY, L.; FRASER, M.; HUNTER, S.; LOPEZ, R.; MCANULLA, C.; MCMENAMIN, C.; NUKA, G.; PESSEAT, S.; SANGRADOR-VEGAS, A.; SCHEREMETJEW, M.; RATO, C.; YONG, S. Y.; BATEMAN, A.; PUNTA, M.; ATTWOOD, T. K.; SIGRIST, C. J.; REDASCHI, N.; RIVOIRE, C.; XENARIOS, I.; KAHN, D.; GUYOT, D.; BORK, P.; LETUNIC, I.; GOUGH, J.; OATES, M.; HAFT, D.; HUANG, H.; NATALE, D. A.; WU, C. H.; ORENGO, C.; SILLITOE, I.; MI, H.; THOMAS, P. D.; FINN, R. D. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. **Nucleic Acids Research**, v.43, p.213-221, 2015.

MITTAL, A.; KATAHIRA, R.; DONOHOE, B.S.; PATTATHIL, S.; KANDEMKAIVIL, S.; REED, M.L.; BIDDY, M.J.; BECKHAM, G.T. Ammonia pretreatment of corn stover enables facile lignin extraction. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v.5, n.3, p.2544-2561, 2017.

MORAIS, M. S.; DE OLIVEIRA, N.T; HERCULANO, P.N; MOREIRA, K. A. Complexo celulolítico produzido por duas espécies de fungos fitopatogênicos isolados de mandioca. **Summa Phytopathologica**, v.42, n.3, p.249–53, 2016.

MOWELL, J. L.; GADD, G. M.; **trans. british mycological society**. v.84, p.685-689, 1985.

MULAT, D.G.; HUERTA, S.G.; KALYANI, D.; HORN, S.J. Enhancing methane production from lignocellulosic biomass by combined steam-explosion pretreatment and bioaugmentation with cellulolytic bacterium *Caldicellulosiruptor bescii*. **Biotechnology for Biofuels**, v.11, p.19,2018.

MUTHUKRISHNAN, S. Optimization and Production of Industrial Important Cellulase Enzyme from *Penicillium citrinum* in Western Ghats of Sathuragiri Hills Soil Sample Isolate. **Universal Journal of Microbiology Research**, v.5, n.1: p.7–16, 2017.

NAGASAKI, N.; SAITO, K.; YARNAMOTO, S. Purification and characterization of an exo- β -1,3-glucanase from a fungi imperfecti. **Agricultura Biology Cbem.** v.41, p.493-502, 1977.JOI:JST.Journalarchive/bbb1961/41.493

NAKABAYASHI, M.; NISHIJIMA, T.; EHARA, G.; NIKAIDOU, N.; NISHIHASHI, H.; WATANABE, T. Structure of the gene encoding laminaripentaose-producing β -1,3-glucanase (LPHase) of *Streptomyces matensis* DIC-108. **Journal of Fermentation. Bioengineer.** v.85, p.459-464, 1998. DOI:10.1016/s0922-338x(98)80062-7.

NARASIMHA, G.; SRIDEVI, A.; *BUDDOLLA*, V.; SUBHOSH, C. M.; RAJASEKHAR, R. B. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **African Journal of Biotechnology** v.5, n.5, p.472–76, 2006.

NDEH, D; ROGOWSKI, A; CARTMELL, A; LUIS, A.S.; BASLÉ, A.; GRAY, J. Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions. **Nature**. v.544, p.,65–70, 2017. doi:10.1038/nature21725

NELSON, TE. The hydrolytic mechanism of an exo-beta-(1--3)-D-glucanase. **Journal Biological Chemistry**. v.245, p.869-72, 1970.

NIELSEN, M.M.; BOZONNET, S.; SEO, E.S.; MÓTYÁN, J.A.; ANDERSEN, J.M.; DILOKPIMOL, A.; ABOU HACHEM, M.; GYÉMÁNT, G.; NÆSTED, H.; KANDRA, L.; SIGURSKJOLD, B.W.; SVENSSON, B. Two secondary carbohydrate binding sites on the surface of barley alpha-amylase 1 have distinct functions and display synergy in hydrolysis of starch granules. **Biochemistry**. v.48, p.7686-97, 2009. DOI:10.1021/bi900795a | PUBMED ID:19606835 | HUBMED [Nielsen2009]

NIELSEN, M.M.; SEO, E.S.; BOZONNET. S.; AGHAJARI, N.; ROBERT, X.; HASER, R.; SVENSSON, B. Multi-site substrate binding and interplay in barley alpha-amylase. **FEBS letters**. v.582, p.2567-71, 2008. DOI:10.1016/j.febslet.2008.06.027.

NISHIMURA, T.; BIGNON, C.; ALLOUCH, J.; CZIZEK, M.; DARBON, H.; WATANABE, T.; HENRISSAT, B. *Streptomyces matensis* laminaripentaose hydrolase is an 'inverting' beta-1,3-glucanase. **FEBS letters**. v.499, p.187-90, 2001.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A.C.; RUBIRA, A.F.; KUNITA, M.H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. Assesment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, v.38, p.373-382, 2006.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels** v.1, p.7, 2008.

OMOJASOLA, P.; JILANI, O. P. Cellulase Production by *Trichoderma longi*, *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* Cultured on Waste Materials from Orange. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**. v.1, p.2382-8, 2008. doi:10.3923/pjbs.2008.2382.2388.

PALMA, M.B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PALUMBO, J.D.; SULLIVAN, R.F.; KOBAYASHI, D.Y. Molecular characterization and expression in *Escherichia coli* of three beta-1,3-glucanase genes from *Lysobacter enzymogenes* strain N4-7. **Journal of Bacteriology**. v.185, p.4362-70, 2003.

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

PARK, J.W.; TAKAHATA, Y.; KAJIUCHI, T.; AKEHATA, T., Effects of nonionic surfactant on enzymatic hydrolysis of used newspaper. **Biotechnology Bioengineering**, New York, v. 39, p. 117–120, 1992.

PAYE, J. M. D.; GUSEVA, A.; HAMMER, S. K.; GJERSING, E.; DAVIS, M. F.; DAVISON, B. H.; OLSTAD, J.; DONOHUE, B. S.; NGUYEN, T. Y.; WYMAN, C.E.; PATTATHIL, S.; HAHN, M.G.; LYND, L.R. Biological lignocellulose solubilization: comparative evaluation of biocatalysts and enhancement via co-treatment. **Biotechnology for Biofuels**, v.9, p.8, 2016. doi: 10.1186/s13068-015-0412-y.

PENA, L.; IKENBERRY, M.; HOHN, K. L.; WANG, D. Acid-functionalized nanoparticles for pretreatment of wheat straw. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v.3, p.342- 352, 2012.

PENA, L.; XU, F.; HOHN, K. L.; LI, J.; WANG, D. Propyl-sulfonic acid functionalized nanoparticles as catalyst for pretreatment of corn stover. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v.5, p.8-16, 2014.

PENNINGA, D.; VAN DER VEEN, B.A.; KNEGTEL, R.M.; VAN HIJUM, S.A.; ROZEBOOM, H.J.; KALK, K.H.; DIJKSTRA, B.W.; DIJKHUIZEN, L. The raw starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251. **Journal Biological Chemistry**. v.271, p.32777-32784, 1996. DOI:10.1074/jbc.271.51.32777

PEREIRA, V. M. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulases por *aspergillus sulphureus* (fresen.) Wehmer.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

PETITDEMANGE, E.; TCHUNDEN, T.; VALLES, S.; PIRSON, H.; RAVAL, G.; GAY, R. Effect of carbon sources on cellulase production by *Clostridium cellulolyticum*. **Biomass and Bioenergy**, v. 3, n.6, p. 393–402, 1992.

PINHEIRO, I. O.; ARAÚJO, J. M.; XIMENES, E. C.; PESSOA, A.; PINTO, J. C.; ALVES, T. L. M. Production of L-Asparaginase by *Zymomonas mobilis* Strain CP4. In: VI PHARMATECH, 2001, Recife. **VI PHARMATECH. III Annual Meeting of the SBTF/ II meeting of Pharmaceutical Quality Control - ENECQ/ APGI Symposium on Membrane Transport**, p. 243-244. 2001.

PINTO, G.A.S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger*.** 2003. 207p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

- PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química, Curitiba–PR, 2007.
- PITSON, S.M.; SEVIOUR, R.J.; MCDUGALL, B.M.; WOODWARD, J.R.; STONE, B.A. Purification and characterization of three extracellular (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan glucohydrolases from the filamentous fungus *Acremonium persicinum*. **Biochemichal Journal**. v.308 (Parte 3), p. 733-741, 1995. DOI:10.1042/bj3080733
- PITSON, S.M.; VORAGEN, A.G.; BELDMAN, G. Stereochemical course of hydrolysis catalyzed by arabinofuranosyl hydrolases. **FEBS lettersers**. v.398, p.7-11, 1996. DOI:10.1016/s0014-5793(96)01153-2
- POINTING, S.; PELLING, A.; SMITH, G.; HYDE, K.; REDDY, C. Screening of basidiomycetes and xylariaceous fungi for lignin peroxidase and laccase gene-specific sequences. **Mycological research**. v.109, 2005. doi:115-24. 10.1017/S0953756204001376.
- PRATTO, B.; SOUZA, R. B. A.; SOUSA, R. DA CRUZ, A, J, G. 2016. Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sugarcane Straw: Kinetic Study and Semi-Mechanistic Modeling. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 178, n.7, p. 1430–44. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-015-1957-8>.
- PRICE, P.B. A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.** n. 97, p. 1247–1251. 2000.
- PULIGUNDLA, P; OH, SE; MOK, C. Microwave-assisted pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic biomass to sugars and ethanol: A review. **Carbon Letters**, v. 17, n.1, p. 1-10. 2016.
- RAGUNATH, C.; MANUEL, S.G.; VENKATARAMAN, V.; SAIT, H.B.; KASINATHAN, C.; RAMASUBBU, N. Probing the role of aromatic residues at the secondary saccharide-binding sites of human salivary alpha-amylase in substrate hydrolysis and bacterial binding. **Journal Molecular Biology**. v.384, p.1232-48, 2008. DOI:10.1016/j.jmb.2008.09.089.
- RAJENDRAN, K.; MURTHY, G.S. How does technology pathway choice influence economic viability and environmental impacts of lignocellulosic biorefineries? **Biotechnology of Biofuels**. v. 10, p. 268. 2017.
- RALE, V. B. Ph.D. **Studies on yeasts of some tropical fruits**. (Tese de doutorado). University of Poona, India. 1979.
- RAMOS, S.; GARCIA ACHA, Cell wall enzymatic lysis of the yeast form of *Pullularia pullulans* and wall regeneration by protoplasts. **Archives of Microbiology**. v. 64, p. 129-135. 1975.
- RASUL, F.; AFROZ, A.; RASHID, U.; MEHMOOD, S.; SUGHRA, K.; ZEESHAN, N. Screening and characterization of cellulase producing bacteria from soil and waste (molasses) of sugar industry. **International Journal of Biosciences**. v. 6, p. 230-238. 2015. doi: 10.12692/ijb/6.3.230-238.
- RECZEY, E.; ZACCHI, G. Cellulase production by *Trichoderma reesei*, **Bioresource Tecnology**, v. 57, p. 25–30, 1996.
- REESE, E. T.; MAGUIRE, A. *Aureobasidium pullulans* as a source of sucrase. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 17, p. 329-332. 1971.
- RIBEIRO, D. A.; COTA, J.; ALVAREZ, T. M.; BRÜCHLI, F.; BRAGATO, J.; PEREIRA, B. M. P.; PAULETTI, B. A.; JACKSON, G.; PIMENTA, M. T. B.; MURAKAMI, M. T.; CAMASSOLA, M.; RULLER, R.; DILLON, A. J. P.; PRADELLA, J. G. C.; PAES LEME, A. F.; SQUINA, F. M.

The *Penicillium echinulatum* Secretome on Sugar Cane Bagasse. **PLoS ONE**, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050571>

ROBYT, J.F.; FRENCH, D. Multiple attach hypothesis of alpha-amylase action: action of porcine pancreatic, human salivary, and *Aspergillus oryzae* alpha-amylases. **Archives on Biochemical Biophysics**. v.122, p. 8-16, 1967. DOI:10.1016/0003-9861(67)90118-x.

RODRIGUEZ SANOJA, R.; MORLON-GUYOT, J.; JORE, J.; PINTADO, J.; JUGE, N; GUYOT, J.P. Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* alpha-amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding. **Applied Environmental Microbiology**. v.66, p.3350-6, 2000. DOI:10.1128/aem.66.8.3350-3356.2000.

ROMERO, M.D.; AGUADO, J.; GONZALEZ, L.; LADERO, M. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 25, p. 244-250, 1999.

ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A. **Práticas de micologia veterinária**. UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. Micologia Veterinária. Prática & Seropédia, 2002.

RUBIN, E.M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, p.841–845. 2008.

RUIRUI, X; XUELI, C; FUCHEN, W; GUANGSUO, Y. Pyrolysis pretreatment of biomass for entrained-flow gasification. **Applied Energy**, v. 87, p.149-155. 2010.

RYABOVA, O.; VRSANSKÁ, M.; KANEKO, S.; VAN ZYL, W.H.; BIELY, P. A novel family of hemicellulolytic alpha-glucuronidase. **FEBS letters**. v.583, p.1457-62, 2009. DOI:10.1016/j.febslet.2009.03.057

RYU, D.; ANDEREOTTI, R.; MANDELS, M.; GALLO, M.; REESE E.T. Studies on quantitative physiology of *Trichoderma reesei* with two-stage continuous culture for cellulose production, **Biotechnology Bioengineering**, v. 21, p. 1887–1903, 1979.

SAAD B. W. M.; OLIVEIRA, LUIS; CÂNDIDO, R.; QUINTANA; GERMÁN; ROCHA; GEORGE; GONCALVES; ADILSON ROBERTO. Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping. **Enzyme and Microbial Technology**. v.43, 2008, doi.:220-225. 10.1016/j.enzmictec.2008.03.006.

SADHU, S.; PALLAB, K. G.; GOUTAM, A.; TUSHAR, K. M. Optimization and strain improvement by mutation for enhanced cellulase production by *Bacillus sp.* (MTCC10046) isolated from cow dung. **Journal of King Saud University-Science**. v. 26, n.4, p. 323–32. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2014.06.001>.

SALVACHUA, D.; MARTINEZ, A. T.; TIEN, M.; LOPEZ-LUCENDO, M. F.; GARCIA, F.; DE LOS RIOS, V.; MARTINEZ, M. J.; PRIETO, A. Differential proteomic analysis of the secretome of *Irpex lacteus* and other white-rot fungi during wheat straw pretreatment. **Biotechnology of Biofuels** v. 6, p. 115. 2013.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C. **Introduction to Food- and Airborne Fungi**, 7th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht. 2004.

SANCHEZ, S. & DEMAİN, A. L. Metabolic regulation of fermentation processes Review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 895-906, 2002.

SANTOS, R. P. DE O. **Compósitos baseados em PET reciclado, fibras de sisal e plasticizantes oriundos de fontes renováveis: estudo do processamento e propriedades destes materiais**. 157

f. Dissertação (Mestrado em ciências) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**. v.37, p. 19-27, 2012.

SATO, K.; SUDO, S. Small-Scale Solid-State Fermentations. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p. 60-79. 1999.

SCHAFNER, D.W.; TOLEDO, R.T. Cellulase production in continuous culture by *T. reesei* on xylose-base media, **Biotechnology Bioengineering**, v. 39, p. 865-869, 1992.

SCHIEB, P.A.; LESCIEUX-KATIR, H.; THÉNOT, M.; CLÉMENT-LAROSIÈRE, B. An original business model: the integrated biorefinery. **Clément-Larosière, B., Lescieux-Katir, H., Schieb, P.A. (Eds.), Biorefinery 2030. Springer, USA**, p. 25-66, 2015.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 2, p. 54.

SCHLITTLER, L. A. F. S.; PEREIRA-JUNIOR, N. Produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica: pré-tratamento e estratégias de processamento. **Revista Diálogos & Ciência**, v. 6, p. 15. 2008.

SHAH, K.H.; NOSTRAMO, R.; ZHANG, B.; VARIA, S.N.; KLERR B.M.; HERMN P.K. Protein kinases are associated with multiple, distinct cytoplasmic granules in quiescent yeast cells. **Genetics**, v. 198, n.4, p. 1495-512. 2014,

SHALLOM, D.; BELAKHOV, V.; SOLOMON, D.; GILEAD-GROPPER, S.; BAASOV, T.; SHOHAM, G.; SHOHAM, Y. The identification of the acid-base catalyst of alpha-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase. **FEBS letters**. v. 514, p. 163-7, 2002. DOI:10.1016/s0014-5793(02)02343-8.

SHALLOM, D.; BELAKHOV, V.; SOLOMON, D.; SHOHAM, G.; BAASOV, T.; SHOHAM, Y. Detailed kinetic analysis and identification of the nucleophile in alpha-L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase. **Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 43667-73, 2002. DOI:10.1074/jbc.M208285200

SHARMA, A; GHOSH, A; PANDEY, RA; MUDLIAR, SN. (Wet air oxidation pretreatment of mixed lignocellulosic biomass to enhance enzymatic convertibility. **Korean Chemical Engineering Research**, v. 53, n.2, p. 216-223. 2015.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C, Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627, 2001.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**. v. 1, p. 2856-2860. 2006.

SILLS, D.L.; GOSSETT, J.M. Assessment of commercial hemicellulases for saccharification of alkaline pretreated perennial biomass. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1389-1398. 2011.

SILVA, N.L.C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. Dissertação: Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

- SINGH, A.; HAYASHI, K. Microbial cellulases: protein architecture, molecular properties, and biosynthesis. **Advances on Applied Microbiology**. v. 40, p. 1-44. 1995.
- SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p.541-549, 2010.
- SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**. v. 150, p. 76-85. 1985.
- SMOOT, M. E.; ONO, K.; RUSCHEINSKI, J.; WANG, P. L.; IDEKER, T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. **Bioinformatics**, v. 27, p. 431-432. 2011.
- SOCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.dS.; MEDEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS L.P. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 4820-4825, 2010.
- SONJAK, S.; FRISVAD, J.C.; GUNDE-CIMERMAN, N. *Penicillium mycobiota* in Arctic subglacial ice. **Microbial Ecology**, v. 52, p. 207–216. 2006.
- SOUTHALL, S.M.; SIMPSON, P.J.; GILBERT, H.J.; WILLIAMSON, G.; WILLIAMSON, M.P. The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. **FEBS letters**. v.447,p. 58-60, 1999. DOI:10.1016/s0014-5793(99)00263-x
- ST JOHN, F.J.; GONZÁLEZ, J.M.; POZHARSKI, E. Consolidation of glycosyl hydrolase family 30: a dual domain 4/7 hydrolase family consisting of two structurally distinct groups. **FEBS letters**. v.584, p.4435-41, 2010. DOI:10.1016/j.febslet.2010.09.051
- STAM, M.R.; DANCHIN, E.G.; RANCUREL, C.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of alpha-amylase-related proteins. **Protein Engineering, Design and Selection**. v.19, p.555-62, 2006. DOI:10.1093/protein/gzl044
- SUGIMOTO, K. **Fermentation and Industry (Japan)**, v.36, p. 98-108. 1977.
- SUHAS, P.J.M.; CARROTT, M.M.L.; CARROTT, R. Lignin—from natural adsorbent to activated carbon: A review. **Bioresource Technology**. v.98, p. 2301–2312, 2007.
- SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v.34, p. 421–424, 2009.
- SUMITANI, J.; TOTTORI, T.; KAWAGUCHI, T.; ARAI, M. New type of starch-binding domain: the direct repeat motif in the C-terminal region of *Bacillus* sp. no. 195 alpha-amylase contributes to starch binding and raw starch degrading. **Biochemical Journal**. v. 350 Pt 2, p.477-84, 2000.
- SUN, X.; ZHANG, R.; ZHANG, Y. Production of lignocellulolytic enzymes by *Trametes gallica* and detection of polysaccharide hydrolase and laccase activities in polyacrylamide gels. **Journal of basic microbiology**. v. 44, p. 220-31. 2004. doi: 10.1002/jobm.200310376.
- SURESHKUMAR, C.; MUNISAMY, P.; Optimization of Process Parameters for Carboxymethyl Cellulase Production under Submerged Fermentation by *Streptomyces lividians*. **Journal of Academia and Industrial Research**. v. 55. p. 505-512. 2015.

SVENSSON, B. Protein engineering in the alpha-amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Molecular Biology*. v.25, p.141-57, 1994. DOI:10.1007/BF00023233

SZABO I. J.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. Optimized cellulose production by *Phanerochaete chrysosporium*: control of catabolite repression by fed-batch cultivation, *Journal of Biotechnology*, v. 48, p. 221–230, 1996.

TENKANEN, M.; SIIKA-AHO, M. An alpha-glucuronidase of *Schizophyllum commune* acting on polymeric xylan. *Journal of biotechnology*. v.78, p.149-61, 2000. DOI:10.1016/s0168-1656(99)00240-0.

TERAN-HILARES, R; DE ALMEIDA, G.F.; AHMED, M.A.; ANTUNES, F.A.F.; DA SILVA, S.S.; H.A.N., J.I.; SANTOS, J.C.D. Hydrodynamic cavitation as an efficient pretreatment method for lignocellulosic biomass: A parametric study. *Bioresource Technology*, v. 235, p. 301-308. 2017. TIBBOT, B.K.; WONG, D.W.; ROBERTSON, G.H. A functional raw starch-binding domain of barley alpha-amylase expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Protein Chemistry*. v.19, p.663-9, 2000. DOI:10.1023/a:1007148202270

TOKUDA, G.; WATANABE, Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis. *Biology letters* v. 3, p. 336-339. 2007. doi:3.336-9.10.1098/rsbl.2007.0073.

TRIOLA, M. F. **Introdução à estatística**. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVARRA, M.; Biodegradation of lignin in compost environment: a review. *Bioresource Technology*, Essex, v. 72, p. 169-183, 2000.

TURK V.; STOKA V.; VASILJEVA O.; RENKO M.; SUN T.; TURK B.; TURK D. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, v.1824, p.68-88, 2012. ISSN 1570-9639, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.002>.

URZÌ, C.; DE LEO, F.; Lo PASSO, C.; CRISEO, G. Intra-specific diversity of *Aureobasidium pullulans* strains isolated from rocks and other habitats assessed by physiological methods and by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Microbiological Methods*, v. 36, p. 95–105. 1999.

VAN DER MAAREL, M.J.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J.C.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *Journal of biotechnology*. v.94, p.137-55, 2002. DOI:10.1016/s0168-1656(01)00407-2.

VAN DYK, J.S.; PLETSCHKE, B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*. v.30, p. 1458-1480, 2012.

VAN TILBEURGH, H.; TOMME, P.; CLAEYSSSENS, M.; BHIKHABHAI, R.L.; PETTERSSON, G. Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *FEBS letters*. v. 204, p. 223–227, 1986.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*. v. 153, p. 895–905. 2010. doi: 10.1104/pp.110. 155119

VÁSQUEZ, M.P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA JR., M.B.; PEREIRA Jr., N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 12, p. 137-140. 2007.

VAUDEL, M.; BARSNES, H.; BERVEN, F. S.; SICKMANN, A.; MARTENS, L. SearchGUI: An open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X!Tandem searches. **Proteomics**, v. 11, p. 996-999. 2011.

VAUDEL, M.; BURKHART, J. M.; ZAHEDI, R. P.; OVELAND, E.; BERVEN, F. S.; SICKMANN, A.; MARTENS, L.; BARSNES, H. PeptideShaker enables reanalysis of MS-derived proteomics data sets. **Nature Biotechnology**, v. 33, p. 22-24. 2015.

VIALA, P.; BOYER, G. Sur un Basidiomycète inférieur, parasite des grains de raisins. **Comptes Rendues Hebdomadaires des Séances de l'Académie de Sciences (traduzido)**, v. 112, p. 1148-1150. 1891.

VILLENA, G.K.; GUTIERREZ-CORREA, M. Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p.231-237, 2007.

VISHNIAC H.S., ONOFRI S. *Cryptococcus antarcticus* var. *circumpolaris* var. nov., a basidiomycetous yeast from Antarctica. **Antonie van Leeuwenhoek** n. 83, p. 231-233. 2003.

VISHNIAC, H. S. A multivariate analysis of soil yeasts isolated from a latitudinal gradient. **Microbial Ecology**, v. 52, p.90-103, 2006.

VU, V.V.; HANGASKY, J.A.; DETOMASI, T.C.; HENRY, S.J.W.; NGO, S.T.; SPAN, E.A.; MARLETTA, M.A. Substrate selectivity in starch polysaccharide monooxygenases. **Journal of Biological Chemistry**, v.294, p.12157-12166, 2019. DOI:10.1074/jbc.RA119.009509

WANG, G.S; PAN, X.J.; ZHU, J.Y.; GLEISNER, R.; ROCKWOOD, D. Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose (SPORL) for robust enzymatic saccharification of hardwoods. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 4, p.1086-1093. 2009.

WEIL, C.E.; BURCH, R.J.; VAN DYK, J.W. An α -amylglucosidase that produces β -glucose, **Cereal Chemistry**, v.31, p.150-158, 1954.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase/ β -glucosidase by the mixed fungi culture of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 121-124, p. 93-104, 2005.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2 ed. New York: marcel Dekker Inc. p. 648. 1994.

WILSON, D. B. Cellulases and biofuels. **Current opinion in biotechnology**, v. 20, v. 3, p. 295-299. 2009.

WITTKOP, T.; EMIG, D.; LANGE, S.; RAHMANN, S.; ALBRECHT, M.; MORRIS, J. H.; BOCKER, S.; STOYE, J.; BAUMBACH, J. Partitioning biological data with transitivity clustering. **Nature Methods**, v.7, p.419-420. 2010.

WITTKOP, T.; EMIG, D.; TRUSS, A.; ALBRECHT, M.; BOCKER, S.; BAUMBACH, J. Comprehensive cluster analysis with Transitivity Clustering. **Nature Protocols**, v.6, p.285-295. 2011

WOODWARD, J.R.; FINCHER, G.B. Substrate specificities and kinetic properties of two (1-3),(1-4)- β -D-glucan endo-hydrolases from germinating barley (*Hordeum vulgare*). **Carbohydrates Res.** v.106, p. 111-122, 1982. DOI:10.1016/S0008-6215(00)80737-5.

WU, H.M.; LIU, S.W.; HSU, M.T.; HUNG, C.L.; LAI, C.C.; CHENG, W.C.; WANG, H.J.; LI, Y.K.; WANG W.C. Structure, mechanistic action, and essential residues of a GH-64 enzyme, laminaripentaose-producing beta-1,3-glucanase. *Journal of Biological Chemistry*. v.284, p.26708-15, 2009. DOI:10.1074/jbc.M109.010983

XU, H; LI, B; MU, X. Review of alkali-based pretreatment to enhance enzymatic saccharification for lignocellulosic biomass conversion. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.55, p.8691-8705. 2005.

YIN, L.; JIANG, S.; PON, S.; LIN, H. Hydrolysis of *Chlorella* by *Cellulomonas* sp. YJ5 Cellulases and Its Biofunctional Properties. *Journal of Food Science*. v.75, p.317-323, 2010. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01867x

ZAKARIASHVILI, N.G.; ELISASHVILI, V.I. Regulation of *Cerrena unicolor* lignocellulolytic activity by a nitrogen source in culture-medium. *Microbiology*. v.62, p.525-528, 1993.

ZALAR, P.G.; SYBREN, C.H.; URŠIČ, V.; SUDHADHAM, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Redefinition of *Aurebasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*. v.61, p.21-38, 2008. 10.3114/sim.2008.61.02.

ZANIN, G. M.; MORAES, F.F. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Legis Summa: Ribeirão Preto, cap.4, p.35-85, 2004.

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, v.24, p.452-481, 2006.

ZHANG, Z; HARRISON, M.D.; RACKEMANN, D.W.; DOHERTYA, W.O.S.; O'HARAA, I.M. Organosolv pretreatment of plant biomass for enhanced enzymatic saccharification. *Green Chemistry*, v. 18, p.360-381, 2016.

ZHENG, Q; ZHOU, T; WANG, Y; CAO, X; WU, S; ZHAO, M; WANG, H; XU, M; ZHENG, B; ZHENG, J; GUAN, X. Pretreatment of wheat straw leads to structural changes and improved enzymatic hydrolysis. *Scientific Reports*, v.8, p.13-21, 2018; doi: 10.1038/s41598-018-195175.