

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Dávida Maria Ribeiro Cardoso dos Santos

Produção, isolamento, caracterização e aplicação biotecnológica da endoglucanase
do fungo filamentoso *Pycnoporus sanguineus*

Maceió-AL

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Dávida Maria Ribeiro Cardoso dos Santos

Produção, isolamento, caracterização e aplicação biotecnológica de endoglucanase
do fungo filamentoso do *Pycnoporus sanguineus*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de doutora em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

Orientador: Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira

Maceió-AL

2022

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

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

S237p Santos, Dávida Maria Ribeiro Cardoso dos.
Produção, isolamento, caracterização e aplicação biotecnológica de endoglucanase do fungo filamentosso do *Pycnoporus sanguineus* / Dávida Maria Ribeiro Cardoso dos Santos. – 2022.
89 f. : il. color., grafs., tabs.

Orientador: Hugo Juarez Vieira Pereira.
Tese (doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 83-89.

1. Agroindústria - Resíduos. 2. Fungos. 3. Celulase - Purificação. 4. Biotecnologia. I. Título.

CDU: 577.21:631.145

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dávida Maria Ribeiro Cardoso dos Santos

Produção, isolamento, caracterização e aplicação biotecnológica de endoglucanase do fungo filamentosso do *Pycnoporus sanguineus* – tese de doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de doutora em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

Orientador: Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira



Documento assinado digitalmente

HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA

Data: 27/01/2023 16:52:09-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira, Universidade Federal de Alagoas (Orientador)



Documento assinado digitalmente

SONIA SALGUEIRO MACHADO

Data: 13/03/2023 15:54:20-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Sônia Salgueiro Machado – Universidade Federal de Alagoas (Externa)



Documento assinado digitalmente

RUTH RUFINO DO NASCIMENTO

Data: 03/02/2023 11:30:38-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Ruth Rufino do Nascimento – Universidade Federal de Alagoas (Externa)



Documento assinado digitalmente

LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO

Data: 15/02/2023 06:42:01-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo – Universidade Federal de Alagoas
(Interno)



Documento assinado digitalmente

FRANCIS SOARES GOMES

Data: 08/02/2023 20:51:25-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Francis Soares – Universidade Federal de Alagoas (Interno)

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Helena Ribeiro e Luciano Cardoso pelo incentivo e cuidado de uma vida toda e ao meu esposo Marcos Oliveira e as minhas filhas Maria Cecília Ribeiro e Mariana Ribeiro que as joias preciosas da minha vida. Muito obrigada Deus.

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro e maior agradecimento é a Deus, meu Senhor, sem a sua misericórdia e providência eu não teria chegado até aqui, foi uma vida repleta dos cuidados de Deus. Quero agradecer a minha mãe Maria Santíssima que me guiou em todos os caminhos com muito amor e cuidado.

Quero agradecer aos meus pais: Maria Helena e Luciano Cardoso que dedicaram à vida toda para que eu e minha irmã Camila pudéssemos estudar sempre nos orientando pelo melhor caminho. Um agradecimento especial a minha irmã Camila Ribeiro por muitos anos foi meu suporte e exemplo para que pudesse estudar e seu exemplo, sempre mostrando o estudo é sempre o melhor caminho.

Agradecer ao meu esposo, amigo, companheiro de todas as horas e lutas, Marcos Oliveira, que teve um papel mais que especial para a conclusão desse doutorado, estando comigo em todas as etapas. Muito obrigada por partilhar a vida comigo, amo você.

Agradecer as minhas filhas lindas, Maria Cecília e Mariana que nasceram durante o período do meu doutorado e se tornaram um dos principais incentivos para execução e conclusão dessa etapa em minha vida.

Ao meu orientador Prof. Hugo Juarez que abriu as portas do laboratório e me ensinou com seu exemplo como ser um excelente professor, orientador e profissional. Aos demais professores do laboratório: prof. Francis Soares, profa. Edma Miranda que estavam dispostos a ajudar a todos que precisassem.

Aos professores, Sônia Machado, Luciano Grillo, Mário Meneguete, Melissa Landell e José Maria Rodrigues por abrirem as portas dos seus laboratórios e estarem sempre dispostos a ajudar em várias etapas desse doutorado.

Aos meus amigos e companheiros de lutas diárias no laboratório: Cláudio Wilian, Cledson Barros, Fabiana Albuquerque, Humberto Tenório, Janaína Kivia, Tatiele Pereira, Alexsandra Ferreira, Monisy, Marta, Antônio Thomas, Josiel, Camila Camerino, Mariana e a todos que de alguma forma me ajudaram a realizar esta importante da minha vida.

Ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular pelo acompanhamento e oportunidade da realização deste doutorado.

A Universidade Federal de Alagoas pela oportunidade de cursar a graduação em biologia, o mestrado e doutorado em bioquímica e biologia molecular. A FAPEAL e Capes pelos incentivos em forma de bolsas de graduação e pós-graduação.

RESUMO

O crescimento da população mundial aumentou o investimento na agroindústria e conseqüentemente aumentou a geração de resíduos agroindustriais, em sua maioria lignocelulótico. Alternativas limpas de aproveitamento dos resíduos agroindustriais vêm sendo pesquisadas em todo mundo, entre elas está à utilização dos resíduos como fonte para crescimento fúngico para produção de enzimas de interesse biotecnológico. Os Objetivos deste trabalho foram produzir, isolar, caracterizar e aplicar biotecnologicamente a endoglucanase produzida a partir do fungo filamentoso *Pycnoporus sanguineus*. Foram utilizados 5 diferentes resíduos agroindustriais (farelo de trigo, bagaço de cana, pó de madeira, fibra de coco e papel de filtro) por fermentação em estado sólido (FES). A enzima foi isolada através do fracionamento etanólico e cromatografia de troca iônica, o isolamento foi confirmado por (SDS-PAGE) em condição redutora e desnaturante. A endoglucanase isolada foi caracterizada quanto a temperatura, pH, halotolerância, cinética enzimática e aplicada biotecnologicamente através da sacarificação de resíduos agroindustriais. A produção de endoglucanase foi maior no farelo de trigo (72 hs). A fração 80-100% do fracionamento etanólico concentrou maior atividade enzimática e foi submetido a cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose), a enzima isolada foi eluída em uma única fração, como confirmado no SDS-PAGE. A temperatura ótima da endoglucanase isolada foi de 50°C e a estabilidade térmica entre 20° a 60°C com ate 50% da atividade enzimática, temperaturas compatíveis com de outras endoglucanases fúngicas. O pH ótimo foi o pH 5,0, com estabilidade em pH entre o pH 4,5 e 8,0, demonstrando uma estabilidade em pH levemente alcalino compatível com aplicações biotecnológicas em indústria de detergentes. A enzima isolada manteve-se viável com atividade superior a 100% em até 5 M de NaCl, característica importante pois alguns processos industriais acontecem na presença de grandes quantidades de NaCl. A enzima apresentou K_m $3,18 \pm 100$ mg/mL e o K_{cat} igual a $4,53 S^{-1}$ e conseguiu produzir açúcares redutores 273 mg/mL em 24 horas em casca de arroz, mostrando-se viável para produção etanol de segunda geração. O presente trabalho concluiu que o fungo *P. sanguineus* é produtor de uma endoglucanase com características bioquímicas importantes, de rápida produção e de baixo custo.

Palavras-chaves: Resíduos agroindustriais, fungos filamentosos, endoglucanase, purificação, caracterização e biotecnologia.

ABSTRACT

The growth of the world population increased investment in agribusiness and, consequently, increased the generation of agroindustrial residues, mostly lignocellulosic. Clean alternatives for the use of agro-industrial residues have been researched around the world, among them is the use of residues as a source for fungal growth for the production of enzymes of biotechnological interest. The objectives of this work were to produce, isolate, characterize and biotechnologically apply the endoglucanase produced from the filamentous fungus *Pycnoporus sanguineus*. Five different agro-industrial residues (wheat bran, sugarcane bagasse, wood powder, coconut fiber and filter paper) were used by solid state fermentation (FES). The enzyme was isolated through ethanol fractionation and ion exchange chromatography, the isolation was confirmed by (SDS-PAGE) in reducing and denaturing conditions. The isolated endoglucanase was characterized for temperature, pH, halotolerance, enzymatic kinetics and applied biotechnologically through the saccharification of agro-industrial residues. Endoglucanase production was higher in wheat bran (72 hs). The 80-100% fraction of the ethanol fractionation concentrated greater enzymatic activity and was subjected to ion exchange chromatography (DEAE-Sepharose), the isolated enzyme was eluted in a single fraction, as confirmed by SDS-PAGE. The optimal temperature of the isolated endoglucanase was 50°C and the thermal stability was between 20° and 60°C with up to 50% of the enzymatic activity, temperatures compatible with other fungal endoglucanases. The optimum pH was pH 5.0, with stability at pH between pH 4.5 and 8.0, demonstrating stability at slightly alkaline pH compatible with biotechnological applications in the detergent industry. The isolated enzyme remained viable with activity greater than 100% in up to 5 M NaCl, an important characteristic because some industrial processes take place in the presence of large amounts of NaCl. The enzyme presented K_m 3.18 ± 100 mg/mL and the K_{cat} equal to 4.53 S⁻¹ and managed to produce 273 mg/mL reducing sugars in 24 hours in rice husks, proving to be viable for the production of second-generation ethanol . The present work concluded that the fungus *P. sanguineus* is a producer of an endoglucanase with important biochemical characteristics, fast production and low cost.

Keywords: Agroindustrial waste, filamentous fungi, endoglucanase, purification, characterization and biotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Bagaço de cana de açúcar.....	18
Figura 2	Fibra de coco verde.....	19
Figura 3	Farelo de trigo.....	20
Figura 4	Pó de madeira.....	21
Figura 5	Resíduos de papel.....	22
Figura 6	Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da celulase.....	26
Figura 7	Imagens do fungo <i>P. sanguineus</i> na natureza	31
Figura 8	Esquema ilustrativo da ação da celulase em biofilmes bacterianos.....	37
Figura 9	Placa de petri com o fungo <i>P. sanguíneus</i> em PDA.....	46
Figura 10	Perfil da atividade enzimática (U/mL) da endoglucanase produzida pelo fungo <i>P. sanguineus</i> nos diferentes resíduos agroindustriais.....	47
Figura 11	Perfil de crescimento do fungo em diferentes resíduos agroindustriais em diferentes tempos de incubação.....	50
Figura 12	Perfil de precipitação com sulfato de amônio.....	54
Figura 13	Perfil de fracionamento do extrato bruto com etanol absoluto..	56
Figura 14	Perfil cromatográfico do isolamento da endoglucanase produzida pelo fungo <i>P. sanguineus</i>	58
Figura 15	Análise do perfil de proteínas em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata.....	62
Figura 16	Determinação da temperatura ótima da endoglucanase isolada do fungo <i>P. sanguineus</i>	65
Figura 17	Determinação da estabilidade térmica da endoglucanase isolada do fungo <i>P. sanguineus</i>	67
Figura 18	Determinação de pH ótimo da endoglucanase isolada do <i>P.</i> <i>sanguineus</i>	70
Figura 19	Determinação da estabilidade em pH da endoglucanase isolada do <i>P. sanguineus</i>	72
Figura 20	Perfil de halotolerância da endoglucanase isolada do <i>P.</i> <i>sanguineus</i>	74
Figura 21	Análise da curva de Michaelis-Menten da endoglucanase isolada do <i>P. sanguineus</i>	76
Figura 22	Perfil de sacarificação de resíduos agroindustriais (bagaço de cana, casca de arroz e farelo de trigo) com a endoglucanase isolada do <i>P. sanguineus</i>	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tabela de classificação de enzimas	23
Tabela 2	Resumo de dados da purificação da endoglucanase isolada do <i>P. sanguineus</i>	61
Tabela 3	Análise da capacidade halotolerante das endoglucanases de fungos.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

CO ₂	Dióxido de Carbono
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophores
CNA-Brasil	Conselho nacional de cana de açúcar
PIB	Produto Interno Bruto
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
pH	Potencial hidrogeniônico
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
PDA	Potato Dextrose Agar
DNS	Ácido Dinitrosalicílico
CMC	Carboximetilcelulose
DEAE	Dietil-amino-etil
K _m	Constante de Michaelis-Menten
V _{max}	Velocidade Máxima
NaCl	Cloreto de Sódio
K _{cat}	Constante de catalise

SUMÁRIO

1.0.	INTRODUÇÃO	14
2.0.	Objetivos	16
2.1.	Objetivo geral.....	16
2.2.	Objetivos específicos.....	16
3.0.	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1.	Resíduos agroindustriais.....	17
3.1.1.	Principais resíduos agroindustriais brasileiros.....	18
3.2.	Enzimas na biotecnologia	23
3.2.1.	Celulases.....	25
3.3.	Microrganismos produtores de enzimas.....	28
3.3.1.	Fungos filamentosos.....	30
3.4.	Fermentação em estado sólido (FES).....	32
3.5.	Purificação.....	33
3.6.	Aplicação biotecnológica.....	35
4.0.	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1.	PRODUÇÃO E OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO (EXTRATO ENZIMÁTICO)	38
4.1.1.	Obtenção do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	38
4.1.2.	Preparo do inóculo	38
4.1.3.	<i>Screening</i> dos resíduos agroindustriais x perfil fermentativo.....	38
4.1.4.	Obtenção do extrato bruto	39
4.1.5.	Atividade Enzimática.....	40
4.2.	PURIFICAÇÃO DA ENDOGLUCANASE DO <i>P. sanguineus</i> ...	40
4.2.1.	Precipitação com sulfato de amônio e precipitação com etanol.....	40
4.2.2.	Cromatografia líquida.....	41
4.2.3.	Análise por SDS-PAGE.....	43
4.3.	CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA	43
4.3.1.	Teste de temperatura ótima e estabilidade térmica.....	42
4.3.2.	Teste de pH ótimo e estabilidade em pH.....	43
4.3.3.	Determinação da capacidade halotolerante.....	44
4.3.4.	Determinação da concentração de proteínas.....	44
4.3.5.	Determinação das constantes cinéticas.....	44
4.4.	APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA	45
4.4.1.	Sacarificação de resíduos agroindustriais	45
5.0.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1.	Obtenção do fungo <i>P. sanguineus</i>	46
5.2.	Fermentação e extrato bruto (extrato enzimático).....	47
5.2.1.	<i>Screening</i> dos resíduos agroindustriais x perfil fermentativo.....	47
5.2.2.	Extrato Bruto.....	53
5.3.	PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	54
5.3.1.	Precipitação com sulfato de amônio e precipitação com etanol.....	54
5.3.2.	Cromatografia Líquida.....	57
5.3.3.	Eletroforese SDS-PAGE.....	61
5.4.	CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA	64

5.4.1. Temperatura ótima.....	64
5.4.2. Estabilidade térmica.....	66
5.4.3. pH ótimo.....	69
5.4.4. Estabilidade em pH.....	71
5.4.5. Halotolerância.....	73
5.4.6. Constantes cinética	75
5.5. APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA	78
5.5.1. SACARIFICAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	78
6.0. CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

1.0. INTRODUÇÃO

A problemática ambiental resultante da produção de resíduos agroindustriais e o descarte incorreto dos mesmos é uma discussão crescente nos últimos anos. O agronegócio é um dos ramos da economia que mais crescem em todo mundo e o Brasil é dos países que mais investe no agronegócio. É um dos maiores produtores de milho, soja, cana, trigo e conseqüentemente geram toneladas de resíduos agroindustriais todos os anos (EMBRAPA, 2020; Marzo et al., 2019).

Estratégias de aproveitamento de resíduos agroindustriais vêm sendo desenvolvidas em todo mundo, desde o aproveitamento para o melhoramento de rações animais, utilização como fertilizantes de solo, geração de energia proveniente da queima dos resíduos (porém gera grande liberação de CO₂ na atmosfera), produção de biocombustíveis, produção de enzimas de origem fúngica para fins biotecnológicos, entre outros (HOUFANI et al., 2020).

Os fungos são conhecidos como importantes produtores de enzimas e alguns apresentam rápido crescimento e são poucos exigentes nutricionalmente (SRIVASTAVA et al., 2018). As enzimas de origem fúngica apresentam características bioquímicas importantes para vários processos industriais, como por exemplo: grande estabilidade térmica o que favorece sua utilização em processos com grandes variações de temperatura, ampla estabilidade em pH variados, halotolerância o que possibilita a utilização em processos com grandes quantidades de sal (SILVA et al., 2018).

Entre as enzimas mais comercializadas em todo mundo atualmente estão as proteases, glicosidase, lipases e amilases, entre as glicosidases a celulase é o complexo enzimático (endoglucanase, exoglucanase e beta glicosidase) mais utilizado em processos industriais (LEKAKARM et al., 2021). São amplamente utilizadas para melhoramento de sucos e vinhos, produção de etanol de segunda geração, melhoramento de rações animais, compõem coquetéis enzimáticos para detergentes, atuam na indústria têxtil no melhoramento dos tecidos, etc (SANTOS et al., 2018).

O objetivo do estudo foi produzir, isolar, caracterizar e aplicar biotecnologicamente a endoglucanase produzida pelo fungo filamentosso *P. sanguineus* em diferentes resíduos agroindustriais, determinar suas características bioquímicas e analisar possíveis utilizações da mesma em diferentes ramos industriais.

2.0. OBJETIVOS

2.1. **Objetivo geral:** Produzir, isolar, caracterizar e aplicar biotecnologicamente endoglucanase produzidas pelo *P. sanguineus*.

2.2. **Objetivos específicos:**

- Analisar a produção de endoglucanase pelo fungo *P. sanguineus* em diferentes resíduos agroindustriais por fermentação em estado sólido;
- Isolar a enzima por fracionamento etanólico e cromatografia líquida;
- Realizar SDS-PAGE;
- Caracterizar bioquimicamente a endoglucanase isolada;
- Determinar as constantes cinéticas;
- Realizar aplicação biotecnológica.

3.0. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Resíduos agroindustriais

O agronegócio é um dos principais ramos da economia brasileira, em 2019 a soma de bens e serviços gerados no agronegócio chegou a 1,55 trilhões de reais ou 21,4% do PIB (Produto Interno Bruto) do Brasil. O segmento agrícola corresponde a maior parcela de contribuição, 68% desse valor (CNA BRASIL, acesso 11/01/2022).

Há uma grande diversidade nas plantações agrícolas, porém as plantações de soja, milho e cana de açúcar lideram a produção no Brasil, estima-se que em 2020/2021 ocorra um crescimento de 3,5% em relação a 2019 na produção agrícola no Brasil (CNA BRASIL, acesso 11/01/2022).

A grande produção agrícola gera uma enorme quantidade de biomassa residual por meio de seus sistemas de cultivo e de processamento, uma grande parcela desses resíduos é de origem lignocelulósicos (EMBRAPA, 2020). O não aproveitamento dos resíduos agroindustriais gera impactos ambientais importantes como o descarte incorreto no meio ambiente, a queima dos mesmos, contaminação de corpos d'água. (HOUFANI et al., 2020)

Os resíduos agroindustriais é definido como “todo resíduo resultante de atividade” industrial que se encontre dos estados sólidos, semi-sólido, gasoso – quando contido, e líquido – cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgoto ou em corpos d'água ou exijam para isso soluções técnica ou economicamente inviável em face da melhor tecnologia disponível (CONAMA nº 313/2002 (BRASIL, 2002)).

Os resíduos agroindustriais podem ser caracterizados em quatro tipos: industriais, agrícolas, sanitários e sólidos urbanos (DIAZ et al., 2018). Os resíduos agroalimentares estão incluídos na categoria agrícolas e são ricos em compostos lignocelulósicos o que tem despertado interesse econômico e ambiental.

A valorização dos resíduos agrícolas como matéria prima para produção de produtos comerciais com alto valor agregado tem ganhado destaque nos últimos anos. Além de possuírem alto valor agregado são produzidos de forma sustentável,

entre eles destacam-se os biocombustíveis (etanol de segunda geração), ácidos orgânicos, triacilgliceróis, entre outros (Diaz et al., 2018; Marzo et al., 2019).

Os resíduos lignocelulósicos estão entre os resíduos mais produzidos pelo agronegócio brasileiro parte desse resíduo é aproveitado para o melhoramento de rações animais, geração de energia a partir da queima, biogás... porém ainda muitas toneladas são descartadas de forma incorreta no meio ambiente.

3.1.1. Principais resíduos agroindustriais brasileiros

Bagaço de cana de açúcar

O bagaço de cana de açúcar é o resíduo industrial mais produzido no Brasil, estima-se que são produzidos de 5 a 12 toneladas por ano cerca de 30% da cana moída. A própria usina utiliza este resíduo na geração de energia através da queima, porém gera impactos ambientais como liberação de CO₂ na atmosfera (CNA, BRASIL acesso 11/01/2022).

As usinas açucareiras produzem como resíduo o bagaço de cana e a torta de filtro (resíduo obtido após a filtração do caldo de cana), afinal do processamento de 1000 toneladas de cana rende nas usinas cerca de 280 toneladas de bagaço e 35 toneladas de torta de filtro (COSTA, 2017).

Figura 1. Bagaço de cana de açúcar



Fonte: agropos.com.br (acesso em 11/01/2022)

O bagaço de cana é um resíduo rico em compostos lignocelulósicos com cerca de 40% de celulose, 35% de hemicelulose e 15% de lignina (figura 1) e podem ser reaproveitados de outras formas como para o desenvolvimento de produtos com valor comercial e grande interesse biotecnológico (MICHAÏLOS et al., 2016).

Fibra do coco

A fibra do coco é um importante resíduo agroindustrial bastante encontrado em todo Brasil com destaque para a costa brasileira. O descarte incorreto da fibra do coco tem gerado grande impacto ambiental, pois as maiorias das indústrias fazem o reaproveitamento da casca do coco madura e não a casca verde.

Contudo há uma grande comercialização do coco verde e o descarte incorreto da fibra do coco verde tem gerado um grande aumento no volume de lixo nos aterros sanitários devido ao seu tamanho, tem entupido as redes de esgotos, contaminado mares, rios e lagoas e favorecendo a proliferação de mosquitos vetores de doenças (CARDOSO et al., 2021).

No ano de 2018, o Brasil gerou cerca de 1,58 milhões de tonelada de resíduo do coco (IBGE, 2019). Esse resíduo requer aproximadamente 10 anos para decompor naturalmente. É um resíduo rico em composto lignocelulósicos e apresenta características importantes de resistências e grande propriedade absorvente (Figura 2) (LUIS-ZARATE et al., 2018).

Figura 2. Fibra de coco verde



Fonte: mfrural.com.br (acesso dia 11/01/2022).

Atualmente a fibra do coco tem sido utilizada para produção de cordas, escovas, tapetes, estofados automotivos, substratos agrícolas, artesanatos, confecção de vasos, etc. (PEREIRA, 2012). Contudo outras utilizações têm sido desenvolvidas para garantir um maior aproveitamento do resíduo e produção de produtos de alto valor agregado, como substrato para crescimento microbiano e produção de enzimas.

Farelo de trigo

O farelo de trigo é uma biomassa lignocelulósica barata representa cerca de 13 – 19% do peso do grão de trigo, corresponde aproximadamente 12% de água, 13%-18% de proteínas, 3,5% de gordura e 56% de carboidratos, sendo deste último 55% de arabinosilano, 9-12% de celulose, 3-5% lignina e 3-4% de frutano (Figura 3) (TANASKOVIC et al., 2021).

As moageiras de trigo comercializam cerca de 70% do resíduo do trigo para ração animal e compostagens, porém há uma busca pelo aproveitamento do farelo de trigo para produção de produtos com alto valor agregado (COSTA, 2017).

Figura 3. Farelo de trigo



Fonte: tese2.com.br (acesso em 12/01/2022)

Pó de madeira

Pó de madeira é importante resíduo agroindustrial proveniente das grandes madeiras e de pequenas serralharías, este resíduo quando descartado de forma incorreta pode gerar grandes prejuízos ambientes, tais como: entupimento das redes de esgoto, contaminação de corpos d'água e contaminação da atmosfera com a queima.

As madeiras provenientes das gimnospermas e angiospermas apresentam como composição química geral de 42% de celulose, 27% de hemicelulose, 28% de lignina, esses grupos de plantas são as mais utilizadas comercialmente (Figura 4) (PEDRAZZI et al., 2019).

A lignina presente na composição da madeira pode dificultar o acesso de alguns microrganismos aos carboidratos da composição favorecendo baixo crescimento microbiano e conseqüentemente ocorre pouca produção de enzimas (BAULI et al., 2019).

Figura 4. Pó de madeira



Fonte: agro20.com.br

Para minimizar a problemática da grande quantidade de lignina na composição da madeira muitos processos de produção de enzimas a partir deste resíduo são iniciados com a desconstrução da estrutura da madeira utilizando pré-

tratamentos químicos, contudo, este processo pode gerar prejuízos aos processos industriais e aumentar o custo do mesmo (BAULI et al., 2019).

Resíduos de papel

Os resíduos de papel também estão entre os resíduos mais produzidos em todo mundo e cerca de 400 milhões de toneladas são geradas anualmente aproximadamente 60% são reciclados, contudo uma significativa parcela não é aproveitada devido à baixa qualidade das fibras e a presença de outros resíduos misturados (Figura 5) (DONG et al., 2021).

Os resíduos de papel que não foram reciclados são encaminhados para compostagens, incineração e aterros sanitários em aterros, porém estes destinos podem causar danos ambientais devido a emissão de gases poluentes e contaminação de lençol freático (KUMAR DAS et al., 2016).

Figura 5. Resíduos de papel



Fonte: untha.co.uk (acesso em 12/01/2022)

Alternativas para o aproveitamento dos resíduos de papel que não foram reciclados têm sido desenvolvidas, tais como indutores para produção de enzimas

lignocelulósicas para fins biotecnológicos (AL-BATTASHI et al., 2019; KUMAR DAS et al., 2016).

3.2. Enzimas na biotecnologia

As enzimas são catalisadores biológicos específicos que aceleram as reações devido à diminuição na energia de ativação da reação. Analisando esta capacidade das enzimas, muitas pesquisas foram desenvolvidas para ampliar o conhecimento a respeito das reações envolvendo enzimas e sua utilização em vários processos industriais (LEHNINGER, 2018).

As enzimas apresentam características fundamentais importantes, são extremamente específicas, são muito eficientes a ponto de catalisar reações com intensidade 100 milhões a 10 bilhões de vezes mais rápidas do que uma reação sem enzima e estão sujeitas a controles celulares (MONTEIRO et al., 2009). As enzimas são classificadas em seis classes, como descreve a tabela 1.

Tabela 1. Tabela de classificação de enzimas

Classes de Enzimas		
Classe 1	Oxirredutases	Catalisam reações de oxirredução, transferindo elétrons, hidretos (H-) ou prótons (H+);
Classe 2	Transferases	Transferem grupos químicos entre moléculas;
Classe 3	Hidrolases	Utilizam a água como receptor de grupos funcionais de outras moléculas;
Classe 4	Liases	Formam ou quebram ligações duplas, respectivamente, retirando ou adicionando grupos funcionais;
Classe 5	Isomerases	Realizam reações isomerização;
Classe 6	Ligases	Formam ligações químicas por reações de condensação, consumindo energia sob a forma de ATP.

Fonte: (ORLANDELLI et al., 2012) com adaptações

As principais fontes de enzimas são os animais, plantas e microrganismos, com destaque para os microrganismos, entre eles os fungos filamentosos que são amplamente utilizados como produtores de enzimas de interesse industrial, por

apresentar digestão enzimática extracelular, alguns apresentam crescimento rápido e são pouco exigentes nutricionalmente (FAÚNDEZ et al., 2019)

A utilização de enzimas na biotecnologia vai além do uso tradicional de enzimas, como a produção de cervejas, pães, vinhos, sucos e queijos. Elas podem ser aplicadas em vários ramos da biotecnologia, desde indústria alimentícia, de bebidas, cuidados pessoais e domésticos, agricultura, bioenergia, farmacêutico, têxtil, entre outros (FASIM et al., 2021).

As vantagens da utilização de enzimas em processos industriais são várias, entre elas está à possibilidade de utilização de enzimas com características específicas para cada processo, melhorando a eficácia do processo, gerando produtos com maior qualidade, além da utilização de fontes enzimáticas sustentáveis, como vísceras de peixes e microrganismos (SANTOS et al., 2020).

As enzimas com alta estabilidade a temperatura, pH, sal, solventes orgânicos são o principal alvo das pesquisas com enzimas devido sua maior capacidade de armazenamento e aplicação biotecnológica. (EISENTHAL et al., 2006).

As enzimas mais utilizadas em processos industriais estão às proteases, lipases, amilases, celulasas. As proteases correspondem a 60% do comércio internacional de enzimas, elas são aplicadas em diferentes processos industriais, entre eles: produção de detergentes, processamento de couro, produção de queijos, produção de medicamentos (LI et al., 2013; ALMONTE et al., 2011).

O segundo maior grupo de enzimas comerciais são as carboidrases, com destaque para as celulasas que são utilizadas tradicionalmente nas industriais de alimentos, cervejas, processamento da ração animal, produção de detergentes em associação as lipases e proteases, indústria têxtil, indústria farmacêutica e médica, fabricação de polpa de papel, produção de etanol de segunda geração (JUTURU and WU, 2014).

As lipases ocupam o terceiro lugar no mercado internacional de enzimas, estão envolvidas na obtenção de ácidos graxos livres a partir da hidrólise de óleos e gorduras presentes em diversos alimentos. Na indústria de cosméticos para o

desenvolvimento de emulsificantes, aromas, surfactantes e emoliente, ração animal, produtos químicos, couros, etc (CARVALHO, 2012; NAWABI et al., 2018).

As amilases correspondem a 25% do comercial mundial de enzimas, elas atuam principalmente no melhoramento do pão, aumentam a capacidade de retenção de gás da massa, aumentam o volume do pão, minimiza o endurecimento do pão (UNAI et al., 2022).

3.2.1 Celulases

A celulose é o polissacarídeo mais abundante da natureza, encontrado nas paredes celulares das plantas, em conjunto com a hemicelulose, a pectina e a lignina, esta última dá rigidez à parede celular e protege contra o ataque dos patógenos como fungos, bactérias e insetos menores (Liu et al. 2021). A celulose compreende cerca de 35-50% do peso seco da planta (Behera et al., 2017). A celulose é composta por polímeros de glicose unidos através de ligações do tipo β 1-4. As celulases são enzimas que hidrolisam a celulose, elas catalisam a hidrólise da ligação covalente com a adição de uma molécula de água (AKRAM et al., 2018).

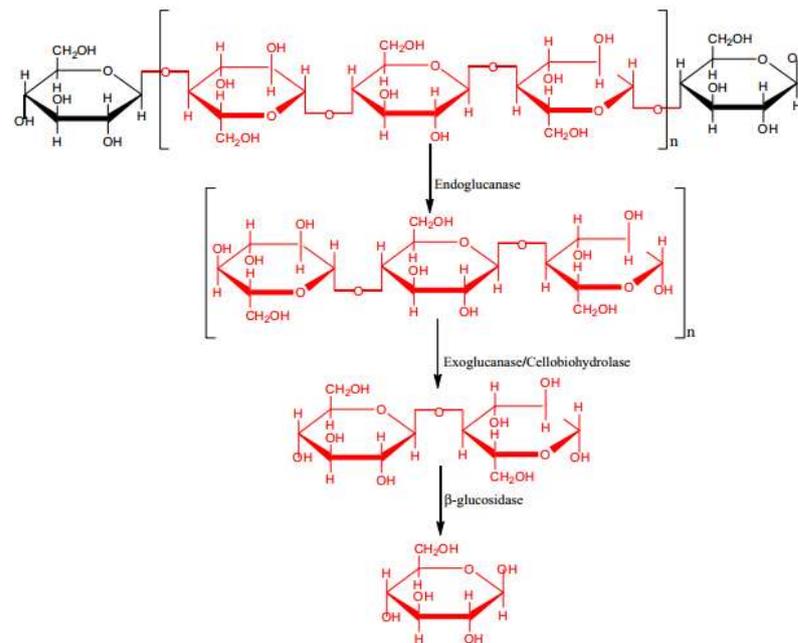
A celulase é formada por um complexo enzimático constituído por três enzimas (exo-1-4- β -D-glucanase, EC 3.2.1.91), (endo-1,4- β -D-glucanase EC 3.2.1.4), e (1,4- β -D-glicosidases EC 3.2.1.21). As exoglucanases agem clivando ligações glicosídicas nas extremidades da cadeia dos polissacarídeos, as endoglucanases clivam as ligações nas regiões mais internas e as β -glicosidases atuam clivando os dissacarídeos e liberando glicose (WANG et al., 2014), como mostra a Figura 6.

O mecanismo de ação da celulase requer o sinergismo das três enzimas do complexo celulolítico: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidase. 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 30 resíduos de

aminoácidos. As enzimas celulolíticas agem sinergicamente 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).

Figura 6. Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da celulase.



Fonte: Juturu et al., 2014

A hidrólise da celulase pode sofrer interferência de alguns fatores, como por exemplo, o tipo de substrato, a concentração do substrato pode afetar o rendimento do produto e a taxa de hidrólise inicial, outros fatores que podem interferir é a quantidade de lignina e o grau de polimerização da celulose contribuindo para a diminuição na taxa de hidrólise enzimática (Liu et al., 2021). Ostby et al., 2020 descreve que a ação da celulase gera glicose e celobiose livre e quando ocorre o acúmulo desses produtos estes se ligam as enzimas livres gerando um efeito inibidor e em testes laboratoriais pode-se utilizar β -glicosidase ou a remoção dos açúcares gerados por ultrafiltração.

A busca por celulases que apresentem potenciais biotecnológicos é grande em todo mundo, principalmente celulases relacionadas à eficácia na produção de biocombustíveis. A maioria das pesquisas de buscas por celulases de interesse biotecnológico utiliza bactérias e fungos, pois estes são responsáveis pela ciclagem biogeoquímica do carbono e nitrogênio. Entre as principais bactérias analisadas estão: proteobacteria, firmicutes, actinobacteria, bacteroidetes e entre os fungos estão as ascomicetos e basideomiceto (Land et al., 2015).

As celulases são a segunda maior classe de enzimas mais comercializadas no mundo, ficando atrás apenas para as proteases, elas estão envolvidas em vários processos industriais, como: na indústria de detergentes, indústria têxtil, indústria de processamento de papel, produção de biocombustível, entre outras (Patel et al., 2019).

A celulase é complexo enzimático composto por 3 enzimas, as endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidase juntas atuam na clivagem da cadeia do polissacarídeo celulose. A estrutura da endoglucanase mostra que esta enzima apresenta uma unidade catalítica com uma estrutura compacta contendo loops curtos e resíduos de aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina (Juturu et al., 2014).

As endoglucanases são bastante estudadas em todo mundo devido as características bioquímicas compatíveis aos processos industriais e sua estabilidade a variações ambientais. Elas são identificadas como (1,4- β -Dglicosidases EC 3.2.1.21) e classificadas como hidrolases clivando os polímeros de carboidratos em regiões internas da cadeia de celulose e liberando as cadeias externas que serão alvos das exoglucanases, estas liberam celobiose onde age as β -glicosidase liberando monômeros de glicose (ALMEIDA et al., 2013).

As endoglucanases apresentam grande importância biotecnológica, pois são consideradas enzimas com grande estabilidade em sua estrutura permitindo seu uso em diversas aplicações industriais, tais como: indústria têxtil, indústria de alimentos, indústria farmacêutica, produção de biocombustíveis como etanol de segunda geração.

3.3. Microrganismos produtores de enzimas

As enzimas microbianas são historicamente utilizadas para o melhoramento dos processos industriais, inicialmente não se tinha conhecimento da existência das enzimas, mas acreditava-se que os microrganismos eram responsáveis pelo melhoramento dos pães, cervejas, vinhos, etc.

Com o progresso da ciência o desenvolvimento do microscópio foi possível identificar que não eram os microrganismos os responsáveis pelo melhoramento dos produtos, mas as enzimas que eles produziam, tais como as amilases.

Diante disso houve uma busca pelo isolamento e obtenção dessas enzimas para avaliação das principais características bioquímicas, utilização em outros processos industriais e comercialização de forma geral, gerando um comércio internacional de enzimas que giram em torno de 6,3 bilhões de dólares anualmente (INDUSTRIAL ENZYME MARKET, 2016).

Os microrganismos são bastante utilizados na produção de enzimas de interesse biotecnológico devido à facilidade no cultivo de algumas espécies, maior controle das condições de cultivo, utilização de substratos baratos para o crescimento como, por exemplo, os resíduos agroindustriais.

Alguns microrganismos secretam suas enzimas, pois realizam digestão extracelular facilitando a obtenção das enzimas e facilitando o processo de purificação das mesmas (CHENG et al., 2020; VACHHER et al., 2022).

Outras vantagens são encontradas nas enzimas microbianas como a maior estabilidade a algumas condições industriais, tais como estabilidade térmica permitindo que a enzima seja utilizada em processos com grandes variações de temperatura sem o comprometimento da atividade enzimática, grande estabilidade a variações de pH, salinidade e estabilidade a solventes orgânicos o que aumenta a eficácia catalítica e o reaproveitamento da mesma (FARIAS et al., 2021).

As enzimas microbianas podem ser obtidas a partir de bactérias, fungos e leveduras. As bactérias são bastante no processo de obtenção de enzimas, principalmente utilizando o consorcio de bactérias e/ou fungos filamentosos, que

formam um grupo heterogêneo de bactérias e/ou fungos capazes de produzir uma maior variedade de enzimas.

Entre as enzimas obtidas a partir de bactérias podemos destacar as peroxidases que atuam na degradação de compostos tóxicos provenientes das indústrias têxtil, química, entre outras. Esses compostos são gerados no final de alguns processos industriais e são eliminados de forma incorreta nos solos, corpos d'água, as peroxidases catalisam a oxidação de vários compostos químicos usando peróxido de hidrogênio como co-substrato. Outras enzimas bacterianas atuam na biorremediação de solos, na remoção de corantes sintéticos da indústria têxtil, na polimerização de compostos fenólicos (SELLAMI et al., 2022).

As tirosinases são enzimas encontradas em algumas bactérias como os *Streptomyces* que tem capacidade de converter L-tirosina em melanina, pigmento muito conhecido para sua capacidade fotoprotetora, porém outras utilizações biotecnológicas tem sido encontrada para as tirosinases, como por exemplo ativação de resíduos de tirosina em políptideos para reticulação de proteínas a filmes de quitosana, remoção de fenol para o tratamento de águas residuais, entre outras utilizações (FAIRHEAD and THONY-MEYER, 2012).

Outro grupo de microrganismo importante para obtenção de enzimas são os fungos, eles podem ser os fungos filamentosos e leveduras. Entre os fungos filamentosos os fitopatogênicos e decompositores de matéria orgânica são os que mais se destacam.

Os fungos fitopatogênico e decompositores são amplamente conhecidos como importantes degradadores de polissacarídeos na natureza, pois produzem um extenso conjunto de enzimas que favorecem sua sobrevivência nesses habitats. Entre as enzimas produzidas estão as xilanolíticas responsáveis pela degradação dos xilanos em monossacarídeos, que pode ser utilizados para produção vários produtos químicos de grande valor (LI et al., 2022).

Os chamados fungos da podridão branca pertencem ao segundo maior filo do reino Fungi, os basidiomycota, eles são conhecidos por consumir lignina heteropolimérica como único recurso de carbono e energia e são amplamente estudados para o pré-tratamento lignocelulósico (SAINI and SHARMA, 2021).

As leveduras também são fungos que apresentam produção de importantes enzimas de interesse biotecnológico, como por exemplo a *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528 que produz valiosos produtos biotecnológicos como biossurfactantes, proteases, lipases e caratenóides e altos níveis de ácidos graxos insaturados (LARIO et al., 2020).

3.3.1. Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos compõem um grupo importante de microrganismos, pertencente ao reino Fungi, são microrganismos que vivem em habitats diversos como as micorrizas que colonizam os solos próximos as raízes das plantas de onde recebem carboidratos para seu desenvolvimento, essa associação simbiótica também favorece a planta que aumenta sua absorção de água e sais minerais. (NUSBAUMER et al., 2015).

Outros fungos se alimentam de substâncias orgânicas provenientes da matéria orgânica que decompõem, estes desempenham um papel importante na reciclagem no meio ambiente.

Os macrofungos podem ser classificados como Ascomicetos, pois seus esporos sexuais (ascósporos) são produzidos dentro de células especializadas denominada ascos. E os Basidiomicetos, onde os esporos sexuais (basidiosporos) se formam externamente no basídio (NUSBAUMER et al., 2015).

Alguns fungos possuem capacidade de sobreviver em solos ou corpo d'água contaminado com produtos tóxicos, pois são produtores de enzimas que degradam compostos tóxicos em compostos menos tóxicos ou atóxicos e podem ser integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais (COLLA et al., 2008).

Eles são uma importante fonte de enzimas para degradação de biomassa vegetal, hidrólise verde produção de biocombustíveis, biorremediação de solos e corpos d'água contaminados, biorrefinamento, a chamada biotecnologia verde (LEVASSEUR et al., 2014).

Pycnoporus sanguineus

O *P. sanguineus* é um fungo filamentoso pertencente a família Polyporaceae, conhecido como fungo da podridão branca, popularmente conhecido como orelha de pau, pertencente ao grupo basideomiceto conhecido como cogumelo, é um fungo decompositor de matéria orgânica apresenta coloração alaranjada e rígida (figura 7) é produtor de importantes enzimas lignocelulósicas favorecendo sua atividade decompositora (LIN et al., 2020).

Figura 7: Imagens do fungo *Pycnoporus sanguineus* na natureza



Fonte: Theknature.com (acesso em 18/01/2022).

O *P. sanguineus* é conhecido por possuir características importantes, como efeito na adsorção de chumbo, cobre e cádmio, aplicações envolvendo sua aplicação na biossorção de metais pesados em habitats poluídos por óleo (DANTÁN-GONZÁLEN et al., 2008).

O fungo também possui substância bioativa com propriedades antimicrobiana e antitumoral, sendo bastante utilizadas para o tratamento de lesões de pele e outras doenças. O ácido ciannabarínico é um metabolito secundário capaz de inibir as bactérias Gram positivas, concentrações mais altas foram capazes de inibir o crescimento do vírus da raiva e células de neuroblastoma em camundongo sem efeitos tóxicos (LIN et al., 2020).

Outras enzimas de interesse biotecnológico foram obtidas a parti do *P. sanguineus*, NIDERHAUS et al., 2018 realizou a produção heteróloga de uma endoxylanase e verificou excelentes características bioquímicas, como ampla estabilidade a variações de pH e temperatura.

O importante papel ecológico do *P. sanguineus* é de grande destaque, pois atua na degradação do lixo florestal lenhoso atuando na “limpeza” de matéria orgânica das florestas (LEE et al., 2012).

3.4. Fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido é definida como cultivo de microrganismos em substratos sólidos na ausência de água livre, bastante utilizada para produção de enzimas e outros produtos, considerada uma técnica de fácil manipulação e baixo custo (HOLKER and LENZ, 2005).

A FES é considerada a técnica mais apropriada para produção de enzimas, compostos bioativos, bioplásticos e biocombustíveis a partir dos resíduos agroindustriais (SHARMA et al., 2021). Essa técnica utiliza subprodutos da agroindústria como meio de baixo custo ou de nenhum valor econômico, é uma técnica prática, legalmente aceitável e ecologicamente benéfica (CHILAKAMARRY et al., 2022; POSTIGO et al., 2021).

A fermentação em estado sólido apresenta algumas características importantes, a fase sólida fornece o carbono, nitrogênio e demais componentes, além de atuar como suporte para o crescimento das células microbianas, o ar necessário para o crescimento microbiano deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas, o crescimento do microrganismo ocorre em condições mais próximas ao natural, não a presença de água livre (YOON et al., 2014; EMBRAPA, 2005).

As bactérias e leveduras também podem crescer nesses tipos de fermentação, porém os fungos filamentosos são mais adaptados a FES, devido à capacidade de crescerem em pouca água, muitos sólidos presentes, estes tipos de fungos crescem por meio de hifas o favorece sua dispersão na fermentação sólida (EMPRADA, 2005).

Na Ásia a fermentação em estado sólido é utilizada há muitos anos para produção de Koji rico em enzimas a partir do *Aspergillus oryzae*, para sacarificação

de arroz usado na produção de bebidas alcoólicas como saquê, produção de celulase, entre outras aplicações (HOLKER AND LENZ, 2005).

Há uma grande diversidade de enzimas produzidas através da fermentação em estado sólido, entre elas as endoglucanases produzidas pelo fungo *Bothritis ricini* cultivada em bagaço de cana de açúcar (SILVA et al., 2018). A fermentação do *Aspergillus sp* em resíduos agroindustriais tendo diversas fontes de óleos como indutores para a produção lipases (TACIN et al., 2019).

As proteases também podem ser produzidas a partir da fermentação em estado sólido, a exemplo da fermentação do fungo *Neurospora crassa* em resíduos de soja (okara) (ZHENG et al., 2020). Vários outros tipos de enzimas podem ser produzidas a partir da fermentação em estado sólido.

Em comparação com a fermentação submersa, a fermentação em estado sólido fornece maior concentração de enzimas, maior produtividade, menos custo de energia, e o emprego de substrato de baixo custo (YOON et al., 2014).

3.5. Purificação

A purificação ou isolamento de proteínas e enzimas é uma das principais etapas nos estudos de conhecimento dessas macromoléculas, pois é possível identificar quais características bioquímicas elas possuem, quais as aplicações biotecnológicas podem ser utilizadas e ampliar o conhecimento acerca dessas macromoléculas como, por exemplo: suas estruturas, seu comportamento e ampliar sua utilização.

A purificação ou isolamento de proteínas podem ser divididos em algumas etapas, que variam de acordo com a característica da amostra inicial do extrato bruto por exemplo. Na primeira etapa necessário realizar a concentração e estabilização da proteína alvo, remover o máximo de impurezas presentes na amostra e na terceira etapa é alcançar o total isolamento da proteína de interesse.

As principais técnicas utilizadas para o isolamento de enzimas e/ou proteínas é o fracionamento salino (*salting out*) utilizando sulfato de amônio ou o fracionamento com solventes orgânicos (etanol absoluto ou acetona), esses

compreendem técnicas de estabilização, concentração e remoção dos contaminantes da amostra inicial, a cromatografia líquida é considerada a principal etapa no processo de isolamento de enzimas e proteínas, pois são as técnicas cromatográficas de conseguem isolar totalmente a enzima de interesse.

O fracionamento salino (*salting out*) ou com solventes orgânicos é a adição de sal geralmente sulfato de amônio ou de solventes orgânicos (acetona ou álcool etílico absoluto) de forma fracionada e lenta para a precipitação de proteínas e/ou enzimas de um extrato ou solução. Com a adição de sal ou do solvente orgânico as moléculas de água diminuem a interação com as proteínas, gerando a precipitação das proteínas de acordo com o grau de solubilidade das mesmas (CHANG et al., 2003; GRECCO et al., 2018)

As técnicas de fracionamento ou precipitação de proteínas são bastante utilizadas para diminuir contaminantes da amostra e facilitar o processo de purificação por cromatografia líquida. As principais formas de cromatografia líquida utilizadas para o isolamento de proteínas e/ou enzimas são a filtração em gel, troca iônica e afinidade (GRECCO et al., 2018).

A cromatografia de filtração em gel compreende uma técnica que utiliza a diferença de massa molecular das partículas da amostra como separa-las. A cromatografia de troca iônica ou catiônica utiliza a diferença de cargas para separa-las, através de uma força de dissociação para separar a proteína ou enzima de interesse. A cromatografia de afinidade utiliza um ligante específico da enzima para separa-la dos componentes não específicos.

O tipo de cromatografia utilizada depende do perfil da enzima apresenta, como por exemplo: carga no pH ótimo da enzima, estrutura tridimensional, etc. É possível utilizar resinas diferentes nas cromatografias, resinas com força iônica maior ou menor. A escolha da melhor resina para cromatografia também deve observar os custos do processo, pois a utilização de cromatografia líquida é um processo bastante oneroso no processo.

3.6. Aplicações biotecnológicas

Com a busca pela diminuição do uso dos combustíveis fósseis os biocombustíveis ganharam grande destaque em todo mundo. A produção de biocombustíveis utilizando fontes vegetais como cana de açúcar, milho vem sendo produzidas nos últimos anos, contudo a produção de etanol a partir de cana de açúcar tem gerado o descarte de toneladas de resíduos de forma incorreta, esses resíduos podem ser reaproveitados para geração de etanol de segunda geração.

Para que ocorra a produção de etanol a partir do bagaço de cana ou de outros resíduos agroindustriais é necessária à utilização de enzimas celulolíticas para a produção de açúcares fermentáveis a partir de resíduos agroindustriais. (Kee et al., 2021). Atualmente as principais fontes de enzimas celulolíticas com boa eficácia catalítica e com grande capacidade de produção de açúcares fermentáveis são os microrganismos.

Como descrito anteriormente o grupo das celulasas é a segunda maior classe de enzimas comercializáveis no mundo e são utilizadas em vários processos industriais como, por exemplo, a produção de biocombustível. (Juturu et al., 2014).

No Brasil a produção de etanol é produzida a partir da cana de açúcar, contudo há a produção de grandes quantidades de bagaço de cana que muitas vezes não são reaproveitados da forma correta. A utilização de enzimas celulolíticas para a degradação do bagaço de cana e produção de açúcares fermentáveis que posteriormente podem ser fermentados por leveduras e produzir mais etanol (HOSGUN et al., 2017).

As celulasas são bastante utilizadas nas industriais de papel e celulose no refinamento, destintagem, melhoramento do brilho da polpa do papel, biobranqueamento do papel kraft, entre outras utilizações (BAJAJ et al., 2019). Pathak et al., 2014 observou que as celulasas e xilanases produzidas pelo *Trichoderma harzianum* aumentou a eficiência da destintagem em 23,6%, aumentou 6,7% da resistência à tração.

A indústria têxtil vem sofrendo pressão para mudar suas tecnologias para tecnologias mais limpas ou chamada biotecnologia verde devido ao aumento

consumo de produtos químicos nos processos, alto consumo de energia e água e descarte incorreto de corantes (SINGH et al., 2021).

A utilização de celulases em seus processos vem ganhando destaque, elas atuam nas industriais têxteis desde 1980 e estão envolvidas em vários processos como amaciamento de algodão, acabamento do tecido, biopolimento, as enzimas são principalmente utilizadas para obter um tecido mais limpo, com superfícies mais lisas (MOREIRA et al., 2016; HOUFANI et al., 2020).

Na indústria alimentícia as celulases desempenham um papel muito importante e podem ser combinadas com pectinases e xilanases são chamadas de enzimas maceradoras. Elas atuam no aumento do rendimento de sucos, reduzem o tempo do processamento, melhoram a extração do processo, atuam na clarificação de sucos de frutas e vegetais, reduz a viscosidade dos sucos, aumentam as características voláteis dos produtos (TOUSHIL et al., 2017).

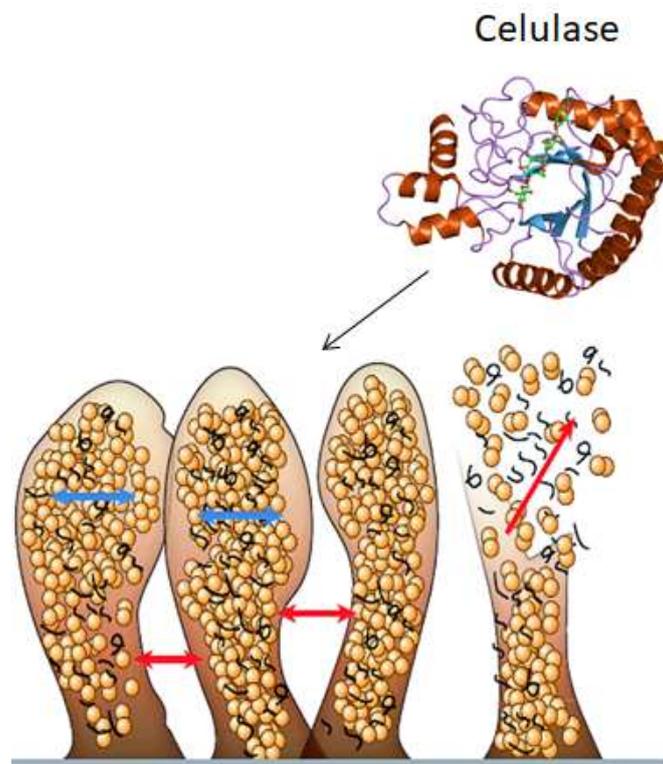
A extração e obtenção dos pigmentos e compostos bioativos são de grande interesse das industriais, porém sua obtenção é difícil, pois são encontrados associados as paredes celulares das plantas e sua extração apresenta baixo rendimento, para resolver este problema as celulases em associação a outras enzimas lignocelulolíticas são utilizadas para degradar os componentes da parede celular e facilitar a extração dos pigmentos e dos compostos bioativos aumentando o rendimento (ZUORRO et al., 2011).

A associação de enzimas diferentes para aumentar a eficácia do processo indústria é bastante utilizada na indústria de detergentes e limpeza, é realizada a associada das enzimas proteases, lipases e celulases em detergentes conhecidos como detergentes com enzimas ativas, estas enzimas facilitam a remoção de manchas nos tecidos sem a presença de agente químicos abrasivos, mantendo as características originais dos tecidos por mais tempo (Houfani et al., 2020).

Outra importante aplicação biotecnologia das celulases é como agentes hidrolisantes de biofilmes bacterianos encontrados em equipamento hospitalares. Os equipamentos hospitalares não bem esterilizados são responsáveis pelas altas taxas de infecções nos hospitais. Os biofilmes são protegidos por uma camada polissacarídica que envolve as células bacterianas, impedindo que os agentes

químicos esterilizantes removam totalmente as bactérias. Dessa forma as celulases são utilizadas para degradar a barreira polissacarídica dos biofilmes e os agentes esterilizantes atuam de forma eficaz (Kee et al., 2014).

Figura 8. Esquema ilustrativo da ação da celulase em biofilme bacteriano.



Fonte: files.ufgd.edu.br (acesso em 01/02/2022).

4.0. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. PRODUÇÃO E OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO (EXTRATO ENZIMÁTICO)

4.1.1 Obtenção do fungo *Pycnoporus sanguineus*

O fungo *P. sanguineus* foi obtido a partir da micoteca do Laboratório de Biotecnologia e Enzimologia situado no instituto de química e biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. O mesmo foi replicado em placa de *petri* contendo meio PDA (Potato Dextrose Agar) e incubado em estufa microbiológica a 28°C por 7 dias.

4.1.2. Preparação do inóculo

O fungo *P. sanguineus* foi cultivado em PDA com 2% de sacarose por 5 dias, após o período de incubação 1 spot de 10 mm do meio de cultura com fungo foi transferido de forma asséptica para os resíduos agroindustriais previamente preparados.

4.1.3. *Screening* dos resíduos agroindustriais x perfil fermentativo

Foram selecionados cinco diferentes resíduos agroindustriais (bagaço de cana de açúcar, papel de filtro, pó de madeira, fibra do coco e farelo de trigo), para ser substrato do crescimento e produção de endoglucanase pelo fungo *P. sanguineus*, por fermentação em estado sólido e fermentação submersa. Os resíduos foram provenientes de industriais de Alagoas e de pequenos comerciantes locais.

Os resíduos foram previamente preparados para as fermentações, contudo não houve pré-tratamento químico ou físico, apenas o bagaço de cana de açúcar foi lavado abundantemente com água corrente e água destilada para remoção dos açúcares redutores presentes neste resíduo, após a lavagem o bagaço de cana foi seco em estufa a 50° C por 48 horas.

Foram pesados 10 g de cada resíduo e transferidos para *erlemayers* de 250 mL, esterilizados em autoclave por 20 minutos a 120°C a pressão de 1 atm. De forma asséptica em câmara de fluxo laminar foram adicionados volumes previamente determinados de água destilada esterilizada em cada resíduo para garantir a umidade necessária e posteriormente foi realizada a inoculação do fungo inserindo 1 spot de 10 mm do fungo em PDA com 5 dias de cultivo, para realização das fermentações em estado sólido.

A fermentação submersa foi realizada para o cultivo do fungo utilizando o papel de filtro como indutor do crescimento fúngico, onde 150 mL de caldo de batata com 10 g de papel de filtro foram utilizadas para o cultivo do fungo em estufa microbiológica a 28°C sob agitação constante durante 7 dias.

O perfil fermentativo foi determinada a partir da maior taxa de hidrólise enzimática sob o substrato CMC durante 7 dias das fermentações em estado sólido e submersa. Foi selecionado o resíduo que apresentou maior taxa de hidrólise do CMC em menor tempo de fermentação. A cada 24 horas uma fermentação foi retirada para determinar a atividade da endoglucanase.

4.1.4. Obtenção do extrato bruto

Após cada dia do cultivo na fermentação em estado sólido foram obtidos os extratos brutos utilizando aproximadamente 50 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 para extração do material enzimático através da homogeneização dos resíduos agroindustriais fermentados por 10 minutos, seguido de filtração em peneira de inox esterilizada e centrifugação por 5 minutos a 5.000 g a temperatura ambiente.

Na fermentação submersa após cada dia de cultivo foi realizada a filtração do fermentado. Todos os extratos brutos obtidos foram armazenados em geladeira entre 2 a 8°C e posteriormente encaminhados para realização da atividade enzimática pelo método de DNS (Ácido dinitrosalicílico).

4.1.5. Atividade Enzimática

A atividade enzimática através da quantificação de açúcares redutores obtidos através da hidrólise enzimática no substrato CMC 2% (método de DNS Ácido dinitrosalicílico). Foram utilizados 5 µl de extrato bruto, 10 µl frações do isolado ou 30 µl enzima isolada e 100 µl de CMC (carboximetilcelulose a 2%) como substrato, tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 por 60 minutos em a 50°C em banho maria.

Após o período incubação foram adicionados 200 µl de DNS, a reação aquecida a 100°C por 5 minutos em banho maria e encerrada adicionando 500 µl de água destilada a temperatura ambiente. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm (VARIAN CARY 50 BIO). (Miller, 1959).

4.2. PURIFICAÇÃO DA ENDOGLUCANASE DO *P. sanguineus*

4.2.1. Precipitação com sulfato de amônio e precipitação com etanol

O extrato bruto foi fracionado em cinco frações utilizando sulfato de amônio (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100%). O fracionamento foi realizado com 5 mL de extrato bruto em agitação constante e banho de gelo durante a adição gradual do sulfato.

Após a adição gradual do sulfato de amônio em cada fração o extrato foi reservado em geladeira por 60 minutos e posteriormente centrifugado a 15.000 g por 15 minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0 e reservado a temperatura entre 2 a 8°C, o sobrenadante foi direcionado para nova adição de sulfato de amônio, todo processo foi repetido até alcançar a fração 80 – 100% de sulfato de amônio.

Semelhante a precipitação com sulfato de amônio, a precipitação com etanol utilizou 5 mL de extrato bruto e o fracionou em cinco frações utilizando álcool absoluto (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100%). O fracionamento foi realizado em agitação constante e banho de gelo durante a adição gradual do álcool.

Após a adição gradual de álcool absoluto em cada fração o extrato foi reservado em geladeira por 60 minutos e posteriormente centrifugado a 15.000 g por 15 minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0 e reservado a temperatura entre 2 a 8°C, o sobrenadante foi direcionado para nova adição de álcool, todo processo foi repetido até alcançar a fração 80 – 100% de álcool absoluto.

Todas as frações provenientes da precipitação com sulfato de amônio e etanol foram analisadas quanto à hidrólise do CMC (método do DNS, sessão 4.1.5.). A fração que apresentou maior atividade enzimática e maior taxa de recuperação foi direcionada para purificação com a cromatografia de troca iônica (DEAE Sepharose).

4.2.2. Cromatografia Líquida

Na cromatografia de troca iônica DEAE Sepharose, foram utilizados 5 mL da fração com maior atividade enzimática e aplicada em coluna de troca iônica (DEAE Sepharose). Foi utilizado o tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 (tampão A) para equilibrar a coluna cromatográfica de aproximadamente 60 mL, o tampão de eluição foi tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 com 0,5 M de NaCl (tampão B), criando um gradiente de concentração de NaCl de 0 a 100% em 10x o volume da coluna utilizando AKTA pure.

Foram cerca de 60 frações com 12 mL cada, estas foram coletadas e analisadas quanto ao perfil proteico em espectrofotômetro a 280 nm e análise da atividade enzimática individualmente utilizando o método de hidrólise do CMC (método de DNS), seção 4.1.4, todas as frações foram armazenadas em temperatura de 2 a 8°C.

As frações que apresentaram maior taxa de hidrólise do CMC (maior atividade enzimática) foram submetidas à eletroforese por SDS-PAGE para verificar a taxa de pureza da mesma.

4.2.3. Análise por SDS-PAGE

A análise por SDS-PAGE foi realizada para o acompanhamento das etapas de purificação e para estimar a massa molecular da enzima isolada. A eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 10% foi realizada através da utilização de alíquotas de 5 µl de extrato bruto, 20 µl de fração 80-100% da precipitação etanólica e 20 µl fração eluída da cromatografia líquida (DEAE Sepharose).

O gel foi submetido a uma voltagem constante (90 V), por aproximadamente 2 horas (LAEMMLI, 1970), utilizando o sistema Mini –Protean 3 (Bio-rad), com um marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Markers, promega – 12 a 225 kDa). Após a corrida eletroforética o mesmo foi inserido em solução de fixação (40 mL de metanol, 50 mL de água destilada e 10 mL de ácido acético) por 15 minutos e posteriormente lavado 4 vezes com água destilada a cada 30 minutos e por fim corado com nitrato de prata de acordo com (Santos et al., 2016).

4.3. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

4.3.1. Temperatura ótima e estabilidade térmica

A temperatura ótima da endoglucanase foi determinada utilizando reações enzimáticas como descritas na secção 4.1.5. A atividade enzimática foi avaliada em diferentes temperaturas (20° - 80°C) em reações contendo 30 µL da enzima em 170 µL de tampão A (acetato de sódio 0,1 M pH 5,0) estas reações foram incubadas por 60 minutos nas respectivas temperaturas em banho maria e após o período de incubação foram adicionados 200 µl de DNS e aquecido a 100°C por 5 minutos, as reações foram encerradas com 500 µl de água destilada.

A termoestabilidade foi determinada de forma semelhante, incubando 30 µl da enzima em 170 µl de tampão A em diferentes temperaturas (20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C e 80°C) por 60 minutos em banho maria, após o período de incubação foi adicionado 100 µl de CMC 2% e incubado novamente por 60 minutos

na temperatura ótima da enzima (50°C), após a segunda incubação foram adicionados 200 µl de DNS e incubado a 100°C por 5 minutos, as reações foram encerradas com 500 µL de água destilada.

Todas as atividades enzimáticas do teste de temperatura ótima e estabilidade térmica foram quantificadas em espectrofotômetro a 540 nm (UV VARIAN CARY 50 BIO), quantificando a produção de açúcares redutores pela hidrólise do CMC. A temperatura que a enzima apresentou maior hidrólise do CMC foi considerada 100%, no teste de estabilidade térmica foi determinado à atividade enzimática residual, após submeter à endoglucanase a temperaturas diferentes.

4.3.2. Teste de pH ótimo e estabilidade em pH

Para determinação do pH ótimo da endoglucanase do *P. sanguineus* analisamos a atividade enzimática em diferentes tampões através da maior taxa de hidrólise do CMC (sessão 4.1.5) , os tampões escolhidos de acordo com a faixa de tamponamento dos mesmos para o pH 2-3 (citrato de sódio 0,05 M), pH 4-6 (acetato de sódio 0,05 M); pH 7,0 (fosfato de sódio 0,05 M); pH 8,0 (Tris-HCl 0,05 M); pH 9-11 (Glicina 0,05 M).

As reações foram realizadas adicionando 30 µL da enzima em 170µL de tampão do pH analisado e 100 µL CMC 2% e incubados por 60 minutos na temperatura ótima (50°C) em banho maria, após o período de incubação foram adicionados 200 µl de DNS e aquecidos por 5 minutos a 100° C, as reações foram encerradas adicionando 500 µl de água destilada e analisadas em espectrofotômetro a 540 nm. O pH em que a endoglucanase apresentou maior atividade foi considerado o pH ótimo.

A estabilidade em pH foi analisada com os mesmos tampões descritos acima, nas reações foram adicionados 30 µL da enzima e incubada por 60 minutos a 50°C em 100 µL dos respectivos tampões de acordo com o pH teste, após o período de incubação foram adicionados 170 µL de tampão do pH ótimo (acetato de sódio 0,2 M) para garantir que a o pH da reação atinge-se o pH ótimo da enzima e 100 µl de CMC 2% e as reações foram novamente incubadas por 60 minutos a 50°C em

banho maria, após a segunda incubação foram adicionados 200 µl de DNS e aquecido por 5 minutos a 100°C, as reações foram encerradas com 500 µl de água destilada e analisadas em espectrofotômetro a 540 nm.

4.3.3. Determinação da capacidade halotolerante

A capacidade halotolerante da endoglucanase isolada do *P. sanguineus* foi determinada conforme a atividade enzimática descrita na secção 4.1.5. Foram adicionados 30 µl da enzima em 170 µl tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 com diferentes concentrações de NaCl (0; 0,5; 1,0; 1,5, 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 M) por 60 minutos a 50° C em banho maria e depois foram adicionados 200 µl de DNS e aquecido a 100 °C por 5 minutos, as reações foram encerradas com 500 µl de água destilada e analisada em espectrofotômetro 540 nm. A atividade relativa foi determinada a partir da atividade enzimática sem a presença de NaCl na reação considerada 100%.

4.3.4. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas em (mg/mL) foi determinada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1970) usando albumina de soro bovino como padrão. Foram utilizados 10 µl das amostras diluídas (1:10) e adicionados 790 µl de água e 200 µl de reagente de Bradford e incubadas por 5 minutos em câmara escura, as amostras foram analisadas em 595 nm em espectrofotômetro.

4.3.5. Determinação das constantes cinéticas

As constantes cinéticas foram determinadas em tampão acetato de sódio 100 0,1 M, pH 5,0, variando a concentração do substrato (CMC) em 0,05 – 7% sob condições de ensaio mencionada na secção 4.1.5 em temperatura e pH ótimos. 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.

Todos os testes para caracterização da endoglucanase do *P. sanguineus* foram realizados em triplicatas e analisados utilizando o mesmo equipamento de espectrofotômetro (UV VARIAN CARY 50 BIO).

4.4. APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

4.4.1. Sacarificação de resíduos agroindustriais

A endoglucanase isolada foi utilizada para sacarificar alguns resíduos agroindustriais como: bagaço de cana, casca de arroz e farelo de trigos cedidos por indústrias de Alagoas. As reações foram realizadas nas condições de temperatura e pH ótimo da enzima, com a adição de 900 µl de tampão acetato de sódio (0,1 M pH 5,0) em 1g do resíduo agroindustrial e 100 µl da enzima isolada (0,449 U/mL).

As reações ocorreram em banho maria a 50°C por 6, 12 e 24 horas de incubação, após cada período de incubação foi realizada a centrifugação da reação por 5 minutos a 10.000 rpm a temperatura ambiente (HITACHI Bx II series), 300 µl foi retirado para adição de 200 µl de DNS e posterior fervura a 100°C por 5 minutos, a reação final foi encerrada com 500 µl de água destilada e analisada em espectrofotômetro a 540 nm. O controle negativo foi realizado sem a utilização da endoglucanase isolada.

Os resultados foram determinados a partir da quantidade de açúcar redutor gerado com a hidrólise da endoglucanase sobre os resíduos agroindustriais testados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OBTENÇÃO DO FUNGO *P. sanguineus*

O fungo foi obtido na micoteca situada no laboratório de Biotecnologia e Enzimologia do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. Após o cultivo em meio PDA (Potate Dextrose Agar) por 7 dias o fungo apresentou quantidade significativa de esporos alaranjados (Figura 12), mostrando-se pronto para as etapas de fermentação nos resíduos agroindustriais.

Figura 9. Placa de petri com o fungo *P. sanguíneus* em PDA



Cultivo do fungo *P. sanguineus* em PDA (Patote Dextrose Agar) por 7 dias em estufa microbiológica a 28°C.

Fonte: autora, 2021

O *P. sanguineus* é um fungo conhecido como podridão branca, pois esta associada à degradação da material orgânico em decomposição e apresenta grandes quantidades de enzimas digestivas de carboidratos. Ele se desenvolve nas paredes de vegetais em decomposição, é um basideomiceto e apresenta um corpo de frutificação alaranjado na natureza.

O fungo apresentou crescimento rápido no meio PDA e grande quantidade de esporos, apresenta esporos alaranjados e base branca.

5.2. FERMENTAÇÃO E EXTRATO BRUTO (EXTRATO ENZIMÁTICO)

5.2.1. *Screening* dos resíduos agroindustriais x perfil fermentativo

O fungo *P. sanguineus* apresentou crescimento e perfil de produção da enzima endoglucanase bem distintos nos cinco resíduos agroindustriais analisados, como mostra os perfis fermentativos na figura 10.

Figura 10. Perfil da atividade enzimática (U/mL) da endoglucanase produzida pelo fungo *P. sanguineus* nos diferentes resíduos agroindustriais.

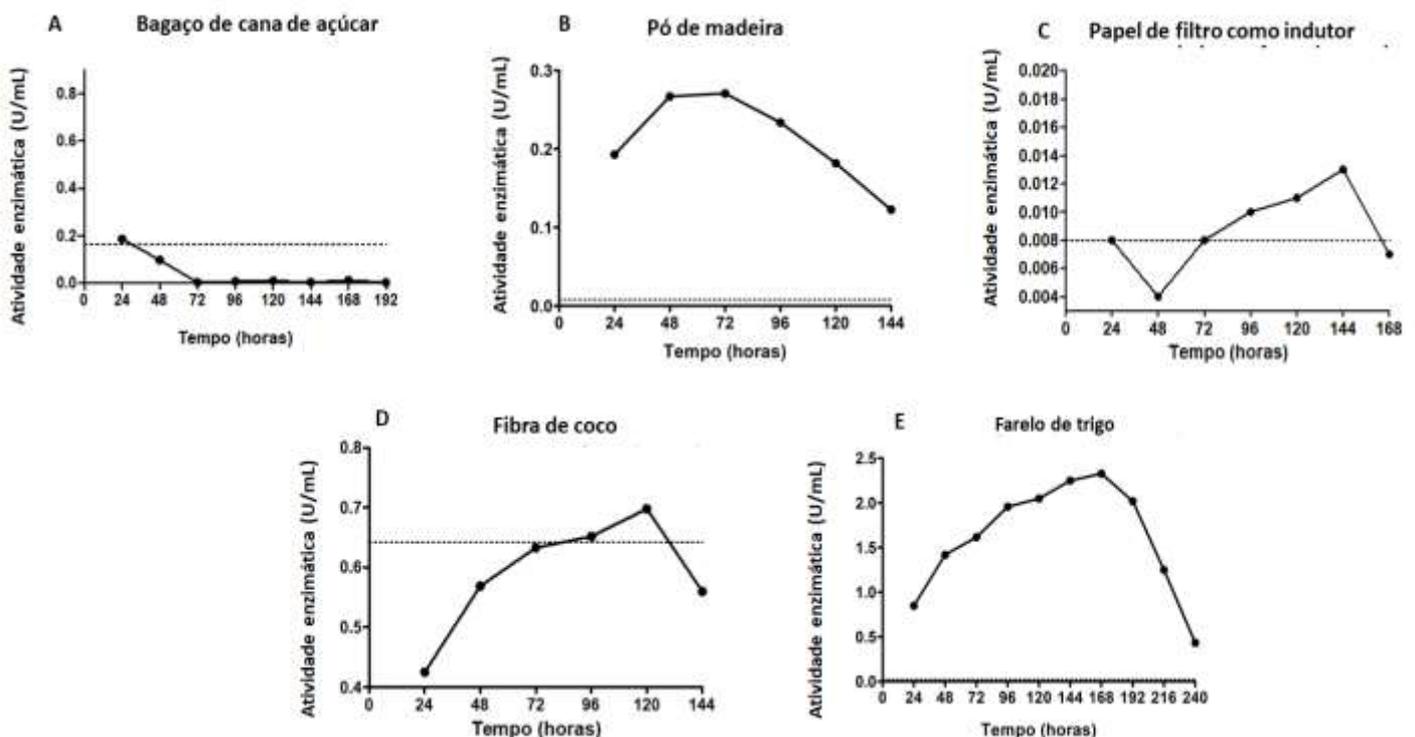


Figura 13: A - Perfil da atividade enzimática (U/mL) em bagaço de cana de açúcar, B – perfil da atividade enzimática (U/mL) em pó de madeira, C – perfil da atividade enzimática (U/mL) em papel de filtro como indutor, D – perfil da atividade enzimática (U/mL) em fibra de coco; E – perfil da atividade enzimática (U/mL) em farelo de trigo.

Fonte: autora, 2021

O primeiro resíduo agroindustrial analisado foi o bagaço de cana de açúcar, que apresentou baixo crescimento do fungo e baixa produção enzimática, este resíduo apresenta uma composição considerada complexa devido ao grande percentual de lignina entre 17-32% (ALOKIKA et al., 2021).

A lignina presente no bagaço de cana atua como uma importante barreira na conversão efetiva de celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis por alguns fungos filamentosos (ÁZAR et al, 2019).

Na figura 10 A é possível observar a baixa atividade enzimática da endoglucanase no bagaço de cana, a produção enzimática manteve-se próxima a linha de base, porém é possível observar que há presença de pequenas quantidades de açúcares redutores nos dois primeiros dias do cultivo do fungo. Isso é devido à presença de açúcares redutores residual na fibra do bagaço de cana.

Ostbly et al., 2020 e Land et a., 2015 descrevem que para um melhor resultado na produção de endoglucanase por fungos filamentosos é necessário submeter os resíduos como o bagaço de cana de açúcar a pré-tratamentos químicos ou físicos para melhorar o acesso do mesmo ao resíduo com a remoção significativa da lignina e garantir uma melhor hidrólise fúngica da celulose e hemicelulose.

A figura 11 A corrobora com a baixa produção da endoglucanase, pois o crescimento do fungo foi baixo. Alguns fungos apresentam dificuldades de desenvolvimentos em resíduos muito complexos devido a grande quantidade de lignina e os pré-tratamentos químicos ou físicos são utilizados para remoção da lignina e facilitação do acesso do fungo ao resíduo (Yoon et al., 2019).

Para aumentar a produção de bioetanol utilizando fermentação do fungo *Phanerochaete chrysosporium* em bagaço de cana, o resíduo foi pré-tratado com 0,62 M de NaOH por 30 minutos a 128°C (Yoon et al., 2019).

Contudo, os pré-tratamentos dos resíduos agroindustriais podem aumentar os custos dos processos e aumentar o desgaste dos maquinários utilizados nas industriais de bioetanol, sejam por pré-tratamentos básicos ou ácidos (Houfani et al., 2020). Os pré-tratamentos também podem ser tóxicos para alguns microrganismos, devido à produção de compostos fenólicos na hidrólise de pré-tratamentos (Salomão et al., 2019).

Outro importante resíduo agroindustrial é o pó de madeira, também conhecido como pó de serra, neste a produção enzimática da endoglucanase também foi baixa,

0,3 U/mL entre 48 a 72 horas (figura 10 B), acompanhando o crescimento fúngico no pó de madeira que também foi considerado baixo (figura 10 B).

Apesar da baixa produção da endoglucanase pelo fungo, o perfil de produção foi considerado um dado importante devido ao comportamento da produção enzimática pelo fungo, na figura 10 B é possível observar uma curva de produção da endoglucanase, registrando um aumento na produção da enzima nas primeiras 48 horas do cultivo, seguido de uma estabilização entre 48 e 72 horas e posterior queda na produção da enzima até 144 horas.

É possível destacar que o fungo utilizou a fonte de carbono presente no pó de madeira para o crescimento e produção da endoglucanase, porém não conseguiu atingir quantidades significativas da enzima, bem como um crescimento abundante. É possível que a estrutura rígida do resíduo, sua constituição tenha dificultado o desenvolvimento do fungo no resíduo e conseqüentemente a baixa produção enzimática.

Este resíduo considerado muito complexo para o crescimento de microrganismos sem nenhum tratamento prévio o que pode ter favorecido o baixo crescimento fúngico e o baixo rendimento na produção da endoglucanase. Ele é um resíduo proveniente de troncos de árvores e apresentam grandes quantidades de lignina, cerca de 30% desse resíduo é composto por lignina (PEDRAZZI et al., 2019), assim como no bagaço de cana de açúcar o pó de madeira é necessário a remoção da lignina para garantir o bom crescimento fúngico no resíduo e conseqüentemente a produção de enzimas.

De acordo com Bi et al., 2021, algumas plantas também produzem metabólitos capazes de inibir o crescimento de fungos *in vivo*, e apesar do processamento do tronco da árvore após o corte, alguns desses metabólitos podem continuar inibindo e dificultar o desenvolvimento dos fungos *in vitro*, dessa forma é necessária a utilização de substâncias antifúngicas no processamento da madeira para melhorar o rendimento na produção de enzimas biotecnológicas.

Analisando o perfil fermentativo do fungo no pó de madeira (figura 10 B), sugere-se que um pré-tratamento no resíduo melhore o acesso do fungo ao mesmo

e aumente a produção da enzima, contribuindo para o melhor reaproveitamento do resíduo e agregando valor ao mesmo, e conseqüentemente diminuindo o potencial de contaminação ambiental do mesmo.

Figura 11. Perfil de crescimento do fungo em diferentes resíduos agroindustriais em diferentes tempos de incubação.

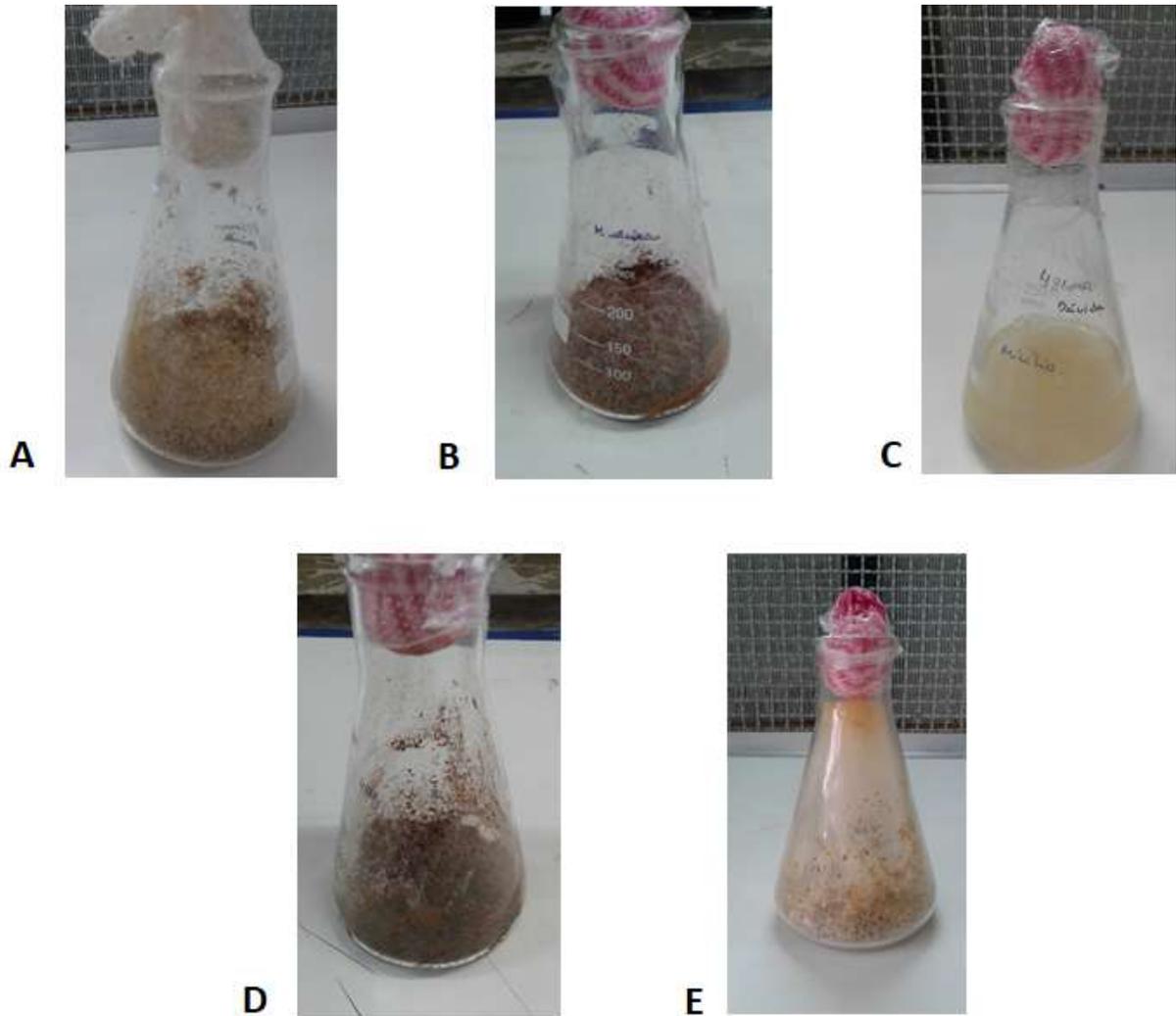


Figura 11: A – Crescimento do fungo *P. sanguineus* em bagaço de cana de açúcar; B – crescimento do fungo em pó de madeira; C – crescimento do fungo em papel de filtro como indutor; D – crescimento do fungo em fibra de coco; E – crescimento do fungo em farelo de trigo.

Fonte: autora, 2021

A utilização da fermentação submersa para o crescimento do fungo com o papel de filtro como indutor foi considerada boa, pois houve um significativo crescimento do fungo como mostra a figura 11 C, porém a produção da enzima endoglucanase foi considerada baixa como mostra a figura 10 C.

O perfil fermentativo do fungo com papel de filtro mostra que nas primeiras 24 horas a atividade enzimática caiu pela metade de 0,008 a 0,004 U/mL, sugerindo que o fungo produziu uma quantidade de endoglucanase, porém depois de 24 horas essa produção caiu e depois de 48 horas houve um aumento na produção da enzima, porém essa produção não foi significativa.

A fermentação submersa utilizada para o crescimento do fungo com papel de filtro foi associada a caldo de batata é possível que o fungo tenha consumido o amido presente na batata para garantir seu rápido crescimento. Analisando o perfil fermentativo do fungo neste resíduo por uma maior quantidade de tempo, poderíamos observar o aumento na produção da endoglucanase depois do consumo total do amido disponível no meio, porém fermentações longas torna o processo demorado e mais oneroso.

A fibra de coco é um importante resíduo encontrado de forma abundante em todo litoral brasileiro e também foi utilizado para fermentação do fungo *P. sanguineus*, porém a análise da produção da enzima endoglucanase dificultada devido à alta concentração de AR presente no resíduo, como mostra a linha de base da figura 10 D, pois a quantificação da endoglucanase é realizada com quantificação de AR proveniente da hidrólise do substrato CMC.

Mesmo realizando a lavagem e secagem do resíduo não houve diferença significativa da quantidade de AR do resíduo. A fibra do coco apresenta grande interesse devido ao seu grande potencial na produção de enzimas, porém assim como alguns outros resíduos descritos anteriormente é necessário o pré-tratamento para garantir a remoção da lignina e aumentar o acesso do fungo ao resíduo e consequentemente a produção das enzimas (Ang et al., 2013).

O crescimento fúngico na fibra de coco foi considerado lento comparado com o crescimento em outros resíduos (figura 11 D), este resíduo assim como o bagaço de cana e a pó de madeira também apresenta grande quantidade de lignina na sua estrutura dificultando o acesso do fungo a celulose presente no resíduo, a fibra do

coco verde apresenta entre 35-45% de lignina, 23-43% de celulose e 3-18% de hemicelulose (PRADO et al., 2014).

O farelo de trigo foi o resíduo agroindustrial que apresentou maior e melhor produção da endoglucanase pelo fungo *P. sanguineus*, a maior produção foi com 196 horas de fermentação, porém comparando com os tempos de incubação anteriores não houve diferença significativa de produção como mostra a figura 10 E.

Observando o perfil fermentativo do fungo no farelo de trigo é possível observar que a produção da enzima apresentou uma curva de produção, um aumento crescente da produção enzimática com 24 horas até atingir o máximo da produção com 168 horas e depois um decréscimo com 240 horas.

A maior produção da endoglucanase ocorreu com 168 horas de fermentação, porém com 72 horas o fungo já apresentava uma produção enzimática significativa em menor tempo de fermentação. O farelo de trigo é um resíduo menos complexo que os descritos anteriores e isso favoreceu o desenvolvimento do fungo e a produção da enzima.

Analisando o crescimento fúngico no farelo de trigo na figura 11 E é possível observar o grande crescimento do mesmo com 72 horas de cultivo, o crescimento fúngico abundante no resíduo evidencia a facilidade que o fungo teve de crescer no resíduo isso pode estar relacionado à alta porosidade do resíduo e a baixa quantidade de lignina cerca de 10% (TANASKOVIC et al., 2021)

Outros fatores também podem ter favorecido para o sucesso no crescimento do *P. sanguineus* no farelo de trigo como o tamanho das partículas adequado e favorece consistência para ancoragem e crescimento dos fungos, a textura do resíduo que permanece solta mesmo na presença de umidade e apresenta grandes quantidades de nutrientes essenciais, como celulose, hemicelulose, sais minerais e proteínas o que fornece excelente suporte para o desenvolvimento fúngico e produção de enzimas (DAS et al., 2013).

Alguns estudos avaliam a produção de enzimas fúngicas com uma associação de alguns tipos de resíduos como, por exemplo, farelo de trigo e casca

de arroz, farelo de trigo e bagaço de cana aumentando o suporte nutricional do fungo (CAMASSOLA and DILLON, 2007).

GOMATHI et al., 2012 analisando a produção de CMCase pelo fungo *Aspergillus flavus* em diferentes resíduos industriais através da fermentação em estado sólido observou a maior produção enzimática foi em farelo de trigo produzindo 0,540 U/mL no quarto dia de fermentação.

Outras enzimas também são produzidas utilizando o farelo de trigo como substrato fúngico, EL-KHONEZY et al., 2021 observou que a produção de uma protease alcalina foi de 3428,9 U/mg no farelo de trigo, esta foi a maior produção entre os resíduos agroindustriais testados.

O farelo de trigo mostrou-se um excelente resíduo para utilização em fermentações em estado sólido, mas também são utilizados para testes de sacarificação como primeira etapa na triagem de endoglucanases com potenciais para produção de etanol de segunda geração.

5.2.2. Extrato Bruto

Analisando os perfis fermentativos e a produção enzimática da endoglucanase do *P. sanguineus* em diferentes resíduos agroindustriais testados e observando a excelente produção em farelo de trigo, este resíduo foi selecionado para o isolamento, caracterização e aplicação biotecnológica da enzima.

O extrato bruto obtido após a fermentação com farelo de trigo apresenta coloração marron, homogenia e foi armazenado em geladeira a 2 a 8°C.

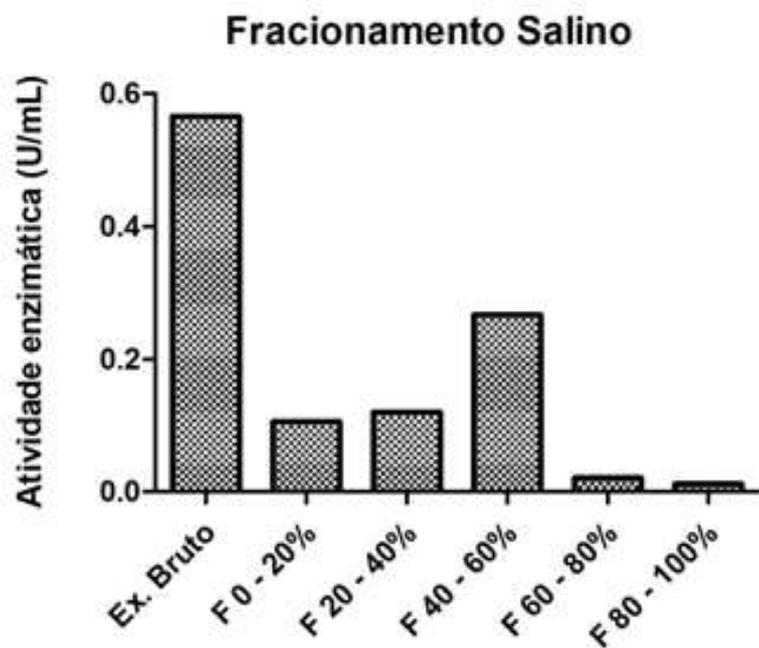
5.3. PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

5.3.1. Precipitação com sulfato de amônio e precipitação com etanol

O fracionamento de proteínas é a primeira etapa no processo de isolamento dessas macromoléculas, a principal forma de precipitar as proteínas numa solução ou extrato bruto é usando o sulfato de amônio, este interage com as proteínas e interfere na sua solubilidade em água.

Após a precipitação com sulfato de amônio foi possível observar que não ocorreu a concentração da endoglucanase do *P. sanguineus* em uma única fração, mas a atividade enzimática ficou distribuída nas cinco frações obtidas, figura 12.

Figura 12. Perfil de precipitação com sulfato de amônio.



Fonte: autora, 2022

Os dados da precipitação com sulfato de amônio ou salina mostram uma perda significativa da atividade enzimática nas frações em relação ao extrato bruto, a fração 40-60% foi à fração que apresentou maior taxa de atividade da

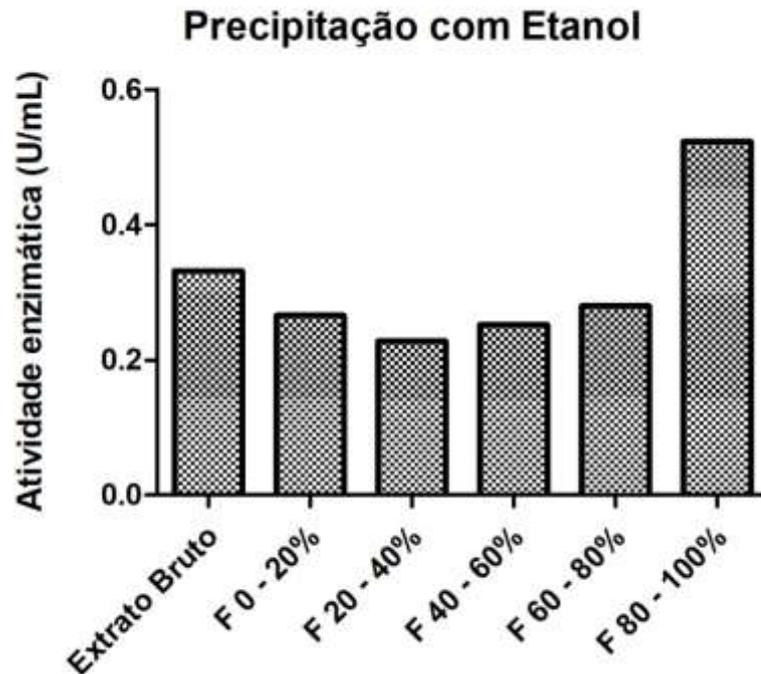
endoglucanase, porém com perda de 50% em relação extrato bruto e apresentou uma recuperação de apenas 7,34%. Analisando o gráfico acima é possível observar que não houve resolução na precipitação com sulfato de amônio e a recuperação foi muito baixa.

A precipitação com sulfato de amônio pode ser inviável para algumas proteínas e /ou enzimas gerando perda da estrutura tridimensional da mesma e perda de atividade.

Diante do insucesso da precipitação com sulfato de amônio o extrato bruto foi submetido a um novo fracionamento utilizando etanol absoluto, nesse processo foi possível observar uma concentração da atividade enzimática em uma única fração 80-100% de etanol absoluto (figura 16), mostrando uma resolução muito boa da precipitação com etanol e um aumento significativo da atividade enzimática na fração 80-100% em relação ao extrato bruto.

O aumento da atividade em relação ao extrato bruto pode indicar a remoção de importantes contaminantes e até inibidores presentes no extrato bruto, aumentando atividade enzimática. Além de uma boa resolução, a precipitação com etanol também permitiu uma excelente recuperação enzimática de 126% com atividade de 0,996 U/mL na fração 80-100%.

Figura 13: Perfil de fracionamento do extrato bruto com etanol absoluto.



Fonte: autora, 2022

O fracionamento de proteínas utilizando etanol tem sido bastante utilizado como alternativa quando o fracionamento com sulfato de amônio não alcança bons resultados de resolução e recuperação da enzima. O fracionamento com etanol além de separar as proteínas em frações também mostra que as proteínas apresentam estabilidade em grandes quantidades de álcool (XUE et al., 2018), característica muito importante para vários processos industriais como a produção de etanol de segunda geração.

A viabilidade das proteínas e/ou enzimas e a taxa de recuperação das mesmas são aumentadas quando a precipitação com solventes orgânicos ocorre em baixas temperaturas e sobre constante agitação (BOHORQUEZ, 2014). O que pode ter contribuído para o bom resultado dessa forma de precipitação com a endoglucanase do *P. sanguineus*.

As endoglucanases apresentam maior interação com água o que define uma maior solubilidade em água, dessa forma é necessário uma maior força seja por sal

no fracionamento com sulfato de amônio ou por etanol no fracionamento com etanol para diminuir as interações endoglucanase-água e fazer com que elas precipitem.

Outras endoglucanases também ficam concentradas nas frações com maiores quantidades de sal ou de solventes orgânicos, como por exemplo, a endoglucanase isolada *Chaetomium thermophilum*, após a precipitação com sulfato de amônio a enzima ficou concentrada na fração 80% (HAN et al., 2020).

A precipitação com etanol é utilizada para fracionar outros tipos de proteínas e/ou enzimas como, por exemplo, a gelatina que ao ser precipitada com etanol melhoraram suas propriedades devido ao aumento das interações intramoleculares e intermoleculares (PENG et al., 2021).

Outra importante vantagem na utilização de etanol para pré-purificar as endoglucanases é verificar sua estabilidade em álcool, visto que uma das suas principais utilização biotecnológica é a produção de etanol de segunda geração.

A precipitação com etanol também é amplamente utilizada para purificação de polissacarídeos, pois favorece a obtenção de polissacarídeos com diferentes composições químicas e pesos moleculares (JIA et al., 2021).

Outros solventes orgânicos também são utilizados para fracionar endoglucanases, a exemplo da endoglucanase isolada do *Fomitopsis meliae* que foi fracionada com acetona e obteve a taxa de recuperação de 74,33% (PATEL and SHAH, 2021).

5.3.2. Cromatografia líquida

Após a primeira etapa de purificação (fracionamento com etanol) a fração 80 – 100% apresentou maior atividade enzimática e maior recuperação (126%), esta foi encaminhada para cromatografia de troca iônica (DEAE Sepharose). Na etapa cromatográfica foram coletadas aproximadamente 60 frações, na fração 8 a enzima foi eluída como mostra a figura 17, a fração 8 também corresponde ao maior pico na análise do perfil de proteínas a 280 nm e como o único pico com atividade enzimática (U/mL) análise a 540 nm, com taxa de recuperação de 92%.

Figura 14. Perfil cromatográfico do isolamento da endoglucanase produzida pelo fungo *P. sanguineus* em cromatografia de troca iônica (DEAE Sepharose).

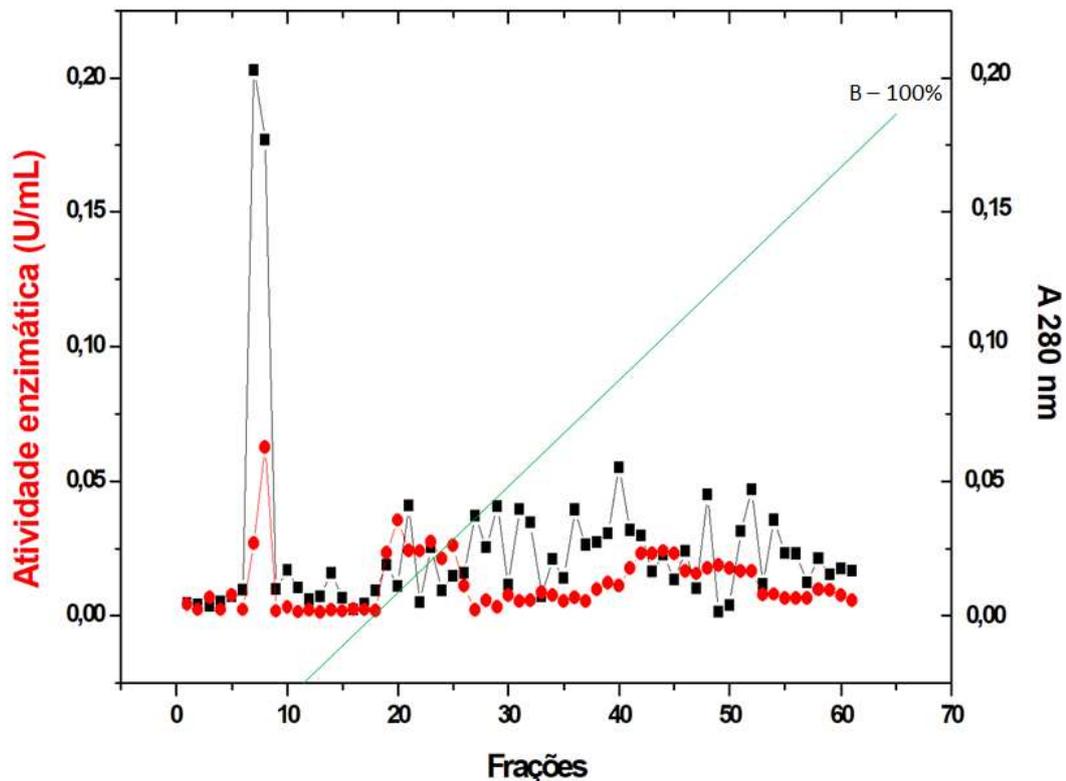


Figura 16. Análise do perfil de eluição de proteínas em espectrofotômetro a 280 nm (linha preta), análise do perfil da atividade enzimática a 540 nm (linha vermelha).

Como mostra o cromatograma na figura 17, a endoglucanase foi eluída antes do gradiente de concentração de sal ter iniciado, ou seja, não houve uma interação forte entre a resina e a endoglucanase do *P. sanguineus*, com isso podemos sugerir que a enzima pode apresentar menor quantidade de aminoácidos carregados negativamente.

O perfil cromatográfico também mostra que a maioria das proteínas presentes na fração 80-100% do fracionamento com etanol foi adsorvido a resina DEAE sepharose, pois foram apenas eluídas com o aumento da concentração do NaCl

demonstrando a diferença de cargas das proteínas e/ou enzimas presentes da fração 80-100%.

Apesar da não adsorção da enzima a cromatografia de troca iônica (DEAE Sepharose) apresentou excelente capacidade de isolamento da endoglucanase do *P. sanguineus*, tendo em vista que após a cromatografia a enzima foi eluída completamente isolada. Garantir o isolamento de enzimas com apenas um passo cromatográfico permite aumentar a taxa de recuperação da mesma e diminuir significativamente os custos do processo.

O isolamento de endoglucanases pode acontecer de várias maneiras utilizando diferentes tipos de colunas cromatográficas, filtração em gel, troca iônica, cromatografia de afinidade. A escolha do tipo de método cromatográfico vai ocorrer de acordo com o perfil da amostra, alguns processos necessitam de 2 ou mais processos cromatográficos para o total isolamento da enzima.

Contudo com o aumento no número dos passos cromatográficos pode ocorrer uma baixa recuperação da enzima, pois parte dela pode ser perdida durante o processo gerando baixo rendimento e aumento nos custos do processo de isolamento, tendo em vista que cada passo cromatográfico apresenta um custo elevado para execução.

O isolamento das endoglucanases de fungos apresenta grande variedade de formas e métodos. Algumas são isoladas através da cromatografia de filtração em gel, como por exemplo, a endoglucanase isolada do fungo *Bothrytis ricini* (SILVA et al., 2018). A endoglucanase do *Aspergillus terreus* isolada com aproximadamente 28 kDa em coluna de filtração em gel (Sephacryl S-200) com recuperação de 13,71% (NARRA et al., 2014).

As cromatografias de troca iônica são bastante utilizadas no isolamento das endoglucanases e de outras enzimas, por exemplo, DYK et al., 2010 isolou uma endoglucanase, xylanase, pectinase e mananases do *Bacillus licheniformis* SVD1 utilizando uma troca iônica (DEAE-Sepharose). A endoglucanase do *Aspergillus ochraceus* também foi isolada com uma cromatografia de troca iônica com da taxa de recuperação de 53% (ASHA et al., 2016).

Devido à formação de um gradiente de força iônica para a eluição das proteínas e/ou enzimas a cromatografia de troca iônica possibilita o isolamento de diferentes proteínas e/ou enzimas da mesma amostra e também o isolamento de isoformas enzimáticas.

Alguns métodos de isolamento de enzimas necessitam de 2 métodos cromatográficos, como por exemplo a carboxymethylcellulase isolada do *Bacillus pumilus* EWBCM1 foi isolada com uma cromatografia de troca iônica (DEAE Cellulose) seguida uma filtração em gel (Sephadex G-100) (SHANKAR et al., 2021).

A β -glicosidase do fungo *Termitomyces clypeatus* foi isolada utilizando dois métodos cromatográficos à primeira uma coluna de filtração em gel (Sephacry S-200) seguida de uma DEAE Sephadex A 50, a taxa de recuperação no final do processo de purificação foi de 6,5%.

A cromatografia por afinidade é considerada um método cromatográfico bastante específico e com alta eficiência e rendimento, porém apresenta um maior custo de execução quando comparado com as cromatografias de filtração em gel e troca iônica.

A endoglucanase isolada do *Trichoderma reesi* foi obtida através de cromatografia por afinidade usando Ni^{2+} carregado na coluna, tampão de ligação com imidazol 10 mM e tampão de eluição com imidazol 250 mM (TAO et al., 2020).

A purificação de proteínas com apenas um passo cromatográfico é muito importante para alcançar uma melhor taxa de recuperação, visto que a utilização de vários métodos de purificação pode levar uma diminuição na taxa de recuperação, principalmente quando essas proteínas e/ou enzimas vão para processos industriais.

Na tabela 2 é possível observar o resumo dos dados de todas as etapas do isolamento da endoglucanase do *P. sanguineus*. Iniciando com a atividade enzimática total (U/mL), seguido da concentração de proteínas em mg/mL, atividade enzimática específica e taxa de recuperação da enzima após cada etapa do isolamento.

Tabela 2: Resumo de dados de todas as etapas do isolamento da endoglucanase isolada do *P. sanguineus*.

Etapas de purificação	Ativ. Total (U/mL)	Total de proteínas (mg/mL)	Ativ. Específica	Recuperação (%)
Extrato Bruto	1,647	0,550 mg/mL	2,880	100%
Fração 80-100%	1,966	0,085 mg/mL	23,86	126%
DEAE-Sepharose	2,034	0,068 mg/mL	30,67	92%

Todos os dados obtidos através de testes realizados em triplicatas e com desvio padrão.

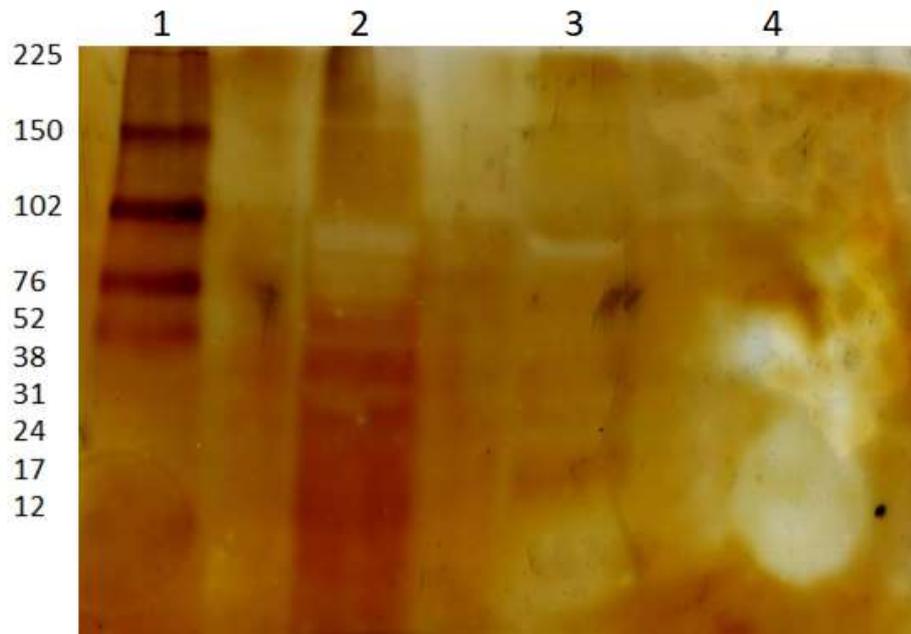
Na tabela 2 de resumo de dados é possível verificar que a concentração de proteínas em todas as etapas do processo foi baixa, principalmente na última etapa do processo a cromatografia, porém é possível observar o aumento 15 vezes maior da atividade específica ao final do processo. Houve a remoção dos contaminantes proteicos da amostra e a remoção de possíveis inibidores da enzima o que favoreceu o aumento da atividade específica ao final do processo.

5.3.3. Eletroforese SDS-PAGE

O perfil proteico do extrato bruto (canaleta 2) mostra a grande quantidade de proteínas no extrato com a coloração escura de várias bandas e na canaleta 3, a fração 80-100% do fracionamento com etanol apresenta uma concentração de proteínas menor, confirmando a eficácia do fracionamento com etanol na remoção de contaminantes proteicos da amostra. Na canaleta 4 é possível visualizar apenas uma banda proteica com aproximadamente 76 kDa confirmando o total isolamento da enzima após a cromatografia de troca iônica (DEAE Sepharose).

As endoglucanases de fungos podem variar a massa molecular entre 30 a 80 KDa e podem ser facilmente visualizadas em eletroforese de proteínas, a endoglucanase isolada do *P. sanguineus* apresenta massa molecular em torno de 76 KDa como mostra a Figura 17.

Figura 15: Análise do perfil de proteínas em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata.



Perfil de proteínas em gel de poliacrilamida. Canaleta 1: Marcado de massa molecular, canaleta 2: extrato bruto, canaleta 3: fração 80-100% do fracionamento etanólico, canaleta 4: enzima isolada.

Fonte: autora, 2021

A verificação exata da massa molecular de proteínas só possível com a utilização de espectrômetro de massa, contudo os géis de eletroforese conseguem obter uma boa aproximação da massa molecular e são utilizados em diversas análises de purificação de proteínas e/ou enzimas.

As endoglucanases isoladas do *Phanerochaete chrysosporium* e *Fomitopsis meliae* apresentam massa molecular de 42 kDa e 48 kDa respectivamente, ambas as massas moleculares também foram estimadas com gel de eletroforese (HUY et al., 2016; PATEL and SHAH, 2021).

Massarente et al., 2020 observou uma endoglucanase isolada do *Myceliophthora thermophila* com massa molecular de aproximadamente 55 kDa. A endoglucanase isolada do *Bacillus subtilis* apresenta massa molecular de 66,4 kDa (LIU et al., 2021). SILVA et al., 2018 isolou uma endoglucanase halotolerante com massa molecular de aproximadamente 39 kDa do fungo *Bothrytis ricini*.

A eletroforese de poliacrilamida foi bastante eficiente no monitoramento das etapas de purificação da enzima possibilitando a escolha das etapas seguintes no isolamento da enzima e estimando a massa molecular da enzima isolada.

Devido a baixa concentração de proteínas da amostra na etapa do processo, como mostra a tabela 2, coluna 3, foi necessário a utilização do nitrato de prata para corar o gel de poliacrilamida, pois este corante consegue corar quantidades mínimas de proteínas.

5.4. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

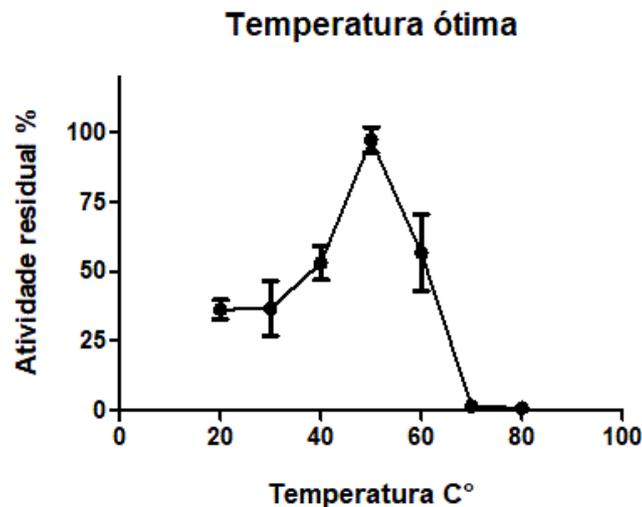
A caracterização bioquímica das enzimas é um processo muito importante para determinar as características bioquímicas próprias da enzima isolada e estimar quais processos industriais ela pode ser utilizada. Entre os testes bioquímicos mais utilizados estão: temperatura ótima, estabilidade térmica, pH ótimo, estabilidade em pH, halotolerância, verificação dos parâmetros cinéticos da enzima e análise da concentração de proteínas pelo método de Bradford.

5.4.1. Temperatura ótima

A endoglucanase isolada do *P. sanguineus* apresentou temperatura ótima de 50°C, como mostra a Figura 19, temperatura que a enzima apresentou 100% da sua atividade quando comparado com as atividades residuais nas outras temperaturas testadas. Também é possível observar que aos 40°C e 60°C a enzima apresentava 50% da atividade e só a partir em 70°C a enzima perdeu totalmente sua atividade catalítica.

A perda total da atividade enzimática a partir dos 70°C pode representar um efeito sobre a estrutura tridimensional da enzima, alterações conformacionais devido a quebra de ligações de hidrogênio e outras interações que estabilizam a mesma. Essas alterações nas estruturas podem ser temporárias ou permanentes, as temporárias são encontradas em enzimas que apresentam capacidade renaturante de suas estruturas quando submetidas a ambientes menos estressantes, porém as alterações permanentes são as que geram desnaturação total e permanente das enzimas, ou seja, mesmo com o retorno ao ambiente em condições ótimas elas não são capazes de retornar a atividade catalítica.

Figura 16: Determinação da temperatura ótima da endoglucanase isolada do fungo *P. sanguineus*.



A análise da temperatura ótima da endoglucanase do *P. sanguineus* em pH ótimo da enzima (pH 5,0).

As endoglucanases são enzimas que apresentam temperatura ótima considerada alta em torno de 50 a 70°C como mostra vários estudos publicados nos últimos anos, com exceção das endoglucanases isoladas de microrganismos extremófilos que podem apresentar temperatura ótima de até 80°C.

A temperatura ótima das enzimas depende do organismo de origem, da estrutura primária dessas enzimas, das interações químicas existentes, entre outros fatores, por exemplo, microrganismos extremófilos possuem enzimas consideradas extremófilas, suportam temperaturas e outras condições extremas como, pHs extremos, grandes quantidades de sal, entre outras características (ISHIHARA et al., 1998).

As endoglucanases isoladas dos fungos extremófilos *Sporotrichum sp.*, *Thermoascus aurantiacus*, *Talaromyces emersonii*, apresentam 100% da atividade entre 70 a 80°C (ISHIHARA et al., 1998; MURRAY et al., 2001) e podem ser consideradas endoglucanases extremófilas. As enzimas extremófilas podem apresentar características bioquímicas excelentes para vários processos industriais, pois suportam vários tipos de processos em condições extremas, porém o

isolamento dessas enzimas pode ser mais exigentes devido às exigências no cultivo dos microrganismos extremófilos.

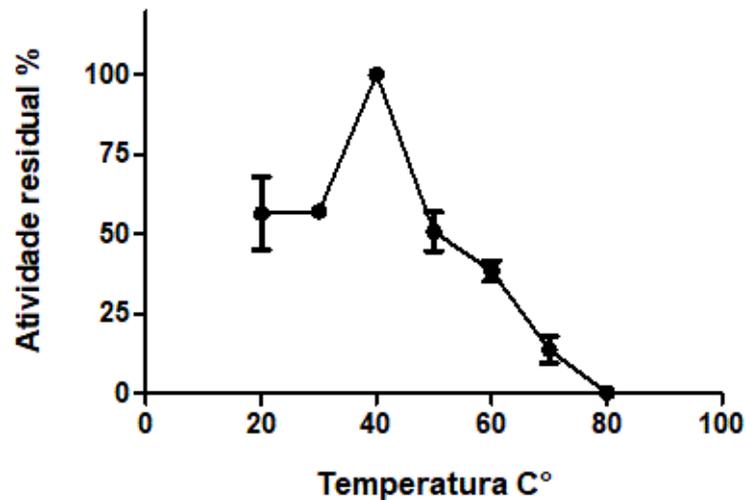
As maiorias das endoglucanases isoladas de microrganismos são de microrganismos mesófilos, ou seja, apresentam temperatura ótima entre 50 a 70°C. Como por exemplo, as endoglucanases isoladas do *Bothrytis ricini* e do *Bacillus subtilis* que apresentaram temperatura ótima de 50°C e ambos os juntos são considerados microrganismos mesófilos (SILVA et al., 2018; LIU et al., 2021). PATEL and SHAH, 2021 isolou uma endoglucanase do *Fomitopsis meliae* com temperatura ótima de 70°C.

5.4.2. Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica é outra característica bioquímica importante em enzimas de interesse biotecnológico, pois as maiorias dos processos industriais acontecem com grandes variações de temperatura e as enzimas que apresentam boa estabilidade térmica conseguem exercer suas atividades em temperaturas variadas ou não perdem suas atividades com a variação das temperaturas.

A estabilidade térmica encontrada na endoglucanase do *P. sanguineus* demonstrou estabilidade com 50% da atividade entre 20 a 55°C, como mostra a Figura 17.

Figura 17: Determinação da estabilidade térmica da endoglucanase isolada do fungo *P. sanguineus*.



É possível que temperaturas acima de 60°C modifiquem a estrutura tridimensional da proteína ou remova ligações covalentes da macromolécula gerando a perda da atividade enzimática. Analisando o perfil de temperatura ótima na figura 16, observa-se que a enzima submetida à temperatura maior que 60°C a enzima perde sua atividade catalítica, porém submetendo novamente a enzima à temperatura ótima 50°C, ocorre um pequeno retorno da atividade catalítica (figura 17), pois algumas proteínas e enzimas podem voltar total ou parcialmente a sua conformação ativa depois de uma desnaturação.

Contudo na temperatura de 80°C é possível observar que não há atividade enzimática, nem retorno da atividade enzimática após diminuição da temperatura, figura 17.

Analisando a atividade enzimática nas temperaturas de 20° e 30°C é possível observar que houve um aumento da atividade atingindo aproximadamente 55% quando a enzima retorna a temperatura ótima 50°C figura 17, porém analisando atividade apenas em 20° e 30°C figura 16, a atividade é de aproximadamente 30%, ou seja, há um acréscimo de pelo menos 20% de atividade enzimática quando a enzima apesar de for exposta a temperatura de 20° e 30°C retorna a 50°C, isso pode ocorrer devido ao rearranjo das estruturas tridimensionais nas condições da enzima.

A termoestabilidade enzimática é proveniente dos arranjos e das forças que estabilizam os resíduos de aminoácidos que compõem da enzima ou o sítio ativo da mesma. Endoglucanases de organismos que vivem em temperatura de 20 a 30°C tem suas enzimas com estruturas mais flexíveis e menor número de interações intra ou intermoleculares e empacotamento hidrofóbico menor, as alças dessas enzimas são mais longas e com menos resíduos de prolina, maior número de glicina, favorecendo uma menor estabilidade térmica (JUTURU and WU, 2014).

As endoglucanases termofílicas ou termoestáveis apresentam núcleo de proteína hidrofóbico rígido e compacto, estrutura com alto conteúdo de prolina, loop reduzido, superfície polar elevada, favorecendo maior estabilidade estrutural das enzimas e/ou proteínas (JUTURU and WU, 2014).

A ocorrência de resíduos hidrofóbicos de prolina, isoleucina e valina e maior proporção de resíduos de aminoácidos polares aumenta a hidrofobicidade e a rigidez das proteínas favorecendo o aumento da estabilidade térmica, bem como a presença de chaperoninas que ajudam no redobramento das proteínas (DADWAL et al., 2021).

É possível realizar a substituição de resíduos de aminoácidos flexíveis por resíduos de aminoácidos mais rígidos como a prolina para diminuir a flexibilização da estrutura tridimensional e conseqüentemente aumentar a estabilidade térmica da enzima, porém esse tipo de técnica aumenta o custo do processo de obtenção da enzima. (DOTSENKO et al., 2019).

Além do isolamento de enzimas com maior atividade específica e maior estabilidade térmica, muitos pesquisadores tem tentado remodelar enzimas para melhorar sua estabilidade térmica utilizando engenharia de proteínas ou usando diferentes métodos de otimização de condição para conseguir grandes quantidades de enzimas (DEHNAVI et al., 2016; AKBARZADEH et al., 2018).

A endoglucanase recombinante isolada do *Myceliophthora thermophila* (organismo extremófilo) manteve-se viável com até 70% da atividade em 100°C foi utilizada a levedura *Pichia pastoris* para expressar essa endoglucanase em maior quantidade (PHADTARE et al., 2017).

A produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica é uma das principais aplicações das celulasas e estas enzimas precisam apresentar boa estabilidade térmica, pois o processo de produção do etanol é realizado em altas temperaturas variando entre 50° a 60°C (DADWAL et al., 2021).

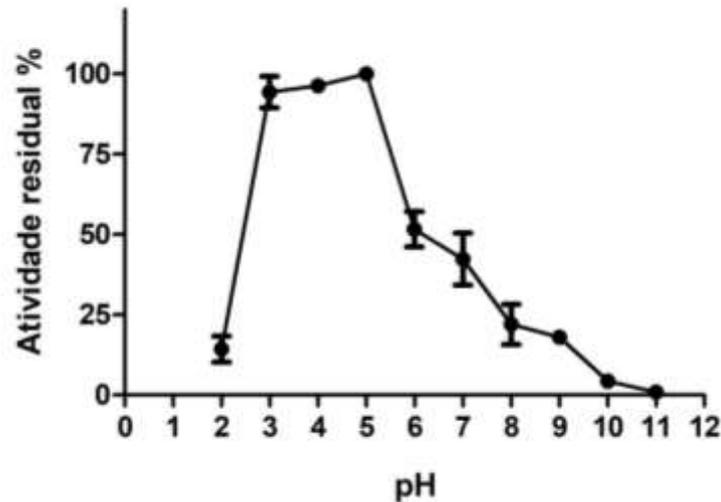
A busca por enzimas de interesse biotecnológico com boa estabilidade térmica é uma crescente em todo mundo visto que o comércio internacional de enzimas e a busca por fontes sustentáveis e limpas em processos industriais vêm crescendo, bem como a utilização de enzimas termoestáveis permite aumentar a solubilidade do substrato, aumentar a viscosidade das enzimas para reação rápida e melhorar a recuperação de substratos voláteis em temperaturas elevadas (Areeshi, 2022).

5.4.3. pH Ótimo

O pH é outra característica muito importante para as enzimas realizarem suas atividades catalíticas, assim como a temperatura, o pH é essencial para garantir o melhor resultado da função catalítica da enzima. A endoglucanase isolada do *P. sanguineus* apresentou pH ótimo em tampão acetato de sódio pH 5,0, pH ótimo mais encontrado entre as endoglucanases de fungos. A Figura 18 mostra o perfil de atividade da enzima isolada nos diferentes pHs analisados.

O pico da atividade enzimática (100%) ocorreu em pH 5,0, porém na figura 18 é possível verificar que entre o pH 3,0 e o 5,0 a atividade foi próxima aos 100% em pH 6,0 a enzima mantém 50% da sua atividade. Evidenciando o pH ácido como o melhor para a atividade da endoglucanase do *P. sanguineus*.

Figura 18. Determinação de pH ótimo da endoglucanase isolada do *P. sanguineus*.



Todas as reações para determinar o pH ótimo foram realizadas na temperatura ótima da enzima 50°C.

O pH ótimo das endoglucanases podem variar de acordo com o organismo de origem da mesma, porém vários estudos demonstram que o pH 5,0 esta entre os mais encontradas nesse tipo de enzima e a faixa ácida do pH favorece a atividade dessas endoglucanases.

Alguns exemplos podem ser observados na literatura: o fungo *Penicillium verruculosum* apresenta endoglucanase com pH de 4,5 a endoglucanase do *Fusarium verticillioides* apresenta máxima atividade entre pH 4,5 e 5,5 (DOTSENKO et al., 2019; ALMEIDA et al., 2013). SILVA et al.; 2018 isolou uma endoglucanase halofílica do fungo fitopatogênico *Bothrytis ricini* com pH ótimo igual a 5,0.

KUMAR et al., 2019 analisando uma endoglucanase recombinante proveniente de uma biblioteca genômica e expressa em *Escherichia coli* verificou que o pH ótimo da enzima é o pH 6,0, contudo o pH 5,0 a enzima apresenta 80% da sua atividade.

No gráfico acima, (figura 18) é evidente que o pH 2,0 muito ácido exerce um efeito contrário ao pH 5,0, a atividade enzimática é de aproximadamente 20%, bem

como acima do pH 7,0 a enzima perde consideravelmente a atividade. Mostrando que o pH alcalino não é o melhor para atividade enzimática da endoglucanase do *P. sanguineus*.

Assim como a temperatura pode alterar a estrutura tridimensional da enzima e consequentemente alterar sua atividade, o pH também influencia na estrutura das enzimas, estes podem alterar a carga os resíduos de aminoácidos, modificando suas interações e sua conformação, gerando perda de atividade parcial ou total.

Assim como estabilidade térmica é essencial para vários processos industriais, o pH enzimático é muito importante para processos industriais, segundo DADWAL, mostra como a variação do pH influencia na produção de etanol, pois o rendimento foi de 138,7% entre o pH 5,0 a 8,0 quando utilizado a palha do arroz para sacarificação e fora dessa faixa de pH o rendimento caiu consideravelmente.

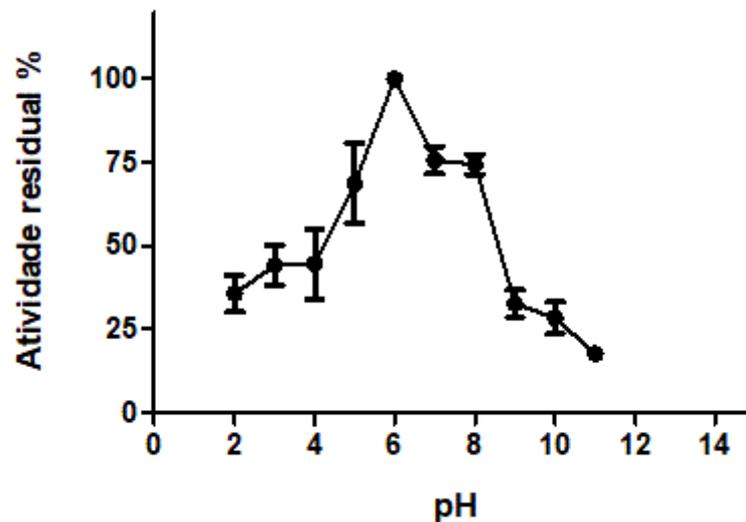
Outro exemplo é encontrado na indústria do papel que apresenta processos com temperaturas altas e pH entre 6,5 a 7,0, para que as endoglucanases consigam exercer suas atividades catalíticas e garantir uma maior eficácia catalítica e consequentemente maior rendimento (KUMAR et al., 2016).

5.4.4. Estabilidade em pH

A estabilidade em pH é a capacidade da enzima em manter sua atividade catalítica numa determinada faixa de pH, quando maior a faixa de pH que as enzimas suportam melhor para os processos biotecnológicos, pois muitos deles ocorrem com grande variação de pH. A endoglucanase isolada do *P. sanguineus* apresenta boa estabilidade a variação de pH a enzima manteve mais de 50% da atividade na faixa de pH 5,0 a 8,0.

A enzima apresentou capacidade de retornar ou aumentar a atividade enzimática depois de exposta a pHs diferentes do seu pH ótimo (figura 19), essa capacidade foi mais proeminente entre os pHs mais neutros ou levemente alcalinos, como os pHs 6,0, 7,0 e 8,0.

Figura 19: Determinação da estabilidade em pH da endoglucanase isolada do *P. sanguineus*.



Todas as reações para determinar a estabilidade em pH ocorreu na temperatura ótima da enzima.

Endoglucanases que apresentam estabilidade em pH 8,0 já podem ser chamadas de endoglucanases neutras e ligeiramente alcalinas e elas são muito utilizadas nas indústrias de detergentes e têxtil (Dhar et al., 2015). A endoglucanase do presente estudo demonstrou manter 75% da atividade em pH 8,0 como mostra a figura 19, o que favorece sua utilização nas indústrias de detergentes e têxteis.

É possível observar que faixas extremas de pH exercem um efeito negativo na atividade enzimática gerando a perda quase que total da atividade enzimática, é provável que nessas faixas extremas ocorra a desnaturação da enzima. Os dados encontrados demonstram que processos industriais que ocorram em pH extremos pode gerar a perda da enzima.

Por exemplo, na indústria de detergentes é necessário a exposição das enzimas a pHs mais alcalinos e a importantes surfactantes que também podem exercer efeito desnaturante para proteínas em geral, então devem utilizadas enzimas que suportem pH mais alcalino e mantenham suas atividades na presença de surfactantes.

DHAR et al., 2015 isolou uma endoglucanase do *Paenibacillus* sp e destacou sua estabilidade alcalina como uma forte candidata a endoglucanases para detergentes com enzimas ativas esta endoglucanase apresentou estabilidade com mais de 60% da atividade entre o pH 6,0 e 9,0.

Analisando uma endoglucanase isolada de um consórcio bacteriano verificou-se a estabilidade em pH entre o pH 4,0 ao 6,0 com mais de 60% da atividade enzimática evidenciando que as endoglucanases isoladas de outros microrganismos também são mais estáveis em pHs ácidos a neutros.

Dessa forma é muito importante destacar que os parâmetros de temperatura e pH são muito importante na atividade enzimática, pois alteram significativamente a estrutura da enzima ou seu sítio catalítico e a descrição das características são essenciais para encontrar endoglucanases com potenciais biotecnológicos e ampliar o conhecimento a cerca dessas carboidrases e outras enzimas (Patel et al., 2019).

5.4.5. Halotolerância

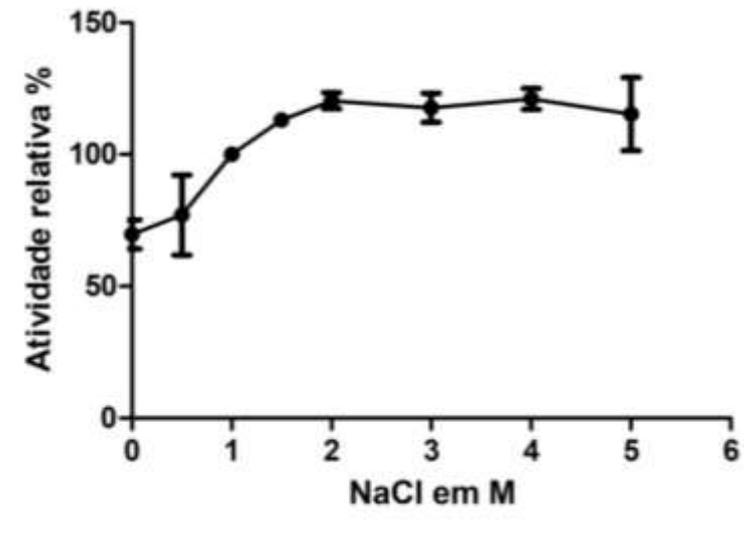
A halotolerância é a capacidade de manter-se viável em grandes concentrações de sal, é uma característica comumente encontrada entre microrganismos extremófilos e macromoléculas, esta característica é muito importante para vários processos industriais. Nos microrganismos mesófilos é possível ser encontrada em algumas macromoléculas a capacidade halotolerante.

A endoglucanase isolada do *P. sanguineus* apresentou uma característica halotolerante, pois se manteve com atividade enzimática maior que 100% em até 5 M de NaCl e também apresentou um comportamento halofílico, pois sua atividade enzimática foi maior na presença de sal quando comparado com a atividade na ausência de NaCl (figura 20).

Algumas macromoléculas podem ser chamadas de halofílicas, pois tem sua atividade aumentada na presença de grandes concentrações de sais, entre 4 a 5 M (Madern et al., 2000), outras podem ser chamadas de poliextremofílica quando são estável em pH alcalino, alta temperatura, atividade em meio micro aquoso e

atividade na presença de sal e maior resistência a desnaturação, entre elas podem ser encontradas as celulases, DNases, lipases, pectinases, proteases e xilanases (García et al., 2012).

Figura 20. Perfil de halotolerância da endoglucanase isolada do *P. sanguineus*.



Todas as reações para determinar a halotolerância foram realizadas em temperatura e pH ótimo da enzima.

As enzimas halofílicas requerem a presença de altas concentrações para exercer suas atividades e em baixas concentrações de sais ou na ausência de sais a estabilidade estrutural e atividade enzimática é perdida total ou parcialmente.

As soluções contendo grandes quantidades de sal exercem um efeito desnaturante nas proteínas, pois a alta concentração de sal aumenta a tensão superficial da água e induz a competição entre as proteínas e os íons de sal e isso leva a desnaturação das proteínas. Algumas características das proteínas e/ou enzimas podem ser alteradas na presença do sal, como por exemplo: solubilidade, ligação, estabilidade, cristalização e precipitação (Mokashe et al., 2018).

Algumas endoglucanases apresentam capacidade halotolerante já descritas na literatura, como mostra a tabela 3 abaixo. A concentração máxima suportada por essas enzimas varia de acordo com as características intrínsecas da enzima.

Tabela 3. Análise da capacidade halotolerante das endoglucanases de fungos.

Fungos	Concentração máxima de NaCl (M)	Referências
<i>Bothrytis ricni</i>	2 M	SILVA et al., 2018
<i>Paenibacillus xylanivorans</i>	3,5 M	GHIO et al., 2020
<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	4 M	SHI et al., 2013
<i>Stachybotys microspora</i>	5 M	HMAD et al., 2017
<i>Haloarcula</i> sp	5M	SAFAK et al., 2020
Cel 5R biblioteca genômica	1,5 M	KUMAR et al., 2019

Nas enzimas halofílicas podem conter maior número de aminoácidos ácidos na superfície como serina e treonina em contraste com proteínas não halofílicas, baixa quantidade de lisina, alta proporção de resíduos hidrofóbicos (glicina, alanina e valina) (García et al., 2012).

Enzimas halofílicas são de grande importância nos processos industriais, pois muitos processos ocorrem na presença de grandes concentrações de sais, como por exemplo, as indústrias têxteis, de detergentes, alimentos, ração animal, cervejas e industriais agrícolas (SAFAK et al., 2020).

Algumas enzimas podem apresentar característica poliextremofílica quando são estáveis a vários ambientes extremos ao mesmo tempo, como: pH alcalino, alta temperatura, atividade em meio micro aquoso e atividade na presença de grandes quantidades de sal e maior resistência a desnaturação, essas características podem ser encontradas em enzimas do tipo celulasas, DNases, lipases, pectinases, proteases e xilanases (García et al., 2012).

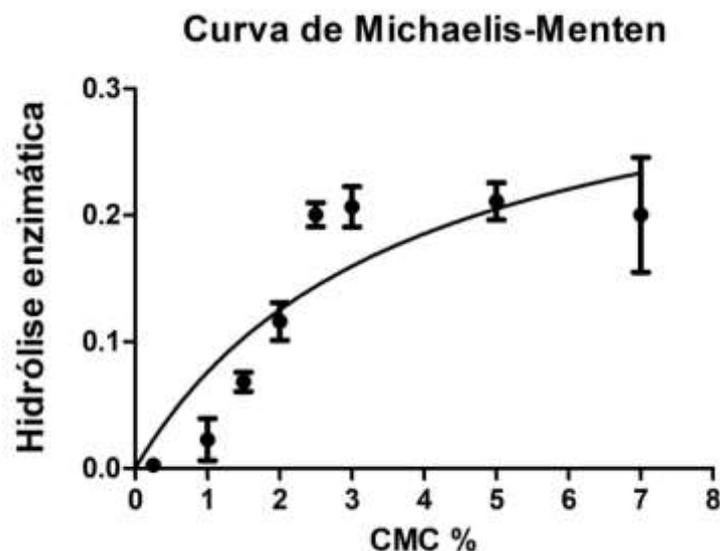
5.4.6. Constantes cinéticas

As constantes cinéticas são parâmetros que avaliam o comportamento das enzimas em relação ao substrato, velocidade da reação, eficácia catalítica, a cinética enzimática é dependente da temperatura e pH da enzima, pois alterações na temperatura e pH podem alterar o comportamento da enzima. Entre as constantes analisadas o K_m é um dos principais parâmetros analisados, este determina a

concentração de substrato que a enzima precisa para atingir a metade da velocidade máxima.

A endoglucanase isolada do *P. sanguineus* apresentou K_m igual a $3,18 \pm 100$ mg/mL e representa a afinidade que a enzima tem pelo substrato. Outro importante parâmetro determinado foi o K_{cat} , onde é obtido o número de moléculas de substrato convertidas em produtos por uma molécula de enzima por unidade de tempo, o K_{cat} foi igual a $4,53 \text{ S}^{-1}$.

Figura 21. Análise da curva de Michaelis-Menten da endoglucanase isolada do *P. sanguineus*.



Todas as reações ocorreram em triplicata e nas condições ótimas da enzima.

Na curva de Michaelis-Menten acima (figura 21) é possível observar é necessário mais substrato para que a enzima atinja o platô da velocidade máxima, ou seja, ela demora mais tempo para chegar à saturação do seu sítio ativo.

Uma análise comparativa entre K_m de outras endoglucanases isoladas de fungos é possível verificar a diversidade existente. LIU et al., 2011, identificou o K_m da endoglucanase isolada do fungo *Aspergillus fumigatus* igual a 37,88 mg/mL utilizando o CMC como substrato.

O K_m e o K_{cat} da endoglucanase isolada do *Fomitopsis meliae* foram iguais a 12,0 mg/mL e 129,41/s respectivamente, a enzima também apresentou de 556,58 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (PATEL and SHAH, 2021). A endoglucanase isolada do *Bothriopsis ricini* apresentou k_m de $0,1299 \pm 0,0096$ mg/mL e V_{max} de $0,097 \pm 0,00121$ mol/min/mL (SILVA et al., 2018).

Os estudos cinéticos são muito importantes para determinar as características e o comportamento das enzimas, esses dados permitem aplicar o uso das enzimas de forma a garantir uma maior eficácia catalítica e obter maiores resultados.

Diante da grande variedade de endoglucanases isoladas, há também uma grande diversidade de características bioquímicas encontradas é necessária analisar qual endoglucanase pode ser mais bem aplicado a cada processo industrial visando uma maior eficiência no processo, menor custo e menor tempo.

5.5. APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

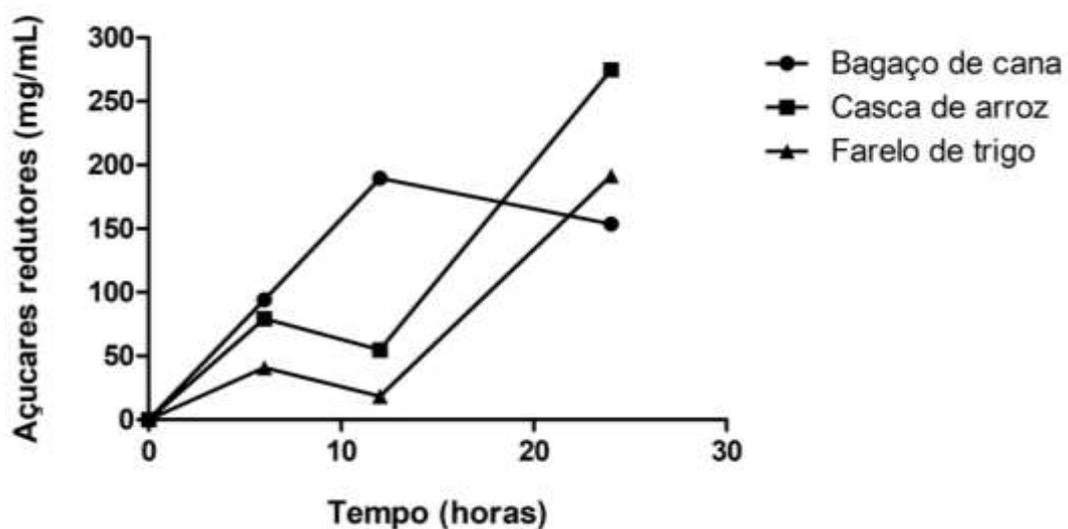
5.5.1. Sacarificação de resíduos agroindustriais

Como já é bastante conhecido as enzimas são amplamente utilizadas em processos industriais elas correspondem a uma parcela considerável do comércio internacional, a utilização das enzimas em processos industriais visa melhorar o desempenho dos processos, dar maior eficácia e ampliar a utilização de fontes consideradas limpas para o meio ambiente.

A sacarificação dos resíduos agroindustriais é primeira etapa de análise da endoglucanase quanto à capacidade de degradar os resíduos agroindustriais e liberar açúcares redutores que podem ser fermentáveis para posterior produção de etanol de segunda geração.

A endoglucanase isolada do fungo *P. sanguineus* sacarificou os três resíduos agroindustriais e conseguiu produzir 155 mg/mL de açúcares redutores em bagaço de cana, 192 mg/mL em farelo de trigo e 273 mg/mL em casca de arroz todos em 24 horas de incubação, como mostra a Figura 24.

Figura 22. Perfil de sacarificação de resíduos agroindustriais (bagaço de cana, casca de arroz e farelo de trigo) com a endoglucanase isolada do *P. sanguineus*.



Todas as reações ocorreram em condições ótimas da enzima.

A endoglucanase do *P. sanguineus* apresentou maior de produção de açúcares redutores na sacarificação da casca do arroz em 24 horas de hidrolise do resíduo, gerando 273 mg/mL de açúcares redutores. Há uma grande variedade de resultados quando comparado à sacarificação utilizando endoglucanases fúngicas visto que cada endoglucanase pode atuar de formas diferentes em diferentes resíduos agroindustriais.

A casca do arroz é um importante resíduo agroindustrial, pois é o alimento básico de toda população mundial especialmente na Ásia e na África. Mas apenas cerca de 20% da casca do arroz é reaproveitada para produção de biocombustíveis, papel, fertilizantes e ração animal (ABRAHAM et al., 2016).

Após a colheita a maior parte é utilizada como fertilizante no próprio solo ou utilizada como cobertura morta para safra seguinte, porém a lentidão para a incorporação da palha do arroz no solo pode gerar doenças na plantação do arroz ou parte é queimada, porém esse destino gera impacto negativo ao meio ambiente (BERNARD and GOODMAN, 2020).

A boa sacarificação da endoglucanase do *P. sanguineus* pode está relacionada com as características da enzima e com a composição da casca do arroz, esta apresenta 28% de celulose, 22% de hemicelulose e 19% de lignina, a maior porção da casca do arroz é composta de celulose o que favorece a atuação da enzima sobre o resíduo (BERNARD and GOODMAN, 2020).

Devido à presença de lignina na composição da casca do arroz alguns autores sugerem o pré-tratamento do resíduo antes da sacarificação enzimática, porém apesar desse processo melhorar o acesso da enzima ao resíduo pode favorecer a diminuição na eficácia da enzima, pois o processo de pré-tratamento pode gerar compostos desfavoráveis à enzima e aumentar o custo do processo (ABRAHAM et al., 2016).

Após a sacarificação da casca do arroz a endoglucanase do *P. sanguineus* conseguiu sacarificar de forma significativa o farelo de trigo com produção de 192 mg/mL de açúcares em 24 horas, a composição do farelo de trigo apresenta cerca de 12% de celulose e baixíssimas taxas de lignina o que favorece sua sacarificação (TANASKOVIC et al., 2021).

O terceiro resíduo utilizado na sacarificação foi o bagaço de cana, importante resíduo agroindustrial e bastante na produção de etanol de segunda geração na tentativa de diminuir a perda das usinas de cana de açúcar e aumentar a produção de etanol. Contudo o bagaço de cana contém significativa quantidade de lignina o que interfere na ação direta das enzimas, sendo necessário o pré-tratamento do resíduo (BERTONHA et al., 2018).

Alguns estudos utilizando endoglucanases de outros fungos para sacarificar resíduos agroindustriais também conseguiram sacarificar o bagaço de cana sem nenhum pré-tratamento prévio, a exemplo da endoglucanase isolada do *Bothriopsis ricini* que apresentou produção de 137 mg/mL de açúcares redutores em 24 horas (SILVA et al., 2018).

A endoglucanase recombinante isolada a partir do *Myceliophthora thermophila* produziu 376, 402, 320, 286 e 265 mg de açúcares redutores por gramas de espigas de milho, farelo de trigo, talos de girassol, palha de arroz e farelo de arroz respectivamente (PHADTARE et al., 2017).

Os dados obtidos a partir da sacarificação dos agrosíduos são possíveis identificar as taxas de açúcares produtores pela enzima isolada nos diferentes resíduos e como eles podem ser mais bem aproveitados para as aplicações biotecnológicas. A sacarificação pode ter seus resultados alterados quando também são alteradas as condições das reações das enzimas.

6. CONCLUSÕES

O fungo *P. sanguineus* conseguiu se desenvolver e produzir uma importante endoglucanase a partir da fermentação em estado sólido no farelo de trigo com 72 horas de fermentação quando comparado com os outros 4 resíduos agroindustriais (bagaço de cana de açúcar, pó de madeira, papel de filtro e fibra de coco).

A endoglucanase foi isolada através do fracionamento com etanol e da cromatografia de troca iônica (DEAE Sepharose), com taxa de recuperação de 92% após o processo de purificação. O SDS-PAGE mostrou-se eficaz no acompanhamento das etapas de purificação da enzima e estimou a massa molecular da mesma em aproximadamente 76 kDa.

A enzima apresentou importantes características bioquímicas como: temperatura ótima de 50°C e estabilidade térmica entre 30° a 60°C com 50% da atividade enzimática, o pH ótimo é o pH 5,0, boa estabilidade a variação de pH, mantendo-se viável entre o pH 5,0 a 8,0, características muito importantes para sua aplicação em processos industriais.

A endoglucanase do *P. sanguineus* foi considerada uma enzima halofílica, pois apresentar maior atividade em ambiente com quantidades significativas de NaCl. Ela apresentou capacidade halotolerante, pois manteve mais de 100% da atividade enzimática em até 5M de NaCl. As constantes cinéticas foram: K_m igual $3,18 \pm 100$ mg/mL e o K_{cat} igual a $4,53 S^{-1}$, constantes cinéticas compatíveis com outras endoglucanases fúngicas.

A endoglucanase do *P. sanguineus* apresentou capacidade de sacarificação de resíduos agroindustriais, produzindo maior quando de açúcares redutores 273 mg/mL em casca de arroz em 24 horas, seguido do farelo de trigo 192 mg/mL e bagaço de cana com 155 mg/mL.

Dessa forma a endoglucanase isolada do *P. sanguineus* mostrou-se uma importante opção para utilização de endoglucanase em processos industriais, pois a mesma apresenta características bioquímicas compatíveis aos processos industriais, com boa estabilidade a condições variáveis dos processos, como por exemplo:

produção de etanol de segunda geração, adição em coquetéis de detergentes comerciais, melhoramento da ração animal, etc.

REFERÊNCIAS

- Akram, F. Haq, I. U. Imran, W. Mukhtar, H. Insight perspectives of thermostable endoglucanases for bioethanol production: A review. **Renewable Energy** 122 (2018) 225-238
- Almeida, M. N. Falkoski, D. L. Guimarães, V. M. Ramos, H. J. Visser, E. M. Alfenas, M. G. P. Rezende, S. T. Characteristic of free endoglucanase and glycosidases multienzyme complex from *Fusarium verticillioides*. **Bioresource Technology** 143 (2013) 413-422
- ALMONT, G. A; SWEAT, J. D. **Serine proteases, serine proteases inhibitors, and protease-activated receptors: Roles in synaptic function and behavior**. Brain research 1407 (2011) 107-122.
- Asha, P. Jose, D. Singh, I. S. B. Purification and characterization of processive-type endoglucanase and β -glucosidase from *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810 through saccharification of delignified coir pith to glucose. **Bioresource Technology** 213 (2016) 245-248
- Bauli, C. R. Rocha, D. B. R. Oliveira, S. A. Rosa, D. S. Cellulose nanostructures from wood waste with low input consumption. **Journal of cleaner production** 211 (2019) 408-416
- Bi, Z. Zhao, Y. Morrell, J. J. Lei, Y. Yan, L. The antifungal mechanism of konjac flying poder extract and its active compounds against wood decay fungi. **Industrial Crops & Products** 164 (2021) 113406
- Bohorquez, M. A. M. **Avaliação do etanol como agente precipitante de glicosil hidrolases produzida por *Trichoderma harzianum* P49P11**. Universidade Estadual de Campinas, 2014.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248–254. 1976
- Cardoso, C. K. M. Mattedi, S. Lobato, A. K. C. L. Moreira, I. T. A. Remediation of petroleum contaminated saline water using value-added adsorbents derived from waste coconut fibres. **Chemosphere** 279 (2021) 130562

Cheng, T. H. Ismail, N. Kamaruding, N. Saidin, J. Danish-Daniel, M. Industrial enzymes-producing marine bacteria from marine resources. **Biotechnology reports** 27 (2020) e00482

Colla, M. L. Primaz, A. L. Lima, M. Bertolin, T. E. Costa, J. A. V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciênc. Agrotec., Lavras**, V. 32, n. 3, p. 809-813, maio/jun., 2008.

Dantán-González, E. Vite-Vallejo, O. Martínez-Anaya, C. Méndez-Sánchez, M. González, M. C. Palomares L.A. Folch-Mallof, J. Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of *Pycnoporus sanguineus* isolated from an oil-polluted tropical habitat. **International Microbiology**. volume 11, Issue 3, pages 163-169. September 2008

DAVID L. NELSON; MICHAEL M. COX. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6° Ed. Porto Alegre: Artemed, 2014. 1298p.

Dehnavi, E. Siadat, S. O. R. Roudsari, M. F. Khajeh, K. Cloning and high-level expression of β -xylosidase from *Selenomonas ruminantium* in *Pichia pastoris* by optimizing of pH, methanol, concentration and temperature conditions. **Protein Expression and purification** 124 (2016) 55-61

Diaz, A. B. Blandino, A. Caro, I. Value added products from fermentation of sugars derived from agro-food residues. **Trends in food Science & Technology** 71 (2018) 52-64

Dhar, H. Kasana, R. C. Gulati, A. Heterologous expression and characterization of detergent stable endoglucanase EG5B from *Paenibacillus* sp. IHB 3084. **Journal of molecular catalysis B: enzymatic** 120 (2015) 9-15

Dong, M. Wang, S. Xu, F. Xiao, G. Bai, J. Efficient utilization of waste paper as an inductive feedstock for simultaneous production of cellulase and xylanase by *Thichoderma longiflorum*. **Journal of cleaner production** 308 (2021) 127287

Eisenthal, R. Peterson, M. E. Daniel, R. M. Danson, M. J. The thermal behaviour of enzyme activity: implications for biotechnology. **Trends in biotechnology** Vol. 24 No. 7 July 2006

Faúndez, C. Pérez, R. Ravanal, M. C. Eyzaguirre, J. *Penicillium purpurogenum* produces a novel, acidic, GH3 beta-xylosidase: Heterologous expression and characterization of the enzyme. **Carbohydrate Research** Volume 482, 1 august 2019, 107738

Fasim, A. More, V. S. More, S. S. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. **Current opinion in biotechnology** 2021, 69:68-76

Figueiredo, A. Silva, A. C. Atividade “in vitro” de extratos de *Pycnoporussanguineus* e *Lentinus crinitus* sobre o fitopatógeno *Fusarium* sp. **Acta Amazonica** VOL. 44 (1) 2014: 1-8

Ghio, S. Bradanini, M. B. Garrido, M. M. Ontanon, O. M. Piccinni, F. E. Villegas, R. M. D. Talia, P. M. Campos, E. Synergic activity of Cel8Pa β -1-4 endoglucanase and Bg1Pa β -glucosidase from *Paenibacillus xylanivorans* A59 in beta-glucan conversion. **Biotechnology Reports** 28 (2020) e00526

Houfani, A. A. Anders, N. Spiess, A. C. Baldrian, P. Benallaoua, S. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicelulose to fermentable sugars – a review. **Biomass and Bioenergy** 134 (2020) 105481

Huang, X. Men, P. Tang, S. Lu, X. *Aspergillus terreus* as na industrial filamentous fungus for pharmaceutical biotechnology. **Current opinion in Biotechnology** 2021, 69: 273-280

Ishihara, M. Tawata, S. Toyama, S. Disintegration of uncooked rice by carboxymethyl cellulase from *Sporotrichum* sp. HG-I. **Journal of bioscience and bioengineering** vol. 87, No. 2, 249-251. 1998

Jia, Y. Xue, Z. Wang, Y. Lu, Y. Li, R. Li, N. Wang, Q. Zhang, M. Chen, H. Chemical structure and inhibition on α -glucosidase of polysaccharides from corn silk by fractional precipitation. **Carbohydrates Polymers** 252 (2021) 117185

Karp, S. G. Rozhkova, A. M. Semenova, M. V. Osipov, D. O. Pauli, S. T.Z. Sinitsyna, O. A. Zorov, I. N. Vandenberghe, L. P. S. Soccol, C. R. Sinitsyn, A. P. Designing enzyme cocktails from *Penicillium* and *Aspergillus* species for the enhanced saccharification of agro-industrial wastes. **Bioresource Technology** 330 (2021) 124888

- Kee, S. H. Chiongson, J. B. V. Saludes, J. P. Vigneswari, S. Ramakrishna, S. Bhubalan, K. Bioconversion of agro-industry sourced biowaste into biomaterials via microbial factors – A viable domain of circular economy. **Environmental Pollution** 271 (2021) 116311
- Kumar Das, R. Brar, S. K. Verma, M. Potential use of pulp and paper solid waste for the bio-production of fumaric acid through submerged and solid state fermentation. **Journal of cleaner production** 112 (2016) 4435-4444
- Kumar, V. Navarro, M. J. Shukla, P. World, J. Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: trends, applications and further perspectives. **Microbiol Biotechnol.**, 32 (2) (2016), p 34
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.
- Land, M. Hauser, L. Jun, S. Nookaew, I. Leuze, M. R. Ahn, T. Karpinets, T. Lund, O. Kora, G. Wassenaar, T. Poudel, S. Ussery, D.W. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. **Funct Integr Genomics** (2015) 15: 141-161
- Levasseur, A. Lomascolo, A. Chabrol, O. Ruiz-Duenas, F. J. Boukhris-Uzan, E. Piumi, F. Kues, U. Ram, A. F. J. Murat, C. Haon, M. Benoit, I. Arfi, Y. Chevret, D. Drula, E. Kwon, M. J. Gouret, P. Meesen, L. L. Lombard, V. Mariette, J. Noirot, C. Park, J. Patyshakuliyeva, A. Sigoillot, J. C. Wiebenga, A. Wosten, H. A. B. Martin, F. Coutinho, P. M. Vries, R. P. Martinez, A. T. Klopp, C. Pontarotti, P. Henrissat, B. Record, E. The genome of the White-rot fungus *Pycnoporus cinnabarius*: a basidiomycete model with a versatile arsenal for lignocellulosic biomass breakdown. **BMC Genomics** 2014, 15:486
- LI, Q; YI, L; MAREK, P.; IVERSON, L. B. Commercial proteases: present and future. **FEBS Letters** 587 (2013) 1155-1163.
- Liu, Z. Li, J. Jie, C. Wu, B. Hao, N. A multifunctional α -amylase BSGH13 from *Bacillus subtilis* BS-5 possessing endoglucanase and xylanase activities. **International journal of biological Macromolecules** 171 (2021) 166-176
- Liu, D. Zhang, R. Yang, X. Xu, Y. Tang, Z. Tian, W. Shen, Q. Expression, purification and characterization of two thermostable endoglucanases cloned from a

lignocellulosic decomposing fungi *Aspergillus fumigatus* Z5 isolated from compost. **Protein Expression and Purification** 79 (2011) 176-186

Luis-zarate, V. H. Rodriguez-hernandez, M. C. Mondragon-Alatriste, F. Charzaro-Ruiz, L. F. Rangel-Mendez, J. R. Coconut endocarp and mesocarp as both biosorbents of dissolved hydrocarbons in fuel spills and as a power source when exhausted. **Journal of Environmental Management** 211 (2018) 103-111

Marzo, C. Díaz, A. B. Caro, I. Blandino, A. Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. **Waste Management & Research** 2019, vol. 37(2) 149-156

MONTEIRO, V. N; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista processos químicos**, Jan / Jun de 2009.

Moreira, S. R. L.; Sciuto, D. L.; Ferreira Filho, E. X. An Overview of cellulose-Degrading enzymes and their applications in textile industry. **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering** 2016, pages 165-175

Murray, P. G. Grassick, A. Laffey, C. D. Cuffe, M. M. Higgins, T. Savage, A. V. Planas, A. Touhy, M. G. Isolation and characterization of a thermostable endo β -glucanase active on 1,3-1,4- β -D-glucans from the aerobic fungus *Talaromyces emersonii* CBS 814.70

Phadtare, P. Joshi, S. Satyanarayana. T. Recombinant thermo-alkali-stable endoglucanase of *Myceliophthora thermophila* BJA (rMt-egl): Biochemical characteristics and applicability in enzymatic saccharification of agro-residues. **Internacional journal of biological macromolecules** 104 (2017) 107-116

Patel, A. Shah, A. Purification and characterization of novel, thermostable and non-processive GH5 family endoglucanase from *Fomitopsis meliae* CFA 2. **International Journal of Biological Macromolecules** 182 (2021) 1161- 1169

Peng, L. Wang, H. Dai, H. Fu, Y. Ma, L. Zhu, H. Yu, Y. Li, L. Wang, Q. Zhang, Y. Preparation and characterization of gelatina films by transglutaminase cross-linking combined with ethanol precipitation or Hofmeister effect. **Food Hydrocolloids** 113 (2021) 106421

- Postigo, L. O. C. Velazquez, D. A. J. Flores, D. G. Amezquita, L. E.G. Cayuela, T. G. Solid-state fermentation for enhancing the nutraceutical content of agrifood by products: Recent advances and its industrial feasibility. **Food Bioscience** 41 (2021) 100926
- Ostbly, H. Hansen, L. D. Horn, S. J. Eijsink, V. G. Varnai, A. Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: principles, recent advances and perspectives. **Journal of industrial microbiology & biotechnology** (2020) 47: 623-657
- Safak, H. Otur, Ç. Kizildogan, A. K. Molecular and biochemical characterization of a recombinant endoglucanase rCKT3eng, from an extreme halophilic *Haloarcula* sp. strain CKT3. **International journal of biological macromolecules** 151 (2020) 1173-1180
- Salomão, G. S. B. Agnezi, J. C. Paulino, L. B. Hencker, L. B. Lira, T. S. Tardioli, P. W. Pinotti, L. M. Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 17 (2019) 1-6
- Santos, P. S. Solidade, L. S. Souza, J. G. B. Lima, G. S. Braga, A. C. R. Assis, F. G.V. Leal, P. L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: Uma revisão sistemática. **The journal of engineering and exact sciences – JCEC**, vol. 04 N. 02 (2018).
- Silva, P. T. Albuquerque, F. S. 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. **Bioresource technology** 270 (2018) 263-269
- Sittipol, D. Saelao, P. Lohnoo, T. Lerksuthirat, T. Kumsang, Y. Yingyong, W. Khunrae, P. Rattanarojpong, T. Jongruja, N. Cloning, expression, purification and characterization of a thermo and surfactant-stable protease from *Thermomonospora curvata*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 19 (2019) 101111
- Srivastara, N. Srisvastara M. Mishra, P.K. Gupta, V. K. Molina, G. Rodriguez-couto, S. Manikanta, A. Ramteke, P.W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 82 (2018) 2379-2386.

Tanaskovic, J. S. Sekuljica, N. Jovanovic, J. Gazikalovic, I. Grbavcic, S. Dordevic, N. Sekulic, M. V. Hao, J. Lukovic, N. Jugovic, K. Z. Upgrading of valuable food componente contentes and anti-nutritional factors depletion by solid-state fermentation: A way to valorize wheat bran for nutrition. **Journal of cereal Science** 99 (2021) 103159

Tao, Y. Yang, L. Yin, L. Lai, G. Huang, C. Li, X. Yong, Q. Novel approach to produce biomass-derived oligosaccharides simultaneously by recombinant endoglucanase from *Trichoderma reesi*. **Enzyme and Microbial Technology** 134 (2020) 109481

Xue, D. S. Zheng, X. Lin, D. Yao, S. Ethanol tolerant endoglucanase from *Aspergillus niger* isolated from wine fermentation cellar. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 15 (2018) 19-24

Zheng, L. Yu, X. Wei, C. Qiu, L. Yu, C. Xing, Q. Fan, Y. Deng, Z. Production and characterization of a novel alkaline protease from a newly isolated *Neurospora crassa* through solid-state fermentation. **LWT – Food Science and technology** 122 (2020) 108990

Wang, H. C. Chen, Y. C. Hseu, R. S. Purification and characterization of a cellulolytic multienzyme complex produced by *Neocallimastix patriciarum* J11. **Biochemical and biophysical research communications** 451 (2014) 190-195

Watanabe H. Tokuda, G. Cellulolytic Systems in Insects. **Annu. Rev. Entomol.** 2010.55.609-632