

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA ENDOGLUCANASE
DE *Botrytis ricini* URM 5627**

TATIELLE PEREIRA SILVA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió – AL

TATIELLE PEREIRA SILVA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA ENDOGLUCANASE DE
Botrytis ricini URM 5627

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano

MACEIÓ-ALAGOAS
2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

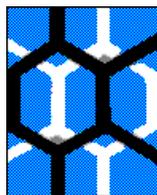
S586p Silva, Tatielle Pereira.
Purificação, caracterização e aplicação da endoglucanase de *Botrytis ricini*
URM 5627 / Tatielle Pereira Silva. – 2020.
132 f. : il., grafs., tabs. color.

Orientador: Hugo Juarez Vieira Pereira.
Co-orientador: Luiz Carlos Caetano.
Tese (doutorado em ciências) – Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em
Química e Biotecnologia. Maceió, 2020.

Inclui bibliografias.

1. Fermentação - Estado sólido. 2. Celulase - Purificação. 3. *Botrytis ricini*.
4. Biotecnologia - Indústria. I. Título.

CDU: 663.15:661.728



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
E BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões Cidade
 Universitária, Tabuleiro dos Martins 57072-
 970, Maceió-AL, Brasil
 Fone: (82) 3214-1144
 Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **TATIELLE PEREIRA SILVA** intitulada: **PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA ENDOGLUCANASE DE *Botrytis ricini* URM 5627**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 17º de julho de 2020, às 14h, por meio de videoconferência realizada através da ferramenta *Google Meet*.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira
 (Presidente da banca - Orientador – PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano
 (Coorientador- IQB/UFAL)

Prof. Dr. Francis Soares Gomes (PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Marcelo Franco
 (RENORBIO/PPGQUIM/PPGECAL)

Profa. Dra. Nadabe dos Santos Reis
 (CFTCI/UFSB)

*Dedico esse trabalho a Deus, minha família,
meu amor e meus amigos. Obrigada por me
ajudarem a tornar esse sonho realidade!*

AGRADECIMENTOS

“Sei o que é passar necessidade e sei o que é ter fartura. Aprendi o segredo de viver contente em toda e qualquer situação, seja bem alimentado, seja com fome, tendo muito, ou passando necessidade”. Tudo posso naquele que me fortalece! (Filipenses 4:12-1)

Chegar até aqui não foi fácil, mas com certeza foi gratificante, pois pude contar com o apoio de muitos e a estes vão os meus sinceros agradecimentos. Tentarei ser breve, mas esse momento vai além da obtenção de um título acadêmico, é uma história de vida repleta de lutas e vitórias.

Primeiro quero agradecer a Deus por todas as dádivas concedidas, por sempre estar ao meu lado e sendo meu refúgio nas horas de angústia. Sempre que passei por momentos difíceis, que pensei em desistir, sua palavra me dizia: Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajosa! “Não se apavore nem desanime, pois eu o Senhor, o seu Deus, estarei contigo por onde você andar” (Josué 1.9).

Aos meus avós, Abiel e Anita que sempre estiveram ao meu lado, me incentivando, apoiando, orando por mim. Hoje não tenho mais a minha Vozinha ao meu lado, mas sei o quanto ela estaria feliz, pois sempre sonhou esse sonho comigo. Serei eternamente grata e saibam que os amo incondicionalmente.

A minha mãe, Selma, a quem eu devo a vida, minha companheirinha, sei o quanto a senhora já sofreu pra eu chegasse a estudar, ter o fardamento, os livros a merenda. Saiba que todo meu esforço é para poder retribuir tudo que fez e faz por mim. Te amo minha veinha!

A Maria Cecília meu grande amorzinho que tanto me ajudou! Você trouxe alegria para minha vida. Obrigada por todas as músicas cantadas, vídeos, beijinhos, memes, brincadeiras, por ser meu mascotinho. Tia Tati te ama muito.

A minha irmã Maiane que sempre torceu por mim, me ajudando e incentivando. Obrigada por tudo! Te amo!

A meus familiares e em especial, minhas primas-irmãs, Emanuella, Priscila e Tallita que sempre alegram meus dias. Obrigada novinhas!

Aos meus sogros Zenilda e Milton e meu cunhado Ueslei, agradeço por serem tão amorosos comigo e por todo apoio de sempre! Ao meu amor, meu esposo Wilton, meu muito obrigada!! Sem o seu amor, compreensão e dedicação esse sonho não seria realizado. Contigo eu comecei a acreditar mais em mim, a ti eterna minha gratidão. Te amo!!

Aos meus professores:

- Dulce: A senhora me inspirou a querer ser professora, te admiro muito como profissional e ainda mais como pessoa. Serei eternamente grata por sempre me apoiar desde a graduação e por nunca ter me desanimado. Obrigada pelos ensinamentos e obrigada por tudo!

- Marcelo Franco: Obrigada pela oportunidade que me deu lá no 2º semestre da graduação como IC voluntária em seu laboratório e por me ensinar fazer Ciência quando eu não sabia nem o que era mestrado ou doutorado. Com o senhor aprendi a batalhar, correr, não ter vergonha de pedir ajuda ser justa e acima de tudo amar a pesquisa e ciência. Eu serei eternamente grata pela orientação no mestrado, pelo apoio durante o doutorado e por ser hoje meu amigo.

- Hugo: O que falar desse professor e cientista fantástico?? O senhor é um exemplo de professor, cientista, orientador, uma das pessoas mais inteligentes que eu conheço. Eu não tenho palavras para agradecer por todos os ensinamentos durante esses 4 anos. Eu tenho muito orgulho de ter sido sua orientanda e espero que essa parceria continue. Saiba que minha gratidão será eterna!

-Luiz Carlos: Um professor humilde, humano, gentil, inteligente e que fala sobre os mais diversos assuntos. Obrigada por ter me ajudado durante esse período professor!

-Francis: Um professor humano, responsável, inteligente, sempre presente e prestativo. Obrigada!

-Édma: Agradeço a senhora por sempre me escutar e me aconselhar nos mais diversos assuntos. Deus a abençoe!

Aos meus amigos:

-Rose: Aquela amiga que está ao meu lado mesmo na distância desde a graduação, meu grudinho, minha dupla, minha panelinha. Obrigada por todo apoio de sempre! Te amo!

-Thatiana: Minha xará que chegou para alegrar e apoiar, uma amiga que Deus me presenteou e que mesmo de longe esteve presente. Obrigada! Te amo!

-Caique: Um ex-aluno que se tornou um grande amigo. Obrigada por sua amizade e apoio de sempre!

-Alê: Eu sempre digo que você foi a resposta de minhas orações, e que o choro pode durar uma noite inteira, mas a alegria vem ao amanhecer. Já éramos amigas desde a graduação, mas durante o doutorado nos tornamos irmãs. Faltam-me palavras para agradecer por cada palavra, apoio, orações, prévias de apresentações, provas, afazeres domésticos, praias, cultos, cinema, feira, farrinhas, foram muitas emoções. AAAAlê, te agradeço por isso por tudo, saiba que peço a Deus que a abençoe muito! Te amo!

-Fabi: Minha companheira de aventuras, meu braço direito, minha figurinha. Ah Fabi, como seria difícil sem você. Obrigada por ter me apresentado a UFAL e por ter sido minha dupla. Você é uma pessoa iluminada, e saiba que onde eu estiver conte sempre comigo. Te amo!

- Beth: Obrigada pelo apoio desde o dia que pisei em Maceió pela primeira vez. Saiba que te desejo tudo de melhor!

- Cláudio: Obrigada por ter sido tão generoso, me ensinando as técnicas, me ouvindo, sendo um amigão.

-Clédson: Obrigada pelos ensinamentos e ainda mais pelas risadas maravilhosas que alegam todo lugar que você chega.

-Dávida: Obrigada por ser uma amiga e colega de trabalho tão generosa. Deus te abençoe.

- Andréa: Minha louquinha do jardim saiba que você chegou e alegrou aquele Lab., você é uma amiga maravilhosa que quero levar para a vida. Muito obrigada por tudo!

-Jana (LAMP): Obrigada pela amizade e generosidade de sempre. Vamos vencer!

-Robertinha: Obrigada pela amizade e apoio de sempre! Ainda daremos muitas risadas!

-Humberto: Te agradeço por sempre estar disposto a ajudar, obrigada pelos atendimentos médicos 0800, e por me acalmar sempre que eu me diagnosticava via google (rsrs).

- Jana (LINQA): Obrigada por ter se tornado uma grande amiga, com quem eu posso desabafar e chorar. Que Deus a abençoe com tudo de melhor dessa Terra!

-Analu: Minha companheira de shopping, de praia, de mercado e da Vida! Obrigada por tudo! Da UESC pra Vida!

Agradeço aos amigos do pensionato, Dona Teresa, Sr. Manoel, Karol, Margarida, Iara, Maria, Bruna, Maynara, Jéssica, Naara pela amizade e apoio de sempre. Vocês me apoiaram no momento em que mais precisei. Que Deus os abençoeem muuuuuuuito!!

Agradeço a todos os colegas de colaboradores do LAMP. Que Deus os abençoe!

Agradeço aos colegas e amigos do GEAR, em especial Cristian, Débora, Filipe, Geovânia, Abner, Kleiton e Thati que sempre me ajudaram e me socorreram. Que Deus os abençoe!

Agradeço aos colegas do LBM Antônio Thomás e Josiel pelo apoio de sempre!

Agradeço aos amigos do LABIOCAT. Que Deus os abençoe!

A todos os professores e demais colaboradores desse trabalho, muito obrigada!

Aos órgãos de fomento (CAPES, CNPq, FAPEAL) pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para que esse sonho fosse realizado. “Se vi mais longe foi por estar sobre os ombros de gigantes”. Com essa bela frase o físico Isaac Newton ilustrou uma característica muito importante da ciência: que ela é necessariamente uma construção coletiva.

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”

Eduardo Galeano

RESUMO

As celulasas são enzimas hidrolíticas do complexo celulolítico que clivam as ligações O-glicosídicas da celulose, sendo divididas em três grupos, de acordo com o seu local de ação no substrato celulósico: endoglucanases (EnG), que dão início a hidrólise e clivam ligações internas da fibra celulósica, na região amorfa; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose. A agricultura brasileira tem se consolidado como o grande vetor de desenvolvimento do país. Essa grande produção em consequência gera um quantitativo de resíduos que por sua vez são responsáveis por uma parcela da poluição e degradação do meio ambiente. Nesse estudo, no primeiro artigo buscou-se através da cromatografia líquida de proteínas, o isolamento de uma nova endoglucanase do fungo filamentosso *Botrytis ricini* URM 5627, em seguida foi realizado a caracterização bioquímica, quanto temperatura ótima, termoestabilidade, pH ótimo, estabilidade ao pH, efeito de sais, halotolerância, constantes cinéticas, e a enzima pura foi aplicada na sacarificação de resíduos agroindustriais. No segundo artigo observou-se os efeitos do pré-tratamento ácido e biológico na obtenção de açúcares fermentáveis. No terceiro artigo observou-se os efeitos de um planejamento estatístico Box- Behnken na otimização da sacarificação enzimática do farelo de trigo. Foi isolada uma endoglucanase halotolerante com uma massa molecular de 39 kDa foi obtida a partir da fermentação sólida do bagaço de cana-de-açúcar pelo fungo *Botrytis ricini* URM 5627. Após o isolamento procedeu-se as caracterizações bioquímicas, apresentando temperatura e pH ótimos de 50°C e 5, respectivamente. A enzima apresentou-se estável em uma faixa de 39 a 60°C por 60 min e entre os pHs 4 a 6. A atividade enzimática aumentou na presença de Na^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e diminuiu quando na presença dos íons Ca^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{2+} . A endoglucanase apresentou um perfil halotolerante, uma vez que sua atividade foi aumentada à medida que a concentração de NaCl ficava maior. A enzima foi capaz de sacarificar todos os resíduos testados. O pré-tratamento biológico utilizando o *Botrytis ricini* URM 5627 apresentou uma grande superioridade ao pré-tratamento ácido na exposição da celulose como visto nos resultados obtidos. O planejamento Box-Behnken permitiu determinar com êxito, as condições das variáveis: tempo de sacarificação, carga de substrato e carga enzimática, necessárias para a maximização da produção de açúcares redutores. Esse trabalho permitiu a obtenção de uma enzima altamente ativa e capaz de ser aplicada para obtenção de açúcares fermentáveis.

Palavras- chave: Fermentação em estado sólido. Purificação. Aplicações biotecnológicas.

ABSTRACT

Cellulases are hydrolytic enzymes of the cellulolytic complex that cleave cellulose O-glycosidic bonds, being divided into three groups, according to their site of action on the cellulosic substrate: endoglucanases (EnG), which initiate hydrolysis and cleave internal bonds cellulose fiber, in the amorphous region; exoglucanases (ExG), which act on the outer region of the cellulose; and β -glycosidases (BG), which hydrolyze glucose-soluble oligosaccharides. Brazilian agriculture has consolidated itself as the major vector of development in the country. This large production consequently generates a quantity of residues that in turn are responsible for a portion of the pollution and degradation of the environment. In this study, in the first article we sought to isolate a new endoglucanase from the filamentous fungus *Botrytis ricini* URM 5627 using liquid protein chromatography, then biochemical characterization was carried out, regarding optimal temperature, thermostability, optimum pH, pH stability, salt effect, halotolerance, kinetic constants, and the pure enzyme was applied in the saccharification of agro-industrial residues. In the second article, the effects of acid and biological pretreatment were observed in obtaining fermentable sugars. In the third article, the effects of Box-Behnken statistical planning on the optimization of enzymatic saccharification of wheat bran were observed. A halotolerant endoglucanase with a molecular mass of 39 kDa was isolated. It was obtained from the solid fermentation of the sugarcane bagasse by the fungus *Botrytis ricini* URM 5627. After the isolation, the biochemical characterizations were performed, presenting optimum temperature and pH of 50°C and 5, respectively. The enzyme was stable in a range of 39 to 60°C for 60 min and between pHs 4 to 6. The enzyme activity increased in the presence of Na⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ and decreased when in the presence of Ca²⁺, Cu²⁺ and Fe²⁺ ions. Endoglucanase showed a halotolerant profile, since its activity was increased as the NaCl concentration increased. The enzyme was able to saccharify all the tested residues. The biological pretreatment using *Botrytis ricini* URM 5627 showed a great superiority to the acid pretreatment in the cellulose exposure as seen in the results obtained. Box-Behnken planning successfully determined the conditions of the variables: saccharification time, substrate loading and enzymatic loading, necessary to maximize the production of reducing sugars. This work made it possible to obtain a highly active enzyme capable of being applied to obtain fermentable sugars.

Keywords: Solid state fermentation. Purification. Biotechnological applications.

LISTA DE FIGURAS

Seção 1 – Revisão Bibliográfica

Figura 1: Esquema representando fibrilas, microfibrilas e celulose na parede celular de vegetais	19
Figura 2: Ação das celulasas sobre a molécula de celulose	21
Figura 3: Fermentação em estado sólido por <i>B.ricini</i> URM 5627	22
Figura 4: Representação do crescimento de fungos filamentosos em substratos sólidos	26
Figura 5: Ilustrações do fungo <i>Botrytis ricini</i>	27
Figura 6: Esquema representativo de materiais lignocelulolíticos	28
Figura 7: Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	30
Figura 8: Bagaço de cana	31
Figura 9: Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré-tratamento	32
Figura 10: Esquema ilustrativo da cromatografia de troca-iônica	35
Figura 11: Esquema ilustrativo da cromatografia de filtração em gel	36
Figura 12: Esquema ilustrativo da cromatografia de afinidade	37

Seção 3 – Artigo 1

Figura 1: Perfil da produção de endoglucanase (U/mL) em fermentações em estado sólido por <i>Botrytis ricini</i> URM 5627	68
Figura 2: Isolamento da endoglucanase de <i>Botrytis ricini</i> URM 5627 por cromatografia em gel filtração em Sephacryl S-100	71
Figura 3: SDS-PAGE a 12% corado com prata da endoglucanase purificada de <i>Botrytis ricini</i> URM 5627	73
Figura 4: Temperatura ótima: Atividade de endoglucanase obtida em diferentes temperaturas	73
Figura 5: Perfil de termoestabilidade da endoglucanase purificada de <i>Botrytis ricini</i> URM 5627 em FES cultivado em bagaço de cana	74
Figura 6: pH ótimo: Atividade de endoglucanase obtida em diferentes pHs	75
Figura 7: Perfil de estabilidade ao pH da endoglucanase purificada de <i>Botrytis ricini</i> URM 5627 em FES cultivado em bagaço de cana	76
Figura 8: Atividade da endoglucanase purificada de <i>Botrytis ricini</i> URM 5627 frente a diferentes sais metálicos	77
Figura 9: Efeito da concentração de NaCl na atividade de hidrólise da endoglucanase purificada de <i>Botrytis ricini</i> URM 5627	79

Figura 10: Sacarificação da casca de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo empregando a endoglucanase pura de <i>Botrytis ricini</i> URM 5627	81
--	-----------

Seção 4 – Artigo 2

Figura 1: Perfil do pré-tratamento ácido em diferentes concentrações e a relação com a quantidade de açúcar redutor liberado	96
Figura 2: Perfil do pré-tratamento biológico em diferentes tempos e a relação com a quantidade de açúcar redutor liberado	97
Figura 3: Imagens da microscopia eletrônica de varredura, referentes aos resíduos ..	101
Figura 4: Espectros FTIR	103
Figura 5: Espectros de DRX	104
Figura 5: Sacarificação dos resíduos	105

Seção 5 – Artigo 3

Figura 1: Eletroforese e zimograma da endoglucanase isolada de <i>Botrytis ricini</i> URM 5627	116
Figura 2: Efeito da refrigeração e congelamento da solução enzimática a -20°C e 6°C sobre atividade de endoglucanase de <i>Botrytis ricini</i> URM 5627	117
Figura 3: Gráfico de Pareto	120
Figura 4: Gráfico de valores reais x previstos	122
Figura 5: Gráficos de superfície de resposta e de contorno	123
Figura 6: Espectros FTIR	125

LISTA DE TABELAS

Seção 1- Revisão bibliográfica

Tabela 1: Endoglucanases produzidas por FES	25
---	----

Seção 2 – Experimental

Tabela 1: Variáveis e níveis do planejamento Box-Behnken	62
--	----

Seção 3 – Artigo 1

Tabela 1: Resumo da purificação da endoglucanase de <i>Botrytis ricini</i> URM 5627	71
---	----

Seção 4 – Artigo 2

Tabela 1: Atividade enzimática do pré-tratamento biológico	98
--	----

Tabela 2: Análise composicional dos resíduos	100
--	-----

Tabela 3: Identificação e concentração dos açúcares redutores formados a partir da sacarificação dos resíduos	106
--	-----

Seção 5 – Artigo 3

Tabela 1: Matriz do tipo Box-Behnken	119
--	-----

Tabela 2: ANOVA	121
-----------------------	-----

SUMÁRIO

SEÇÃO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1 Introdução	17
1.1 Características gerais das endoglucanases	18
1.2 Fermentação em estado sólido para obtenção de enzimas	21
1.3 O fungo <i>Botrytis ricini</i>	26
1.4 Aspectos gerais dos resíduos agroindustriais	28
1.5 Aspectos gerais do bagaço de cana	29
1.6 Pré-tratamentos de resíduos lignocelulolíticos	31
1.7 Técnicas de purificação de proteínas	33
1.8 Aplicações de endoglucanases	37
2 Conclusão	38
3 Capítulo de Livro aceito para publicação	38
4 Justificativa e Objetivos	40
5 Referências	41
SEÇÃO 2 – EXPERIMENTAL	49
2 Experimental	50
2.1 Reagentes e Soluções	50
2.2 Experimental artigo 1	50
2.2.1 Preparo do inóculo	50
2.2.2 Obtenção e preparo dos resíduos	50
2.2.3 Perfil fermentativo	51
2.2.4 Fermentação em estado sólido	51
2.2.5 Extração enzimática	51
2.2.6 Determinação da atividade enzimática	51
2.2.7 Fracionamento salino	52
2.2.8 Purificação da endoglucanase de <i>Botrytis ricini</i> URM 5627	52
2.2.9 Determinação de proteína total	52
2.2.10 Eletroforese (SDS-PAGE)	52
2.2.11 Temperatura ótima e termoestabilidade	53
2.2.12 pH ótimo e estabilidade ao pH	53
2.2.13 Efeito sob adição de sais	53
2.2.14 Halotolerância	54
2.2.15 Determinação das constantes cinéticas	54
2.2.16 Sacarificação de resíduos agroindustriais	54

2.3 Experimental artigo 2	55
2.3.1 Matéria prima	55
2.3.2 Pré-tratamento ácido diluído.....	55
2.3.3 Pré-tratamento biológico.....	55
2.3.4 Análise de composição.....	56
2.3.5 Determinação da atividade celulase	56
2.3.6 Análise de FTIR	57
2.3.6 Análise de Raio-X e Cristalinidade	57
2.3.7 Microscopia eletrônica de varredura	57
2.3.8 Sacarificação dos resíduos	58
2.3.9 Identificação dos inibidores formados após os pré-tratamentos	58
2.4 Experimental artigo 3	59
2.4.1 Enzima	59
2.4.2 Determinação da atividade enzimática.....	59
2.4.3 Matéria prima	59
2.4.4 Zimografia.....	60
2.4.5 Estabilidade da enzima refrigerada e congelada	60
2.4.6 Sacarificação enzimática do farelo de trigo	60
2.4.7 Planejamento Box – Behnken para otimização da sacarificação do farelo de trigo	61
2.4.8 Análise de FTIR	63
2.5 Referências.....	63
SEÇÃO 3 – ARTIGO 1	65
3.1 Introdução	67
3.2 Resultados e discussão	68
3.2.1 Perfil fermentativo	68
3.2.2 Caracterização do resíduo agroindustrial	70
3.2.3 Purificação enzimática.....	71
3.2.4 Temperatura ótima e termoestabilidade	73
3.2.5 pH ótimo e estabilidade ao pH	75
3.2.6 Efeito sob a adição de sais	77
3.2.7 Halotolerância	78
3.2.8 Determinação das constantes cinéticas	80
3.2.9 Sacarificação de resíduos agroindustriais	80
3.3 Conclusão	82
3.4 Artigo Publicado	82
3.5 Referências bibliográficas	84

SEÇÃO 4 – ARTIGO 2	91
4.1 Introdução	94
4.2 Resultados e discussão	95
4.2.1 Pré-tratamento ácido diluído	95
4.2.2 Pré-tratamento biológico	96
4.2.3 Análise da composição dos resíduos antes e após os pré-tratamentos	98
4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura	101
4.2.5 FTIR	103
4.2.6 Difração de Raio- X	104
4.2.7 Sacarificação dos resíduos	105
4.3 Conclusão	107
4.4 Referências Bibliográficas	108
SEÇÃO 5 – ARTIGO 3	112
5.1 Introdução	115
5.2 Resultados e discussão	116
5.2.1 Zimografia	116
5.2.2 Estabilidade da enzima refrigerada e congelada	117
5.2.3 Planejamento Box–Behnken para otimização da sacarificação do farelo de trigo	119
5.2.4 FTIR	124
5.3 Conclusão	126
5.4 Referencias Bibliográficas	126
SEÇÃO 6 – Conclusão geral e perspectivas	132
3.1 Conclusão geral	133
3.2 Perspectivas	133

Seção 1

Revisão da literatura

1 Introdução

A agricultura brasileira tem se consolidado como o grande vetor de desenvolvimento do país. Essa grande produção em consequência gera um quantitativo de resíduos que por sua vez são responsáveis por uma parcela da poluição e degradação do meio ambiente. Nos últimos anos, tem crescido o interesse pela utilização de resíduos agrícolas. Estudos recentes mostram que anualmente, 180 bilhões de toneladas de celulose são sintetizadas por plantas superiores, sendo por isso responsável pelo maior reservatório de carbono orgânico do planeta (FESTUCCI-BUSELLI, 2007). Em países de cultura agrícola, como o Brasil, por exemplo, o conteúdo de biomassa gerado pode atingir de 10^7 a 9×10^7 milhões de toneladas. Para a cana de açúcar, por exemplo, a cada tonelada moída, 280 Kg de bagaço são gerados, o que corresponde a aproximadamente 30% do peso líquido total (UDOP, 2015).

Tendo em vista a redução do acúmulo destes rejeitos, processos biotecnológicos vêm sendo estudados na atualidade, a produção de enzimas com aplicação industrial, aproveita os rejeitos como fonte de matéria prima, na obtenção dessas biomoléculas. A fermentação em estado sólido (FES) surge como uma estratégia viável para reciclar os resíduos gerados pela agroindústria. A mesma tem sido definida como o processo de fermentação que envolve uma matriz sólida, que deve ser realizado em ausência ou quase ausência de água; porém o substrato deve possuir teores de umidade e atividade de água suficiente para o crescimento, desenvolvimento e metabolismo do microrganismo empregado (SINGHANIA, R *et al.*, 2009).

Dentre essas enzimas destaca-se o estudo com a endoglucanase, que está classificada com o EC 3.2.1.4, possui como nome sistemático, segundo a IUBMB -*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 1,4-β-D-glucana-4-glucano-hidrolase. É a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise de homopolissacarídeos de glicose. Tal enzima hidrolisa as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e outro não redutor (ZANDONÁ, 2001). As celulases têm ganhado muito destaque devido sua versatilidade em aplicações na hidrólise de resíduos agrícolas visando à liberação da glicose contida na celulose (OLSSON *et al.*, 2003). Atualmente, são disponibilizadas na indústria de papel e celulose para branqueamento da polpa de celulose, na indústria têxtil produzindo a aparência “lavada” de jeans e tornando tecidos mais lisos e macios, e na indústria de alimentos, na produção de sucos de frutas,

liquefazendo o tecido vegetal e permitindo a extração de pigmentos do fruto, entre outros (MUSSATTO et al., 2010). Além disso, o interesse tem surgido no emprego dessas enzimas em processos de hidrólise de resíduos agroindustriais para produção de açúcares fermentáveis que podem ser convertidos em biocombustíveis.

A maior dificuldade para o aproveitamento dos resíduos celulósicos está representada pela barreira física formada pela lignina, impedindo o acesso a celulose (Volynets et al., 2017). Vários tipos de pré-tratamentos podem ser aplicados com o objetivo de diminuir o teor de lignina e facilitar a posterior hidrólise enzimática por celulasas (Volynets et al., 2017). Os pré-tratamentos podem ser realizados utilizando ácidos, bases, vapor, biológico ou até mesmo a combinação entre eles (Singh et al., 2015).

Com relação à sacarificação enzimática, várias pesquisas se voltam ao descobrimento de novas celulasas e hemicelulasas com alta eficiência hidrolítica, estáveis e que tenham baixo custo. Para esta proposta várias estratégias podem ser utilizadas, como por exemplo, estudos com novos organismos produtores de enzimas lignocelulolíticas, avaliação de diferentes sistemas de cultivo, avaliação de coquetéis enzimáticos que contenham todas as atividades necessárias com uma composição de proteínas pré-definida, estudos com reciclagem de enzimas, utilização de resíduos agropecuários como fontes de carbono para a produção das enzimas, entre outras. Esta última estratégia pode reduzir e os custos de produção destas enzimas e, além disso, estudos recentes já demonstraram a importância da composição das biomassas residuais na indução das enzimas lignocelulolíticas pelos microrganismos.

Diante do exposto é viável propor a utilização dos rejeitos agroindustriais como substrato para produção de endoglucanase por microrganismos, uma vez que o processo é atrativo por se tratar do uso de um material como um meio de cultivo alternativo, abundante e de baixo custo. Além disso, propor o estudo bioquímico de uma endoglucanase, é uma tarefa nobre, tanto no âmbito científico quanto técnico, uma vez que existe a descoberta de um potencial biocatalizador específico com vistas a diversas aplicações biotecnológicas.

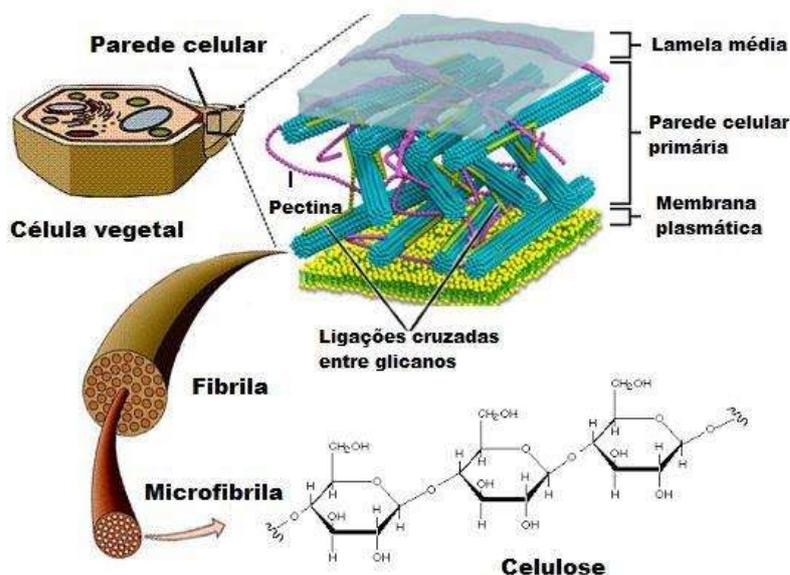
1.1 Características gerais das endoglucanases

Celulasas são enzimas sintetizadas por uma grande diversidade de microrganismos, incluindo fungos e bactérias, durante seus crescimentos em materiais celulósicos. Estes microrganismos podem ser aeróbicos, anaeróbicos, mesofílicos ou termofílicos (SUN e CHENG, 2002). São enzimas hidrolíticas que compõem o grupo das celulasas as endo-1,4-β-

glucanases (EC 3.2.1.4), as exo-1,4- β - glucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e as 1,4- β -glucosidases (EC 3.2.1.21) atuam de forma sinérgica na degradação da celulose.

A celulose é um polissacarídeo composto por unidades de glicose ligadas entre si através de ligações β -1,4, formando microfibrilas. Estas microfibrilas se entrelaçam, formando finos filamentos, denominados fibrilas. As moléculas de celulose possuem duas regiões, cristalina e amorfa, sendo a região cristalina impermeável à água e resistente à degradação química e biológica, pois apresenta um número elevado de interações moleculares intra e internamente, como ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. Já a região amorfa é facilmente hidrolisável, pois nesta região há menos interações de hidrogênio, sendo facilmente hidratada e mais acessível às enzimas (PERCIVAL et al, 2006) (Figura 1).

Figura 1: Esquema representando fibrilas, microfibrilas e celulose na parede celular de vegetais.



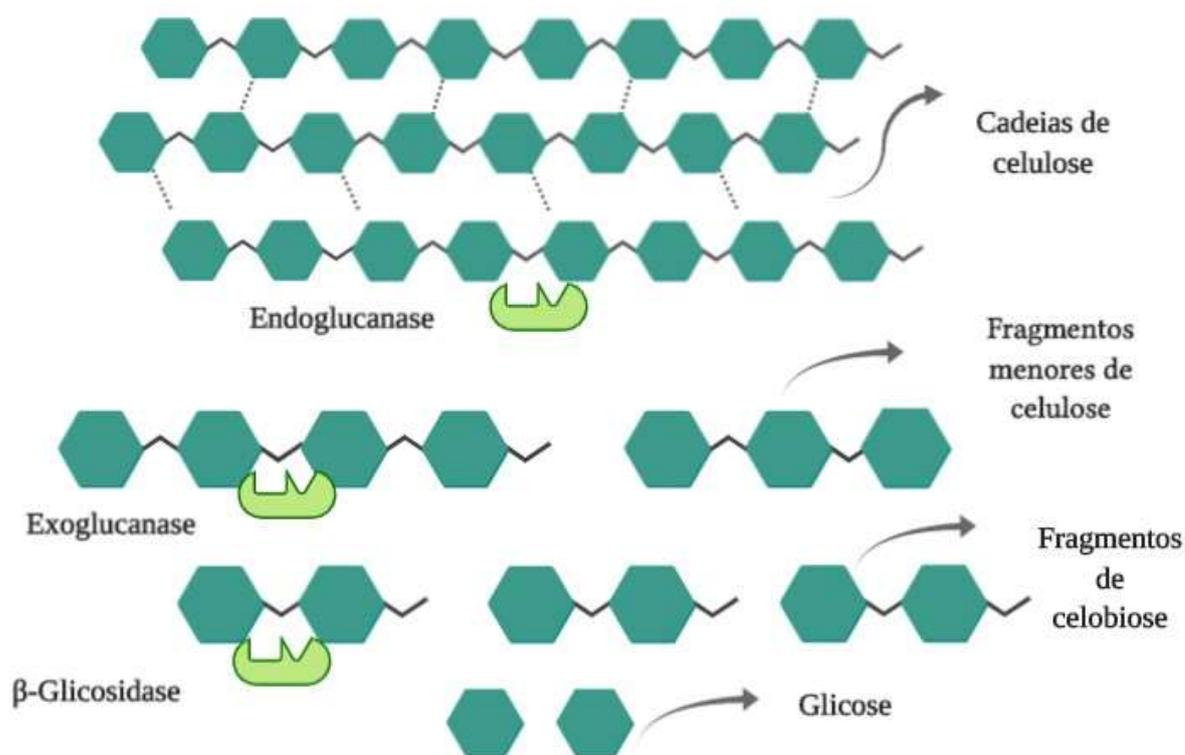
Fonte: Adaptado de Alexander Silberman Institute of Life Sciences, 2015.

A hidrólise completa da biomassa celulolítica requer o sinergismo das três enzimas do complexo celulolítico: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) e β -glucosidase (EC 3.2.1.21). Estruturalmente, as enzimas possuem dois domínios separados, o primeiro um domínio de ligação à celulose (CBM) e o segundo um domínio catalítico proeminente (CD) contendo resíduos ativos que formam uma fenda ou bolsa catalítica. Ambos os domínios de proteína modular são conectados por uma região de ligação flexível, rica em treonina e serina, e o CBM contém cerca de 35 resíduos de aminoácidos. As enzimas celulolíticas agem sinérgicamente para converter a celulose em glicose, as endoglucanases

atuam em primeiro lugar, clivando a cadeia linear de celulose, atuando nas ligações β -1-4 internas, posteriormente, as exoglucanases atuam em resíduos expostos pela ação da endoglucanase e liberam a celobiose que é convertido em glicose livre pela β -glicosidase (AKRAM et al., 2018; WATANABE and TOKUDA, 2010).

As celulasas são enzimas que desempenham um papel fundamental na hidrólise da ligação β -1,4-glicosídica da celulose, um componente dominante da parede celular das plantas. A produção de celulasas é uma importante área de pesquisa. No mercado industrial, ocupa a terceira posição no ranking mundial, representando 20% do volume total de enzimas comercializadas (YOON et al., 2014). A celulose é clivada por endoglucanases, as quais promovem cortes no polímero de celulose, expondo as extremidades redutoras e não redutoras. Enquanto as celobiohidrolases agem nas extremidades redutoras e não redutoras deste polissacarídeo liberando oligossacarídeos, dentre estes, unidades de celobiose. As betas glicosidases clivam a celobiose, liberando duas unidades de glicose. Após a ação sinérgica deste sistema celulolítico se tem a completa hidrólise da celulose (VARNAI et al., 2010; SIGHANIA et al., 2010). A Figura 2 é uma representação simplificada da ação enzimática de cada classe de enzimas.

Figura 2: Ação das celulasas sobre a molécula de celulose



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

As Endo-1,4- β -glucanase (EG), conhecidas também como endoglucanase, estão classificadas com o EC 3.2.1.4, e possuem nome sistemático, segundo a *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB), 1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolase. A carboximetilcelulose (CMC) é utilizado como substrato preferencial para a atividade dessas enzimas, devido ao seu alto grau de polimerização e baixa cristalinidade (CAO e TAN, 2002; ZHANG et al., 2006). Tais enzimas hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, clivando ligações β -1,4 na região central da molécula e liberando açúcares e oligossacarídeos e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um reductor e um não reductor (LYND et al., 2002).

A maioria das endoglucanases não é glicosilada, porém algumas apresentam até 12% de glicosilação em sua cadeia (BALDRIAN; VALÁŠKOVÁ, 2008) e possuem tamanho médio de 22 a 45 kDa, podendo algumas apresentarem 90 kDa, como endoglucanases de alguns fungos (SADANA et al., 1984). A maioria delas apresenta maior atividade entre as temperaturas de 50 e 70°C e valores entre 4 e 5 em relação ao pH (VALÁŠKOVÁ; BALDRIAN, 2006; DING et al., 2006).

Possuem grande importância econômica, podendo ser aplicadas em uma ampla variedade de atividades industriais. As principais aplicações são nas indústrias alimentícias, ração animal, têxtil, detergente, e cervejarias. Outras áreas incluem a indústria de polpa e papel, gestão de resíduos e indústria médico-farmacêutica (BHAT e BHAT, 1997). O mercado dessas enzimas deverá expandir-se dramaticamente quando as celulasas forem usadas para hidrolisar materiais lignocelulósicos pré-tratados em açúcares, que podem ser fermentados para commodities como o etanol de 2ª geração e produtos com base biológica em larga escala (CHERRY e FIDANTSEF, 2003; HIMMEL et al., 1999; VAN BEILEN e LI, 2002).

1.2 Fermentação em estado sólido para obtenção de enzimas

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como um bioprocesso que consiste no cultivo de microrganismos na superfície de materiais sólidos que apresentam a propriedade de absorver ou de conter água, inertes ou em substratos insolúveis que podem ser utilizados como fonte de nutrientes e energia. Esta técnica é realizada na ausência ou quase ausência de água livre, simulando o habitat natural que muitos fungos, bactérias e leveduras. No entanto, é necessário que o substrato possua umidade suficiente para suportar o

crescimento e atividade metabólica dos microrganismos (Figura 1.3) (RAHARDJO et al., 2006; PANDEY, 2003). A fermentação em estado sólido (FES) apresenta grandes vantagens como o grande rendimento produtivo, pouca produção de resíduos e exige equipamentos simples de fermentação. Para um bom aproveitamento, devem-se levar em conta vários fatores, dentre os quais: a seleção criteriosa do microrganismo e do substrato, além do controle dos parâmetros fermentativos (PANDEY, 2012).

Figura 3: Fermentação em estado sólido por *B. ricini* URM 5627 realizada em frascos erlenmeyer utilizando resíduo de trigo, arroz e bagaço de cana e água como meio de cultivo.



Fonte: elaborado pela autora, 2020

Com o avanço da biotecnologia, a fermentação em estado sólido vem ganhando cada vez mais interesse e destaque devido a suas potenciais aplicações como na produção de enzimas e demais compostos bioativos (THOMAS, et al., 2013; SANTOS et al, 2013). A FES é favorecida e potencialmente utilizada devido à possibilidade de utilização de resíduos de origem agroindustrial que muitas vezes são descartados na natureza causando problemas ambientais e os utilizando como suporte ricos em fonte de carbono, nitrogênio e nutrientes para crescimento de microrganismos (LI e ZONG, 2010; KIRAN et al., 2014).

Para determinar as melhores condições de fermentação para a obtenção de enzimas faz-se necessário identificar as variáveis do processo. Desta maneira vê-se que estes parâmetros são de suma importância. Entre todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo sólido, tem destaque a atividade de água (a_w) ou umidade, que deve ser baixa,

para evitar a contaminação do meio. Na FES, o microrganismo possui um limite de água para suas atividades metabólicas e seu crescimento. Segundo Pelizer *et al.* (2003) a atividade de água influencia o crescimento microbiano e processos biológicos e enzimáticos. Cada microrganismo possui um limite mínimo de atividade de água para realizar suas atividades metabólicas. Portanto, a atividade de água (a_w) mínima para o crescimento de fungos é em torno de 0,70; para leveduras 0,80 e, para bactérias, 0,90 (JAY, J. M., 2005). O tamanho das partículas (granulometria) do substrato, também é importante, para facilitar o crescimento dos microrganismos. Partículas pequenas favorecem a compactação do sólido em consequência, dificulta a circulação de gases no meio. Em conta partida, partículas grandes favorecem maior aeração, no entanto limitam a superfície de contato do substrato para o microrganismo (DEL BIANCHI *et al.*, 2011). A temperatura é um parâmetro de suma importância no crescimento dos microrganismos envolvidos, estando relacionado com a transferência de calor que ocorre no processo (PANDEY, 2004), portanto pode-se inferir que as reações envolvidas no crescimento microbiano são exotérmicas. O pH é um fator crítico na FES, por conta da heterogeneidade e consistência do material, sendo difícil de ser controlado. Diante a adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato tem se tornado importante (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O tempo de fermentação está relacionado com a presença de nutrientes dispersos ao longo da fermentação contribuindo para o crescimento do microrganismo. À medida que os microrganismos vão consumindo os nutrientes e ocorrendo o esgotamento destes, há conseqüentemente a diminuição da produção microbiana e por fim o declínio da produção de metabólitos (SANTOS *et al.*, 2013). Portanto, o controle das variáveis se faz necessário para a obtenção de produtos com características uniformes e constantes (DEL BIANCHI *et al.*, 2001; PANDEY *et al.*, 2002).

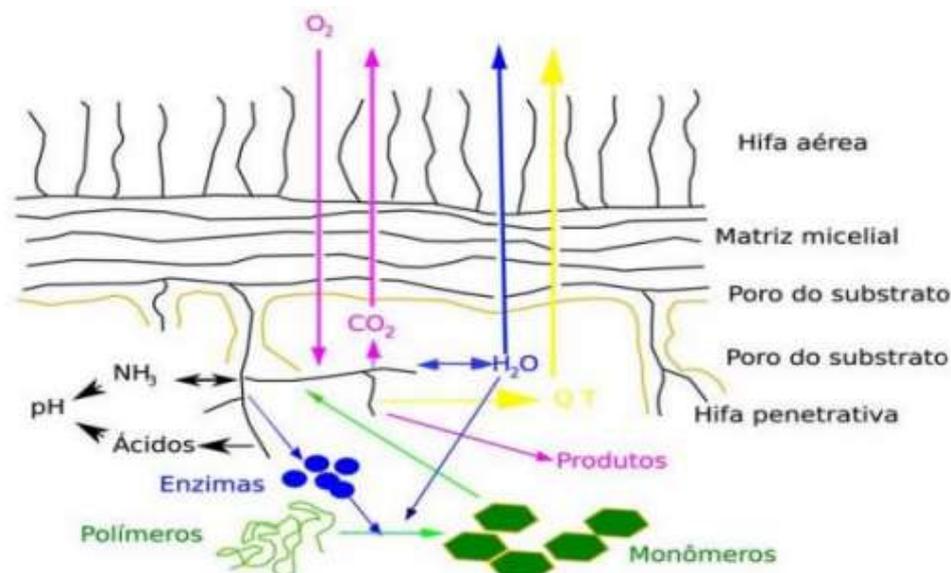
Diferentes enzimas podem ser produzidas por FES, a produção de endoglucanase por FES vem sendo amplamente estudada. Alguns dos principais focos são a avaliação de diferentes microrganismos, substratos sólidos e condições de cultivo. A Tabela 1.1 apresenta alguns trabalhos utilizando a técnica de FES na obtenção de endoglucanases.

Na Fermentação em Estado Sólido, os fungos filamentosos representam os microrganismos mais promissores, pela variedade de produtos de seu metabolismo e devido ao desenvolvimento das hifas que permite aos mesmos maiores penetrações no substrato e nas regiões porosas entre partículas da matéria-prima (Figura 1.4). Além disso, a maioria dos fungos possui capacidade de crescer em meios com baixa atividade de água (a_w) ou umidade e

baixo pH, e produz enzimas extracelulares hidrolíticas para degradar as macromoléculas presentes no substrato sólido, favorecendo assim o seu uso em FES (RAHARDJO et al., 2006). De acordo Hasan, *et.al.*,(2002), dentre os fungos filamentosos, as três classes mais usadas em FES são *Phycomycetes (Mucor e Rhizopus)*, *Ascomycetes (Aspergillus e Penicillium)* e *Basidiomycetes (Polysporus)*. A produção das endoglucanases foi estudada em muitos fungos filamentosos, particularmente nos grupos *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (CHELLAPANDI, 2008) (tabela 1).

	Microrganismos	Tempo de Fermentação (horas)	Temperatura de incubação (°C)	Referências
Farelo de Trigo	<i>Aspergillus niger</i>	72	32	Pirota et al. 2013
Pera espinhosa	<i>Rhizopus sp.</i>	68,12	30,41	Santos et al. 2016
Palha de trigo cortada	<i>Aspergillus niger</i>	70,35	29,56	Saqib et al. 2010
Casca de laranja, flor seca e bagaço de cana	<i>Aspergillus fumigatus</i>	168	30	Karmakar e Ray 2010
Ervas Chinesas	<i>Rhizopus oryzae</i>	48	37	Longwei et al. 2014
Grão de milho moído	<i>Trichoderma virride</i>	72	30	Farinas et al. 2011
Farelo de Trigo	<i>Aspergillus níger</i>	72	32	Pirota et al. 2016
Bagaço de cana de açúcar	<i>Aspergillus oryzae</i>	72	35	Zanelato et al. 2012
Farelo de trigo	<i>Myceliophthora sp.</i>	18	50	Dave et al. 2013
Palha de arroz e palha de trigo	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	168	30	Deswal et al. 2011
Farelo de trigo	<i>Fomitopsis sp.</i> <i>Aspergillus. niger</i>	72	32	Farinas et al. 2011

Figura 4: Representação do crescimento de fungos filamentosos em substratos sólidos.



Fonte: HOLKER; LENZ, 2005.

Os principais resíduos utilizados em fermentação em estado sólido são de origem vegetal e animal proveniente da indústria agrícola e alimentos, respectivamente. Dentre os resíduos de origem animal destacam-se esterco de vaca, resíduo sólido de curtume, pena de galinha e farinha de peixe. Dentre os de origem vegetal destacam-se os resíduos de arroz, trigo, soja, algodão, cascas e bagaços de vegetais e frutas e resíduo de grãos utilizados na fabricação de pães e bebidas fermentadas (El-Bakry et al., 2015). Nas pesquisas voltadas para aplicação da FES na produção de endoglucanase os resíduos mais investigados são os resíduos de trigo (farelo, palha), milho (sabugo, palha), cana-de-açúcar (bagaço), soja, casca de arroz, pó de madeira, papel Kraft, entre outros (Tabela 1).

1.3 O fungo *Botrytis ricini*

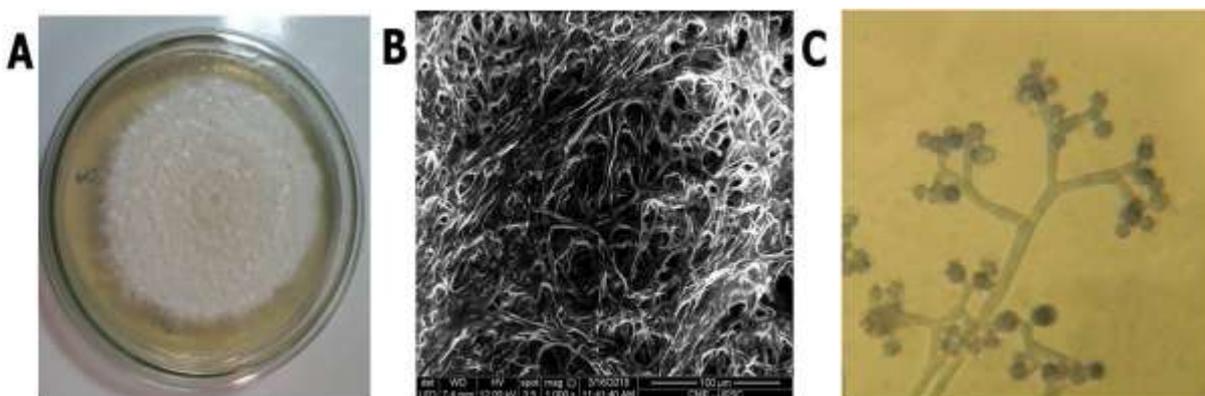
O fungo *Botrytis ricini* é um fungo endofítico, corresponde a sua forma teleomórfica e pertence à classe dos Ascomycetes (LIMA *et al.*, 2001). O mofo cinzento foi isolado de cultivares de mamoneira (*Ricinus communis*) e pode infectar essa planta em qualquer estágio, sendo uma das doenças mais importantes para essa cultura (Documentos 137, Embrapa, 2005; Angelo et al., 2011).

A doença vegetal foi relatada pela primeira vez nos EUA em meados de 1918 (Godfrey, 1923) e no Brasil, em São Paulo, 1932 (Gonçalves, 1936), tendo documentadas ocorrências em outros países, bem como em outros tipos de

plantações (Amiri, Onofre and Peres, 2016; Yu et al., 2014). Embora *A. ricini* tenha nicho ecológico fitopatogênico, suas enzimas podem ser obtidas a partir de diferentes processos de extração e purificação a partir do crescimento saprofítico em resíduos vegetais ou resíduos agroindustriais, de forma que a possibilidade de disseminação do fungo no ambiente é nula ou muito baixa.

As colônias de *Botrytis ricini* são efusas, tornando-se branco acinzentado para castanho, com hifas hialinas, septadas e ramificadas. O conidióforo apresenta haste cilíndrica, de coloração marrom claro, septada, com ramificações quase simétricas, longas e cilíndricas (Figura 5). Algumas espécies podem apresentar impactos negativos tais como, o comportamento oportunista de plantas causando doenças de pré e pós-colheita em diversas culturas alimentares. Entretanto existem relatos que apresentam o alto desempenho desse gênero na produção de enzimas extracelulares de alto valor agregado, devido a sua alta capacidade em romper os tecidos vegetais, ligeiro crescimento e desenvolvimento (ABO-ELMAGD, et al 2012).

Figura 5: Ilustrações do fungo *Botrytis ricini*; (a) Aspectos das colônias crescidas em cultura no interior de placa de Petri em meio BDA. (b) Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura sob aumento de 1000X; (c) Imagem de conidióforo e conídios sob microscopia óptica de 40x .



Fonte: A e B elaborado pela autora, 2020 e C Silva, U. A., 2013.

Existem poucos relatos na literatura voltados a purificação das enzimas produzidas por esse gênero, entretanto existem vários estudos que apresentam a atividade de diversas hidrolases, entre elas a endoglucanase por esses microrganismos, dessa maneira aumentando o

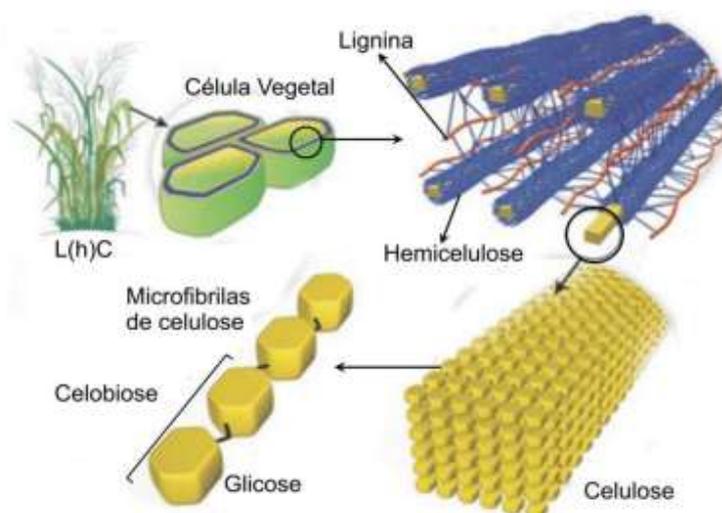
interesse por ele, uma vez que sua capacidade de penetração, crescimento em meios frente ao stress, chama a atenção para estudos mais profundos (RHA et al., 2001).

1.4 Aspectos gerais dos resíduos agroindustriais

Sabe-se que os processos biotecnológicos vêm recebendo cada vez mais destaque e se difundido em vários segmentos industriais e tem se mostrado promissores e com inúmeras vantagens em relação aos processos convencionais. Isto porque os resíduos agroindustriais devido ao baixo ou nenhum valor comercial é uma alternativa atrativa e promissora considerando o elevado teor de carboidratos dessa biomassa, atuando como fonte de nutrientes (CUNHA et al.,2005). Os resíduos resultantes das atividades agroindustriais são gerados no processamento de couro, fibras, alimentos, madeira, produção de açúcar e álcool, etc. Sua produção é geralmente, sazonal, condicionada pela maturidade da cultura ou oferta da matéria-prima (MATOS, 2005). O tipo e quantidade de resíduos agroindustriais produzidos são variáveis com o tempo (MATOS, 2014).

As biomassas residuais de composição majoritária lignocelulósicas e são consideradas o recurso renovável mais abundante da terra, que consiste em cadeias de açúcares (polissacarídeos) fortemente associadas e ligadas covalentemente. Os componentes principais dos materiais lignocelulolíticos consistem de três grandes polímeros tais como celulose, hemicelulose e lignina (Figura 6), no qual as microfibrilas de celulose encontram-se incorporados dentro de uma matriz composta por hemicelulose e lignina, conferindo maior estabilidade e proteção à parede celular aos ataques microbianos e enzimáticos (LYND et al 2008; PETERS, 2014). Vários resíduos agroindustriais podem ser utilizados como fonte de composto lignocelulolíticos, como o farelo de cevada, palha de milho, bagaço de cana, casca de arroz, palha de trigo, casca de aveia, palha de sorgo, casca de amendoim, etc. A biomassa é composta aproximadamente de 30 a 40% de celulose, 20 a 30% de hemicelulose, 5 a 20% de lignina (Tabela 1.1), além de pequenas quantidades de outros componentes em sua composição: cinzas, proteínas, pectinas, minerais, amido, dentre outros (BARR et al., 2012; SARKAR et al., 2012; BRAGATTO, 2010).

Figura 6: Esquema representativo de materiais lignocelulolíticos (Santos et al.2012).



Fonte: Santos et al.2012.

Tais resíduos podem ser utilizados como substrato em fermentação em estado sólido (FES), sendo necessária menor infraestrutura e equipamentos de fermentação mais simples, além de ser possível obter o produto de forma mais concentrada, o que representa grande vantagem econômica, em comparação com outras modalidades para a produção de enzimas (EL- BONDKLY; EL-GENDY, 2012; SUKUMARAN et al., 2009). O Brasil apresenta vantagens para o desenvolvimento de uma indústria baseada em matérias-primas renováveis devido à vasta biodiversidade existente em seu território, cultivos agrícolas em grande extensão, diversidade de clima, cujo bioprocessamento desperta grande interesse econômico e social (COUTINHO, BOMTEMPO, 2010). Diante disso torna-se viável os estudos envolvendo processos fermentativos e enzimáticos, uma vez que esses materiais estão amplamente disponíveis para uso, além disso, podendo trazer benefícios que vão além dos produtos obtidos que é o fortalecimento da química verde, e desta forma gerando menos impactos ambientais.

1.5 Aspectos gerais do bagaço de cana

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (figura 7) foi introduzida no Brasil durante o período colonial, e tornou-se a principal cultura brasileira, tornando o país maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. Segundo o CONAB (2018) o Brasil produz mais de 633,26 milhões de toneladas de cana-de-açúcar por ano (safra 2017/2018), sendo também o

maior produtor mundial de açúcar, com 36 milhões de toneladas produzidas e 37,87 milhões de toneladas exportadas no ciclo 2017/2018 - quantias equivalentes a 20% da produção global e 40% da exportação mundial. No caso do etanol, o país é o segundo maior produtor mundial (ranking liderado pelos Estados Unidos).

Figura 7: Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)



Fonte: Portal Syngenta, 2020.

O bagaço de cana juntamente com a palha (figura 8) são os resíduos remanescentes da indústria de cana. O bagaço é obtido após o esmagamento da cana e extração do seu caldo (SU et al., 2012). Ele é composto de feixes de fibras e outros elementos estruturais, tais como vasos, parênquima e células epiteliais. Sua composição predominante apresenta 32-44% de celulose, 27-32% de hemicelulose e 19-24% de lignina (SOCOOL et al., 2010). Com o aumento na demanda por cana-de-açúcar, a disponibilidade de bagaço também aumenta na mesma proporção (HOFSETZ; SILVA, 2012; WALTER et al., 2011). Para cada tonelada de cana processada, tem-se em média 0,3 toneladas de bagaço (HOFSETZ; SILVA, 2012), sendo gerados em torno de 195 milhões de toneladas deste resíduo por ano, no Brasil (GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BON, 2010).

O bagaço tem uma aplicação estabelecida no processo produtivo, direcionado à alimentação das caldeiras e na geração de energia elétrica e calor para manutenção do setor, no entanto esse aproveitamento não é suficiente para acabar com os problemas ambientais causados por esse rejeito. Diante disso tem-se buscado alternativas que além de aproveitar esse material, seja capaz de agregar valor ao mesmo. Dentre as alternativas o uso do mesmo na técnica de fermentação sólida que valoriza esse resíduo dando ao mesmo certa nobreza.

Estudos têm direcionado o uso deste resíduo em uma ampla variedade de processos biotecnológicos e na obtenção de novos coprodutos como ração animal, biofertilizantes, biocombustíveis, carvão vegetal, biogás, como material alternativo na construção civil, na produção de biomassa microbiana, compósitos e polímeros, entre outros (BRAUNBECK & CORTEZ, 2005).

Figura 8: Bagaço de cana.



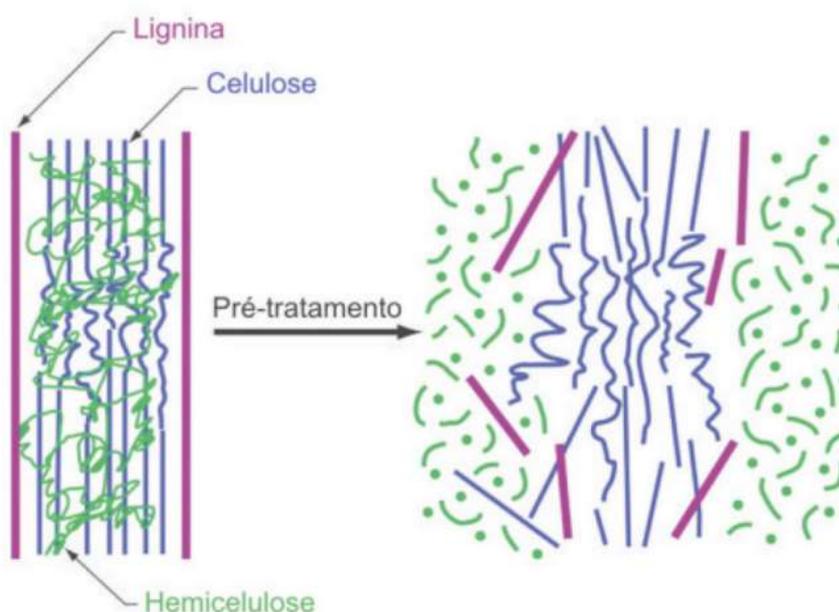
Fonte: Portal Syngenta, 2020.

1.6 Pré-tratamentos de resíduos lignocelulolíticos

No contexto do processo de conversão biológica da biomassa lignocelulósica em açúcares possíveis de serem fermentados para produção de etanol e outros insumos, no entanto para tornar esse processo mais eficiente faz-se necessário um pré-tratamento desses materiais, a fim de aumentar a susceptibilidade de ataque das enzimas aos polissacarídeos (LI et al., 2009). Os métodos de pré-tratamento podem ser classificados em: físico, químico, biológico e combinados. Os pré-tratamentos podem ser realizados utilizando ácidos, bases, vapor, ou até mesmo a combinação entre eles, sabendo-se que o vapor de amônia é uma base. Dentre os vários métodos de pré-tratamento, os mais utilizados são Expansão da fibra em amônia (AFEX), hidrólise, Processo em Separado de Sacarificação (SHF) e Fermentação Simultâneas (SSF) (SUN e CHENG, 2005). Para ser considerado eficaz, o pré-tratamento deve diminuir o grau de polimerização das moléculas de celulose, de forma que se tornem acessíveis ao processo de hidrólise, evitar formação de subprodutos inibidores dos processos

de hidrólise e fermentação e, principalmente, ser economicamente viável. O pré- tratamento separa a lignina da celulose e hemicelulose, os deixando disponíveis como demonstrado na figura 9.

Figura 9: Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré-tratamento.



Fonte: Santos et al., 2012.

✓ Pré-tratamentos físicos:

Os pré-tratamentos físicos possuem como objetivo principal tornar a área superficial da celulose maior, reduzindo seu grau de cristalinidade, o que facilita a realização da etapa de hidrólise. Esse tipo de processo tem como característica, na maioria das vezes, alto consumo de energia (SANTOS et al., 2012). Dentre eles, destacamos a moagem e trituração (bola, energia vibratória, rolo duplo, pressão, martelo); radiação (raios de elétrons, raios gama, micro-ondas); altas temperaturas (pirólises, explosão a vapor).

✓ Pré-tratamentos químicos:

Os tipos de pré-tratamentos químicos diferenciam-se pelos compostos utilizados, assim como pelos mecanismos responsáveis pelas modificações estruturais e químicas da parede celular. Os mesmos podem usar ácidos, bases ou solventes orgânicos (BRODEUR et al., 2011 apud CHEMMÉS et al., 2013).

✓ Pré-tratamentos biológicos:

Conforme mencionado anteriormente, enquanto os pré-tratamentos químicos baseiam-se na aplicação de substâncias específicas, os processos de pré-tratamento biológico utilizam microrganismos, principalmente fungos, para tornarem a estrutura do material lignocelulósico mais acessível aos agentes promotores da hidrólise. Por tratar-se da aplicação de seres vivos, as condições de pressão e temperatura são brandas e a necessidade de energia é pequena (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008 apud BERNARDO NETO, 2009). A atuação desses microrganismos dá-se a partir da secreção de enzimas extracelulares que permitem a remoção de grande parte da lignina da biomassa. Os principais agentes promotores de tal processo são os fungos de decomposição branca, que produzem enzimas como a lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e a lacase (BONONI, 1997; CHAGAS; DURRANT, 2001; CLOETE; CELLIERS, 1999 apud BORTOLAZZO, 2011).

✓ Pré-tratamentos combinados:

Os processos de pré-tratamentos combinados são assim chamados por tratarem de combinações dos pré-tratamentos físicos, químicos e biológicos já desenvolvidos. Destes, o principal é a explosão a vapor catalisada.

1.7 Técnicas de purificação de proteínas

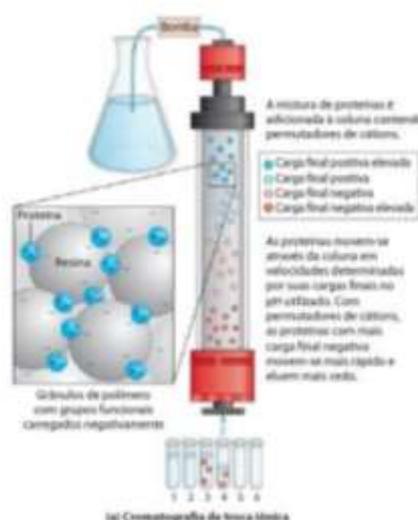
Sabe-se que o interesse por processos de purificação de biomoléculas está intimamente ligado ao desenvolvimento da biotecnologia e às demandas industriais de diferentes indústrias, tais como, alimentos, farmacêutica e química. Os processos de purificação são dados por etapas e isso por sua vez ao longo dos anos vem sendo discutidos por vários pesquisadores. Em 1986, Belter sugeriu que cada separação fosse considerada como quatro passos sequenciais, ou seja, clarificação ou remoção de compostos insolúveis, isolamento do produto ou concentração, purificação intermediária e polimento. Essa foi a melhor estratégia

para a purificação de biomoléculas, sendo utilizada em processos biotecnológicos como base para o desenvolvimento de processos de purificação de proteínas, enzimas, células e hormônios. Tal estratégia também se mostrou eficiente no desenvolvimento de novas rotas ou esquemas de purificação em nível de pesquisa de laboratório e industrial (NELSON e COX, 2014; ZUÑIGA et al. 2003; CUSSLER et al. 1995).

A escolha da técnica a ser utilizada na purificação das proteínas depende dos objetivos da separação. A purificação de uma única proteína de uma mistura complexa, que é conhecida como extrato bruto, exigirá uma técnica diferente àquela necessária para separar todos os componentes da mistura (NELSON e COX, 2014). As separações cromatográficas são as mais utilizadas na obtenção de proteínas puras e consistem na partição do soluto entre uma fase móvel e outra estacionária. Comumente, a fase estacionária é sólida, sendo formada por matriz de partículas empacotadas em coluna de forma tubular. A fase móvel que contém a mistura de componentes a serem separados passa através da coluna (ZUÑIGA et al. 2003). Dentre as cromatografias mais utilizadas destaca-se a de troca-iônica, gel-filtração e afinidade.

Na cromatografia de troca iônica, a separação ocorre de acordo com a carga das biomoléculas. A separação ocorre porque as interações eletrostáticas entre os grupos são reversíveis e dependentes da afinidade de cada substância pelo trocador. Esta afinidade é em função do pH do meio, da temperatura, da força iônica, do tampão, etc. As resinas utilizadas são obtidas pela introdução de grupamentos polares em matrizes insolúveis em água, tais como, celulose, poliacrilamida, géis de dextrana e copolímeros de estireno e divinilbenzeno. Na figura 10 pode ser observado um esquema ilustrativo da cromatografia de troca iônica.

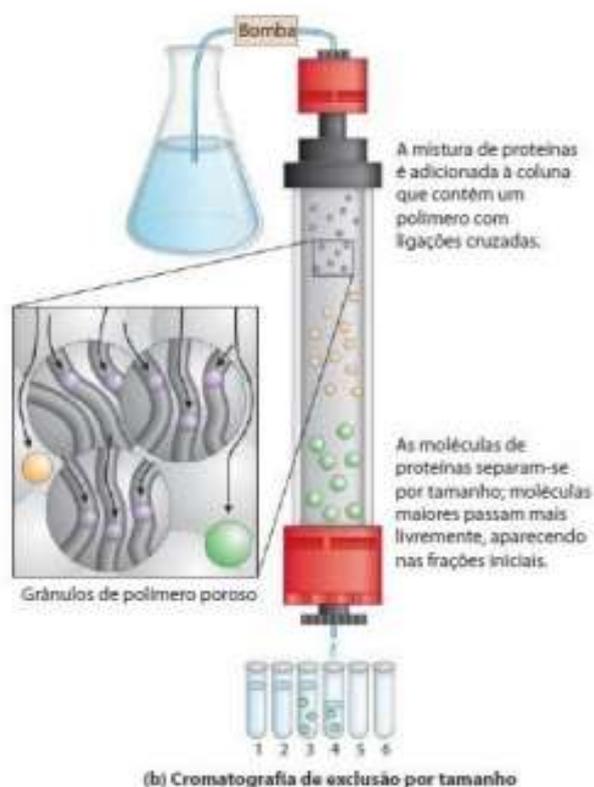
Figura 10: Esquema ilustrativo da cromatografia de troca-iônica



Fonte: Nelson e Cox, 2014.

Outro tipo de cromatografia é a filtração em gel, também conhecida como cromatografia por exclusão de tamanho, em que as moléculas são separadas de acordo com sua massa molecular (COMINETTI; PONTES; SOUZA, 2007). A cromatografia por exclusão tem propriedades desejáveis, tais como simplicidade técnica, insensibilidade a solventes e temperatura, condições amenas e versatilidade. Assim, uma solução aquosa contendo proteínas de vários tamanhos passa por essa fase estacionária e as proteínas com maiores massas moleculares não conseguem entrar e passar pelos poros, sendo excluídas, e, portanto, saem anteriormente às proteínas com menores massas moleculares, como é apresentado no esquema ilustrativo da figura 11.

Figura 11: Esquema ilustrativo da cromatografia de filtração em gel.

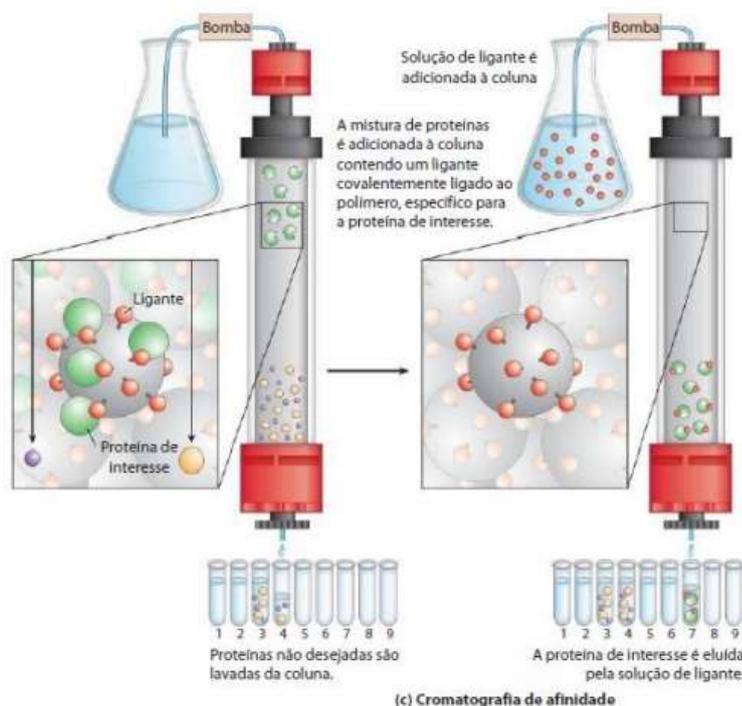


Fonte: Nelson e Cox, 2014.

Outra técnica utilizada é a cromatografia por afinidade onde o suporte apresenta afinidade específica com a substância a ser isolada. Ela é capaz de fornecer um alto grau de purificação, acopla-se covalentemente uma molécula ligante apropriada a uma matriz insolúvel. A molécula ligante adsorve da solução a substância a ser isolada, sendo eliminadas

as que não apresentam nenhuma afinidade com o suporte, como pode ser observado na figura 12.

Figura 12: Esquema ilustrativo da cromatografia de afinidade.



Fonte: Nelson e Cox, 2014).

1.8 Aplicações de endoglucanases

As hidrolases compreendem, aproximadamente, 75% do total de enzimas comercializadas, incluindo celulases, amilases e hemicelulases, constituindo o segundo maior grupo, após as proteases. As celulases possuem um grande potencial biotecnológico, podendo ser empregadas nas indústrias alimentícias, de rações animais, têxtil e de detergentes, na reciclagem de papel, além da possibilidade de aplicação na sacarificação de resíduos agroindustriais para a produção de etanol (BHAT et al., 2000). Destaca-se outro distinto potencial biotecnológico das celulases consiste no processo de reciclagem de papel, onde conseguem remover, com eficácia, partículas de tinta aderidas à superfície das fibras e favorecendo o branqueamento total do papel (BHAT et al., 2000).

A sacarificação de resíduos lignocelulósicos por celulases, com a posterior produção de etanol de segunda geração, também chamado de etanol celulósico, representa uma busca incessante por pesquisadores de vários países do mundo, no sentido de encontrar novas fontes alternativas aos combustíveis fósseis. A utilização ou reutilização da biomassa vegetal, além

de reduzir a emissão de CO₂ na atmosfera, agrega valor à matéria e contribui para reduzir o impacto ambiental ocasionado pelo acúmulo de resíduos lignocelulósicos, gerados anualmente (PANDEY et al., 2000; LIN & TANAKA, 2006). A conversão de resíduos lignocelulósicos em açúcares fermentáveis é considerada uma etapa crítica para a produção de bioetanol (YU et al., 2013). Entre as tecnologias disponíveis pode-se destacar a hidrólise enzimática. Este método oferece diversas vantagens, como alta especificidade, condições de reação mais suave, alto rendimento, menor gasto de energia e menor formação de produtos indesejáveis (CHAPLA et al., 2010; SADAF e KHARE, 2014; VICUNA et al., 1995).

A conversão da celulose a etanol compreende as etapas de sacarificação e fermentação dos açúcares liberados. Na sacarificação ocorre a hidrólise dos polissacarídeos que pode ser por via ácida ou enzimática e posteriormente os açúcares liberados são fermentados por leveduras. A hidrólise ácida é bem conhecida, porém apresenta muitas desvantagens, como a geração de inibidores da fermentação por leveduras e a difícil recuperação dos açúcares liberados. A hidrólise enzimática é o método mais eficiente e que não gera inibidores, sendo que seu processo está em pleno desenvolvimento e pode contribuir na utilização da biomassa (SANTOS, et al., 2012).

2 Conclusão

Conforme foi observado pelo referencial teórico apresentado neste capítulo, vários trabalhos abordam o grande interesse na obtenção e utilização das endoglucanases em aplicações industriais bem como biotecnológicas, tais como, indústrias alimentícias, têxtil, ração animal, farmacêuticos, produtos químicos, produção de biocombustíveis, entre outros.

Mesmo em meio aos obstáculos, que estão intimamente ligados aos custos na produção, bem como na possível reutilização desse catalizador biológico muitos esforços pela redução de custos na produção de enzimas tem proporcionado o aumento das pesquisas na sua fabricação através da utilização de cepas microbianas associadas às técnicas de fermentação. O processo de fermentação em estado sólido vem abrindo novas oportunidades, pelo fato de utilizar uma matriz decorrente de rejeitos agroindustriais, que em consequência barateia os custos de produção que são explicitados nos variados estudos citados nesse trabalho.

Portanto, o estudo da utilização empregando, pó de madeira, fibra de coco, bagaço de cana na fermentação em estado sólido como substrato para a cultivo do *Botrytis ricini* URM

5627 pode proporcionar a viabilidade em obter biomoléculas com alto valor agregado como uma endoglucanase de interesse industrial e biotecnológico.

3 Capítulo de Livro aceito para publicação



PONTA GROSSA, 21 de junho de 2020.

DECLARAÇÃO DE ACEITE

Após avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta editora, tenho a honra de informar que o artigo intitulado "OBTENÇÃO DE CELULASES MICROBIANAS: UMA BREVE REVISÃO" de autoria de "TATIELLE PEREIRA SILVA, ALEXSANDRA NASCIMENTO FERREIRA, CLEDSON BARROS DE SOUZA, DÁVIDA MARIA RIBEIRO CARDOSO DOS SANTOS, MARTA MARIA OLIVEIRA DOS SANTOS, HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA", foi aprovado e encontra-se no prelo para publicação no livro eletrônico "Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 3" a ser divulgado em junho de 2020.

Agradeço a escolha pela Atena Editora como meio de transmitir ao público científico e acadêmico o trabalho e parabenizo os autores pelo aceite de publicação.

Reitero protestos de mais elevada estima e consideração.


Prof.ª Dr.ª Antonella Carvalho de Oliveira
Editora Chefe
ATENA EDITORA
PREFIXO EDITORIAL ISBN 83243
PREFIXO EDITORIAL DOI 10.22533

4 Justificativa e Objetivos

✓ **Justificativa**

O aumento da conscientização ambiental e a busca por alternativas sustentáveis tem merecido atenção desde o final do século XX e em consequência vem desafiando a humanidade a equilibrar a produção de bens e serviços, o crescimento econômico, a igualdade social e a sustentabilidade ambiental. Com isso surgem soluções práticas, versáteis e viáveis economicamente para o aproveitamento de resíduos agroindustriais (destacando para os resíduos de maior abundância, os lignocelulósicos). Neste contexto, a seleção de microrganismos celulolíticos eficientes é estratégica, uma vez que o Brasil é um país rico em biodiversidade, o que corrobora para a produção econômica destas enzimas utilizando-se de meios de baixo custo, o que proporcionará a aplicação dessa enzima em diferentes processos.

✓ **Objetivo Geral**

Enzimas com novas características são constantemente requeridas nos processos industriais e biotecnológico, isso por sua vez estimula o estudo das mesmas, logo esse m trabalho tem como objetivo isolar, caracterizar e aplicar a endoglucanase produzida pelo fungo filamentososo *Brotrytis ricini* URM 5627 na sacarificação de resíduos agroindustriais.

✓ **Objetivos específicos**

- Analisar a produção de endoglucanase pelo fungo cultivado em meios de cultura alternativos por fermentação em estado sólido;
- Isolar por cromatografia líquida a endoglucanase produzida;
- Caracterização bioquímica da enzima isolada;
- Aplicação biotecnológica da enzima na sacarificação de resíduos agroindustriais;
- Produção de Etanol 2G.

5 Referências

ABO-ELMAGD, H.I. & HOUSSEINY, M.M. **Ann Microbiol** 62: 1547. 2012.

ALEXANDER SILBERMAN INSTITUTE OF LIFE SCIENCES.

Disponível em: www.teachline.ls.huji.ac.il/72346/PlantCell/cellwall.html.

Acesso em Dezembro 2019

AKRAM, F. HAQ, I. UL. IMRAM, W. MUKHTAR, H. Insight perspectives of thermostable endoglucanases for bioethanol production: A review. **Renewable Energy** 122 (2018) 255-238.

BALDRIAN, P.; VALÁŠKOVÁ, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 3, p. 501– 521, 2008.

BARR, C. J.; MERTENS, J. A.; SCHALL, C. A.; Critical cellulase and hemicellulase activities for hydrolysis of ionic liquid pretreated biomass. **Bioresource Technol.**, v.104, p. 480-485, 2012.

BERNARDO NETO, O. **Integração das principais tecnologias de obtenção de etanol através do processamento de celulose (2ª geração) nas atuais usinas de processamento de cana-de-açúcar (1ª geração).** 2009. 137 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Área de Concentração em Engenharia de Sistemas) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2009

BHAT, S. BHAT, K. M. Food Macromolecular Science Department, Institute of Food Research Reading Laboratory, Earley Gate, Whiteknights Road, Reading, RG6 6BZ, United Kingdom. **Biotechnology advances**, v. 15, p. 583–620, 1997.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.** 2011. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Área de Concentração em Microbiologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, Piracicaba - SP, 2011

BRAGATTO, J. **Avaliação do potencial da casca de Eucalyptus para a produção de bioetanol.** Juliano Bragatto. 2010. 154 f. (Tese Doutorado) Fisiologia e Bioquímica de

Plantas - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2010.

BRAUNBECK, O. A.; CORTEZ, L. A. B. O cultivo da cana-de-açúcar e o uso dos resíduos. In: ROSILLO-CALLE, F.; BAJAY, S. V.; ROTHMAN, H. (Org.). **Uso de biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2005. v. 1, p. 215-246.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**. v. 337, p. 1291-1296, 2002.

CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; DATTA, M.; SHAH, A. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 361-369, 2010.

CHELLAPANDI P.; HIMANSHU M. J. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. **Braz. J. Microbiol.** v.39, n.1, p. 122-127, 2008.

CHEMMÉS, C. S. et al. **Estudo de métodos físico-químicos no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração**. In: XII SEPA - SEMINÁRIO ESTUDANTIL DE PRODUÇÃO ACADÊMICA, UNIFACS, v. 12.

CHERRY, J.R.; FIDANTSEF, A.L.. Directed Evolution of Industrial Enzymes: an Update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 438-443, 2003.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento

Disponível em: www.conab.gov.br

Acesso em Dezembro 2019.

COUTINHO, P. L. A.; BOMTEMPO, J. V. **Uso de roadmaps tecnológicos para favorecer o ambiente de inovação: uma proposta em matérias primas renovável**. In: SIMPOI, 2010.

CUNHA, M. A. A.; SILVA, S. S.; CARVALHO, W.; SANTOS, J. C. **Uso de células imobilizadas em gel de PVA: uma nova estratégia para produção biotecnológica de**

xilitol a partir do bagaço de cana-de-açúcar. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.26, n. 1, p. 61–70, 2005.

DAVE, B. R.; SUDHIR, A. P.; PARMAR, P.; PATHAK, S.; RAYKUNDALIYA, D.; SUBRAMANIAN, R. B. Enhancement of cellulose activity by a new strain of *Thermoascus aurantiacus*: Optimisation by statistical design response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 108 – 115, 2013.

DEL BIANCHI, V. L., MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F. **Biotecnologia industrial: Fermentação em Estado Sólido**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, vol. 2. 2001.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis sp.*RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresour. Technol**, v. 102, p. 6065–6072, 2011.

DING, S.; GE, W.; BUSWELL, J. A. Cloning of multiple cellulase cDNAs from *Volvariella volvacea* and their differential expression during substrate colonization and fruiting. **FEMS Microbiology Letters**, v. 263, n. 2, p. 207–213, 2006.

EL-BAKRY, M.; ABRAHAM, J.; CERDA, A.; BARRENA, R.; PONSÁ, S.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. From wastes to high value added products: novel aspects of ssf in the production of enzymes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 18, p. 1999-2042, 2015.

EL-BONDKLY, A. M. A.; EL-GENDY, M. M. A. Cellulase production from agricultural residues by recombinant fusant of a fungal endophyte of the marine sponge *Latrunculia corticata* for production of ethanol. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 331-346, 2012.

FARINAS, C. S., SCARPELINI, L. M., MIRANDA, E. A., BERTUCCI NETO, V. AND COURI, S. Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 17-26, 2011.

FESTUCCI-BUSELLI, Reginaldo A.; OTONI, Wagner C.; JOSHI, Chandrashekhar P.. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Braz. J. Plant Physiol.**, Londrina, v.19, n.1, p.1-13, Mar. 2007.

- GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E, P. S. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**. v. 51, p. 72-78, 2010.
- HASAN, F., SHAH, A.A. and HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enz. Microb. Technol.**, 39:235–51, 2006.
- HIMMEL, M.E.; RUTH, M.F.; WYMAN, C.E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 10, p. 358-364, 1999.
- HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.301–306, 2005.
- KARMAKAR, M. and R.R. RAY, 2011. Current trends in research and application of microbial cellulases. **Res. J. Microbiol.**, 6: 41-53.
- KIRAN, E. U.; TRZCINSKI, A. P.; NG, W. J.; LIU, Y. Enzyme production from food wastes using a biorefinery concept. **Waste Biomass Valorization**, v. 5, p. 903-917, 2014.
- LI, N.; ZONG, M. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.66, p. 43–54, 2010.
- LIMA, E.F.; ARAÚJO, A.E. ; BATISTA, F.A.S., **Doenças e seu Controle. In: O Agronegócio da Mamona no Brasil.** (Azevedo, D.M.P. e Lima, E.F. ed.) Brasília: Embrapa, Doenças e seu Controle, p.191-212, 2001.
- LONGWEI G., HONGMAN C., HUIHUI W., GUOSHI, K., DAMING R. Optimization of state-solid conditions for the production of cellulose and its hydrolytic potentials by *Trichoderma virride* Sn-0196. **African Journal of Microbiology Research**. v. 8, n. 26, p. 2547-2554, 2014.
- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H van; PRETORIUS, I.S.. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 66, n. 3, p. 506-577. 2002.
- LYND, L. R.; LASER, M. S.; BRANSBY, B. E.; DALE, B. E.; DAVISON, B.; HAMILTON, R. How biotech can transform biofuels. **Nat biotechnology**, v. 26, p. 169– 172, 2008.

- MATOS, A. T. Curso **Sobre Tratamento de Resíduos Agroindustriais**. Viçosa: FEAM/UFV, 2005.
- MATOS, A. T. **Tratamento e Aproveitamento Agrícola de Resíduos Sólidos**. Viçosa, Minas Gerais: Ed. UFV, 2014
- MUSSATTO, S.I. et al., Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, 2010, p.817-830.
- OLSSON, L. et al., Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, 2003, p.612-619.
- PANDEY A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**.13: 81-84, 2003.
- PANDEY, A. **Concise Encyclopedia of Bioresource Technology**. New York: The Haworth Press, 735 p, 2004.
- PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.36, p.14, 2012.
- PELIZER, L. H. et al. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 371-375, 2003.
- PERCIVAL ZHANG, Y. H; HIMMEL, M. E; MIELENZ, F; MUTJE, P. Enzyme deinking of old newspapers with cellulose. **Process Biochemistry**, v.24, p.452-481, 2006.
- PETERS, N. K Doe Bioenergy Reserarch Centers. **Bionergy Science Center**. DOESCO162, p.1-35, 2014.
- PIROTA, R. D. P. B., MIOTTO, L. S., DELABONA, P. S., FARINAS, C. S. Improving the extraction conditions of endoglucanase produced by *Aspergillus niger* under solid- state fermentation. **Braz. J. Chem. Eng.** v.30, n.1, p. 117-123, 2013.
- RHA E, PARK HJ, KIM MO, CHUNG YR, LEE CW and Kim JW .Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**. 201: 105-109, 2001.
- RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnol. Adv.**, 2005.

SADAF, A.; KHARE, S.K. Production of *Sporotrichum thermophile* xylanase by solid state fermentation utilizing deoiled *Jatropha curcas* seed cake and its application in xylooligosachharide synthesis. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 126–130, 2014.

SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, p. 641–646, 2010.

SANTOS, F.A.; QUEIRÓZ, J.H. DE; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M. Potencial da palha de cana-de-aucar para produção de etanol. **Quimica nova**, v.35, n.5, p.1004–1010, 2012.

SANTOS, T. C.; ABREU FILHO, G.; OLIVEIRA, A. C.; ROCHA, T. J. O.; MACHADO, F. D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; MOTA, K. I. A.; FRANCO, M. Application of response surface methodology for producing cellulolytic enzymes by solid-state fermentation from the puple mombin (*Spondias purpurea* L.) residue. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 1-7, 2013.

SANTOS, T. C.; ROCHA, T. J. O.; OLIVEIRA, A. C.; FILHO, G. A.; FRANCO, M. **Aspergillus niger** como produtor de enzimas celulolíticas a partir do farelo de cacau (**Theobroma cacao**). Arq. Inst. Biol., São Paulo, v. 80, n. 1, p. 65-71, 2013.

SANTOS, T.C.; REIS, N. S; SILVA, T. P.; FRANCO M. Prickly Palm Cactus Husk as a Raw Material for Production of Ligninolytic Enzymes by *Aspergillus niger*. **Food Sci. Biotechnol.** v. 25, n. 1, p. 205-211, 2016.

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

SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E. AND BORZANI, W., **Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Blucher, São Paulo (2001).

SINGHANIA, R. R; PATEL, A. K., SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recents advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal, Amsterdam**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.;

GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRERA, M. A.; BOM, E. P. S.; MORAIS, L. M. P.; ARAUJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 4820–4825, 2010.

SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; MATHEW, G.M., PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocelluloses saccharification for bio-ethanol production. **Renew energy**. v. 34, p. 421-424, 2009

SUN, Y.; CHENG, J. Hidrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p.1-11, 2002.

SUN, Y.; CHENG, J.J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethaol production. **Bioresource Technology**, v.96, p.1599-1606, 2005.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, 2013.

UDOP – Usinas e Destilarias do Oeste Paulista.

Disponível em: <http://www.udop.com.br>

Acesso em dezembro de 2019.

VAN BEILEN, J.; LI, Z. Enzyme Technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, n. 4, p. 338-344, 2002.

VARNAI, A., SIIKA, M., VIKARI, L (2010) Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicelulose. **Enzyme and Microbial Technology** 46:185-193.

VICUNA, R.; OYARZUN, E.; OSSES, M. Assessment of various commercial enzymes in the bleaching of radiata pine Kraft pulps. **Journal of Biotechnology**, v. 40, p. 63-168, 1995.

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

WALTER, A.; DOLZAN, P.; QUILODRÁN, O.; OLIVEIRA, J.G.; SILVA, C. P. F.; SEGERSTEDT, A. Sustainability assessment of bio- ethanol production in Brazil

considering land use change, GHG emissions and socio-economic aspects. **Energy Policy**, v. 39, p. 5703-5716, 2011.

WATANABE, H. TOKUDA, G. Cellulolytic Systems in Insects. **Annu. Rev. Entomol.** 2010. 55: 609-32.

ZANDONÁ FILHO, A. **Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas.** Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

ZANELATO, A. I.; SHIOTA, V. M.; GOMES, E.; THOMÉO, J. C. Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora* sp. I-1D3b in a packed bed solid state fermentor. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1536-1544, 2012.

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n.5, p. 452-481, 2006.

Seção 2

Experimental

2 Experimental

2.1 Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados nos ensaios são de grau analítico de pureza. As soluções foram preparadas com água destilada e água ultrapura com resistividade específica de 18,2 M Ω cm, a partir de um sistema de purificação Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2 Experimental artigo 1

2.2.1 Preparo do inóculo

O fungo filamentosso *Botrytis ricini*, foi adquirido da Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (URM-UFPE) sob o número de registo: 5627. A cultura foi previamente crescida em Potato-Dextrose Agar (VETEC®) a 27 °C por 72 h e mantida a 4°C para manutenção. A suspensão de conídios foi preparada a partir do fungo cultivado em ágar batata-dextrose (VETEC®) e ágar-ágar (VETEC®) em frascos Erlenmeyer de 250 mL, durante um período de 7 dias em estufa bacteriológica (SL 222, Solab) a 27 ° C; a coleta dos conídios foi feita com a adição de esferas de vidro estéreis Tween 80 (VETEC®) (0,01% v / v) nos frascos de Erlenmeyer. Para a contagem do número de esporos em suspensão, utilizou-se uma câmara de Neubauer duplamente espelhada e um microscópio binocular, lente de 40X (BIOVAL® L1000).

2.2.2 Obtenção e preparo dos resíduos

Neste estudo foram utilizados diferentes resíduos industriais, tais como: fibra de coco, bagaço de cana-de-açúcar e pó de madeira para a fermentação sólida. Os resíduos foram fornecidos por indústrias localizadas na cidade de Maceió-Alagoas (Brasil) e secas em estufa com circulação de ar (TECNAL) a 50° C por 24 h e trituradas em moinho de laminas do tipo Wiley (ACB LABOR®) até um tamanho de partícula de 2 mm sendo armazenado em recipiente de plástico até que estivesse pronto para uso. A composição físico-química foi realizada para o bagaço de cana-de-açúcar -de-açúcar uma vez que foi o meio que utilizado para a obtenção da endoglucanase nesse estudo. Determinou-se do bagaço de cana-de-açúcar a matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (LIG), celulose (CEL), hemicelulose (HC) de acordo com a

metodologia da Associação de Químicos Analíticos Oficiais AOAC (1995); os valores obtidos foram expressos em “g / 100 g de matéria seca”.

2.2.3 Perfil fermentativo

O perfil fermentativo foi realizado a fim de encontrar a maior atividade de hidrólise e o melhor tempo de fermentação em cada um dos suportes utilizados. Para isso realizou-se a fermentação por 264 horas. A cada 24 horas uma fermentação foi retirada e determinada à atividade endoglucanásica.

2.2.4 Fermentação em estado sólido

Cada frasco Erlenmeyer de 150 mL contendo 5g de resíduos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, fibra de coco e pó de madeira) foi submetido à esterilização em autoclave vertical a 121°C por 20 min. Foram adicionados ao meio a quantidade de 10^7 conídios por grama de substrato e água destilada estéril até atingir umidade desejada (50%) e incubados em câmara de germinação (SL 222, Solab) com temperatura controlada de 27°C por 10 dias.

2.2.5 Extração enzimática

Após a etapa de fermentação, foram adicionados aos meios fermentados 5 mL de tampão acetato de sódio (100 mM / pH 5) para cada 1 g de resíduo. As misturas foram mantidas em incubadora com agitação orbital (Shaker) por 20 minutos a 170 rpm e 25°C. O conteúdo inteiro de cada frasco foi filtrado através de uma peneira, para separar o sólido do extrato enzimático, e o filtrado foi coletado em tubo Falcon e centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos sob refrigeração. Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando-se a parte sobrenadante, a qual foi denominada extrato enzimático bruto.

2.2.6 Determinação da atividade enzimática

A atividade endoglucanásica (CMCase, endo-1,4-β-D-glucanase; EC 3.2.1.4) foi determinada em um meio reacional total de 1 ml contendo 10μL do extrato bruto, frações do isolamento ou enzima purificada, 100μL de solução de CMC (2%) e 190 μL do tampão acetato de sódio (0,1 M / pH 5). Esta mistura foi incubada a 50°C durante 60 min, em seguida foi adicionado 200 μL de DNS e submetido a 100 °C por 10 min, resfriamento e adição 500

μL de água destilada. A liberação de açúcares redutores foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) Miller (1959) em espectrofotômetro a 540 nm (VARIAN CARY 50 BIO).

2.2.7 Fracionamento salino

O extrato enzimático bruto foi fracionado por precipitação com sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ em: 20%, 40%, 60% e 80% (g / 100 mL) Englard e Seifter (1990). Para tal, o sulfato de amônio foi adicionado lentamente a 50 mL do extrato enzimático bruto, sob agitação em banho de gelo, até a obtenção das saturações pretendidas. Depois disso, as amostras foram mantidas na geladeira por 1 hora. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (HITACHI Rx II series) a 15.000g a 4 ° C por 15 min. O sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspensionado em 1,0 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M / pH 5). A eficiência do processo de precipitação com sulfato de amônio foi avaliada através da recuperação da atividade enzimática específica.

2.2.8 Purificação da endoglucanase de *Botrytis ricini* URM 5627

A fração com maior atividade endoglucanásica foi liofilizada e ressuspensa em 1,0 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M / pH 5). Em seguida foi então aplicada no sistema ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare, Uppsala) equipado com uma coluna de Gel filtração, Sephacryl S-100 (60 x 0,5cm), pré-equilibrada com acetato de sódio (0,1 M / pH 5). A cromatografia foi realizada com tampão idêntico ao de equilíbrio a um fluxo de 0,1 mL/min. Recolheram-se frações de 2 ml e analisou-se a atividade enzimática individualmente.

2.2.9 Determinação de proteína total

A concentração de proteína foi determinada de acordo com Bradford (1976) usando albumina de soro de bovino como padrão.

2.2.10 Eletroforese (SDS-PAGE)

Para determinação do perfil proteico, bem como a estimativa do peso molecular da endoglucanase isolada foi realizado uma eletroforese com gel de poliacrilamida na presença de SDS como é descrito por Laemmli (1970), usando o sistema de eletroforese Mini-Protean 3

(Bio-Rad), com um marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Markers, Promega -10 a 225 kDa). Os géis foram corados com nitrato de prata segundo (Santos et. al., 2016).

2.2.11 Temperatura ótima e termoestabilidade

A determinação da temperatura ótima de reação para a atividade de endoglucanase foi realizada em meio padrão para determinação da atividade de endoglucanase (secção 2.3.3). As reações ocorreram em diferentes temperaturas de incubação (20-80°C).

A estabilidade térmica foi avaliada incubando-se 10 µL da fração pura de endoglucanase em tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 5) sob diferentes temperaturas (20-80°C) por 1 h. Em seguida foi adicionado o substrato (CMC) e realizado os ensaios de atividade endoglucanásica nas condições ótimas de temperatura e pH. Ambas as respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo o maior resultado obtido considerado como 100%.

2.2.12 pH ótimo e estabilidade ao pH

O efeito do pH de reação foi investigado na faixa de 2 a 13, sendo os tampões utilizados, (2-3 citrato de sódio 0,05 M), (4-6 Acetato de sódio 0,05 M), (7, 12, 13 Fosfato de sódio 0,05 M), (8 Tris-HCl 0,05 M), (9-11 Glicina 0,05 M).

Para os ensaios de estabilidade ao pH, incubou-se 10 µL da fração pura de endoglucanase nos tampões com diferentes pHs (2-3 citrato de sódio 0,05 M), (4-6 Acetato de sódio 0,05 M), (7, 12, 13 Fosfato de sódio 0,05 M), (8 Tris-HCl 0,05 M), (9-11 Glicina 0,05 M), por 1 h em banho a 50°C. Em seguida foi adicionado o substrato (CMC) e realizado os ensaios de atividade endoglucanásica nas condições ótimas de temperatura e pH. As respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a maior atividade enzimática.

2.2.13 Efeito sob adição de sais

Foram avaliados os efeitos dos sais metálicos MgCl₂, MnCl₂, CaCl₂, CuSO₄, ZnSO₄, FeSO₄, NaCl, sobre a atividade enzimática. Os ensaios consistiram em adicionar ao meio reacional os aditivos salinos na concentração de 10 mmol/L. A atividade enzimática foi

expressa como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade endoglucanásica isolada.

2.2.14 Halotolerância

A tolerância ao sal da endoglucanase de *Botrytis ricini* URM 5627 foi investigada estimando-se a atividade de hidrólise na presença de diferentes concentrações de NaCl. Foi utilizado o tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5, com variação na concentração de NaCl nas reações (0M, 0,01M, 0,05M, 0,1 M, 1M, 2M, 3M, 5M e 6M).

2.2.15 Determinação das constantes cinéticas

Os parâmetros cinéticos foram determinados em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5, variando a concentração do substrato (CMC) 0,05 – 3,5 % sob condições de ensaio otimizadas pelo método padrão mencionada na secção 2.3.3. A constante de Michaelis-Menten (K_m , mg/mL) e a velocidade máxima de reação (V_{Max} , mol/min/mL), foram calculados utilizando o programa GraphPad Prism 8.0. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.2.16 Sacarificação de resíduos agroindustriais

A endoglucanase pura de *Botrytis ricini* URM 5627 foi utilizada para sacarificar bagaço de cana, casca de arroz e farelo de trigo, cedidos por indústrias de Alagoas. O meio de reação foi constituído por 1 mL de tampão acetato de sódio (100 mM / pH 5/ 2M de NaCl), contendo 1% de resíduo que anteriormente foi seco em estufa com circulação de ar (TECNAL) a 50° C por 24 h e triturados em moinho de lâminas do tipo Wiley (ACB LABOR®) até um tamanho de partícula de 2 mm, e 2,5% da enzima pura (1062,32 U/mL). A sacarificação foi realizada em banho 50 ° C por 6, 12 e 24 h. O controle de cada mistura reacional foi realizado sem a utilização da endoglucanase pura. Após a sacarificação, os tubos foram centrifugados (HITACHI Rx II series) a 5.000g a 24°C por 3 min, a parte sobrenadante foi utilizada para estimar a quantidade de açúcares redutores liberados (Miller, 1959).

2.3 Experimental artigo 2

2.3.1 Matéria prima

Neste estudo foram utilizados diferentes resíduos industriais, tais como: bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e casca de arroz, para ambos os pré-tratamentos e sacarificação enzimática. Os resíduos foram fornecidos por agroindústrias localizadas na cidade de Maceió (Brasil), os mesmos foram lavados para remover as impurezas e em seguida secas em estufa com circulação de ar (TECNAL) a 50° C por 24 h e trituradas em moinho de lâminas do tipo Wiley (ACB LABOR®) até um tamanho de partícula de 2 mm sendo armazenado em recipiente de plástico até que estivesse pronto para uso.

2.3.2 Pré-tratamento ácido diluído

Para a realização do pré-tratamento ácido, os resíduos foram pesados (5g) e adicionados em erlenmeyer de 250 mL na proporção de 1:10 (resíduo triturado e seco (g)/volume da solução ácido sulfúrico (0,5%, 1%, 1,5% (v/v))). Em seguida, os erlenmeyers foram fechados e levados à autoclave por 20 min a 120°C. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados do equipamento e resfriados a temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da líquida por filtração a vácuo em papel de filtro qualitativo. A fração líquida foi utilizada para realizar as análises posteriores de AR (açúcar redutor) pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) Miller (1959), além da identificação de possíveis inibidores da enzima celulase por HPLC. As frações sólidas retidas no papel filtro foram lavadas em abundância para remoção do ácido e acondicionadas em estufa a 50°C para secagem e posteriormente utilizados nas caracterizações e sacarificação.

2.3.3 Pré-tratamento biológico

Para a realização do pré-tratamento biológico, cada frasco erlenmeyer de 150 mL contendo 5g de resíduos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e casca de arroz) foi submetido à esterilização em autoclave vertical a 121°C por 20 min. Foram

adicionados ao meio a quantidade de 10^7 conídios de *Botrytis ricini* URM 5627 por grama de substrato e água destilada estéril até atingir umidade desejada (50%) e incubados em câmara de germinação (SL 222, Solab) com temperatura controlada de 27°C por 24, 48, 96 e 150 horas. Após a fermentação, 50 mL de tampão acetato de sódio (100 mM / pH 5) foram adicionados ao substrato fermentado. A fase líquida foi separada por filtração, seguida de centrifugação (15000g) por 5 minutos para remoção de partículas. A fração líquida foi utilizada para realizar as análises posteriores de AR (açúcar redutor) pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) Miller (1959) e dosagem de atividade enzimática de celulase e seus inibidores por HPLC. As frações sólidas foram novamente submetidas à esterilização em autoclave vertical, acondicionadas em estufa a 50°C para secagem e posteriormente utilizadas. As frações sólidas retidas no papel filtro foram lavadas em abundância e acondicionadas em estufa a 50°C para secagem e posteriormente utilizados nas caracterizações e sacarificação.

2.3.4 Análise de composição

A composição físico-química foi realizada para os resíduos “*in natura*” e após o tratamento ácido diluído e biológico. Determinou-se a proteína bruta (PB), lignina (LIG), celulose (CEL), hemicelulose (HC) de acordo com a metodologia da Associação de Químicos Analíticos Oficiais AOAC (1995); os valores obtidos foram expressos em “%, g / 100 g de matéria seca”.

2.3.5 Determinação da atividade celulase

Após o tratamento biológico dos resíduos, foi verificada na fração líquida obtida a atividade enzimática de Fpase, endoglucanase, celobiase, β -glicosidase, para observar suas funções na eficiência do tratamento biológico (Silva et al., 2018; Reis et al., 2018; Daroit et al., 2008).

2.3.6 Análise de FTIR

Os espectros na região do infravermelho médio foram obtidos num espectrofotômetro de infravermelho modelo Nicole-IR, utilizando o brometo de potássio (KBr) como agente dispersante. Inicialmente as amostras e o KBr foram pesados, para a confecção das pastilhas. Foram utilizados os seguintes parâmetros operacionais: faixa espectral de 400-4000 cm^{-1} , 60 scans em modo transmitância, com resolução de 4 cm^{-1} .

2.3.6 Análise de Raio-X e Cristalinidade

A difração de Raio-X foi realizada utilizando o equipamento modelo XRD-6000 da Shimadzu com uma fonte de radiação de $\text{CuK } \alpha$ com voltagem de 30 KV e corrente de 30 mA, com filtro de Ni. Foi utilizado o método de pó para realização desse procedimento. Os dados foram selecionados na faixa de 2θ de 10° a 40° com velocidade de goniômetro de $2^\circ/\text{min}$ com um passo de $0,02^\circ$. O índice de cristalinidade (CrI) das três amostras foi calculado pelo método (Segal et al., 1959). O índice de cristalinidade (IC) é determinado usando a (equação 2).

$$CI (\%) = \left(1 - \frac{h_{am}}{h_{crs}}\right) \times 100 \quad (2)$$

Onde h_{crs} é a altura do sinal mais intenso, e h_{am} a intensidade da difração atribuída à celulose amorfa. A altura de intensidade do material amorfo é tomada perto de 18° para celulose e em torno de 16° para celulose II. Os valores de CI são calculados a partir dos dados originais sem subtrair o fundo (Segal et al., 1959).

2.3.7 Microscopia eletrônica de varredura

A análise de imagem das partículas dos resíduos antes e após os tratamentos foram realizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a análise, foram retirados

fragmentos de aproximadamente 2 mm dos resíduos, estes fragmentos foram fixados a um suporte “Stub” e as micrografias foram realizadas em modo ambiente em aumentos de 1000x.

2.3.8 Sacarificação dos resíduos

Pra o estudo de sacarificação dos resíduos após as melhores condições de tratamento ácido e biológico, foi utilizado a endoglucanase isolada de *Botrytis ricini* URM 5627 (736,59 U/mL) (Silva et al., 2018). O meio de reação foi constituído por 1 mL de tampão acetato de sódio (100 mM / pH 5), contendo 1% de resíduo. A sacarificação foi realizada em banho 50°C por 6, 12 e 24 h. O controle de cada mistura reacional foi realizado sem a utilização da endoglucanase. Após a sacarificação, os tubos foram centrifugados (HITACHI Rx II series) a 5.000g a 24°C por 3 min, a parte sobrenadante foi utilizada para dosagem dos açúcares redutores pelo método DNS Miller (1959) e identificação dos açúcares fermentáveis produzidos ao final do processo com maior produção de açúcares redutores por HPLC, com detecção por índice de refração (RI). O cromatógrafo em questão estava equipado com uma bomba modelo ProStar 210 (Varian), injetor manual modelo 80765 (HAMILTON) com loop de 20 µl, detector de índice de refração modelo 356 LC. A coluna cromatográfica empregada para determinação dos produtos foi a 87H (300 mm x 7,8 mm d.i.; MetaCarb), operando nas seguintes condições: temperatura da coluna: 55 °C; a fase móvel foi uma solução de ácido sulfúrico (0,005 mol.L⁻¹) com fluxo de 0,70 mL.min⁻¹.

2.3.9 Identificação dos inibidores formados após os pré-tratamentos

Após os pré-tratamentos ácido e biológico, os tubos foram centrifugados (HITACHI Rx II series) a 5.000g a 24°C por 3 min, a parte sobrenadante foi utilizada a identificação dos inibidores produzidos ao final do processo por HPLC, com detecção por índice de refração (RI). O cromatógrafo em questão estava equipado com uma bomba modelo ProStar 210 (Varian), injetor manual modelo 80765 (HAMILTON) com loop de 20 µl, detector de índice

de refração modelo 356 LC. A coluna cromatográfica empregada para determinação dos produtos foi a 87H (300 mm x 7,8 mm d.i.; MetaCarb), operando nas seguintes condições: temperatura da coluna: 55 °C; a fase móvel foi uma solução de ácido sulfúrico (0,005 mol.L⁻¹) com fluxo de 0,70 mL.min⁻¹.

2.4 Experimental artigo 3

2.4.1 Enzima

A enzima utilizada nesse estudo foi uma endoglucanase pura (CMCase, endo-1,4-β-D-glucanase; EC 3.2.1.4) halotolerante e termoestável isolada do fungo filamentoso *Botrytis ricini* URM 5627.

2.4.2 Determinação da atividade enzimática

A atividade endoglucanásica (CMCase, endo-1,4-β-D-glucanase; EC 3.2.1.4) foi determinada em um meio reacional total de 1 ml contendo 10μL do extrato bruto, frações do isolamento ou enzima purificada, 100μL de solução de CMC (2%) e 190 μL do tampão acetato de sódio (0,1 M / pH 5). Esta mistura foi incubada a 50°C durante 60 min, em seguida foi adicionado 200 μL de DNS e submetido a 100 °C por 10 min, resfriamento e adição 500 μL de água destilada. A liberação de açúcares redutores foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) Miller (1959) em espectrofotômetro a 540 nm (VARIAN CARY 50 BIO).

2.4.3 Matéria prima

Neste estudo foi utilizado resíduo lignocelulósico, farelo de trigo, fornecido por uma indústria localizada na cidade de Maceió (Brasil). Ele passou por lavagem em água corrente por 30min para remover as impurezas e em seguida foi seco em estufa com circulação de ar (TECNAL) à 50° C por 24 h. O resíduo seco foi triturado em moinho de lâminas do tipo Wiley (ACB LABOR®) até um tamanho de partícula de 2 mm e foi armazenado em recipiente plástico até sua utilização.

2.4.4 Zimografia

Para determinar a atividade e a estabilidade da enzima isolada do *Botrytis ricini* URM 5627 em meio sólido foi feito uma zimografia em gel de poliacrilamida/CMC. Foram aplicados 20 µL da enzima pura com 5 µL de tampão de amostra composto por 0,5 M de Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 10% glicerol; 0.001% azul de bromofenol. As amostras sem aquecimento foram carregadas em gel de descontínuo com gel de empilhamento à 4 % (Acrilamida/Bis-acrilamida) e de separação à 10% (Acrilamida/Bis- acrilamida) contendo 0.1 % de CMC (p/v). A corrida foi realizada a 50 V. Em seguida, o gel de poliacrilamida/CMC foi mergulhado em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5 por 1 hora. Transcorrido esse tempo, o gel foi corado com solução de vermelho do congo 0.2% (p/v) *overnight*. O gel foi descorado com solução de NaCl 2 M por 30 min.

2.4.5 Estabilidade da enzima refrigerada e congelada

A endoglucanase isolada de *Botrytis ricini* URM 5627 foi armazenada refrigerada e congelada à 6°C e -20°C, respectivamente, por 120 dias em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5. A manutenção de sua atividade endoglucanásica foi avaliada ao longo do tempo, com intervalo de 30 dias. Os resultados foram expressos como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade obtida antes da refrigeração (U_0) de 575 U/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.4.6 Sacarificação enzimática do farelo de trigo

Pra o estudo de sacarificação do resíduo de trigo, foi utilizado a endoglucanase isolada de *Botrytis ricini* URM 5627 com atividade (497,3 U/mL) . O meio de reação foi constituído por 1 mL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5, contendo carga do farelo de trigo (1, 2 e 3% p/v) e carga da enzima (3, 4 e 5% v/v). A sacarificação foi realizada em banho à 50°C em

diferentes tempos (4, 8 e 12 horas). O controle de cada mistura reacional foi realizado sem a utilização da endoglucanase. Após a sacarificação, os tubos foram centrifugados (HITACHI Rx II series) à 5.000g à 24°C por 3 min. O sobrenadante foi utilizado para dosagem dos açúcares redutores pelo método DNS (Miller, 1959) a partir de uma curva padrão de glicose (0 a 1 $\mu\text{mol mL}^{-1}$) em espectrofotômetro a 540 nm (VARIAN CARY 50 BIO). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.4.7 Planejamento Box – Behnken para otimização da sacarificação do farelo de trigo

Foi empregado o planejamento Box-Behnken para investigar a influência de diferentes fatores sobre a sacarificação enzimática do farelo de trigo, utilizando a enzima isolada do *Botrytis ricini* URM 5627, e para determinar os níveis mais adequados desses fatores na produção máxima de açúcares redutores. Uma matriz composta de 15 experimentos foi empregada para avaliar a utilização dessa celulase e sua capacidade de hidrolisar o farelo de trigo para a obtenção de açúcares fermentáveis. A matriz incluiu três réplicas no ponto central para estimar o erro experimental; avaliar efeitos quadráticos, lineares e de interação das variáveis; para ajustar um modelo de segunda ordem com termos quadráticos. A quantidade de açúcares redutores formados (mg/g de resíduo de trigo) foi escolhida como valor de resposta e os fatores: tempo (T), carga de substrato % [S] e carga enzimática % [E] foram selecionados como variáveis independentes. Os valores reais e codificados das variáveis independentes podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1: Variáveis e níveis do planejamento Box-Behnken para a otimização da sacarificação enzimática do farelo de trigo endoglucanase isolada de *Botrytis ricini* URM 5627.

Variáveis	Símbolo	Níveis		
		-1	0	+1
Tempo (h)	T	4	8	12
Carga de Substrato %	[S]	1	2	3
Carga enzimática %	[E]	3	4	5

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

A partir dos valores experimentais obtidos como resposta foi construído um modelo polinomial, de segunda ordem, de acordo com a **Equação 1** para avaliar os efeitos das variáveis independentes sobre a resposta, onde Y é a resposta, a_0 é o termo independente e a_i , a_{ii} e a_{ij} são os coeficientes de regressão linear, quadrático e de interação, respectivamente.

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n \cdot \sum_{j=1+1}^n a_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

O nível de significância estatística do modelo gerado foi avaliado por análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$). Os coeficientes de regressão foram avaliados a partir dos efeitos padronizados (com base em t-Student, $p < 0,05$). A qualidade do modelo foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de determinação ajustado (R^2 -adj) e teste de falta de ajuste. Foi utilizado o software Statistica versão 10 (STATSOFT) para análise dos dados e elaboração dos gráficos.

2.4.8 Análise de FTIR

Foram analisadas amostras do farelo de trigo *in natura* e após a sacarificação enzimática. Os espectros na região do infravermelho médio foram obtidos num espectrofotômetro de infravermelho modelo Nicole-IR utilizando o brometo de potássio (KBr) como agente dispersante. Inicialmente as amostras e o KBr foram pesados para a confecção das pastilhas. Foram utilizados os seguintes parâmetros operacionais: faixa espectral de 400-4000 cm^{-1} , 60 scans em modo transmitância, com resolução de 4 cm^{-1} .

2.5 Referências

AOAC - Association of Official Analytical Chemistry, 1995. Official methods of analysis. 16th ed. **AOAC International**, Arlington.

BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72, 248-254.

DAROIT, D.J.; SIMONETTI, A.; HERTZ, P.F.; BRANDELLI, A. 2008. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. **J. Microbiol. Biotechnol.** 18.933-941

ENGLARD, S., SEIFTER, S., 1990. Precipitation techniques. **Methods in Enzymology, Academic Press**, 182, 285-300.

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

MILLER, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.** 31, 426-428.

REIS, N. S., BRITO, A. R.,PACHECO, C. S. V. ,COSTA, L. C. B. , GROSS, E. , SANTOS, T.P., Costa, A. R., Silva, E.G. P.,Oliveira, R. A. ,Aguiar-Oliveira, E., Oliveira, J. R.,Franco, M. 2018 . Improvement in menthol extraction of fresh leaves of *Mentha arvensis* by the application of multi-enzymatic extract of *Aspergillus niger* . **Chem Eng Commun.** 206, 387-397.

SANTOS, C.W.V.; MARQUES, M.E.C.; TENÓRIO, H.A.; MIRANDA, E.C.; PEREIRA, H.J.V., 2016.Purification and characterization of trypsin from *Luphiosilurus alexandri* pyloric cécum. **Biochem. Biophys. Rep.**, 8, 29-33.

SEGAL L, CREELY J.J, MARTIN A.E, CONRAD C.M .1959.An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-Ray diffractometer. **Text Res J** 29.786–794.

SILVA, T. P., DE ALBUQUERQUE, F. S., DOS SANTOS, C. W. V., FRANCO, M., CAETANO, L. C., & PEREIRA, H. J. V. 2018. Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. **Bioresour. Technol**, 270, 263–269.

Seção 3

Artigo 1

3 ARTIGO 1: PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA NOVA ENDOGLUCANASE HALOTOLERANTE E TERMOESTÁVEL DE *BOTRYTIS RICINI* URM 5627

RESUMO: Uma endoglucanase halotolerante com uma massa molecular de 39 kDa foi obtida a partir da fermentação sólida do bagaço de cana-de-açúcar pelo fungo *Botrytis ricini* URM 5627 e isolada utilizando apenas dois processos de purificação: fracionamento com sulfato de amônio e Cromatografia líquida de filtração em gel, resultando em uma atividade de (1289,83U/mL). Após o isolamento procedeu-se as caracterizações bioquímicas, apresentando temperatura e pH ótimos de 50°C e 5, respectivamente. A enzima apresentou-se estável em uma faixa de 39 a 60°C por 60 min e entre os pHs 4 a 6. A atividade enzimática aumentou na presença de Na⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ e diminuiu quando na presença dos íons Ca²⁺, Cu²⁺ e Fe²⁺. A endoglucanase apresentou um perfil halotolerante, uma vez que sua atividade foi aumentada à medida que a concentração de NaCl ficava maior. A máxima atividade foi alcançada em 2 M de NaCl com um incremento de 75% de atividade. A enzima tem K_m de 0,1299 ± 0,0096 mg/ml e V_{max} de 0,097 ± 0,00121 mol/min/mL. Durante a aplicação em ensaios de sacarificação a enzima foi capaz de hidrolisar, bagaço de cana, casca de arroz e farelo de trigo, apresentando a maior produção de açúcares redutores em 24 horas de sacarificação do farelo de trigo (137,21 mg/g). Portanto, todas estas propriedades combinadas fazem desta enzima purificada uma potencial candidata para diversas aplicações biotecnológicas e industriais.

Palavras-chave: Endoglucanase. *Botrytis ricini*. Fermentação sólida. Purificação. Caracterização. Halotolerância.

PRODUCTION, PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF A NEW HALOTOLERANT AND THERMOSTABLE ENDOGLUCANASE OF *BOTRYTIS RICINI* URM 5627

ABSTRACT: A halotolerant endoglucanase with a molecular mass of 39 kDa was obtained from the solid fermentation of sugarcane bagasse by the fungus *Botrytis ricini* URM 5627 and isolated using only two purification processes: fractionation with ammonium sulphate and size-exclusion chromatography resulting in an activity of 1289.83 U/mL. After the isolation, biochemical characterizations were performed, giving a temperature of 50°C and optimum pH

of 5. The enzyme was stable at 39–60°C for 60 min and at a pH of 4–6. The enzymatic activity increased in the presence of Na⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ and Zn²⁺ and decreased in the presence of Ca²⁺, Cu²⁺, and Fe²⁺. The endoglucanase revealed a halotolerant profile since its activity increased proportionally to an increase in NaCl concentration. The maximum activity was reached at 2 M NaCl with a 75% increase in activity. The enzyme had a K_m of 0.1299 ± 0.0096 mg/mL and a V_{max} of 0.097 ± 0.00121 mol/min/mL. During application in saccharification tests, the enzyme was able to hydrolyse sugarcane bagasse, rice husk, and wheat bran, with the highest production of reducers/fermentable sugars within 24 h of saccharification for wheat bran (137.21 mg/g). Therefore, these properties combined make this isolated enzyme a potential candidate for biotechnological and industrial applications.

Keywords: Endoglucanase, *Botrytis ricini*, Solid Fermentation, Purification, Characterization, Application, Halotolerant.

3.1 Introdução

A indústria e agroindústria anualmente geram toneladas de resíduos agrícolas, em sua maioria, constituídos de celulose, hemicelulose e lignina, advindos do processamento de diversas matérias-primas, e isso por sua vez, gera um enorme problema ambiental, devido à disposição e má utilização desses materiais (Pandey et al., 1999). Considerando esse fato, tem-se pensado em diversas estratégias para o emprego destes resíduos e assim agregar valor a estes, de modo a serem reaproveitados na síntese de compostos químicos e produtos de alto valor como biocombustíveis, enzimas, ácidos orgânicos e aminoácidos (Couto & Sanromán, 2006; Badhan et al., 2007; Pensupa et al., 2013; Kiran et al., 2014). Nesse cenário a fermentação em estado sólido (FES) se apresenta como uma técnica bastante promissora, sendo capaz de aproveitar esses subprodutos agrícolas e agroindustriais, como meio de cultivo para microrganismos, principalmente os fungos filamentosos, que se nutrem por meio de suas hifas e secretam enzimas extracelulares com alto valor agregado e possibilidade de emprego biotecnológicos (Pandey et al., 2000; Wang et al., 2008; Singhania, et al., 2009; Orlandelli et al., 2012; Yoon et al., 2014; Kiran et al., 2014).

As celulasas estão entre as enzimas mais comercializadas, dentre elas a endoglucanase, que são enzimas responsáveis pela degradação da celulose, principal composto presente nas células vegetais (Castro et al., 2010). As endoglucanases são muito importantes para a conversão de biomassa e outras aplicações industriais quando iniciam a decomposição da

celulose atuando randomicamente nas regiões internas da fibra celulósica (Bhat, et al. 1997). Para a aplicação biotecnológica de endoglucanases buscam-se características relevantes, tais como estabilidade térmica, capacidade de hidrólise em uma ampla faixa de pH, tolerância a sais e líquidos iônicos. As endoglucanases com essas características podem ser aplicadas nos setores industriais, principalmente na produção de açúcares fermentáveis para a conversão em biocombustíveis (Gao, et al., 2008; Tang, et al., 2012; Ang et al., 2013; Xu, et al., 2014; Kocabas et al., 2015; Akhtar, et al., 2016; Asha, et al., 2016; Hmad, et al., 2016; Ferraz et al., 2017; Idris, et al., 2017).

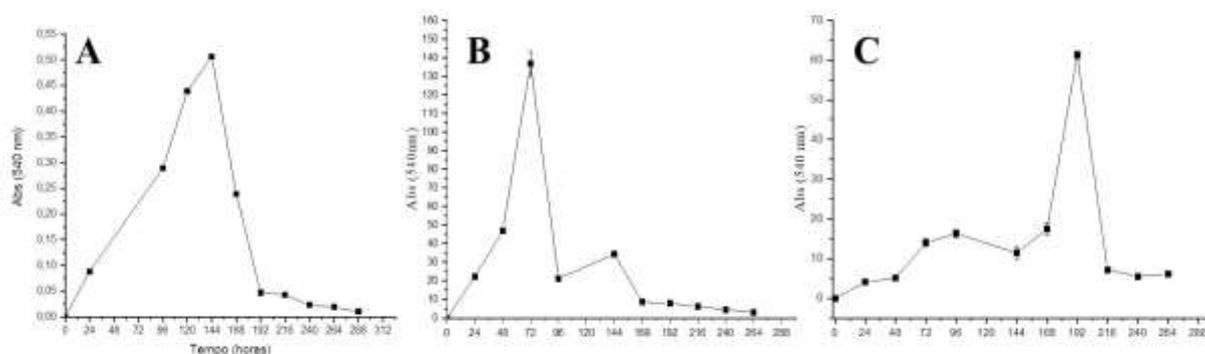
No presente estudo, relatamos a produção, purificação, caracterização e aplicação de uma nova endoglucanase halotolerante e termoestável produzida por *Botrytis ricini* URM 5627, a partir da fermentação sólida de resíduos agrícolas como: bagaço de cana-de-açúcar, fibra de coco e pó de madeira.

3.2 Resultados e discussão

3.2.1 Perfil fermentativo

Os resultados experimentais obtidos a partir das condições de cultivo em meio sólido do *Botrytis ricini* URM 5627 aplicados para otimização da produção da endoglucanase podem ser observados na Figura 1.

Figura 1: Perfil da produção de endoglucanase (U/mL) em fermentações em estado sólido por *Botrytis ricini* URM 5627, (A) bagaço de cana-de-açúcar, (B) fibra de coco, (C) pó de madeira a 27°C e 50% de umidade. Barras representam o desvio das triplicatas e a figura foi obtida com o software OriginPro® v. 8.0.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

São apresentados os perfis de produção da enzima (U/mL) em função do tempo de incubação e os seguintes meios: Cana-de-açúcar (Figura 1A), Fibra de coco Figura (1B) e Pó de madeira (Figura 1 C). A Figura 1 permitiu verificar que o fungo foi capaz de sintetizar a endoglucanase utilizando qualquer um dos meios de cultivo empregados nas condições: temperatura 27°C, 50 % umidade e $10^7/g$ de inóculo, durante as 264 horas sem nenhum tipo de suplementação dos meios sólidos produzidos a partir de resíduos agroindustriais. Esse fato se explica pela capacidade que esse microrganismo possui de desenvolver-se bem em diferentes meios e sob diferentes condições de temperatura (entre 14 a 28°C) e alta umidade relativa (Araújo et al., 2007; Sussel et al.; 2011; Dantas et al., 2012).

Diferentes fontes de carbono foram testadas quanto ao seu efeito na produção da enzima. É possível observar que o *Botrytis ricini* URM 5627, apresentou seu máximo de produção de endoglucanase (extrato bruto), no meio contendo o bagaço de cana-de-açúcar em 144 horas de fermentação sólida (1643,92 U/mL) Figura 1 A, seguido do meio contendo fibra de coco (139,80 U/mL) Figura 1 B em 72 horas e pó de madeira (61,28 U/mL) em 192 horas Figura 1 C. Todos os meios são de natureza celulósica, o que contribuiu para a indução da produção de endoglucanase conferindo a esse fungo um grande potencial para a obtenção das enzimas do complexo celulolítico em baixo custo de produção. É importante ressaltar que o tempo de fermentação, no que diz respeito ao crescimento e decaimento da atividade enzimática ao longo do período está relacionado com a presença e disposição de nutrientes no meio (Santos et al., 2016), uma vez que nas primeiras horas a expressão da atividade da enzima é mais lenta, seguido de um máximo de atividade e posterior queda da mesma, é possível esse comportamento na Figura 1. A produção de endoglucanase depende fortemente da natureza da fonte de carbono utilizada no meio de cultura (Gao et al., 2008).

A obtenção de endoglucanase através da fermentação sólida de resíduos agroindustriais vem sendo cada vez mais difundida, uma vez que a técnica tem um apelo ambiental e tem sido muito eficiente para a nutrição de microrganismos e em consequência a produção de biomoléculas de grande interesse biotecnológico e com baixo custo. Gao e colaboradores (2008) investigaram a produção de endoglucanase, utilizando o *Aspergillus terreus* M11 em palha de milho (581U) e em papel de filtro (243U) umedecidos em meio mineral contendo extrato de levedura. Uma endoglucanase de *Aspergillus niger* foi produzida em bagaço de cana-de-açúcar com 57 U/L (Cunha et al., 2012). O *Trichoderma reesei* RUT C-3 produziu 959.53 IU/gDS de endoglucanase em farelo de trigo (Idris et al., 2017). Diante dos estudos apresentados é possível observar atividades enzimáticas expressivas de endoglucanase, no entanto a maioria destes utilizaram meios suplementados, que deixam o

processo mais oneroso. Nesse estudo os resultados obtidos apresentam maior valor de atividade enzimática (1643,92 U/mL,) Figura 1 A, além disso destaca-se a ausência de suplementação no meio, já que a maior produção de endoglucanase foi em 144 horas, usando somente o bagaço de cana-de-açúcar, água e o microrganismo.

3.2.2 Caracterização do resíduo agroindustrial

Os melhores resultados para obtenção da endoglucanase foram utilizando o cultivo sólido do *Botrytis ricini* URM 5627 no bagaço de cana-de-açúcar e diante disso foi investigado através de análises físico-químicas o potencial nutritivo (*in natura*) e principalmente seu uso como fonte de carbono e nitrogênio além de meio de cultivo microbiano, ainda foi possível verificar o perfil do mesmo após 144 horas sob ação do microrganismo. As composições (% g / 100 g de matéria seca) obtidas *in natura* foram: MS: 75,87% ± 0,16, PB: 1,87% ± 0,21, FDN: 66,08% ± 0,29, FDA: 61,52% ± 0,35, LIG: 38,6% ± 0,21, CEL: 29,88% ± 0,19, HC: 19,63% ± 0,81. O perfil do bagaço de cana-de-açúcar vem sendo bastante estudado, uma vez que ele tem sido alvo de muitas pesquisas na área de alimentação animal, energias renováveis, produção de açúcares fermentáveis, além de que muitos autores apresentaram perspectivas viáveis utilizando o mesmo como suporte para obtenção de enzimas (Pereira et al., 2009; Reis et al., 2001, Bocchini et al., 2005; Mazutti et al., 2006, Muthuvelayudham & Viruthagiri, 2006). Os resultados obtidos nesse trabalho para o bagaço *in natura* estão em concordância com outros apresentados na literatura (Murta et al., 2011, Carvalho et al., 2006), e isso por sua vez o caracteriza como o um substrato promissor para a produção de enzimas celulolíticas, devido tanto ao seu perfil nutricional uniforme, quanto a uma série de fatores que incluem o custo e a viabilidade de obtenção do bagaço de cana-de-açúcar em países como o Brasil com uma produção anual de 607,137 milhões de toneladas (safra 2016/2017) Unica (2018).

No que diz respeito ao comportamento do microrganismo após as 144 horas de cultivo sólido podem ser observadas as composições (% g / 100 g de matéria seca): MS: 32,52% ± 0,26, PB: 3,38% ± 0,31, FDN: 28,89% ± 0,19, FDA: 25,58% ± 0,42, LIG: 14,38% ± 0,29, CEL: 10,17% ± 0,23, HC: 9,52% ± 0,71. Esses resultados apresentam uma mudança no perfil do substrato, fruto da efetiva ação do microrganismo que foi capaz de degradar a matéria celulósica, hemicelulósica e ligninolósica, o que corrobora com os estudos que inferem sobre o grande potencial desse fungo em crescimento em vegetais (Jackson, R.S., 2014). Outro ponto interessante é a capacidade de enriquecimento proteico ocorrido nesse processo, uma

vez que o aumento foi de 90,38%, ratificando a nobreza do processo de fermentação em estado sólido e as possibilidades de aplicação biotecnológica desses produtos em diferentes áreas, seja na alimentação animal, humana, isolamento de enzimas etc. (Pandey, 2003).

3.2.3 Purificação enzimática

O resumo da purificação referente à endoglucanase de *Botrytis ricini* URM 5627, pode ser observada na tabela 1.

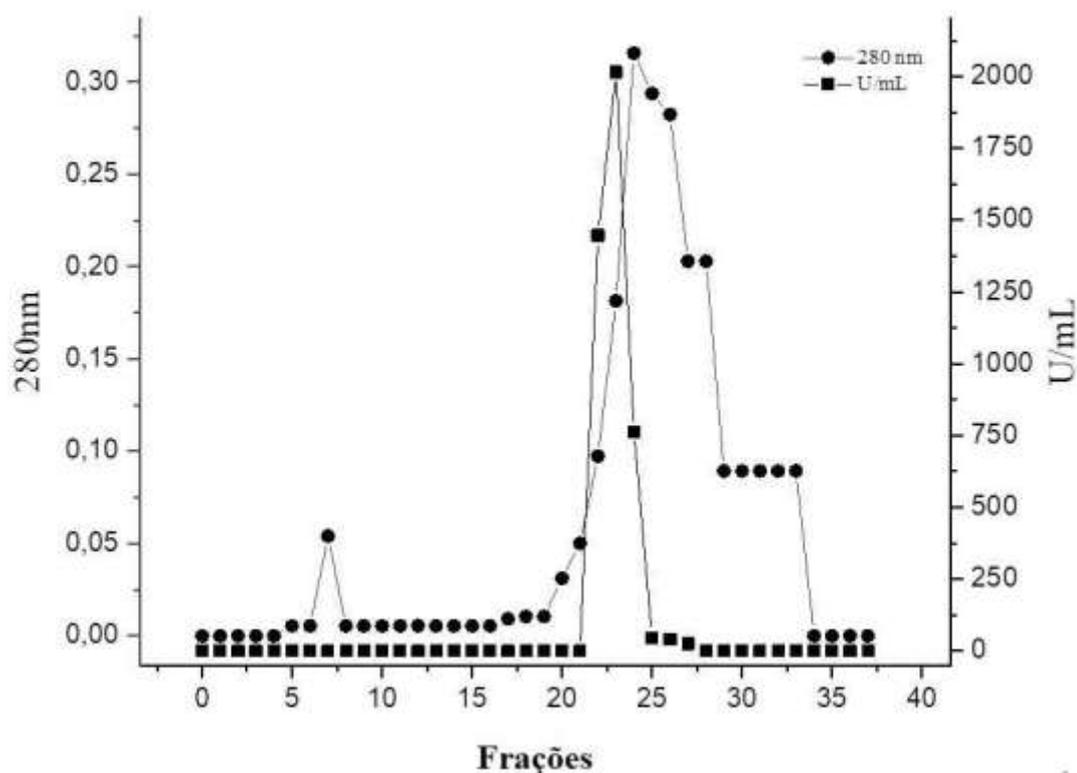
Tabela 1: Resumo da purificação da endoglucanase de *Botrytis ricini* URM 5627.

Etapas de purificação	Atividade total (U/mL)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)
Extrato bruto	1643,92	178,33	9,22	100
80-100% [(NH₄)₂SO₄]	1328,61	111,6	11,91	65,46
Sephacryl S-100	1289,83	22,27	57,92	48,22

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

O extrato bruto foi inicialmente submetido ao fracionamento salino com [(NH₄)₂SO₄] em diferentes proporções, (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100%), a enzima de interesse manteve sua maior atividade (65,46% de recuperação) na última fração (80-100%), a qual foi utilizada para os posteriores ensaios de purificação. Esta fração seguiu para uma coluna de filtração em gel Sephacryl S-100 em tampão acetato de sódio (0,1 M / pH 5), fluxo de 0,1 mL/min, apresentando um único pico de atividade endoglucanásica, conforme apresentado na figura 2.

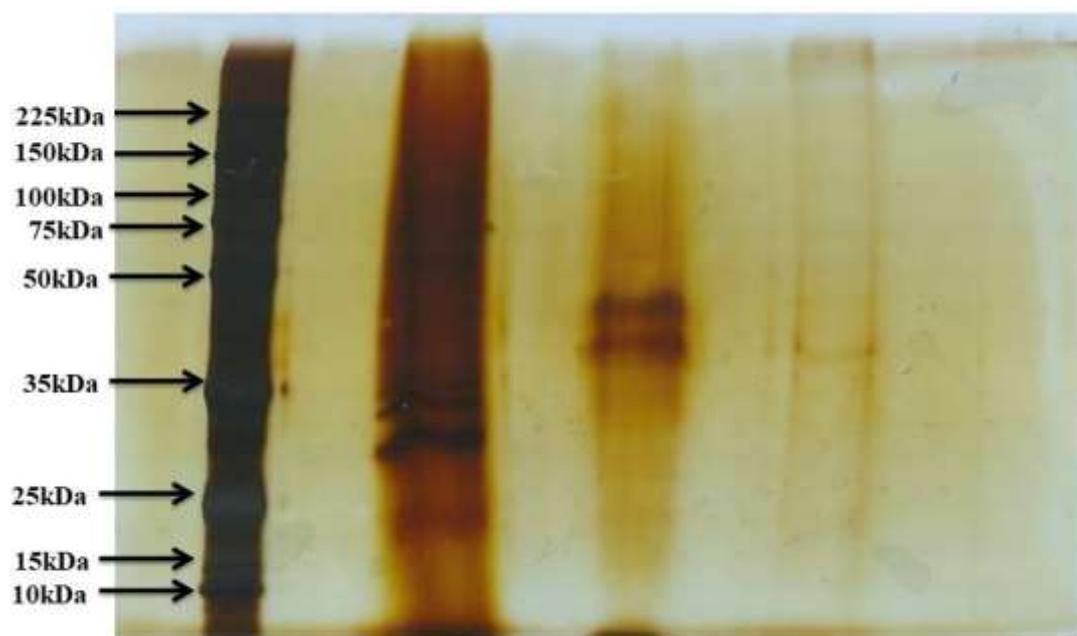
Figura 2: Isolamento da endoglucanase de *Botrytis ricini* URM 5627 por cromatografia em gel filtração em Sephacryl S-100 (1cm × 60cm). A cromatografia foi executada em tampão acetato de sódio (0,1 M / pH 5), fluxo de 0,1 mL/min. A amostra aplicada corresponde fração 80-100% da precipitação com sulfato de amônio. A concentração de proteínas foi estimada por absorbância a 280nm (círculo) e a atividade endoglucanásica pela hidrólise do substrato CMC U/mL (quadrado).



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

A verificação da eficiência do método de purificação foi feita através de um SDS-PAGE 12% (figura 3), que apresentou apenas uma banda proteica com aproximadamente 39 kDa. As massas moleculares de endoglucanases de outros fungos têm sido relatadas na literatura na faixa de 27 a 70 kDa (Sadana et al., 1984; Almeida et al., 2013; Narra et al., 2014). Ainda pode-se concluir que o processo de purificação foi bastante promissor, uma vez que se empregou apenas um método de cromatografia líquida.

Figura 3: SDS-PAGE a 12% corado com prata da endoglucanase purificada de *Botrytis ricini* URM 5627. Linha 1: padrão de peso molecular (kDa); Linha 2: extrato bruto; Linha 3: precipitação salina (80–100%) [(NH₄)₂ SO₄]; Linha 4: enzima purificada correspondente à fração da cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-100.

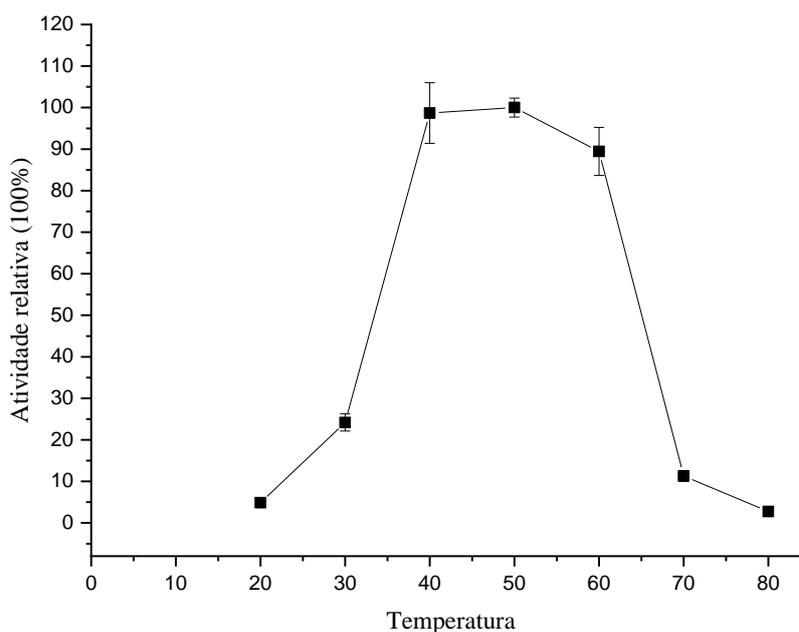


Fonte: elaborado pela autora, 2020.

3.2.4 Temperatura ótima e termoestabilidade

O efeito da temperatura foi avaliado frente na faixa de 20-80°C conforme a figura 4. Nota-se que a atividade relativa da endoglucanase de *Botrytis ricini* URM 5627 aumentou com o incremento da temperatura de reação alcançando seu máximo em 50°C, e reteve 85% de sua atividade máxima a 60°C demonstrando um grande potencial para aplicações industriais. Hmad e colaboradores demonstram o efeito da temperatura sobre a atividade da endoglucanase de *Stachybotrys microspora* encontrou como temperatura ótima 50°C (Hmad et al.,2017). A endoglucanase de *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810 apresentou uma temperatura ótima de 40°C (Asha et al.,2016).

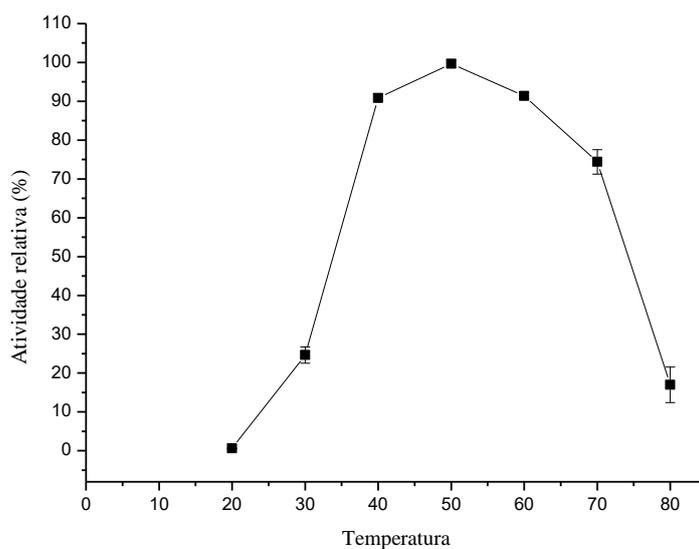
Figura 4: Temperatura ótima: Atividade de endoglucanase obtida em diferentes temperaturas (a atividade mais alta obtida em 50°C foi tomada como 100%). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

A termoestabilidade da endoglucanase pura de *Botrytis ricini* URM 5627 foi avaliada incubando-a na faixa de 20-80°C por 1h, como exposto na figura 5. Os resultados obtidos indicam que a enzima manteve 90% de sua atividade relativa na faixa de 39 a 60°C, demonstrando uma ampla estabilidade térmica, ressaltando que mesmo em 70°C a enzima conseguiu resistir com 75% de sua atividade. Narra e colaboradores observaram que a endoglucanase de *Aspergillus terreus* se mostrou estável durante 30 min a temperatura 30, 40 e 50°C, mantendo 100% de atividade. A enzima foi inativada a 70°C, mantendo 10% de atividade após 30 min de incubação (Narra et al., 2014).

Figura 5: Perfil de termoestabilidade da endoglucanase purificada de *Botrytis ricini* URM 5627 em FES cultivado em bagaço de cana (as reações foram realizadas em pH 5,0). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.

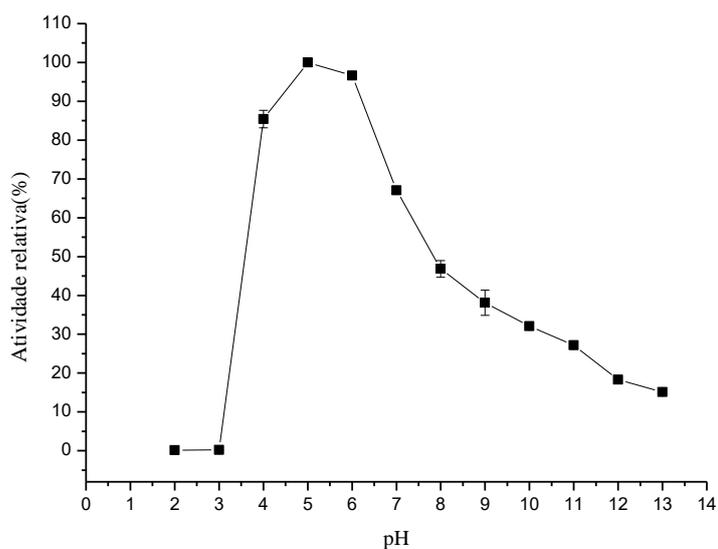


Fonte: elaborado pela autora, 2020.

3.2.5 pH ótimo e estabilidade ao pH

O efeito do pH foi avaliado frente na faixa de 2 a 13, como apresentado na figura 6. Observa-se que a atividade relativa da endoglucanase de *Botrytis ricini* URM foi em pH 5, apresentando 65% da sua atividade nos pHs de 4 a 7. A endoglucanase de *Aspergillus niger* apresentou pH ótimo em 5 (Xue et al., 2018) e infere-se que a maioria das endoglucanases fúngicas apresentam as maiores atividades enzimáticas em pH entre 4 e 5 (Ding et al., 2006).

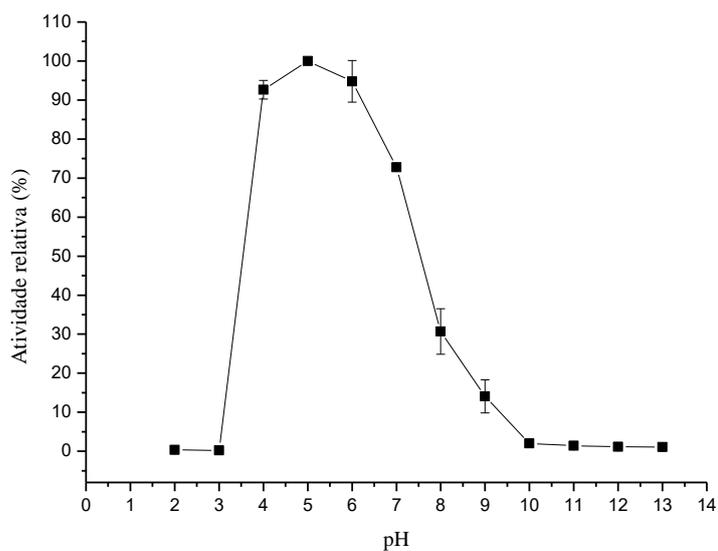
Figura 6: pH ótimo: Atividade de endoglucanase obtida em diferentes pHs (a atividade mais alta obtida em pH 5 foi tomada como 100%). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

A estabilidade ao pH foi avaliada na faixa de 2 a 13 (Figura 7). Os resultados demonstraram que a enzima se manteve estável entre os pHs 4 a 6, mantendo 95% de sua atividade, ainda foi possível observar que em pH 7 a endoglucanase apresentou 75% de sua atividade enzimática relativa. Uma endoglucanase de *Volvariella volvacea* 1 expressa em *Pichia pastoris* mostrou-se relativamente estável na faixa de pH de 4,5 a 7,0, mas foi reduzido nas faixas de pH de 7,5 a 8,0 (Li et al., 2018).

Figura 7: Perfil de estabilidade ao pH da endoglucanase purificada de *Botrytis ricini* URM 5627 em FES cultivado em bagaço de cana (as reações foram realizadas em temperatura de 50°C). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.

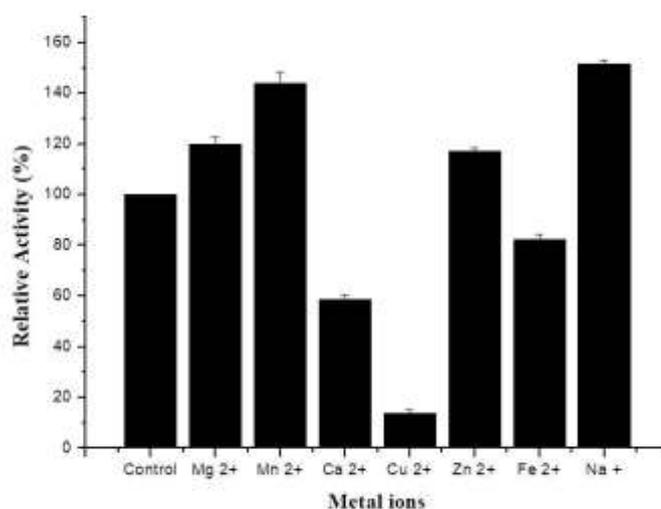


Fonte: elaborado pela autora, 2020.

3.2.6 Efeito sob a adição de sais

O efeito de diferentes íons metálicos sobre a atividade da endoglucanase pode ser observado na figura 8.

Figura 8: Atividade da endoglucanase purificada de *Botrytis ricini* URM 5627 frente a diferentes sais metálicos (a atividade obtida utilizando a enzima purificada sem aditivos foi tomada como 100% - controle; condições de reação: concentração de aditivos: 10 mM; temperatura: 50°C; pH: 5; tempo: 60 min). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

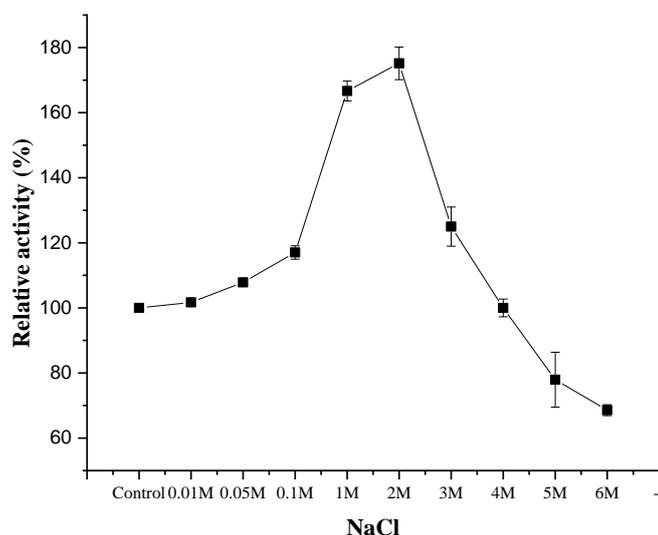
A presença do íon Na^+ exerceu a maior influência aumentando 51,5% da atividade enzimática, as demais espécies Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} aumentaram 43, 25, 15 %, respectivamente. Os íons Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , atuaram inibindo a atividade da endoglucanase, sendo que o íon Cu^{2+} apresentou a maior influência na perda de atividade enzimática, uma vez que, houve uma queda de 86,36% na atividade enzimática na presença desse íon metálico. Segundo Lin (2012), enzimas celulolíticas obtidas a partir de microrganismos, geralmente precisam de cátions divalentes para a estabilização da atividade (Lin et al., 2012). Íons bivalentes, principalmente o Mn^{+2} , Zn^{+2} e Mg^{+2} usados em baixas concentrações podem estabilizar a estrutura terciária da proteína promovendo a formação de ligações cruzadas, que conferindo a ela uma maior estabilidade (Tomazic, 1991; Cordeiro & Martins, 2009). (Wang et al., 2009) reportaram que o íon Na^+ aumentou em 57% da atividade enzimática. O efeito inibidor do íon Cu^{2+} vem sendo relatado para endoglucanase de vários microrganismos (Murashima, et al., 2002; Huy et al., 2016; Phadtare et al., 2017).

3.2.7 Halotolerância

A atividade da endoglucanase de *Botrytis ricini* URM 5627 foi investigada na presença de diferentes concentrações de NaCl (1 a 6 M), comparando com um controle nas condições padrão. Observa-se que a enzima manteve sua atividade em todas as concentrações

de sal, e ainda verificou-se que à medida que a concentração ficava maior a atividade enzimática aumenta conforme figura 9.

Figura 9: Efeito da concentração de NaCl na atividade de hidrólise da endoglucanase purificada de *Botrytis ricini* URM 5627. A atividade da CMCase foi determinada na presença de diferentes concentrações de NaCl variando de 0 a 6,0 M (a atividade obtida utilizando a enzima purificada sem NaCl foi tomada como 100% - controle). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

A enzima apresenta seu máximo de atividade em 2M de NaCl com um incremento de 75% de atividade, e só começa a apresentar perda de 22% de sua atividade em 5 M de NaCl. É notória a importância de se investigar essa característica, uma vez que seu potencial biotecnológico aumenta e sobressai a outras endoglucanases, por se tratar de uma nova propriedade dessa classe (Liang et al., 2011; Xu, et al., 2014). Enzimas resistentes a grandes quantidades de sal são oriundas principalmente de microrganismos halofílicos, em suma as bactérias, no entanto são raras em fungos (Gunde-Cimerman, et al., 2000; Gunde-Cimerman, et al., 2014).

Madern et al., 2000 infere que as enzimas halofílicas são inativadas em concentrações menores que 2M de NaCl no entanto, pode ser observado que a endoglucanase em estudo mantém sua atividade em ambas as situações, com e sem NaCl. Diante disso (Xu, et al., 2014), propõe que enzimas que apresentem esse perfil sejam denominadas halotolerantes, por se tratarem de ser excretadas de microrganismos de habitats não-halofílicos. (Hmad, et al., 2016) estudaram uma endoglucanase de *Stachybotrys microspora*, que foi resistente a NaCl, apresentando um máximo de incremento atividade (52%) em 5 M de NaCl. Uma celulase de *Aspergillus fumigatus*, foi reportada por (Xu, et al., 2014), que aumentou 18% de sua atividade em 2M de NaCl. A celulase de *Aspergillus terreus* UniMAP AA-6, que foi estudada por (Gunny, et al., 2014) apresentou características de tolerância a NaCl.

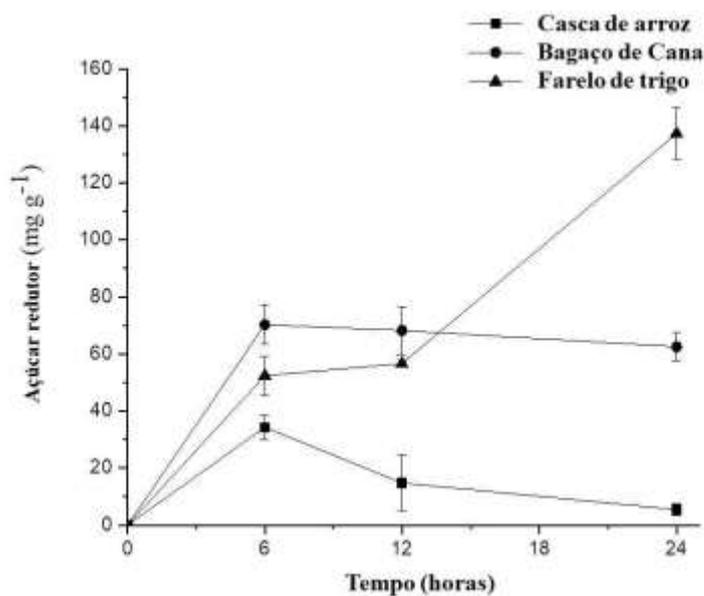
3.2.8 Determinação das constantes cinéticas

As constantes cinéticas K_m e V_{max} da endoglucanase purificada de *Botrytis ricini* URM 5627, foram determinadas pelo modelo cinético de Michaelis–Mentem. A enzima tem K_m de $0,1299 \pm 0,0096$ mg/ml e V_{max} de $0,097 \pm 0,00121$ mol/min/mL. A isoforma de endoglucanase de *R. emersonii* S10 exibiu um K_m de $3,53 \pm 0,32$ mg.mL⁻¹ e um V_{max} de $2,86 \pm 0,04$ μmol/min.mL⁻¹ (Kaur et al. 2007). (Hua et al., 2018) estudando a endoglucanase de *Chaetomium*, encontraram um K_m (mg/ml) 79.19 ± 5.76 e V_{max} (μg/min/ml) 59.64 ± 8.25 . As constantes cinéticas K_m e V_{max} para *Penicillium purpurogenum* foram $1,15$ mg.mL⁻¹ e $225,6$ U mg de proteína⁻¹ respectivamente (Lee et al., 2010). Esses resultados ressaltam a eficiência da enzima isolada em comparação as enzimas citadas na literatura e a destacam para potencial uso na degradação de carboidratos não digeríveis para obtenção de carboidratos fermentáveis a partir de celulose.

3.2.9 Sacarificação de resíduos agroindustriais

A sacarificação da casca de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo empregando a endoglucanase pura de *Botrytis ricini* URM 5627, foi realizada em diferentes intervalos de tempo e os resultados podem ser observados na Figura 10. Estes resultados indicaram que a enzima foi capaz de hidrolisar todos os resíduos utilizados, uma vez que estes são de natureza celulósica (Avci et al., 2013). A maior produção de açúcares redutores pode ser observada em 24 horas de hidrólise do farelo de trigo (137,21 mg/g), os demais resíduos utilizados foram sacarificados em média menos de 50% em relação ao farelo de trigo.

Figura 10: Sacarificação da casca de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo empregando a endoglucanase pura de *Botrytis ricini* URM 5627. A sacarificação foi realizada em banho 50°C por 6, 12 e 24 horas, utilizando uma carga de substrato de 1% e uma carga enzimática de 1062,32 U/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

A sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais para obtenção de açúcares surge como uma alternativa vantajosa em relação à sacarificação química, pois apresenta um alto rendimento em condições suaves, além de ser um processo menos oneroso. Essa técnica vem sendo utilizada principalmente para a produção de açúcares fermentáveis para a de bio-etanol (Ferraz et al., 2017; Sadaf e Khare, 2014; Vicuna et al., 1995). As celulases vêm recebendo destaque na hidrólise de agrosíduos, bem como a utilização das endoglucanases nesse processo tem sido relatado na literatura. Asha et al., 2016 apresentou uma eficiente sacarificação da polpa de coco pré-tratada pela endoglucanase de *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810, apresentando 801,25 mg de glicose/g. Adıgüzel e Tunçer (2017) também relataram a sacarificação da palha de trigo pré-tratada com NaOH, pela endoglucanase de *Actinomadura geliboluensis*, apresentando uma produção e açúcares redutores de 265,1 mg/g. Xu et al (2014), estudando a sacarificação da casca de arroz com líquidos iônicos relataram a obtenção de 0,87 mg/mL de açúcares redutores. Fazendo uma análise desses estudos

apresentados, vale ressaltar que os resíduos agroindustriais utilizados foram submetidos a processos de pré-tratamento físico-químicos antes do processo de sacarificação pelas endoglucanases. Sabe-se que essas etapas de pré-tratamento conseguem facilitar acesso da enzima ao substrato, mas somam custos ao processo podendo torná-lo desvantajoso e oneroso (Ferraz et al., 2017; Pensupa et al., 2013). Neste trabalho a aplicação da endoglucanase pura de *Botrytis ricini* URM 5627 resultou em eficiente sacarificação de agrosíduos sem a utilização de etapas de pré-tratamento (exceto a secagem e trituração do resíduo), tornando-se um processo biotecnológico promissor.

3.3 Conclusão

O *Botrytis ricini* URM 5627 apresentou um grande potencial para a produção de uma endoglucanase por fermentação em estado sólido utilizando o bagaço de cana-de-açúcar como única fonte de nutrientes e energia. A endoglucanase produzida apresenta características destacadas em relação a outras relatadas na literatura, destacando-se, uma alta estabilidade a temperatura e pH, ativação frente a muitos íons metálicos, e halotolerância, além da capacidade de sacarificar diferentes agrosíduos de natureza lignocelulósica sem a necessidade de pré-tratamento. Portanto, todas estas propriedades combinadas fazem desta enzima purificada uma candidata promissora a aplicações biotecnológicas e industriais, tais como, têxteis, sacarificação de lignoceluloses para obtenção de açúcares fermentáveis e produção de biocombustíveis renováveis de segunda geração.

3.4 Artigo Publicado



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresour. Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech

Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627



Tatielle P. Silva^a, Fabiana S. de Albuquerque^a, Cláudio Willian V. dos Santos^b, Marcelo Franco^b, Luiz Carlos Caetano^a, Hugo Juarez Vieira Pereira^{a,*}

^a Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, A. C. Sísíola Campus, (UFAL), 57072-900 Maceió, Alagoas, Brazil

^b Department of Exact Sciences and Technology, State University of Santa Cruz (UESC), 45654-270 Ilhéus, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Endoglucanase
Botrytis ricini
 Solid fermentation
 Purification
 Characterization
 Application
 Halotolerant

ABSTRACT

A halotolerant endoglucanase with a molecular mass of 39 kDa was obtained from the solid fermentation of sugarcane bagasse by the fungus *Botrytis ricini* URM 5627 and isolated using only two purification processes: fractionation with ammonium sulphate and size-exclusion chromatography resulting in an activity of 1289.83 U/mL. After the isolation, biochemical characterizations were performed, giving a temperature of 50 °C and optimum pH of 5. The enzyme was stable at 39–60 °C for 60 min and at a pH of 4–6. The enzymatic activity increased in the presence of Na⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ and Zn²⁺ and decreased in the presence of Ca²⁺, Cu²⁺, and Fe³⁺. The endoglucanase revealed a halotolerant profile since its activity increased proportionally to an increase in NaCl concentration. The maximum activity was reached at 2 M NaCl with a 75% increase in activity. The enzyme had a K_m of 0.1299 ± 0.0096 mg/mL and a V_{max} of 0.097 ± 0.00121 mol/min/mL. During application in saccharification tests, the enzyme was able to hydrolyse sugarcane bagasse, rice husk, and wheat bran, with the highest production of reducers/fermentable sugars within 24 h of saccharification for wheat bran (137.21 mg/g). Therefore, these properties combined make this isolated enzyme a potential candidate for biotechnological and industrial applications.

1. Introduction

Both the industry and agroindustry generate tons of agricultural residue annually, which is mostly composed of cellulose, hemicellulose, and lignin derived from the processing of different raw materials, causing serious environmental issues resulting from the disposition and misuse of such materials (Pandey et al., 2000). In this context, several strategies have been developed regarding the application of these residues to add value and to be reused in the synthesis of chemical compounds and high-value products such as biofuels, enzymes, organic acids, and amino acids (Pemsapa et al., 2013; Kiran et al., 2014).

This is a scenario in which solid state fermentation (SSF) emerges as a promising technique that is able to exploit such agricultural and agroindustrial by-products as cultivation mediums for microorganisms, especially filamentous fungi, which feed through their hyphae and secrete extracellular enzymes with high added value and the possibility of biotechnological applications (Pandey et al., 2000; Wang et al., 2008; Orlandelli et al., 2012; Yoon et al., 2014; Kiran et al., 2014). Therefore, the choice of *Botrytis ricini* URM 5627 is justified because it is a filamentous endophytic fungus isolated from castor bean (*Ricinus*

communis) which presents morphological properties ideal for use in solid state fermentation, besides belonging to a potential genus for secretion of hydrolytic enzymes, including those of the cellulolytic complex, as presented by Cabanne and Donèche (2002), Pathkoulou et al. (2002).

The advances in endoglucanase research have been disseminated over the years in relation to the isolation of microorganisms producing this enzyme, the increase of protein expression by gene mutations, purification and characterization, the understanding of the mechanisms of attack against cellulose, cloning and expression of genes, the determination of three-dimensional structures of cellulases, and the demonstration of the industrial potential of these enzymes, mainly in the production of fermentable sugars for the production of biofuels. Cellulases are among the most commercialized enzymes and include the endoglucanases, enzymes responsible for cellulose degradation, a major compound present in plant cells. Endoglucanases are very important for biomass conversion and other industrial applications when initiating cellulose decomposition by acting randomly in the internal regions of cellulotic fibres (Castro et al., 2011).

For endoglucanases to have biotechnological applications some

* Corresponding author.

E-mail address: hugo.vieira@iqb.ufal.br (H.J.V. Pereira).

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.022>

Received 26 July 2018; Received in revised form 3 September 2018; Accepted 4 September 2018

Available online 05 September 2018

0960-8524/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

3.5 Referências bibliográficas

ADIGÜZEL, A.O., TUNÇER, M. 2017. Production and Characterization of Partially Purified Thermostable Endoxylanase and Endoglucanase from Novel *Actinomadura geliboluensis* and the Biotechnological Applications in the Saccharification of Lignocellulosic Biomass.

BioResources, 12(2), 2528-2547.

AKHTAR, N., GOYAL, D., GOYAL, A., 2017. Characterization of microwave-alkali-acid pretreated rice straw for optimization of ethanol production via simultaneous saccharification and fermentation (SSF). **Energy Convers. Manag.**, 141, 133-144.

ALMEIDA, M.N, FALKOSKI, D.L., GUIMARÃES, V.M, RAMOS, H.J.O., VISSER, E.M., MAITAN-ALFENAS, G.P., DE REZENDE, S.T., 2013. Characteristics of free endoglucanase and glycosydases multienzyme complex from *Fusarium verticillioides*.

Bioresour Technol., 143, 413-422.

ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH, Y.; SURAINI, A. A.; MADIHAH, M.S., 2013. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochem.**, 48, 1293-1302.

ARAÚJO, A. E.; SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M. Doenças e seu Manejo. In: Azevedo, D. M. P.; Beltrão, E.M. 2007. O Agronegócio da Mamona no Brasil. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2, 283-303.

ASHA, P., DIVYA, J. I.S., SINGH, B., 2016. Purification and characterisation of processive-type endoglucanase and β -glucosidase from *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810 through saccharification of delignified coir pith to glucose. **Bioresour Technol.**, 213, 245-248.

AVCI, A., SAHA, B. C., DIEN, B. S., KENNEDY, G. J.; COTTA, M. A. 2013. Response surface optimization of corn stover pretreatment using dilute phosphoric acid for enzymatic hydrolysis and ethanol production. **Bioresour Technol.**, 130, 603-612.

BHAT, M.K. BHAT, S., 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications, **Biotechnol Adv**, 15, 583-620.

BOCCHINI, D. A., OLIVEIRA, O.M.M.F., GOMES, E., SILVA, R. D., 2005. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. **Process Biochem.**, 40(12), 3653-3659.

CASTRO, A. M.; ANDRÉA, T. V.; CARVALHO, D. F.; TEIXEIRA, M. M. P.; DOS REIS, C.L.; FREIRE, D. M. G. 2011. Valorization of residual agroindustrial cakes by fungal production of multienzyme complexes and their use in cold hydrolysis of raw starch. **Waste and Biomass Valorization**, 2, 291-302.

CARVALHO, G.G.P. DE, PIRES, A.J.V., VELOSO, C.M., MAGALHÃES, A.F., FREIRE, M.A.L., SILVA, F.F. DA, SILVA, R.R., CARVALHO, B.M.A. de., 2006. Valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar amonizado com quatro doses de uréia. **Pesq. agropec. bras.**,41, 125- 132.

CORDEIRO , C.A.M., MARTINS, M.L.L., 2009. Production of a polygalacturonase, by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzyme .**Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 29, 135-141.

COUTO, R.S., SANROMÁN, M.A., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry— A review. **J Food Eng.** , 76(3), 291-302.

CUNHA, F.M., ESPERANÇA, M.N., ZANGIROLAMI, T.C., BADINO, A.C., FARINAS, C.S., 2012. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. **Bioresour Technol.**, 112, 270-274.

DANTAS, F. V.; ALMEIDA, R. P.; SILVA FILHO, J. L.; SOARES, D. J. 2012. Efeito da temperatura sobre os componentes monocíclicos de *Amphobotrys ricini* em frutos destacados de mamoneira. **Trop Plant Pathol.** 38,615. 2012.

DING, S.,GE, W., BUSWELL, J. A., 2006. Cloning of multiple cellulase cDNAs from *Volvariella volvacea* and their differential expression during substrate colonization and fruiting. **FEMS Microbiol Rev**,263, 207–213.

FERRAZ, J.L.A.A., SOUZA, L.O., SOARES, G.A., COUTINHO, J.P., DE OLIVEIRA, J.R., OLIVEIRA, E.L., FRANCO, M., 2018 .Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit. **Bioresour Technol.**, 248, Part A, 214-220 .

GAO, J., WENG, H., ZHU, D., YUAN, M., GUAN, F., XI, Y., 2008. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresour Technol.**, 99, 7623-7629.

GUNDE-CIMERMAN, N., ZALAR, P., DE HOOG, S., PLEMENITAŠ, A., 2000. Hypersaline waters in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts. **FEMS Microbiol Ecol.**, 32, 235-240.

GUNDE-CIMERMAN, N., ZALAR, P., 2014. Extremely halotolerant and halophilic fungi inhabit brine in solar salterns around the globe. **Food Technol Biotech.**, 52, 170-179.

HMAD, I.B., BOUDABBOUS, M., BELGHITH, H., GARGOURI, A., 2017. A novel ionic liquid-stable halophilic endoglucanase from *Stachybotrys microspora*, **Process Biochem**, 54, 59-66.

HUA, C., LI, W., HAN, W., WANG, Q., BI, P., HAN, C., ZHU, L., 2018. Characterization of a novel thermostable GH7 endoglucanase from *Chaetomium thermophilum* capable of xylan hydrolysis. **Int J Biol Macromol.**, 8130.

HUY, N.D., NGUYEN, C.L., PARK, H.S., NGUYEN, H.L., CHOI, M. S., KIM, D.H., SEO, J.W., PARK, S. M., 2016. Characterization of a novel manganese dependent endoglucanase belongs in GH family 5 from *Phanerochaete chrysosporium*, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 121, 154-159.

IDRIS, A.S.O., PANDEY, A., RAO, S., SUKUMARAN, R.K., 2017. Cellulase production through solid state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover, **Bioresour Technol.** , 242, 265-271.

JACKSON, R.S., IN BATT, C.A., TORTORELLO, M.L., 2014. Botrytis. Encyclopedia of food microbiology. **Academic Press**, 2, 288-296.

LI, L., HUANG, C., ZHAO, F., DENG, T., LIN, Y., ZHENG, S., LIANG, S., HAN, S. 2018. Improved production and characterization of *Volvarella volvacea* Endoglucanase 1 expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, 1046-5928.

LIANG, L., XUE, D., 2017. Kinetics of cellulose hydrolysis by halostable cellulase from a marine *Aspergillus niger* at different salinities. **Process Biochem.**, 63, 163-168.

KAUR, J.; CHADHA, B.; KUMAR, B.; SAINI, H., 2007. Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. **Bioresour Technol.**, 98, 74–81.

KIRAN, E. U.; TRZCINSKI, A. P.; NG, W. J.; LIU, Y., 2014. Enzyme production from food wastes using a biorefinery concept. **Waste and Biomass Valorization**, 5, 903-917.

KOCABAS, D. S.; GÜDERB, S.; ÖZBENC, N., 2015. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. **J Mol Catal B Enzym.**, 115, 66-75.

LIN, L., KAN, X., YAN, H., WANG, D., 2012. Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. **Electron J Biotechnol.**, 15, 1-7.

MADERN, D., EBEL, C., ZACCAI, G., 2000. **Halophilic adaptation of enzymes. Extremophiles**, 4, 91–98.

MAZUTTI, M., BENDER, J.P. TREICHEL, H., DI LUCCIO, M., 2006. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Enzyme Microb Tech*, 39, 56-59.

MURTA, R. M., CHAVES, M. A., PIRES, A.J.V., VELOSO, C. M., SILVA, F. F., NETO, A. L. R., EUSTÁQUIO FILHO, A., SANTOS, P. E. F., 2011. Desempenho e digestibilidade

aparente dos nutrientes em ovinos alimentados com dietas contendo bagaço de cana-de-açúcar tratado com óxido de cálcio. **R. Bras. Zootec**, 40, 6, 1325-1332.

MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T., 2006. Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. **Afr. J. Biotechnol.**, 5, 1873-1881.

MURASHIMA, K., NISHIMURA, T., NAKAMURA, Y., KOGA, J. MORIYA, T., SUMIDA, N., YAGUCHI, T., KONO, T., 2002. Purification and characterization of new endo-1,4- β -d-glucanases from *Rhizopus oryzae*. **Enzyme Microb Technol.**, 30, 319-326.

NARRA, M., DIXIT, G., DIVECHA, J., KUMAR, K., MADAMWAR, D., SHAH, A. R. 2014. Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. **Int Biodeter Biodegr.**, 88, 150-161.

ORLANDELLI, R.C., ALBERTO, R.N., RUBIN, C.J., PAMPHILE, J.A., 2012. Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae) leaves. **Genet Mol Res.**, 11, 1575–1585.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C., & NIGAM, P., 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, 77(1), 149-162.

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

PANDEY, A., 2003. Solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.**, 13, 81-84.

PENSUPA, N.; JIN, M.; KOKOLSKI, M.; ARCHER, D. B.; DU, C., 2013. A solid state fungal fermentation-based strategy for the hydrolysis of wheat straw. **Bioresour Technol.**, 149, 261-267.

PEREIRA, R. C.; EVANGELISTA, A. R.; MUNIZ, J. A., 2009. Evaluation of sugar cane bagasse subjected to haying and ensiling. **Ciênc. Agrotec.**, 33, 1649-1654.

- PHADTARE,P., JOSHI, S., SATYANARAYANA, T., 2017. Recombinant thermo-alkali-stable endoglucanase of *Myceliophthora thermophila* BJA (rMt-egl): Biochemical characteristics and applicability in enzymatic saccharification of agro-residues. **Int J Biol Macromol.**, 104, 107-116.
- REIS, R. A.; RODRIGUES, L.R.A.; PEREIRA, J.R.A., 2001. Composição química e digestibilidade de feno tratados com amônia anidra ou uréia. **R. Bras. Zootec.**, 30, 666-673.
- SADAF, A.; KHARE, S.K., 2014. Production of *Sporotrichum thermophile* xylanase by solid state fermentation utilizing deoiled *Jatropha curcas* seed cake and its application in xylooligosachharide synthesis. **Bioresour. Technol.** 153, 126–130.
- SADANA, J. C.; LACHKE, A. H.; PATIL, R. V., 1984. Endo-(1,4)- β -D-glucanases from *Sclerotium rolfsii*. Purification, substrate specificity, and mode of action. **Carbohydr. Res.**, 133, 297–312.
- SANTOS, T. C. D.; ABREU FILHO, G.; BRITO, A. R. D.; PIRES, A. J. V.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M., 2016. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. by solid state fermentation of prickly pear. **Rev Caatinga**, 29, 222-233.
- SINGHANIA, R. R; PATEL, A. K., SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem Eng J.*, 44, 13-18.
- SUSSEL, A. A. B.; POZZA, E. A.; CASTRO, H. A.; LASMAR, E. B. C., 2011. Incidência e severidade do mofo-cinzeno-da-mamoneira sob diferentes temperaturas, períodos de molhamento e concentração de conídios. **Summa Phytopathol.**, 37, 30-34.
- TANG, B., PAN, H., TANG, W., ZHANG, Q., DING, L., ZHANG, F., 2012. Fermentation and purification of cellulase from a novel strain *Rhizopus stolonifer* var. *reflexus* TP-02, **Biomass Bioenergy**, 36, 366-372.
- TOMAZIC S.J., 1991. Protein Stabilization. In: Dordick J.S. **Biocatalysts for Industry** , 241-255.

UNICA – União das Indústrias de Cana-de-açúcar. UNICA revisa projeção para safra 2014/2015, aponta moagem maior mas queda na produção total de açúcar e etanol no Centro-Sul. Disponível em: <http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=102> Acesso em : Jun. 2019.

VICUNA, R., OYARZUN, E., OSSES, M., 1995. Assessment of various commercial enzymes in the bleaching of radiata pine Kraft pulps. **J. Biotechnol.** 40, 63-168

YOON, L.W., ANG, T.N., NGOH, G.C., CHUA, A.S.M., 2014. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass Bioenergy**, 67:319–338.

WANG, Q., HOU, Y., XU, Z., MIAO, J., LI, G., 2008. Optimization of cold-active protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 with response surface methodology. **Bioresour Technol.**, 99, 1926-1931.

XU, J., HE, B., WU, B., WANG, B., WANG, C., HU, L., 2014. An ionic liquid tolerant cellulase derived from chemically polluted microhabitats and its application in in situ saccharification of rice straw. **Bioresour Technol.**, 157, 166-173.

XUE, D.S., ZENG, X., LIN, D., YAO, S., 2018. Ethanol tolerant endoglucanase from *Aspergillus niger* isolated from wine fermentation cellar. **Biocatal Agric Biotechnol.**, 15, 19-24.

Seção 4

Artigo 2

4 ARTIGO 2: COMPARAÇÃO ENTRE O PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO E BIOLÓGICO PARA SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E PRODUÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTÁVEIS

RESUMO: Neste trabalho foi realizada a comparação entre diferentes tipos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos (bagaço de cana, farelo de trigo e casca de arroz), o ácido diluído, utilizando o ácido sulfúrico em diferentes concentrações (0,5%, 1%, 1,5% (v/v)) e o biológico, utilizando o fungo endofítico *Botrytis ricini* URM 5627 em diferentes tempos de fermentação sólida (24, 48, 96 e 150 horas). Na análise da composição dos resíduos, antes e após os tratamentos, foi possível observar o aumento da concentração de celulose e perda de hemicelulose e lignina, corroborados com resultados do FTIR e X-ray. O pré-tratamento ácido 1.5% do bagaço de cana apresentou a formação do inibidor, HMF (5-hidroxiacetilfurfural) (148 mg/L), nos demais resíduos não houve formação de inibidores. No pré-tratamento biológico foi verificada a atividade de todas as enzimas do complexo celulolítico, cooperando para a eficiência do processo de desconstrução lignocelulósico, o mais eficiente nesse estudo. Após a sacarificação enzimática dos resíduos pré-tratados observou-se a formação de açúcares fermentáveis, para o pré-tratamento ácido dos Farelo de trigo (0.5% H₂SO₄ por 6h), Bagaço de cana (1.5% H₂SO₄ por 24h), Casca de arroz (1% H₂SO₄ por 6h), foram produzidas 363,97±1,23; 395,54±1,70; 425,37±7,61 de glicose em mg/L, respectivamente, e, 32,68 ± 0,35; 36,12 ± 0,74; 35,95 ± 0,80 de frutose em mg/L. Para o pré-tratamento biológico dos Farelo de trigo (12h), Bagaço de cana (24h), Casca de arroz (6h), foram produzidos 2784,86 ± 3,02; 4357,74 ±7,4; 573,33 ± 3,91 de glicose em mg/L, respectivamente, e, 395,90 ± 3,93; 372,77 ± 2,98; 41,11 ± 3,81 de frutose em mg/L, respectivamente. Diante desses resultados o pré-tratamento biológico se apresenta como o mais promissor, por se tratar de um processo menos oneroso, sem formação de inibidores e

pode ser utilizado como etapa anterior a sacarificação enzimática para a obtenção de açúcares fermentáveis de resíduos agroindustriais.

Palavras-chave: Celulase. *Botrytis ricini*. Biomassa lignocelulósica. Bagaço de cana. Farelo de trigo. Casca de arroz.

COMPARISON BETWEEN THE ACID AND BIOLOGICAL PRE-TREATMENT FOR ENZYMATIC SACARIFICATION OF AGRO-INDUSTRIAL WASTE AND PRODUCTION OF FERMENTABLE SUGARS

ABSTRACT: In this work, a comparison was made between different types of pre-treatments of lignocellulosic materials (sugarcane bagasse, wheat bran and rice husk), the diluted acid, using sulfuric acid in different concentrations (0.5%, 1%, 1.5% (v / v)) and biological, using the endophytic fungus *Botrytis ricini* URM 5627 at different times of solid fermentation (24, 48, 96 and 150 hours). In the analysis of the composition of the residues, before and after the treatments, it was possible to observe the increase in the concentration of cellulose and loss of hemicellulose and lignin, corroborated with FTIR and X-ray results. The 1.5% acid pretreatment of sugarcane bagasse showed the formation of the inhibitor, HMF (5-hydroxymethylfurfural) (148 mg / L), in the other residues there was no inhibitor formation. In the biological pre-treatment, the activity of all enzymes of the cellulolytic complex was verified, cooperating for the efficiency of the lignocellulosic deconstruction process, the most efficient in this study. After the enzymatic saccharification of the pre-treated residues, the formation of fermentable sugars was observed, for the acid pretreatment of Wheat bran (0.5% H₂SO₄ for 6h), Cane bagasse (1.5% H₂SO₄ for 24h), Rice husk (1% H₂SO₄ for 6h), 363.97 ± 1.23 were produced; 395.54 ± 1.70; 425.37 ± 7.61 of glucose in mg / L, respectively, and, 32.68 ± 0.35; 36.12 ± 0.74; 35.95 ± 0.80 fructose in mg / L. For the biological pretreatment of

wheat bran (12h), cane bagasse (24h), rice husk (6h), 2784.86 ± 3.02 were produced; 4357.74 ± 7.4 ; 573.33 ± 3.91 of glucose in mg / L, respectively, and, 395.90 ± 3.93 ; 372.77 ± 2.98 ; 41.11 ± 3.81 of fructose in mg / L, respectively. In view of these results, biological pre-treatment presents itself as the most promising, as it is a less costly process, without the formation of inhibitors, and enzymatic saccharification to obtain fermentable sugars from agro-industrial residues can be used as a previous step.

Keywords: Cellulase. *Botrytis ricini*. Lignocellulosic biomass. Sugarcane bagasse. Wheat bran. Rice husk.

4.1 Introdução

As inúmeras discussões no que diz respeito à importância da sustentabilidade nas atividades produtivas e as preocupações com os problemas relacionados à geração de resíduos agroindustriais tem merecido destaque, uma vez que, se torna cada vez mais necessário o uso de alternativas que substituam o uso de combustíveis fósseis, recursos que são limitados e mostram muitos obstáculos, como emissões de gases de efeito estufa e preços elevados (Ferreira et al., 2016). Deste modo os materiais lignocelulósicos, recurso bio-renovável mais abundante na natureza, de baixo custo, compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina se apresentam como alternativa promissora na obtenção de açúcares fermentáveis para produção de biocombustíveis e outros compostos bioquímicos que podem ser utilizados como base para a produção de novos materiais (Singh et al., 2017, Kassaye et al., 2017, Guo et al., 2018).

A maior dificuldade para o aproveitamento dos resíduos celulósicos está representada pela barreira física formada pela lignina, impedindo o acesso a celulose (Volynets et al., 2017). Vários tipos de pré-tratamentos podem ser aplicados com o objetivo de diminuir o teor de lignina e facilitar a posterior hidrólise enzimática por celulasas (Volynets et al., 2017). Os pré-tratamentos podem ser realizados utilizando ácidos, bases, vapor, ou até mesmo a combinação entre eles (Singh et al., 2015).

O pré-tratamento ácido diluído é realizado com a finalidade de romper a estrutura lignocelulósica por meio da solubilização da hemicelulose no meio ácido, em consequência aumentando a digestibilidade da celulose nas etapas posteriores (Silva-Dernandes et al.,

2017). O tratamento com ácido sulfúrico (H_2SO_4) permite uma elevada reatividade da fibra celulósica, apresentando cerca de 90% de digestibilidade da mesma ao ataque enzimático (Silva-Dernandes et al., 2017). Pré-tratamentos químicos são eficazes para liberar os açúcares e aumentar o processo de deslignificação, no entanto, é o mais amplamente estudado por produzir inibidores para a fermentação (Masran et al., 2016).

O pré-tratamento biológico utiliza microrganismos, principalmente fungos, para tornarem a estrutura do material lignocelulósico mais acessível aos agentes promotores da hidrólise. Ao contrário dos métodos de pré-tratamento físico e químico, os pré-tratamentos biológicos não envolvem alta temperatura e / ou pressão e não requerem ácidos, bases ou qualquer espécie reativa. Além disso, o processo não gera produtos indesejáveis, tais como os inibidores (Madhavan et al., 2017). A atuação desses microrganismos dá-se a partir da secreção de enzimas extracelulares que permitem a remoção de grande parte da lignina da biomassa (Madhavan et al., 2017; Rastogi e Shrivastava, 2017).

O processo para obtenção dos açúcares fermentáveis a partir da biomassa lignocelulósica envolve a etapa de hidrólise ou sacarificação dos polissacarídeos, expostos após a etapa de pré-tratamento. Essa hidrólise pode ocorrer tanto pela ação de ácidos ou enzimas, no entanto o uso de enzimas mostra-se mais promissora devido à seletividade e eficiência das mesmas (Volynets et al., 2017). Nesse processo a celulose é convertida a glicose e as celulasas são as enzimas mais específicas nessa reação (Silva et al., 2018).

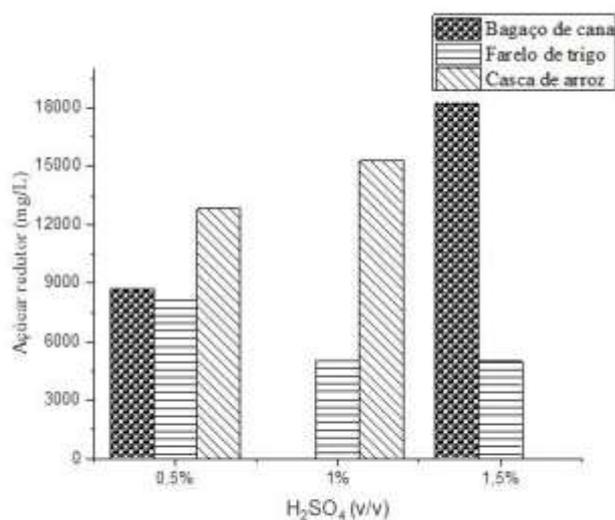
No presente estudo, comparamos o pré-tratamento ácido diluído (H_2SO_4) e o pré-tratamento biológico utilizando o fungo endofítico *Botrytis ricini* URM 5627, para a sacarificação enzimática e obtenção de açúcares fermentáveis.

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Pré-tratamento ácido diluído

O pré-tratamento ácido sulfúrico diluído foi realizado em diferentes concentrações (0.5%, 1%, 1.5% (v/v)), e foram verificados quais eram os maiores teores de açúcar redutor produzido (Figura 1) em cada uma delas. Desta forma, esse critério foi considerado para seguir as etapas de caracterização do resíduo e sacarificação. Nessa etapa de tratamento o ácido atua na estrutura hemicelulósica para liberar as pentoses como xilose e arabinose (Garai e Kumar et al., 2013; Liang et al., 2010). Diante dos resultados, pode-se concluir que a maior obtenção de açúcar redutor para bagaço de cana foi na concentração 1.5% (18,220 mg/L), farelo de trigo 0.5% (8,130 mg/L) e casca de arroz 1% (15,280 mg/L).

Figura 1: Perfil do pré-tratamento ácido em diferentes concentrações e a relação com a quantidade de açúcar redutor liberado.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

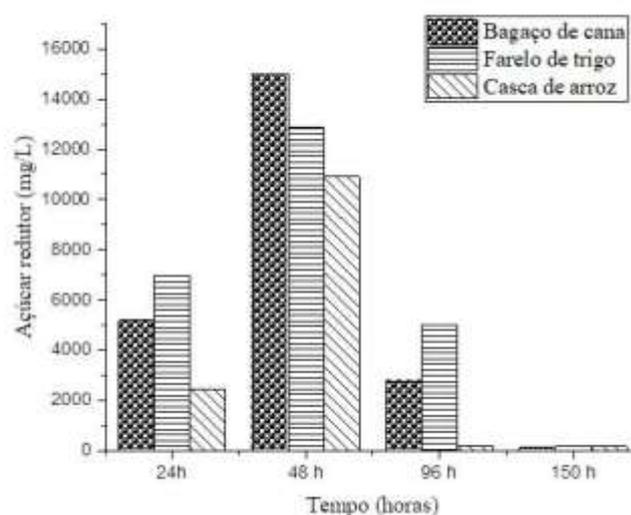
Foram analisados a fração líquida do tratamento ácido do bagaço de cana 1.5%, farelo de trigo 0.5% e casca de arroz 1%, quanto a formação de inibidores. Observou-se a formação de 148 mg/L do inibidor HMF (5-hidroximetilfurfural) no bagaço de cana 1.5%. Os compostos formados durante o processo de pré-tratamento da lignocelulose podem revelar-se inibidores da atividade enzimática, crescimento microbiano e metabolismo. Substâncias químicas potencialmente inibidoras que podem ser liberadas da celulose, hemicelulose e lignina quando empregam tratamentos termoquímicos, como é o caso do ácido diluído sob aquecimento (Behera et al., 2014; Ravindran et al., 2016).

4.2.2 Pré-tratamento biológico

O pré-tratamento biológico, utilizando o fungo *Botrytis ricini* URM 5627 foi realizado em diferentes tempos de cultivo sólido (24, 48, 96 e 150 horas) e foram verificados quais eram os maiores teores de açúcar redutor produzido (Figura 2) em cada uma delas. Desta forma, esse foi o critério considerado para seguir as etapas de caracterização do resíduo e sacarificação enzimática. Diante dos resultados, pode-se concluir que a maior obtenção de

açúcar redutor para bagaço de cana, farelo de trigo e casca de arroz foi em 48 horas de cultivo sólido (15.000 mg/L, 12.860 mg/L e 10.900 mg/L respectivamente). O pré-tratamento biológico destina-se a melhorar a formação de açúcares fermentáveis, além de prevenir a degradação ou perda de carboidratos e a formação de inibidores, bem como reduzir custos-efetivos (Martín-Sampedro et al., 2015; Alvira et al., 2010).

Figura 2: Perfil do pré-tratamento biológico em diferentes tempos e a relação com a quantidade de açúcar redutor liberado.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

O tratamento biológico é influenciado pelas enzimas produzidas pelo microrganismo empregado no processo, e foi possível observar que no extrato bruto (fração líquida do tratamento) apresenta atividade das enzimas (U/mL) que compõem o complexo celulolítico (fpase, endoglucanase, celobiase, β -glicosidase), demonstrando que a presença dessas é importante para a desconstrução estrutural dos resíduos (tabela 1).

Tabela 1: Atividade enzimática verificada na fração líquida do pré-tratamento biológico de Fpase, endoglucanase, celobiase, β -glicosidase, para observar suas funções na eficiência do tratamento biológico.

Fpase (U/mL)	24 h	48h	96h	150h
Bagaço de cana	50,712 \pm 0,9	127,3 \pm 1,1	78,971 \pm 0,8	20,897 \pm 0,91
Farelo de Trigo	41,327 \pm 0,67	116,714 \pm 0,89	63,458 \pm 1,02	25,296 \pm 1,12
Casca de arroz	20,135 \pm 0,35	42,725 \pm 0,93	28,353 \pm 1,17	15,084 \pm 1,13
Endoglucanase(U/mL)	24 h	48h	96h	150h
Bagaço de cana	70,158 \pm 0,38	125,756 \pm 0,27	385,471 \pm 0,93	242,75 \pm 0,97
Farelo de Trigo	50,125 \pm 1,05	80,935 \pm 0,83	182,75 \pm 0,65	91,376 \pm 0,78
Casca de arroz	30,102 \pm 0,9	50,605 \pm 0,8	21,605 \pm 0,91	15,014 \pm 0,87
Glicosidase (U/mL)	24 h	48h	96h	150h
Bagaço de cana	28,351 \pm 0,28	34,139 \pm 0,87	25,075 \pm 0,67	22,342 \pm 1,02
Farelo de Trigo	20,021 \pm 0,37	31,156 \pm 0,71	27,635 \pm 0,89	18,745 \pm 0,97
Casca de arroz	10,575 \pm 0,43	18,074 \pm 0,78	9,015 \pm 1,05	5,935 \pm 0,75
Celobiase(U/mL)	24 h	48h	96h	150h
Bagaço de cana	40,135 \pm 0,87	90,906 \pm 0,13	49,976 \pm 0,78	35,012 \pm 0,32
Farelo de Trigo	38,108 \pm 0,78	75,127 \pm 1,01	35,915 \pm 0,56	29,457 \pm 0,43
Casca de arroz	18,945 \pm 0,63	28,296 \pm 1,25	20,786 \pm 0,78	17,415 \pm 0,58

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Foram analisados a fração líquida do tratamento biológico do bagaço de cana, farelo de trigo e casca de arroz (48h), quanto a formação de inibidores, no entanto não observou a formação de inibidores. Os sistemas de pré-tratamento biológico dependem de agentes biológicos para deslignificar e tornar o processo de hidrólise enzimática mais eficiente. Ao contrário dos métodos de pré-tratamento físico e químico, os pré-tratamentos biológicos não geram produtos indesejáveis, tais como os inibidores (Ravindran et al., 2016) e possuem menores custos operacionais e baixo consumo de reagentes (Alvira et al., 2010; Talebnia et al., 2010).

4.2.3 Análise da composição dos resíduos antes e após os pré-tratamentos

A caracterização da composição química dos resíduos é uma etapa importante, pois colabora na detecção da sua viabilidade para o estudo, uma vez que se trata de uma exploração do potencial destes para os processos de obtenção de açúcares fermentáveis. A composição dos resíduos foi analisada para avaliar o teor de celulose (CEL), hemicelulose (HC), lignina (LIG) e proteína bruta (PB). A composição química do bagaço de cana, farelo de trigo e casca de arroz antes e após os pré-tratamentos ácido e biológico podem ser observadas na (tabela 2). Em ambos os tratamentos o teor de celulose foi aumentado, e diminuído a hemicelulose e lignina. A redução do teor de hemicelulose pode aumentar o acesso enzimático à celulose e reduzir a ligação não produtiva da celulase com açúcares hemicelulósicos (Chang et al., 2017). Além disso, é possível observar o enriquecimento proteico nas amostras tratadas biologicamente, e isso por sua vez ratifica o potencial da fermentação sólida nesse processo. A biomassa microbiana, considerada como um concentrado proteico natural contém proteínas de alto valor biológico, com aminoácidos essenciais (Parajó et al., 1995; Villas Bôas e Esposito, 2000).

Tabela 2: Análise composicional dos resíduos, casca de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo “in natura” e após os pré-tratamento ácido e biológico.

Pré- tratamento ácido	Ligninina	Celulose	Hemicelulose	Proteína bruta
Farelo de trigo (in natura)	7.27% ± 0.29	9.58% ± 0.71	8.75% ± 0.69	16.57%±0.96
Farelo de trigo (0.5%)	4.97% ± 0.81	12.98% ± 0.69	6.58% ± 0.71	19.87% ± 0.87

Bagaço de cana (in natura)	38.6% ± 0.21	29.88% ± 0.19	19.63% ± 0.81	1.87% ± 0.21
Bagaço de cana (1.5%)	19.6% ± 0.11	31.76 % ± 0.25	10.7% ± 0.98	2.25% ± 0.35
Casca de arroz (in natura)	27.98% ± 1.2	37.9 ± 1.8	13.09 ± 0.98	1.68% ± 0.71
Casca de arroz (1%)	22.73% ± 0.98	39.75 ± 1.2	9.95 ± 1.35	2.05% ± 0.35

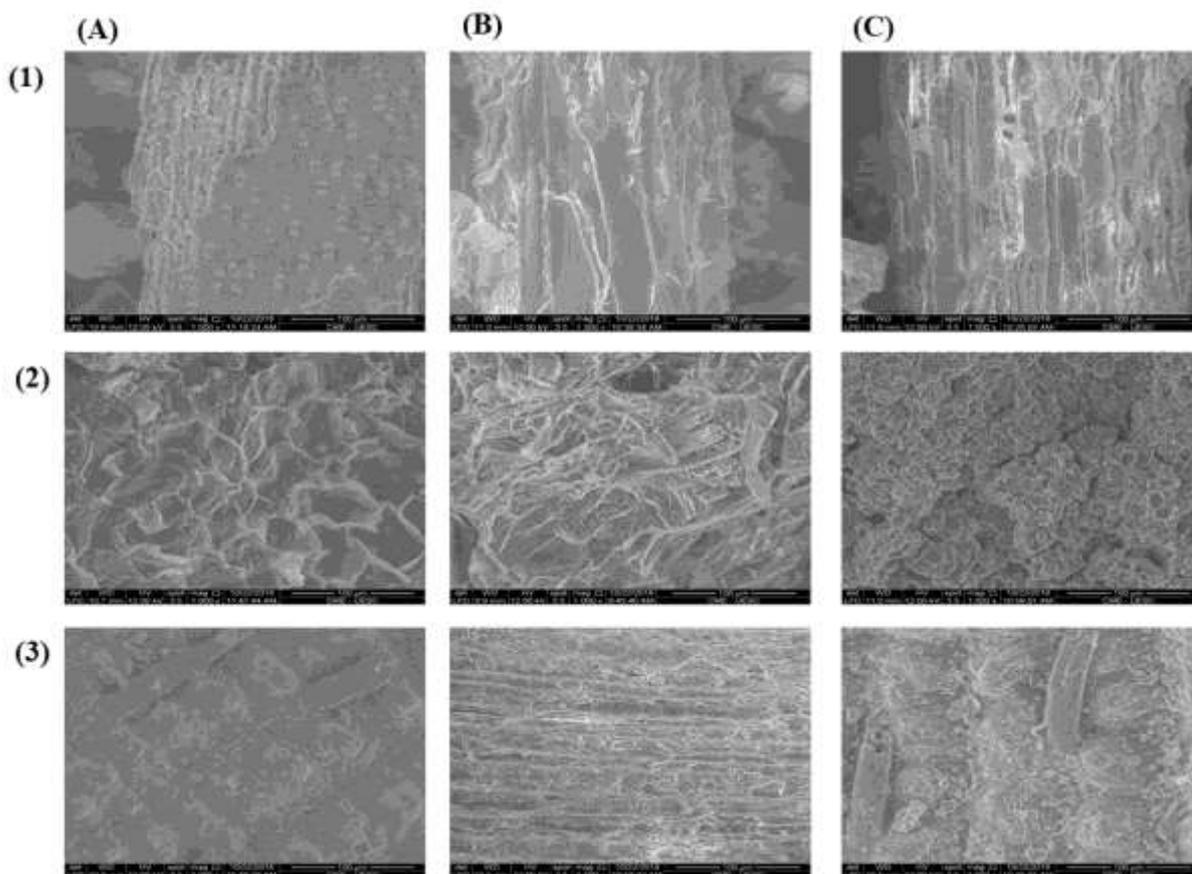
Pré-tratamento biológico	Ligninina	Celulose	Hemicelulose	Proteína Bruta
Farelo de trigo (in natura)	7.27% ± 0.29	9.58% ± 0.71	8.75% ± 0.69	16.57%±0.96
Farelo de trigo (48h)	5.21% ± 0.62	11.58% ± 0.49	7.81% ± 0.35	25.49%±0.68
Bagaço de Cana (in natura)	38.6% ± 0.21	29.88% ± 0.19	19.63% ± 0.81	1.87% ± 0.21
Bagaço de cana (48h)	16.7% ± 0.78	30.76 % ± 0.19	9.75% ± 0.76	2.53% ± 0.97
Casca de arroz (in natura)	27.98% ± 1.2	37.9 ± 1.8	13.09 ± 0.98	1.68% ± 0.71
Casca de arroz (48h)	24.39% ± 1.3	40.94 ± 1.1	11.23 ± 1.2	2.05%±1.03

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

O uso do microscópio eletrônico de varredura é útil na identificação das alterações morfológicas dos resíduos quando submetido aos processos de pré-tratamentos citados. As micrografias apresentadas dos resíduos de bagaço de cana, farelo de trigo e casca de arroz, *in natura* e nelas verifica-se a existência de uma estrutura vegetal bem organizada com fibras lisas, compactas e com poucas rupturas. Essas características são atribuídas à presença da barreira vegetal, formada pela lignina e hemicelulose, que recobre toda a cadeia celulósica (figura 3).

Figura 3: Imagens da microscopia eletrônica de varredura, referentes aos resíduos, A1 (bagaço de cana), A2 (farelo de trigo) e A3(casca de arroz) in natura, B1 (bagaço de cana), B2 (farelo de trigo) e B3 (casca de arroz) após o pré-tratamento ácido e C1 (bagaço de cana), C2 (farelo de trigo) e C3 (casca de arroz) após o pré-tratamento biológico.



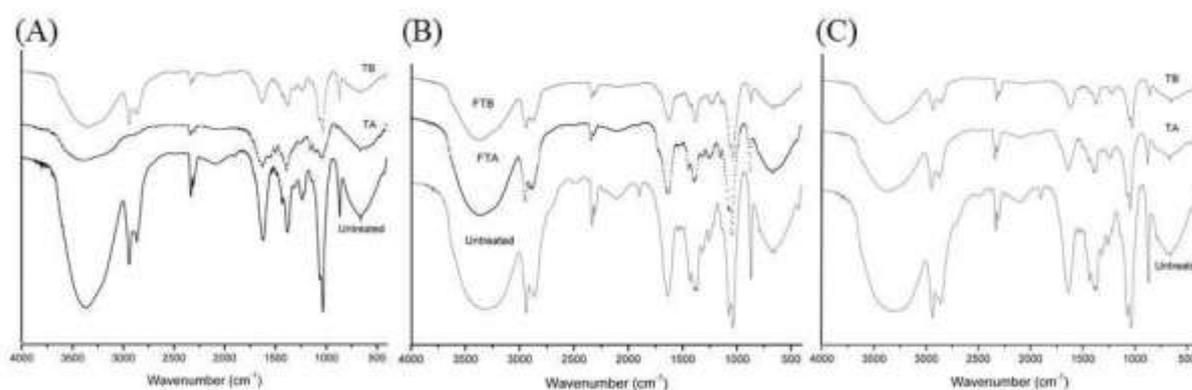
Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Após ambos os tratamentos observa-se uma estrutura menos compacta, com fissuras nas fibras e aumento da área superficial, é possível visualizar uma relevante desestruturação da fibra *in natura*, e a perda da camada protetora com a solubilização / perda mássica, principalmente, da lignina e hemicelulose. Há predominantemente dois tipos de efeitos nas micrografias do tratamento ácido: a abertura de fendas ou canais, e formação de uma parede celular estratificada, ou seja, em várias camadas. Quando realizado o pré-tratamento biológico foram observadas a formação de agregados amorfos. Diante disso, é verificado que os pré-tratamentos provocaram mudanças significativas na estrutura e morfologia dos resíduos, expondo a celulose e em consequência facilitando a acesso da enzima celulase isolada durante o processo de sacarificação.

4.2.5 FTIR

A análise de espectroscopia na região do infravermelho foi realizada com intuito de obter informações sobre os grupos funcionais presentes nos sólidos antes do tratamento e após os tratamentos (figura 4).

Figura 4: Espectros FTIR (A) pré-tratamento ácido (TA) e pré-tratamento biológico (TB) do farelo de trigo, (B) pré-tratamento ácido (TA) e pré-tratamento biológico (TB) do bagaço de cana, (C) pré-tratamento ácido (TA) e pré-tratamento biológico (TB) da casca de arroz.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

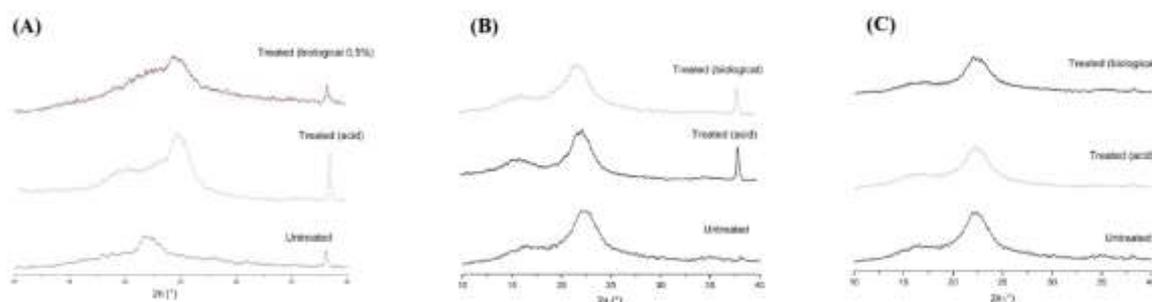
O sinal em 896 cm^{-1} corresponde a ligação glicosídeo β -(1 \rightarrow 4) referente a celulose (Dissanayake et al., 2018). A vibração entre 1200 e 1100 cm^{-1} são atribuídas à hemicelulose e celulose. Em 1144 cm^{-1} corresponde ao alongamento assimétrico de C-O-C (Colom et al., 2003). A região na faixa de 1450 a 1300 cm^{-1} são referentes a diversos acoplamentos moleculares, o que torna complexo o entendimento do espectro, esse superposição é devido a diversos modos vibracionais de lignina e carboidratos. O sinal em torno de 1458 cm^{-1} é relatado como deformação da lignina CH_2 e CH_3 em 1604 cm^{-1} podem ser atribuídas ao alongamento da lignina C=C e C=O referente ao anel aromático. A região em torno de 1515

cm^{-1} é devido ao alongamento C=C indicativo do anel aromático na lignina (Pandey e Pitman, 2003). A absorção em 1733 cm^{-1} é característica da ligação C=O devido ao estiramento de hemicelulose não conjugada. Os sinais em 2850, 2918 são característicos da celulose, devido às ligações simétricas e assimétricas, respectivamente dos grupos CH e CH_2 . Os sinais entre 3800 e 3000 cm^{-1} são relacionados às vibrações das ligações de hidrogênio e do grupo OH referentes celulose. Para todas as biomassas investigadas foi observada a diminuição de sinais referentes à hemicelulose e a celulose após o tratamento ácido e biológico, apontando um possível processo de deslignificação.

4.2.6 Difração de Raio- X

A celulose e hemicelulose presente nos materiais tratados apresentam regiões cristalinas (altamente ordenadas) e o tratamento aplicado resulta em propriedades diferentes para cada biomassa (figura 5).

Figura 5: Espectros de DRX (A) pré-tratamento ácido e pré-tratamento biológico do farelo de trigo, (B) pré-tratamento ácido e pré-tratamento biológico do bagaço de cana, (C) pré-tratamento ácido e pré-tratamento biológico da casca de arroz.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

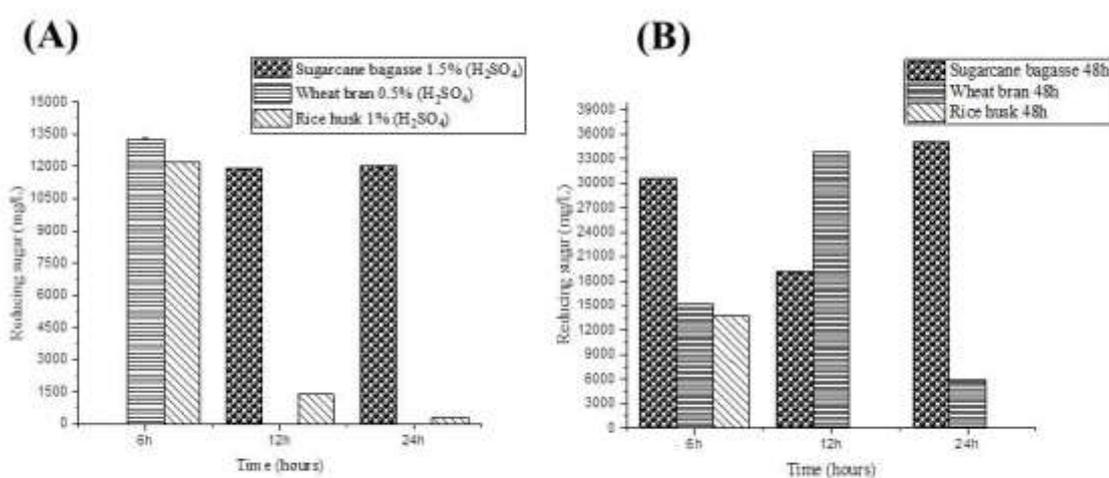
Os índices de cristalinidade para os sólidos não tratados foram de 53,8; 55,1 e 57,7 % para WB (farelo de trigo), SB (bagaço de cana) e RH (casaca de arroz), respectivamente.

Após o tratamento ácido foi observado, para WB e RH, a diminuição da cristalinidade que foi de 53,8% para 11,9 % (WB) e de 57,7% para 55,7 % (RH). Por outro lado, para o SB foi observado o aumento da cristalinidade após esse procedimento que passou de 55,1% para 57,1%. Resultado similar foi observado para o tratamento biológico, no qual foi observada a diminuição da cristalinidade para WB e RH e aumento da cristalinidade para SB. Este efeito pode ser explicado pela remoção de lignina amorfa e hemicelulose que provoca aumento da exposição da celulose, enquanto o inchaço da celulose em tratamento ácido suavizou a estrutura lignocelulósica provocando a diminuição da cristalinidade (Wei e Cheng, 1985).

4.2.7 Sacarificação dos resíduos

A sacarificação enzimática dos resíduos tratados quimicamente e biologicamente foram realizadas em diferentes tempos 6, 12 e 24 h de reação enzimática (figura 6).

Figura 5: (A) Sacarificação da casca de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo empregando, pré-tratados com ácido utilizando a endoglucanase pura de *Botrytis ricini* URM 5627. (B) Sacarificação da casca de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo empregando, pré-tratados biologicamente utilizando a endoglucanase pura de *Botrytis ricini* URM 5627.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Os tempos com maior produção de açúcares redutores tiveram os açúcares formados identificados por HPLC. Foi observado em ambos os tratamentos a formação de glicose e frutose, e que o tratamento biológico se mostrou superior ao ácido no que diz respeito à quantidade de açúcares formados (tabela 3). Os pré-tratamentos fúngicos apresentam várias vantagens, quais sejam, menos onerosos, menores gastos energéticos, dispensa o uso de aditivos químicos, realizado em condições ambientais moderadas e nenhuma emissão de inibidores para a fermentação (Martín-Sampedro et al., 2015).

Tabela 3: Identificação e concentração dos açúcares redutores formados a partir da sacarificação dos resíduos de trigo, cana e arroz após o pré-tratamento ácido e biológico.

<i>Pré tratamento ácido</i>	Glicose (mg/L)	Frutose (mg/L)	Açúcar total (mg/L)
Farelo de trigo (6h)	363,97 ±1,23	32,68 ± 0,35	396,65 ± 0,8
Bagaço de cana (24h)	395,54±1,70	36,12 ± 0,74	431,66 ± 1,22
Casca de arroz (6h)	425,37±7,61	35,95 ± 0,80	461,32 ± 4,02
<i>Pré tratamento biológico</i>	Glicose (mg/L)	Frutose (mg/L)	Açúcar total (mg/L)
Farelo de trigo (12h)	2784,86 ± 3,02	395,90 ± 3,93	3180,76 ± 3,4
Bagaço de cana (24h)	4357,74 ± 7,4	372,77 ± 2,98	4730,51 ± 5,6
Casca de arroz (6h)	573,33 ± 3,91	41,11 ± 3,81	466,48 ± 3,86

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Existem poucos estudos utilizando fungos endofíticos em pré-tratamento de material lignocelulósico, na maioria das vezes baseiam-se no uso de microrganismos (como fungos da podridão parda, branca e mole) capazes de degradar a lignina e hemicelulose (Alvira et al.,2010). Observa-se que os fungos endofíticos (principalmente ascomicetes) não foram

previamente utilizados para este fim. Esses fungos habitam tecidos vegetais assintomáticos, vivendo em simbiose com seus hospedeiros. A extensão da enorme diversidade desses fungos permanece desconhecida, tornando-os fontes potenciais de ferramentas biotecnológicas para usos múltiplos. A atividade altamente específica de fungos endofíticos como degradadores primários de substratos lignocelulósicos aos quais eles são adaptados por processos evolutivos provavelmente melhora a eficiência de pré-tratamentos biológicos (Martín-Sampedro et al., 2015). Isso por sua vez caracteriza o *Botrytis ricini* URM 5627 como um fungo endofítico potencial para aplicações em pré-tratamentos biológicos.

4.3 Conclusão

O pré-tratamento biológico utilizando o *Botrytis ricini* URM 5627 apresentou uma grande superioridade ao pré-tratamento ácido na exposição da celulose como visto nos resultados obtidos na microscopia eletrônica de varredura, FTIR e DRX. A ruptura das fibras facilitou o acesso da celulase pura no processo de sacarificação dos resíduos pré-tratados com a formação de açúcares redutores (glicose e frutose). Após a sacarificação enzimática dos resíduos pré-tratados observou-se a formação de açúcares fermentáveis, para o pré-tratamento ácido dos Farelo de trigo (0.5% H₂SO₄ por 6h), Bagaço de cana (1.5% H₂SO₄ por 24h), Casca de arroz (1% H₂SO₄ por 6h), foram produzidas 363,97±1,23; 395,54±1,70; 425,37±7,61 de glicose em mg/L, respectivamente, e, 32,68 ± 0,35; 36,12 ± 0,74; 35,95 ± 0,80 de frutose em mg/L. Para o pré-tratamento biológico dos Farelo de trigo (12h), Bagaço de cana (24h), Casca de arroz (6h), foram produzidos 2784,86 ± 3,02; 4357,74 ± 7,4; 573,33 ± 3,91 de glicose em mg/L, respectivamente, e, 395,90 ± 3,93; 372,77 ± 2,98; 41,11 ± 3,81 de frutose em mg/L, respectivamente.

Esses resultados representam um considerável avanço, uma vez que, se trata de processo menos oneroso, que não gera produtos indesejáveis, tais como os inibidores, e isso por sua vez possibilita a utilização desse método de pré-tratamento antes da sacarificação enzimática, para a obtenção de açúcares fermentáveis, que podem ser utilizados na produção de biocombustíveis renováveis.

4.4 Referências Bibliográficas

ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., NEGRO, M.J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review **Bioresour. Technol.**, 101.2010. 4851-4861.

BEHERA, S., ARORA, R., NANDHAGOPAL, N., KUMAR, S., 2014. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renew. Sust. Energy Rev.** 6, 91–106.

CHANG, K., CHEN, X., WANG, X., HAN, Y., POTPROMMANEE, L., LIU, J., LIAO, Y., NING, X., SUN, S., HUANG, Q., 2017. Impact of surfactant type for ionic liquid pretreatment on enhancing delignification of rice straw. **Bioresour. Technol.** 227, 388-392.

COLOM, X., CARRILLO, F., NOGUE'S, F., GARRIGA, P. **Structural analysis of photodegraded wood by means of FTIR spectroscopy.** 2003. 80, 543–549.

DISSANAYAKE, N., THALANGAMAARACHCHIGE, V.D., TROXELL, S., QUITEVIS, T.L., ABIDI, N. 2018. Substituent effects on cellulose dissolution in imidazolium-based ionic liquids. **Cellulose** .25, 6887–6900.

FERREIRA, J.A., MAHBOUBI, A., LENNARTSSON, P.R., TAHERZADEH, M. J., 2016.

Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects.

Bioresour. Technol., 215, 334-345.

GARAI, D.; KUMAR, V. A. 2013. Box-Behnken design approach for the production of

xylanase by *Aspergillus candidus* under solid state fermentation and its application in

saccharification of agro residues and *Parthenium hysterophorus* L. **Ind. Crops Prod.** 44,

352-363.

GUO, H., CHANG, Y., LEE, D.J. 2018. Enzymatic saccharification of lignocellulosic

biorefinery: Research focuses. **Bioresour. Technol.**, 252, 198-215.

KASSAYE S., PANT K.K., JALIN S. 2017. Hydrolysis of cellulosic bamboo biomass into

reducing sugars via a combined alkaline solution and ionic liquid pretreatment steps. *Renew.*

Energy 104, 177–184.

LIANG, Y., SIDDARAMU, T., YESUF, J., SARKANY, N., 2010. Fermentable sugar release

from jatropha seed cakes following lime pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Bioresour.**

Technol. 101, 6417–6424.

MADHAVAN, A. R., SINDHU R., BINOD P., SUKUMARAN, R.K. Pandey A.

2017. Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. **Bioresour.**

Technol., 245 , 1304-1313.

MARTÍN-SAMPEDRO, R., FILLAT, Ú., IBARRA, D., EUGENIO, M.E. 2015. Use of new endophytic fungi as pretreatment to enhance enzymatic saccharification of *Eucalyptus globulus* **Bioresour. Technol.**, 196.383-390.

MASRAN R., ZANIRUN Z., BAHRIN E.K., IBRAHIM M.F., YEE P.L., ABD-AZIZ S. 2016. Harnessing the potential of ligninolytic enzymes for lignocellulosic biomass pretreatment. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 100, 5231–5246.

PANDEY, K.K. PITMAN, A.J. 2003. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. **Int. Biodeterior. Biodegradatio**, 52, 151-160.

PARAJÓ, J.C., SANTOS, V., DOMINGUEZ, H., VASQUEZ, M., ALVAREZ, C. 1995. Protein concentrates from yeast cultured in wood hydrolysates. **Food Chem.** 53. 157-163 .

RASTOGI, M., SHRIVASTAVA, S. 2017. Recent advances in second generation bioethanol production: an insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes **Renewable Sustainable Energy Rev.**, 80,330-340.

RAVINDRAN, R., JAISWAL, A.K. 2016. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. **Bioresour. Technol.**, 199. 92-102.

SILVA, T. P., DE ALBUQUERQUE, F. S., DOS SANTOS, C. W. V., FRANCO, M., CAETANO, L. C., & PEREIRA, H. J. V. 2018. Production, purification, characterization and

application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. **Bioresour. Technol.** 270, 263–269.

SILVA-DERNANDES T., SANTOS J.C., HASMANN F., RODRIGUES R.C.L.B., FILHO I.H.J., FELIPE M.G.A. 2017. Biodegradable alternative for removing toxic compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates for valorization in biorefineries. **Bioresour. Technol.** 243, 384–392.

SINGH, J., SUHAG, M., DHAKAC, A., 2015, Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review, **Carbohydrate Polymers** v. 117, pp. 624–631.

SINGH Y.D., MAHANTA P., BORA U. 2017. Comprehensive characterization of lignocellulosic biomass through proximate, ultimate and compositional analysis for bioenergy production. **Renew. Energy** 103, 490–500.

VILLAS-BÔAS, S.G., ESPOSITO, E. & DE MENDONÇA, M.M. 2002. Novel lignocellulolytic ability of *Candida utilis* during solid-substrate cultivation on apple pomace. **World J Microbiol Biotechnol** 18. 541–545.

VOLYNETS B., EIN-MOZAFFARI F., DAHMAN Y. 2017. Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. **Green Process. Synth.** 6, 1–22.

WEI, C.-J., & CHENG, C.Y. 1985. Effect of hydrogen peroxide pretreatment on the structural features and the enzymatic hydrolysis of rice straw. **Biotechnol. Bioeng.**, 27, 1418–1426.

Seção 5
Artigo 3

5 ARTIGO 3: UTILIZAÇÃO DO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN E ANÁLISE POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (RSM) PARA A OTIMIZAÇÃO DA SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO FARELO DE TRIGO

RESUMO: O potencial da matéria-prima lignocelulósica tem sido amplamente estudado, principalmente para a obtenção de bioprodutos. O presente estudo teve como objetivo promover, via planejamento Box-Behnken e análise por metodologia de superfície de resposta (RSM), a otimização da sacarificação enzimática do farelo de trigo para produzir açúcares fermentáveis. Verificou-se a atividade endoglucanásica em meio sólido através de ensaio zimográfico e a estabilidade enzimática em diferentes temperaturas e tempos de armazenamento. O farelo de trigo foi submetido à sacarificação pela endoglucanase isolada de *Botrytis ricini* que produziu açúcares redutores, nas condições, carga do farelo de trigo (1, 2 e 3% p/v) e carga da enzima (3, 4 e 5% v/v) em banho à 50°C em diferentes tempos (4, 8 e 12 horas). Os parâmetros: tempo de sacarificação, carga de substrato e carga enzimática foram otimizados utilizando o planejamento Box-Behnken e a análise por metodologia de superfície de resposta. O farelo de trigo foi caracterizado por FTIR, antes e após a sacarificação. A enzima apresentou atividade satisfatória em meio sólido e manteve-se estável mesmo após 120 dias de refrigeração e congelamento. A atividade enzimática foi mantida em 86,08% e 78,78% após o armazenamento por 120 dias em 6°C e -20 °C, respectivamente. As análises de FTIR demonstraram processo de deslignificação e afrouxamento da celulose. A enzima foi capaz de sacarificar o farelo de trigo em todas as combinações das variáveis investigadas de acordo ao planejamento. A maior produção de açúcares redutores (116,93 mg/g) ocorreu quando as condições foram mantidas no ponto central do planejamento (tempo de 8 h, carga de substrato 2% e carga enzimática 4%). A enzima isolada de *Botrytis ricini* foi estável em meio sólido e capaz de sacarificar o farelo de trigo sem pré-tratamento. O alto rendimento na produção de açúcares redutores demonstra a eficácia da otimização da sacarificação como processo alternativo e promissor para obtenção de açúcares fermentáveis na sacarificação de farelo de trigo por endoglucanase de *Botrytis ricini*.

Palavras - Chave : Box- Behnken. Endoglucanase. *Botrytis ricini*. Açúcar fermentável.

Box–Behnken experimental design for the optimization of enzymatic saccharification of wheat bran

Abstract: The potential of lignocellulosic raw material has been widely studied, mainly for obtaining bioproducts. The aim of this study was to find out the optimum conditions to produce fermentable sugars using wheat bran, *Botrytis ricini* URM 5627 halotolerant and thermostable endoglucanase and Box–Behnken experimental design, one of the response surface methodologies. The zymographic assay in polyacrylamide gel was performed and stained with Congo red after hydrolysis. Enzymatic activity measurements were made to determine enzyme stability at different temperatures (-20°C and 6°C) and periods (up to 120 days). Wheat bran characterization by the Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) before and after the enzymatic saccharification was done. The saccharification time, substrate load, and enzyme load parameters were optimized using Box–Behnken design. The zymogram demonstrated a single activity band in the 39 kDa region indicating the molecular weight of the *B. ricini* URM5627 endoglucanase. Enzyme activity was preserved at 78.78% and 86.08% after storage for 120 days at -20°C and 6°C, respectively. The FTIR analyses showed cellulose delignification and loosening after enzymatic action. The highest production of reducing sugars (116.93 mg g⁻¹) occurred when conditions were maintained at the central point of planning (8 h, 2% substrate load and 4% enzyme load), close to the actual value obtained (117.75 mg g⁻¹). The enzyme isolated from *B. ricini* was stable in solid medium and storage, being able to saccharify wheat bran without pre-treatments. The high yield in the production of reducing sugars and the proximity between predicted and real values demonstrated the effectiveness of statistical optimization, which was shown to be an alternative and promising process for obtaining fermentable sugars.

Keywords: Response surface methodology, endoglucanase, agro-industrial residue, fermentable sugar

5.1 Introdução

Os resíduos lignocelulósicos são produzidos em grande quantidade pelas indústrias de alimentos, de móveis, de combustíveis, entre outras (Silva et al., 2018). O aproveitamento desses resíduos ocorre, principalmente, por incineração para fornecimento de energia na própria indústria e também para alimentação animal. Muitos deles são descartados como lixo, ampliando cada vez mais os problemas ambientais (Bilal et al., 2017). No entanto, esses resíduos apresentam diversos macro e micronutrientes que podem ser reutilizados e convertidos em diferentes produtos de alto valor agregado, como açúcares fermentáveis, biocombustíveis, produtos químicos, enzimas, entre outros (Anwar et al., 2014; Boonsombuti et al., 2013; Marques et al., 2017).

As celulasas são enzimas responsáveis pela degradação da celulose, principal composto presente nas células vegetais, e isso, por sua vez, as tornam muito importantes para a conversão de biomassa e outras aplicações industriais. A sacarificação enzimática de biomassa lignocelulósica é um processo eficaz e oferece diversas vantagens quando comparada aos métodos químicos tradicionais para produção de açúcares fermentáveis, podendo-se destacar a alta especificidade, condições de reação mais brandas, alto rendimento e menor formação de produtos indesejáveis (Sadaf et al., 2013; Govumoni et al., 2013; Yucel et al., 2015; Ferraz et al., 2018).

A utilização de otimização estatística dos processos de sacarificação é mais vantajosa se comparada à prática clássica que altera uma variável de cada vez. As principais vantagens são: o menor número de experimentos executados e a possibilidade de avaliar os efeitos de interação entre as variáveis (Santos et al., 2013). A metodologia da superfície de resposta é um conjunto de ferramentas estatísticas para projetar e modelar o desenvolvimento de experimentos, avaliando os efeitos de fatores e buscando suas condições ótimas para obter respostas desejáveis, possibilitando prever a interação entre diferentes parâmetros do processo. Design Box–Behnken é uma técnica multivariada de segunda ordem baseada em desenhos fatoriais parciais de três níveis. Permite estimar parâmetros e detectar falta de ajuste no modelo quadrático (Narra et al., 2020).

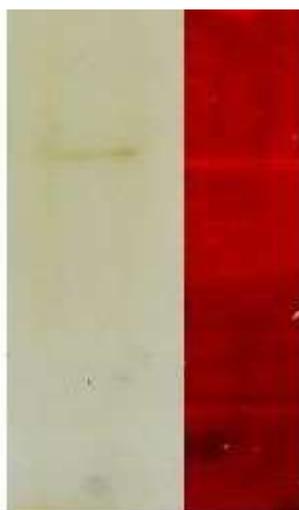
Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a metodologia de superfície de resposta na otimização da sacarificação do farelo de trigo, via planejamento Box-Behnken e análise por metodologia de superfície de resposta (RSM), utilizando a celulase isolada do *Botrytis ricini* URM 5627.

5.2 Resultados e discussão

5.2.1 Zimografia

Para determinação da atividade e estabilidade da endoglucanase isolada do *Botrytis ricini* URM 5627 em meio sólido foi feito uma zimografia em gel de poliacrilamida com CMC (Figura 1). O zimograma apresenta a formação de um halo de hidrólise bem visível (canaleta 2, Fig. 1) com uma massa molecular de 39 kDa (canaleta 1, Figura 1), massa molecular da endoglucanase isolada e caracterizada do *Botrytis ricini* URM 5627 (Silva et al., 2018). As massas moleculares de endoglucanases de outros fungos têm sido relatadas na literatura na faixa de 27 a 70 kDa (Narra et al., 2014; Sadana et al., 1984; Almeida et al., 2013; Chen et al., 2001).

Figura 1: Eletroforese e zimograma da endoglucanase isolada de *Botrytis ricini* URM 5627. 1: Eletroforese corada com nitrato de prata para amostra pura da endoglucanase. 2: Zimograma 0.1 % de CMC (Carboximetil-celulose) corado com vermelho do congo 0,2%.



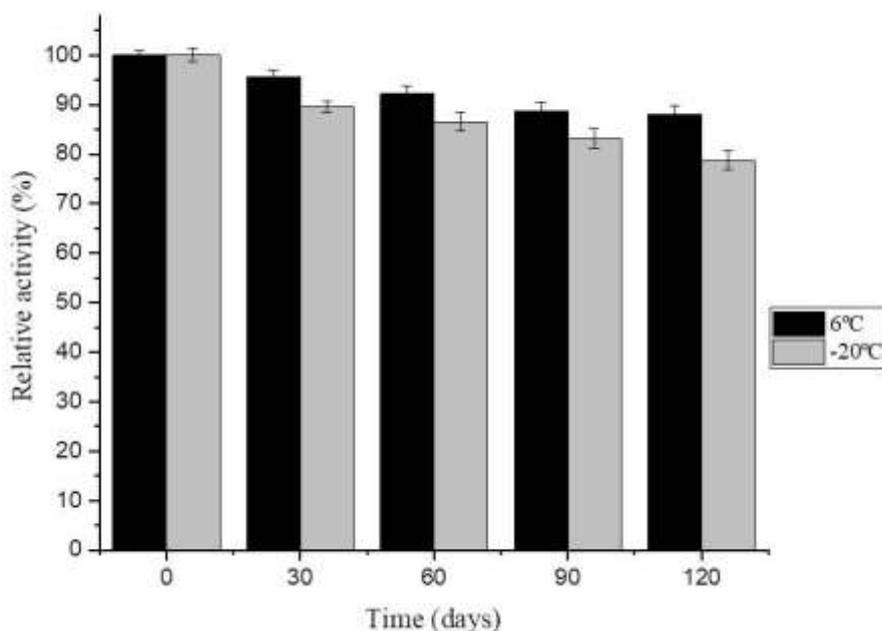
Fonte: elaborado pela autora, 2020.

A capacidade da enzima se manter ativa em meio sólido, detectada pela zimografia, a caracteriza como uma enzima promissora para aplicação em processos sólidos, tais como, sacarificação de resíduos agroindustriais, panificação e indústria têxtil (Jayasekara et al., 2019).

5.2.2 Estabilidade da enzima refrigerada e congelada

Buscando avaliar o efeito do armazenamento em baixas temperaturas na atividade enzimática da endoglucanase isolada de *Botrytis ricini* URM 5627, submeteu-se a enzima a estocagem à 6 e -20 °C por 120 dias. Foram feitas dosagens da atividade enzimática em intervalos de 30 dias para calcular a variação da atividade endoglucanásica ao longo da estocagem (Figura 2). Os resultados demonstraram que a endoglucanase se manteve estável em ambas as temperaturas investigadas após 120 dias de refrigeração e congelamento, apresentando atividade enzimática de 86,08 e 78,78% após o armazenamento em 6°C e -20 °C, respectivamente.

Figura 2: Efeito da refrigeração e congelamento da solução enzimática a -20°C e 6°C sobre atividade de endoglucanase de *Botrytis ricini* URM 5627 (a atividade obtida no tempo 0h foi tomada como 100%). Os experimentos foram realizados em duplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Segundo Heller, et al 1997, o congelamento à baixas temperaturas é o método mais comum de armazenamento de proteínas. Em contrapartida, o congelamento de soluções enzimáticas pode causar modificações estruturais ocasionando a perda ou diminuição da atividade catalítica provocada pela formação de cristais de gelo. As celulases produzidas pelo fungo filamentosso *Rhizopus sp* cultivado em fermentação em estado sólido utilizando a palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*) como substrato, demonstraram estabilidade por até 144 horas quando armazenado a -18°C (Santos et al., 2016). A endoglucanase isolada de *Aspergillus terreus* foi mantida relativamente estável após 150 meses de armazenamento à 4°C , havendo um decréscimo de até 5% de sua atividade enzimática inicial (Qi et al., 2019). Nesse estudo, a endoglucanase do *Botrytis ricini* URM 5627 se mostrou estável frente ambas as temperaturas de armazenamento por 120 dias logo, apresenta possibilidade de aplicação, distribuição e uso.

5.2.3 Planejamento Box–Behnken para otimização da sacarificação do farelo de trigo

Os resultados experimentais obtidos a partir das condições do planejamento Box-Behnken aplicados para otimização da sacarificação do farelo de trigo utilizando a endoglucanase (497,3 U/mL) isolada do *Botrytis ricini* URM 5627 podem ser observados na tabela 1. Tempo (T), carga de substrato (S) e carga enzimática (E) são variáveis que podem influenciar significativamente na catálise enzimática. Diante disso foi desenvolvido esse planejamento para avaliar a influência destas variáveis e otimizar o rendimento de açúcares redutores liberados durante a sacarificação.

Uma análise preliminar da tabela 1 permitiu verificar que a enzima foi capaz de sacarificar o farelo de trigo em todas as combinações das variáveis investigadas, de acordo com o planejamento. A maior produção de açúcares redutores (116,93 mg/g) foi alcançada quando as condições foram mantidas no ponto central, neste caso, tempo de 8 h, carga de substrato 2% e carga enzimática 4%. Os dados disponíveis nesta tabela foram submetidos à análise de regressão para construção de um modelo matemático de previsão.

Tabela 1: Matriz do tipo Box-Behnken para análise dos parâmetros tempo, carga de substrato e carga enzimática e otimização da enzimática do farelo de trigo endoglucanase isolada de *Botrytis ricini* URM 5627.

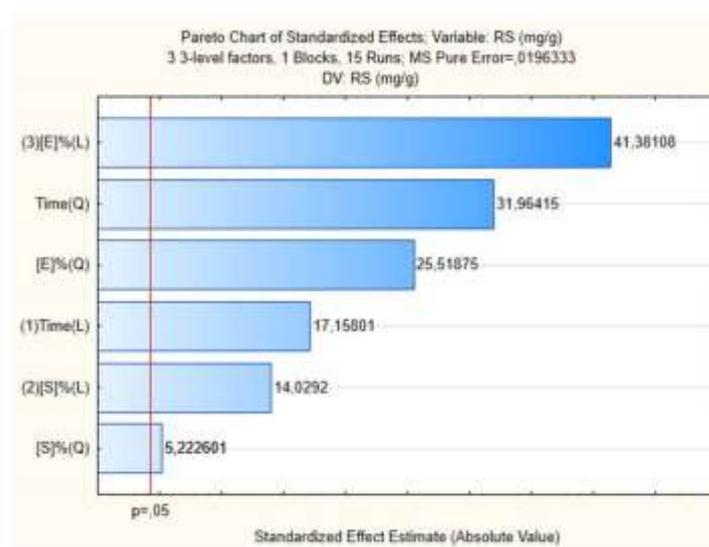
Experimentos	Tempo (T)	[S]	[E]	Açúcares redutores (mg g ⁻¹)
1	-1 (4h)	-1 (1%)	0 (4%)	111,98
2	+1 (12h)	-1 (1%)	0 (4%)	114,56
3	-1 (4h)	+1 (3%)	0 (4%)	114,94
4	+1 (12h)	+1 (3%)	0 (4%)	114,82
5	-1 (4h)	0 (2%)	-1 (3%)	109,04
6	+1 (12h)	0 (2%)	-1 (3%)	110,56
7	-1 (4h)	0 (2%)	+1 (5%)	113,98
8	+1 (12h)	0 (2%)	+1 (5%)	116,80
9	0 (8h)	-1 (1%)	-1 (3%)	112,98

10	0 (8h)	+1 (3%)	-1 (3%)	113,50
11	0 (8h)	-1 (1%)	+1 (5%)	114,94
12	0 (8h)	+1 (3%)	+1 (5%)	116,76
13	0 (8h)	0 (2%)	0 (4%)	116,65
14	0 (8h)	0 (2%)	0 (4%)	116,93
15	0 (8h)	0 (2%)	0 (4%)	116,78

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Observando o gráfico de Pareto (Figura 3), uma vez que os resultados apresentados pelo mesmo indica a significância dos efeitos padronizados dos termos de regressão, pôde-se observar que todos os termos lineares e quadráticos do modelo foram significativos a um nível de 95% de confiança. Das variáveis estudadas, três delas apresentaram maior influência na sacarificação: carga enzimática linear, carga enzimática quadrática e tempo quadrático. O maior comprimento da barra que representa o efeito padronizado do termo linear [E] indica que a carga enzimática foi a variável que mais se destacou influenciando nessa aplicação.

Figura 3: Gráfico de Pareto mostrando a significância dos termos das variáveis tempo (T), carga de substrato [S] e carga enzimática [E] no modelo ajustado para sacarificação de farelo de trigo utilizando endoglucanase isolada de *Botrytis ricini* URM 5627.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Uma vez que os modelos apresentam somente termos significativos, os coeficientes de regressão destes termos reduzidos foram construídos por análise de regressão e submetidos à ANOVA ($p < 0,05$) (Tabela 2).

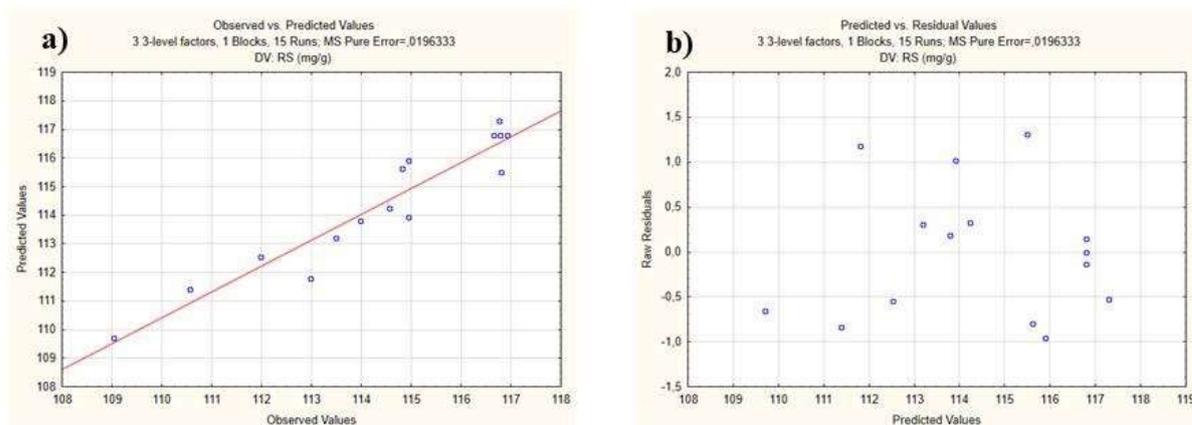
Tabela 2: ANOVA para o modelo reduzido ajustado a partir dos resultados experimentais obtidos com o planejamento Box-Behnken.

	SS	FD	MS	F	P
Regressão	73,8508	6	12,3084	12,8120	0,0005
Residual	7,6855	8	0,9606		
Falta de ajuste	7,6463	6	1,2743		0,0152
Erro puro	0,0392	2	0,0196		
Total	81,5364	14			
R²	0,9057				
R² -adj	0,8350				

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Os resultados apresentados na tabela 2 indicam que o modelo matemático construído ($p < 0,05$) foi estatisticamente significativo. Para o presente modelo, os valores de R^2 e R^2 -adj (0,9057 e 0,8350, respectivamente) indicam um bom ajuste aos resultados experimentais. A partir de um valor de R^2 de 0,9057, conclui-se que 90,57% da variabilidade das respostas de produção de açúcares redutores podem ser explicadas pelo modelo reduzido ao passo que, um valor de R^2 -adj de 0,8350 significa que 83,50% da variação das respostas de atividade de endoglucanase podem ser explicadas pelo modelo ajustado. O valor de falta de ajuste foi insignificante ($p = 0,0152$). Esta afirmação pôde ser ratificada a partir dos gráficos de valores reais e previstos (Figura 4), os quais evidenciaram que o modelo reduzido apresentou os valores das respostas previstas muito próximos aos das respostas experimentais reais. Além disso, os resíduos foram relativamente baixos e distribuídos de forma aleatória, tornando o modelo válido para construção da superfície de resposta e previsão das regiões desejadas.

Figura 4: Gráfico de valores reais x previstos (a) e gráfico de distribuição de resíduos (b) para o modelo reduzido ajustado para explicar a variabilidade dos resultados da sacarificação farelo de trigo utilizando endoglucanase isolada de *Botrytis ricini* URM 5627.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

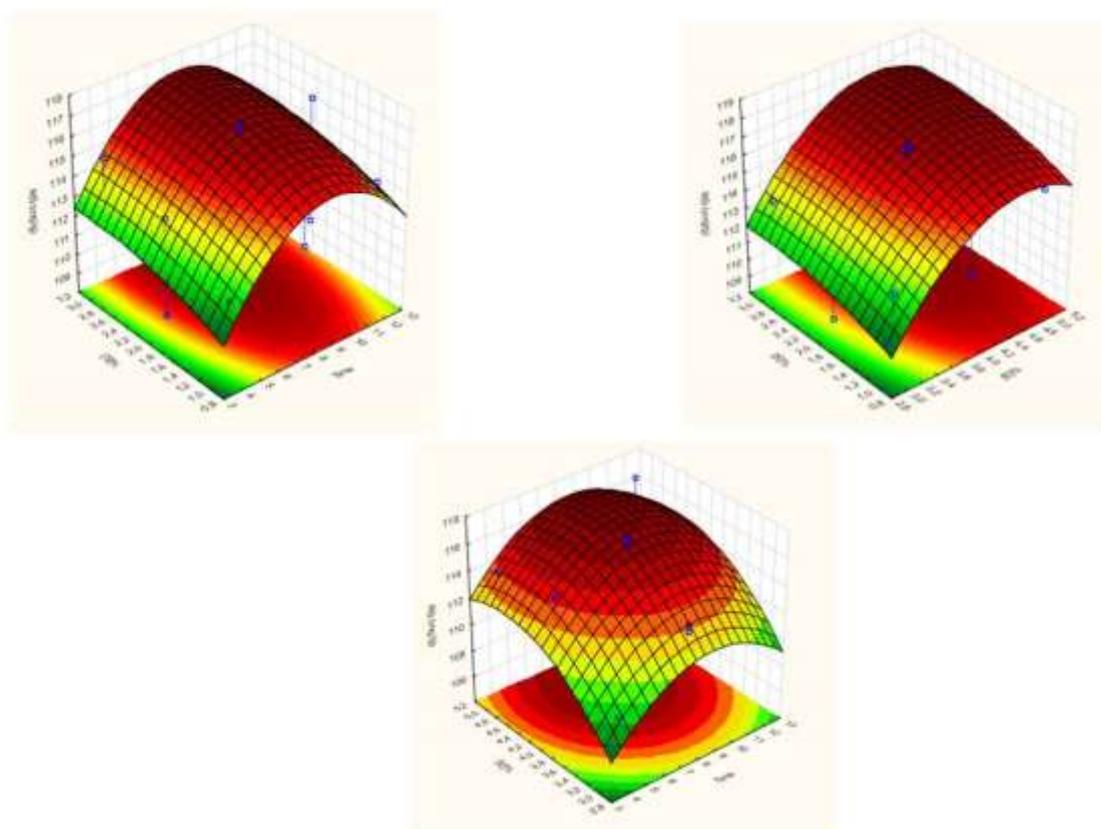
O modelo reduzido, ajustado a partir dos resultados experimentais obtidos para sacarificação do farelo de trigo pela endoglucanase de *Botrytis ricini* URM 5627, é representado pela equação 2. Os termos codificados representados significam, Y a quantidade de açúcares redutores liberados (resposta), ao passo que T, S e E representam as variáveis independentes: tempo, carga de substrato e carga enzimática.

$$Y = 64,87 + 2,54 T - 0,145 T^2 + 2,218 S - 0,380 S^2 + 16,93 E - 1,860 E^2 \quad (2)$$

Os gráficos de superfície de resposta (Figura 5) construídos a partir da equação 2, ilustram o efeito das variáveis e suas interações. A partir destes gráficos ficou evidente que, dentro da região experimental estudada a variável carga enzimática [E] exerceu maior influencia sobre o processo de sacarificação. Os resultados foram validados com a repetição

em triplicata dos valores críticos apontados pelo modelo, através da Equação 2 gerada. A partir desses resultados foi possível prever um valor máximo de produção de açúcares redutores, equivalente a 117,75 mg/g sob as condições de tempo de 8,7 h, carga de substrato de 2,9 % e carga enzimática de 4,6%. Nestas condições, foi encontrado um valor médio real da análise feita em triplicata de 118,92 mg/g, que foi bastante próximo ao valor previsto.

Figura 5: Gráficos de superfície de resposta e de contorno construídos com base no modelo Y representando as interações entre as variáveis tendo-se como resposta a quantidade de açúcares redutores formados.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

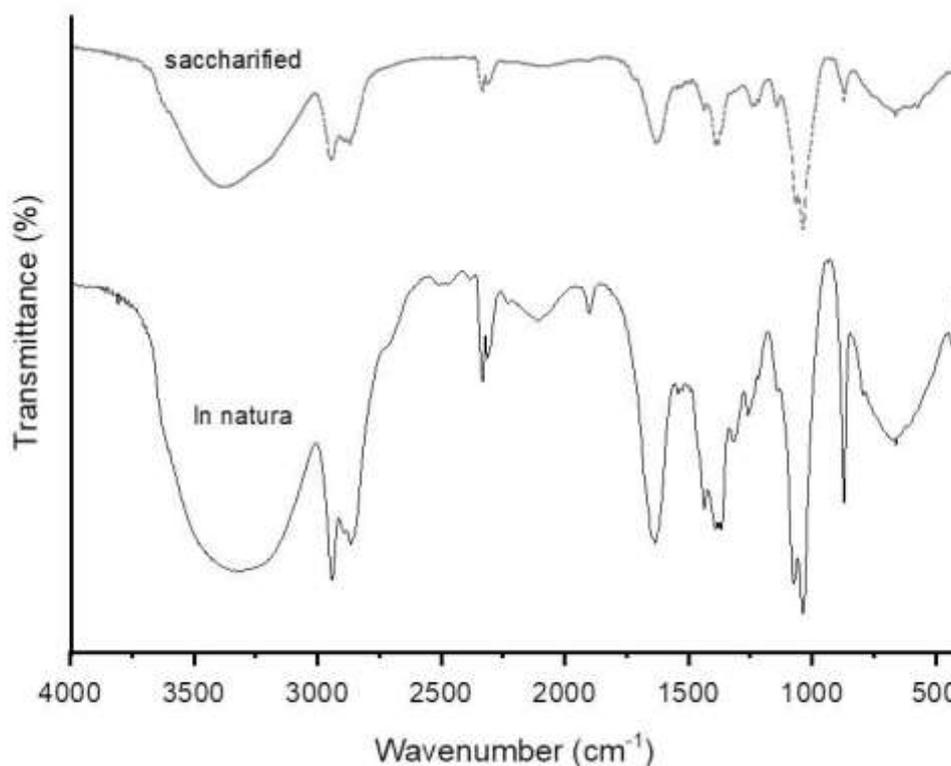
O farelo de trigo produzido como subproduto agrícola pode servir como matéria-prima atraente de baixo custo para a produção de açúcares fermentáveis (Qi et al., 2019). De acordo com o estudo proposto por Sawisit et al., 2018, utilizando várias cargas enzimáticas (1 a 6%) em casca de arroz pré-tratadas, verificou-se que a saturação ocorreu acima das cargas enzimáticas de 4%. Da mesma forma, a saturação observada no tempo de sacarificação de 18 a 24 h de incubação, não houve melhora significativa no rendimento de açúcar redutores produzidos após 24 h de incubação (Narra et al., 2020). Wang et al. 2019, demonstraram uma produção de $6,51 \pm 0,39$ g/L de açúcares redutores quando a carga de substrato de agave foi de 10% em um tempo de hidrólise de 72h, utilizando um coquetel enzimático celulolítico de *Aspergillus niger*. O resultado indicou que maior carga sólida de agave aumentou significativamente a concentração de açúcar no hidrolisado.

Utilizando um extrato bruto produzido por *Penicillium chrysogenum*, aplicado a sacarificação de sabugo de milho pré-hidrolisado, obteve-se um rendimento de açúcares redutores (23,08 mg g⁻¹ com 24 h) (Zhang e Sang, 2015). Adigüzel and Tunçer, 2017, também relataram a sacarificação de farelo de trigo (2,5% de carga de substrato) pré-tratado com NaOH por 6h de hidrólise pela endoglucanase de *Actinomadura geliboluensis*, apresentando uma produção de açúcares redutores de 265,1 mg/g. Apesar de serem apontadas como promissoras, etapas de pré-tratamento podem encarecer o processo de sacarificação e produzir inibidores da fermentação (Masran et al., 2016). A sacarificação do farelo de trigo pela endoglucanase de *Botrytis ricini* URM 5627 foi realizada sem a utilização de etapas de pré-tratamento e, ainda assim, apresentou resultados satisfatórios, uma vez que, o tempo de hidrólise foi de 8h, caracterizando um menor gasto energético e financeiro.

5.2.4 FTIR

O farelo de trigo antes e após o processo de sacarificação foi caracterizado por FTIR, e os espectros são apresentados na figura 6. Algumas diferenças foram observadas entre os espectros.

Figura 6: Espectros FTIR para o farelo de trigo in natura e após a sacarificação utilizando endoglucanase isolada de *Botrytis ricini* URM 5627.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

A banda larga a $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ foi associada à vibração de alongamento OH referentes a celulose, assim como as bandas em 2850 a 2918 cm^{-1} . A absorção em 1733 cm^{-1} é característica da ligação C=O devido ao estiramento de hemicelulose não conjugada. O sinal em 896 cm^{-1} corresponde a ligação glicosídeo β -(1 \rightarrow 4) referente a celulose (Dissanayake et al., 2018). A vibração entre 1200 e 1100 cm^{-1} são atribuídas à hemicelulose e celulose. Diante disso foi observada a diminuição de sinais referentes à hemicelulose e a celulose após o

processo de sacarificação, apontando um possível processo de deslignificação e afrouxamento da celulose facilitando assim, a ação da enzima na hidrólise e, em consequência, a produção de açúcares redutores.

5.3 Conclusão

Este estudo demonstrou o potencial de utilização e estocagem da endoglucanase de *Botrytis ricini* URM 5627 para sacarificação do farelo de trigo sem a necessidade de pré-tratamento deste material. Além disso, a aplicação da metodologia de superfície de resposta utilizando uma matriz de planejamento Box-Behnken permitiu determinar com êxito, as condições das variáveis: tempo de sacarificação, carga de substrato e carga enzimática, necessárias para a maximização da produção de açúcares redutores. Se trata de um estudo que possibilitou a análise de diferentes combinações de variáveis com a realização de poucos pontos experimentais. A partir da utilização desse modelo estatístico após sua validação foi possível produzir 118,92 mg/g de açúcares redutores, utilizando uma carga de substrato de 2% (p/v), carga enzimática 4% (v/v) em 8 horas de sacarificação. Demonstrou-se aqui um resultado promissor, uma vez que, o processo apresentado é menos oneroso, com um menor gasto energético e otimizado, sem contar que o modelo matemático previsto foi verificado em condições reais sendo bastante próximo ao valor previsto.

5.4 Referencias Bibliográficas

ADIGÜZEL, A.O AND TUNÇER, M. Production and Characterization of Partially Purified Thermostable Endoxylanase and Endoglucanase from Novel *Actinomyces geliboluensis* and the Biotechnological Applications in the Saccharification of Lignocellulosic **Biomass**. **BioResources** (2017) .

AKHTAR, N., GOYAL, D., GOYAL, A. Characterization of microwave-alkali-acid pretreated rice straw for optimization of ethanol production via simultaneous saccharification and fermentation (SSF). **Energy Convers. Manag** (2017).

ALMEIDA, M.N, FALKOSKI, D.L., GUIMARÃES, V.M, RAMOS, H.J.O., VISSER, E.M., MAITAN-ALFENAS, G.P., DE REZENDE, S.T. Characteristics of free endoglucanase and glycosydases multienzyme complex from *Fusarium verticillioides*. **Bioresour Technol.** (2013)

ANWAR,Z., GULFRAZ, M., IRSHAD,M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **J Radiat res Appl Sc.** (2014)

BILAL, M., ASGHER, M., IQBAL, H.M.N., RAMZAN, M.: Enhanced bio-ethanol production from old newspapers waste through álcali and enzymatic delignification. **Waste Biomass Valor.** (2017)

BOONSOMBUTI, A., LUENGNARUEMITCHAI, A., WONGKASEMJIT, S. Enhancement of enzymatic hydrolysis of corncob by microwave-assisted alkali pretreatment and ts effect in morphology. **Cellulose** (2013)

CHEN,G., DU,J., ZHUANG, L., GAO P.Purification and properties of ndoglucanases from *Aspergillus aculeatus* SM-L22. (2001).

DISSANAYAKE, N., THALANGAMAARACHCHIGE, V.D., TROXELL, S., QUITEVIS, T.L., ABIDI.N. Substituent effects on cellulose dissolution in imidazolium-based ionic liquids. **Cellulose** (2018)

FERRAZ, J.L.A.A., SOUZA, L.O., SOARES, G.A., COUTINHO, J.P., DE OLIVEIRA, J.R., OLIVEIRA, E.L., FRANCO, M. .Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit. **Bioresour Technol.** (2018) .

GOVUMONI SP, KOTI S, KOTHAGOUNI SY, VENKATESHWAR S, LINGA VR. Evaluation of pretreatment methods for enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production. **Carbohydr Polym.** (2013).

HELLER, M. C.; CARPENTER, J. F.; RANDOLPH, T. W. Manipulation of lyophilization-induced phase separation: implications for pharmaceutical proteins. **Biotechnology progress** (1997).

JAYASEKARA,S., RATNAYAKE, R. Microbial Cellulases: An Overview and Applications. **Intechopen** (2019) .

MASRAN R., ZANIRUN Z., BAHRIN E.K., IBRAHIM M.F., YEE P.L., ABD-AZIZ S. Harnessing the potential of ligninolytic enzymes for lignocellulosic biomass pretreatment. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** (2016) .

MARQUES, G.L., REIS, N.R., SILVA, T.P., FERREIRA, M.L.O., AGUIAR-OLIVEIRA, E., OLIVEIRA, J.R., FRANCO, M. Production and Characterisation of Xylanase and

Endoglucanases Produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 Through the Solid-State Fermentation of Rice Husk Residue. **Waste Biomass Valor.** (2017).

NARRA, M., RUDAKIYA, D.M., MACWAN,K., PATEL, N. Black liquor: A potential moistening agent for production of cost-effective hydrolytic enzymes by a newly isolated cellulose-xylanase fungal strain *Aspergillus tubingensis* and its role in higher saccharification efficiency. **Bioresour. Technol** (2020).

NARRA, M., DIXIT, G., DIVECHA, J., KUMAR, K., MADAMWAR, D., SHAH, A. R. Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. **Int Biodeter Biodegr.** (2014).

QI, G., HUANG, D., JIANHUI WANG, J., SHEN, Y., GAO, X. Enhanced butanol production from ammonium sulfite pretreated wheat straw by separate hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and fermentation. **Sustain. Energy Technol. Assess** (2019).

SADAF, A.; KHARE, S.K. Production of *Sporotrichum thermophile* xylanase by solid state fermentation utilizing deoiled *Jatropha curcas* seed cake and its application in xylooligosaccharide synthesis. **Bioresour. Technol** (2014).

SADANA, J. C.; LACHKE, A. H.; PATIL, R. V. Endo-(1,4)- β -D-glucanases from *Sclerotium rolfsii*. Purification, substrate specificity, and mode of action. **Carbohydr. Res.**, (1984).

SANTOS, T. C.; ABREU FILHO, G.; OLIVEIRA, A. C.; ROCHA, T. J. O.; MACHADO, F. D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; MOTA, K. I. A.; Franco, M. Application of response surface methodology for producing cellulolytic enzymes by solid-state fermentation from the puple mombin (*Spondias purpurea* L.) residue. **Food Sci Biotechnol**, (2013).

SANTOS, T.C., FILHO, G.A., BRITO, A.R., PIRES, A.J.V., BONOMO, R.C.F., FRANCO, M. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. by solid state fermentation of prickly pear. **Rev. Caatinga** (2016).

SAWISIT, S. JAMPATESH, S.S. JANTAMA, K. JANTAMA Optimization of sodium hydroxide pretreatment and enzyme loading for efficient hydrolysis of rice straw to improve succinate production by metabolically engineered *Escherichia coli* KJ122 under simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresour. Technol.** (2018).

SILVA, T. P., DE ALBUQUERQUE, F. S., DOS SANTOS, C. W. V., FRANCO, M., CAETANO, L. C., & PEREIRA, H. J. V. Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. **Bioresour. Technol.** (2018).

YUCEL, Y., GOYCINCIK, S.: Optimization and modelling of process conditions using response surface methodology (RSM) for enzymatic saccharification of spent tea waste (STW). **Waste Biomass Valor** (2015).

ZHANG H AND SANG Q, Production and extraction optimization of xyla-nase and ψ -mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and pri-mary application in saccharification of corncob. *Biochem Eng* (2015).

WANG, J. C. CHIO, X. CHEN, E. SU, F. CAO, Y. JIN, W. QIN. Efficient saccharification of agave biomass using *Aspergillus niger* produced low-cost enzyme cocktail with hyperactive pectinase activity. ***Bioresour. Technol.*** (2019).

Seção 6

Conclusão geral e perspectivas

6.1 Conclusão geral

- ✓ O fungo filamentoso *Botrytis ricini* URM 5627 foi capaz de produzir a enzima endoglucanase em diferentes meios de cultivo;
- ✓ A fermentação em estado sólido se mostrou como uma técnica promissora para reduzir os custos de produção da enzima;
- ✓ O bagaço de cana foi o resíduo agroindustrial mais eficiente no processo de crescimento microbiano;
- ✓ A enzima foi purificada utilizando apenas dois passos, tais como fracionamento salino e cromatografia líquida de proteínas;
- ✓ A enzima pura apresentou características bioquímicas superiores a algumas endoglucanases relatadas na literatura, sendo halotolerante, termoestável, estável em diferentes pHs;
- ✓ A enzima foi capaz de sacarificar diferentes resíduos industriais in natura e após pré-tratamentos ácido e biológico, produzindo açúcares fermentáveis.

6.2 Perspectivas

- ✓ Utilizar os açúcares fermentáveis produzidos para a obtenção de etanol 2G.