



Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**CARACTERIZAÇÃO DE XILANASE DE *Aspergillus niger*
QUANDO CULTIVADO EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR
PRÉ-TRATADO**

BÁRBARA CALHEIROS NEUMANN

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho



Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

CARACTERIZAÇÃO DE XILANASE DE *Aspergillus niger*
QUANDO CULTIVADO EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR
PRÉ-TRATADO

BÁRBARA CALHEIROS NEUMANN

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Brasília – DF, março de 2018.

CARACTERIZAÇÃO DE XILANASE DE *Aspergillus niger*
QUANDO CULTIVADO EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR
PRÉ-TRATADO

BÁRBARA CALHEIROS NEUMANN

Banca Examinadora:

- Dra. Dasciana de Sousa Rodrigues Gambetta
- Profa. Dra. Mariana de Souza Castro
- Dr. Helder Andrey Rocha Gomes

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Brasília – DF, março de 2018.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Edivaldo, pela compreensão, confiança e disponibilidade para me receber em sua sala, por ouvir minhas lamentações e problemas nos últimos anos, e por todas as oportunidades que me proporcionou.

Aos meus pais, Andréa e Udo, e à minha vó Marlene, que têm um coração gigante. Fizeram o possível para oferecer a estrutura necessária aos meus estudos, e estimularam minha paixão pela ciência desde as minhas primeiras lembranças.

Aos meus colegas de laboratório, Caio, Antonielle, Helder, Leonora, Guilherme, Raíssa, Andreza, Carol, Fran, Alonso, sempre dispostos a ensinar, ajudar, sanar dúvidas, emprestar material, fazer companhia para lanchar e oferecer um consolo e empatia nas horas difíceis. Sem vocês eu nunca teria chegado tão longe. Em especial à Paula Jaramillo, que me apresentou à maior parte da metodologia aqui abordada, ao Caio pela colaboração no projeto e no desenvolvimento do capítulo de livro junto com a Leonora, à Ton pela parceria fora do lab e por compartilhar comigo casa, família e cotidiano, e ao Guilherme por acreditar em mim e me acompanhar nas incursões de forró.

A todos os servidores técnicos que facilitaram essa jornada: dos laboratórios, da secretaria, do RU e da limpeza. Um agradecimento especial ao seu Antônio, que faz questão de manter nossas bancadas e o corredor limpos com muito capricho.

Aos professores que cederam espaço, material e equipamento para realização das análises, Dra. Sonia Bao, Dr. Carlos André e Dr. Marcelo Vale, obrigada pela colaboração.

Aos doutores que aceitaram participar da minha banca de defesa, Dra. Dasciana Rodrigues, Prof. Dra Mariana Castro e Dr. Helder Andrey, agradeço muito pela disponibilidade e interesse.

Aos professores que me inspiraram dentro e fora de sala de aula desde a graduação, pela sua postura e dedicação ao ensino, como Cynthia, Fernando Fortes, entre tantos outros.

Ao CNPq que financiou minha bolsa de estudos, sem a qual teria sido impossível participar deste programa de pós-graduação.

Aos amigos que estiverem presentes de alguma forma durante esse trajeto e tornaram-no menos solitário, agindo como pontinhos de luz para iluminar meus passos, ajudando a me recompor dos inúmeros tropeços e me lembrando de inspirar e expirar cada vez que eu esquecia como fazer isso: as mais que amadas Isa, Mari, Natashinha, Secs, Samia, minhas destinadas Bárbaras e todas as meninas do Femivinho; minha irmã sem sangue mas com todo o coração, Amanda; meu porto seguro, Lulu; meu atestado de que o mundo não para de girar mas cada novo ciclo é uma oportunidade, querido Zé; Bê, Bela, Paraca, Radan, Vini, Deus, Thiaga, Pagipe, Lessa, Ana C, Laura, Bia Rocha, Lara, Brey, Roberta, Cybelle, Najme, Artur, Kevin, Marcola, Sid,

Trans, Victor e todos que não deixaram de demonstrar carinho mesmo que de longe, mesmo quando não pude dar a devida atenção. Obrigada por todo o apoio moral e por tornarem minha vida social muito mais agradável e divertida. Vocês mantiveram minha motivação viva.

Aos meus irmãos Thiago e Rafael, meus avós Vera e Udo, meus tios Geraldo, Teca, Ciça, os primos Gus, Rico, Bê, Dudu, Bia e toda a família: obrigada pela compreensão e amor.

Ao Universo, sempre misterioso e caótico: o destino não parou de me desafiar nos mais diversos aspectos (minha saúde que o diga), mas proporcionou momentos que permitiram superar os obstáculos e foi um processo de aprendizado sem limites. Enfrentei torpor, euforia, compartilhei de tudo e nada, sorvi os excessos, vazios, tantas certezas e muito mais dúvidas. Isso me incentivou a refletir sobre tudo o que eu ainda tenho vontade de aprender. Não pretendo parar.

APOIO FINANCEIRO

Este projeto foi realizado com auxílio do CNPq, CAPES e FAP-DF.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	xiii
Lista de abreviaturas.....	xiv
Resumo	xvi
Abstract	xvii
1 Introdução	1
1.1 Características dos Fungos	1
1.1.1 <i>Aspergillus niger</i>	3
1.2 Composição da Parede Celular Vegetal	5
1.2.1 Celulose	6
1.2.2 Hemicelulose.....	7
1.2.3 Lignina	9
1.3 A Biomassa no Contexto Industrial	9
1.3.1 Cana-de-Açúcar.....	9
1.3.2 Biorrefinarias.....	10
1.3.3 Enzimas Lignocelulolíticas	11
1.3.4 Pré-tratamentos	12
2 Justificativa	17
3 Objetivos.....	18
4 Materiais e Métodos	19
4.1 Microrganismo.....	20
4.2 Fonte de carbono	20
4.2.1 Pré-tratamento	20
4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	21
4.3 Cultivo.....	21
4.4 Determinação da quantidade de proteínas.....	22
4.5 Determinação da atividade enzimática.....	22
4.6 Caracterização de xilanases.....	23
4.6.1 Efeito do tempo de reação.....	23
4.6.2 Efeito da temperatura	23
4.6.3 Avaliação da termoestabilidade	24
4.6.4 Efeito do pH.....	24

4.6.5	Efeito de íons e EDTA	24
4.6.6	Efeito de compostos fenólicos	24
4.7	Separação de componentes da amostra	25
4.7.1	Ultrafiltração	25
4.7.2	Cromatografia	26
4.7.3	Eletroforese	26
4.7.4	Análise proteômica.....	27
5	Resultados e discussão.....	29
5.1	BNT: Avaliação preliminar e semi-purificação	29
5.2	Pré-tratados.....	36
5.2.1	MEV	36
5.2.2	Holocelulases	38
5.3	Caracterização de xilanases das amostras Tr10 e Tr16.....	41
5.4	Análise Proteômica	47
6	Conclusões	66
7	Perspectivas	67
8	Referências	68
9	Apêndice	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características das hifas dos fungos. (a) Hifa septada com parede cruzada, ou septos, dividindo as hifas em unidades tipo célula. (b) A hifa cenocítica não contém septos. (c) Crescimento das hifas por alongamento das extremidades (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).	1
Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura de <i>Talaromyces</i> , um ascomiceto. O ascósporo (a) ocorre na reprodução sexuada e o conidióforo (b), na assexuada. Adaptado de Tortora (2012).	2
Figura 3: Fungos do gênero <i>Aspergillus</i> . (a): Colônia de <i>Aspergillus niger</i> em meio de cultura sólido BDA. Arquivo pessoal – isolado DCFS11 da coleção micológica do Laboratório de Enzimologia - UnB. (b): e hifas com conidiósporos de <i>Aspergillus niger</i> observados ao microscópio óptico. Adaptado de VARGA et al (2011).	4
Figura 4: Micrografias eletrônicas que permitem visualizar a parede celular vegetal. (a) MET de uma célula de folha de milho. (b) MEV das microfibrilas de celulose na superfície de uma célula de cenoura. (EVERT; EICHHORN, 2014).	5
Figura 5: À esquerda, esquema de componentes da parede celular vegetal em diferentes escalas de resolução. (adaptado de MCCANN; CARPITA, 2015). À direita, ilustração do arranjo de microfibrilas de celulose (em azul), xiloglicanas (em verde) e pectinas (amarelo). Extraído de Cosgrove (2016).	6
Figura 6: Ilustração esquemática da estrutura da celulose (HUANG; FU, 2013).	7
Figura 7: Organização geral da parede celular vegetal (SIQUEIRA; FILHO, 2010).	7
Figura 8: Esquema da estrutura hipotética da xilana e enzimas envolvidas em sua degradação. Substituintes: grupos acetil (Ac), ácido α -4-O-metil-glicurônico (α -4-O-Me-GlcUA), α -arabinose (α -araf), ácido p-cumárico (pcoum) e ácido ferúlico (fer). (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005)	8
Figura 10: Estrutura química da manana linear. Este polissacarídeo também pode ser encontrado nas formas de galactomana, glicomana ou galactoglicomana. Adaptado de Dhawan e Kaur (2007).	8
Figura 9: Estrutura primária de uma molécula de pectina. Não estão incluídos resíduos de ramnose, galactose, arabinose e xilose (UENOJO; PASTORE, 2007).	9
Figura 11: (a): Cana de açúcar em estágio inicial de maturação. Ilustração de Rogério Lupo. Adaptado de (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). (b): Plantação de cana entre Rio de Janeiro e São Paulo no início do século XX (ROLPH, 1917).	10

Figura 12: Distribuição das famílias de CAZymes entre os genes de <i>Trichoderma atroviride</i> que tiveram sua transcrição aumentada quando cultivado em celulose (Ta_Cel) e glicose (Ta_Glu). (CRIVELENTE HORTA et al., 2018).	13
Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de nós e entrenós do caule de cana de açúcar submetidos a diferentes pré-tratamentos químicos: ácido sulfúrico, hidróxido de sódio e água oxigenada, em comparação à cana sem tratamento. (BRIENZO et al., 2016).....	14
Figura 14: SDS-PAGE (esquerda) e zimograma (direita) de proteínas e xilanases secretadas por <i>A. niger</i> quando cultivado em bagaço de cana de açúcar <i>in natura</i> (BNT), pré-tratado (BPT), licor resultante de pré-tratamento hidrotérmico (LIC) e bagaço pré-tratado e licor no mesmo meio de cultura (BPT+LIC). Extraído de SILVA (2018).....	15
Figura 15: Proposta de aplicação de tratamentos hidrotérmicos para produção de coquetéis enzimáticos em biorrefinaria de cana-de-açúcar. (SILVA, 2018).....	16
Figura 16: Esquema simplificado da metodologia utilizada ao longo do projeto de pesquisa.	19
Figura 17: Esquema simplificado da estratégia de purificação.	25
Figura 18: A esquerda , atividades de celulases e hemicelulases do Extrato Bruto (BNT). A direita, quantidade de proteínas totais nas frações obtidas após ultrafiltração em PM 30.	30
Figura 19: Atividades de holocelulases após ultrafiltração do extrato bruto em PM 30. A esquerda, as atividades estão expressas em UI/mL e os desvios-padrão representados por linhas verticais. A direita, as atividades específicas estão expressas em UI/mg de proteínas totais. “C” corresponde à fração concentrada da amostra, e “U”, à ultrafiltrada.	30
Figura 20: Efeito do pH na atividade de xilanase de CPM30 (esquerda) e UPM30 (direita)..	31
Figura 21: Efeito da temperatura na atividade de xilanases de CPM30 (esquerda) e UPM30 (direita).	31
Figura 22: Termoestabilidade de xilanases do concentrado CPM30 a 55 °C (esquerda) e do ultrafiltrado UPM30 a 50°C (direita). A atividade do tempo 0 foi considerada igual a 100%.	32
Figura 23: Termoestabilidade de xilanase de UPM30 a 40 °C. A atividade do tempo 0 foi considerada igual a 100%.	32
Figura 24: Perfil de eluição da solução enzimática em cromatografia por filtração em gel com resina Sephadex G-50 equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0.	33
Figura 25: Perfil de eluição da solução enzimática em cromatografia por troca iônica com resina HiTrap DEAE Fast Flow equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e gradiente de NaCl que atingiu a concentração de 1 M a partir da fração 15, representado pela linha preta.	34

Figura 26: SDS-PAGE e zimogramas de solução enzimática secretada por <i>A. niger</i> após etapas do processo de purificação. M: marcador de peso molecular. CPM10: fração da amostra concentrada por ultrafiltração em PM10. G50: fração da amostra do pico de proteínas após cromatografia por filtração em gel Sephadex G-50. DEAE1: primeiro pico de proteínas após cromatografia em resina aniônica DEAE Sepharose <i>Fast Flow</i> . DEAE2: segundo pico de proteínas após cromatografia em resina aniônica DEAE Sepharose <i>Fast Flow</i>	35
Figura 28: Micrografias eletrônicas da superfície do bagaço de cana <i>in natura</i> e após tratamento hidrotérmico. As imagens à esquerda foram registradas com um aumento de 130x, e à direita, de 2000x. (a) e (b): BNT. (c) e (d): Tr10. (e) e (f): Tr16. Estas imagens foram obtidas em colaboração com Caio de Oliveira Gorgulho Silva, e também foram utilizadas em sua tese de doutorado.	37
Figura 29: Histogramas das atividades de holocelulases expressas em UI/mL de cada um dos tratamentos testados. Os desvios-padrão foram representados por linhas verticais, e os ensaios foram realizados em quintuplicata técnica. Os tratamentos estão detalhados na Tabela 2. São quantificadas atividades das seguintes enzimas: (a): xilanases. (b): pectinases. (c): CMCases. (d): mananases. (e): FPAses. (f): avicelases. Em cima de cada barra dos histogramas foram inseridos, no formato de letras, os resultados do Teste de Tukey como parte da análise estatística aplicada à atividades enzimáticas.	39
Figura 30: Perfil da atividade específica de xilanases produzidas <i>A. niger</i> cultivado em bagaço de cana.	40
Figura 31: Representação da atividade – expressa em UI/mL – de celulasas e hemicelulasas produzidas por <i>A. niger</i> cultivado em bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente sob variados parâmetros (consultar Tabela 2 para mais detalhes). BNT: bagaço não-tratado.	40
Figura 32: Representação da atividade específica – expressa em UI/mg – de celulasas e hemicelulasas produzidas por <i>A. niger</i> cultivado em bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente sob variados parâmetros (consultar Tabela 2 para mais detalhes). BNT: bagaço não-tratado.	40
Figura 33: Perfil de liberação de açúcares redutores ao incubar a solução enzimática Tr10 com xilana <i>oat spelt</i> 1% durante variados intervalos de tempo. A atividade enzimática foi calculada com base no intervalo de tempo utilizado em cada ensaio.	41
Figura 34: Atividade de xilanases incubadas em diferentes temperaturas. (a): Tr10. (b): Tr16.	42
Figura 35: Estabilidade da atividade de xilanases incubadas a 55 (a) e 40 °C (b) ao longo do tempo.	42

Figura 36: Atividades de xilanases tamponadas em diferentes pHs. (a): Tr10. (b): Tr16.....	43
Figura 37: Atividade de xilanases das amostras BNT (a), Tr10 (b) e Tr16 (c) quando incubadas na presença de compostos iônicos a 1 e 10 mM.....	44
Figura 38: Atividade de xilanases em presença de diferentes compostos fenólicos a uma concentração final de 1 mg/mL. (a): BNT. (b): Tr10. (c): Tr16.....	45
Figura 40: Diagrama de interseção das proteínas identificadas em BNT e Tr16.	47
Figura 41: Distribuição das enzimas identificadas em BNT e Tr16 por família e presença de módulo de ligação a carboidrato (CBM).	49
Figura 42: Capítulo de livro publicado durante a participação no Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular: “Microbial biofuel production: An overview on recent developments.” Microbial Applications - Recent Advancements and Future Developments. Editora: Walter de Gruyter GmbH. Editores: Gupta, V. K.; Zeilinger, S.; Ferreira Filho, E. X.; Domínguez-de-Bazúa, M. C. D.; Purchase, D. 2017.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos de cada tipo de pré-tratamento na biomassa. As letras indicam a intensidade do efeito. A = alta. M = média. B = baixa. Traduzido de (SUN et al., 2016).	14
Tabela 2: Variação de parâmetros utilizados no tratamento LHW aplicado ao bagaço de cana-de-açúcar.....	21
Tabela 3: Proteínas identificadas por análise proteômica qualitativa de BNT.....	50
Tabela 4: Proteínas identificadas por análise proteômica qualitativa de Tr16	55

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2G: etanol de segunda geração, também conhecido como etanol celulósico
- AA: família de enzimas de atividades auxiliares
- ACN: acetonitrila
- AF: ácido fórmico
- AFEX: *ammonia fiber explosion* ou explosão da fibra por amônia
- BCA: bagaço de cana de açúcar
- BDA: meio de cultura batata-dextrose-ágar
- BNT: bagaço não-tratado
- BSA: albumina sérica bovina
- BPT: bagaço pré-tratado
- BT: β -tubulina
- C: concentrado
- CBM: *carbohydrate-binding module* ou família de módulos de ligação ao carboidrato
- CE: carboidrato-esterases
- CMD: calmodulina
- CPM10: fração concentrada em membrana de retenção de 10 kDa
- CPM30: fração concentrada em membrana de retenção de 30 kDa
- DCCR: delineamento composto central rotacional
- DEAE1: amostra do primeiro pico de xilanase produzido por cromatografia em Hitrap DEAE Sepharose *Fast Flow* 1 mL
- DEAE2: : amostra do segundo pico de xilanase produzido por cromatografia em Hitrap DEAE Sepharose *Fast Flow* 1 mL
- DNS: ácido 3,5-dinitro-salicílico
- DTT: ditioneitol
- EB: extrato bruto
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
- FDA: *Food and Drug Administration*, agência de supervisão da saúde pública nos Estados Unidos
- G50: amostra do pico de xilanase produzido por cromatografia em Sephadex G-50
- GH: família das glicosil-hidrolases
- GRAS: *generally regarded as safe* ou geralmente considerado seguro
- GT: família das glicosil-transferases

ITS: *internal transcribed spacer* ou espaçador interno transcrito

LHW: *liquid hot water*, método de pré-tratamento hidrotérmico

LMPO: *lytic polysaccharide monoxygenases* ou família das monooxigenases líticas de polissacarídeos

MET: microscopia eletrônica de transmissão

MEV: microscopia eletrônica de varredura

PL: família das polissacarídeo-liases

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* ou eletroforese de gel de poliacrilamida e dodecilsulfato de sódio

SmF: *submerged fermentation* ou fermentação submersa

TCA: ácido tricloroacético

TFA: ácido trifluoroacético

TEAB: bicarbonato de trietilamônio

U: ultrafiltrado

UPM10: fração ultrafiltrada em membrana de retenção de 10 kDa

UPM30: fração ultrafiltrada em membrana de retenção de 30 kDa

RESUMO

A indústria sucroalcooleira do Brasil está desenvolvendo métodos para tornar os custos de produção e comercialização do etanol de segunda geração viáveis. A recalcitrância da fibra celulósica não permite sua conversão em açúcares de forma eficiente sem uma etapa adicional de pré-tratamento da biomassa. Tratamentos hidrotérmicos possibilitam a solubilização da hemicelulose e conseqüente recuperação de açúcares fermentescíveis com baixo impacto ambiental. Neste estudo, foi aplicado o tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de enzimas holocelulolíticas pelo fungo *Aspergillus niger*. O foco do trabalho foi otimizar a atividade de xilanases, analisando os efeitos dos parâmetros de pré-tratamento utilizados e alguns fatores que podem influenciar na eficiência da reação enzimática. Adicionalmente, propõe possíveis metodologias para a purificação das xilanases obtidas e analisa as diferenças encontradas entre as xilanases obtidas utilizando bagaço *in natura* (BNT) ou pré-tratado (Tr10 e Tr16). As atividades de celulase e hemicelulase variaram em função dos parâmetros do pré-tratamento e foi possível obter um aumento de até 470 % na atividade de xilanase quando comparada ao bagaço-não tratado, além de aumentos nas atividades de pectinase, mananase, CMCase, FPAse e avicelase. As xilanases obtidas apresentaram atividade num amplo gradiente de temperatura (35-70 °C) e pH (3 – 9,0), termoestabilidade a 40 °C, e estabilidade na presença de diversos íons e fenóis durante a reação enzimática. Após 4 etapas de separação de moléculas foi possível obter duas amostras semi-puras de xilanases, cada uma com 2 isoformas da enzima. Foram identificadas 42 proteínas no extrato bruto de BNT e 99 em Tr16; apenas 23 das proteínas identificadas estavam presentes em ambas as amostras. Em Tr16 foi obtida uma variedade de celulases 2,3 vezes maior do que em BNT, ressaltando o potencial do tratamento hidrotérmico como ferramenta para modular a produção de enzimas holocelulolíticas pelo fungo.

ABSTRACT

The sugar and alcohol industry of Brazil is developing methods to make viable costs for producing and commercializing second generation ethanol. The cellulosic fiber recalcitrance does not allow for an efficient conversion of sugars without adding a step for pretreatment of the biomass. Hydrothermal pretreatment can solubilize hemicellulose and recover fermentable sugars with low environmental impact. In this study, hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse was used for the production of holocellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. The focus of this work was optimizing the activity of xylanases, analyzing the effects of pretreatment parameters and other factors that could influence the efficiency of enzymatic reaction. Furthermore, it proposes methodologies for purifying the obtained xylanases and analyzes the differences found when using raw (BNT) and pretreated sugarcane bagasse (Tr10 and Tr16). Cellulase and hemicellulase activities were found to vary according to the parameters used for pretreatment and an increase of 470 % on xylanase activity was obtained when compared to raw SCB. Pectinase, mananase, CMCase, FPAse and avicelase activities were also increased. The xylanases presented activities in a wide range of temperature (35-70 °C) and pH (3,0-9,0), thermoestability at 40 °C, and stability in the presence of several ionic and phenolic compounds during enzymatic reactions. It was possible to recover two semi-pure samples of xylanase after 4 steps for the separation of molecules, and there were 2 isoforms of the enzyme in each sample. In BNT crude extract, 42 proteins were identified, while in Tr16 there were 99 proteins; only 23 of the identified proteins were found in both samples. In Tr16 it was obtained a variety of cellulases 2,3 times larger than BNT, thus highlighting the potential of this hydrothermal pretreatment for modulating holocellulolytic enzyme production by fungi.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS DOS FUNGOS

Fungos são organismos eucarióticos, cosmopolitas e heterotróficos que desempenham um papel fundamental na decomposição de matéria orgânica. Podem ser unicelulares ou pluricelulares (com estruturas filamentosas, as hifas, compondo o micélio - Figura 1), contém parede celular composta de quitina, glucanas e, em alguns casos, celulose, além de apresentar um ciclo de vida geralmente complexo e reprodução sexuada, parassexuada ou assexuada (MAIA; CARVALHO JUNIOR, 2010). Os fungos geralmente crescem em ambientes com pH próximo de 5,0 e quase todos são aeróbios, entretanto leveduras normalmente são anaeróbias facultativas. Podem crescer mesmo em concentrações elevadas de sal ou açúcar, por serem resistentes à pressão osmótica, e em baixa umidade ou até pouca disponibilidade de nitrogênio – essas características permitem que prosperem em ambientes geralmente considerados hostis para bactérias. Eles absorvem os nutrientes ao invés de digerí-los internamente, por isso secretam enzimas para hidrolisar polissacarídeos, lipídeos e proteínas, quebrando-os em compostos menores e permitindo a passagem dos nutrientes para o interior da célula; devido à sua maquinaria hidrolítica, destacam-se por serem capazes de metabolizar carboidratos complexos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). As enzimas necessárias para permitir o crescimento de um fungo são, muitas vezes, constitutivas; em alguns casos a síntese ou a ativação enzimática precisam ser induzidas pela presença do substrato. Seu crescimento filamentoso auxilia também na penetração ao substrato, tornando-os adaptados ao aproveitamento de uma ampla variedade de substratos e contribuindo para a ubiquidade deste grupo (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

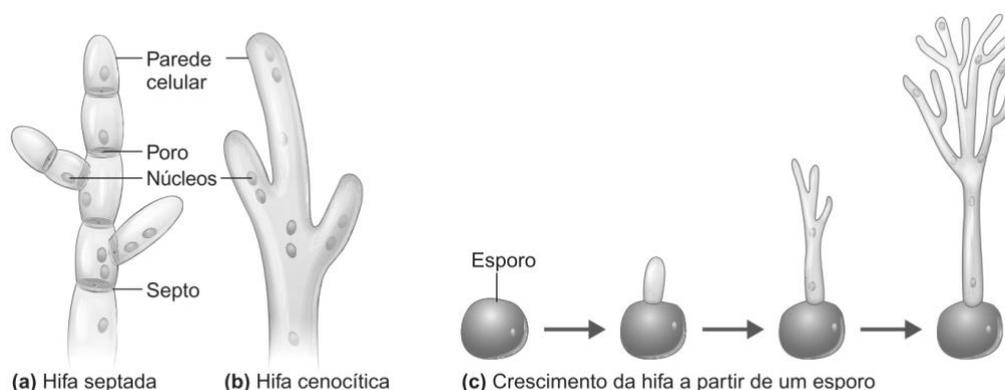


Figura 1: Características das hifas dos fungos. (a) Hifa septada com parede cruzada, ou septos, dividindo as hifas em unidades tipo célula. (b) A hifa cenocítica não contém septos. (c) Crescimento das hifas por alongamento das extremidades (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Apesar de vastas diversidade e distribuição, os fungos ainda são considerados um táxon que carece de estudos, pois estima-se que existam mais de 5 milhões de espécies e menos de 100.000 foram descritas. O conhecimento obtido equivale a 2 % da diversidade estimada do grupo. No Brasil, este percentual é ainda menor e em alguns estados, como o Tocantins, os dados são praticamente inexistentes; desde 2010, micologistas têm feito um esforço coletivo para agregar dados ao Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil, que reúne 5.719 espécies – dessas, apenas 638 foram encontradas no Cerrado (o segundo maior bioma brasileiro) (MAIA et al., 2015).

Os ascomicetos, pertencentes ao maior filo de fungos da natureza (Ascomycota), se caracterizam por produzirem esporos sexuais do tipo ascósporo na fase teleomórfica / sexuada (Figura 2). Os ascomicetos saprofíticos podem ser encontrados em ambientes como o solo, a casca, lenho ou folhas de árvores, o esterco de herbívoros, o ar, o mar, ou lagos; os parasitas se hospedam em plantas, animais e até outros fungos; os simbiontes formam líquens com

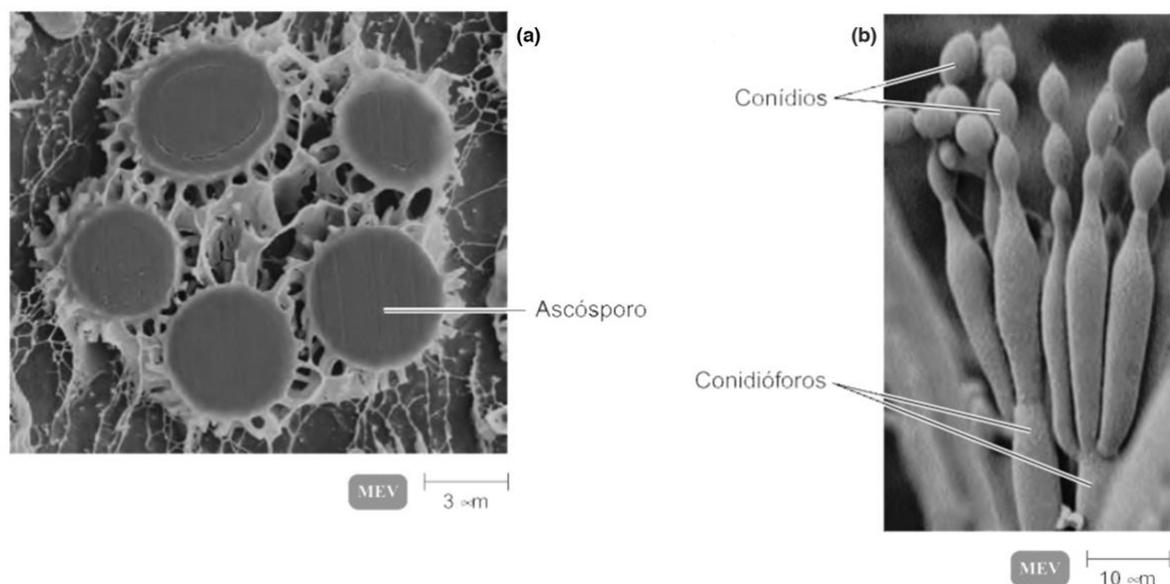


Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura de *Talaromyces*, um ascomiceto. O ascósporo (a) ocorre na reprodução sexuada e o conidióforo (b), na assexuada. Adaptado de Tortora (2012).

clorófitas ou cianobactérias, micorrizas com plantas superiores, os endofíticos vivem dentro de vegetais vasculares, alguns mitospóricos se associam a artrópodes de forma parasitária ou em simbiose. Representantes deste filo tem participação nas atividades humanas: há espécies que formam produtos alimentícios valiosos, como pão, cerveja, vinho, trufas e queijo (*Saccharomyces cerevisiae*); *Chaetomium* e *Trichoderma* podem destruir produtos celulósicos; há patógenos de plantações e alguns são utilizados como biocontrole; quando parasitam animais, podem causar doenças como pé-de-atleta e pneumonia; alguns são organismos-modelo

de estudos celulares e moleculares, ou a origem de antibióticos para a indústria farmacêutica – incluindo a penicilina (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Há diversos relatos sobre a relação simbiótica de fungos com outros organismos sem a qual algumas espécies não sobreviveriam. Em 2015, foi descrita pela primeira vez uma abelha social no Brasil que cultiva um fungo ascomiceto na própria colmeia para a alimentação das suas larvas; as larvas cultivadas *in vitro* sem presença do fungo tiveram uma taxa de sobrevivência de 8 %, enquanto no grupo controle – onde o fungo foi inoculado na sua alimentação – a taxa foi de 76% (MENEZES et al., 2015).

1.1.1 ASPERGILLUS NIGER

Os ascomicetos do gênero *Aspergillus* compõem mais de 350 espécies de fungos filamentosos de ampla distribuição mundial. Pesquisas com *Aspergillus sp.* contribuíram para o nosso entendimento do metabolismo primário e secundário de eucariotos, a regulação gênica por fatores ambientais, o ciclo celular, e o desenvolvimento sexual e assexual dos fungos. Seu uso como organismo-modelo data da década de 1950, quando Guido Pontecorvo, em sua pesquisa genética pioneira, contribuiu para o conceito de gene como uma unidade funcional. Recentemente, a pesquisa com *Aspergillus* auxiliou na identificação do transcrito causador de alcaptonúria em humanos (doença genética que afeta o metabolismo de tirosina). Atualmente existem mais de 50 laboratórios ao redor do globo dedicados ao estudo desse gênero (ROKAS, 2013).

Estudos ‘ômicos’ têm utilizado fungos deste gênero como modelo para a biologia de sistemas; tecnologias de análise de genoma, transcritoma e proteoma permitem a observação de efeitos induzidos por fatores ambientais e mudanças temporais. O sequenciamento de genomas de Aspergilli começou a ser publicado em 2005 e deu início à genômica comparativa entre linhagens com características diferenciais, como produção elevada de ácido cítrico ou de hidrolases. Até o momento, o genoma de 25 espécies do gênero foi sequenciado e há previsão de publicação de mais 150 espécies, fazendo dele o maior foco para estudos genômicos em fungos. A essas publicações, sucedeu-se o estudo do transcritoma, que permitiu a elucidação de vias metabólicas e comparação dos transcritos obtidos em condições de cultivo estressantes como hipóxia, pH ácido, temperatura elevada e fatores de virulência em infecções. Já na proteômica, uma área de especial interesse é o arsenal de enzimas que degradam biomassa secretado em variadas condições de cultivo. A combinação desses dados é uma boa ferramenta para analisar o desenvolvimento e fisiologia dos fungos; alguns modelos para explicar o catabolismo de arabinose, xilose e a produção de ácido cítrico em *A. niger* têm sido elaborados para identificar possíveis alvos de engenharia metabólica; a ferramenta CRISPR/Cas9 para

edição de genes já foi introduzida e impactou na manipulação genética deste gênero (BRANDL; ANDERSEN, 2017).

A. niger (Divisão Ascomycota, Classe Eurotiomycetes, Ordem Eurotiales, Família Trichocomaceae, gênero *Aspergillus*, sessão *Nigri*) é uma espécie comumente encontrada em solos, serapilheiras, vegetais e frutas. É tolerante a temperaturas variadas e considerado estável em relação a mutações espontâneas quando comparado a outras espécies do gênero. Ele produz colônias de hifas com aspecto de feltro amareladas ou brancas, mas se tornam escuras ou pretas com a formação dos conídios (Figura 3). Ao microscópio, observa-se hifas septadas e conidiósporos longos com pontas globosas (FLANNIGAN; SAMSON; MILLER, 2011; GEISER et al., 2007). *A. niger* é considerado um dos mais importantes microrganismos usados

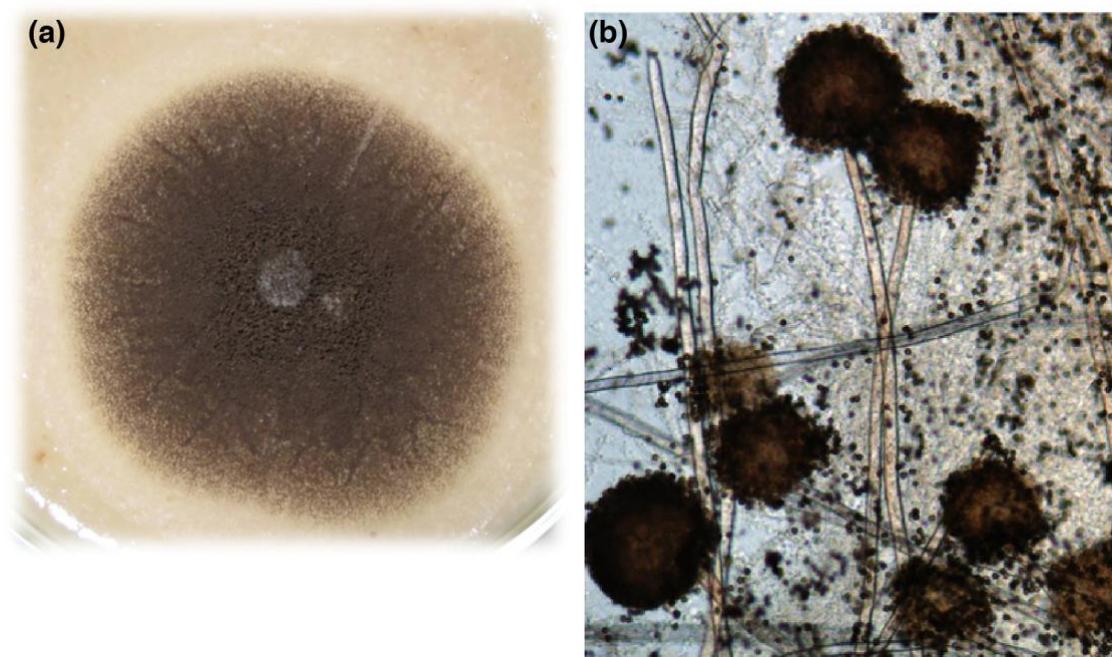


Figura 3: Fungos do gênero *Aspergillus*. (a): Colônia de *Aspergillus niger* em meio de cultura sólido BDA. Arquivo pessoal – isolado DCFS11 da coleção micológica do Laboratório de Enzimologia - UnB. (b): e hifas com conidiósporos de *Aspergillus niger* observados ao microscópio óptico. Adaptado de VARGA et al (2011).

para biotecnologia e recebe destaque na literatura por sua capacidade de produzir enzimas lignocelulolíticas, em especial pectinases e hemicelulases. Também é utilizado para a produção de β -glicosidase, α -amilase, proteases, lipases, ácido cítrico e até aromas de frutas (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). É descrito como seguro para uso comercial e recebeu o status *generally regarded as safe* (GRAS) do órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA); apesar disso, algumas linhagens produzem micotoxinas, desencadeiam respostas alérgicas ou causam infecções oportunistas em pacientes imunossuprimidos (NIELSEN et al., 2009; SCHUSTER et al., 2002). Há interesse no uso da espécie para biorremediação e biolixiviação, por sua

capacidade de absorção de cromo (PRASENJIT; SUMATHI, 2005) e elevada tolerância à exposição a metais (LE et al., 2006).

1.2 COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL

As células vegetais possuem em sua porção mais externa uma estrutura polissacarídica comumente chamada de parede celular (Figura 4). Entre seus componentes está a celulose, uma substância fibrosa e resistente, abundante em regiões como caule, tronco e porções amadeiradas do corpo da planta. A celulose é um polímero que se mantém unido por ligações glicosídicas do tipo β -1,4; alguns organismos, como fungos, bactérias e protozoários, são equipados para quebrar essas ligações, mas animais em geral não conseguem digerir celulose de forma independente, apenas como consequência de associações simbióticas com outros organismos que secretem celulasas (NELSON; COX, 2013).

As paredes celulares evitam a ruptura da membrana plasmática pela entrada de água na célula, além de determinar o tamanho, forma e textura do tecido vegetal. Sua estrutura permite identificar os tipos celulares, o que reflete a importante relação entre a parede e a função da célula; ela também modula o transporte, absorção e secreção de algumas substâncias, a sinalização celular e a proteção contra patógenos (EVERT; EICHHORN, 2014).

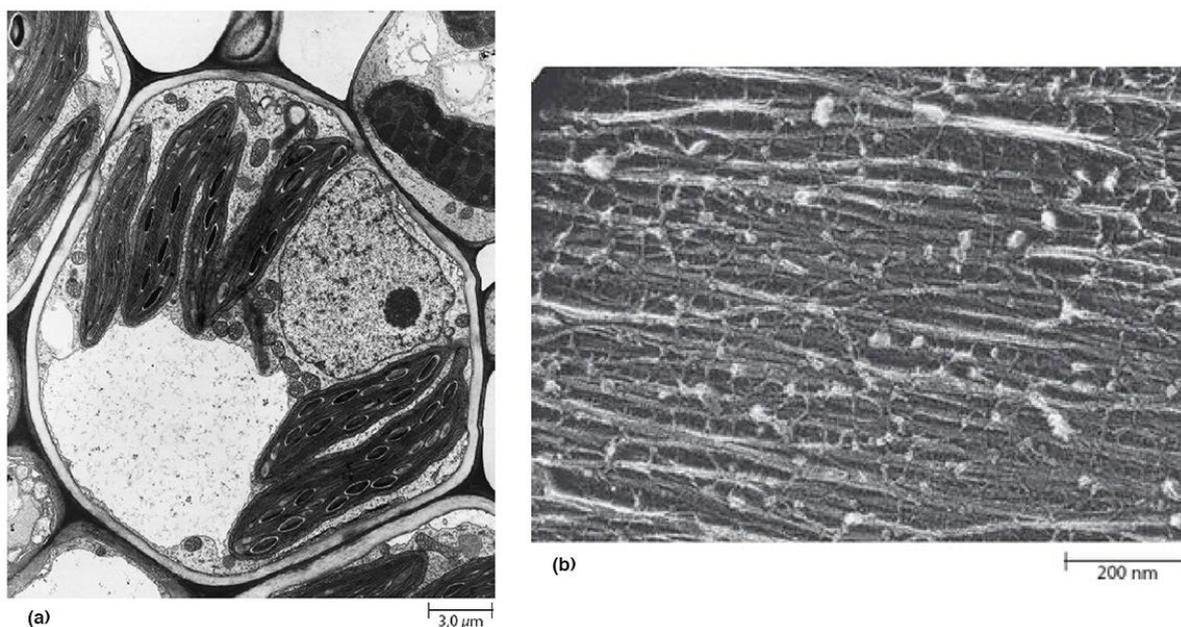


Figura 4: Micrografias eletrônicas que permitem visualizar a parede celular vegetal. (a) MET de uma célula de folha de milho. (b) MEV das microfibrilas de celulose na superfície de uma célula de cenoura. (EVERT; EICHHORN, 2014).

Alguns resíduos agrícolas, ricos em fibras vegetais, são chamados de materiais lignocelulósicos (Figura 5) porque contém quantidades consideráveis de celulose, hemicelulose, lignina, extrativos – fenóis e resinas – e sais minerais. Estes componentes fazem

parte da parede e são intimamente ligados, de forma a conferir estabilidade estrutural aos vegetais (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). A holocelulose se refere ao conteúdo total de carboidratos da estrutura lignocelulósica da parede celular da planta. A disposição de cada um dos componentes é complexa, diversa e sutilmente detalhada; acredita-se que esse arranjo componha um “código glicômico”, armazenando informações em moléculas de carboidratos assim como o código genético está contido nas moléculas de DNA. A proposta de Tavares & Buckeridge (2015) faz alusão aos monossacarídeos atuando como os nucleotídeos e os polissacarídeos – que apresentam propriedades emergentes diferentes dos monossacarídeos isolados – como as moléculas de DNA. As distintas combinações e proporções de composição

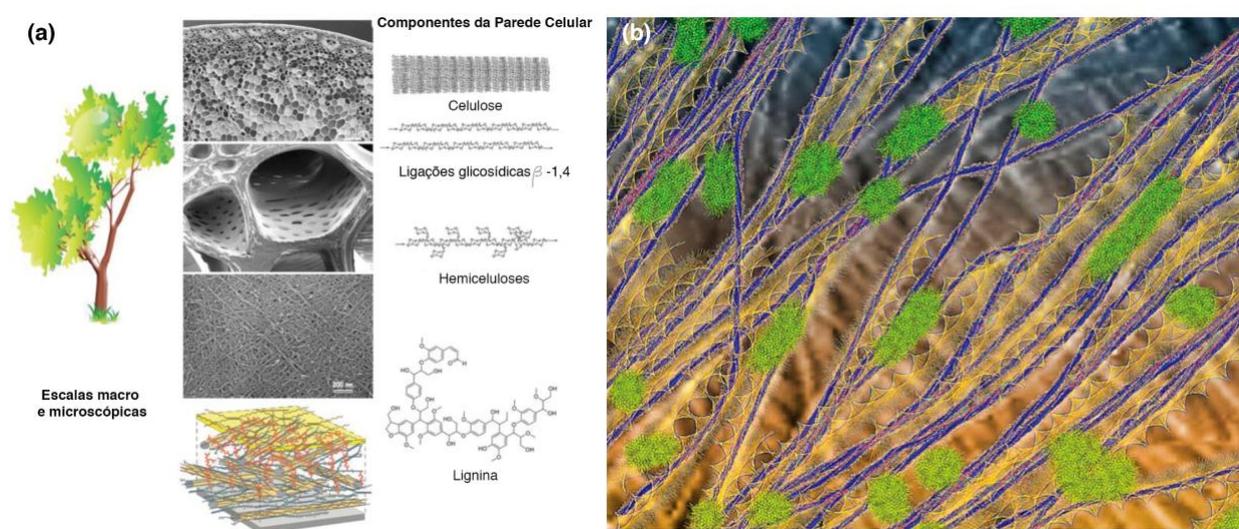


Figura 5: À esquerda, esquema de componentes da parede celular vegetal em diferentes escalas de resolução. (adaptado de MCCANN; CARPITA, 2015). À direita, ilustração do arranjo de microfibrilas de celulose (em azul), xiloglicanas (em verde) e pectinas (amarelo). Extraído de Cosgrove (2016).

dos polissacarídeos encontrados na parede celular resultam em arquiteturas com características químicas e mecânicas particulares. Até o momento, foram isolados 14 monossacarídeos que compõem essa estrutura, e o estoque energético resultante fica praticamente inacessível – dificultando muito a ação de enzimas hidrolíticas; isto oferece uma proteção biológica com papel evolutivo contra a predação, parasitismo e decomposição (TAVARES; BUCKERIDGE, 2015). A participação da parede celular vegetal nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de combustíveis estimulou a realização de diversas pesquisas nos últimos anos para um entendimento mais aprofundado dessa estrutura, incluindo seus mecanismos de síntese e os genes responsáveis por eles.

1.2.1 CELULOSE

A celulose tem valor econômico significativo por dar origem a produtos como papel, tecidos, madeira, polímeros, ração animal e biomassa para geração de energia. Ela é sintetizada

na membrana plasmática formando ligações glicosídicas lineares do tipo β -1,4 entre resíduos de glicose (Figura 6). Evidências indicam que cada microfibrila contém entre 18-24 resíduos de glicose, empacotados ordenadamente num arranjo hexagonal, conferindo propriedades físicas e interativas com a matriz celulósica: as microfibrilas possuem superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas distintas; acredita-se que essas superfícies ofereçam um alvo de ligação com diferentes afinidades à xiloglicanas, xilanas e ligninas, além de serem atingidas diferencialmente por enzimas líticas e tratamentos químicos (COSGROVE, 2014). A celulose em sua forma cristalina é ordenada de forma a impedir a entrada de água ou enzimas. Celulose amorfa é um pouco mais acessível. A amorfogênese é modulada por proteínas não-hidrolíticas, como swoleninas, expansinas, e módulos de ligação ao carboidrato (CBM) - acessórios de enzimas hidrolíticas que causam alterações estruturais na celulose (ARANTES et al., 2010).

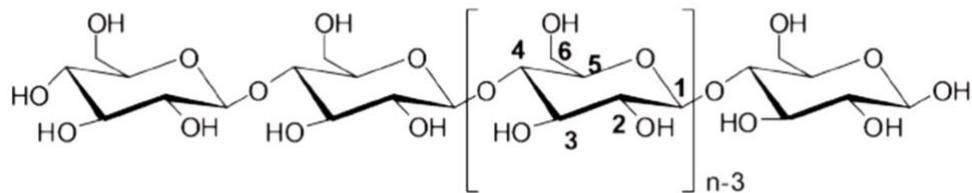


Figura 6: Ilustração esquemática da estrutura da celulose (HUANG; FU, 2013).

1.2.2 HEMICELULOSE

“Hemicelulose” é um termo usado para designar os polissacarídeos não-celulósicos que fazem parte da parede celular, como xiloglicanas, xilanas e galactomananas; podem ser descritas como um heteropolímero (Figura 7) amorfo solúvel em água que forma uma matriz de compostos de baixa massa molecular, apresenta cadeias lineares ou ramificadas e uma mistura de monossacarídeos– entre eles, glicose, xilose, manose e arabinose (SANT’ANNA; SOUZA, 2012).

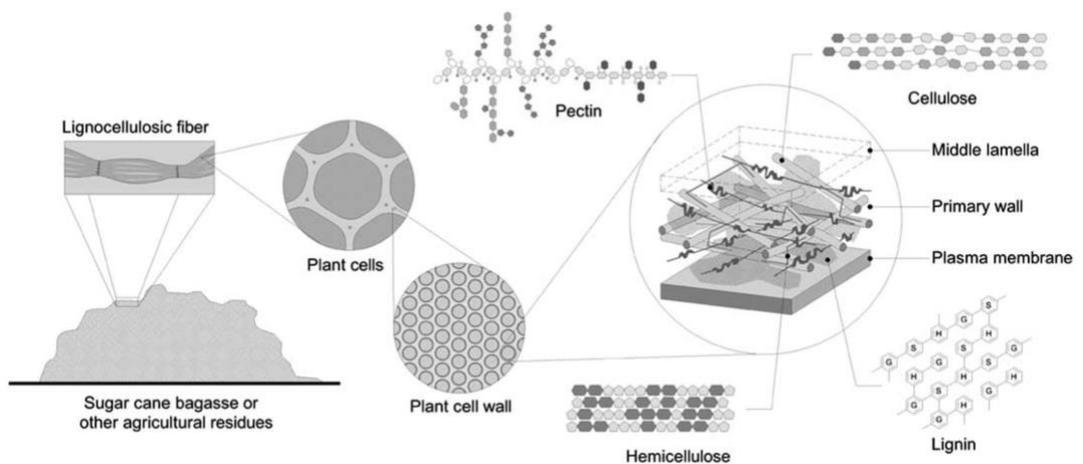


Figura 7: Organização geral da parede celular vegetal (SIQUEIRA; FILHO, 2010).

A xilana é a hemicelulose mais abundante na natureza e consiste de resíduos de β -D-xilopiranosil unidos por ligações glicosídicas β -1,4 (Figura 8); pode ser ramificada com resíduos de ácido D- glicurônico (glicuronoxilana), com resíduos de L-arabinose (arabinoxilana) ou com ambos (formando a glicuronoarabinoxilana) (KUBICEK; STARR; GLASS, 2014; SANT'ANNA; SOUZA, 2012; SUN et al., 2016).

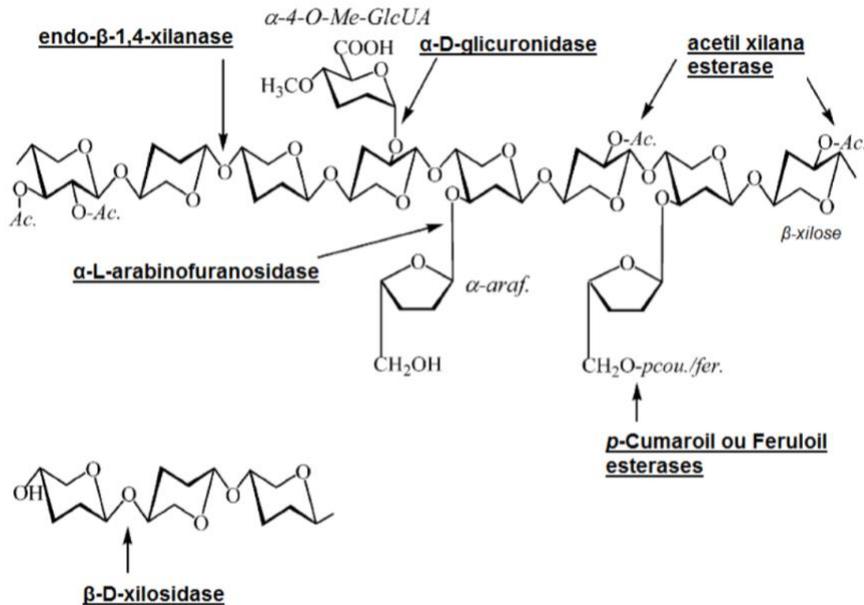


Figura 8: Esquema da estrutura hipotética da xilana e enzimas envolvidas em sua degradação. Substituintes: grupos acetil (Ac), ácido α -4-O-metil-glicurônico (α -4-O-Me-GlcUA), α -arabinose (α -araf.), ácido *p*-cumárico (pcou.) e ácido ferúlico (fer). (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005)

As mananas são hemiceluloses que apresentam funções estruturais, de armazenamento e sinalização nas plantas. São polissacarídeos contendo resíduos de manose unidos por ligações do tipo β -1,4 (Figura 9) e podem apresentar outros polissacarídeos e cadeias laterais de galactose (LIEPMAN et al., 2007; MOREIRA; FILHO, 2008)

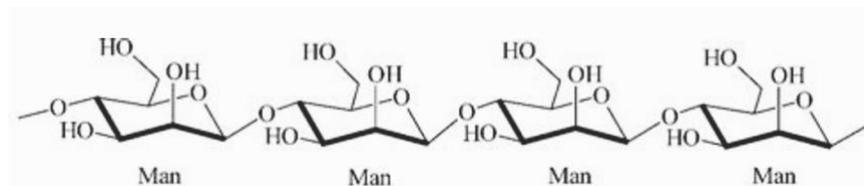


Figura 9: Estrutura química da manana linear. Este polissacarídeo também pode ser encontrado nas formas de galactomana, glicomana ou galactoglicomana. Adaptado de Dhawan e Kaur (2007)

Pectinas englobam uma série de polissacarídeos encontrados principalmente na lamela média dos tecidos vegetais, e são definidas como uma solução coloidal de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações do tipo α -1,4 (Figura 10). O termo é usado para designar ácidos pectíneos solúveis em água, contendo diferentes grupos do tipo metil éster e capazes de formar géis (UENOJO; PASTORE, 2007). Para uso comercial – especialmente por sua capacidade gelificante – são extraídas de frutas cítricas, bagaço de maçã e resíduos da produção

de sucos, mas também podem ser extraídas de resíduos de beterraba, girassóis e manga (SRIAMORNSAK, 2003).

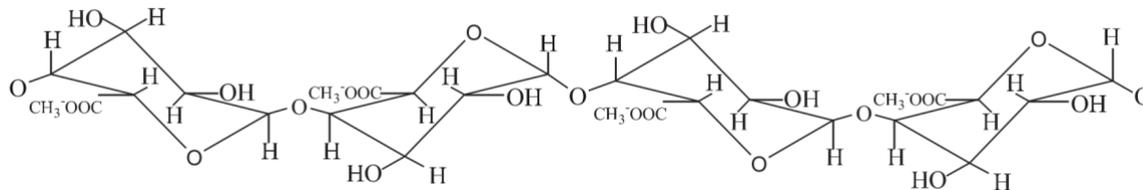


Figura 10: Estrutura primária de uma molécula de pectina. Não estão incluídos resíduos de ramnose, galactose, arabinose e xilose (UENOJO; PASTORE, 2007).

1.2.3 LIGNINA

A cadeia primária das ligninas é composta por unidades de fenilpropano e anéis aromáticos variados que proporcionam força mecânica, rigidez e impermeabilidade às plantas; são o principal obstáculo à conversão de biomassa em açúcares por processos enzimáticos. Ela também oferece uma superfície para adsorção não-produtiva de enzimas, inibindo sua ação sobre outros substratos (SANT'ANNA; SOUZA, 2012).

1.3 A BIOMASSA NO CONTEXTO INDUSTRIAL

1.3.1 CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene tropical cultivada em diversos países na Ásia, África e América, com provável origem na ilha de Nova Guiné. Sua representante mais comum é a espécie *Saccharum officinarum*, da família *Poaceae*. Introduzida pela colonização portuguesa, esta planta exerce papel econômico no Brasil desde o século XVI (Figura 11); na safra de 2015/16, foram produzidas mais de 600 milhões de toneladas e o valor bruto de sua produção em 2016 foi de R\$ 53,4 bilhões (MAPA, 2017). A maior parte da produção se encontra no estado de São Paulo; cerca de 40% da safra costuma ser destinada à produção de açúcar e 55%, à de etanol, segundo dados da CONAB (2017).

A biomassa resultante desta produção consiste majoritariamente de bagaço e palha da cana de açúcar, cuja produção anual chega a 208 milhões de toneladas e compõe o principal resíduo da agroindústria brasileira (NUNES et al., 2013). Silva (2018) analisou a composição de bagaço de cana de açúcar e encontrou 43,4 % de glicanas, 22,4 % de xilanas, 19,8 % de lignina ácido-insolúvel, 5,6 % de lignina ácido-solúvel, 2,5 % de arabinanas e 0,7 % de galactosanas; o elevado teor de arabinoxilanas faz desse resíduo um bom modelo de matéria-prima voltado para valorização de hemiceluloses.

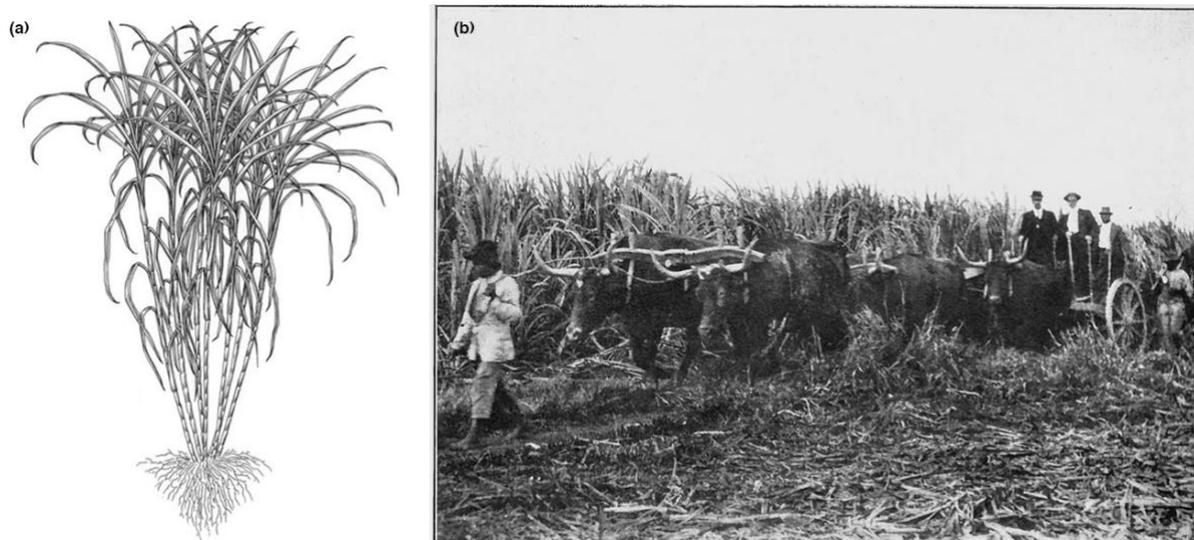


Figura 11: (a): Cana de açúcar em estágio inicial de maturação. Ilustração de Rogério Lupo. Adaptado de (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). (b): Plantação de cana entre Rio de Janeiro e São Paulo no início do século XX (ROLPH, 1917).

1.3.2 BIORREFINARIAS

O conceito de biorrefinaria envolve o processamento de biomassa em produtos comerciáveis e energia, podendo se referir a uma instalação, um processo ou uma planta, desde que tenha abordagem holística visando a sustentabilidade ambiental, econômica e social. O refinamento de biomassa lignocelulósica em intermediários e produtos de valor agregado é incentivado atualmente por fatores como aquecimento global, escassez de recursos fósseis e crise energética. A integração de reciclagem, remediação e bioprocessos já é realidade, mas ainda carrega custos elevados e inibe a competitividade com o mercado tradicional (SILVA; VAZ; FILHO, 2017). A produção de energia a partir de cana de açúcar depende principalmente da produção de etanol de primeira geração. A queima do bagaço produz energia elétrica para as usinas, mas não é suficiente para dar destino à toda a biomassa produzida, que possui muito potencial para aplicações em biorrefinarias – entre elas, fermentação, produção de etanol de segunda geração e de polietileno. No Brasil, onde o uso industrial de cana de açúcar é bem estabelecido, um sistema sustentável é adaptável a maior parte das regiões e há um esforço do setor para construção de usinas produtoras de etanol celulósico ou de segunda geração (abreviadamente, etanol 2G) (DE SOUZA et al., 2014; GUPTA et al., 2017)

Ademais, avanços biotecnológicos levaram a indústria a utilizar enzimas em diversos produtos por razões econômicas ou por sustentabilidade, e hoje elas fazem parte da produção de papel, tecidos, detergentes, alimentos, fármacos e combustíveis. Em 2015, o mercado de

enzimas movimentou cerca de U\$ 8,18 bilhões, sendo 56,9 % no setor de enzimas industriais, e U\$ 1,63 bilhões no setor farmacêutico (GRANDVIEW, 2016). DSM, Novozymes, Danisco, DuPont Genencor, BASF e Advanced Enzymes são algumas das empresas que oferecem produtos e exercem participação neste mercado; as principais enzimas de importância industrial são: amilases, glicose isomerases, proteases, lactases, xilanases, pectinases, lipases, penicilina acilases, catalases, álcool desidrogenases, glicose oxidases, galactose oxidases, hexoquinases, muramidases, colesterol oxidases, asparaginases, estreptoquinases, celulases, lacases, esterases e fitases (GUPTA et al., 2017).

O uso de enzimas fúngicas é muito atrativo por sua alta especificidade, estabilidade, segurança, e ação rápida em condições brandas de temperatura e pressão (quando comparadas a processos industriais não-biológicos) e pode contribuir para geração de produtos de interesse com baixo impacto ambiental, custos reduzidos, alto rendimento e pouca produção de poluentes. A síntese de produtos comerciais por meio de células vivas e enzimas é conhecida como “biotecnologia branca”. Selecionar linhagens eficientes para conversão de biomassa em larga escala e aplicar técnicas de engenharia genética nos microorganismos para aprimorar suas propriedades desejadas possibilitam ampliar a substituição de atuais refinarias não-sustentáveis por biorrefinarias, principalmente quando ligadas à produção de energia (ADRIO; DEMAIN, 2014; CHAMBERGO; VALENCIA, 2016; HASUNUMA et al., 2013).

1.3.3 ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

A digestão de resíduos lignocelulósicos é viável na natureza devido à ação de enzimas digestivas específicas – que podem ser produzidas por fungos, protozoários ou bactérias, como mencionado no item 1.2. As enzimas são proteínas com poder catalítico de alta especificidade, acelerando as reações químicas de sistemas biológicos – sendo assim, elas protagonizam os processos bioquímicos. O sistema de classificação numérico EC (*enzyme commission numbers*) divide as enzimas de acordo com sua atividade: oxirredutases (EC 1.-), transferases (EC 2.-), hidrolases (EC 3.-), liases (EC 4.-), isomerases (EC 5.-) e ligases (EC 6.-). Para especificações mais aprofundadas, o número EC vem acompanhado de mais dígitos; uma endo-1,4- β -xilanase, que hidrolisa ligações do tipo β -1,4 entre resíduos de xilose na porção interna da xilana, possui o número EC 3.2.1.8 (BAIROCH, 2000).

Enzimas de fungos que degradam polissacarídeos geralmente estão sujeitas a mecanismos de regulação da sua síntese. As endoenzimas atuam ao acaso sobre o polímero na porção interior da moléculas, produzindo oligossacarídeos e reduzindo a viscosidade do substrato. Exoenzimas atuam a partir de um extremo não-redutor, liberando mono ou dissacarídeos de modo

sequencial; também podem agir em extremos redutores, liberando oligossacarídeos maiores. Esse sistema enzimático se completa com a atuação de enzimas sobre os oligossacarídeos ou dissacarídeos, causando a degradação completa do polímero de modo sinérgico – a produção de cada uma pode ser induzida pelo substrato adequado ou reprimida por açúcares facilmente utilizáveis, como glicose. O indutor mais eficiente é o próprio substrato a ser digerido (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Segundo Zhao et al. (2009) e Alvira et al. (2010), a eficiência da hidrólise enzimática depende de fatores que circundam as enzimas (atividade, inibição, estabilidade, sinergismo, adsorção) e de fatores que dizem respeito ao substrato (características físicas, químicas e morfológicas). Dentro do contexto acima descrito, as holocelulases são glicosil-hidrolases (GH) responsáveis pela hidrólise de polissacarídeos presentes na parede celular das plantas.

O arsenal de proteínas (proteoma) secretado por uma célula, tecido ou organismo é chamado de secretoma. A composição do secretoma de fungos filamentosos depende da biologia do microorganismo e é variável em resposta à mudanças no ambiente em que o indivíduo se encontra, portanto, a quantidade e variedade de enzimas hidrolíticas presentes no secretoma fúngico é determinada pela fonte de carbono disponível (BROWN; RIES; GOLDMAN, 2014; PAPAGIANNI, 2004). O secretoma de fungos filamentosos cultivados em fonte de carbono lignocelulósica é composto principalmente por enzimas ativas em carboidrato (CAZymes), que degradam, criam ou modificam ligações glicosídicas. Elas são classificadas de acordo com sua atividade: glicosil-hidrolases (GH), glicosil-transferases (GT), polissacarídeo-liases (PL), carboidrato-esterases (CE), módulos de ligação a carboidrato não-catalíticos (CBM). CAZymes podem atuar em conjunto com enzimas da família de atividades auxiliares (AA) ou monooxigenases líticas de polissacarídeos (LMPO) (BORIN et al., 2017; LOMBARD et al., 2014; MONCLARO; FILHO, 2017; OBENG et al., 2017). Alguns estudos analisam a distribuição destas famílias no transcriptoma ou secretoma de fungos quando crescidos em diferentes fontes de carbono (COLOGNA et al., 2018), como demonstra a Figura 12.

1.3.4 PRÉ-TRATAMENTOS

Como abordado no item 1.2, a interação da matriz lignocelulósica confere recalcitrância à biomassa, e isso reduz sua digestibilidade. Na biorrefinaria, é comum recorrer a processos de pré-tratamento para tornar os polissacarídeos mais acessíveis e disponíveis à digestão enzimática. A acessibilidade pode ser influenciada por área de superfície, cristalinidade,

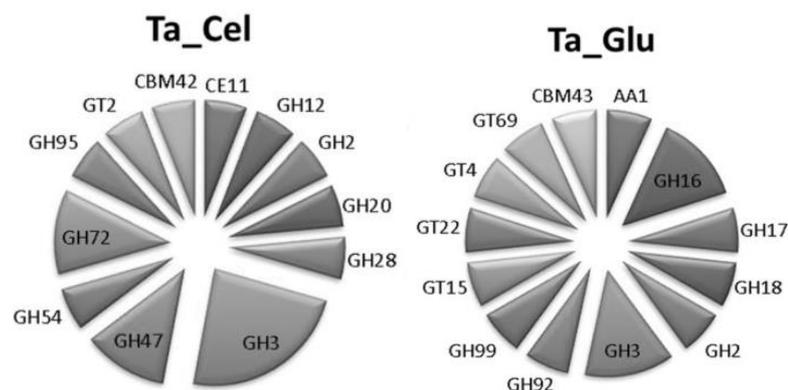


Figura 12: Distribuição das famílias de CAZymes entre os genes de *Trichoderma atroviride* que tiveram sua transcrição aumentada quando cultivado em celulose (Ta_Cel) e glicose (Ta_Glu). (CRIVELENTE HORTA et al., 2018).

porosidade, composição e proporção dos compostos na biomassa (ALVIRA et al., 2010), portanto, estes são os alvos mais comuns de pré-tratamentos.

A remoção da hemicelulose (pode aumentar o contato das enzimas com o substrato), a remoção da lignina (pode diminuir a rigidez do material e a adsorção não-produtiva de enzimas), a remoção simultânea de hemicelulose e lignina (podem aumentar a porosidade e consequente acesso ao substrato), e a diminuição da cristalinidade da celulose são estratégias estudadas para melhorar a digestibilidade do material. Produtos dos pré-tratamentos, como ácidos, furfural e fenóis solúveis, podem atuar como inibidores da reação enzimática. Porém, se usados de forma apropriada, esses processos podem promover economia de custos e de energia para qualquer aplicação que envolva hidrólise enzimática de material lignocelulósico (SUN et al., 2016).

Os tratamentos podem ser de natureza química, física, físico-química ou biológica. Tratamentos físicos, como moagem e irradiação, visam destruir as regularidades estruturais, diminuir o tamanho das partículas de biomassa e aumentar a superfície disponível para ação enzimática. Os químicos (Figura 13) tem uma variedade maior de ações: alcalino, ácido, delignificação oxidativa, organosolv, líquidos iônicos. Entre os físico-químicos, temos explosão a vapor, hidrotérmico, explosão da fibra por amônia (AFEX), CO₂ supercrítico (SC-CO₂). Já os biológicos envolvem a degradação fúngica – os denominados fungos da podridão da madeira e da podridão branca recebem destaque aqui pela degradação da lignina (SUN et al., 2016). Os efeitos de cada um podem ser consultados na Tabela 1.

Além de facilitar a hidrólise enzimática, a aplicação de pré-tratamento pode ser utilizada como uma ferramenta para a produção enzimática. Estudos recentes têm demonstrado a possibilidade de alterar o secretoma de um fungo para obter as enzimas desejadas ao cultivá-lo em biomassa pré-tratada (RIBEIRO et al., 2012). No caso do tratamento hidrotérmico (também

conhecido como *Liquid Hot Water*) obtém-se, adicionalmente à biomassa, uma fração líquida rica em produtos da degradação da hemicelulose solubilizados, como oligossacarídeos, que também pode ser aproveitada para cultivo de microorganismos ou fermentação (SILVA, 2018).

Tabela 1: Efeitos de cada tipo de pré-tratamento na biomassa. As letras indicam a intensidade do efeito. A = alta. M = média. B = baixa. Traduzido de (SUN et al., 2016).

Método de pré-tratamento	Remoção de lignina	Remoção de hemicelulose	Aumento da área de superfície	Diminuição da cristalinidade na celulose	Aumento de porosidade	Produção de inibidores
Moagem	-	-	A	A	-	B
Alcalino	A	A	A	-	A	B
Ácido	M	A	A	-	M	A
Oxidativo	A	-	-	-	A	B
Organosolv	A	B	A	-	M	B
Íons	M	B	A	A	A	B
Explosão a vapor	B	A	A	B	A	A
Hidrotérmico	M	A	M	-	M	A
AFEX	M	B	A	A	A	B
SC-CO ₂	B	B	A	-	A	B
Biológico	A	M	A	-	A	B

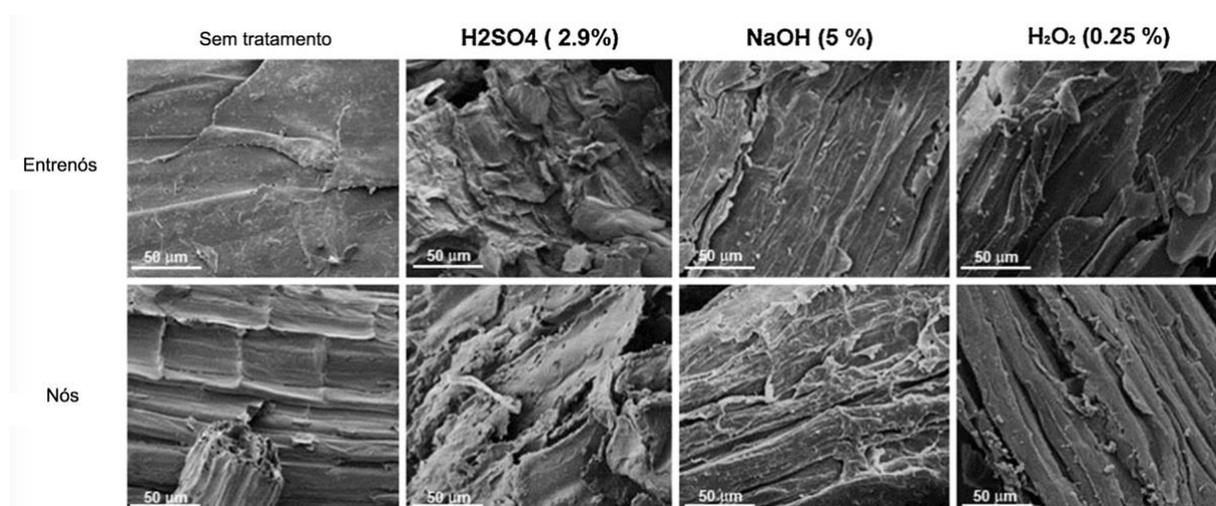


Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de nós e entrenós do caule de cana de açúcar submetidos a diferentes pré-tratamentos químicos: ácido sulfúrico, hidróxido de sódio e água oxigenada, em comparação à cana sem tratamento. (BRIENZO et al., 2016).

O pré-tratamento hidrotérmico submete a biomassa a altas pressão, temperatura e umidade. Promove as remoções de hemicelulose e parcialmente da lignina por reações de hidrólise, aumentando a porosidade do material, não exige catalisador, a estrutura necessária

para realizá-lo tem baixo custo quando comparado a outros tratamentos, a produção de inibidores enzimáticos pode ser branda (de acordo com a severidade dos parâmetros utilizados) e oferece o menor impacto ambiental. Os componentes da biomassa possuem diferentes estabilidades térmicas, fazendo com que decompor hemiceluloses seja mais fácil do que lignina ou celulose por este processo (SUN et al., 2016).

Ao aplicar tratamento hidrotérmico em bagaço de cana de açúcar para cultivo de *A. niger*, Silva (2018) demonstrou a expressão diferencial de enzimas hidrolíticas (Figura 14) com uso de bagaço pré-tratado e licores resultantes do tratamento, oferecendo uma ferramenta para modular a produção enzimática. Quando os parâmetros utilizados supõem um menor fator de severidade, é possível limitar a degradação de hemicelulose e de inibidores enzimáticos de forma a favorecer a produção de xilanases. Silva também propôs, num esquema de produção integrada de enzimas (realizada na mesma instalação que a hidrólise e fermentação da biomassa), a aplicação de pré-tratamentos específicos para cada objetivo, com reaproveitamento do sedimento sólido, que pode ser conferido na Figura 15.

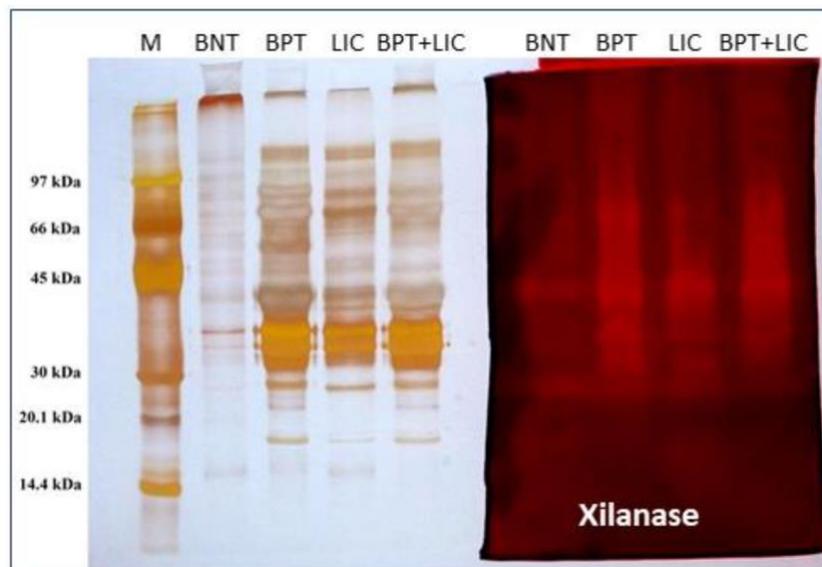


Figura 14: SDS-PAGE (esquerda) e zimograma (direita) de proteínas e xilanases secretadas por *A. niger* quando cultivado em bagaço de cana de açúcar *in natura* (BNT), pré-tratado (BPT), licor resultante de pré-tratamento hidrotérmico (LIC) e bagaço pré-tratado e licor no mesmo meio de cultura (BPT+LIC). Extraído de SILVA (2018).

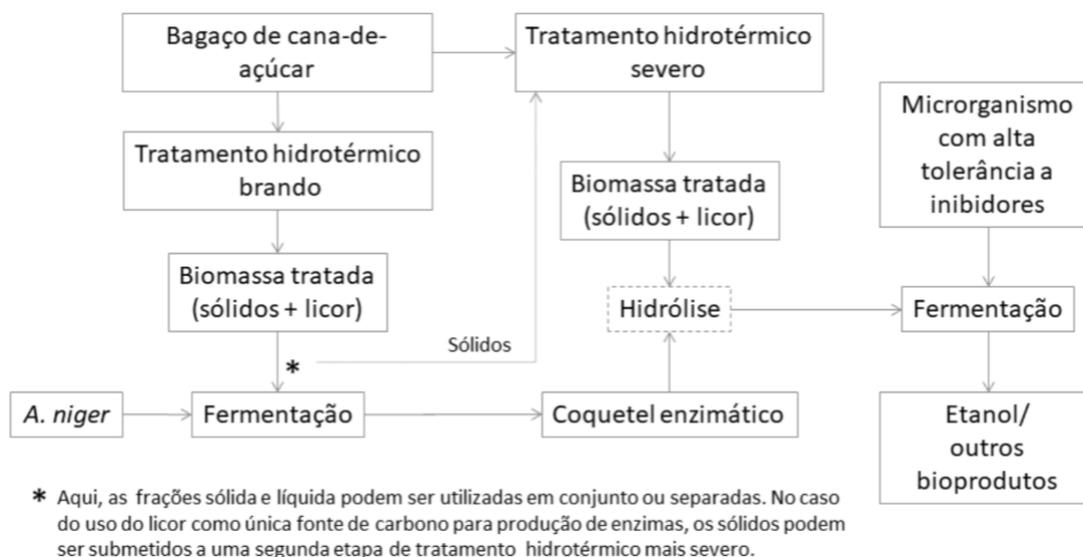


Figura 15: Proposta de aplicação de tratamentos hidrotérmicos para produção de coquetéis enzimáticos em biorrefinaria de cana-de-açúcar. (SILVA, 2018)

2 JUSTIFICATIVA

O presente trabalho é relevante devido a diversos motivos, e a experiência prévia do grupo de pesquisa com pré-tratamentos (elucidada em parte no item 1.3.4 e em detalhes na Tese de Doutorado de Silva, 2018) foi determinante para a elaboração do projeto e adaptação das técnicas utilizadas. O trabalho visa contribuir para o desenvolvimento de métodos mais baratos e eficientes para a realização de hidrólise enzimática no contexto industrial e para a implementação de sistemas de biorrefinarias, cujos custos elevados relacionados à aquisição e manutenção de equipamentos, reagentes químicos e energia são tidos como um obstáculo para atingir a sustentabilidade na indústria. A produção anual de resíduos agroindustriais requer um destino mais vantajoso e ecológico do que o descarte ou produção de energia termoelétrica (cuja demanda é incompatível com a quantidade de biomassa disponível). A produção de enzimas por fungos filamentosos é uma forma de agregar valor a estes materiais. Além disso, as tecnologias de pré-tratamento são atualmente estudadas para aumentar o rendimento da produção de etanol, mas ainda são poucos os que visam otimizar a produção de holocelulases, como foi realizado nesta pesquisa.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi investigar a aplicação de pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar como ferramenta para otimizar a produção de enzimas holocelulolíticas pelo isolado DCFS11 de *Aspergillus niger*, com foco em xilanases. Dessa forma, os objetivos específicos foram:

- Produzir holocelulases a partir do bagaço de cana-de-açúcar;
- Encontrar um pré-tratamento que resulte em maior produção de holocelulases, e mais especificamente de xilanase, devido ao potencial da espécie;
- Caracterizar a atividade das xilanases obtidas pelo cultivo de *A. niger* em bagaço de cana;
- Purificar as xilanases secretadas;
- Avaliar as diferenças entre utilizar biomassa pré-tratada na produção de enzimas em comparação à biomassa *in natura*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

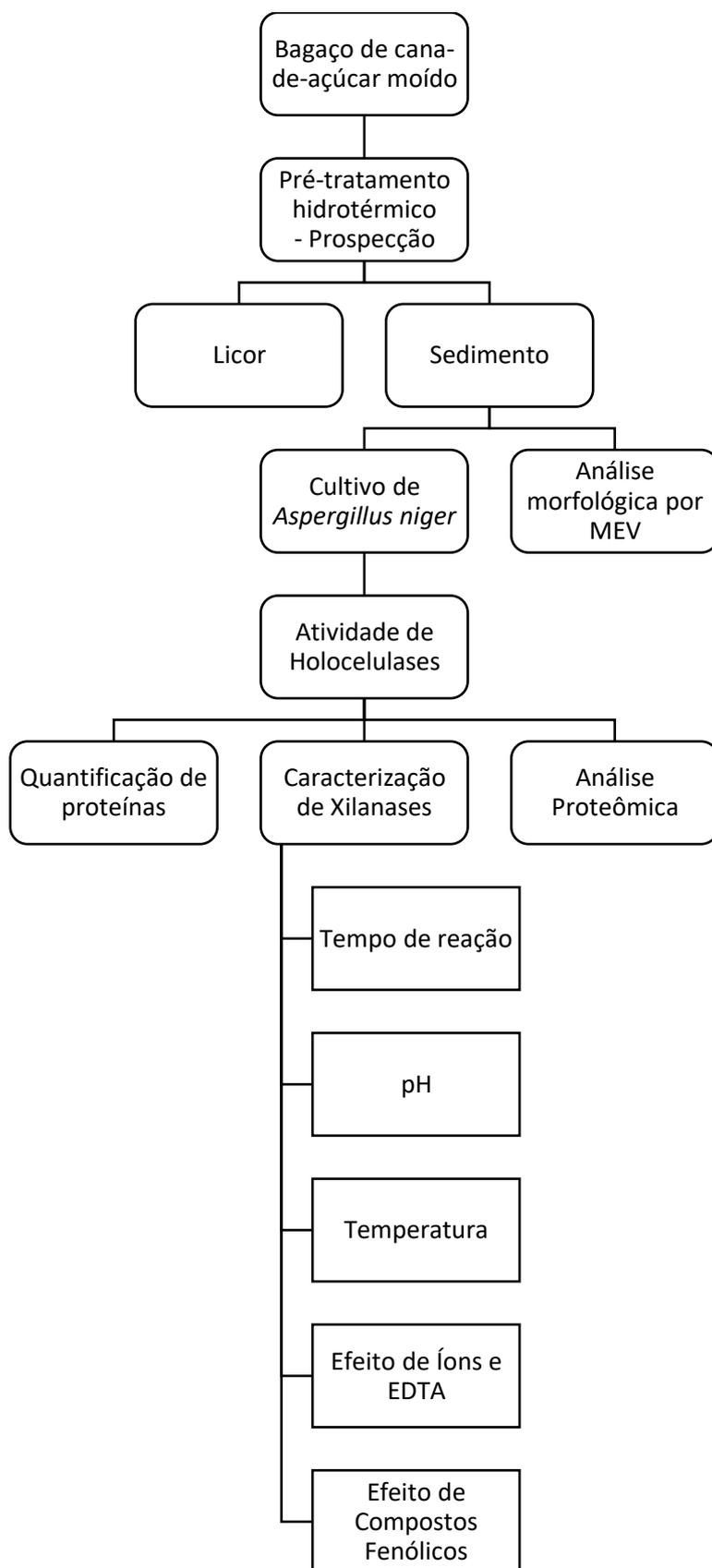


Figura 16: Esquema simplificado da metodologia utilizada ao longo do projeto de pesquisa.

4.1 MICRORGANISMO

O isolado de *A. niger* (DCFS11) utilizado neste trabalho está depositado na micoteca do Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, com subamostra depositada também no Banco de Germoplasma de Microrganismos, Cenargen, Embrapa. A utilização desta linhagem foi autorizada com a concessão de acesso e remessa de amostra de componente do patrimônio genético nº 010237/2015-1/CNPq. Além disso, essa micoteca é registrada (registro 1128) no *World Data Center for Microorganism* (WDCM). Foi coletado em solo de uma área de cerrado-floresta próxima a Brasília-DF e cultivado em meio seletivo DG-18 a 28 °C. Foi preservado em solução NaCl 0,9 % (massa/volume ou m/v), glicerol 50 % (volume/volume ou v/v), e Tween 80 0,01 % (v/v) a -80 °C e repicado em placas de Petri com meio batata 10 %, dextrose 1 % e ágar 2 % (BDA) a 28 °C para sua manutenção. O isolado foi identificado como *Aspergillus niger* após análise das sequências genômicas de *internal transcribed spacer* (ITS), β -tubulina (BT) e calmodulina (CMD), como descrito por SILVA et al. (2018).

4.2 FONTE DE CARBONO

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) foi cedido pela fazenda Monjolo, em Formosa – GO e moído.

4.2.1 PRÉ-TRATAMENTO

O bagaço foi incubado em um cilindro de aço inoxidável vedável adaptado (Swagelok, EUA), com 285 mL de capacidade, em um sistema de banho fluidizado em óxido de alumínio (Fluidized sand bath system, Cole-Parmer, EUA). Ao final do processo, o cilindro foi resfriado em um recipiente com água e gelo durante 10 min, e o bagaço pré-tratado (BPT - fração sólida ou sedimento resultante do pré-tratamento) foi separado do licor (fração líquida) por filtração em coador simples de pano, lavado com água destilada a 5 % (massa/massa ou m/m) durante 15 min sob agitação e armazenado durante cerca de 3 h em estufa para secagem.

O método de pré-tratamento hidrotérmico *Liquid Hot Water* (LHW) foi aplicado variando-se 3 parâmetros que resultam em diferentes níveis de severidade, determinados após testes preliminares para verificar a viabilidade de cultivo do fungo sob estes parâmetros. A temperatura utilizada no tratamento foi de 153 a 180 °C, o tempo de 5 a 55 minutos e a carga de bagaço de 1 a 9 % (m/m), conforme indicado na Tabela 2. Como controle, foi utilizado o bagaço de cana *in natura*, denominado bagaço não-tratado (BNT). Os parâmetros foram escolhidos com base no planejamento fatorial do tipo delineamento composto central rotacional

(DCCR) realizado por Silva (2018), e as denominações referentes aos tratamentos foram mantidas para facilitar a comparação entre os resultados obtidos: em Tr1, lê-se Tratamento 1.

Tabela 2: Variação de parâmetros utilizados no tratamento LHW aplicado ao bagaço de cana-de-açúcar.

Tratamento	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Carga (% m/m)	Fator de Severidade (log Ro)
Tr1	160	15	3	2,94
Tr2	180	15	3	3,53
Tr6	180	15	9	3,53
Tr8	180	45	9	4,01
Tr10	170	30	6	3,54
Tr12	153	30	6	3,04
Tr14	170	5	6	2,76
Tr15	170	55	6	3,80
Tr16	170	30	1	3,54

4.2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para obtenção das imagens de MEV com bagaço não foi necessário submeter a amostra a procedimentos de fixação. A metalização foi realizada fixando a amostra com auxílio de fita dupla face metalizada em uma base metálica, cobrindo-a com uma fina camada de ouro no equipamento Sputter Coater SCD 050 (Balzers, Alemanha). Para visualização e registro das imagens foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura modelo JMS 7001F (JEOL, Japão) com voltagem de 15 kV, de acordo com protocolo adaptado de Li et al. (2014). As micrografias foram obtidas em colaboração com Silva (2018).

4.3 CULTIVO

O fungo foi cultivado sob fermentação submersa (SmF) em erlenmeyers com capacidade de 250 mL contendo 75 mL de meio suplementado (m/v) (KH_2PO_4 0,7 %, K_2HPO_4 0,2 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,05 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 %, extrato de levedura 0,06 %) a pH 7,0 e 1,0 % (m/v) de fonte de carbono; os erlenmeyers com meio foram autoclavados a 120 °C durante 30 min.

As fontes de carbono utilizadas foram BPT nas condições descritas na Tabela 2, ou BNT (*in natura*). Uma das replicatas foi inoculada sem fonte de carbono como referência de controle negativo.

O inóculo foi obtido por meio da raspagem de esporos de placas de Petri e sua dispersão em 50 mL de solução salina (NaCl 0,9 % e 1mL de *Tween* 80 a 1 %) autoclavada. Após a contagem de esporos em câmara de Neubauer e microscópio óptico, alíquotas da solução de esporos (10^7 esporos/mL) foram inoculadas nos Erlenmeyers na proporção de 1% de volume do meio de cultura (750 μ L) em triplicata biológica.

O cultivo foi mantido durante 7 dias a 28 °C e 120 r.p.m., retirando-se alíquotas de 300 μ L a cada 24h para verificação da atividade de xilanase e avaliação da curva de crescimento (resultados não foram incluídos). Posteriormente, o tempo de cultivo foi reduzido para 3 dias, pois observou-se que após esse período a maioria dos cultivos atingiu um platô para atividade de xilanase.

O Extrato Bruto (EB), sobrenadante da amostra contendo enzimas secretadas pelo fungo, foi obtido por filtração a vácuo do cultivo com funil de Büchner e papel de filtro Whatman nº 1. O EB foi armazenado em câmara fria a 4 °C.

4.4 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas totais das amostras foi determinada pela aplicação do método de Bradford. (BRADFORD, 1976) com o *Kit Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Para a curva-padrão foi usada albumina sérica bovina 0,1 mg/mL (BSA) conforme as instruções do fabricante.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As amostras de EB foram avaliadas em relação às atividades de celulasas (avicelase, CMCase e FPase), hemicelulasas (mananase e xilanase) e pectinase; os substratos utilizados foram celulose microcristalina (Avicel), carboximetilcelulose 4% (CMC), papel de filtro Whatman nº 1, manana 1% (galactoamanana- *locus bean*), xilana 1% (*oat spelt xylan*) e pectina 1 % (*citrus fruit*), respectivamente, adquiridos da Sigma – Aldrich (St. Louis, MO. USA) com exceção do papel de filtro que provém da GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ. USA).

Para CMCCase, mananase, xilanase e pectinase, foram realizados microensaios incubando-se 10 μ L de extrato bruto (EB) e 20 μ L de substrato a 50 °C em termociclador (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) durante 30 min (adaptado de FILHO; PULS; COUGHLAN, 1993). Após esse período as reações foram interrompidas pela adição de 60 μ L

de ácido 3,5-Dinitro- Salicílico (DNS) e incubação a 97 °C durante 10 min (MILLER, 1959). Desta solução, foram aplicados 50 µL acrescidos de 150 µL de água destilada em microplaca para a leitura de absorbância a 540 nm (SpectraMax M2^e, Molecular Devices Co., EUA). O ensaio de avicelase foi realizado incubando-se 50 µL de EB e 50 µL de Avicel 1 % em tampão acetato de sódio 50mM e pH 4,8 a 50 °C durante 2 horas sob agitação; no ensaio de FPase foram utilizadas tiras de papel de filtro com dimensões de 3,0 x 0,5 cm e 75 µL de EB incubados a 50°C durante 1 h; em ambos foi realizada posterior adição de 150 µL de DNS a 97 °C durante 10 min; adição de 750 µL de água destilada e leitura do sobrenadante a 540 nm (GHOOSE, 1987). Valores de referência para o branco de substrato foram obtidos substituindo-se a enzima (EB) por água destilada, e para o branco de enzima, substituindo-se o substrato; os valores de absorbância dos brancos foram subtraídos da absorbância total do ensaio.

As atividades foram expressas em UI/mL de extrato bruto ou solução enzimática, definido como µmol de açúcar redutor liberado por minuto de reação. O cálculo foi feito a partir de curvas de calibração variando-se a concentração dos açúcares redutores envolvidos nos ensaios enzimáticos – glicose, manose, xilose e ácido galacturônico – de 0,2 a 2,0 mg/mL, com volume final de 30 ou 75 µL. Cada reação enzimática foi realizada em quintuplicata ou triplicata técnicas, de acordo com o volume final.

As atividades de cada enzima foram comparadas entre os diferentes tratamentos através de uma análise de variância simples ou *One-Way ANOVA* no *software* Microsoft Excel (versão Office 365), com nível de significância (α) = 0,05, e como *post-hoc* foi utilizado o teste de Tukey no *software* R (versão 3.4.0) com intervalo de confiança de 95 %.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DE XILANASES

4.6.1 EFEITO DO TEMPO DE REAÇÃO

Para avaliar o perfil da reação enzimática ao longo do tempo e determinar o período de reação mais adequado para a amostra (Tr10), o ensaio enzimático foi realizado com incubações de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos (adaptado de BIZ et al., 2014).

4.6.2 EFEITO DA TEMPERATURA

Para verificar o efeito da temperatura na atividade de xilanases, o substrato foi pré-aquecido no termociclador em temperaturas de 30 a 100 °C durante cerca de 2 min antes da adição de EB. O tempo de reação foi de 5 min, e os demais parâmetros de ensaio enzimático foram realizados como descrito no item 4.5.

4.6.3 AVALIAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE

Alíquotas de solução enzimática contendo xilanases foram incubadas em tubos de polipropileno a 40 e 55 °C e sua atividade foi verificada a cada 24 horas como descrito no item 4.5, com tempo de reação de 5 min.

4.6.4 EFEITO DO pH

Para verificar o efeito do pH na atividade de xilanases, o substrato foi tamponado com tampão universal Glicina-Citrato-Fosfato a 50 mM em um gradiente de pH de 3,5 a 9,0. O tempo de reação foi de 5 min, e os demais parâmetros de ensaio enzimático foram realizados como descrito no item 4.5.

4.6.5 EFEITO DE ÍONS E EDTA

Para avaliar o efeito de íons na atividade, as amostras foram pré-incubadas na presença de íons por cerca de 20 min à temperatura ambiente (± 28 °C) na concentração de 1 e 10 mM. O efeito dos íons metálicos foi avaliado utilizando os seguintes reagentes: CaCl_2 , CoCl_2 , CuSO_4 , 4FeCl_3 , FeSO_4 , KCl , MgCl_2 , NaCl , ZnSO_4 ou ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), um agente quelante. Em seguida foi realizado o ensaio enzimático conforme item 4.5, com tempo de reação de 5 min. As atividades foram expressas em atividade relativa (%), e nos controles os íons foram substituídos por água destilada.

4.6.6 EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

As amostras enzimáticas foram pré-incubadas com compostos fenólicos por cerca de 20 min à temperatura ambiente (± 28 °C) na concentração final de 1 mg/mL. O efeito dos compostos fenólicos foi avaliado utilizando os seguintes reagentes: vanilina e ácido tânico (dissolvidos em água); ácido 4-hidroxibenzoico, ácido ferúlico, ácido para-cumárico e ácido trans-cinâmico (dissolvidos em etanol 50 %). Em seguida, foi realizado o ensaio enzimático conforme item 4.5, com tempo de reação de 5 min, as atividades foram expressas em atividade relativa (%), e, nos controles, os fenóis foram substituídos por água destilada ou etanol 50 %.

4.7 SEPARAÇÃO DE COMPONENTES DA AMOSTRA

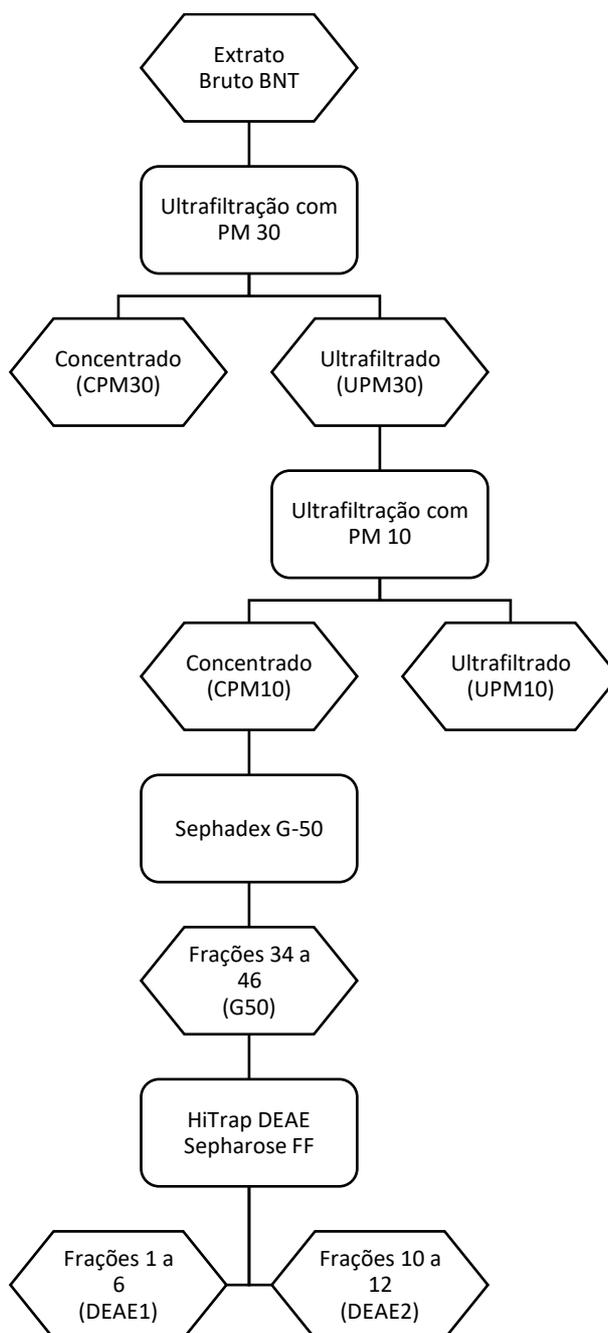


Figura 17: Esquema simplificado da estratégia de purificação.

4.7.1 ULTRAFILTRAÇÃO

O extrato bruto foi submetido a um processo de ultrafiltração por membrana de retenção de 30 kDa (PM 30 Milipore Co., Ma, EUA), sob pressão de 5 Kg.f/cm², agitação constante à temperatura de 10 °C em sistema do tipo Amicon. As duas frações obtidas na proporção de volume de 10:1 foram denominadas concentrado (C) e ultrafiltrado (U). Na segunda etapa de ultrafiltração, foi utilizada membrana de 10 kDa.

4.7.2 CROMATOGRAFIA

A amostra enzimática foi submetida a um procedimento de purificação por filtração em gel; foi aplicado 6-7 mL do concentrado da PM 10 na coluna com aproximadamente 350 mL de resina Sephadex G-50 e coletados em 95 tubos, frações de cerca de 4 mL. Posteriormente foi realizado o procedimento de troca iônica aplicando-se 1 mL da solução enzimática obtida em resina aniônica Hitrap DEAE Sepharose *Fast Flow* 1 mL, em 34 tubos e frações com 1 mL, fluxo de 60 mL/h. Ambas cromatografias foram eluídas com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, e o tampão da troca iônica tinha adicionalmente 1 M de NaCl.

4.7.3 ELETROFORESE

Para verificar a massa molecular e variedade de proteínas presentes nas soluções enzimáticas obtidas, as amostras (BNT, Tr10 e Tr16, na forma de EB, Concentrado e Ultrafiltrado) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12 % sob condições desnaturantes (LAEMMLI, 1970). As proteínas foram precipitadas em solução de ácido tricloroacético 100 % (TCA) durante 1h a 4 °C, seguido por centrifugação a 14.000 r.p.m. e 4 °C durante 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de acetona refrigerada e centrifugado novamente por três vezes; por fim foi realizada a secagem em temperatura ambiente. O pellet foi ressuscitado com 20 µL tampão de amostra (Tris-HCL 125 mM pH 6,8; SDS 2,0 %; azul de bromofenol 0,05 %; glicerol 20 % e β- mercaptoetanol 5,0 %), a solução de cada amostra foi aquecida a 100 °C durante 5 min e submetida à eletroforese no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para cada corrida foi aplicado 2 µL de *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Scientific, Ma, EUA), um marcador molecular para referência da migração aparente de proteínas contendo (de cima para baixo): β-galactosidase (116 KDa), BSA (66,2 KDa), Ovoalbumina (45 KDa), lactato desidrogenase (35 KDa), REase Bsp981 (25 KDa), β-lactoglobulina (18,4 KDa) e lisozima (14,4 KDa). A eletroforese foi realizada em sistema *Mini-Protean III Cell* (BioRad Laboratories; Hercules, CA, EUA) com tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM e SDS 0,075 % (m/v), pH 8,3) sob corrente constante de 25 mA para cada gel até completar a migração das proteínas.

4.7.3.1 COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA

A visualização das proteínas presentes no gel foi realizada após o procedimento de coloração proposto por Blum (1987).

O gel de poliacrilamida foi incubado em solução fixadora (metanol 40 %, ácido acético 12 % (v/v)) durante 1h, lavado 3 vezes com etanol 50 % (v/v) durante 20 min sob agitação,

incubado em tiosulfato de sódio 0,02 % (v/v) durante 1 min, lavado três vezes com água destilada e incubado por 15 min sob agitação em uma solução de coloração (nitrito de prata 0,2% (m/v), formaldeído 0,03 % (v/v)). Depois foi lavado com água destilada três vezes novamente, e revelado com uma solução de carbonato de sódio 6,0 % (m/v), tiosulfato de sódio 0,004 % (v/v) e formaldeído 0,02 % (v/v). A reação da solução reveladora foi interrompida pela adição de solução fixadora.

4.7.3.2 ZIMOGRAMA

A técnica de zimograma indica a correlação entre a atividade enzimática testada e as proteínas encontradas SDS-PAGE de acordo com sua posição na malha do gel. O procedimento foi realizado de forma muito semelhante ao que foi descrito no item 4.7.3, com a diferença de que o gel foi copolimerizado com xilana numa concentração final de 0,1%.

4.7.3.3 COLORAÇÃO COM VERMELHO CONGO

Após a corrida, o gel do zimograma foi incubado em Triton x-100 2,5 % por 30 min, lavado duas vezes com tampão acetato de sódio 50 mM H 5,0 e incubado por 1h30min no mesmo tampão a 50 °C. A reação enzimática foi interrompida ao ser submetida a 4°C durante 30 min. A coloração foi feita com uma solução de vermelho Congo 0,1 % por 30 min sob agitação, lavada com NaCl 1 M por 1h e revelada pela adição de ácido acético 0,5 % (v/v).

4.7.4 ANÁLISE PROTEÔMICA

Para verificar a composição das proteínas secretadas pelo fungo durante seu cultivo, foi realizada uma análise proteômica qualitativa por abordagem *bottom-up* do tipo LC-ESI-MS/MS dos Extratos Brutos de Tr16 e do BNT. Para o preparo das amostras, as etapas a seguir foram realizadas de modo subsequente.

4.7.4.1 REMOÇÃO DE PIGMENTOS

Para remoção de pigmentos que podem interferir nas análises, as amostras foram submetidas à precipitação de proteínas pelo método acetona-NaCl (CROWELL; WALL; DOUCETTE, 2013), ressuspensas em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e quantificadas pelo método de Bradford (1976).

4.7.4.2 REDUÇÃO DE PROTEÍNAS

Após a remoção de pigmentos, alíquotas com 50 µg de proteínas totais foram novamente precipitadas por acetona-NaCl, e depois ressuspensas em 150 µL de uma solução contendo uréia 8 M, NaCl 7,5 mM, bicarbonato de trietilamônio (TEAB) 50 mM e ditioneitol (DTT) 5 mM pH 8,2. As alíquotas foram incubadas a 55 °C durante 25 minutos para o processo de redução de proteínas – que promove quebra de ligações dissulfeto.

4.7.4.3 ALQUILAÇÃO

Foi adicionada uma solução de iocetamida às amostras numa concentração final de 14 mM e repousaram no escuro durante 40 min à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com DTT a 10 mM, e a mistura foi diluída com solução de TEAB 25 mM CaCl₂ 1mM e pH 7,9 na proporção de 1:5.

4.7.4.4 TRIPSINIZAÇÃO

Às amostras foi adicionado 1 µg de tripsina (para cada 50 µg de proteínas totais) e foram incubadas a 37 °C *overnight*. A digestão das proteínas foi interrompida pela adição de ácido trifluoroacético (TFA) numa concentração final de 0,5 %. A amostra foi concentrada em *Speed-vac* e ressuspensa em TFA 1 %. As soluções de peptídeos tripticos foram dessalinizadas com membrana hidrofóbica Empore C18 e eluídas por lavagens sequenciais com as seguintes soluções (v/v): acetonitrila (ACN) 25 % e ácido acético 0,5 %; ACN 50 % e ácido acético 0,5 %; ACN 80 % e ácido acético 0,5 %; ACN 100 %.

4.7.4.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Alíquotas contendo 1µg de peptídeos tripticos foram injetadas em um sistema LC-ESI-MS/MS. A etapa de cromatografia líquida foi realizada em equipamento Nano LC Ultimate 3000 (Dionex, Amsterdã, Holanda) equipado com pré-coluna e empacotadas com resina Reprosil-Pur 120 C18-AQ (Dr. Maish, Ammerbuch, Alemanha) e a eluição foi realizada com solventes A [ACN 5% (v/v), ácido fórmico (AF) 0,1% (v/v)] e B [ACN 95% (v/v), AF 0,1% (v/v)] conforme descrito por (SILVA, 2018). Os peptídeos foram eluídos da cromatografia de fase reversa para um espectrômetro de massas modelo LTQ-Orbitrap Elite (ThermoFisher Scientific, Bremen, Alemanha) através de sonda nanospray (ThermoFisher Scientific) com voltagem de 3,02 kV e temperatura de transferência capilar de 275°C. A identificação das proteínas foi realizada através do software Peaks (versão 7), baseando-se no proteoma predito de três linhagens de *A. niger* cujos genomas estão disponíveis publicamente na plataforma Uniprot (uniprot.org). As linhagens CBS 513.88 (designada ASPN_A), ATCC 1015 (designada ASPN_C) e An76 (designada ASPN_G) foram utilizadas. As tabelas de resultados foram geradas ao inserir a lista códigos de acesso obtidos na base de dados UniProt.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, investigou-se o extrato bruto produzido por *A. niger* cultivado em bagaço de cana de açúcar não-tratado por fermentação submersa para quantificar as atividades de xilanase, pectinase, mananase e CMCase e as proteínas totais presentes na amostra. O extrato bruto passou por etapas de purificação (Figura 17): ultrafiltração (PM30), ultrafiltração (PM10), cromatografia por filtração em gel (Sephadex G-50), cromatografia por troca iônica (HiTrap DEAE Sepharose *Fast Flow*). Ao longo do processo, as estratégias foram utilizadas para selecionar xilanases. Concomitante às estratégias de purificação, foi necessário realizar procedimentos para caracterizar a influência de fatores na atividade enzimática quanto a temperatura, pH e termoestabilidade. Em uma segunda etapa do projeto, foi realizado tratamento hidrotérmico com o bagaço variando-se três parâmetros: temperatura (153 - 180 °C), tempo (5 - 55 min) e carga de sólidos (1 - 9 % m/v). Foram realizados 9 tratamentos, o BPT foi utilizado como fonte de carbono para cultivo do fungo, e BNT foi utilizado como controle. As atividades de xilanase, pectinase, mananase, CMCase, FPAse e avicelase foram quantificadas, assim como as proteínas totais de cada amostra. Os tratamentos Tr10 e Tr16 foram selecionados para caracterização das atividades de xilanase quanto a temperatura, pH, efeito de íons e efeito de compostos fenólicos. Foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura do bagaço Tr10, Tr16 e BNT para avaliação morfológica; os extratos brutos de Tr16 e BNT foram submetidos à análise proteômica qualitativa para identificação das proteínas presentes em cada um. Os resultados deste estudo estão detalhados a seguir.

5.1 BNT: AVALIAÇÃO PRELIMINAR E SEMI-PURIFICAÇÃO

O extrato bruto (EB) foi obtido no cultivo de *Aspergillus niger* em bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. As atividades enzimáticas de xilanase, pectinase, mananase e xilanase desse extrato estão representadas na Figura 18. A atividade de xilanase destacou-se em relação às demais com 0,47 UI/mL. Sperandio (2018), conduzindo o cultivo em BCA sob fermentação no estado sólido, também encontrou atividade de xilanase mais elevada que de celulases, atingindo 0,80 UI/mL e com atividade específica de 52,7 UI/mg. O extrato bruto foi ultrafiltrado com PM30; a quantidade de proteínas e as atividades obtidas por cada fração de amostra - concentrado (CPM30) e ultrafiltrado (UPM30) podem ser observadas nas Figura 18 e Figura 19. A atividade de xilanase em CPM30 e UPM30 foi de 0,55 e 0,24 UI/mL, respectivamente, o que indica que a membrana de retenção de 30 kDa não foi seletiva para essa enzima ou que existe mais de uma proteína com essa atividade na amostra, com tamanhos diferentes; porém, a quantidade de proteínas em CPM30 foi 22 vezes maior que em UPM30 – as atividades

específicas de pectinase, mananase e xilanase obtidas no ultrafiltrado foram maiores que no concentrado em 15, 6 e 10 vezes, respectivamente. A maior atividade específica de xilanase em UPM30 do que em CPM30 pode estar relacionada, além da menor concentração de proteínas totais, a uma maior afinidade das enzimas presentes pelo substrato testado.

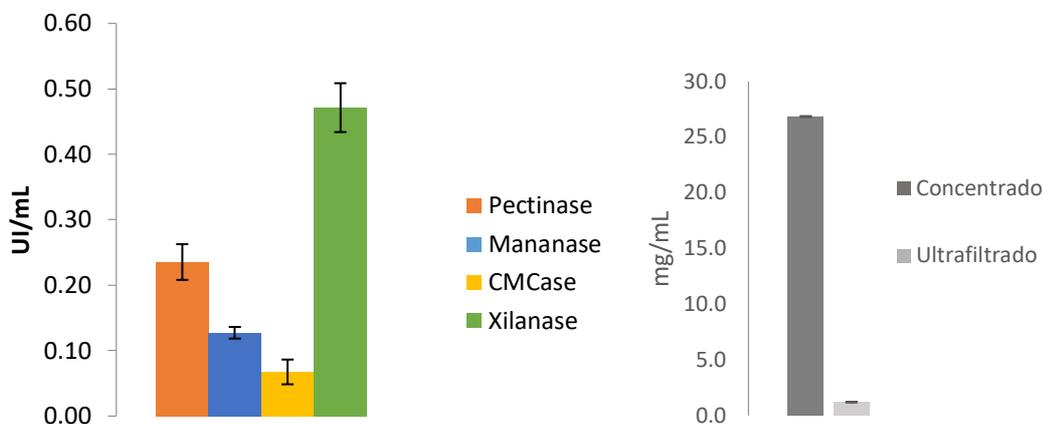


Figura 18: A esquerda, atividades de celulases e hemicelulases do Extrato Bruto (BNT). A direita, quantidade de proteínas totais nas frações obtidas após ultrafiltração em PM 30.

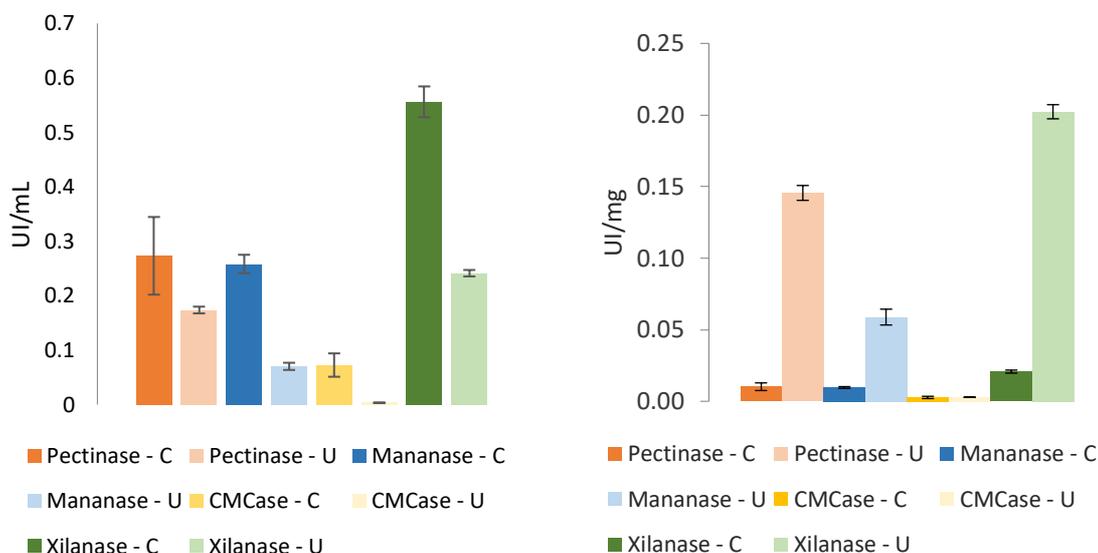


Figura 19: Atividades de holocelulases após ultrafiltração do extrato bruto em PM 30. A esquerda, as atividades estão expressas em UI/mL e os desvios-padrão representados por linhas verticais. A direita, as atividades específicas estão expressas em UI/mg de proteínas totais. “C” corresponde à fração concentrada da amostra, e “U”, à ultrafiltrada.

Diante destes resultados, decidiu-se investigar com mais profundidade as xilanases obtidas; foi verificado o efeito do pH (Figura 20) e da temperatura (Figura 21). Os valores de pH de 4,5 e 7,0 e temperaturas entre 45 e 60 °C resultaram em maiores atividades de xilanase nas duas frações (concentrado e no ultrafiltrado). Muitas das xilanases produzidas por microorganismos apresentam maior atividade entre 40 e 70 °C, e pH entre 4,0 e 7,0 (FREIRE;

ISHII, 2011; POLIZELI et al., 2005). Os resultados encontrados nesse presente trabalho estão condizentes com os apresentados na literatura. O perfil do gráfico, com a presença de mais de um pico de atividade, pode ser explicado pela presença de mais de uma proteína com atividade de xilanase na amostra; outra possibilidade é devido a influência da composição iônica do tampão utilizado na reação enzimática.

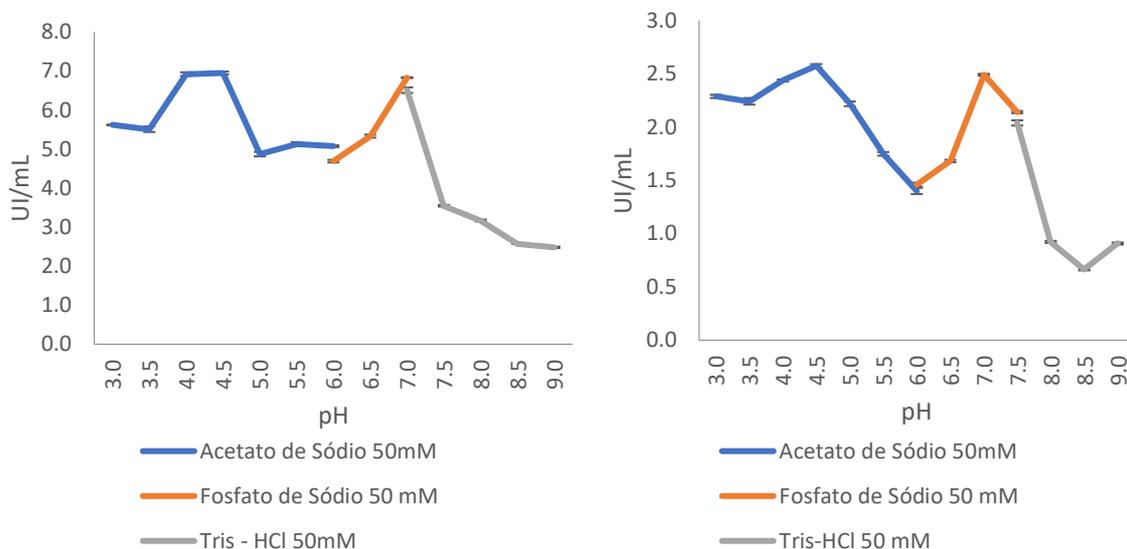


Figura 20: Efeito do pH na atividade de xilanase de CPM30 (esquerda) e UPM30 (direita).

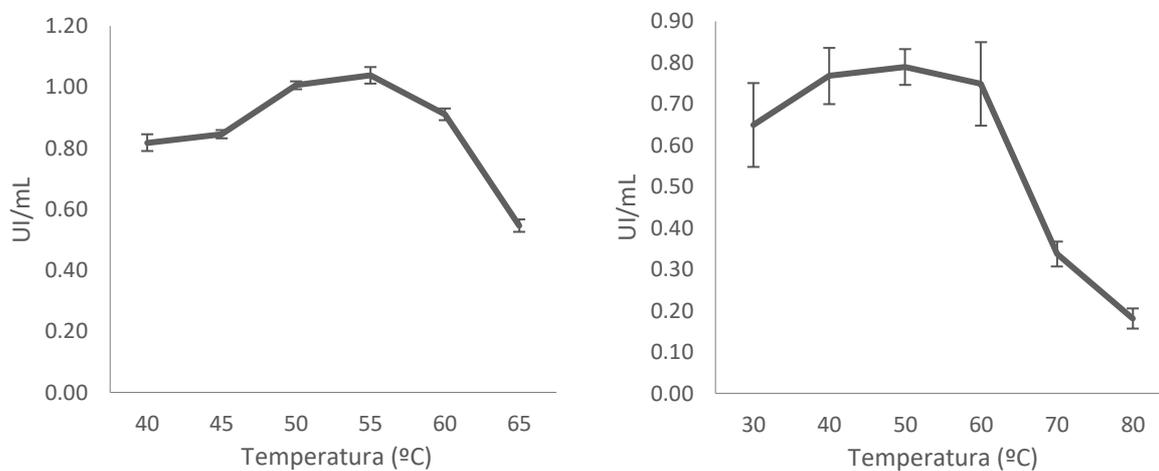


Figura 21: Efeito da temperatura na atividade de xilanasas de CPM30 (esquerda) e UPM30 (direita).

A estabilidade da enzima foi testada em suas temperaturas de maior atividade (Figura 22 e Figura 23). Em UPM30, a xilanase apresentou estabilidade a 40 °C, retendo cerca de 60 % de atividade após 4 dias de incubação. A meia vida de CPM30 a 55 °C foi abaixo de 6 h, menor do que as 12 h reportadas por Moreira (2013) para amostras puras de xilanase. Ao ser incubada a 50 °C, UPM30 apresentou atividade residual de 55 % após 24h, e de 44 % após 48 h. Uma possível explicação para a discrepância de estabilidade térmica entre as amostras é a presença

de muitas proteínas em CPM30 que podem afetar a conformação e afinidade da xilanase, além da atuação de proteases que poderiam degradar a enzima.

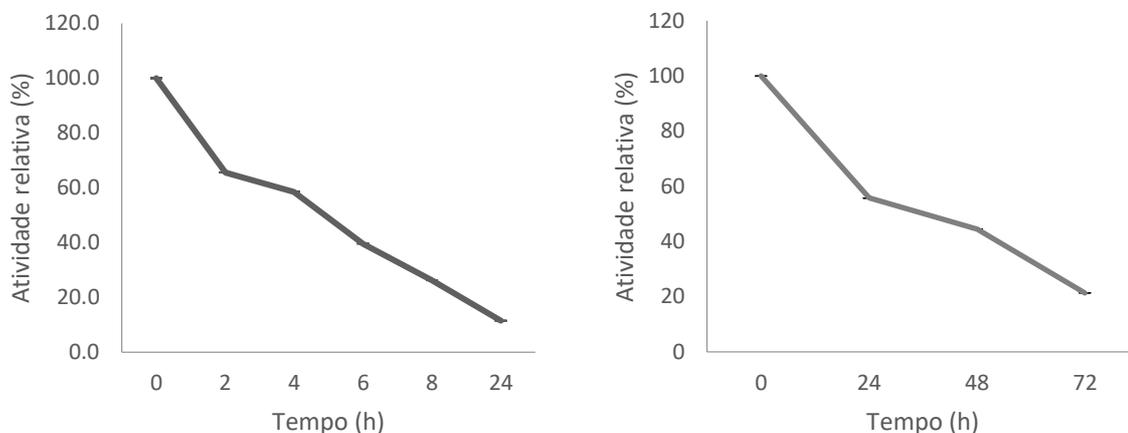


Figura 22: Termoestabilidade de xilanasas do concentrado CPM30 a 55 °C (esquerda) e do ultrafiltrado UPM30 a 50°C (direita). A atividade do tempo 0 foi considerada igual a 100%.

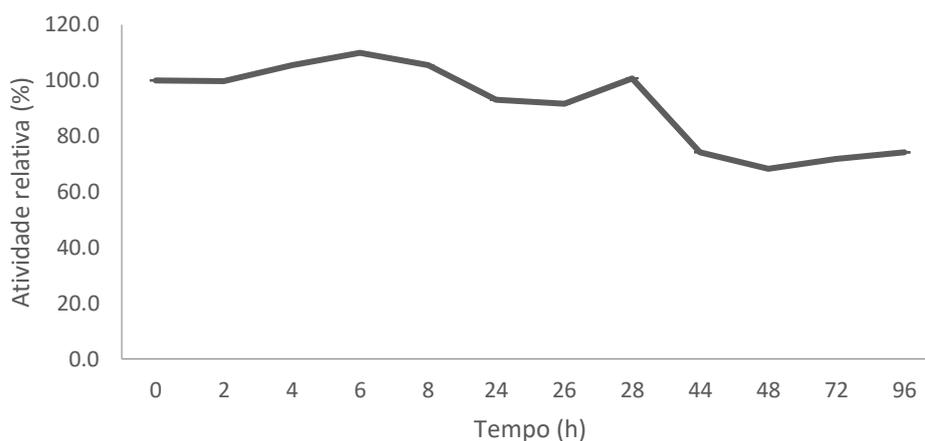


Figura 23: Termoestabilidade de xilanase de UPM30 a 40 °C. A atividade do tempo 0 foi considerada igual a 100%.

Foi realizada uma segunda ultrafiltração em UPM30, dessa vez com membrana de retenção de 10 kDa. Algumas xilanasas de origem fúngica são capazes de mudar sua conformação e passar através de membranas com ponto de corte de 10 kDa, mas a maior parte das proteínas xilanolíticas produzidas por microorganismos possuem massa molecular de 20 a 60 kDa (POLIZELI et al., 2005; SÁ-PEREIRA et al., 2003). As atividades xilanolíticas ficaram totalmente retidas na fração concentrada resultante (CPM10) com 1,59 UI/mL. Moreira (2013), ao purificar uma xilanase produzida por *A. terreus* cultivado em BCA, utilizou PM10, mas em contraste com os resultados aqui obtidos, as frações concentrada e ultrafiltrada apresentaram atividade de xilanase.

Após a ultrafiltração, CPM10 foi submetida a cromatografia por filtração em gel em resina Sephadex G-50. As frações de 34 a 46 apresentaram atividade de xilanase e o pico de atividade não coincidiu com o pico de proteínas, mas os picos se apresentaram de forma parcialmente sobreposta (Figura 24); a atividade mais elevada foi encontrada no tubo 39 e atingiu 0,46 UI/mL. Este resultado é similar aos de outros trabalhos em condições semelhantes, como o de Moreira (2013), que obteve uma xilanase entre as frações 30-40 e atividade de cerca de 0,5 UI/mL, e Silva (2014) entre as frações 37-45 e atividade específica de 108,5 UI/mg. Outros trabalhos utilizaram as resinas Sephadex G-75 (SANJIVKUMAR et al., 2017) e Sephadex G-200 (NAIR; SINDHU; SHASHIDHAR, 2008) para obter amostras puras. As frações cromatográficas com atividade de xilanasas foram misturadas em uma mesma amostra, aqui designada por G50, e apresentaram uma média de 0,012 mg/mL de proteínas totais. Amostras enzimáticas produzidas por fungos filamentosos podem possuir elevada concentração de pigmentos, e resinas do tipo troca iônica podem ser danificadas por estes pigmentos, como observado pelo grupo de pesquisa do laboratório; essa etapa foi relevante para realizar a separação entre os pigmentos e as enzimas e preparar a amostra para a próxima cromatografia. O líquido obtido com atividade de xilanasas após esta etapa cromatográfica era transparente, em contraste com a cor castanha inicial de CPM10. Para a realização da cromatografia, G50 foi eluída em tampão acetato de sódio pH 7,0; esta eluição diminuiu a concentração de enzimas. Por este motivo, a amostra foi ultrafiltrada em PM10 novamente com o objetivo de concentrar a amostra para prosseguir com a próxima etapa de purificação.

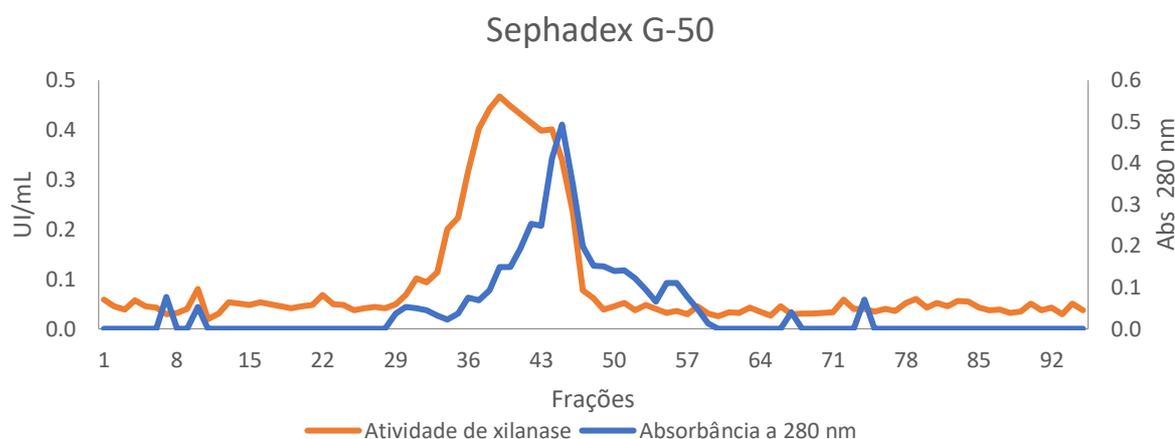


Figura 24: Perfil de eluição da solução enzimática em cromatografia por filtração em gel com resina Sephadex G-50 equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0.

A amostra G50 foi aplicada em uma coluna de troca iônica com resina aniônica HiTrap DEAE Sepharose FF 1 mL. A amostra resultante foi eluída em 34 tubos, numerados

sequencialmente (frações 1-34). Foi encontrada atividade de xilanases nos tubos 1 a 6 (primeiro pico) e 10 a 12 (segundo pico), com atividade enzimática variando entre 0,24 e 0,61 UI/mL (Figura 25) e concentração de proteínas entre 0,002 e 0,02 mg/mL. A presença de 2 picos de xilanases indica que podem haver duas xilanases com perfis iônicos diferenciados na amostra. Esta etapa foi realizada com adição gradiente de NaCl até atingir a concentração de 1 M na fração 15. É possível que as xilanases do segundo pico tivessem uma maior afinidade pela resina aniônica do que as do primeiro pico, e o gradiente de sal interferiu nesta interação.

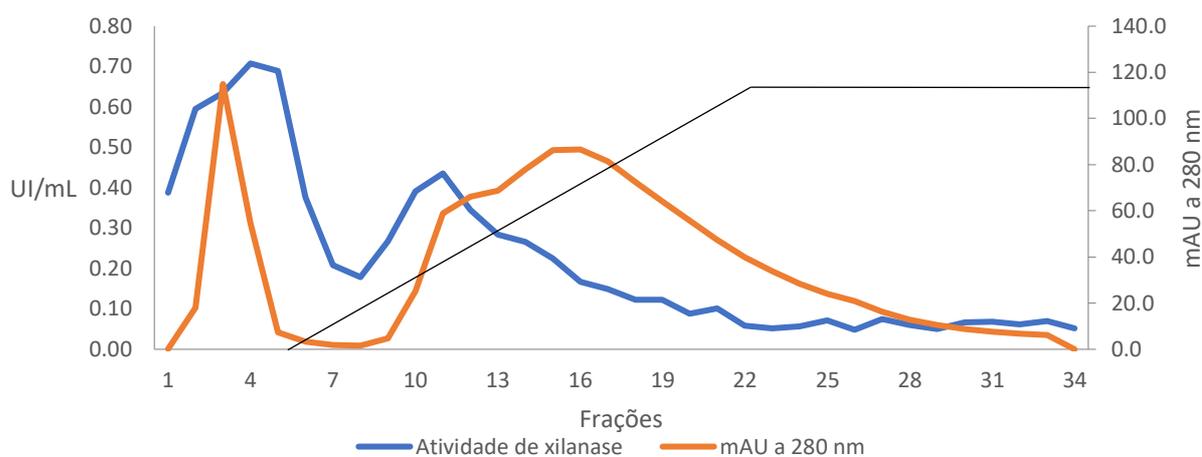


Figura 25: Perfil de eluição da solução enzimática em cromatografia por troca iônica com resina HiTrap DEAE Fast Flow equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e gradiente de NaCl que atingiu a concentração de 1 M a partir da fração 15, representado pela linha preta.

A hipótese de que a amostra apresenta mais de uma isoforma de xilanase é corroborada pelas imagens de eletroforese de CPM10 e DEAE1 (Figura 26). Uma das bandas de xilanase se alinhou entre os marcadores de 30 e 45 kDa, e a outra entre 20,1 e 30 kDa; muitas xilanases fúngicas possuem entre 20 e 40 kDa (POLIZELI et al., 2005). Como a fração foi obtida do ultrafiltrado de PM30, provavelmente a xilanase maior (~38 kDa) passou através da membrana devido à capacidade de mudar sua conformação mencionada anteriormente. A metodologia utilizada não foi suficiente para a purificação total da amostra, e este é considerado um processo importante para estudos mais aprofundados sobre a estrutura tridimensional da proteína e otimização da atividade. Para obter uma amostra semi-purificada o uso de ultrafiltração pode se provar útil com apenas 2 etapas, considerando que o SDS-PAGE revelou poucas bandas entre 14 e 97 kDa da amostra CPM10. Heinen et al. (2018) obteve uma xilanase pura do extrato bruto produzido por *A. tamaritii* em apenas uma etapa de cromatografia de troca iônica, porém, essa estratégia talvez não seja a mais adequada para a amostra estudada neste projeto porque os pigmentos presentes poderiam danificar a resina, como mencionado anteriormente, impedindo sua reutilização – o que seria economicamente inviável.

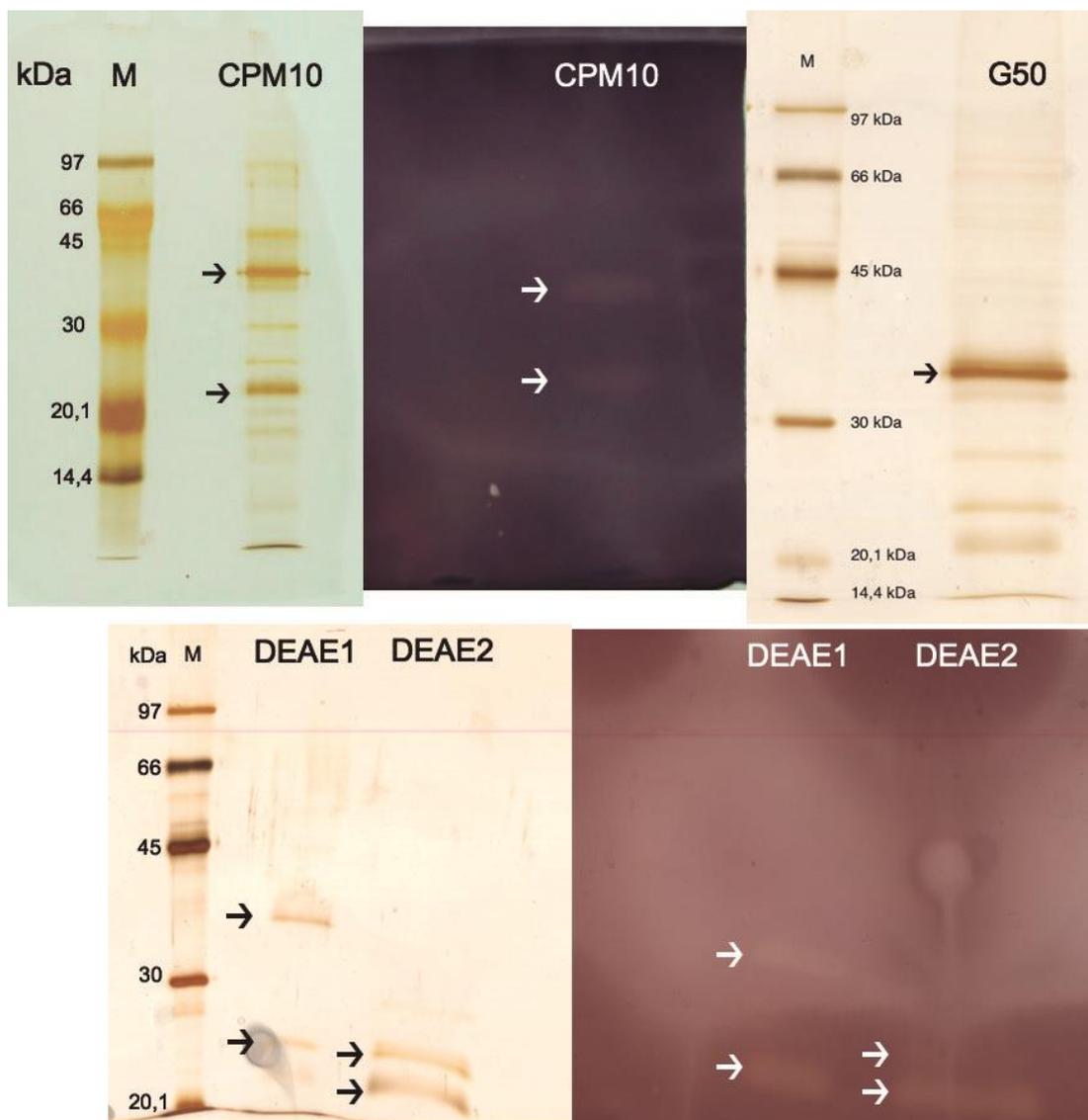


Figura 26: SDS-PAGE e zimogramas de solução enzimática secretada por *A. niger* após etapas do processo de purificação. M: marcador de peso molecular. CPM10: fração da amostra concentrada por ultrafiltração em PM10. G50: fração da amostra do pico de proteínas após cromatografia por filtração em gel Sephadex G-50. DEAE1: primeiro pico de proteínas após cromatografia em resina aniônica DEAE Sepharose *Fast Flow*. DEAE2: segundo pico de proteínas após cromatografia em resina aniônica DEAE Sepharose *Fast Flow*.

O zimograma de G50 não foi incluído na Figura 26 porque sua coloração não possibilitou a visualização de bandas, possivelmente devido ao uso de reagentes degradados ou erros na execução da técnica de coloração, mas no zimograma de DEAE1 e 2 as bandas comprovam atividade de xilanase em posição correspondente à bandas protéicas do SDS-PAGE. Este zimograma ficou manchado provavelmente devido a presença de saliências no fundo do recipiente utilizado para realizar a coloração, mas não foi possível repetir a análise por falta de amostra disponível.

5.2 PRÉ-TRATADOS

O bagaço de cana, utilizado como fonte de carbono para o cultivo de *Aspergillus niger*, foi submetido a um pré-tratamento hidrotérmico do tipo *Liquid Hot Water* sob diversas condições de temperatura, concentração e tempo. Como pode ser verificado na Tabela 2, cada um dos tratamentos foi denominado em concordância com os dados utilizados por Silva et al (2018) para facilitar a comparação de resultados, tendo em vista que os parâmetros utilizados no pré-tratamento e o isolado fúngico foram os mesmos nos dois trabalhos, como mencionado no item 1.3.4. A composição do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, verificada através de estudos bromatológicos por Silva (2018), é de 43,4 % de glicana, 22,4 % de xilana, e 24,4 % de lignina; quando submetida ao Tratamento 16 (Tr16) sua composição foi alterada para 51,4 %, 17,5 % e 22,1 % dos mesmos compostos, respectivamente.

5.2.1 MEV

Amostras de pré-tratados foram analisados morfologicamente por microscopia eletrônica de varredura. Foi possível observar alterações na superfície celulósica da amostra (Figura 27) resultantes do tratamento hidrotérmico aplicado. A superfície do BNT é mais lisa e compacta, enquanto os pré-tratados avaliados apresentam aspecto mais aveludado (Tr10) e poroso (Tr16); as irregularidades também aumentam a área de superfície, possivelmente permitindo um maior acesso de *A. niger* e suas enzimas hidrolíticas ao substrato analisado. Pode-se afirmar que houve diminuição da recalcitrância do bagaço, ao associar as imagens obtidas aos resultados de produção de holocelulases explorados no item 5.2.2 e considerar que não houve intensa alteração da composição química do pré-tratado. Portanto, a expressão diferencial de holocelulases provavelmente é resultante de alterações estruturais do material.

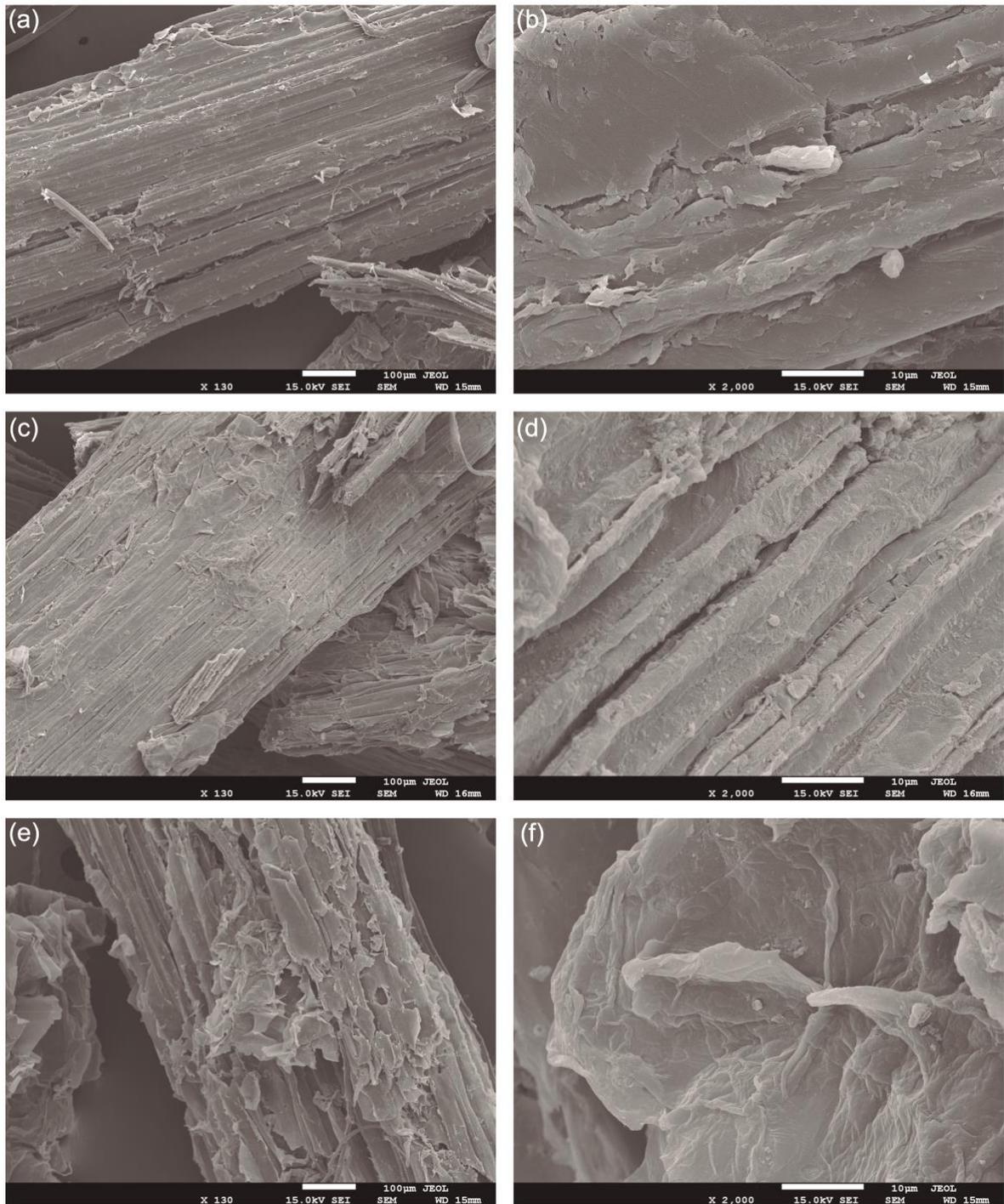


Figura 27: Micrografias eletrônicas da superfície do bagaço de cana *in natura* e após tratamento hidrotérmico. As imagens à esquerda foram registradas com um aumento de 130x, e à direita, de 2000x. (a) e (b): BNT. (c) e (d): Tr10. (e) e (f): Tr16. Estas imagens foram obtidas em colaboração com Caio de Oliveira Gorgulho Silva, e também foram utilizadas em sua tese de doutorado.

5.2.2 HOLOCELULASES

Os tratamentos aqui utilizados foram testados para atividades de Xilanase, Pectinase, CMCCase, Mananase, FPase e Avicelase (Figura 28). Todas as atividades foram analisadas por ANOVA e em nenhuma delas foi verificado $p > 0,000001$. Este resultado indica que existem pelo menos 2 tratamentos com atividades significativamente diferentes. Como *post-hoc* foi realizado o Teste de Tuckey para evidenciar quais tratamentos foram significativamente diferentes de quais – a eles, foram designadas diferentes letras, variando de “a” a “e”. Letras iguais não apresentam diferença estatística significativa. Os gráficos evidenciam as atividades dos tratamentos Tr2, Tr8, Tr10, Tr15 e Tr16 em detrimento dos grupos controle (BNT) e dos tratamentos Tr1 e Tr14 . Os grupos Tr6 e Tr12 se destacaram pela atividade de xilanases de 0,34 e 0,43 UI/mL. A maior atividade de xilanases foi do Tr10, com 0,62 UI/mL, que atingiu ainda as maiores atividades de FPases e avicelases (0,12 e 0,12 UI/mL). As pectinases de Tr2 e Tr16 atingiram 0,15 UI/mL; as CMCases de Tr2, Tr8, Tr10 e Tr16 também foram as mais elevadas, com 0,15 UI/mL; Tr8 atingiu 0,16 UI/mL na atividade de mananase. Essas atividades, quando comparadas com o que é reportado na literatura, não são altas; mas é importante ressaltar que o que está sendo avaliado é o resultado obtido com uso do pré-tratamento hidrotérmico. Por isso a referência de comparação utilizada por este trabalho foca no BNT como grupo controle. A maior parte das atividades de xilanases foi maior nos pré-tratados; este dado pode ser consequência de algum mecanismo que ative a expressão destas proteínas. Uma hipótese para explicar esse dado é que a solubilização da lignina, propiciando acesso facilitado do fungo às hemicelulases, ativa fatores de transcrição para essas enzimas. Os resultados obtidos no teste de Tukey para avicelases não condizem com a análise visual do gráfico, e isso foi atribuído a erros na etapa de normalização dos dados, por isso foram descartados e não estão apresentados na Figura 28. As atividades de holocelulases obtidas estão representados resumidamente na Figura 30. As atividades específicas (Figura 31) foram calculadas após quantificação de proteínas totais pelo Método de Bradford. O tratamento hidrotérmico a 170 °C por 30 min e com carga de sólidos de 1 e 6 % (m/v) aumentou a atividade das xilanases produzidas em 360 (Tr16) e 470 % (Tr10), quando comparada a BNT. Os parâmetros do pré-tratamento foram determinados após testes preliminares, nos quais uma alta severidade não propiciou o crescimento adequado do fungo; a isso atribuiu-se uma possível produção de inibidores enzimáticos.

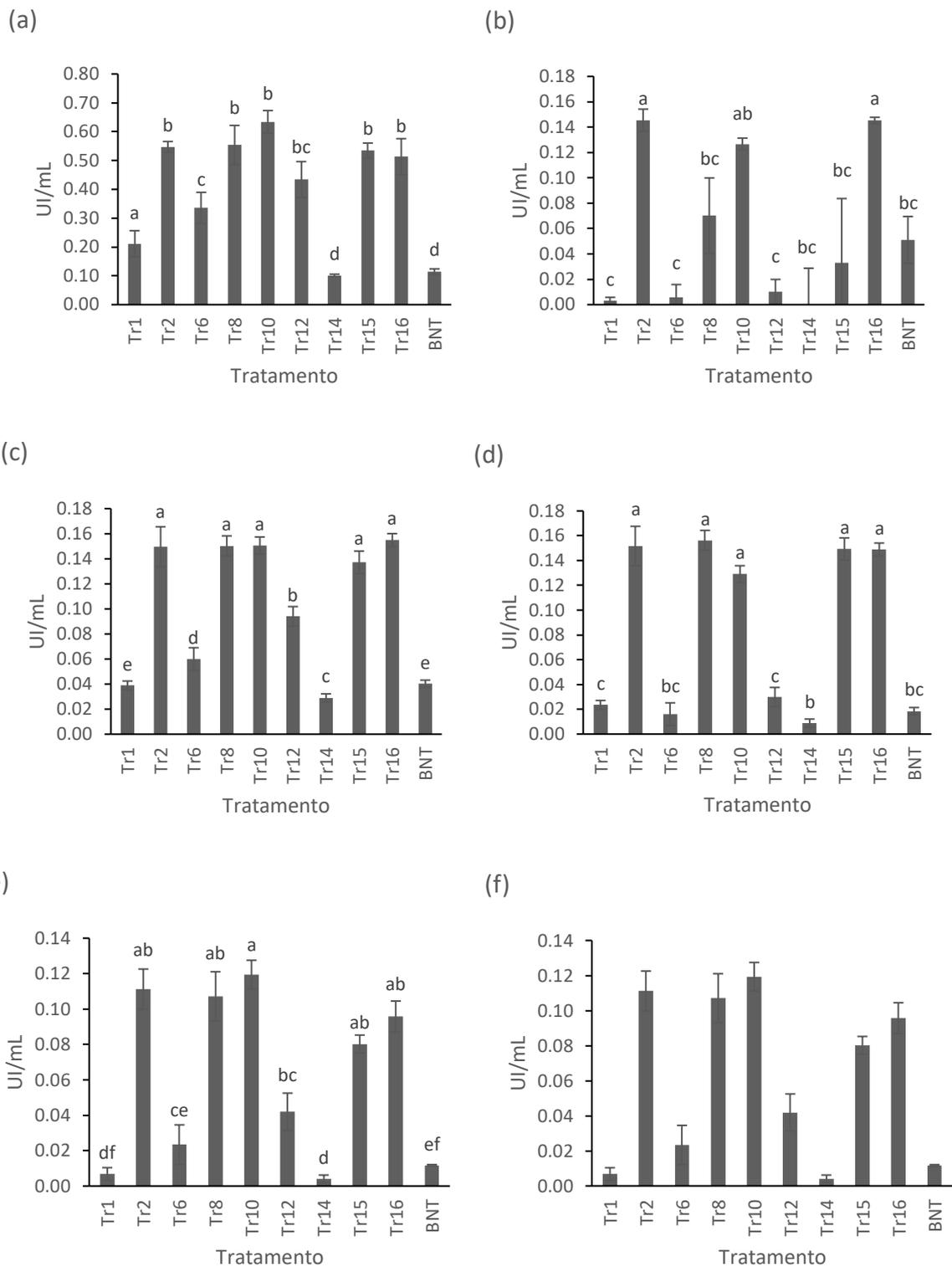


Figura 28: Histogramas das atividades de holoelulasas expressas em UI/mL de cada um dos tratamentos testados. Os desvios-padrão foram representados por linhas verticais, e os ensaios foram realizados em quintuplicata técnica. Os tratamentos estão detalhados na Tabela 2. São quantificadas atividades das seguintes enzimas: (a): xilanasas. (b): pectinasas. (c): CMCases. (d): mananasas. (e): FPAsas. (f): avicelasas. Em cima de cada barra dos histogramas foram inseridos, no formato de letras, os resultados do Teste de Tukey como parte da análise estatística aplicada à atividades enzimáticas.

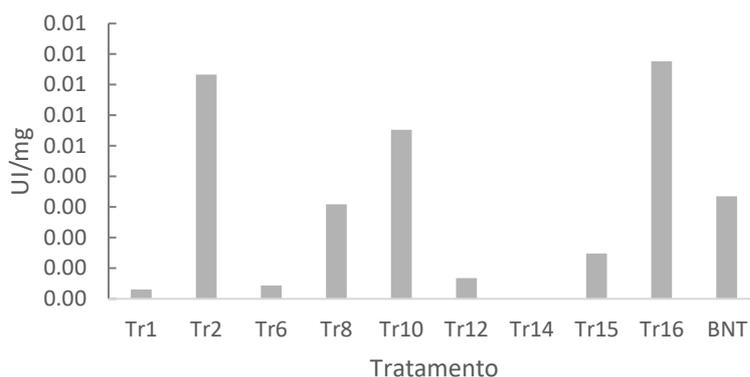


Figura 29: Perfil da atividade específica de xilanases produzidas *A. niger* cultivado em bagaço de cana.

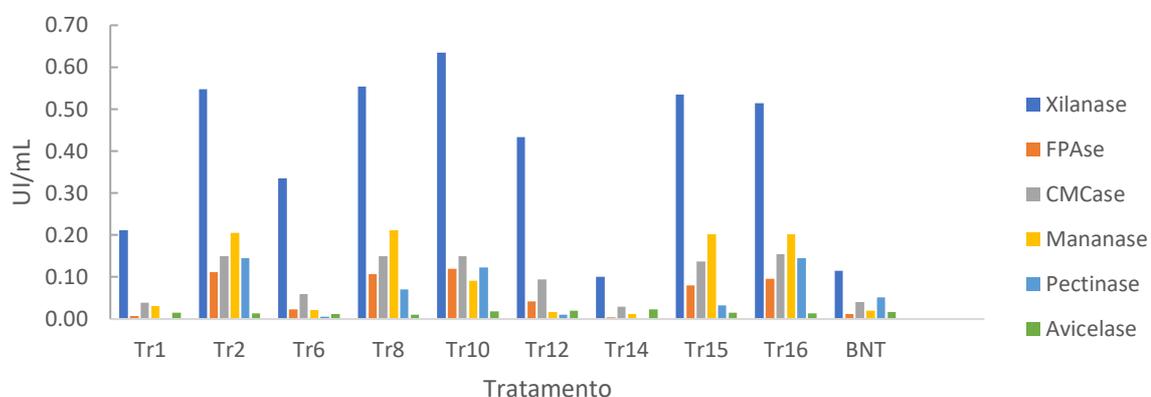


Figura 30: Representação da atividade – expressa em UI/mL – de celulases e hemicelulases produzidas por *A. niger* cultivado em bagaço de cana pré-tratado hidrotérmicamente sob variados parâmetros (consultar Tabela 2 para mais detalhes). BNT: bagaço não-tratado.

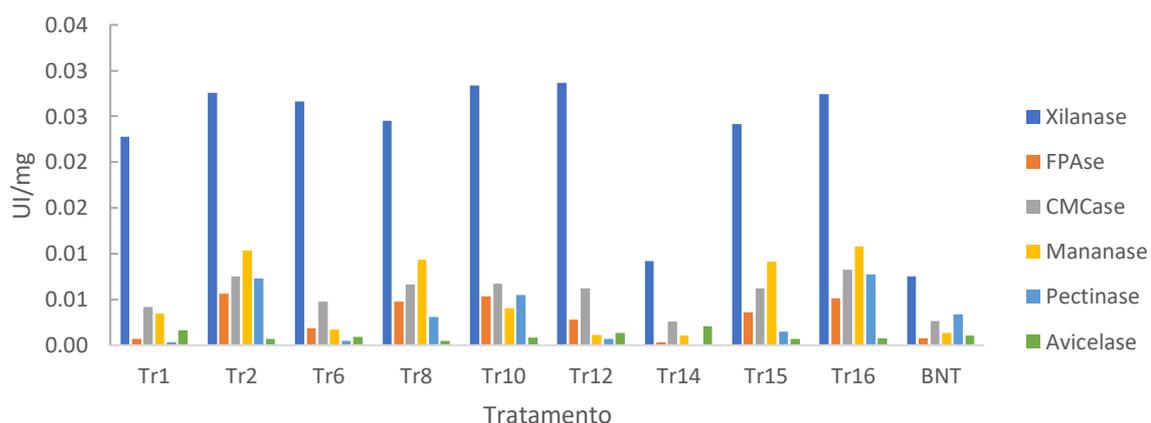


Figura 31: Representação da atividade específica – expressa em UI/mg – de celulases e hemicelulases produzidas por *A. niger* cultivado em bagaço de cana pré-tratado hidrotérmicamente sob variados parâmetros (consultar Tabela 2 para mais detalhes). BNT: bagaço não-tratado.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DE XILANASES DAS AMOSTRAS TR10 E TR16

As amostras Tr10 (170 °C, 30 min e 6%) e Tr16 (170 °C, 30 min e 1%) foram selecionadas para prosseguir com a caracterização enzimática devido às suas atividades específicas de xilanase associadas ao potencial demonstrado para a produção de holocelulases por estas amostras. Seria interessante realizar as análises seguintes com as amostras Tr2 e Tr8 também, mas não foi possível fazê-lo devido ao tempo limitado disponível para tal.

O perfil de liberação de açúcares redutores foi avaliado em função do tempo de reação (Figura 32), e o tempo de 5 minutos foi escolhido para adequar a metodologia de verificação da atividade de xilanase às amostras selecionadas nas etapas seguintes, tendo em vista que um tempo muito menor do que esse dificultaria a execução das análises de forma similar. Não foi possível atingir uma padronização a partir desse resultado, mas a adaptação facilitou a verificação da atividade enzimática.

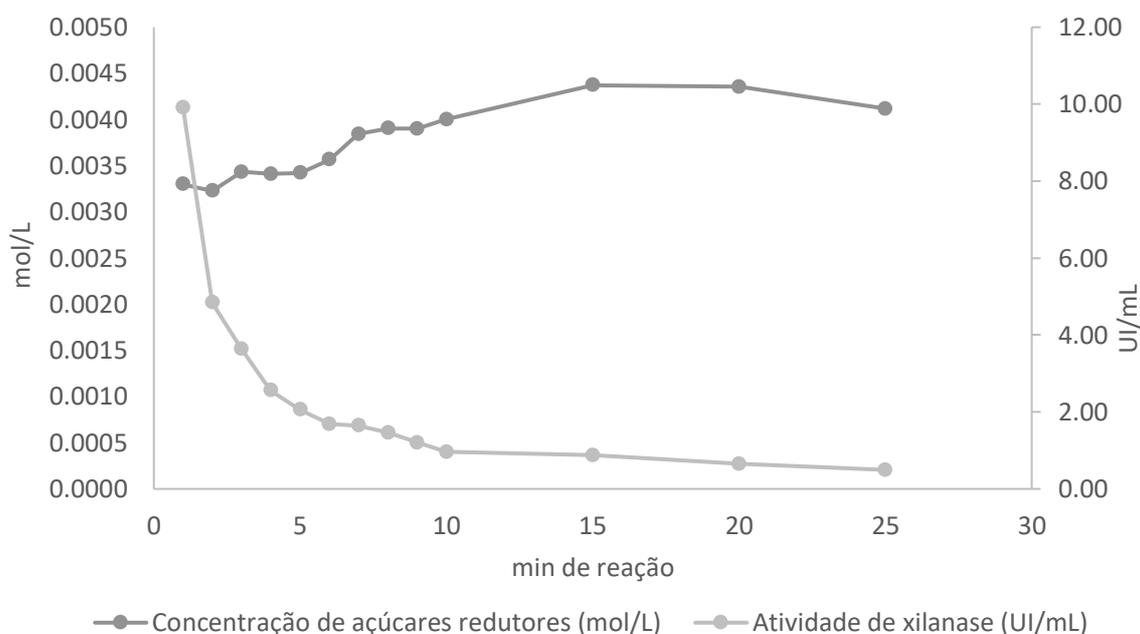


Figura 32: Perfil de liberação de açúcares redutores ao incubar a solução enzimática Tr10 com xilana *oat spelt* 1% durante variados intervalos de tempo. A atividade enzimática foi calculada com base no intervalo de tempo utilizado em cada ensaio.

A eficiência catalítica e a estabilidade desta enzima dependem de uma série de parâmetros; a maior parte das xilanases apresenta maior atividade no intervalo de 40 a 70 °C e pH entre 4,0 e 7,0. Apesar disso, há registros de xilanases apresentando atividade desde 5 a 105 °C (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). Em Tr10, as maiores atividades foram obtidas na faixa de temperatura entre 50 e 60 °C, atingindo 2,36 UI/mL a 53 °C; Tr16 teve uma faixa de atividade otimizada de 45 a 60 °C, sendo 3,03 UI/mL sua maior atividade, a 55 °C, como pode ser verificado nos gráficos da Figura 33. Foi necessário o preaquecimento do substrato para

esta análise, pois os resultados iniciais eram inconclusivos e a curva de atividade se manteve elevada inclusive a 100 °C. Estima-se que o tempo que o termociclador leva para aquecer a placa (cerca de 1 min) foi suficiente para a liberação de açúcares com essas amostras, o que é corroborado pela figura acima. A estabilidade foi avaliada a 55 e 40 °C, e os resultados foram consistentes com os obtidos no item 5.1: quando incubadas 55 °C, as atividades caíram a menos de 16% do valor inicial em 24h, mas a 40 °C se mantiveram estáveis (retendo > 93% da atividade inicial) por pelo menos 7 dias.

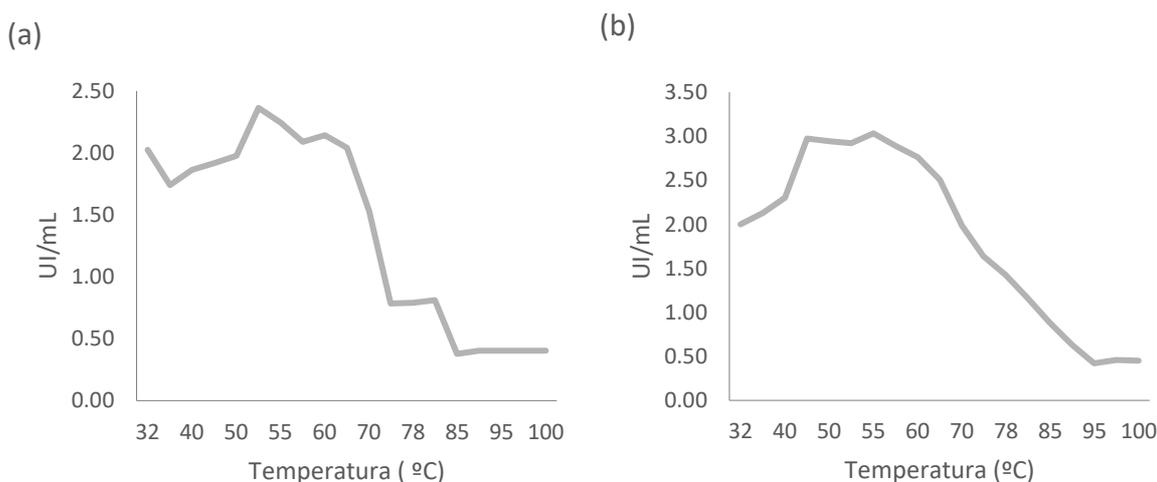


Figura 33: Atividade de xilanases incubadas em diferentes temperaturas. (a): Tr10. (b): Tr16.

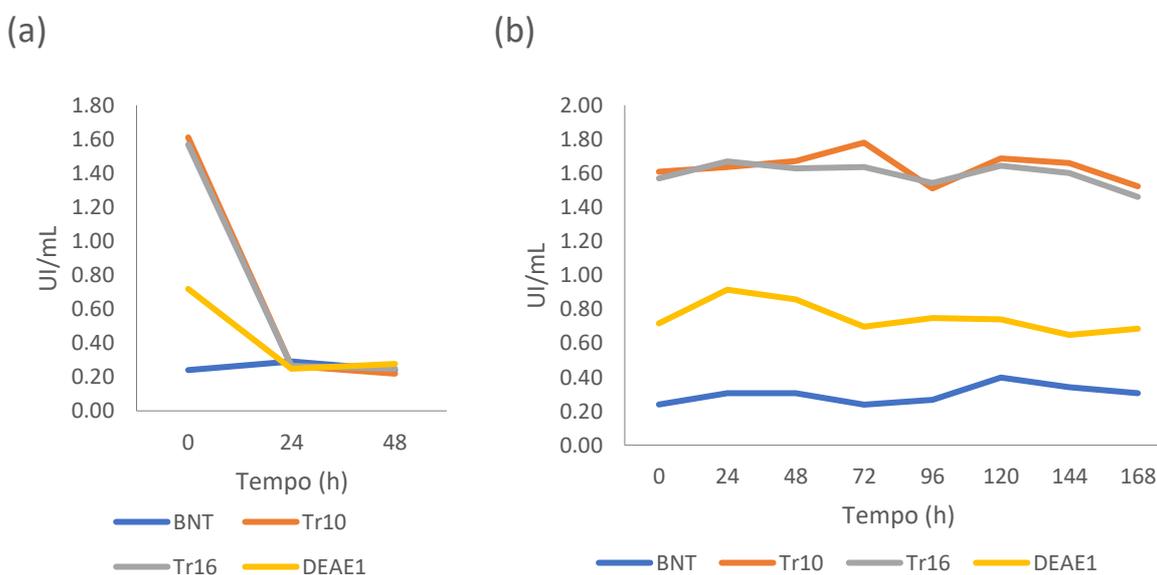


Figura 34: Estabilidade da atividade de xilanases incubadas a 55 (a) e 40 °C (b) ao longo do tempo.

Em relação ao pH, as amostras demonstraram capacidade de atuar em uma faixa ampla (Figura 35); Tr10 teve suas maiores atividades em pH de 4,5 a 5,5, com 1,86 UI/mL e apresentou retenção de 64% quando incubada em pH 9,0. Tr16 apresentou pouca variação ($\cong 7\%$) na atividade de xilanase em uma faixa de 3,5 a 6,5 de pH com até 1,69 UI/mL e retenção de

62 % da atividade em pH 9,0. Xilanases comerciais atuam numa média de pH de 5,5 e 55 °C, a capacidade de atuar em pH alcalino é incomum entre xilanases fúngicas e se mostra relevante principalmente para aplicações na indústria de papel e na produção de detergentes (HE et al., 2015; POLIZELI et al., 2005). Portanto, as xilanases de Tr10 e Tr16 apresentaram comportamento semelhante às que são utilizadas em indústrias de ração animal, celulose, papel e alimentícia.

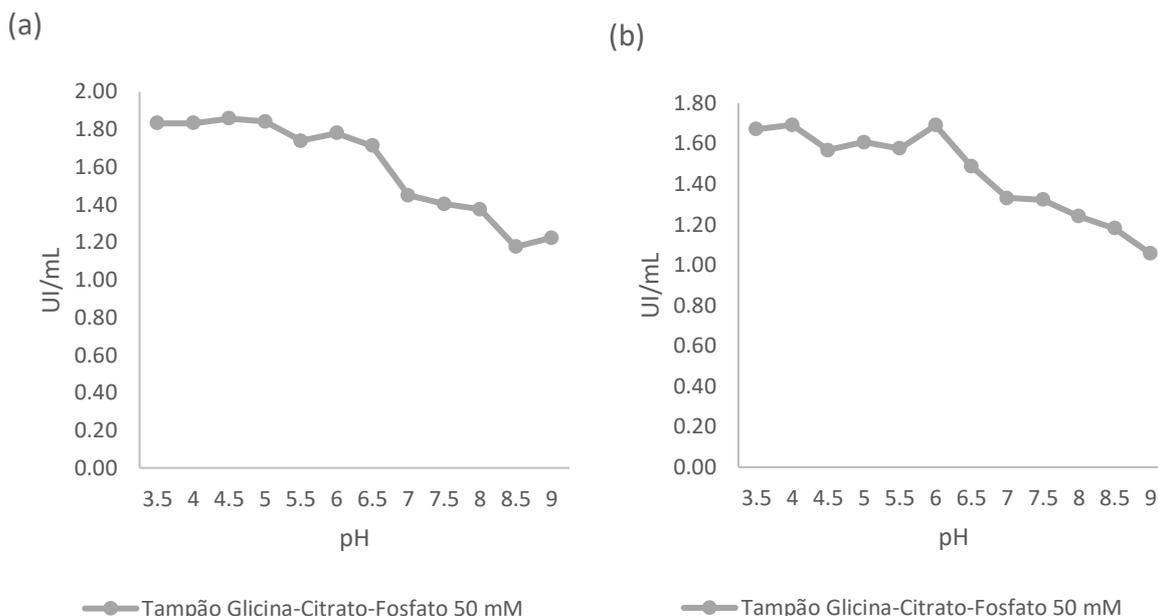
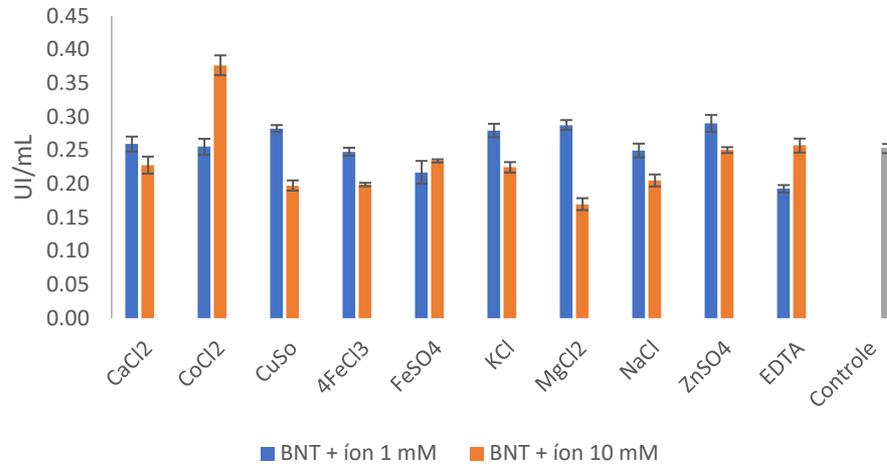


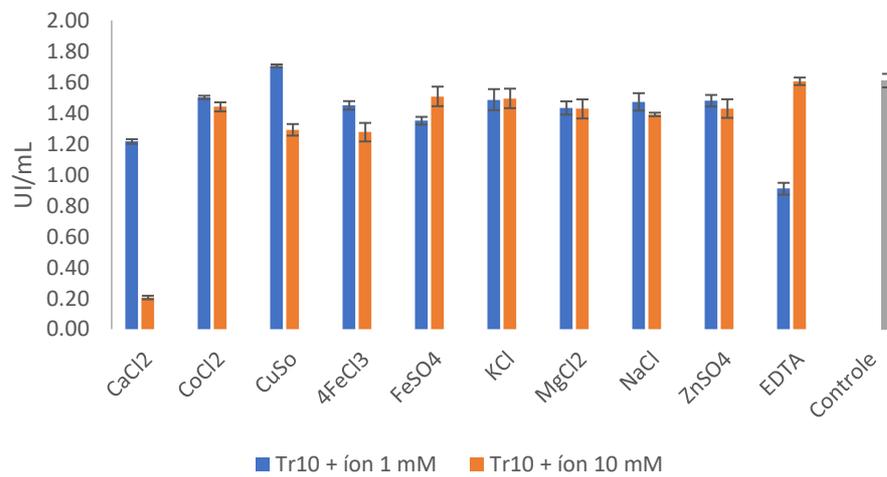
Figura 35: Atividades de xilanases tamponadas em diferentes pHs. (a): Tr10. (b): Tr16.

Em condições naturais, as enzimas produzidas por fungos provavelmente atuam em contato com diversos sais e íons metálicos. Níveis significativos destes compostos também podem ser encontrados em sistemas industriais para conversão de biomassa (TEJIRIAN; XU, 2010). Os íons podem atuar como cofatores, ligando-se à proteínas e inibindo ou ativando-as; a caracterização química de enzimas quanto a inibição ou ativação por íons é uma ferramenta para melhor entendimento do seu modo de ação (JARAMILLO, 2014). As enzimas foram incubadas com compostos iônicos numa concentração final de 1 e 10 mM, e os resultados estão apresentados na Figura 36. No caso do BNT, a menor atividade se deu com $MgCl_2$ (10 mM), de 62 % em relação ao controle, e a maior, em $CoCl_2$ (10 mM), que atingiu 152 %. Tr10 não apresentou efeitos aditivos significativos com nenhum dos compostos, mas houve inibição acentuada com $CaCl_2$, decaindo a 13 % da atividade de xilanase em relação ao controle. Tr 16 demonstrou-se estável em todos os compostos testados, com atividades variando de 88 ($CoCl_2$ 10 mM) a 105 ($MgCl_2$ 1mM) % com relação ao controle.

(a)



(b)



(c)

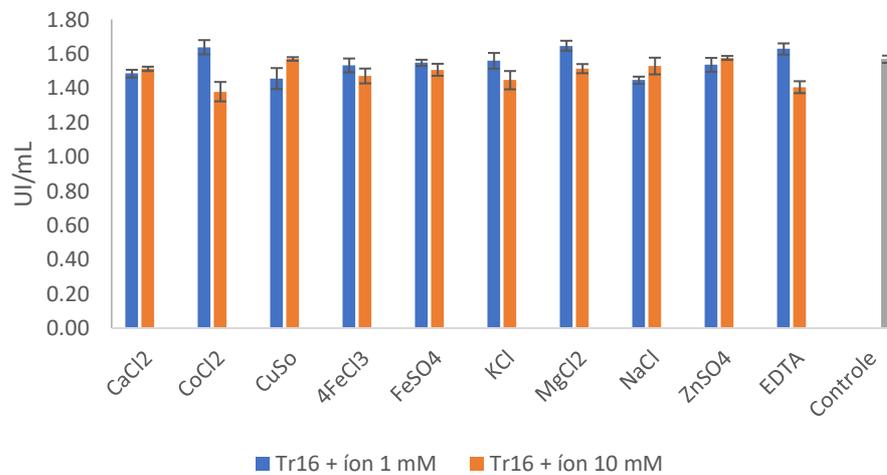


Figura 36: Atividade de xilanases das amostras BNT (a), Tr10 (b) e Tr16 (c) quando incubadas na presença de compostos iônicos a 1 e 10 mM.

A degradação de lignina (seja por ação de fungos ou de pré-tratamentos) pode provocar liberação de compostos fenólicos. Assim como íons, os fenóis podem interagir com resíduos de aminoácidos presentes nas proteínas e afetar sua estrutura secundária ou terciária, causando efeito aditivo ou inibitório em sua atividade enzimática (MOREIRA, 2013). As amostras foram testadas na presença de compostos fenólicos a 1 mg/mL, conforme as figuras **Figura 37 Error! Reference source not found.** A atividade xilanolítica de BNT foi inibida em até 50 % em relação ao controle, com ácido tânico e de Tr10 em 65% com vanilina. Tr16 teve sua atividade elevada em 34 % na presença de ácido cumárico e Tr10 em 28 % com ácido ferúlico. Tr16 destacou-se por não ter sofrido inibição na presença de nenhum dos fenóis testados.

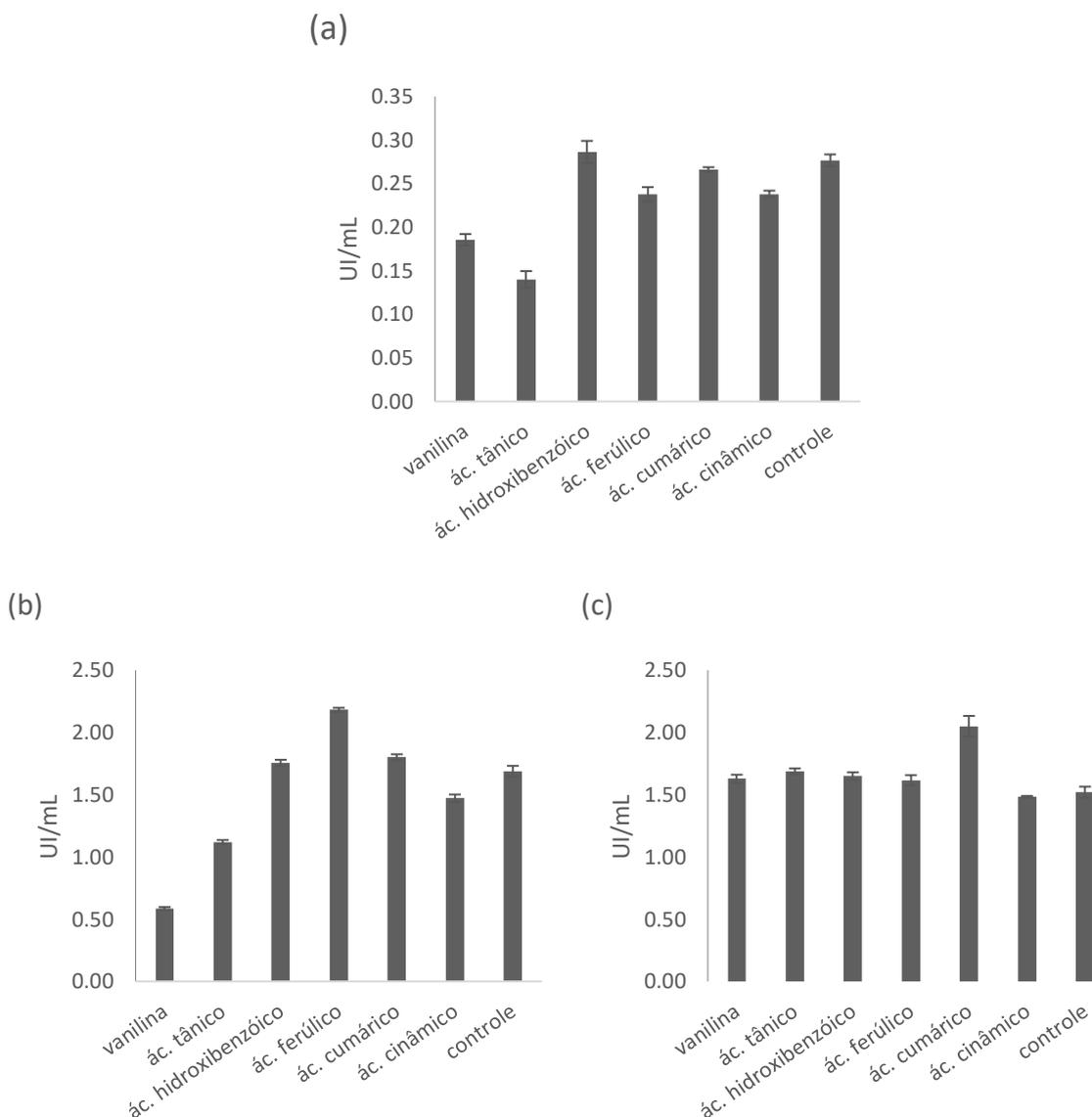


Figura 37: Atividade de xilanases em presença de diferentes compostos fenólicos a uma concentração final de 1 mg/mL. (a): BNT. (b): Tr10. (c): Tr16.

Há muitos estudos que afirmam inibição ou inativação de enzimas holocelulolíticas pela interação com compostos fenólicos, e para contornar este efeito, propõem a remoção dos fenóis antes da hidrólise da biomassa, a execução de hidrólise por períodos mais curtos, a conversão de fenóis para uma forma inativa (XIMENES et al., 2010, 2011) e até engenharia metabólica para aprimorar potenciais mecanismos de tolerância nos microorganismos (GUPTA et al., 2016). Os resultados do presente trabalho merecem destaque por possibilitarem a obtenção de uma xilanase resistente a fenóis, como a de Tr16, que pode dispensar tais estratégias, economizando energia e custos em aplicações biotecnológicas.

Não houve grandes divergências entre os 2 tratamentos aqui explorados (Tr10 e Tr16); ambos se apresentaram como candidatos razoáveis para otimizar a produção de holocelulases. Um deles utiliza mais água, e o outro, mais bagaço, então sua aplicação depende das necessidades específicas. A temperatura de 170 °C durante 30 min é considerada como um tratamento hidrotérmico brando, com pouca produção de fenóis e furfural.

5.4 ANÁLISE PROTEÔMICA

Foram identificadas 42 proteínas no secretoma de BNT, e 99 em Tr16; destas, 23 hidrolases estavam presentes nas duas amostras (Figura 38). Em BNT, 30 proteínas foram identificadas como glicosidases (EC 3.2.1.-) e 1 peptidase (EC 3.4.-). Em Tr16, foram obtidas 2 oxirredutases (EC 1.-), 3 hexose-transferases (EC 2.4.1.-), 50 hidrolases (EC 3.-) e 2 pectato-liases (EC 4.2.2.2).

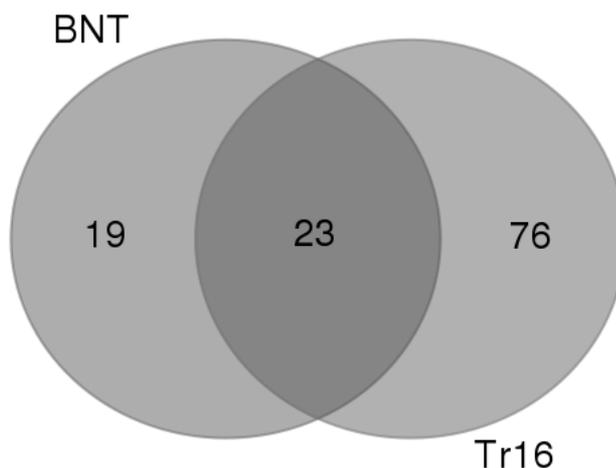


Figura 38: Diagrama de interseção das proteínas identificadas em BNT e Tr16.

Esta análise teve seu foco direcionado para as famílias de enzimas ativas sobre carboidratos, e sua distribuição nas amostras BNT e Tr16 foi esquematizada na Figura 39. As proteínas que não foram identificadas quanto à família CAZy foram classificadas como “outras”. Os dados foram detalhados nas tabelas Tabela 3 Tabela 4. Em Tr16, observa-se a presença de algumas famílias exclusivas, como AA9, PL1, GH5 e GH12. As famílias em comum nas duas amostras foram: GH3, GH10, GH11, GH7, CBM1 e GH62. As GH 7 secretadas atuam sobre celulose, GH10, 11 e 62 sobre xilana, e no caso de Tr16, as GH3 tem atividade sobre celulose e xilana. CBM1 é um fator aditivo para a eficiência catalítica das glicosil-hidrolases pois promove amorfogênese na estrutura da celulose, como mencionado no item 1.2.1. GH31 foi encontrada exclusivamente no secretoma de BNT e atua sobre oligossacarídeos; uma hipótese para explicar este resultado é que, com o pré-tratamento utilizado em Tr16, alguns polissacarídeos presentes na parede celular foram hidrolisados a monômeros, inibindo a necessidade de secreção desta família. É notável a diferença de composição de famílias entre as amostras: foram identificadas 6 famílias para BNT e 20 para Tr16. Mas não houve muita variação do número de enzimas que atuam sobre xilana entre os tratamentos: 18 em BNT, e 22 em Tr16. Já para as enzimas que atuam sobre celulose, foram

identificadas 10 em BNT e 23 em Tr16. Também foram encontradas mais pectinases, peptidases e lipases em Tr16.

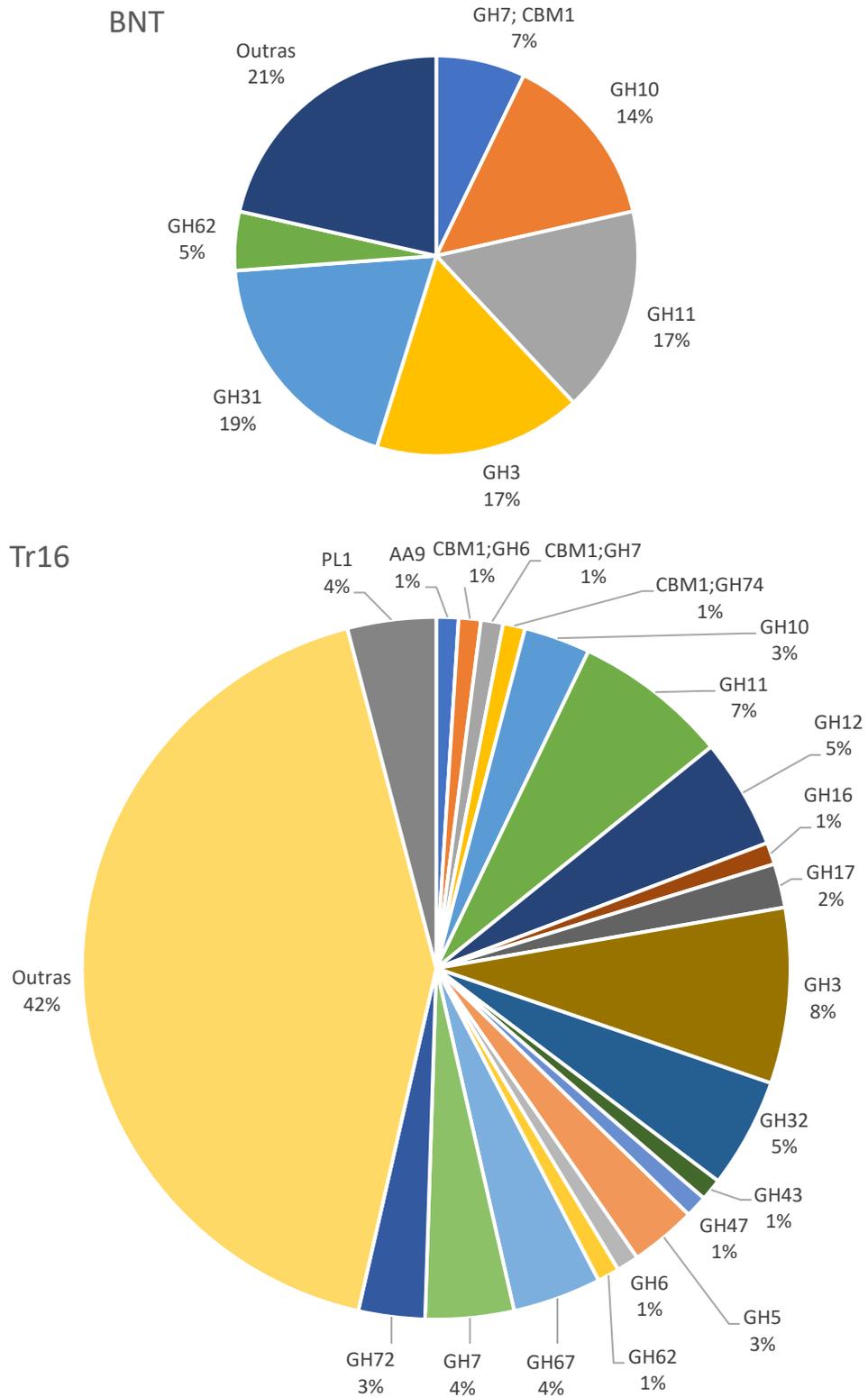


Figura 39: Distribuição das enzimas identificadas em BNT e Tr16 por família e presença de módulo de ligação a carboidrato (CBM).

As celulasas provavelmente tiveram sua secreção diversificada devido à menor recalcitrância no bagaço pré-tratado hidrotérmicamente, o que proporcionou acesso a uma maior variedade de polissacarídeos presentes na parede celular e induziu à secreção destas enzimas. A presença de peptídeo sinal para endereçamento de proteínas é comum nas moléculas secretadas, e em BNT, 35 das proteínas possuíam sequência correspondente à sinalização para secreção. Algumas das proteínas não identificadas possivelmente correspondem a fragmentos peptídicos ou a proteínas que não constavam na base de dados. Como foi indicado no item 5.1, a amostra DEAE1 continha 2 xilanases semi-puras com massa molecular diferente, entre 30 e 45 kDa e entre 20,1 e 30 kDa. Possivelmente a primeira corresponde a alguma das proteínas com atividade de xilanase da família GH10 obtida em BNT (34-36 kDa), e a segunda, da família GH11 (22-25 kDa).

A maioria das proteínas identificadas em secretoma de *A. niger* desempenham papel na conversão de biomassa. Lu et al. (2010) cultivou *A. niger* em xilose e identificou 21 proteínas secretadas, entre elas, 60 % de hidrolases. Genes que codificam celulasas e xilanases são positivamente regulados por xilose e XlnR, e reprimidos por CreA/Cre1. No bagaço de cana, arabinoxilanas, pectinas e glicanas são acessíveis e ficam rapidamente disponíveis para o fungo pela ação de α -arabinofuranosidases. Borin et al. (2015) confirmou a presença de α -amilases da família GH13 em diversos estudos do secretoma de *A. niger*, mas em BNT esta família não foi identificada. Esta análise demonstrou a expressão diferencial de proteínas modulada pela aplicação de tratamento hidrotérmico na fonte de carbono. A modulação é uma ferramenta para a produção de coquetéis enzimáticos sob medida, visando expressar o potencial genético de uma linhagem fúngica selvagem (COLOGNA et al., 2018).

Tabela 3: Proteínas identificadas por análise proteômica qualitativa de BNT.

Família Cazy	Nome da Proteína	Massa (kDa)	Tipo de molécula em que atua	Código de Acesso - UniProt	Atividade Catalítica	Presença de Peptídeo Sinal
CBM1;GH7;	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B (EC 3.2.1.91) (Beta-glucan cellobiohydrolase B) (Exocellobiohydrolase B) (Exoglucanase B)	56,219	Celulose	Q9UVS8	Hydrolysis of (1->4)-beta-D-glucosidic linkages in cellulose and cellotetraose, releasing cellobiose from the non-reducing ends of the chains.	Sim
	Glucanase (EC 3.2.1.-)	56,279	Celulose	A0A0F7LG82	(vazio)	Sim
	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B (EC 3.2.1.91) (Beta-glucan cellobiohydrolase B) (Exocellobiohydrolase B) (Exoglucanase B)	56,205	Celulose	A2QAI7	Hydrolysis of (1->4)-beta-D-glucosidic linkages in cellulose and cellotetraose, releasing cellobiose from the non-reducing ends of the chains.	Sim
GH10;	Beta-xylanase (EC 3.2.1.8)	34,930	Xilana	A0A0S2CWJ5	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
		35,059	Xilana	A0A100I6F6	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
		35,486	Xilana	A0A060IU57	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
				G3Y866	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
	Beta-xylanase (EC 3.2.1.8) (Fragment)	34,163	Xilana	U6C0R7	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Não

	Probable endo-1,4-beta-xylanase C (Xylanase C) (EC 3.2.1.8) (1,4-beta-D-xylan xylanohydrolase C)	35,486	Xilana	A2QFV7	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
GH11;	Endo-1,4-beta-xylanase (EC 3.2.1.8)	24,057	Xilana	G3XTQ6	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
				I3QKR9	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
		24,127	Xilana	F5CI28	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
				Q6QA21	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
	Endo-1,4-beta-xylanase (EC 3.2.1.8) (Fragment)	22,627	Xilana	U6C0N2	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Não
	Endo-1,4-beta-xylanase B (Xylanase B) (EC 3.2.1.8) (1,4-beta-D-xylan xylanohydrolase B) (Endo-1,4-beta-xylanase G1) (Xylanase G1) (Endo-1,4-beta-xylanase II) (Xylanase II)	24,057	Xilana	P55330	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
	Probable endo-1,4-beta-xylanase B (Xylanase B) (EC 3.2.1.8) (1,4-beta-D-xylan xylanohydrolase B) (Endo-1,4-beta-xylanase G1) (Xylanase G1)	24,057	Xilana	A2Q7I0	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
GH3;	Beta-glucosidase (EC 3.2.1.21)	93,243	Celulose	COM0K9	Hydrolysis of terminal, non-reducing beta-D-glucosyl	Sim

					residues with release of beta-D-glucose.	
		93,272	Celulose	B0YIR9	Hydrolysis of terminal, non-reducing beta-D-glucosyl residues with release of beta-D-glucose.	Sim
		93,285	Celulose	G3YDY8	Hydrolysis of terminal, non-reducing beta-D-glucosyl residues with release of beta-D-glucose.	Sim
		93,299	Celulose	C7C4Z9	Hydrolysis of terminal, non-reducing beta-D-glucosyl residues with release of beta-D-glucose.	Sim
		93,303	Celulose	A0A075EKG1	Hydrolysis of terminal, non-reducing beta-D-glucosyl residues with release of beta-D-glucose.	Sim
		93,347	Celulose	C9E8N1	Hydrolysis of terminal, non-reducing beta-D-glucosyl residues with release of beta-D-glucose.	Sim
	Probable beta-glucosidase M (EC 3.2.1.21) (Beta-D-glucoside	82,116	Celulose	A5ABF5	Hydrolysis of terminal, non-reducing beta-D-glucosyl	Sim

	glucohydrolase M) (Cellobiase M) (Gentiobiase M)				residues with release of beta-D-glucose.	
GH31;	A-glicosidase (Alpha-glicosidase) (EC 3.2.1.20) (Glycosyl hydrolases family 31 family protein)	108,913	Alfa-glicosídeos	A0PCH8		Sim
	Alpha-glicosidase	108,897	Alfa-glicosídeos	A0A0A1E2X6		Sim
	Alpha-glicosidase (EC 3.2.1.20) (Maltase)	108,913	Maltooligossacarídeos	P56526	Hydrolysis of terminal, non-reducing (1->4)-linked alpha-D-glucose residues with release of alpha-D-glucose.	Sim
	Aspergillus niger contig An01c0330, genomic contig (EC 3.2.1.-)	96,935	Celbiose	A2QAC1		Não
	Extracellular alpha-glicosidase	108,828	Alfa-glicosídeos	A0A117DZ97		Sim
	Extracellular alpha-glicosidase agIU-Aspergillus niger (EC 3.2.1.20)	108,913	Alfa-glicosídeos	A2QJF7		Sim
	Uncharacterized protein	108,913	Glicosídeos	G3Y9N1		Sim
	Uncharacterized protein (Fragment)	88,884	Glicosídeos	G3XQP1		Não
GH62;	Alpha-L-arabinofuranosidase axhA (EC 3.2.1.55) (Arabinoxylan arabinofuranohydrolase axhA)	35,837	Xilana	P79019	Hydrolysis of terminal non-reducing alpha-L-arabinofuranoside residues in alpha-L-arabinosides.	Sim
	Probable alpha-L-arabinofuranosidase axhA (EC 3.2.1.55) (Arabinoxylan arabinofuranohydrolase axhA)	35,837	Xilana	A2QFV9	Hydrolysis of terminal non-reducing alpha-L-	Sim

					arabinofuranoside residues in alpha-L-arabinosides.	
Indeterminada	Alpha-L-arabinofuranosidase	35,839	Xilana	A0A060IP77		Sim
	Arabinofuranosidase AxA	35,851	Xilana	A0A0S2CW01		Não
	Beta-glicosidase (EC 3.2.1.21)	82,044	Glicosídeos	A0A1B1QDA2		Sim
	Uncharacterized protein	35,837	Xilana	G3Y867		Não
	.Uncharacterized protein (Fragment)	82,044	Glicosídeos	G3YBE0		Sim
	Aspergillus niger contig An02c0330, genomic contig	86,208		A2QEK4		Não
	Endoprotease Endo-Pro-Aspergillus niger	58,706	Proteína	A2QR21		Sim
	S28 peptidase (EC 3.4.-.-) (Fragment)	58,706	Peptídeos	G3YH60		Sim
	Uncharacterized protein	22,500		G3Y6V8		Sim

Tabela 4: Proteínas identificadas por análise proteômica qualitativa de Tr16.

Família Cazy	Nome da Proteína	Massa (kDa)	Tipo de molécula em que atua	Código de Acesso UniProt	Atividade Catalítica	Contém Peptídeo Sinal
AA9;	Aspergillus niger contig An12c0130, genomic contig	29,396	-	A2QZE1	-	Sim
CBM1;GH6;	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase C (EC 3.2.1.91) (Beta-glucan cellobiohydrolase C) (Exocellobiohydrolase C) (Exoglucanase C)	48,126	Celulose	A2QYR9	Hydrolysis of (1->4)-beta-D-glucosidic linkages in cellulose and cellotetraose, releasing cellobiose from the non-reducing ends of the chains.	Sim
CBM1;GH7;	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B (EC 3.2.1.91) (Beta-glucan cellobiohydrolase B) (Exocellobiohydrolase B) (Exoglucanase B)	56,219	Celulose	Q9UVS8	Hydrolysis of (1->4)-beta-D-glucosidic linkages in cellulose and cellotetraose, releasing cellobiose from the non-reducing ends of the chains.	Sim
CBM1;GH74;	Aspergillus niger contig An01c0070, genomic contig	90,969	Celulose	A2Q7T5	-	Sim
GH10;	Beta-xylanase (EC 3.2.1.8)	35,059	Xilana	A0A100I6F6	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
		35,486	Xilana	G3Y866	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
	Probable endo-1,4-beta-xylanase C (Xylanase C) (EC 3.2.1.8) (1,4-beta-D-xylan xylanohydrolase C)	35,486	Xilana	A2QFV7	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim

GH11;	Endo-1,4-beta-xylanase (EC 3.2.1.8)	24,057	Xilana	G3XTQ6	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
				I3QKR9	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
		24,127	Xilana	F5CI28	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
				Q6QA21	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
	Endo-1,4-beta-xylanase (EC 3.2.1.8) (Fragment)	22,627	Xilana	U6C0N2	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Não
	Endo-1,4-beta-xylanase B (Xylanase B) (EC 3.2.1.8) (1,4-beta-D-xylan xylanohydrolase B) (Endo-1,4-beta-xylanase G1) (Xylanase G1) (Endo-1,4-beta-xylanase II) (Xylanase II)	24,057	Xilana	P55330	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
	Probable endo-1,4-beta-xylanase B (Xylanase B) (EC 3.2.1.8) (1,4-beta-D-xylan xylanohydrolase B) (Endo-1,4-beta-xylanase G1) (Xylanase G1)	24,057	Xilana	A2Q7I0	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D-xylosidic linkages in xylans.	Sim
GH12;	Endoglucanase	25,801	Celulose	D3YNY2	-	Sim
	Endoglucanase (Endoglucanase A) (EC 3.2.1.4) (Glycosyl hydrolase family 12 family protein)	25,859	Celulose	O74705	-	Sim
	Endoglucanase A (Fragment)	25,718	Celulose	D3YC02	-	Sim

	Endoglucanase A eglA-Aspergillus niger (EC 3.2.1.4)	25,873	Celulose	A2R322	-	Sim
	Uncharacterized protein	25,859	Celulose	G3XPD3	-	Sim
GH16;	Aspergillus niger contig An01c0330, genomic contig	39,887	Glicosídeos	A2QAC9	-	Sim
GH17;	Aspergillus niger contig An08c0100, genomic contig	32,092	Glicosídeos	A2QQS9	-	Sim
	Uncharacterized protein	32,092	Glicosídeos	G3YGS6	-	Sim
GH3;	Aspergillus niger contig An17c0020, genomic contig (EC 3.2.1.-)	88,034	Glicosídeos	A2R967	-	Sim
	Beta-glucosidase (EC 3.2.1.21)	92,630	Celulose	G3YD55	Hydrolysis of terminal, non-reducing beta-D-glucosyl residues with release of beta-D-glucose.	Sim
		93,243	Celulose	C0M0K9	Hydrolysis of terminal, non-reducing beta-D-glucosyl residues with release of beta-D-glucose.	Sim
		93,272	Celulose	B0YIR9	Hydrolysis of terminal, non-reducing beta-D-glucosyl residues with release of beta-D-glucose.	Sim
		93,299	Celulose	C7C4Z9	Hydrolysis of terminal, non-reducing beta-D-glucosyl residues with release of beta-D-glucose.	Sim

	Exo-1,4-beta-xylosidase xInD (EC 3.2.1.37) (1,4-beta-D-xylan xylohydrolase xInD) (Beta-xylosidase A) (Beta-xylosidase xInD) (Xylobiase xInD)	87,211	Xilana	O00089	Hydrolysis of (1->4)-beta-D-xylans, to remove successive D-xylose residues from the non-reducing termini.	Sim
	Probable beta-glucosidase M (EC 3.2.1.21) (Beta-D-glucoside glucohydrolase M) (Cellobiase M) (Gentiobiase M)	82,116	Celulose	A5ABF5	Hydrolysis of terminal, non-reducing beta-D-glucosyl residues with release of beta-D-glucose.	Sim
	Probable exo-1,4-beta-xylosidase xInD (EC 3.2.1.37) (1,4-beta-D-xylan xylohydrolase xInD) (Beta-xylosidase A) (Beta-xylosidase xInD) (Xylobiase xInD)	87,211	Xilana	A2QA27	Hydrolysis of (1->4)-beta-D-xylans, to remove successive D-xylose residues from the non-reducing termini.	Sim
GH32;	Beta-glucosidase (EC 3.2.1.21)	136,909	Celulose	A0A100IJJ3	Hydrolysis of terminal, non-reducing beta-D-glucosyl residues with release of beta-D-glucose.	Não
	Exoinulinase	59,134	Glicosídeos	Q6S3E2	-	Sim
	Extracellular exo-inulinase inuE (EC 3.2.1.80)	59,143	Frutana	Q76HP6	Hydrolysis of terminal, non-reducing (2->1)- and (2->6)-linked beta-D-fructofuranose residues in fructans.	Sim
		59,150	Frutana	A2R0E0	Hydrolysis of terminal, non-reducing (2->1)- and (2->6)-linked beta-D-fructofuranose residues in fructans.	Sim

	Inulinase (EC 3.2.1.80)	59,150	Frutana	G3XWA9	-	Sim
GH43;	Aspergillus niger contig An08c0060, genomic contig (EC 3.2.1.37)	71,092	Xilana	A2QQB3	-	Sim
GH47;	Probable mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase 1B (EC 3.2.1.113) (Class I alpha-mannosidase 1B) (Man(9)- alpha-mannosidase 1B)	55,929	Manosídeos	A2QAS2	Hydrolysis of the terminal (1->2)- linked alpha-D-mannose residues in the oligo-mannose oligosaccharide Man(9)(GlcNAc)(2).	Sim
GH5;	Endo-beta-1,4-glucanase B (Endoglucanase B) (EC 3.2.1.4) (Carboxymethylcellulase B) (Cellulase B)	36,559	Celulose	O74706	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D- glucosidic linkages in cellulose, lichenin and cereal beta-D- glucans.	Sim
	Probable endo-beta-1,4-glucanase B (Endoglucanase B) (EC 3.2.1.4) (Carboxymethylcellulase B) (Cellulase B)	36,559	Celulose	A2QPC3	Endohydrolysis of (1->4)-beta-D- glucosidic linkages in cellulose, lichenin and cereal beta-D- glucans.	Sim
	Uncharacterized protein	36,559	Glicosídeos	G3XZI3	-	Sim
GH6;	Glucanase (EC 3.2.1.-)	42,142	Glicosídeos	A2QQ99	-	Sim
GH62;	Alpha-L-arabinofuranosidase axhA (EC 3.2.1.55) (Arabinoxylan arabinofuranohydrolase axhA)	35,837	Xilana	P79019	Hydrolysis of terminal non- reducing alpha-L- arabinofuranoside residues in alpha-L-arabinosides.	Sim

GH67;	Alpha-glucuronidase (EC 3.2.1.139)	93,760	Xilana	A0A0N7HI10	An alpha-D-glucuronoside + H(2)O = an alcohol + D-glucuronate.	Sim
		93,950	Xilana	G3XNR5	An alpha-D-glucuronoside + H(2)O = an alcohol + D-glucuronate.	Sim
	Probable alpha-glucuronidase A (EC 3.2.1.139) (Alpha-glucosiduronase A)	93,732	Xilana	A2R3X3	An alpha-D-glucuronoside + H(2)O = an alcohol + D-glucuronate.	Sim
		93,950	Xilana	Q96WX9	An alpha-D-glucuronoside + H(2)O = an alcohol + D-glucuronate.	Sim
GH7;	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A (EC 3.2.1.91) (Beta-glucan cellobiohydrolase A) (Cellobiohydrolase D) (Exocellobiohydrolase A) (Exoglucanase A)	48,258	Celulose	Q9UVS9	Hydrolysis of (1->4)-beta-D-glucosidic linkages in cellulose and cellotetraose, releasing cellobiose from the non-reducing ends of the chains.	Sim
	Glucanase (EC 3.2.1.-)	145,038	Celulose	A0A100I8W6	-	Sim
		56,279	Celulose	A0A0F7LG82	-	Sim

	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B (EC 3.2.1.91) (Beta-glucan cellobiohydrolase B) (Exocellobiohydrolase B) (Exoglucanase B)	56,205	Celulose	A2QAI7	Hydrolysis of (1->4)-beta-D-glucosidic linkages in cellulose and cellotetraose, releasing cellobiose from the non-reducing ends of the chains.	Sim
GH72;	1,3-beta-glucanosyltransferase (EC 2.4.1.-)	48,466	Glicosídeos	A2QUZ1	-	Sim
				G3Y439	-	Sim
		48,527	Glicosídeos	A0A100IUF3	-	Sim
PL1;	Pectate lyase	34,375	Pectina	A0A124BYG9	-	Sim
	Pectate lyase A (EC 4.2.2.2)	34,369	Pectina	Q9C2Z0	Eliminative cleavage of (1->4)-alpha-D-galacturonan to give oligosaccharides with 4-deoxy-alpha-D-galact-4-enuronosyl groups at their non-reducing ends.	Sim
	Probable pectate lyase A (EC 4.2.2.2)	34,323	Pectina	A2QV36	Eliminative cleavage of (1->4)-alpha-D-galacturonan to give oligosaccharides with 4-deoxy-alpha-D-galact-4-enuronosyl groups at their non-reducing ends.	Sim
	Uncharacterized protein	34,369	-	G3Y478	-	Sim
	Alpha-L-arabinofuranosidase	35,839	Xilana	A0A060IP77	-	Sim
	Arabinofuranosidase AxhA	35,851	Xilana	A0A0S2CW01	-	Não

Aspergillus niger contig An03c0020, genomic contig (EC 1.5.3.6)	54,709	-	A2QFR3	-	Sim
Aspergillus niger contig An04c0260, genomic contig	17,132	-	A2QJT0	-	Sim
Aspergillus niger contig An07c0310, genomic contig	35,089	-	A2QPC2	-	Não
Aspergillus niger contig An11c0150, genomic contig	61,291	-	A2QW39	-	Sim
Aspergillus niger contig An14c0100, genomic contig	28,275	-	A2R2V6	-	Sim
	65,699	Peptídeos; Íons metálicos	A2R2Z3	-	Sim
Beta-glucosidase (EC 3.2.1.21)	82,044	Glicosídeos	A0A1B1QDA2	-	Sim
Carboxypeptidase (EC 3.4.16.-)	61,210	Peptídeos	G3Y6Y3	-	Sim
	61,297	Peptídeos	A2R906	-	Sim
Cell wall biogenesis protein	28,275	-	G3XP39	-	Sim
Cell wall protein	27,929	-	A0A100IKJ6	-	Sim
Cell wall protein (CwpA)	28,259	-	Q5DR86	-	Sim
Cell wall protein PhiA	19,395	-	A0A124BXN4	-	Sim
Cell wall protein phiA (Phialide development protein A)	19,180	-	A2R2S8	-	Sim
Endo-1,4-beta-glucanase	29,161	Glicosídeos	A0A100IQ43	-	Sim
FAD/FMN-containing dehydrogenase	61,279	-	G3YCM1	-	Sim
Ferulic acid esterase A	30,525	Lipídeos	A0A1P8SNQ7	-	Sim

	Feruloyl esterase A (EC 3.1.1.73) (Cinnamoyl esterase) (FAE-III) (Ferulic acid esterase A)	30,537	Celulose; Lipídeos; Pectina	O42807	Feruloyl-polysaccharide + H(2)O = ferulate + polysaccharide.	Sim
	Ferulylesterase A (Lipase (Class 3) family protein)	30,550	Lipídeos	A0A0S2CVZ1	-	Sim
	Gamma-glutamyltranspeptidase	141,400	-	A0A100IT64	(vazio)	Não
	Glucanase (EC 3.2.1.-)	42,200	Celulose	A0A100IHS6	-	Sim
		48,126	Celulose	G3XUK0	-	Sim
	Glucanase (EC 3.2.1.-) (Fragment)	43,455	Celulose	G3YGO3	-	Não
	Plasma membrane ATPase (EC 3.6.3.6)	108,925	ATP	A2QEX1	ATP + H(2)O + H(+)(In) = ADP + phosphate + H(+)(Out).	Não
				G3Y258	ATP + H(2)O + H(+)(In) = ADP + phosphate + H(+)(Out).	Não
	Probable feruloyl esterase A (EC 3.1.1.73) (Ferulic acid esterase A)	30,550	Xilana; Lipídeos	A2QSY5	Feruloyl-polysaccharide + H(2)O = ferulate + polysaccharide.	Sim
	Putative beta-xylosidase (Fragment)	84,231	Xilana	A0A1V1G264	-	Sim
	Sulphydryl oxidase Sox from patent EP565172-A1-Aspergillus niger (EC 1.-.-)	43,499	-	A2QUK3	-	Sim
	Tripeptidyl peptidase	65,798	-	G3XP67	-	Sim
	Uncharacterized protein	17,132	-	G3YA88	-	Sim
		29,396	-	G3XVI2	-	Sim
		30,550	Lipídeos	G3XLZ4	-	Sim
		35,837	Xilana	G3Y867	-	Não

		41,066	-	G3YA28	-	Sim
		43,499	-	G3XLN0	-	Sim
		54,649	-	G3Y833	-	Sim
		85,873	Glicosídeos	G3Y4D3	-	Sim
	Uncharacterized protein (Fragment)	19,100	-	G3XNW4	-	Sim
		30,916	Glicosídeos	G3XQP9	-	Sim
		82,044	Glicosídeos	G3YBE0	-	Sim

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, foi possível concluir que:

- Os tratamentos hidrotérmicos utilizados neste estudo afetaram positivamente a produção de holocelulases por *A. niger*;
- Foi possível selecionar tratamentos que otimizam a produção de xilanases;
- Foi possível verificar alterações na morfologia do bagaço de cana de açúcar pelo tratamento hidrotérmico, atribuídas à diminuição na recalcitrância do material;
- Foi possível obter uma amostra semi-pura de xilanase com 2 etapas de purificação, mas para obter uma amostra pura seriam necessários mais estudos;
- As xilanases produzidas pelo isolado DCFS11 possuem características favoráveis para utilização na indústria, ao considerar sua atividade em condições muito variadas de temperatura e pH, retenção de atividade mesmo após incubação durante períodos prolongados a 40 °C, e resistência a efeitos inibitórios pela presença de íons, EDTA e compostos fenólicos, com destaque para a amostra Tr16 obtida pelo tratamento hidrotérmico;

7 PERSPECTIVAS

As perspectivas para melhor elucidar as descobertas desta pesquisa são descritas abaixo, como sugestões para pesquisas futuras:

- Estudar a produção de holocelulases usando o bagaço pré-tratado combinado ao licor resultante do tratamento como fonte de carbono para cultivo do fungo;
- Testar a produção de holocelulases em maior escala (processos fermentativos);
- Investigar a produção enzimática ao inocular o fungo em bagaço pré-tratado por fermentação no estado sólido;
- Introduzir modificações genéticas em *Aspergillus niger* para aumentar produção de xilanases em cultivo utilizando o bagaço pré-tratado como fonte de carbono;
- Utilizar o extrato bruto ou a xilanase semi-pura como suplemento de coquetéis enzimáticos;
- Investigar as proteínas não-caracterizadas encontradas no extrato bruto de Tr16 pelo seu potencial hidrolítico.

8 REFERÊNCIAS

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. **Microbial enzymes: tools for biotechnological processes***Biomolecules*, 2014.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.
- ARANTES, V. et al. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 4, 2010.
- BAIROCH, A. The ENZYME database in 2000. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 304–305, 2000.
- BIZ, A. et al. Pectinase activity determination: An early deceleration in the release of reducing sugars throws a spanner in the works! **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.
- BORIN, G. P. et al. Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–20, 2015.
- BORIN, G. P. et al. Comparative transcriptome analysis reveals different strategies for degradation of steam-exploded sugarcane bagasse by *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–21, 2017.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRANDL, J.; ANDERSEN, M. R. *Aspergilli: Models for Systems Biology in Filamentous Fungi*. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 6, p. 67–73, 2017.
- BRIENZO, M. et al. Characterization of anatomy, lignin distribution, and response to pretreatments of sugarcane culm node and internode. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 305–313, 2016.
- BROWN, N. A.; RIES, L. N. A.; GOLDMAN, G. H. How nutritional status signalling coordinates metabolism and lignocellulolytic enzyme secretion. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 48–63, 2014.
- CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, E. Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 62–89, 2011.

- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, 2005.
- COLOGNA, N. DE M. DI et al. Exploring Trichoderma and Aspergillus secretomes: Proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 109, n. August 2017, p. 1–10, 2018.
- COSGROVE, D. J. Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly Daniel. **Current opinion on plant biology**, v. December, n. 22, p. 122–131, 2014.
- COSGROVE, D. J. Plant cell wall extensibility: Connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 2, p. 463–476, 2016.
- CRIVELANTE HORTA, M. A. et al. Network of proteins, enzymes and genes linked to biomass degradation shared by Trichoderma species. n. January, 2018.
- CROWELL, A. M. J.; WALL, M. J.; DOUCETTE, A. A. Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. **Analytica Chimica Acta**, v. 796, p. 48–54, 2013.
- DE SOUZA, A. P. et al. Sugarcane as a Bioenergy Source: History, Performance, and Perspectives for Second-Generation Bioethanol. **Bioenergy Research**, v. 7, p. 24–35, 2014.
- DHAWAN, S.; KAUR, J. **Microbial mannanases: An overview of production and applications** **Critical Reviews in Biotechnology**, 2007.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. DE. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2a Edição ed. Caxias do Sul - RS: EDUCS, 2010.
- EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 8a. ed. Rio de Janeiro: Grupo Editorial Nacional; Editora Guanabara Koogan, 2014.
- FILHO, E. X. F.; PULS, J.; COUGHLAN, M. P. Biochemical characteristics of two endo-beta-1,4-xylanases produced by Penicillium capsulatum. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 11, p. 171–180, 1993.
- FLANNIGAN, B. (BRIAN); SAMSON, R. A.; MILLER, J. D. (J. D. **Microorganisms in home and indoor work environments : diversity, health impacts, investigation and control**. [s.l: s.n.]. v. 31
- FREIRE, L.; ISHII, L. Xilanases : Principais Metodologias e Parâmetros Cinéticos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. May, p. 7–15, 2011.
- GEISER, D. M. et al. The current status of species recognition and identification in Aspergillus. **Studies in Mycology**. 2007.
- GHOOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, n.

2, p. 257–268, 1987.

GRANDVIEW. Enzymes Market By Type (Industrial, Specialty), By Product (Carbohydrases, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases), By Application (Food & Beverages, Detergents, Animal Feed, Textile, Paper & Pulp, Nutraceutical, Personal Care & Cosmetics, Wastewater. San Francisco: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>>.

GUPTA, V. K. et al. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 7, p. 633–645, 2016.

GUPTA, V. K. et al. (EDS.). **Microbial Applications - Recent Advancements and Future Developments**. Berlin: Walter de Gruyter GmbH, 2017.

HASUNUMA, T. et al. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 513–522, 2013.

HE, H. et al. Purification and Characterization of a Thermostable Hypothetical Xylanase from *Aspergillus oryzae* HML366. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 6, p. 3148–3161, 2015.

HEINEN, P. R. et al. GH11 xylanase from *Aspergillus tamarii* Kita: Purification by one-step chromatography and xylooligosaccharides hydrolysis monitored in real-time by mass spectrometry. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 291–299, 2018.

HUANG, Y.-B.; FU, Y. Hydrolysis of cellulose to glucose by solid acid catalysts. **Green Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 1095, 2013.

JARAMILLO, P. M. D. Produção, Caracterização e Aplicação Biotecnológica de Pectinases produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* cultivado em casca de maracujá-amarelo. Universidade de Brasília, 2014.

KUBICEK, C. P.; STARR, T. L.; GLASS, N. L. Plant Cell Wall–Degrading Enzymes and Their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, n. 1, p. 427–451, 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LE, L. et al. Bioleaching nickel laterite ores using multi-metal tolerant *Aspergillus foetidus* organism. **Minerals Engineering**, v. 19, n. 12, p. 1259–1265, 2006.

LI, X. et al. Characteristics of corn stover pretreated with liquid hot water and fed-batch semi-simultaneous saccharification and fermentation for bioethanol production. **PLoS ONE**, v. 9, n.

4, 2014.

LIEPMAN, A. H. et al. Functional Genomic Analysis Supports Conservation of Function Among Cellulose Synthase-Like A Gene Family Members and Suggests Diverse Roles of Mannans in Plants. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 143, n. 4, p. 1881–1893, 2007.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, 2014.

LU, X. et al. The intra- and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. **Microbial Cell Factories**, v. 9, p. 1–13, 2010.

MAIA, L. C. et al. Diversity of brazilian fungi. **Rodriguesia**, v. 66, n. 4, p. 1033–1045, 2015.

MAIA, L. C.; CARVALHO JUNIOR, A. A. Os fungos do Brasil. **Catalogo de plantas e fungos do Brasil**, v. 1, p. 43–48, 2010.

MCCANN, M. C.; CARPITA, N. C. Biomass recalcitrance: A multi-scale, multi-factor, and conversion-specific property. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 14, p. 4109–4118, 2015.

MENEZES, C. et al. A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. **Current Biology**, v. 25, n. 21, p. 2851–2855, 2015.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MONCLARO, A. V.; FILHO, E. X. F. Fungal lytic polysaccharide monooxygenases from family AA9: Recent developments and application in lignocelullose breakdown. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

MOREIRA, L. R. D. S. Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus*: Caracterização, degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos. Universidade de Brasília - UnB, 2013.

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2008.

NAIR, S. G.; SINDHU, R.; SHASHIDHAR, S. Purification and biochemical characterization of two xylanases from *Aspergillus sydowii* SBS 45. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 149, n. 3, p. 229–243, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6th. ed. New York: Freeman, 2013.

NIELSEN, K. F. et al. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 5, p. 1225–1242, 2009.

NUNES, R. DE M. et al. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113–123, 2013.

OBENG, E. M. et al. Lignocellulases: a review of emerging and developing enzymes, systems, and practices. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 16, 2017.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, 2004.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

PRASENJIT, B.; SUMATHI, S. Uptake of chromium by *Aspergillus foetidus*. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 7, n. 2, p. 88–92, 2005.

RIBEIRO, D. A. et al. The *Penicillium echinulatum* Secretome on Sugar Cane Bagasse. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

ROKAS, A. *Aspergillus*. **Current Biology**, v. 23, n. 5, p. R187–R188, 2013.

ROLPH, G. M. **Something about sugar: Its history, growth, manufacture and distribution**. San Francisco: John J. Newbegin, 1917.

SÁ-PEREIRA, P. et al. A new look at xylanases. **Molecular biotechnology**, v. 24, n. July 2016, p. 256–281, 2003.

SANJIVKUMAR, M. et al. Biosynthesis, purification and characterization of β -1,4-xylanase from a novel mangrove associated actinobacterium *Streptomyces olivaceus* (MSU3) and its applications. **Protein Expression and Purification**, v. 130, p. 1–12, 2017.

SANT'ANNA, C.; SOUZA, W. DE. Microscopy as a tool to follow deconstruction of lignocellulosic biomass. **Current Microscopy Contributions to Advanced in Science and Technology**, p. 639–645, 2012.

SCHUSTER, E. et al. On the safety of *Aspergillus niger* - A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 4–5, p. 426–435, 2002.

SILVA, C. O. DE G. *Emericella nidulans* E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR : FERRAMENTAS PARA PRODUÇÃO DE ENDO- β -1 , 4-. [s.l.] Universidade de Brasília, 2014.

SILVA, C. O. DE G. Tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar como ferramenta para aumentar a produção de holocelulases por *Aspergillus niger*. [s.l.] Universidade de Brasília Departamento, 2018.

SILVA, C. O. G. et al. Sugarcane Bagasse Hydrothermal Pretreatment Liquors as Suitable Carbon Sources for Hemicellulase Production by *Aspergillus niger*. **Bioenergy Research**, 2018.

- SILVA, C. O. G.; VAZ, R. P.; FILHO, E. X. F. Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, p. 1–13, 2017.
- SIQUEIRA, F. G. DE; FILHO, E. X. F. Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 7, n. June 2017, p. 54–60, 2010.
- SPERANDIO, G. B. Estudos dos perfis enzimáticos de *Trichoderma reesei* RutC30 e 9414 em co-culturas com fungos do gênero *Aspergillus* e *Phanerochaete*. [s.l: s.n.].
- SRIAMORNSAK, P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review. **Silpakorn University International Journal**, v. 3, n. 1–2, p. 207–228, 2003.
- SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49–58, 2016.
- TAVARES, E. Q. P.; BUCKERIDGE, M. S. Do plant cell walls have a code? **Plant Science**, v. 241, p. 286–294, 2015.
- TEJIRIAN, A.; XU, F. Inhibition of cellulase-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 23, p. 7673–7682, 2010.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10a. ed. Porto Alegre: [s.n.].
- UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 388–394, 2007.
- VARGA, J. et al. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 1–17, 2011.
- XIMENES, E. et al. Enzyme and Microbial Technology Inhibition of cellulases by phenols. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, p. 170–176, 2010.
- XIMENES, E. et al. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 1, p. 54–60, 2011.
- ZHAO, H. et al. Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. **Journal of Biotechnology**, v. 139, n. 1, p. 47–54, 2009.

9 APÊNDICE

Leonora Rios de Souza Moreira, Caio de Oliveira Gorgulho Silva,
Barbara Calheiros Neumann, and Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

11 Microbial biofuel production: An overview on recent developments

11.1 Abstract

Currently, the growing energy demand together with the claiming for reduction in environmental pollution has led scientist to search for new energy sources. Ethanol presents advantages of reduction of greenhouse gases and be a renewable fuel. First generation bioethanol is a well-stabilized pathway for this fuel production which is produced mainly in Brazil and USA, from sugarcane and corn, respectively. In past decades the concern about reduction of food feedstock prompted the development of second generation bioethanol that is produced from lignocellulosic feedstock. This production utilizes microbial enzymes to hydrolyse the polysaccharides contained in biomass for subsequent fermentation. Third and four generation bioethanol is the fuel produced from aquatic microbial oxygenic photoautotrophs (AMOPs) such as algae and cyanobacterias and engineered AMOPs, respectively. They can be cultivated in areas that do not present the competition with the production of feed and food. This chapter focuses on reviewing the main advantages and challenges of bioethanol from first to fourth generation.

11.2 Introduction

The world's economy today is highly dependent on fossil energy sources (coal, oil, natural gas) which are used to produce fuels, electricity, chemicals, and other goods. As a result of increasing population, demand of energy is escalating throughout the world. Utilization of fossil energy sources in the long run is not considered to be sustainable. In this scenario, use of renewable resources is an alternative [1]. Although estimates vary, the economically recoverable fossil fuel reserves include almost 1 trillion metric tons of coal, more than 1 trillion barrels of petroleum, and over 150 trillion cubic meters of natural gas [2].

Extreme consumption of fossil fuels, especially in large urban areas has caused more pollution due to release of greenhouse gases (GHGs) especially during the last few decades. The concentration of GHGs in the biosphere has hugely increased [3-5]. According to the World Energy Council, approximately 82 % of global energy demand is provided by fossil resources such as petroleum, natural gas and coal. Transportation sector alone consumes about 60 % of the petroleum based fuel produced globally and is responsible for production of one fifth of total CO₂ emissions [6].

Incentives for mitigating global climate change further stimulate international communities to invest in development and utilization of renewable energy [5]. To reduce our dependency on fossil fuels, except for nuclear energy, the most suitable alternative to fossil fuels is renewable sources such as hydroelectric, biomass, wind, solar, geothermal heat, and marine

Figura 40: Capítulo de livro publicado durante a participação no Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular: "Microbial biofuel production: An overview on recent developments." Microbial Applications - Recent Advancements and Future Developments. Editora: Walter de Gruyter GmbH. Editores: Gupta, V. K.; Zeilinger, S.; Ferreira Filho, E. X.; Domínguez-de-Bazúa, M. C. D.; Purchase, D. 2017.