



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Cleiton Márcio Pinto Braga

**PRODUÇÃO DAS ENZIMAS ACESSÓRIAS FERULOIL ESTERASE E XILANASE POR  
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA REGIÃO AMAZÔNICA E SUA  
APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**SÃO CARLOS-SP**

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Cleiton Márcio Pinto Braga

**PRODUÇÃO DAS ENZIMAS ACESSÓRIAS FERULOIL ESTERASE E XILANASE POR  
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA REGIÃO AMAZÔNICA E SUA  
APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores:

Dra. Cristiane Sanchez Farinas  
Dr. José Geraldo da Cruz Pradella

SÃO CARLOS-SP

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B813pe

Braga, Cleiton Márcio Pinto.

Produção das enzimas acessórias feruloil esterase e xilanase por fungos filamentosos isolados da região amazônica e sua aplicação na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar / Cleiton Márcio Pinto Braga. -- São Carlos : UFSCar, 2014.

86 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Enzimas. 2. Ácido ferúlico. 3. Feruloil esterase. 4. Xilanase. 5. Biomassa. I. Título.

CDD: 660.634 (20<sup>a</sup>)

**Cleiton Márcio Pinto Braga**

Dissertação de Mestrado submetida  
à Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia

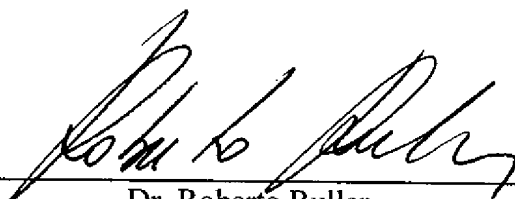
**Aprovado em: 13/12/2013**

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dra. Cristiane Sanchez Farinas (Orientadora)  
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/ EMBRAPA Instrumentação)



---

Dr. Roberto Ruller  
(CNPEM/ CTBE – Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol)



---

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava  
(Universidade Federal de São Carlos)

Dedico este trabalho a Deus  
e aos presentes Ele que me deu:  
minha mãe, Rilza, e minha avó, Maria.

## AGRADECIMENTOS

Embora as palavras não sejam bastantes, agradeço:

A Deus, o Autor da existência, pela vida, pela bondade e misericórdia, pelo dom da fé, por ter-me conduzido até aqui.

Ao Senhor Jesus, o amado Redentor, por ser o meu Mestre e Fiel Amigo, por Sua paz, por nunca desistir de mim.

Aos meus pais, Rilza e Raimundo, e avós, pelos valores que me ensinaram, pelo carinho e amor incondicional.

Aos meus familiares, que sempre me apoiaram e torceram por mim.

Aos meus amigos, pela amizade sólida que construímos, a qual tenho como uma pedra de valor inestimável.

Aos meus orientadores, Dra. Cristiane e Dr. Pradella, que tiveram uma paciência imensurável comigo, sempre estiveram disponíveis para ajudar, acreditaram no meu trabalho e muito me ensinaram.

Aos colegas de laboratório, funcionários e terceirizados da Embrapa Instrumentação e do Cnpem, por toda a ajuda, incentivo e conversas.

Aos meus professores, por tudo que me ensinaram.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa, Prof. Dr. Adilson J. da Silva, Prof. Dr. Paulo T. Lacava, Dr. Roberto Ruller e Dra. Sandra C. Pereira, pelas críticas construtivas ao trabalho e ao texto.

Ao Prof. Dr. George J. M. Rocha, que gentilmente cedeu os bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados; e ao Prof. Dr. Craig B. Faulds, pela generosidade em detalhar o método de atividade da feruloil esterase.

A tantas outras pessoas boas que Deus colocou no meu caminho.

À UFSCar, minha universidade do coração, e ao PPG-Biotecnologia, pela realização do curso de mestrado e por todo o apoio.

À Embrapa Instrumentação e ao Cnpem por toda a infraestrutura disponibilizada.

À CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

*"Quando passares pelas águas estarei contigo,  
e quando pelos rios, eles não te submergirão;  
quando passares pelo fogo, não te queimarás,  
nem a chama arderá em ti."*

(Isaías 43:2)

## RESUMO

A xilanase e a feruloil esterase (FAE) são duas enzimas de grande relevância na decomposição da biomassa vegetal. Um dos constituintes da biomassa, a hemicelulose, possui uma grande variedade estrutural, de modo que, para sua completa desconstrução, são necessários diversos grupos de enzimas, entre as quais se pode destacar a xilanase. Esta age sobre as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 entre resíduos de xilose. Sua atividade pode ser incrementada na presença de esterases, tal como a feruloil esterase (FAE), haja vista que esta catalisa a hidrólise de ligações que ajudam a tornar a estrutura mais intrincada. Tais ligações são formadas, principalmente, por ácido ferúlico esterificado a resíduos de açúcares anexados à cadeia principal do carboidrato. Vale ressaltar que o ácido ferúlico promove conexões entre os componentes da hemicelulose, pectina e lignina. Ambas as enzimas despertam interesse em diversos setores, como nos processos de sacarificação e de branqueamento, nas indústrias de bioetanol e de papel e celulose, respectivamente. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivos selecionar e cultivar fungos filamentosos produtores de xilanase e feruloil esterase e avaliar a aplicação dessas enzimas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. Inicialmente, foi realizada uma seleção em placas com ferulato de etila, entre onze fungos filamentosos isolados da região amazônica, sendo que sete formaram halo claro ao redor da colônia, como indicativo de produção de FAE. Em seguida, os fungos foram cultivados em meio líquido suplementado com 1% de farelo de trigo, e, com base nos valores de produtividade, foram escolhidas três linhagens de *Aspergillus oryzae* (P21C3, P27C3 e P6B2), para o cultivo em biorreator de tanque agitado. Após 24 horas de cultivo do isolado P21C3 em reator, obteve-se um extrato enzimático com  $74,85 \text{ UI.mL}^{-1}$  de xilanase e  $47,02 \text{ UI.L}^{-1}$  de FAE, o qual foi empregado para hidrólise de bagaço de cana com pré-tratamento hidrotérmico, junto ao preparado enzimático comercial de celulases. Nestas condições, obteve-se uma conversão de 51,2% (celulose em glicose) e de 78,1% (hemicelulose em xilose), sendo que, a adição do extrato enzimático obtido nesse trabalho proporcionou um ganho de 35,8% na liberação de glicose e de 53,8% na liberação de xilose.

---

**Palavras-chave:** ácido ferúlico; feruloil esterase; xilanase; biomassa.



## ABSTRACT

Xylanase and feruloyl esterase (FAE) are two enzymes of great importance for plant biomass decomposition. The hemicellulose, one of the biomass constituents, has a great structural variety, so that for its complete deconstruction, several groups of enzymes are required, including mainly xylanases. These enzymes act on the  $\beta$ -1,4 glycosidic bonds between the xylose residues. Xylanase activity can be enhanced in the presence of esterases, such as feruloyl esterase (FAE), since the latter catalyzes the hydrolysis of linkages which make cell wall structure to be more intricated. Such connections are formed mainly by the ferulic acid esterified to sugar residues attached to the carbohydrate main chain. It is noteworthy that the ferulic acid cross-links to hemicellulose, pectin and lignin structures. Both enzymes are of interest in many sectors, for example, during the saccharification for bioethanol production and bleaching stages of pulp and paper industry. Therefore, this study aimed to select and cultivate filamentous fungi from the Amazon rainforest capable of synthesizing FAE and xylanase, and to evaluate the application of these enzymes in the hydrolysis of sugar cane bagasse. Initially, a screening was conducted on agar plates containing ethyl ferulate. Among eleven fungi tested, seven showed a clear halo around the colony, as indicative of FAE production. Then, the fungi were cultivated in liquid nutrient medium supplemented with 1% wheat bran, and, based on productivity values, three strains of *Aspergillus oryzae* (P21C3, P6B2 and P27C3) were chosen for cultivation in a stirred tank bioreactor. After 24 hours of cultivation of the P21C3 strain in the bioreactor, it was obtained a crude enzyme extract with  $74.85 \text{ UI.mL}^{-1}$  and  $47.02 \text{ UI.L}^{-1}$  of xylanase and FAE activity, respectively. This extract was used for the hydrolysis of hydrothermal pretreated sugarcane bagasse with supplementation of a commercial cellulolytic enzyme preparation. These hydrolysis reactions resulted in conversions of 51.2% (cellulose to glucose) and 78.1% (hemicellulose to xylose). Furthermore, the addition of the on-site produced enzyme extract increased the glucose release by 35.8% and the xylose release by 53.8%.

---

**Keywords:** ferulic acid; feruloyl esterase; xylanase; biomass.

## PUBLICAÇÕES

BRAGA, C. M. P.; DELABONA, P. S.; LIMA, D. J. S.; PAIXAO, D. A. A.; PRADELLA, J. G.; FARINAS, C. S. Addition of feruloyl esterase and xylanase produced on-site improves sugarcane bagasse hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 316-324, 2014.

BRAGA, C. M. P.; DELABONA, P. S.; PRADELLA, J. G. C.; FARINAS, C. S. Production of accessory enzymes for biomass degradation by filamentous fungi isolated from the Amazon rainforest. In: 35th SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, 2013, Portland. **Anais do 35th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**, 2013.

BRAGA, C. M. P.; DELABONA, P. S.; PRADELLA, J. G. C.; FARINAS, C. S. Seleção e cultivo de fungos amazônicos produtores de xilanase e feruloil esterase. In: X SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 2012, Blumenau-SC. **Livro de resumos do X Enzitec 2012**. Blumenau: FURB, 2012.

BRAGA, C. M. P.; DELABONA, P. S.; PRADELLA, J. G. C.; FARINAS, C. S. Produção de enzimas acessórias por fungos filamentosos para degradação da biomassa vegetal. In: IV JORNADA CIENTÍFICA - EMBRAPA SÃO CARLOS, 2012, São Carlos. **Anais da IV Jornada Científica - Embrapa São Carlos**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2012.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Heterogeneidade nas estruturas dos polissacarídeos de parede vegetal.....	24
<b>Figura 2</b>	Estrutura da parede celular vegetal primária.....	25
<b>Figura 3</b>	Feruloilação do glucoarabinosilano, principal carboidrato de hemiceluloses da parede vegetal primária de alguns grupos de plantas.....	28
<b>Figura 4</b>	Estruturas de ácidos hidroxicinâmicos.....	30
<b>Figura 5</b>	Autofluorescência devido ao ácido ferúlico esterificado na pectina da parede de células-guarda de milho.....	32
<b>Figura 6</b>	Colônias de alguns isolados submetidos ao teste com EFA.....	50
<b>Figura 7</b>	Curva de correlação linear entre dados de atividade de FAE obtidos em espectrofotômetro e em HPLC.....	51
<b>Figura 8</b>	Atividades máximas de xilanase apresentadas pelos diferentes fungos.....	52
<b>Figura 9</b>	Produtividades máximas de xilanase apresentadas pelos diferentes fungos ao longo do cultivo.....	53
<b>Figura 10</b>	Comparação entre as maiores produções de FAE, até o quarto dia de cultivo.....	54
<b>Figura 11</b>	Produtividades máximas de feruloil esterase apresentadas pelos diferentes fungos ao longo do cultivo.....	55
<b>Figura 12</b>	Perfil de proteínas do sobrenadante do cultivo de diferentes fungos.....	56

<b>Figura 13</b>	Efeito de fontes de carbono sobre a produção de xilanase ao longo do período de cultivo do fungo P21C3.....	58
<b>Figura 14</b>	Efeito de fontes de carbono sobre a produção de FAE ao longo do período de cultivo do fungo P21C3.....	59
<b>Figura 15</b>	Perfil de proteínas do sobrenadante do cultivo do fungo P21C3 com diferentes fontes de carbono.....	61
<b>Figura 16</b>	Atividade de xilanase ao longo do período do cultivo de três linhagens de <i>A. oryzae</i> em reator.....	62
<b>Figura 17</b>	Atividade de feruloil esterase ao longo do período do cultivo das três linhagens de <i>A. oryzae</i> em reator.....	63
<b>Figura 18</b>	Produção de xilanase pelo fungo P21C3 em diferentes concentrações de farelo de trigo.....	64
<b>Figura 19</b>	Produção de FAE pelo fungo P21C3 em diferentes concentrações de farelo de trigo.....	65
<b>Figura 20</b>	Curva de saturação: liberação de glicose a partir de bagaço hidrotérmico através de tratamentos com diferentes níveis de proteína, após 24 horas de ensaio.....	69
<b>Figura 21</b>	Rendimento de celulose em glicose da curva de saturação.....	70
<b>Figura 22</b>	Ganho percentual na liberação de glicose em relação ao controle feito apenas com <i>Celluclast</i> (r0).....	71
<b>Figura 23</b>	Perfis de liberação de glicose ao longo do tempo, a partir de diferentes tratamentos, no experimento de hidrólise em frascos agitados.....	72

<b>Figura 24</b>	Rendimento de celulose em glicose obtido no ensaio de hidrólise em frascos agitados.....	73
<b>Figura 25</b>	Ganho percentual na liberação de glicose em relação ao controle "r0", no ensaio de hidrólise em frascos agitados.....	73
<b>Figura 26</b>	Perfis de liberação de xilose ao longo do tempo, a partir de diferentes tratamentos, no experimento de hidrólise em frascos agitados.....	74
<b>Figura 27</b>	Rendimento de hemicelulose em xilose obtido no ensaio de hidrólise em frascos agitados.....	75
<b>Figura 28</b>	Ganho percentual na liberação de xilose em relação ao controle "r0" no ensaio de hidrólise em frascos agitados.....	75
<b>Figura 29</b>	Perfis de liberação de celobiose ao longo do tempo, a partir de diferentes tratamentos, no experimento de hidrólise em frascos agitados.....	76
<b>Figura A1</b>	Monitoramento do pH ao longo do cultivo em shaker do fungo P21C3 durante ensaio para avaliação do efeito de fontes de carbono sobre a produção de xilanase e FAE.....	85
<b>Figura A2</b>	Perfis de agitação (rpm) e oxigênio dissolvido (% de saturação com ar) ao longo do cultivo do fungo P21C3 em biorreator convencional.....	86

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Formação de halo claro e de crescimento entre os diferentes fungos em placas com EFA.....	49
<b>Tabela 2</b>	Caracterização dos substratos bagaço explodido, bagaço hidrotérmico e licor.....	58
<b>Tabela 3</b>	Painel de atividade enzimática do extrato <i>R05B</i> e de <i>Celluclast 1.5L</i> .....	67
<b>Tabela 4</b>	Caracterização do bagaço com pré-tratamento hidrotérmico utilizado nos ensaios de hidrólise enzimática.....	68
<b>Tabela 5</b>	Quantidades relativas de proteína, xilanase e FAE adicionadas em cada tratamento por grama de bagaço seco.....	69
<b>Tabela 6</b>	Comparação de médias por meio de teste de Tukey aplicado aos dados de liberação de glicose do experimento de hidrólise em frascos agitados.....	72
<b>Tabela 7</b>	Comparação de médias por meio do teste de Tukey aplicado aos dados de liberação de xilose do experimento de hidrólise em frascos agitados.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA	Batata-dextrose-ágar
BEX	Bagaço de cana-de-açúcar tratado por explosão a vapor
BH	Bagaço de cana-de-açúcar tratado por processo hidrotérmico
CA	Ácido caféico
CBH	Celobiohidrolase
ctrl	Controle feito com tampão e substrato na hidrólise
d.d.p.	diferença de potencial elétrico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido dinitrosalicílico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
EC	<i>Enzyme Commission</i> - número de classificação de enzimas
EFA	Ferulato de etila (do inglês <i>ethyl ferulate</i> )
FA	Ácido ferúlico (do inglês <i>ferulic acid</i> )
FAE	Feruloil esterase (do inglês <i>ferulic acid esterase</i> )
FI	Farelo de trigo <i>in natura</i>
FLcT	Meio contendo farelo de trigo lavado e tampão ftalato
FLsT	Meio contendo farelo de trigo lavado e sem tampão ftalato
FPase	Atividade enzimática sobre papel filtro
FPU	Unidade de atividade enzimática sobre papel filtro
FS	Farelo de soja
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
L10	Meio contendo 10% de licor de pré-tratamento hidrotérmico
L20	Meio contendo 20% de licor de pré-tratamento hidrotérmico
L40	Meio contendo 40% de licor de pré-tratamento hidrotérmico
L50	Meio contendo 50% de licor de pré-tratamento hidrotérmico
m/m	Relação massa por massa
m/v	Relação massa por volume
MCA	Cafeato de metila (do inglês <i>methyl caffeate</i> )

MFA	Ferulato de metila (do inglês <i>methyl ferulate</i> )
MM	Massa molecular
MpCA	<i>p</i> -cumarato de metila (do inglês <i>methyl p-coumarate</i> )
MSA	sinapato de metila (do inglês <i>methyl sinapate</i> )
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
pCA	Ácido <i>p</i> -cumárico (do inglês <i>p-coumaric acid</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
pH	Potencial hidrogeniônico
pNPC	<i>p</i> -nitrofenol- $\beta$ -D-celobiosídeo
pNPG	<i>p</i> -nitrofenol- $\beta$ -D-glucopiranosídeo
r0	reação de hidrólise com extrato enzimático composto apenas por <i>Celluclast</i>
R05B	Extrato bruto do fungo P21C3 obtido após 24 horas de cultivo em reator com 10 g.L <sup>-1</sup> de farelo de trigo lavado
r1	Reação de hidrólise com suplementação de 10% de extrato <i>R05B</i>
r2	Reação de hidrólise com suplementação de 20% de extrato <i>R05B</i>
r <sup>2</sup>	Coefficiente de correlação linear
r3	Reação de hidrólise com suplementação de 30% de extrato <i>R05B</i>
r4	Reação de hidrólise com suplementação de 40% de extrato <i>R05B</i>
r5	Reação de hidrólise com suplementação de 50% de extrato <i>R05B</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SA	Ácido sinápico (do inglês <i>sinapic acid</i> )
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-	
PAGE	Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida
U / UI	Unidade internacional de atividade enzimática
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Espectro de luz ultravioleta-visível
v/v	Relação volume por volume



## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
Å	Angstrom
Da	Dalton
g	Gramma
$g$ (x $g$ )	Aceleração gravitacional da Terra
h	Hora
L	Litro
m	Metro
M	Molar
rpm	Rotação por minuto
V	Volt

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	19
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	22
2.1	<b>A parede celular vegetal.....</b>	22
2.2	<b>Componentes da parede vegetal.....</b>	23
2.3	<b>Enzimas envolvidas na degradação da parede vegetal.....</b>	25
2.4	<b>Xilanase e suas aplicações.....</b>	26
2.5	<b>Papel das feruloil esterases.....</b>	28
2.6	<b>Propriedades das feruloil esterases.....</b>	29
2.7	<b>Produção microbiana das feruloil esterases.....</b>	31
3	<b>OBJETIVOS.....</b>	36
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	37
4.1	<b>Microrganismos.....</b>	37
4.2	<b>Seleção dos isolados em placas contendo ferulato de etila.....</b>	37
4.3	<b>Seleção por cultivo em shaker.....</b>	38
4.4	<b>Efeito de fontes de carbono.....</b>	38
4.5	<b>Cultivo em reator convencional de tanque agitado.....</b>	39
4.5.1	Comparação entre três linhagens de <i>Aspergillus oryzae</i> .....	39
4.5.2	Efeito da concentração da fonte de carbono.....	40
4.6	<b>Painel de atividade enzimática.....</b>	40
4.7	<b>Curva de saturação.....</b>	40
4.8	<b>Hidrólise em frascos agitados.....</b>	41
4.9	<b>Substratos utilizados nos ensaios de cultivo e de hidrólise enzimática.....</b>	41
4.10	<b>Métodos analíticos.....</b>	42
4.10.1	Análise de feruloil esterase.....	42
4.10.1.1	<i>Método empregando HPLC.....</i>	42
4.10.1.2	<i>Método empregando espectrofotômetro.....</i>	43
4.10.2	Análise de xilanase.....	44
4.10.2.1	<i>Ensaio em tubos.....</i>	44

4.10.2.2	<i>Ensaio em microplacas</i> .....	45
4.10.3	Análise de FPase, pectinase, xiloglucanase, $\beta$ -glucosidase e celobiohidrolase....	45
4.10.4	Determinação de açúcares redutores.....	46
4.10.5	Determinação de açúcares em HPLC.....	46
4.10.6	Determinação de proteínas totais.....	46
4.11	<b>SDS-PAGE</b> .....	47
4.12	<b>Identificação dos isolados P21C3, P27C3 e P6B2</b> .....	47
4.12.1	Identificação molecular.....	47
4.12.2	Detecção de aflatoxinas.....	48
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	49
5.1	<b>Seleção de isolados em placas contendo ferulato de etila</b> .....	49
5.2	<b>Validação de metodologia para análise de FAE</b> .....	51
5.3	<b>Seleção por cultivo em shaker</b> .....	52
5.4	<b>Efeito de fontes de carbono</b> .....	57
5.5	<b>Cultivo em reator convencional de tanque agitado</b> .....	62
5.6	<b>Painel de atividade enzimática</b> .....	66
5.7	<b>Curva de saturação</b> .....	68
5.8	<b>Hidrólise em frascos agitados</b> .....	71
5.9	<b>Identificação dos isolados P21C3, P27C3 e P6B2</b> .....	77
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	78
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	79
	<b>APÊNDICE A - MONITORAMENTO DE pH</b> .....	85
	<b>APÊNDICE B – PERFIS DE AGITAÇÃO E OXIGÊNIO DISSOLVIDO EM BIORREATOR</b> .....	86

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema energético mundial depende fortemente de combustíveis fósseis, que incluem carvão, petróleo e gás natural. Em 2011, 81,5 % do consumo mundial de energia originaram-se dessas fontes (THE WORLD BANK, 2013). No entanto, a perspectiva de esgotamento das atuais reservas em exploração, bem como os efeitos negativos ao meio ambiente que resultam do seu uso, tem gerado preocupação. Com o objetivo de reduzir a dependência por essa fonte de energia finita e de distribuição irregular entre as diversas partes do globo, tem-se buscado fontes alternativas renováveis.

Entre as diversas alternativas relacionadas ao setor de transportes, o etanol se consagrou como o biocombustível mais utilizado (STICKLEN, 2008). Neste sentido, uma forma de aumentar a produção desse composto, utilizando-se fontes diversificadas como matéria-prima, é o aproveitamento da biomassa vegetal. Para que tal produção seja possível, é necessário que o material lignocelulósico que constitui a biomassa seja submetido a: pré-tratamento, sacarificação e fermentação (WYMAN, 1994).

Através do pré-tratamento é que ocorre a ruptura do complexo lignina-carboidrato e a quebra do mesmo em intermediários, para que então possa haver a sacarificação. Tais processos podem ser físicos, químicos, biológicos ou uma combinação desses. Um exemplo de processo físico é a explosão a vapor, de químico, o emprego de ácidos e de biológico, o uso de microrganismos que utilizem esses materiais como substratos. Os dois primeiros são os mais economicamente viáveis, no entanto promovem uma perda maior de açúcares, visto que são pouco específicos e muito agressivos (SUN; CHENG, 2002).

Nesse contexto, uma alternativa para aumentar a eficiência da sacarificação é a aplicação de enzimas acessórias, entre as quais, merecem especial atenção as do grupo das feruloil esterases (FAEs). As FAEs agem, de maneira sinérgica com outros tipos de enzimas, justamente sobre ligações que ajudam a tornar o complexo lignina-carboidrato muito mais resistente. Estas consistem em ligações do tipo éster entre cadeias laterais dos polissacarídeos que compõem a parede vegetal e entre estes e a lignina. Uma vez desfeito esse complexo, as enzimas que catalisam a hidrólise dos carboidratos tem o acesso ao substrato facilitado, aumentando assim a eficiência da sacarificação. Dessa forma, além do potencial de aplicação na etapa de hidrólise enzimática, essas enzimas também servem de ferramenta analítica para o entendimento da intrincada estrutura das paredes celulares, especialmente de plantas ainda não

estudadas. E, com base em tal entendimento, é possível se estudar um tratamento adequado para cada tipo de fonte de material lignocelulósico (WYMAN, 1994).

Vale ainda ressaltar que o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos não se restringe à produção de etanol, uma vez que se tem expectativa também de obtenção de compostos de valor agregado mais elevado. Sob essa abordagem, as FAEs são enzimas atrativas, pois o seu produto, o ácido ferúlico, apresenta uma vasta gama de aplicação. O ácido ferúlico pode ser empregado: como um conservante alimentar devido a sua ação antimicrobiana; em formulações farmacêuticas, pois apresenta propriedades terapêuticas; como precursor da vanilina, aromatizante muito utilizado (MATHEW; ABRAHAM, 2005).

Para que ocorra a degradação da biomassa vegetal pela atividade enzimática, é necessária a participação de diversos tipos de enzimas, face à complexidade estrutural que a mesma apresenta. Considerando que a celulose seja o alvo principal de um processo de aproveitamento da biomassa, já que a glicose dela obtida pode ser facilmente destinada à via de fermentação alcoólica, as enzimas que agem no sentido de tornar a celulose mais acessível podem ser denominadas "enzimas acessórias". Além da FAE já citada, a xilanase também possui um importante papel nesse contexto, uma vez que age na decomposição da hemicelulose, polissacarídeo que circunda a celulose e está associado à lignina (HU *et al.*, 2013).

É importante salientar que o termo "enzima acessória" também pode ser empregado para englobar as enzimas que agem sobre os substituintes ou cadeias laterais dos polissacarídeos, apresentando sinergismo com aquelas que atuam sobre a cadeia principal dessas estruturas (de VRIES; VISSER, 2001).

Tendo em vista o amplo espectro de enzimas que são naturalmente capazes de produzir, os fungos filamentosos são potenciais fontes de FAE e xilanase. Vale ressaltar que o gênero *Aspergillus* compreende os fungos mais utilizados para produção de enzimas comerciais. Outras características desses incluem a capacidade de utilização de substratos relativamente baratos, a secreção de proteínas em altos níveis, a classificação como organismos seguros (GRAS - *Generally Recognized as Safe*) e a qualidade de excelentes hospedeiros para expressão heteróloga (SHARMA *et al.*, 2009).

É desejável que os microrganismos sintetizem as enzimas de interesse em grandes quantidades, a fim de se baratear os custos de produção. No entanto, os próprios microrganismos possuem mecanismos regulatórios que limitam a síntese proteica. Para atender às necessidades da escala industrial, pode-se valer de manipulações genéticas. Entretanto, alguns entraves podem estar atrelados ao uso de organismos geneticamente

modificados, como, por exemplo, a dificuldade na sua contenção. Um alternativa consiste na exploração de novos microrganismos. Devido a sua rica biodiversidade, o bioma Amazônico é uma potencial fonte de recursos genéticos para se atender às necessidades levantadas (DELABONA *et al.*, 2012).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A parede celular vegetal

A parede celular das plantas é constituída, em geral, de 40% de celulose, 40% de hemicelulose e pectina e 20% de lignina (DOI; KOSUGI, 2004). A proporção entre tais polímeros varia de acordo com o tecido e o grau de desenvolvimento do mesmo. Estes componentes estão arrançados de uma maneira tal na parede celular, que, não apenas a tornam essencial à sustentação da planta, mas também proporcionam que essa estrutura celular seja uma barreira física muito resistente e, por conseguinte, a forma mais eficiente que o vegetal tem de se proteger contra infecções por microrganismos (WILLIAMSON; KROON; FAULDS, 1998).

Analisando-se essa proteção do ponto de vista físico, pode-se mencionar o fato de os poros das paredes serem tão pequenos a ponto de impedirem até mesmo a passagem de vírus, de modo que estes invadem a célula por meio de rupturas ocasionais. Do ponto de vista químico, essa proteção existe no sentido de dificultar o acesso das enzimas que hidrolisam os componentes da parede vegetal, uma vez que os microrganismos infectantes podem degradar, enzimaticamente, a parede vegetal para utilizar os açúcares que a compõem ou para ter acesso aos nutrientes do interior da célula (WILLIAMSON; KROON; FAULDS, 1998).

A estrutura química dos polissacarídeos que compõem a parede celular das plantas é reforçada pela anexação de cadeias laterais, que podem se apresentar em substituições simples ou em ligações cruzadas. As cadeias laterais não somente alteram as propriedades físicas, tais como solubilidade e cristalinidade do polissacarídeo, como também limitam o acesso das enzimas à cadeia principal do polímero, reforçando, portanto, a resistência e a integridade física das paredes celulares (MITCHELL *et al.*, 1990).

A parede celular vegetal desempenha também outras funções para a planta. Além do papel estrutural, seus componentes podem servir de reserva de energia. Além disso, quando existe ataque microbiano, os fragmentos de pectina gerados, por exemplo, são reconhecidos por receptores específicos na membrana e há o desencadeamento de uma série de reações relacionadas com as vias de defesa por parte da planta (BURTON; GIDLEY; FINCHER, 2010).

## 2.2 Componentes da parede vegetal

Dentre os componentes da parede vegetal, o principal constituinte e mais ubíquo é a celulose. Esta consiste em um homopolissacarídeo linear com resíduos de glicose unidos através de ligação do tipo  $\beta$ -1,4, sendo cada resíduo rotacionado em  $180^\circ$  em relação ao seu vizinho. Como a configuração espacial das ligações é alternada, diz-se que a unidade de repetição da celulose é a celobiose (dímero). As cadeias de celuloses são muito extensas, com cerca de 10 a 15 mil unidades e são agrupadas por meio de ligações de hidrogênio entre elas, o que resulta em arranjos cristalinos denominados microfibrilas (NELSON; COX, 2006). E são essas estruturas que proporcionam a alta resistência à tração, característica da parede celular (HELDT, 2005).

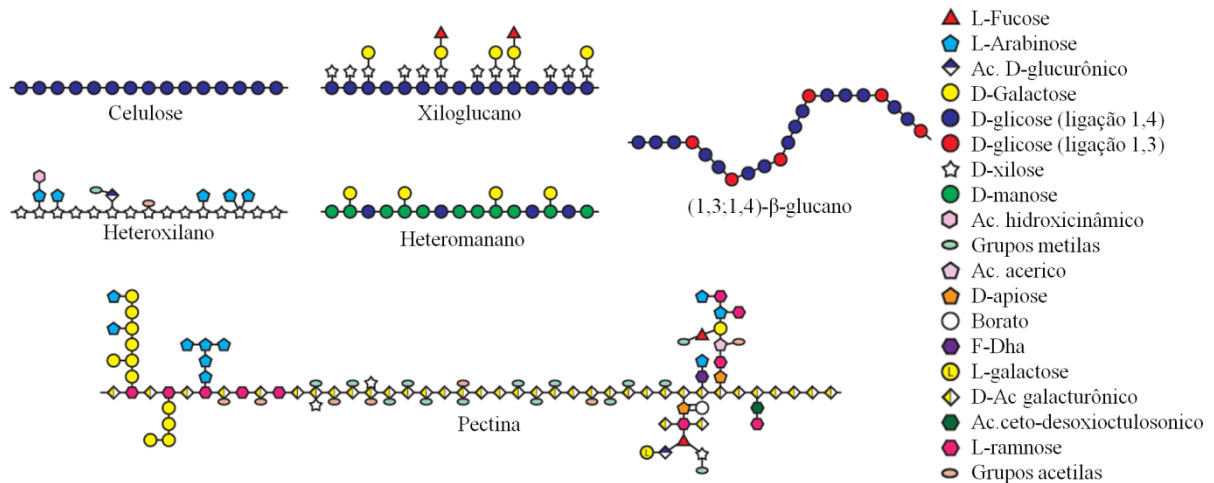
A hemicelulose é também um importante polissacarídeo da parede celular. Sua estrutura básica pode ser representada por uma cadeia de  $\beta$ -1,4-xilano, uma estrutura linear formada por resíduos de xilose. Essa cadeia pode apresentar algumas ramificações, por exemplo, com resíduos de arabinose, formando o arabinoxilano (AX), e ainda com ácido glucurônico, no caso do glucuronoarabinoxilano (GAX). Outros resíduos de açúcar também podem formar uma variedade de estruturas, com diferentes padrões e graus de ramificação. Em plantas da família *Poaceae*, que inclui cereais e gramíneas, há um elevado teor de heteroxilano, muito maior que de polissacarídeos pécticos (BURTON; GIDLEY; FINCHER, 2010).

A pectina é outro polissacarídeo não-celulósico, sendo mais abundante principalmente em paredes primárias e em plantas dicotiledôneas. Os polissacarídeos pécticos compreendem polímeros que contêm, em geral, ácido galacturônico (em ligação  $\alpha$ -1,4) e ramnose. É altamente ramificada, com uma grande diversidade de resíduos em suas cadeias laterais, entre os quais se podem destacar a arabinose e a galactose (WALDRON; FAULDS, 2007). Alguns grupos carboxílicos são metilados e outros podem estar ligados a íons de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , os quais promovem a interação entre cadeias adjacentes. A pectina forma um gel e sua presença confere elasticidade à parede (HELDT, 2005). A composição dos diferentes polissacarídeos que compõem a parede vegetal pode ser vista na **Figura 1**.

A lignina, por sua vez, consiste em uma macromolécula de compostos fenólicos, formada em geral pelos alcoóis cumarílico, coniferílico e sinapílico. Está presente em paredes secundárias, sendo responsável por aumentar a rigidez e a hidrofobicidade da estrutura (HELDT, 2005).



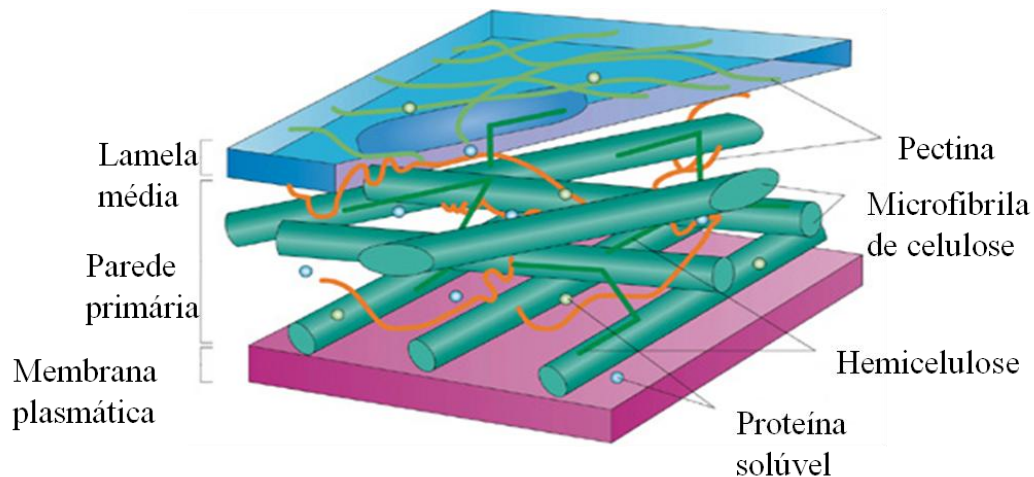
Algumas proteínas também compõem a parede celular, podendo desempenhar papel estrutural, interligando os componentes, ou atuando no controle do crescimento da parede (HELDT, 2005).



**Figura 1** – Heterogeneidade nas estruturas dos polissacarídeos de parede vegetal.

Fonte: adaptado de Burton, Gidley e Fincher (2010).

A formação da celulose acontece na membrana plasmática, através da enzima celulose sintase. Diversas enzimas circunvizinhas deste tipo polimerizam moléculas de glicose, formando as extensas cadeias. Como várias cadeias crescem juntas, elas se agrupam, formando os arranjos cristalinos, caracterizados por serem amorfos. Entretanto, no desenvolvimento da parede, existe também a participação da proteína expansina, a qual quebra ligações de hidrogênio entre as microfibrilas, permitindo que sejam feitas interações com outros polissacarídeos, os quais, por sua vez, são originados no complexo de Golgi. Outras proteínas participam do entrelaçamento dos diferentes heteropolímeros, formando uma matriz que envolve as microfibrilas. Dessa forma, a parede consiste em uma estrutura muito complexa (**Figura 2**) e recalcitrante (HELDT, 2005).



**Figura 2** – Estrutura da parede celular vegetal primária.

Fonte: adaptado de Sticklen.(2008).

### 2.3 Enzimas envolvidas na degradação da parede vegetal

Os compostos da parede celular podem ser explorados para uma vasta gama de aplicações, desde a produção de combustíveis até bioativos com efeitos nutricionais. Entretanto, sua natureza complexa requer diferentes mecanismos para sua decomposição. Face à complexidade e recalcitrância da estrutura, os microrganismos apresentam diversos tipos de enzimas que atuam na degradação da mesma.

Entre as enzimas que atuam sobre a celulose, podem ser citadas as endo e exo-1,4- $\beta$ -glucanase e as  $\beta$ -glucosidases. Essas três agem sinergicamente, uma vez que a atividade de endo cliva aleatoriamente ligações internas da cadeia de celulose, gerando fragmentos com extremidades redutoras e não-redutoras. Estas extremidades são atacadas pelas enzimas de atividade exo, cujo produto é a celobiose. Este dissacarídeo é, por sua vez, convertido em glicose pela  $\beta$ -glucosidase. A conversão em glicose mitiga a inibição pelo produto que as enzimas anteriores podem sofrer (HORN *et al.*, 2012). Essas três enzimas supramencionadas são hidrolases e atuam sobre as ligações glicosídicas. Entretanto, outras proteínas também estão envolvidas na conversão da celulose, como por exemplo a swolenina, uma proteína sem atividade catalítica, com função análoga às expansinas.

Em relação à degradação da hemicelulose, os tipos de ligação presentes são mais diversificados, pois existe uma maior diversidade de resíduos de açúcares e outros substituintes. Assim, existem glicosil hidrolases, como endo- $\beta$ -xilanase,  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-

arabinofuranosidase e  $\alpha$ -glucuronidase; carboidrato esterases, a exemplo da acetil xilano esterase, glucoronil esterase e feruloil esterase; e carboidrato liases.

A endo- $\beta$ -xilanasase atua sobre as ligações entre resíduos de xilose da cadeia principal de xilano. A  $\beta$ -xilosidase libera xilose a partir da xilobiose e de outros xilooligossacarídeos. A  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e  $\alpha$ -glucuronidase atuam sobre resíduos de arabinose e ácido glucurônico, respectivamente. As carboidrato esterases citadas liberam grupos esterificados ao longo da cadeia, como os grupos acetilas, pela acetil xilano esterase; glucoronilas, pela glucoronil esterase; e ferulatos (e outros derivados de ácido hidroxicinâmico), que são liberados pelas feruloil esterases. As enzimas carboidrato liases também clivam ligações glicosídicas, porém não empregam o mecanismo de hidrólise (SWEENEY; XU, 2012). Existe sinergismo entre as diferentes hemicelulases, mas também entre estas e as celulases, uma vez que a degradação da hemicelulose expõe as microfibrilas, facilitando o acesso a seu substrato.

Devido a sua natureza heterogênea, a pectina também necessita de diversos grupos de enzimas para sua degradação. Dessa forma, podem ser destacadas as poligalacturonases, pectina liases e pectina metil esterase. Por conta das ramificações laterais de arabinose e galactose, também se incluem no grupo a arabinofuranosidase e galactosidase (SWEENEY; XU, 2012).

A lignina pode ser decomposta pelas enzimas oxidorreduções, como a lignina peroxidase, manganês peroxidase, lacase, entre outras. A remoção da lignina aumenta a acessibilidade dos polissacarídeos às enzimas que os degradam e diminui a inativação das mesmas, causada pela adsorção à lignina. Em contrapartida, as oxidorreduções podem gerar espécies reativas, que também podem atacar as próprias (hemi)celulases. Assim, os benefícios desses catalisadores na conversão da biomassa precisam ser melhor estudados (SWEENEY; XU, 2012).

## 2.4 Xilanasase e suas aplicações

Os polissacarídeos baseados em xilano, que compõem a hemicelulose, estão entre os mais abundantes na natureza, atrás apenas da celulose. Os xilanos são encontrados em abundância em madeiras, cereais e gramíneas e apresentam uma grande variedade estrutural dependendo da fonte botânica. Eles constituem entre 25% e 35% da massa seca de tecidos de madeiras e de tecidos lignificados de monocotiledôneas, podendo representar até

50% de alguns tecidos de cereais. As principais fontes de xilano incluem palhas, sorgo, cana-de-açúcar, resíduos do processamento de cereais e da celulose, no caso da indústria papelreira (WALDRON; FAULDS, 2007).

A estrutura básica consiste em uma cadeia de resíduos de xilose unidos por ligação glicosídica  $\beta$ -1,4. Diversos grupos substituintes podem estar anexados na cadeia, dando origem aos derivados do xilano. A cadeia principal do xilano é alvo das enzimas xilanases, as quais liberam xilooligossacarídeos, que, por sua vez, são convertidos em xilose pela enzima  $\beta$ -xilosidase. A xilanase tem recebido uma grande atenção, devido ao seu potencial biotecnológico em diversos processos (VENEGAS *et al.*, 2013).

A degradação eficiente da hemicelulose tem grande impacto na sustentabilidade de uma biorrefinaria. A remoção do xilano expõe as microfibrilas de celulose, aumentando a acessibilidade das mesmas, o que resulta em maiores rendimentos de glicose. A glicose liberada pode ser então a base para diversos processos, como para a obtenção de etanol a partir da fermentação (JORDAN *et al.*, 2012). Além disso, os próprios constituintes da hemicelulose podem ser utilizados para a obtenção de compostos com valor agregado, como o adoçante xilitol (GAWANDE; KAMAT, 1999).

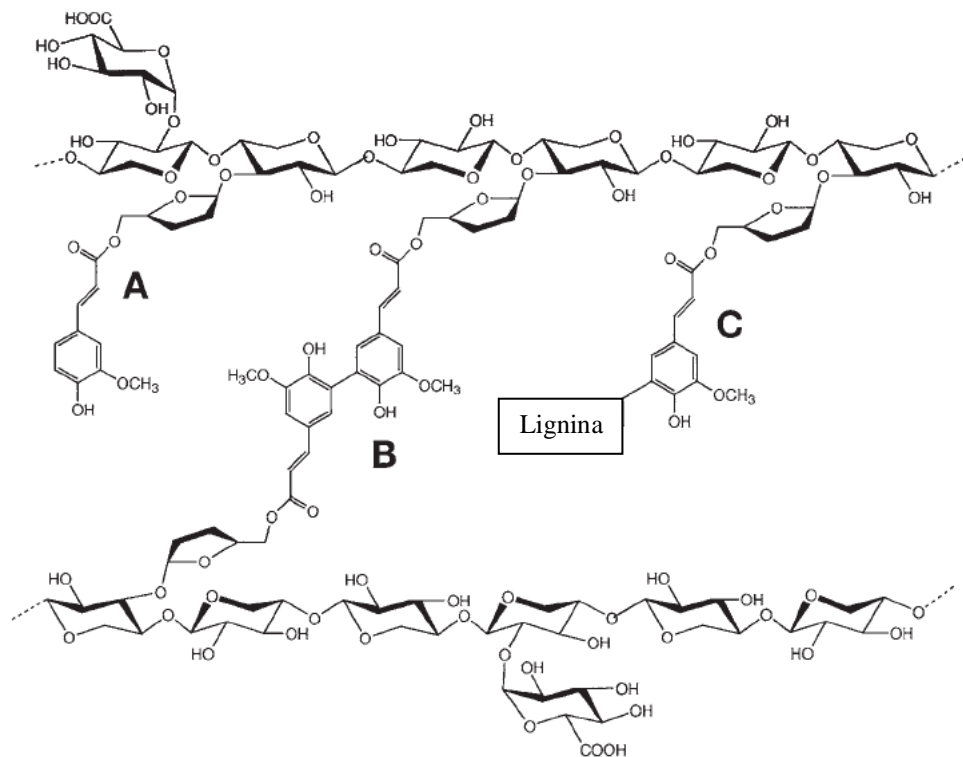
As xilanases podem ainda ser utilizadas em ração animal, aumentando a digestibilidade, o que proporciona ganhos de massa corporal (BAKRI; Al-JAZAIRI; Al-KAYAT, 2008). Essas enzimas podem ser aplicadas na clarificação de sucos, na indústria de alimentos. No processo de panificação, a xilanase transforma a hemicelulose insolúvel em sua forma solúvel, a qual retém água na massa, diminuindo a firmeza e aumentando o volume da mesma. Essas alterações nas propriedades da massa também proporcionam melhores condições de operação do maquinário (BUTT *et al.*, 2008).

Outra importante aplicação é na indústria de papel e celulose. No processo de branqueamento, são utilizados compostos químicos clorados que resultam em danos ambientais. O emprego de xilanase diminui o grau de polimerização da hemicelulose e facilita a remoção da lignina (GUIMARAES *et al.*, 2013).

A produção de xilanases tem sido relatada tanto em bactérias quanto em fungos. Entretanto, os fungos filamentosos tem recebido grande atenção, pois eles liberam essas enzimas em altas concentrações no meio de cultivo, comparado com bactérias e leveduras, por exemplo. E, entre os fungos filamentosos, os mais explorados têm sido os do gênero *Aspergillus* (GUIMARAES *et al.*, 2013).

## 2.5 Papel das feruloil esterases

Como explicitado anteriormente, os polissacarídeos não-celulósicos apresentam algumas ramificações, cujos resíduos podem estar "livres" ou promovendo inter cruzamentos. Entre as ligações cruzadas presentes nas paredes vegetais, um tipo que merece destaque é a união de moléculas de ácido ferúlico entre duas cadeias adjacentes. Esse tipo de ligação pode ocorrer entre cadeias de hemicelulose ou entre uma hemicelulose e uma cadeia de pectina ou lignina (**Figura 3**). A ligação cruzada também influencia nas propriedades da parede, agindo sobre a extensibilidade, plasticidade e digestibilidade, limitando o acesso das enzimas que degradam os polissacarídeos a seus substratos (MITCHELL *et al.*, 1990).



**Figura 3** – Feruloilação do glucoarabinoxilano, principal carboidrato de hemiceluloses da parede vegetal primária de alguns grupos de plantas.

Legenda: (A) grupo feruloil ligado ao resíduo arabinofuranosil; (B) dímero de ácido ferúlico em ligação cruzada com resíduos de arabinofuranosil; (C) grupo feruloil entre o resíduo arabinofuranosil e a lignina.

Fonte: Wong (2006).

Neste sentido, uma enzima de extrema relevância na degradação da parede celular vegetal é a feruloil esterase (FAE), visto que ela cliva justamente estas ligações que ajudam a tornar a estrutura mais intrincada. Ela assume um papel significativo para a planta,

pois permite modelar a parede celular no início da sua formação e é importante para os microrganismos que a sintetizam, pois lhes facultava acesso à parede vegetal e ao conteúdo por ela encerrado (KROON; WILLIAMSON, 1999).

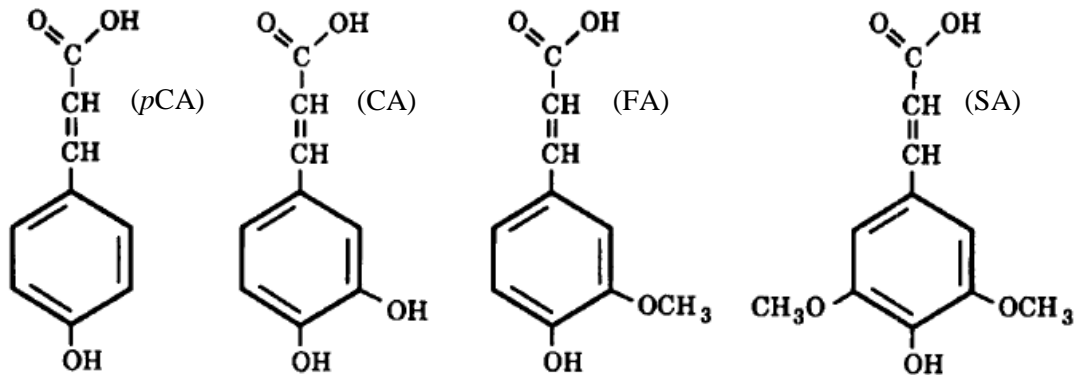
Estas enzimas apresentam um vasto potencial de aplicação, o qual deve ser entendido no que concerne à utilização direta da mesma, bem como à utilização do seu principal produto, o ácido ferúlico. Como mencionado, as FAEs exercem um papel fisiológico essencial na degradação da intrincada estrutura da parede celular vegetal por hidrolisar grupos ferulatos esterificados, envolvidos na ligação cruzada entre cadeias de hemiceluloses e entre hemicelulose e lignina ou pectina. Assim, essas enzimas são aplicáveis: na produção de bioetanol combustível, tornando a sacarificação da biomassa vegetal mais eficiente pelo seu efeito sinérgico a outras hidrolases; na indústria de papel e celulose, por auxiliar juntamente com xilanases na deslignificação e, assim, facilitar as etapas de branqueamento; no aproveitamento de resíduos lignocelulósicos provenientes de diferentes setores agroindustriais; na elucidação da estrutura da parede celular de diversas espécies de plantas; em rações animais, visando à remoção do ácido ferúlico e/ou seu dímero, que estão entre os principais inibidores de microrganismos do rúmen (FAZARY; JU, 2008) e que limitam a digestibilidade da dieta.

Em se tratando de ácido ferúlico, o mesmo pode ser utilizado: na composição de fármacos antivirais, antiinflamatórios e antitumorais; e como conservante alimentar natural, por inibir o crescimento microbiano. Além disso, ele é precursor do ácido vanílico, o qual por sua vez é precursor da vanilina, uma das moléculas aromáticas mais empregadas, seja na indústria cosmética, farmacêutica ou alimentícia (TOPAKAS; VAFIADI; CHRISTAKOPOULOS, 2007). Este composto fenólico pode ser ainda empregado como princípio ativo em cosméticos, explorando-se sua propriedade antioxidante e protetora contra luz UV.

## 2.6 Propriedades das feruloil esterases

A feruloil esterase (EC 3.1.1.73) é a enzima capaz de catalisar a hidrólise da ligação éster entre ácidos hidroxicinâmicos e resíduos de açúcar de um polissacarídeo da parede celular vegetal. Juntamente com as hidrolases de ácido cinâmico, formam uma subclasse das enzimas carboxilesterases (EC 3.1.1) (FAZARY; JU, 2008). Em relação aos sítios-alvo dessas enzimas, vale lembrar que o ácido ferúlico, assim como os ácidos *p*-

cumárico, caféico e sinápico, é um derivado do ácido cinâmico, diferenciando deste por grupos ligados a seu anel aromático (**Figura 4**). Como podem agir também sobre ésteres derivados destes outros ácidos, as feruloil esterases são genericamente denominadas cinamoil esterases ou ácido cinâmico hidrolases (KROON; WILLIAMSON, 1999).



**Figura 4** – Estruturas de ácidos hidroxicinâmicos.

Legenda: (pCA) ácido *p*-cumárico; (CA) ácido caféico; (FA) ácido ferúlico; (SA) ácido sinápico.  
Fonte: Faulds e Williamson (1994).

Um crescente interesse nestas enzimas tem levado a descoberta de muitas delas, principalmente em microrganismos. O grupo dessas enzimas é muito diverso. No entanto, com base em alinhamentos múltiplos de sequências peptídicas (ou domínios demonstrando sua atividade) e dados sobre a especificidade ao substrato das FAEs, as mesmas foram classificadas em quatro tipos: A, B, C e D. Além disso, o resultado de tal comparação sugeriu que há um relacionamento evolucionário entre FAEs, acetil-xilano esterases e determinadas lipases (VAFIADI *et al.*, 2006).

Vale ressaltar que é comum esterases agirem sobre uma grande variedade de substratos. O tipo A de FAE, por exemplo, mostra preferência por fenólicos contendo metoxi (-O-CH<sub>3</sub>) substituições, especialmente em posição meta, como ocorre em ácidos ferúlico e sinápico. Ao passo que as enzimas do tipo B mostram atividade complementar às do tipo A, demonstrando preferência por substratos contendo uma ou duas substituições de hidroxilas, como encontradas nos ácidos *p*-cumárico e caféico, os quais possuem substituintes menos hidrofóbicos no anel aromático que os outros dois citados anteriormente. Já as FAEs dos tipos C e D exibem uma grande especificidade sobre os ésteres sintéticos de ácidos hidroxicinâmicos (ácidos ferúlico, *p*-cumárico, caféico e sinápico) (**Figura 4**), diferenciando apenas na habilidade para liberar dímeros de ácido ferúlico (WONG, 2006).

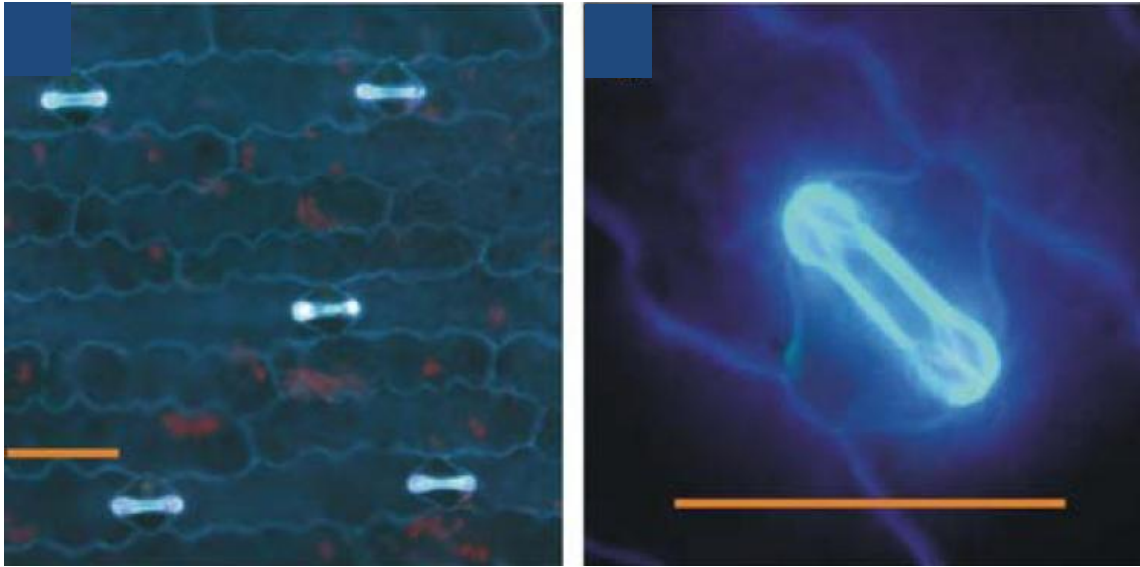
## 2.7 Produção microbiana das feruloil esterases

A parede celular das plantas consiste em uma estrutura complexa e intrincada, a qual é reforçada, dentre outros fatores, pela presença de ácido ferúlico, seja na forma mono, di ou trimérica. Desta forma, a produção de feruloil esterases é de grande interesse, visto que elas podem facilitar o processamento de materiais lignocelulósicos, bem como permitir a extração de compostos fenólicos de valor agregado. Elas compõem o grupo de enzimas acessórias do complexo enzimático que os microrganismos utilizam para degradar a parede celular vegetal. Embora sejam encontradas também nas próprias plantas e em animais, inclusive no homem.

As feruloil esterases microbianas são secretadas no meio de cultura. No entanto, para que estas enzimas sejam produzidas, é necessário o fornecimento de um substrato adequado. Em geral, monossacarídeos e dissacarídeos, tais como glicose, xilose, lactose, maltose e xilitol, não favorecem a produção de FAE. Isto possivelmente está relacionado com a repressão catabólica da glicose ou com outros mecanismos ainda não elucidados. O substrato não serve apenas como fonte de carbono e energia, mas também fornece os compostos indutores necessários para o microrganismo. Fontes complexas de carbono que contêm altos teores de ácido ferúlico esterificado têm sido eficientemente empregadas para a produção microbiana de FAE. Entre estas fontes, podem ser citadas farelo de trigo (com ou sem amido), farelo de milho, grão de cevada e polpa de beterraba-açucareira (FAZARY; JU, 2007).

O ácido ferúlico é comumente encontrado em polissacarídeos de parede celular vegetal, por exemplo, no xilano, ao qual ele está ligado na posição *O*-5 ou *O*-2 de resíduos de  $\alpha$ -L-arabinofuranose, e na pectina, à qual está ligado na posição *O*-2 de resíduos de  $\alpha$ -L-arabinofuranose ou *O*-6 de resíduos de  $\beta$ -D-galactopiranosose. Vale ressaltar que a polpa de beterraba-açucareira é composta de paredes celulares primárias ricas em pectina, enquanto que os farelos de cereais contêm paredes secundárias ricas em heteroxilanos. No farelo de trigo, o ácido ferúlico constitui de 0,5-0,7% de sua massa seca; na polpa de beterraba-açucareira, 0,6-0,8%; na parede celular do endosperma de arroz, 0,9%; e no farelo de milho, 3% (KOSEKI *et al.*, 2009; BENOIT *et al.*, 2006; TOPAKAS; VAFIADI; CHRISTAKOPOULOS, 2007). A presença de ácido ferúlico em ramificações da pectina é responsável pelo fenômeno da autofluorescência, que pode ser visualizado na **Figura 5**.





**Figura 5** – Autofluorescência devido ao ácido ferúlico esterificado na pectina da parede de células-guarda de milho.

Fonte: Jones *et al.* (2005).

Com o objetivo de recuperar ácido ferúlico para sua posterior bioconversão em vanilina, Shin e colaboradores (2006) selecionaram uma linhagem capaz de liberar este composto a partir de farelo e fibra de milho. Foi realizada uma fermentação submersa, e em tempos determinados, o sobrenadante da cultura foi avaliado quanto à atividade de diversas enzimas. A atividade da feruloil esterase foi avaliada ora sobre o ferulato de metila (MFA) ora sobre farelo e fibra de milho como substratos. Uma observação importante é que a atividade máxima de feruloil esterase, medida sobre o substrato sintético (MFA), não correspondeu à liberação total de ácido ferúlico pelo extrato enzimático a partir dos resíduos de milho, o que ressalta a importância da ação conjunta de outras enzimas. Neste trabalho, foi descoberto o fungo filamentoso *Neosatorya spinosa*, o qual produz um complexo enzimático capaz de liberar todo o ácido ferúlico do material analisado, além de grande parcela dos açúcares redutores (76-100%).

Mukherjee e colaboradores (2007) isolaram microrganismos do solo em meio seletivo para o gênero *Streptomyces*. As 52 cepas isoladas foram avaliadas quanto ao seu potencial de produção de feruloil esterase. Para tanto, os microrganismos foram cultivados em meio contendo farelo de trigo de-amilado como fonte de carbono. Após 96 h de fermentação, o extrato de enzima foi incubado com farelo de trigo de-amilado, sendo o produto detectado através de HPLC. A cepa mais promissora foi confirmada como sendo do gênero *Streptomyces*.

Trzcińska *et al.* (2005) também utilizaram o farelo de trigo (3%) para induzir a produção da enzima pelo fungo *Aspergillus niger*. Após 5 dias de cultivo, a enzima foi submetida a vários passos de purificação, sendo cada um monitorado por teste de atividade contra o *p*-nitrofenol acetato, por ser um teste rápido. A atividade da enzima purificada foi avaliada sobre substratos complexos (centeio, malte, farelo de trigo e xilano de aveia), sendo confirmado o efeito sinérgico da FAE com outras hidrolases na liberação de açúcares redutores.

O fungo *Penicillium brasilianum* foi também avaliado quanto à produção de enzimas degradadoras de arabinoxilano. Neste trabalho, testaram-se, como fonte de carbono (2%), grão de cevada, polpa de beterraba-açucareira, xilano de madeira de bétula, xilano de aveia, vagem de ervilha; e, como fonte de nitrogênio (1%), peptona, extrato de levedura, sulfato de amônia, uréia, licor de maceração de milho e grão de cevada. Quando cultivado em polpa de beterraba-açucareira, verificou-se a atividade máxima de feruloil esterase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, ao passo que a atividade de xilanase foi maior ao ser cultivado em xilano de aveia. A fonte de nitrogênio preferida foi o extrato de levedura. Além disso, a adição de ácido ferúlico livre estimulou a produção das três enzimas mencionadas, de modo que ele pode estar envolvido no mecanismo de regulação do fungo para produção e secreção das mesmas. Ao realizar um tratamento para eliminar a feruloil esterase, a liberação de pentoses foi reduzida, reforçando o papel sinérgico desta enzima na hidrólise (PANAGIOTOU; OLAVARRIA; OLSSON, 2007).

Algumas linhagens conhecidas por utilizar xilano de fibra de milho, um substrato altamente complexo e ramificado contendo ácido ferúlico, foram objeto de estudo para a detecção da produção de feruloil esterase (SHIN; CHEN, 2006). Os fungos foram cultivados em farelo de milho e o sobrenadante do cultivo foi avaliado quanto à atividade da enzima de interesse. Uma linhagem de *Fusarium proliferatum* mostrou atividade significativamente maior sobre o ferulato de metila que a cepa de *A. niger* empregada como controle. Além disso, a primeira foi capaz de liberar ácido ferúlico a partir do farelo de milho, enquanto que o controle não. Diferente de um trabalho já mencionado (PANAGIOTOU; OLAVARRIA; OLSSON, 2007), fontes de nitrogênio orgânicas (peptona e extrato de levedura) impactaram negativamente na produção da enzima, sendo empregado, portanto, o tartarato de amônio. Durante os estudos de otimização, o meio mineral descrito por Christakopoulos (1996), desenvolvido para o cultivo de *F. oxysporum*, proporcionou uma produção significativamente maior da enzima que o meio mineral comumente utilizado para *A. niger* (SHIN; CHEN, 2006).

Muitos trabalhos focaram na produção de FAE por fungos. No entanto, também se tem relatado a produção destas enzimas por bactérias – como é o caso do trabalho citado anteriormente envolvendo *Streptomyces*. Sabe-se que ácidos fenólicos antioxidantes podem ser liberados a partir da fibra da dieta pela ação da microflora intestinal, a qual é composta, dentre outras, por cepas de *Lactobacillus*. Tendo isto em vista, Szwajgier e Jakubczyk (2011) examinaram a habilidade de quatro cepas de *Lactobacillus* em produzir FAE extracelular, quando cultivadas na presença de fontes de carbono naturais e sintéticas. Dentre os diversos substratos testados (farelo de trigo/centeio, pectina de maçã/milho, arabinogalactano de madeira de lariço, grão de cevada, entre outros), a maior produção da enzima foi verificada quando o ferulato de metila foi fornecido como única fonte de carbono. Possivelmente, isto ocorreu porque o microrganismo foi forçado a produzi-la, sendo que na presença dos demais substratos, outras fontes de carbono foram exploradas. Entretanto, os outros substratos também deram suporte à produção da enzima.

Vale lembrar que as FAE são classificadas em quatro tipos. Essa classificação é baseada na especificidade a substratos modelos – ferulato de metila (MFA), *p*-cumarato de metila (MpCA), cafeato de metila (MCA) e sinapato de metila (MSA) – e na sequência primária da proteína. O tipo A não é ativo sobre MCA, enquanto o tipo B não é ativo sobre MSA. Os tipos C e D são ativos sobre os quatros ésteres. No entanto, apenas os tipos A e D são capazes de liberar ácido diferúlico (5-5'). Em relação à identidade de sequência, os tipos A, B, C e D estão associados, respectivamente, com as famílias da lipase, acetil xilano esterase (família 1 das carboxil esterases), tananase/clorogenato esterase e xilanase. Considerando os microrganismos citados pelos autores que propuseram esta classificação, os tipos A e D são induzidos preferencialmente por farelo de trigo, o B por polpa de beterraba-açucareira, e o C por um destes dois substratos, dependendo da espécie (CREPIN; FAULDS; CONNERTON, 2004). É importante salientar que muitos trabalhos reportam que o tipo A é induzido por materiais derivados de cereais (farelo de milho/trigo e xilano de aveia, por exemplo).

Benoit *et al.* (2006) compararam dois tipos de FAE de *A. niger* purificadas, testando sua habilidade em liberar ácidos fenólicos, tais como ácido caféico, *p*-cumárico e ácido ferúlico, a partir de polpa de café, bagaço de maçã e palha de trigo. A atividade de hidrólise sobre estes substratos foi comparada com o farelo de milho e a polpa de beterraba-açucareira. O tipo A praticamente não liberou ácidos fenólicos da polpa de café e do bagaço de maçã. Enquanto que o tipo C foi muito ativo sobre estes substratos. Além disso, o tipo A liberou mais ácido ferúlico e *p*-cumárico que o C somente no farelo de milho. Os resultados

indicaram que o tipo C possui uma especificidade mais ampla aos substratos. Nesse trabalho, os autores salientaram a importância do conhecimento da especificidade das feruloil esterases, o que pode ajudar a preparar coquetéis enzimáticos mais adequados para o tratamento de um determinado tipo de biomassa.

### 3 OBJETIVOS

Com vista ao amplo espectro de aplicação das enzimas feruloil esterase e xilanase, o presente trabalho teve por objetivo geral realizar a seleção de fungos filamentosos da região amazônica capazes de produzir feruloil esterases e xilanases e avaliar a eficiência dessas enzimas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

Para atingir esse objetivo, as seguintes etapas foram traçadas:

- Selecionar fungos isolados do solo da região Amazônica quanto à capacidade de produção de feruloil esterase, através de teste em placas contendo ferulato de etila;
- Estabelecer metodologia para análise de atividade de FAE;
- Selecionar os isolados quanto à produção de xilanase e feruloil esterase por meio de cultivo por fermentação submersa em shaker;
- Avaliar o efeito da fonte de carbono sobre a produção de xilanase e FAE, por meio de cultivo em shaker;
- Selecionar três isolados com os melhores resultados de produtividade de xilanase e FAE e cultivá-los em biorreator convencional do tipo tanque agitado, com controle de pH, temperatura, agitação, aeração e oxigênio dissolvido;
- Avaliar o efeito da concentração da fonte de carbono sobre a produção das enzimas de interesse, mediante o cultivo em reator de um isolado selecionado;
- Caracterizar o extrato enzimático obtido durante o cultivo em biorreator, quanto aos níveis de atividade de FPase, xilanase, xiloglucanase, pectinase, celobiohidrolase,  $\beta$ -glucosidase e FAE;
- Avaliar a aplicação do extrato enzimático obtido durante o cultivo em biorreator na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento hidrotérmico;
- Identificar a espécie de três isolados da Amazônia por métodos moleculares.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismos

Neste trabalho, foram utilizados fungos filamentosos isolados da região amazônica (DELABONA *et al.*, 2012) e o fungo *Aspergillus niger* F12 (AnF12), cujas culturas estoques foram mantidas em meio batata-dextrose-ágar (BDA) a 4 °C. Para garantir que fosse utilizada a mesma geração entre os ensaios, uma suspensão de esporos foi preparada com 20% de glicerol e 0,1% de NaCl, a qual foi armazenada em alíquotas a -50 °C. Antes de cada ensaio, os fungos foram reativados em meio BDA, sendo incubados a 29 °C até completa esporulação.

Os fungos utilizados neste trabalho foram os seguintes: AnF12, P21C3, P24C1, P27C3, P28P11, P34P9, P41C1, P45C3, P6B2, P75P1 e P77C5, os quais fazem parte da coleção de fungos do Laboratório de Agroenergia da Embrapa Instrumentação (São Carlos - SP). A maioria desses isolados ainda não foi identificada.

### 4.2 Seleção dos isolados em placas contendo ferulato de etila

Inicialmente, foi realizado um ensaio em placas com ágar, de acordo com o trabalho de Mathew e Abraham (2005), o qual foi adaptado de um estudo visando a detecção de feruloil esterase produzida por *Bacillus* ssp. e lactobacilli (DONAGHY, KELLY e McKAY, 1998).

Neste ensaio foi empregado meio com a seguinte composição: 1,3 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,39 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,25 g/L de  $\text{MgSO}_4$ ; 0,07 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,03 g/L de  $\text{FeCl}_3$ ; 1 g/L de extrato de levedura; e 20 g/L de ágar. O pH foi ajustado para 6,0. Após o meio ser autoclavado, adicionou-se como única fonte de carbono o ferulato de etila (EFA) para uma concentração final de 0,1% (m/v), a partir de uma solução estoque a 10% (m/v) em dimetil formamida. Os microrganismos foram transferidos do meio BDA para o meio contendo EFA, com o auxílio de uma alça metálica, de modo a se ter um único ponto de inoculação. A incubação foi mantida a 29 °C durante seis dias. O experimento foi realizado em triplicata para cada isolado.

O indicativo da produção de feruloil esterase foi a formação de uma zona clara ao redor do ponto de inoculação. O diâmetro da zona do halo no ágar foi medido e comparado entre as cepas isoladas. Nesta etapa, também foi utilizado o fungo *Aspergillus niger* F12, como controle, uma vez que essa espécie é relatada na literatura como bom produtor de FAE.

#### 4.3 Seleção por cultivo em shaker

Os onze fungos foram também cultivados em meio líquido, utilizando-se farelo de trigo lavado como indutor para produção das enzimas de interesse. O cultivo submerso foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, a de inóculo, foram inoculados  $2,5 \times 10^6$  esporos por mililitro de solução em meio de Mandels modificado (MANDELS; WEBER, 1969), suplementado com 10 g/L de glicose e pH ajustado para 4,5. Esse meio foi composto por: 1,4 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 2,0 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,3973 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5 mg/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,6 mg/L de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 1,4 mg/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2,0 mg/L de  $\text{CoCl}_2$ ; 5 g/L de peptona bacteriológica; 2,0 g/L de extrato de levedura; 0,3 g/L de uréia; 0,1% de Tween 80. O inóculo foi incubado a 29 °C em shaker, empregando-se uma agitação de 200 rpm. Após um período de 48 horas, um novo meio líquido (Mandels modificado) foi inoculado com 10% de inóculo (v/v). Este novo meio teve o pH ajustado para 6,0 e foi suplementado com 1% (m/v) de farelo de trigo lavado, ao invés de glicose. O cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura. Ao longo dessa segunda etapa, de fermentação, acompanharam-se os níveis de atividade de feruloil esterase e xilanase, de acordo com a metodologia descrita nos itens 4.10.1 e 4.10.2.1, respectivamente. O cultivo foi realizado em duplicata.

#### 4.4 Efeito de fontes de carbono

Depois do ensaio de seleção entre as diferentes cepas, o fungo P21C3 foi submetido a um teste para avaliar o efeito da fonte de carbono sobre a produção de xilanase e feruloil esterase. As condições de ensaio foram basicamente as mesmas descritas para o ensaio de seleção por cultivo em shaker (item 4.3). As únicas diferenças estão descritas a seguir.

As fontes de carbono para cada ensaio (descritos em parênteses) foram: farelo de trigo lavado (1 - FLsT e 2 - FLcT); farelo de trigo in natura (3 - FI); farelo de soja (4 - FS); 10% de licor (5 - L10); 20% de licor (6 - L20); 40% de licor (7 - L40); 50% de licor (8 - L50); bagaço de cana-de-açúcar hidrotérmico (9 - BH); bagaço de cana-de-açúcar explodido (10 - BEX). As fontes de carbono sólidas (farelos e bagaços) foram empregadas com uma concentração final de 10 g/L. O licor foi adicionado na proporção já descrita, em volume. Vale ressaltar que o licor consiste em um subproduto do pré-tratamento do bagaço de cana e contém a fração do material solubilizada em água, após o tratamento hidrotérmico. Além disso, nos ensaios de 2 (FLcT) a 10 (BEX), foi empregado o tampão ftalato de potássio a 50 mM, para tentar mitigar o efeito da variação do pH sobre a produção das enzimas de interesse. O pH inicial foi ajustado para 5,5, para não se extrapolar a faixa de tamponamento do ftalato.

#### 4.5 Cultivo em reator convencional de tanque agitado

##### 4.5.1 Comparação entre três linhagens de *Aspergillus oryzae*

Após a seleção da fonte de carbono, três linhagens de *Aspergillus oryzae* (P21C3, P27C3 e P6B2) foram cultivadas em reator convencional de tanque agitado. O preparo do inóculo e do meio de cultivo foi realizado da mesma forma que o ensaio de seleção por cultivo em shaker (item 4.3).

Nesse cultivo, foi utilizado um fermentador BioFlo 115 (New Brunswick), equipado com controle automático de temperatura, pH, agitação e aeração. O reator foi inoculado com 10% (v/v) de inóculo a partir de uma pré-cultura. O volume de trabalho foi de 1,0 L, o pH foi fixado em 6,0 e a temperatura foi mantida em 29 °C. A taxa de aeração foi ajustada de modo que o nível de oxigênio dissolvido ficasse no mínimo em 30% de saturação de ar. O pH foi controlado usando solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,4 M ou solução de NH<sub>4</sub>OH em água (1:3). A formação de espuma foi controlada com a adição de agente antiespumante polipropileno glicol. As amostras foram retiradas do reator, em tempos periódicos, centrifugadas a 3.800 x g por 15 minutos, a 4 °C. Posteriormente, foram realizadas as análises de atividade de xilanase (item 4.10.2.2) e feruloil esterase (item 4.10.1.2).



#### 4.5.2 Efeito da concentração da fonte de carbono

Ainda em reator, foram realizados cultivos com o fungo P21C3 para avaliar o efeito da concentração da fonte de carbono sobre a produção de enzimas de interesse. As condições foram as mesmas das descritas no item anterior (3.5.1). Entretanto, as concentrações de farelo de trigo lavado variaram entre 5 g/L, 10 g/L e 20 g/L. Ao longo do cultivo, foram mensurados os níveis de atividade de xilanase (item 4.10.2.2) e feruloil esterase (item 4.10.1.2).

#### 4.6 Painel de atividade enzimática

Entre as bateladas de cultivo realizadas em reator (item 4.5.2), foi gerado o extrato denominado "R05B", o qual foi obtido após 24 horas de cultivo da linhagem P21C3, com 10 g/L de farelo de trigo. Foi realizada a caracterização desse extrato R05B quanto aos níveis de atividade de algumas enzimas, para a construção de um "painel de atividade". As atividades enzimáticas avaliadas foram: FPase (celulase), xilanase, pectinase, xiloglucanase, celobiohidrolase,  $\beta$ -glucosidase e FAE. Foi também determinado o teor de proteínas totais.

Além do extrato R05B, o painel de atividade foi construído para a enzima comercial *Celluclast 1.5L* (Novozymes).

#### 4.7 Curva de saturação

Objetivou-se também a construção de uma curva de saturação ou dose-resposta, com o intuito de se verificar até que ponto a adição do extrato enzimático R05B proporcionaria uma contribuição significativa para a hidrólise de bagaço de cana. Nesse ensaio, foi realizada a hidrólise do bagaço hidrotérmico, empregando-se uma quantidade fixa de enzima comercial e quantidades crescentes do extrato bruto. Assim, foram realizados os tratamentos contendo: 5% (m/v) de bagaço hidrotérmico; quantidade de *Celluclast 1.5L* correspondente a 10 FPU por grama de bagaço; 10% a 50% (v/v) de extrato bruto R05B; tampão citrato de sódio pH 4,8 a 50 mM; 0,02% de azida de sódio.

A reação teve um volume final de 1 mL. Foi utilizado um tubo tipo Eppendorf de 2 mL, sendo que a reação foi mantida a 50 °C por 24 horas, em um Termomixer

(Eppendorf), empregando-se 1000 rpm de agitação. O ensaio foi realizado em triplicata e a temperatura empregada corresponde à temperatura ótima de atividade das celulasas em geral.

Os açúcares redutores foram mensurados com emprego do método de ácido dinitrosalicílico (DNS) (item 4.10.4), além disso, foi realizada a quantificação de glicose, xilose, arabinose, celobiose e ácido acético por método empregando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, na sigla em inglês) (item 4.10.5).

#### **4.8 Hidrólise em frascos agitados**

Foi realizado um ensaio de hidrólise em frascos agitados. As condições e as proporções foram as mesmas que do experimento anterior (item 4.7). No entanto, o volume final da reação foi de 50 mL. Foram realizados dois tipos de controle: um sem a adição de enzima (ctrl); e outro sem adição de enzima comercial e com 50% (v/v) de extrato R05B.

Os frascos (Erlenmeyers de 125 mL) contendo a mistura foram incubados em um shaker a 50 °C e 250 rpm de rotação. O ensaio foi realizado em duplicata. Foram retiradas alíquotas das reações, sendo cada amostra analisada por DNS (item 4.10.4) e HPLC (item 4.10.5).

#### **4.9 Substratos utilizados nos ensaios de cultivo e de hidrólise enzimática**

O farelo de trigo utilizado nos cultivos dos fungos foi submetido a um processo de lavagem para remoção do amido. Inicialmente, o substrato foi colocado em um recipiente e coberto com água, sendo misturado manualmente por cinco minutos. Em seguida, o farelo foi transferido para uma peneira e lavado em água corrente, sendo espremido contra a malha da peneira. Esse processo foi realizado por quatro vezes, sendo que, entre o segundo e o terceiro ciclos, o farelo foi mantido coberto com água e em repouso por 12 horas. Após o último ciclo, o farelo foi espalhado em bandejas de alumínio e seco em estufa com circulação de ar a 50 °C. Por fim, o material foi armazenado a -50 °C. Ao longo do trabalho, foram utilizados dois lotes de farelo de trigo lavado, sendo um deles utilizado no ensaio de seleção por cultivo em shaker (item 4.3) e o outro nos ensaios de efeito da fonte de carbono (item 4.4) e de cultivo em reator (item 4.5). Verificou-se que a umidade do farelo de trigo lavado foi de 9%.

O bagaço explodido (BEX) foi proveniente de um pré-tratamento por explosão a vapor. O bagaço de cana-de-açúcar que serviu de matéria-prima foi submetido a um processo, cujas condições foram descritas por Pereira *et al.* (2013). Em síntese, o substrato foi submetido a uma pressão elevada com vapor de água e despressurizado de forma súbita, em seguida a fração sólida foi lavada com água até a neutralidade e, por fim, seca a temperatura ambiente.

O bagaço hidrotérmico (BH) foi proveniente de um pré-tratamento com água líquida quente. De forma resumida, o bagaço de cana-de-açúcar foi misturado com água, com uma relação de sólido para líquido de 1:10. A mistura foi aquecida a 190 °C por 10 minutos, em um reator de alta pressão de 2 L (Parr - modelo 4848). Posteriormente, a fração sólida foi seca ao ar livre. Nesse trabalho, foram utilizados dois lotes diferentes de bagaço hidrotérmico, sendo um deles no ensaio de comparação entre fontes de carbono (item 4.4) e outro no ensaio de hidrólise enzimática (itens 4.7 e 4.8). No caso do bagaço utilizado para hidrólise, foi realizada a moagem em moinho Pulverisette 14 (Fritsch), acoplado com uma peneira com abertura de malha de 0,2 mm. A umidade do bagaço hidrotérmico utilizado na hidrólise foi de 8,0%. O licor utilizado consistiu na fração líquida após o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana, cujas condições foram as mesmas descritas anteriormente.

Os bagaços submetidos ao processo de explosão a vapor e ao tratamento hidrotérmico, assim como o licor, foram caracterizados quanto à composição química, de acordo com a metodologia descrita por Gouveia *et al.* (2009). Esses substratos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), cujo grupo também foi responsável pela caracterização.

#### 4.10 Métodos analíticos

##### 4.10.1 Análise de feruloil esterase

###### 4.10.1.1 Método empregando HPLC

A atividade de feruloil esterase foi realizada através da incubação do extrato bruto com o substrato ferulato de metila (methyl ferulate, MFA) e a análise foi executada com HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) ou em espectrofotômetro.

No caso do método empregando HPLC, 1 mL de substrato a 200  $\mu$ M (em tampão MOPS a 200 mM, pH 6,0) foi misturado com 1 mL de extrato bruto diluído em água. Após um período de 30 minutos de incubação em banho a 37 °C, a mistura foi transferida para um banho de água fervente durante 5 minutos, a fim de que a reação fosse paralisada. Posteriormente, a mistura foi resfriada em banho de gelo, centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi armazenado a -50 °C.

A amostra foi filtrada em um filtro de seringa de celulose regenerada ou Nylon de 0,22  $\mu$ m. Em seguida, 20  $\mu$ L de amostra foram aplicados em uma coluna C18 com um fluxo de 1 mL/min, com tempo de corrida de 20 minutos. A fase móvel foi composta pela solução A (tampão acetato de sódio a 50 mM, pH 4,0) e solução B (acetonitrila). A condição inicial da corrida foi de 100% de A e, ao longo da mesma, foi empregado um gradiente linear de modo a se obter 50% de A e 50% de B no final. Antes de cada aplicação, as condições iniciais da coluna foram reestabelecidas. O monitoramento foi realizado a 320 nm e a quantificação foi feita a partir de uma curva padrão de ácido ferúlico.

A coluna C18 empregada foi uma Microsorb MV da Varian (partícula de 5  $\mu$ m; poro de 100 Å; diâmetro interno de 4,6 mm e comprimento de 250 mm). Cromatógrafo (Varian) equipado com bombas modelo ProStar 210 e detector UV-Vis modelo ProStar 325.

O método empregando HPLC foi baseado no trabalho de Yue *et al.* (2009) e foi empregado somente para as amostras provenientes do ensaio de seleção por cultivo em shaker (item 4.3).

Uma unidade de atividade enzimática (UI) corresponde a 1  $\mu$ mol de ácido ferúlico liberado por minuto. Os resultados foram expressos em UI por volume de extrato enzimático bruto.

#### 4.10.1.2 Método empregando espectrofotômetro

A atividade de feruloil esterase foi também determinada por um método empregando espectrofotômetro, o qual foi baseado no trabalho de Ralet *et al.* (1994). Nesse ensaio, 1,25 mL de substrato MFA a 200  $\mu$ M (em tampão MOPS a 200 mM, pH 6,0) foram adicionados a uma cubeta de quartzo contendo uma barra magnética. A agitação foi acionada e então foram adicionados 1,25 mL de extrato bruto diluído em água. Logo em seguida, iniciou-se a leitura a 335 nm, a qual foi realizada de trinta em trinta. A temperatura foi

mantida a 37°C com auxílio de um *holder* termostatzado. A diferença entre a absorbância final e inicial foi utilizada para os cálculos de nível de atividade de feruloil esterase.

Para os extratos obtidos a partir do cultivo em shaker (item 4.3), o tempo de incubação foi de 30 minutos. Ao passo que um período de incubação de 10 minutos foi empregado para os extratos provenientes dos ensaios subsequentes, ou seja, efeito da fonte de carbono (item 4.4) e cultivo em reator (item 4.5).

Uma unidade de atividade enzimática (UI) corresponde a 1 µmol de ácido ferúlico liberado por minuto. Os resultados foram expressos em UI por volume de extrato enzimático bruto. Vale salientar que os níveis de atividade foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$UI = \frac{V}{\Delta\varepsilon \times l} \times \left( \frac{\Delta A}{t} \right)$$

sendo,  $V$  = volume da reação (L);  $\Delta\varepsilon$  = diferença entre os coeficientes de extinção molar do substrato MFA e do ácido ferúlico ( $M^{-1}.cm^{-1}$ );  $l$  = caminho óptico (cm);  $\Delta A$  = variação na absorbância;  $t$  = tempo de reação (min).

#### 4.10.2 Análise de xilanase

##### 4.10.2.1 *Ensaio em tubos*

A atividade de xilanase, para as amostras do ensaio de seleção em shaker (item 4.3), foi realizada por um método empregando tubos de ensaio (BAILEY; POUTANEN, 1989), com o substrato xilano de madeira de faia (beechwood).

A mistura reacional consistiu de 2 mL de solução de xilano (1% em tampão acetato de sódio a 100 mM, pH 5,0) e 1 mL de extrato enzimático diluído. A reação foi mantida a 50 °C por 30 minutos e paralisada com a adição do reagente DNS. Por fim, foram mensurados os açúcares redutores.

Uma unidade de atividade enzimática (UI) corresponde a 1 µmol de xilose liberada por minuto. Os resultados foram expressos em UI por volume (mL) de extrato enzimático bruto.

#### 4.10.2.2 *Ensaio em microplacas*

As amostras dos ensaios de efeito da fonte de carbono (item 4.4) e cultivo em reator (item 4.5) foram analisadas por um método empregando microplacas, o qual consiste apenas em uma adaptação do método anterior.

A mistura da reação foi composta por: 50  $\mu\text{L}$  de substrato (0,5% de xilano), 40  $\mu\text{L}$  de tampão (citrato de sódio a 50 mM; pH 4,8) e 10  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático diluído. Após 10 minutos de incubação a 50 °C, houve adição de 100  $\mu\text{L}$  de reagente DNS. Foram mensurados os açúcares redutores pelo método de DNS.

#### 4.10.3 Análise de FPase, pectinase, xiloglucanase, $\beta$ -glucosidase e celobiohidrolase

A atividade de celulase em papel filtro (FPase) foi determinada segundo método descrito por Ghose (1987), com algumas modificações para reduzir a escala do procedimento em dez vezes. O papel filtro utilizado foi o Whatman nº 1. A reação foi incubada por 60 minutos a 50 °C. O tampão empregado foi o citrato de sódio a 50 mM, pH 4,8. A reação foi paralisada com a adição do reagente DNS e foram avaliados os açúcares redutores, sendo a atividade expressa em unidade de FPase (FPU).

A atividade de pectinase foi medida sobre o substrato pectina de citrus. Foi realizada da mesma forma que o ensaio de xilanase em microplacas (item 4.10.2.2). Ao final da reação, foram mensurados os açúcares redutores.

A atividade de xiloglucanase foi mensurada sobre o substrato xiloglucano. Sendo a reação executada da mesma forma que a xilanase em microplacas (item 4.10.2.2). Ao final da reação, foram mensurados os açúcares redutores.

A atividade de  $\beta$ -glucosidase foi determinada sobre o substrato *p*-nitrofenol- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (pNPG), baseando-se no método descrito por Zhang, Hong e Ye (2009). No ensaio, foram misturados 80  $\mu\text{L}$  de pNPG a 1 mM (em tampão citrato de sódio a 50 mM, pH 4,8) e 20  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático diluído. A mistura foi incubada a 50 °C por 10 minutos. A reação foi parada com a adição de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 1,0 M. A leitura foi realizada a 400 nm e a curva padrão foi construída com *p*-nitrofenol.

A atividade de celobiohidrolase (CBH) foi determinada sobre *p*-nitrofenol- $\beta$ -D-celobiosídeo (pNPC). A reação foi composta por: 50  $\mu\text{L}$  de substrato a 5 mM, 40  $\mu\text{L}$  de tampão (citrato de sódio a 50 mM, pH 4,8) e 10  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático. A mistura foi

incubada a 50 °C por 10 minutos. A reação foi também paralisada com acréscimo de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A leitura foi realizada a 400 nm e a curva padrão foi construída com *p*-nitrofenol.

A quantificação do produto foi baseada em curva de glicose, para os ensaios com polissacarídeos como substrato, e em curva de *p*-nitrofenol, para os ensaios com substratos sintéticos.

Em todos os casos, 1 unidade internacional (UI) de atividade enzimática foi definida como a quantidade responsável pela liberação de 1 μmol de produto por minuto, nas condições empregadas. Os resultados foram expressos em UI por unidade de volume de extrato enzimático bruto.

#### 4.10.4 Determinação de açúcares redutores

A quantificação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), descrito por Miller (1959). A leitura foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro padrão ou leitor de microplacas. No caso da atividade de xilanase, a curva padrão foi construída com xilose, nos outros casos com glicose.

#### 4.10.5 Determinação de açúcares em HPLC

A determinação de açúcares foi realizada por método empregando HPLC, para as amostras dos ensaios da curva de saturação (item 4.7) e da hidrólise em frascos agitados (item 4.8). A análise foi realizada pelo Laboratório de Análise Instrumental do CTBE, segundo a metodologia descrita por Rocha e colaboradores (2012).

#### 4.10.6 Determinação de proteínas totais

As concentrações de proteína foram determinadas em microplacas, empregando-se o método de Bradford (1976). Para quantificação, foi utilizada a albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

#### 4.11 SDS-PAGE

Alguns extratos enzimáticos foram submetidos ao ensaio de Eletroforese em Gel SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE, na sigla em inglês). A metodologia seguiu as instruções descritas por Sambrook e Russel (2001). Os géis foram preparados com 5% de poliácridamida para o gel de empacotamento e 12% para o gel de separação. As amostras foram centrifugadas e 20 µL do sobrenadante foram misturados com 10 µL de tampão de amostra. A mistura foi aquecida a 99 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriada à temperatura ambiente. Um volume de 20 µL da mistura foi aplicado no gel. Não houve processo de concentração da amostra nem padronização pelo teor de proteína, ou seja, os extratos enzimáticos foram utilizados em sua forma bruta. O gel foi submetido a uma tensão de 120 V por até 1 hora e 30 minutos. Por fim, o gel foi corado com solução contendo Comassie Blue R250. O padrão de massa molecular utilizado foi o *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific). Quando necessário, a estimativa do tamanho das bandas do gel seguiu a metodologia descrita por Hames (1998).

#### 4.12 Identificação dos isolados P21C3, P27C3 e P6B2

##### 4.12.1 Identificação molecular

Os três isolados utilizados nos cultivos em reator (P21C3, P27C3 e P6B2) foram identificados por sequenciamento da região ITS (*internal transcribed spacer*) do DNA ribossomal. Inicialmente, seus esporos foram inoculados em um Erlenmeyer contendo meio de Mandels (conforme descrito no item 4.3), sendo o frasco mantido a 29 °C em estufa bacteriológica, sem agitação. Após seis dias, o micélio foi transferido para um almofariz e triturado em nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino, o qual foi armazenado a -80 °C até a próxima etapa.

Posteriormente, foi realizada a extração de DNA total empregando-se o método descrito por Specht *et al.* (1982). A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 0,8%, o qual foi submetido a uma d.d.p. (diferença de potencial) de 80 V. O DNA foi quantificado por meio de leitura a 260 nm em NanoDrop.



A região do ITS foi amplificada por meio da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, na sigla em inglês). Os reagentes empregados foram obtidos da Fermentas. Os iniciadores utilizados foram o ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e o ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE *et al.*, 1990). Para cada fungo, foi realizada uma reação de 50 µL em duplicata com a seguinte composição: tampão de reação 1X concentrado; MgCl<sub>2</sub> a 2 mM; mistura de deoxinucleotídeos (dNTP) a 0,2 mM; 0,2 µM de cada iniciador; 45 ng de DNA; e 0,5 µL da enzima Taq DNA Polimerase.

Os tubos de 0,2 mL contendo as reações foram incubados em termociclador (Eppendorf), sendo executados: um passo inicial de desnaturação a 95 °C por 2 minutos; trinta e cinco ciclos de desnaturação a 95 °C por 20 segundos, anelamento a 55 °C por 40 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos; e um passo final de extensão a 72 °C por 10 minutos.

O amplificado da reação de PCR foi verificado em gel de agarose 1%. A reação foi purificada através do kit para purificação de reações de PCR da GE Healthcare (*illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*). O fragmento de DNA de interesse foi eluído com 60 µL de água a 65 °C, a partir da coluna do kit. As amostras foram quantificadas em NanoDrop e foi realizado o sequenciamento, empregando-se os iniciadores ITS1 e ITS4. O resultado do sequenciamento foi comparado com o banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### 4.12.2 Detecção de aflatoxinas

Além da identificação molecular, foi realizado um teste para detecção de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. O limite de detecção foi de 2 µg/kg. A análise foi realizada pelo Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, vinculado ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), em Campinas-SP, sendo empregada a metodologia descrita por Filtenborg, Frisvad e Svendsen (1983).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção de isolados em placas contendo ferulato de etila

Foi realizado um ensaio com dez isolados de fungos amazônicos e uma linhagem controle (*Aspergillus niger* – AnF12), a fim de se verificar a capacidade de produção de feruloil esterase. Após seis dias de incubação em meio contendo o substrato ferulato de etila (EFA), foram medidos os diâmetros da colônia e do halo claro ao redor da mesma, bem como o índice enzimático (razão entre halo e colônia). Os resultados foram apresentados na **Tabela 1**. A formação do halo pode ser visualizada na **Figura 6**.

**Tabela 1.** Formação de halo claro e de crescimento entre os diferentes fungos em placas com EFA.

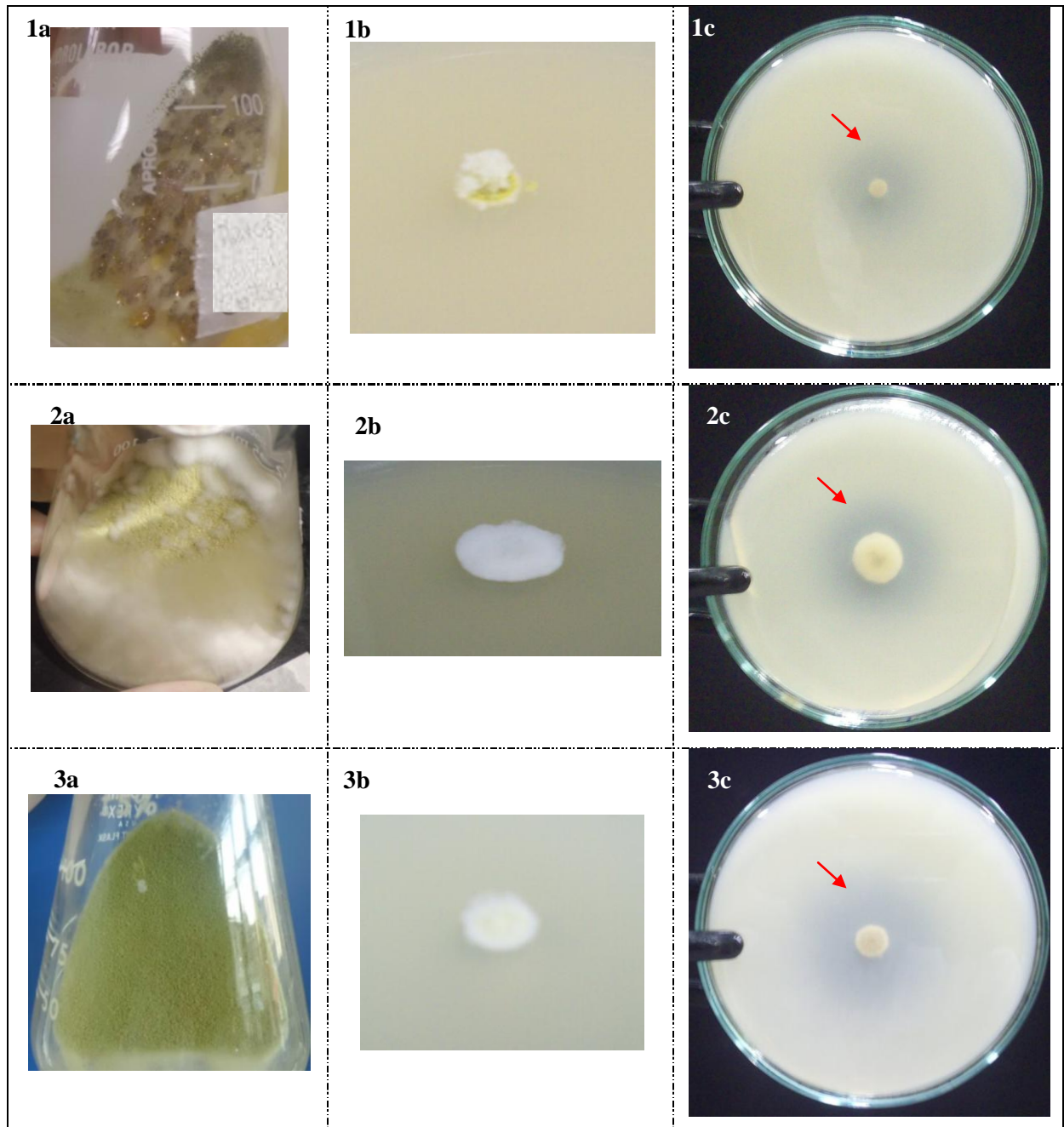
Fungo	Halo <sup>1</sup>	Colônia <sup>2</sup>	Índice Enzimático
AnF12	-	-	-
P21C3	++	++	3,10 ± 0,21
P24C1	-	-	-
P27C3	++	++	3,09 ± 0,86
P28P11	+++	+++	1,91 ± 0,02
P34P9	+++	+++	2,93 ± 0,18
P41C1	+++	++	3,83 ± 0,44
P45C3	+	+	3,33 ± 0,47
P6B2	+	+	2,75 ± 0,35
P75P1	-	-	-
P77C5	-	-	-

<sup>1</sup> (-) sem formação de halo; (+++) halo com diâmetro ≥ 25 mm;

<sup>2</sup> (-) sem colônia; (+++) colônia com diâmetro ≥ 10 mm.

Os isolados P28P11, P34P9 e P41C1 foram os que mais se destacaram, tanto em crescimento da colônia, quanto em formação de halo. Os isolados P21C3 e P27C3 apresentaram resultados semelhantes entre si. No entanto, os isolados P41C1 e P45C3 foram os que exibiram os maiores valores quanto ao parâmetro índice enzimático. A linhagem de *A. niger* AnF12, utilizada como controle, não se desenvolveu no meio, assim como os isolados P24C1, P75P1 e P77C5. Todavia, é bem estabelecido na literatura que o fungo *A. niger* é muito explorado quanto à produção de feruloil esterase (FAZARY; JU, 2007; TOPAKAS;

VAFIADI; CHRISTAKOPOULOS, 2007; WONG, 2006). Além disso, os resultados de seleção por cultivo em shaker (item 5.3) mostraram que a linhagem *A. niger* F12 foi a que proporcionou o maior nível de atividade de FAE. Considerando a existência de falsos negativos, o método de seleção em placas não se mostrou eficaz para inferir-se a capacidade de produção dessa enzima.

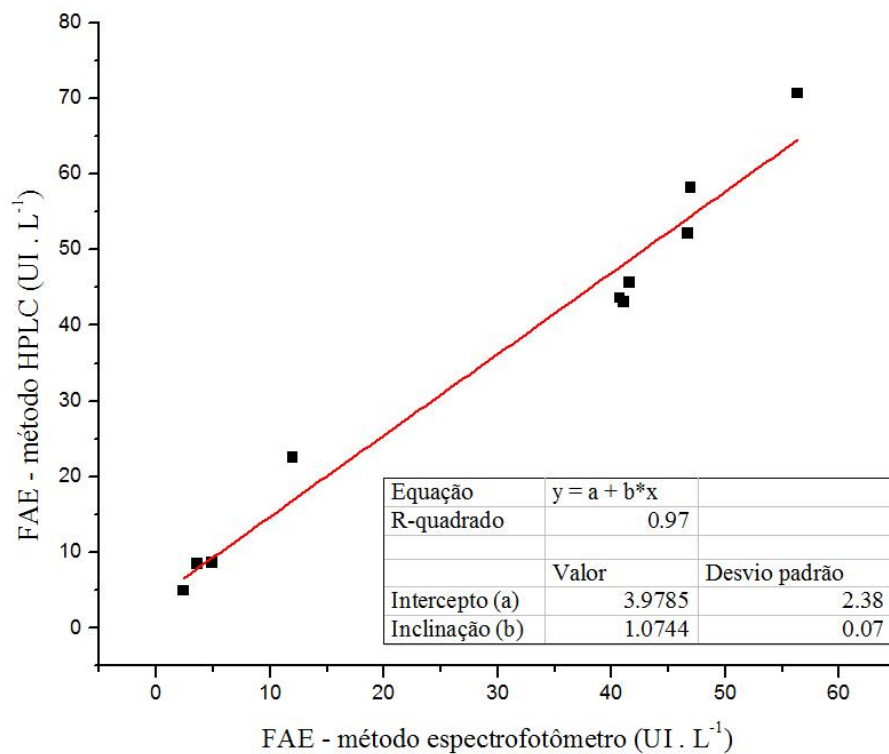


**Figura 6** – Colônias de alguns isolados submetidos ao teste com EFA.

Legenda: (1) P21C3; (2) P28P11; (3) P34P9. (a) crescimento em meio BDA; (b) colônia em meio com EFA; (c) halo formado pela degradação de EFA. Seta vermelha indicando halo claro ao redor da colônia. Nota-se presença de exsudatos em "1a".

## 5.2 Validação de metodologia para análise de FAE

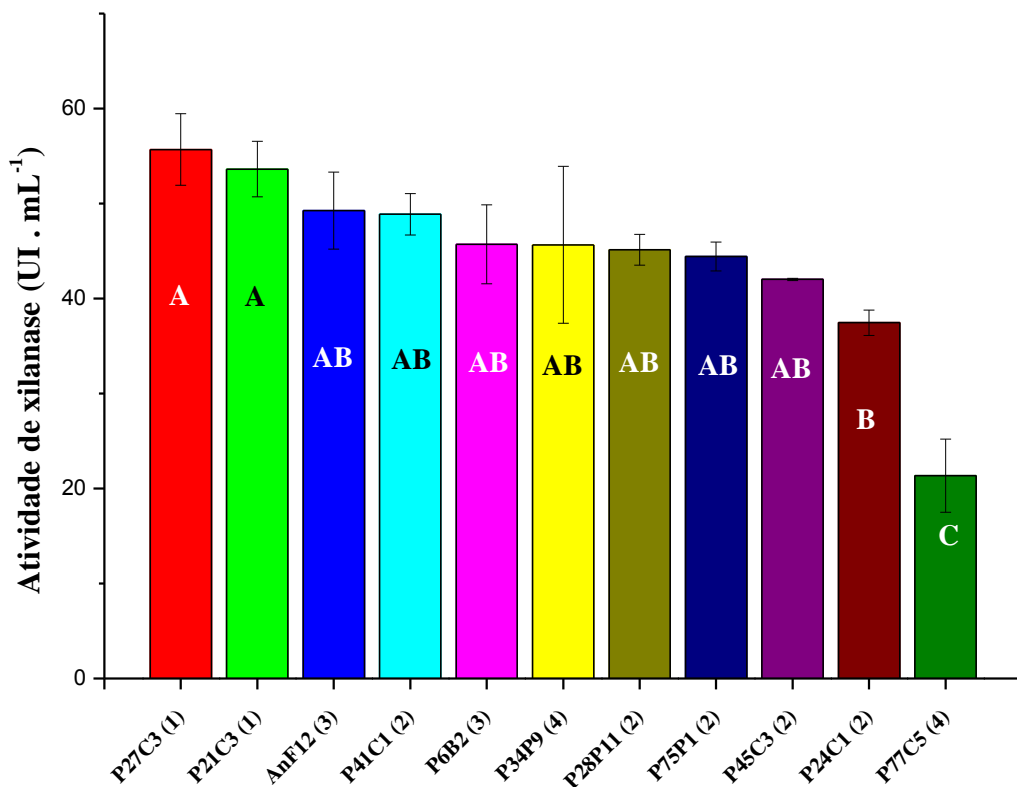
A partir dos dados de atividade de FAE mensurados em HPLC e espectrofotômetro, foi construída uma curva de correlação (**Figura 7**), cujo coeficiente de correlação ( $r^2$ ) foi de 0,97. A equação mostrada na figura foi usada para converter os dados obtidos por espectrofotômetro em dados estimados de HPLC. Vale ressaltar que a curva foi construída resguardando-se as mesmas condições de reação para todas as amostras.



**Figura 7** – Curva de correlação linear entre dados de atividade de FAE obtidos em espectrofotômetro e em HPLC.

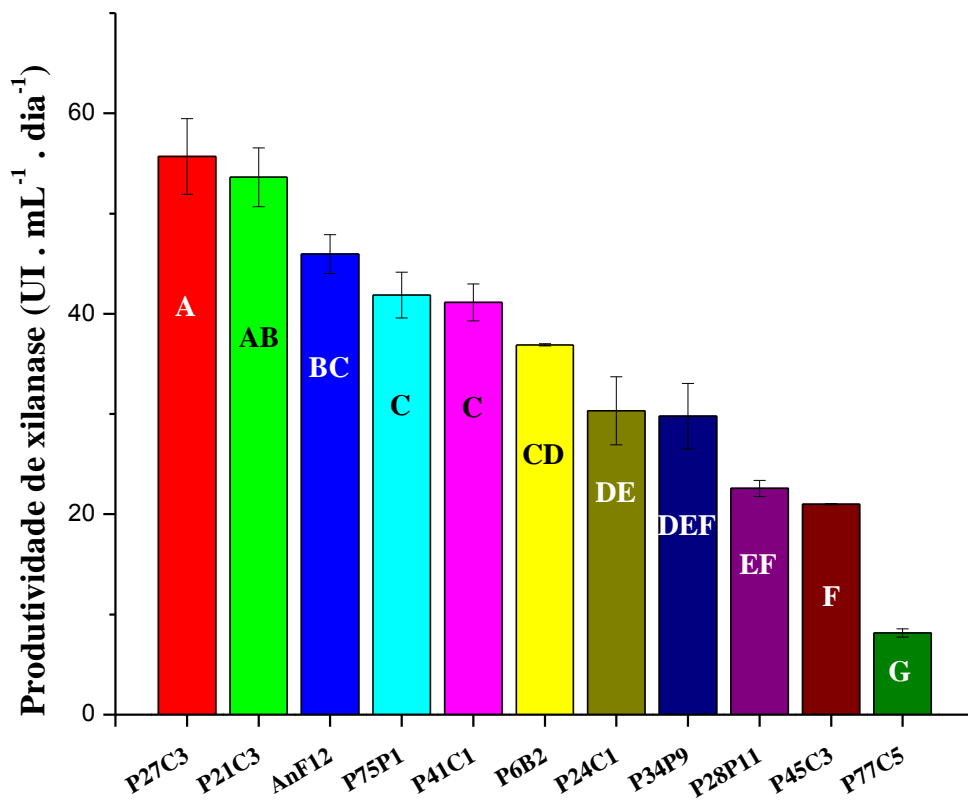
### 5.3 Seleção por cultivo em shaker

Durante o teste de seleção em placas com ferulato de etila (EFA) (item 5.1), verificou-se que não houve indicação de produção de FAE para a linhagem de *A. niger* AnF12, o que correspondeu a um resultado de falso negativo. Desta forma, os onze fungos foram submetidos a um novo ensaio de seleção, o qual se deu a partir do cultivo em meio líquido contendo farelo de trigo lavado como substrato. Foram realizadas análises de atividade de xilanase e feruloil esterase, ao longo de quatro dias de cultivo. Na **Figura 8**, estão apresentados os maiores níveis de xilanase observados, e na **Figura 9**, as maiores produtividades em relação a essa enzima.



**Figura 8** – Atividades máximas de xilanase apresentadas pelos diferentes fungos.

Os resultados correspondem à média entre os níveis observados a partir de cultivo realizado em duplicata e a barra de erro corresponde ao desvio padrão entre esses níveis. Após a indicação do fungo, o número entre parênteses indica o tempo de cultivo em dia correspondente a cada média. As letras dentro das colunas, quando iguais, correspondem a médias sem diferença estatística ao nível de 5% de significância.



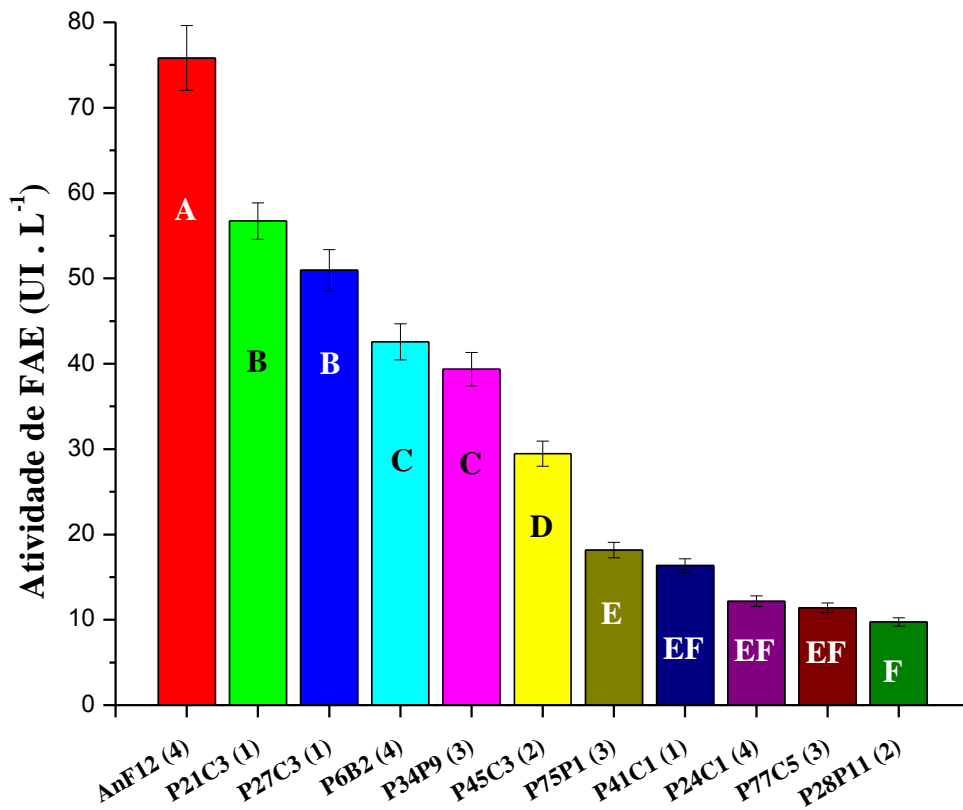
**Figura 9** – Produtividades máximas de xilanase apresentadas pelos diferentes fungos ao longo do cultivo.

Os resultados correspondem à média entre os níveis observados a partir de cultivo realizado em duplicata e a barra de erro corresponde ao desvio padrão entre esses níveis. As letras dentro das colunas, quando iguais, correspondem a médias sem diferença estatística ao nível de 5% de significância.

Analisando-se o nível absoluto, não se verificou diferença estatística, ao nível de 5% de significância, entre a linhagem P27C3, que produziu 55,8 UI/mL de xilanase, e o isolado P45C3, que produziu até 42,02 UI/mL (após dois dias de cultivo). Entretanto, ao se observar os valores de produtividade, as diferenças tornam-se mais claras. Assim, as linhagens P27C3 e P21C3 foram as que mais se destacaram em relação à atividade de xilanase. Esses níveis de xilanase alcançados foram superiores aos de *A. terreus* (38,5 UI.L<sup>-1</sup>) e *A. niger* (35,5 UI.L<sup>-1</sup>), quando cultivados com farelo de trigo, em condições similares com as empregadas no presente trabalho (GAWANDE; KAMAT, 1999).

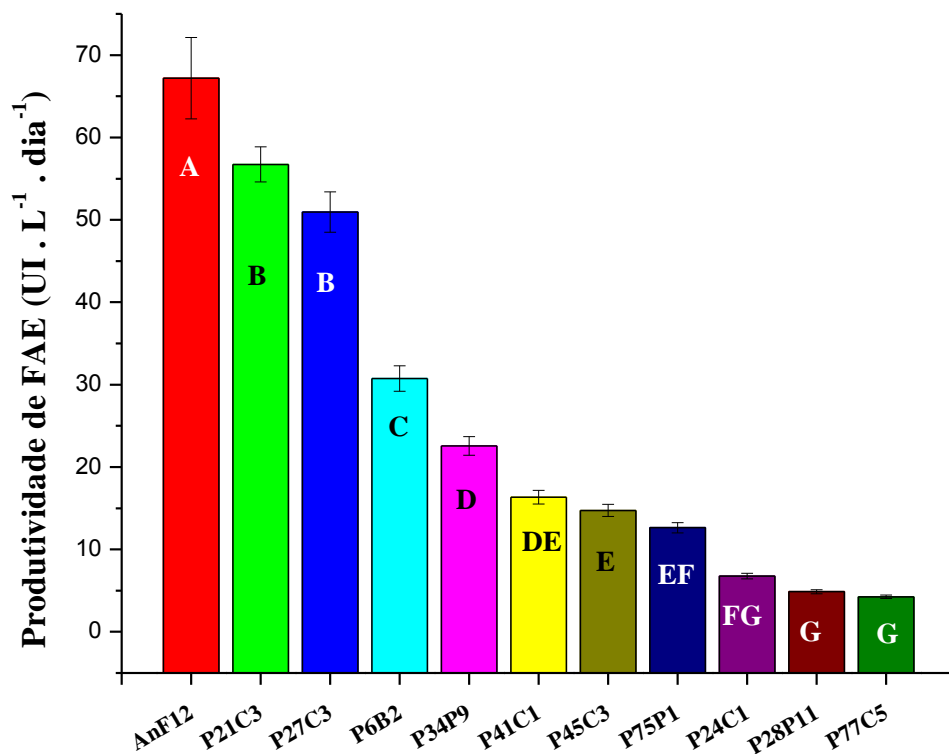
A comparação entre os isolados também foi baseada na produção de feruloil esterase. Os níveis máximos de produção dessa enzima estão apresentados na **Figura 10** e os de produtividade máxima na **Figura 11**. A linhagem de *A. niger* F12, empregada como controle, foi a que mais se destacou, com um nível máximo de 75,8 UI.L<sup>-1</sup>, após quatro dias de cultivo. Além disso, a produtividade máxima dessa linhagem foi de 67,2 UI.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Porém, entre os fungos da região amazônica, os isolados P27C3, P21C3 e P6B2 apresentaram

os mais elevados níveis de FAE ao longo do cultivo e as mais elevadas produtividades, com até  $56,7 \text{ UI.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$  (P21C3), por exemplo. Os resultados alcançados para feruloil esterase foram superiores ao observado em *A. niger*, quando cultivado com polpa de beterraba açucareira, o qual foi de  $5,9 \text{ UI.L}^{-1}$  sobre o substrato MFA (ASTHER *et al.*, 2002).



**Figura 10** – Comparação entre as maiores produções de FAE, até o quarto dia de cultivo.

Os resultados correspondem à média entre os níveis observados em cultivo realizado em duplicata e a barra de erro corresponde ao desvio padrão entre esses níveis. Após a indicação do fungo, o número entre parênteses indica o tempo de cultivo em dia correspondente a cada média. As letras dentro das colunas, quando iguais, correspondem a médias sem diferença significativa a 5% de significância.

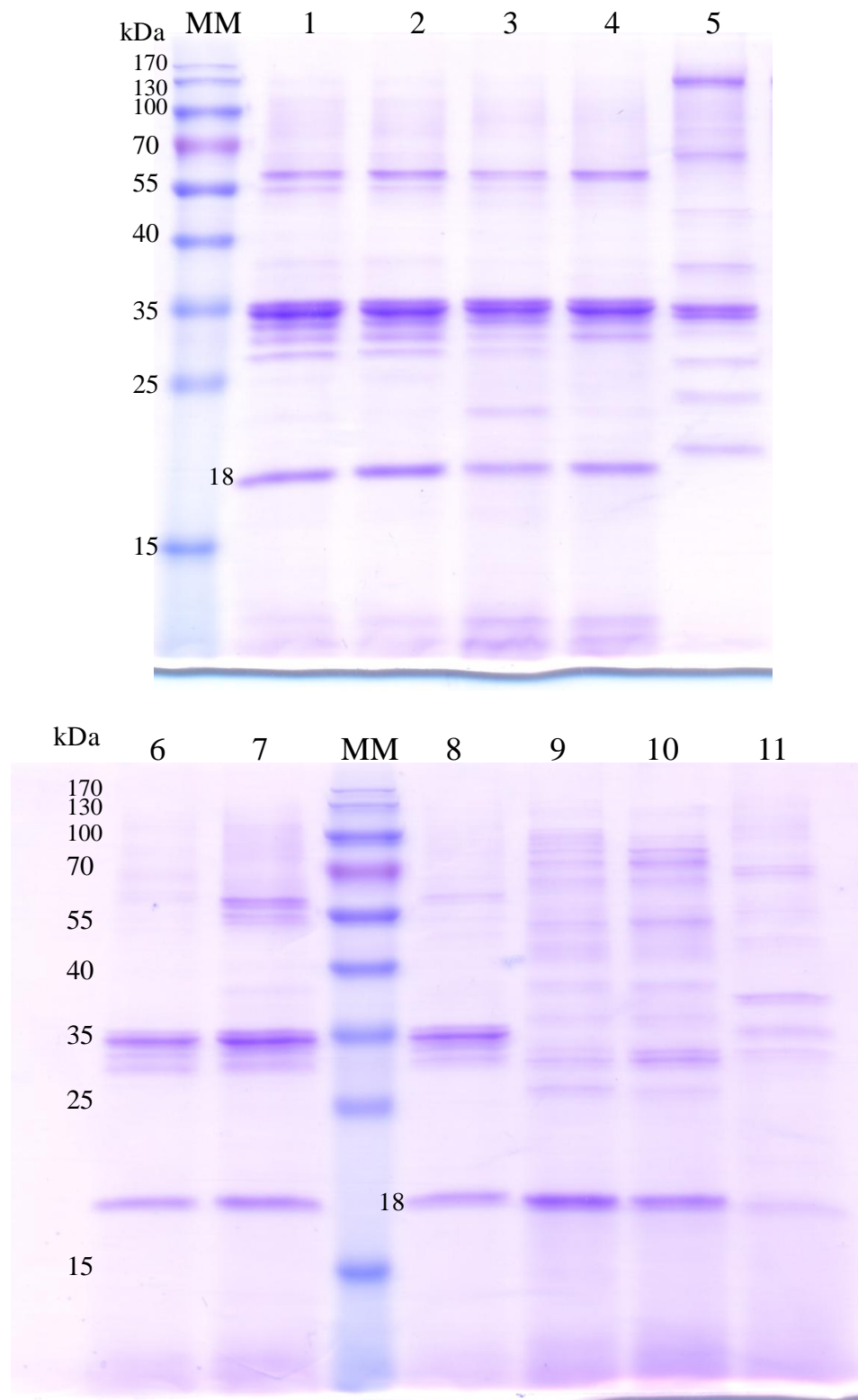


**Figura 11** – Produtividades máximas de feruloil esterase apresentadas pelos diferentes fungos ao longo do cultivo.

Os resultados correspondem à média entre os níveis observados em cultivo realizado em duplicata e a barra de erro corresponde ao desvio padrão entre esses níveis. As letras dentro das colunas, quando iguais, correspondem a médias sem diferença significativa a 5% de significância.

O sobrenadante a partir do cultivo dos diferentes fungos foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (**Figura 12**). As amostras foram escolhidas com base no tempo correspondente aos picos de produção de xilanase e FAE e, quando os mesmos não foram simultâneos, selecionaram-se os períodos de amostragem com níveis elevados de ambas as enzimas. Analisando-se o perfil de proteínas na **Figura 12**, é possível observar a diversidade entre os diferentes isolados. Na maioria dos extratos enzimáticos, há uma nítida banda de 35 kDa (quilo Daltons) e outra de 18 kDa (valor estimado). Nota-se também que os perfis de proteínas dos isolados P21C3 e P27C3 são muito parecidos entre si e diferem pouco entre os isolados P6B2, P45C3 e P28P11. A linhagem de *A. niger* F12 apresentou bandas bem distribuídas na faixa entre 18 e 130 kDa. O isolado P77C5 apresentou as bandas mais fracas, de forma que essa menor concentração de proteínas pode estar refletida na baixa produção das enzimas avaliadas.





**Figura 12** – Perfil de proteínas do sobrenadante do cultivo de diferentes fungos.

Legenda: (MM) marcador de massa molecular; (1) P21C3 (após 1 dia de cultivo); (2) P27C3 (após 1 dia); (3) P6B2 (após 2 dias); (4) P45C3 (após 2 dias); (5) AnF12 (após 4 dias); (6) P34P9 (após 2 dias); (7) P28P11 (após 2 dias); (8) P41C1 (após 1 dia); (9) P75C1 (após 3 dias); (10) P24C1 (após 4 dias); (11) P77C5 (após 4 dias). Ao lado esquerdo da figura, encontram-se as massas das bandas do marcador em kDa. O número 18 corresponde a um valor estimado em kDa.

Por envolver fungos que ainda não foram identificados, existe uma dificuldade em se relacionar as bandas do gel com as possíveis enzimas a que correspondem. Além disso, alterações no padrão de glicosilação, que podem ocorrer por diversos motivos, podem afetar o deslocamento das proteínas no gel. Vale ressaltar também que algumas enzimas possuem diferentes isoformas, ou seja, enzimas com a mesma atividade podem diferir em sua estrutura. Khonzue e colaboradores (2011) identificaram uma endo- $\beta$ -1,4-xilanase de 35,5 kDa e uma  $\beta$ -xilosidase de 87,2 kDa, a partir do extrato enzimático de *A. niger*. Cultivando essa mesma espécie com farelo de trigo, Hegde e Muralikrishna (2009) purificaram duas FAEs, as quais consistiram de glicoproteínas monoméricas com 50 kDa e 55 kDa, enquanto que Trzcińska *et al.* (2005) obtiveram uma FAE com 30 kDa. Em relação ao *Aspergillus oryzae*, Kitamoto *et al.* (1999) purificaram uma xilanase de 35 kDa e Tenkanen e colaboradores (1991) identificaram uma FAE monomérica com 30 kDa. Três FAEs de uma mesma cepa de *A. oryzae* foram isoladas e suas massas foram estimadas em 60, 64 e 65 kDa (UDATHA *et al.*, 2012). Assim, supõe-se que as bandas de 35 kDa comum na maioria dos extratos podem ser de xilanase. Enquanto que as bandas logo abaixo de 35 kDa ou logo acima de 55 kDa podem ser de feruloil esterase, no caso dos isolados P21C3, P27C3 e P6B2.

#### 5.4 Efeito de fontes de carbono

Antes de iniciarem-se os ensaios em reator, foi realizado um teste com o fungo P21C3, para se verificar o efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de xilanase e feruloil esterase. Essa linhagem foi escolhida por ter sido uma das que mais se destacaram na produção das enzimas de interesse, a partir da seleção por cultivo em shaker (item 5.3), junto com a P27C3. Entretanto, o P21C3 apresentou uma maior esporulação em meio BDA que o P27C3, o que facilitou a sua manipulação. Na **Tabela 2**, encontram-se os dados de caracterização de alguns substratos empregados nesse ensaio.

**Tabela 2.** Caracterização dos substratos bagaço explodido, bagaço hidrotérmico e licor.

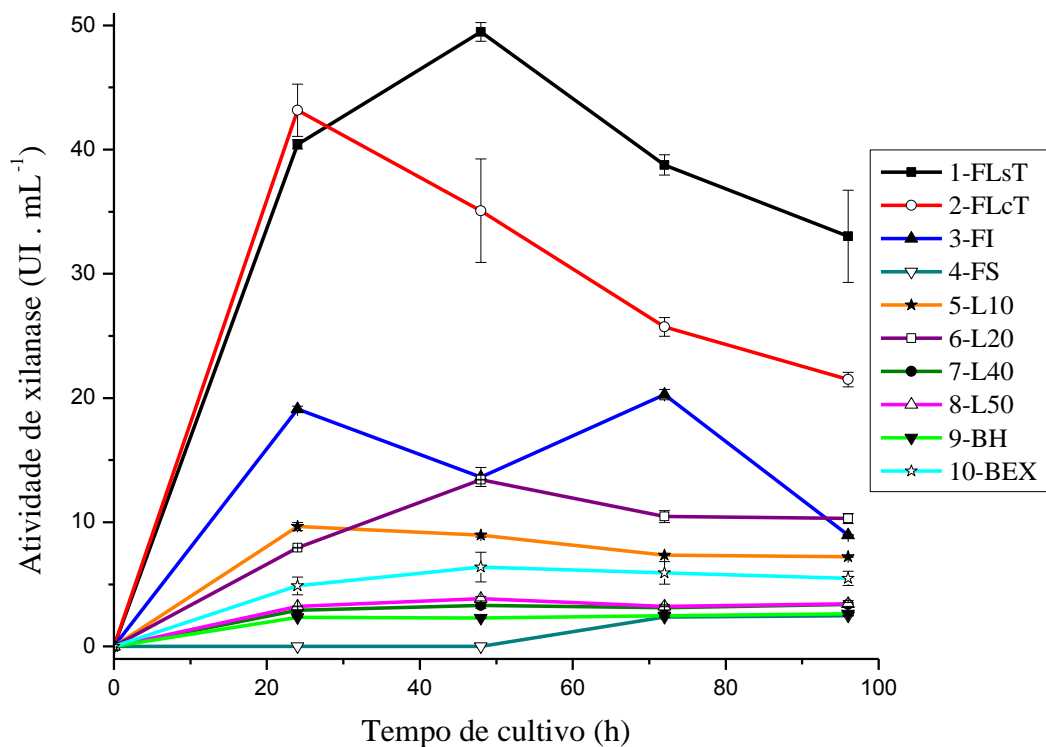
	<i>Celulose</i> (%) <sup>1</sup>	<i>Hemicelulose</i> (%) <sup>1</sup>	<i>Lignina</i> (%) <sup>1</sup>	<i>Cinzas</i> (%) <sup>1</sup>
<b>BEX<sup>2</sup></b>	51,7 ± 0,6	8,9 ± 0,1	34,3 ± 0,3	5,5 ± 0,2
<b>BH<sup>3</sup></b>	74,0 ± 1,3	6,0 ± 0,5	26,0 ± 0,1	0,2 ± 0,1

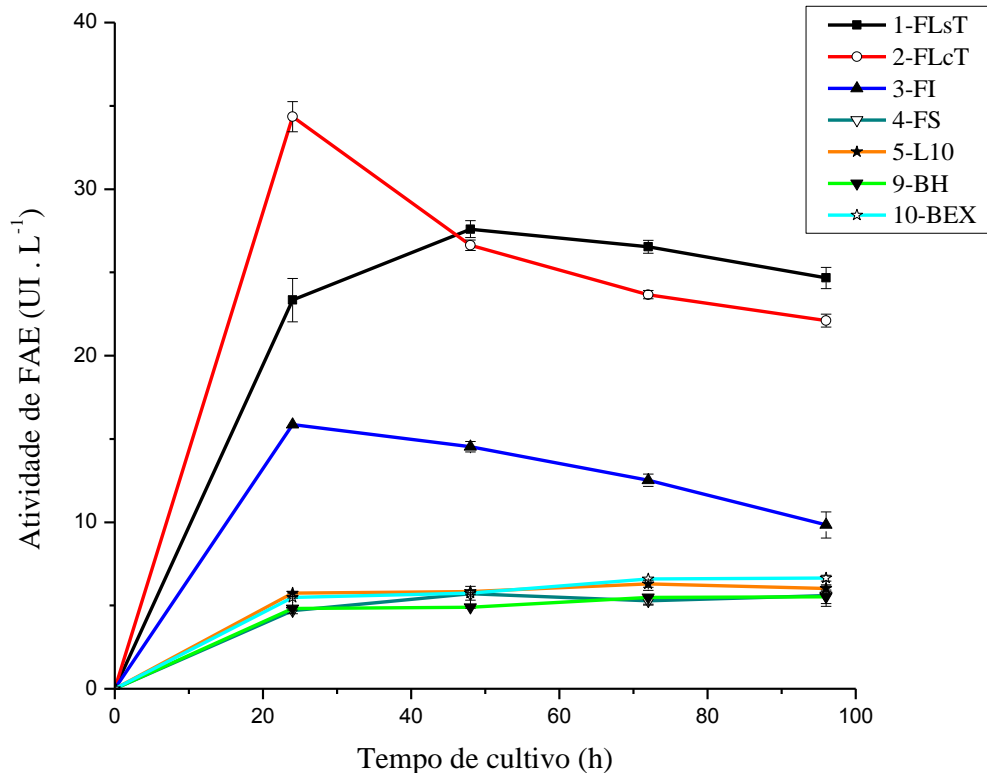
	<i>Xilose</i> g/L	<i>Glicose</i> g/L	<i>Arab.</i> g/L <sup>4</sup>	<i>Celob.</i> g/L <sup>5</sup>	<i>Acético</i> g/L <sup>6</sup>	<i>XOG</i> g/L <sup>7</sup>	<i>HMF</i> g/L <sup>8</sup>	<i>Furfural</i> g/L
<b>Licor</b>	5,5	0,69	0,85	0,0	1,9	9,87	0,15	1,26

<sup>1</sup> Os resultados estão expressos em porcentagens de massa em base seca; <sup>2</sup> bagaço explodido; <sup>3</sup> bagaço hidrotérmico; <sup>4</sup> arabinose; <sup>5</sup> celobiose; <sup>6</sup> ácido acético; <sup>7</sup> xilooligossacarídeos; <sup>8</sup> hidroximetilfurfural.

Os níveis de produção de xilanase obtidos nesse ensaio de fontes de carbono estão apresentados na **Figura 13** e os de FAE na **Figura 14**.

**Figura 13** – Efeito de fontes de carbono sobre a produção de xilanase ao longo do período de cultivo do fungo P21C3.

Legenda: (1-FLsT e 2-FLcT) farelo de trigo lavado – meio sem e meio com tampão ftalato, respectivamente; (3-FI) farelo de trigo *in natura*; (4-FS) farelo de soja; (5-L10, 6-L20, 7-40 e 8-L50) 10%, 20%, 40% e 50% de licor, respectivamente; (9-BH) bagaço hidrotérmico; (10-BEX) bagaço explodido.



**Figura 14** – Efeito de fontes de carbono sobre a produção de FAE ao longo do período de cultivo do fungo P21C3.

Legenda: (1-FLsT e 2-FLcT) farelo de trigo lavado – meio sem e meio com tampão ftalato, respectivamente; (3-FI) farelo de trigo *in natura*; (4-FS) farelo de soja; (5-L10, 6-L20, 7-40 e 8-L50) 10%, 20%, 40% e 50% de licor, respectivamente; (9-BH) bagaço hidrotérmico; (10-BEX) bagaço explodido.

Pôde-se verificar, por exemplo, que o farelo de trigo foi o melhor indutor para ambas as enzimas. Além disso, a lavagem do farelo de trigo aumentou a produção das mesmas, uma vez que a produção de xilanase foi 2,3 vezes maior com "FLcT" (farelo de trigo lavado; com tampão) em relação ao "FI" (*in natura*), após 24 horas de cultivo. Essa relação é praticamente a mesma, quando se considera a atividade de feruloil esterase, para tais amostras. Isso pode estar relacionado ao fato de o fungo utilizar fontes de carbono mais facilmente assimiláveis, como o amido presente no farelo de trigo *in natura*, de modo que ele reduz a expressão das enzimas relacionadas à degradação de substratos mais complexos, como o arabinosilano, também presente no mesmo substrato. Watanabe *et al.* (2011) demonstraram que a perda da função do gene *amyR*, relacionado com enzimas de degradação do amido, aumentou a atividade de enzimas hemicelulotíficas (como a xilanase, por exemplo), em uma linhagem de *A. oryzae*. Haja vista que o amido do substrato não foi hidrolisado, não havendo liberação da glicose, a qual reprime a expressão de genes relacionados com a degradação da celulose e hemicelulose. Segundo de Vries e Visser (1999), o gene *faeA* de *A. niger* sofre uma regulação complexa, sendo também sujeito à repressão catabólica da glicose.

É provável que os genes de FAE do *A. oryzae*, que é o caso do P21C3, sejam reprimidos dessa mesma forma.

O uso do licor não favoreceu o crescimento do fungo e não proporcionou bons resultados. Além disso, não foi possível detectar atividade de FAE nos ensaios com licor a 20%, 40% e 50%. Os substratos farelo de soja, bagaço hidrotérmico e bagaço explodido também não foram bons indutores para as enzimas de interesse.

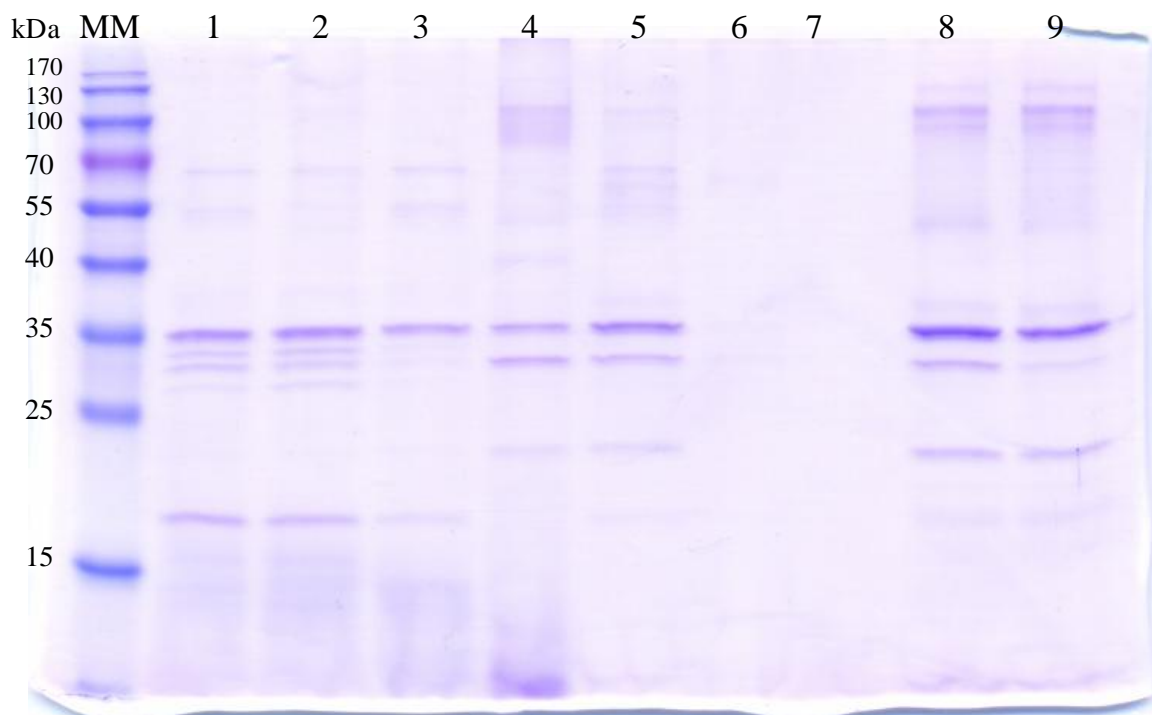
O farelo de trigo é caracterizado por apresentar maiores teores de hemicelulose, comparado ao bagaço de cana-de-açúcar. Além disso, os pré-tratamentos empregados para a obtenção dos bagaços são caracterizados por remover a maior parte da hemicelulose. Essa diferença nos teores de hemicelulose pode ter afetado a produção de xilanase. A FAE é induzida na presença de xilose, a qual resulta da degradação da hemicelulose, e de compostos fenólicos, principalmente o ácido ferúlico (DE VRIES *et al.*, 2002). Como o farelo de trigo possui maiores teores de hemicelulose, a produção de xilanase pode ter sido favorecida e, a degradação desse polissacarídeo liberando xilose, junto com uma maior presença de ácido ferúlico, pode ter favorecido a produção de FAE. Essa estreita relação quanto à indução dessas duas enzimas pode estar refletida em seu perfil de produção que é similar, como pode ser visto no cultivo com farelo de trigo lavado (2 - FLcT). Vale ressaltar que esse perfil similar também foi verificado para os isolados P21C3, P27C3, P6B2 e P45C3, no ensaio de seleção por cultivo em shaker (item 5.3).

Os resultados concernentes ao cultivo com licor de pré-tratamento hidrotérmico podem estar relacionados à presença de furfural e hidroximetil furfural, cujas concentrações encontram-se na **Tabela 2**. Zeringue (2000) avaliou a composição de compostos voláteis liberados pelos "cabelos" (estilo-estigmas) de genótipos de milho susceptíveis ou não ao *A. flavus*. Nesse trabalho, verificou-se que o crescimento do fungo, bem como sua produção de aflatoxinas, foi afetado de modo significativo devido à presença de alguns compostos voláteis, principalmente o furfural. Considerando que o genoma do *A. flavus* apresenta elevada homologia com o do *A. oryzae*, é possível que a presença desses compostos tenha afetado o desenvolvimento do P21C3 no meio com licor e, conseqüentemente, a produção das enzimas de interesse também.

O monitoramento do pH durante o cultivo pode ser visualizado na **Figura A1** do Anexo A.

Na **Figura 15**, pode ser visualizado o perfil de proteínas apresentado pelo fungo P21C3, quando cultivado com as diferentes fontes de carbono. Fica evidenciado, por exemplo, o baixo desenvolvimento do fungo com 20% e 40% de licor, de forma que as

proteínas presentes no sobrenadante não foram detectadas através do método de coloração empregado. Além disso, há uma clara diferença entre as amostras do cultivo com farelo de trigo lavado e as do cultivo com farelo *in natura*, principalmente em relação às bandas menores que 35 kDa. Foi discutido no item 4.3 que as bandas de 35 kDa poderiam ser de xilanase. Entretanto, elas podem também incluir proteínas de expressão constitutiva, uma vez que estão presentes em todos os meios que o fungo conseguiu crescer. Trabalhos futuros poderão ser realizados para sequenciar as proteínas do gel, tornando possível a sua identificação.



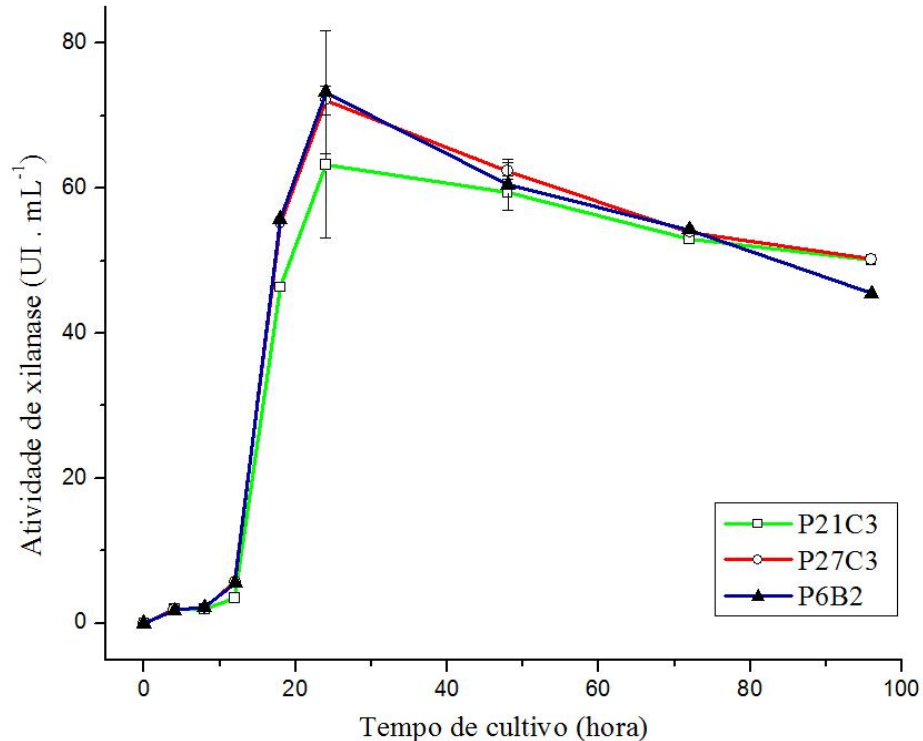
**Figura 15** – Perfil de proteínas do sobrenadante do cultivo do fungo P21C3 com diferentes fontes de carbono.

Legenda: (MM) marcador de massa molecular; (1) farelo de trigo lavado sem tampão (após 24 horas de cultivo); (2) farelo de trigo lavado com tampão (após 24 horas); (3) farelo de trigo *in natura* (após 24 horas); (4) farelo de soja (após 72 horas); (5) licor a 10% (após 48 horas); (6) licor a 20% (após 48 horas); (7) licor a 40% (após 48 horas); (8) bagaço hidrotérmico (após 72 horas); (9) bagaço explodido (após 72 horas). No lado esquerdo da figura, encontram-se as massas em kDa das bandas do marcador.

### 5.5 Cultivo em reator convencional de tanque agitado

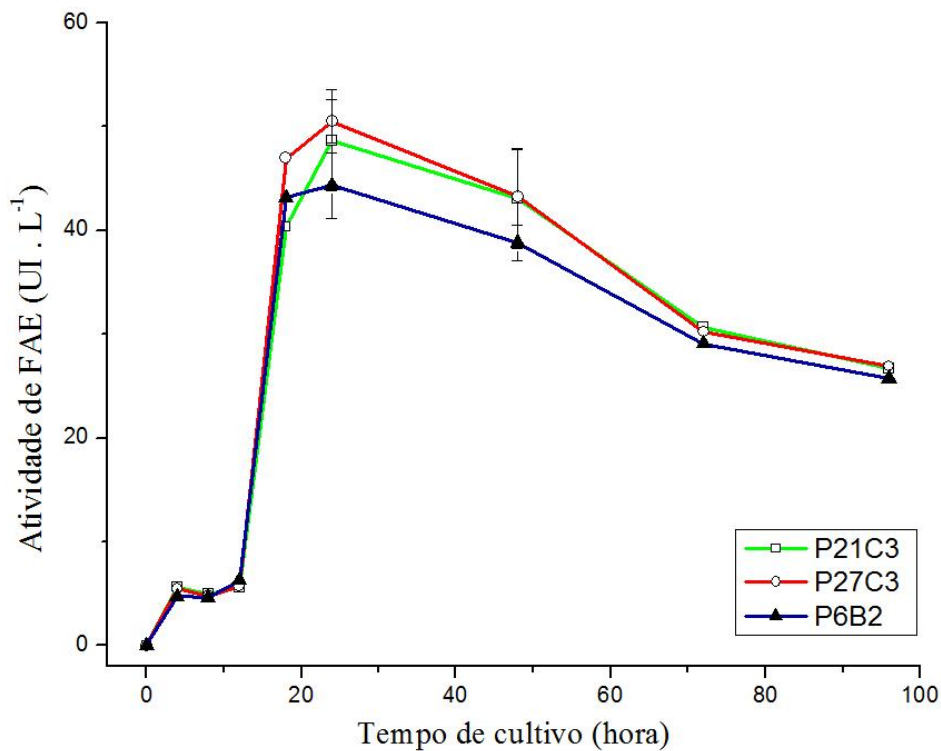
Tendo em vista que a produtividade é um importante parâmetro em termos de processo, entre os fungos amazônicos, três linhagens de *Aspergillus oryzae* (P21C3, P27C3 e P6B2) foram escolhidas com base em seus valores de produtividade de FAE, a partir do cultivo em shaker. Além disso, elas estiveram entre as que mais se destacaram quanto à produção de xilanase. Essas linhagens foram então cultivadas em reator convencional de tanque agitado, com controle de pH, temperatura, agitação e aeração.

Os níveis de atividade de xilanase, acompanhados ao longo do cultivo, estão apresentados na **Figura 16**, e os de FAE, na **Figura 17**. Pode-se observar, por exemplo, que o perfil de produção apresentado pelas três linhagens é similar e os resultados são próximos. O pico de produção de xilanase sucedeu-se após 24 horas de cultivo, sendo 63,2 UI.mL<sup>-1</sup> para a linhagem P21C3, 72,1 UI.mL<sup>-1</sup> para a P27C3 e 73,2 UI.mL<sup>-1</sup> para a P6B2. Porém, essas médias não são significativamente diferentes, ao nível de 5% de significância.



**Figura 16** – Atividade de xilanase ao longo do período do cultivo de três linhagens de *A. oryzae* em reator.

Os resultados correspondem à média entre os níveis observados em cultivo realizado em duplicata (ou triplicata, no caso do P21C3) e a barra de erro corresponde ao desvio padrão entre esses níveis.



**Figura 17** – Atividade de feruloil esterase ao longo do período do cultivo das três linhagens de *A. oryzae* em reator.

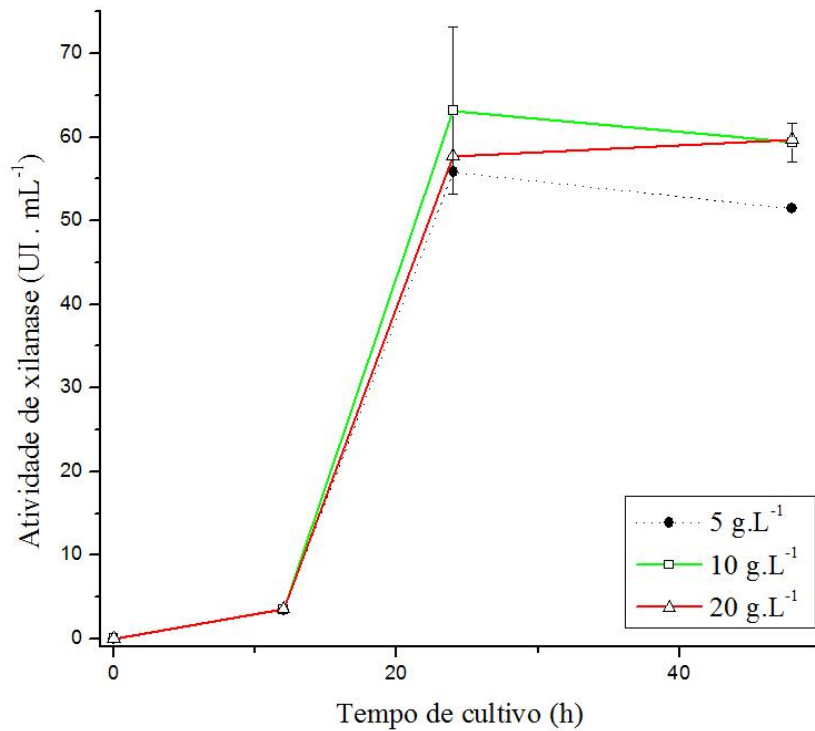
Os resultados correspondem à média entre os níveis observados em cultivo realizado em duplicata (ou triplicata, no caso do P21C3) e a barra de erro corresponde ao desvio padrão entre esses níveis.

Da mesma forma, os perfis de secreção de FAE foram similares entre as três linhagens. O nível máximo também foi observado após 24 horas de cultivo, sendo na ordem de 48,7 UI.L<sup>-1</sup> para o fungo P21C3, 50,5 UI.L<sup>-1</sup> para o P27C3 e 44,3 UI.L<sup>-1</sup> para o P6B2. Essas médias também não apresentaram diferença estatística, ao nível de 5% de significância. Isso pode estar relacionado com o fato de o cultivo em reator fornecer um maior nível de oxigênio dissolvido. De modo que, sem a limitação do mesmo, o potencial de produção das enzimas pode ser melhor explorado, e as diferenças entre as linhagens ficam reduzidas. O controle do pH durante o cultivo também pode ter contribuído, já que tem grande influência sobre a produção de enzimas em geral.

Uma observação interessante é que o pico de produção de xilanase ocorreu após 24 horas de cultivo, tanto nos ensaios em shaker (itens 4.3 e 4.4) quanto em reator. Oda *et al.* (2006) avaliaram o nível de expressão de alguns genes de *A. oryzae* quando cultivado em meio líquido com farelo de trigo. Eles detectaram um maior nível de expressão dos genes *xynG1* e *xynG2*, que codificam xilanases, após 24 horas de cultivo, comparando-se com os períodos de 32 e 40 horas.

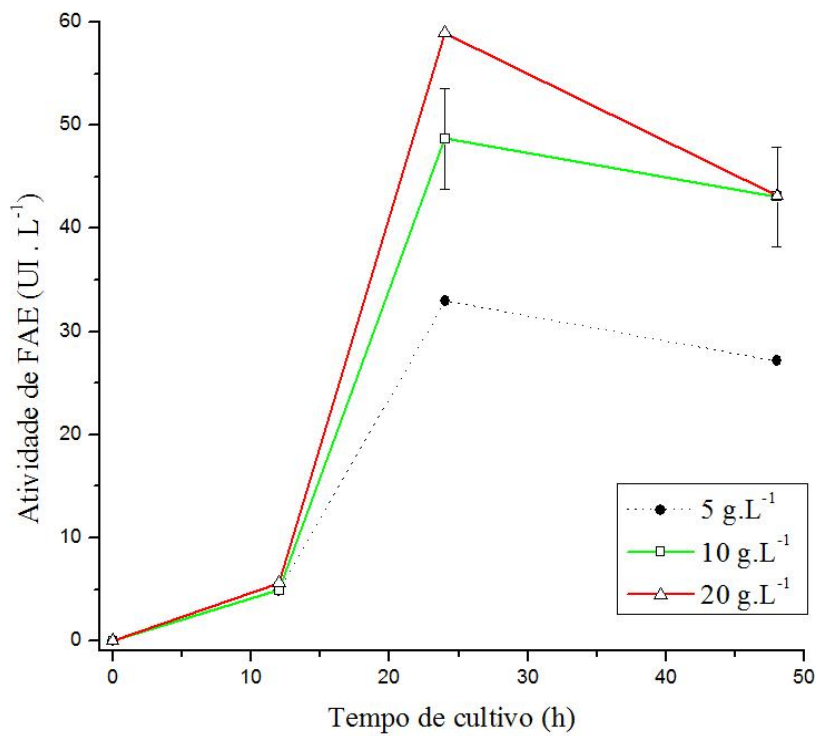


Objetivou-se também avaliar o efeito da concentração do substrato sobre a produção das enzimas. Assim, o fungo P21C3 foi cultivado com farelo de trigo lavado a  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , a concentração padrão utilizada nesse trabalho, e com uma concentração maior e outra menor que essa, sendo de  $5 \text{ g.L}^{-1}$  e  $20 \text{ g.L}^{-1}$ . A concentração do substrato teve um efeito positivo sobre a produção de xilanase (**Figura 18**) e de FAE (**Figura 19**). Pode-se notar que a produção de FAE foi mais sensível à concentração de farelo que a de xilanase. No caso específico do período de 24 horas, não se verificou diferença estatística, a 5% de significância, na produção de xilanase entre as três concentrações de farelo, nem na produção de FAE, quando o cultivo foi realizado com  $10 \text{ g.L}^{-1}$  e  $20 \text{ g.L}^{-1}$ .



**Figura 18** – Produção de xilanase pelo fungo P21C3 em diferentes concentrações de farelo de trigo.

Os resultados correspondem à média entre os níveis observados em cultivo realizado em duplicata (ou triplicata, no caso de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ ) e a barra de erro corresponde ao desvio padrão entre esses níveis.



**Figura 19** – Produção de FAE pelo fungo P21C3 em diferentes concentrações de farelo de trigo.

Os resultados correspondem à média entre os níveis observados em cultivo realizado em duplicata (ou triplicata, no caso de 10 g.L<sup>-1</sup>) e a barra de erro corresponde ao desvio padrão entre esses níveis.

Na **Figura A2** (Anexo B), foram apresentadas as curvas de agitação e de oxigênio dissolvido ao longo de uma batelada com o fungo P21C3, a partir das quais se pode ter uma ideia sobre o consumo de oxigênio e, por conseguinte, sobre o crescimento celular.

## 5.6 Painel de atividade enzimática

Foram determinados os níveis de atividade de diversas enzimas, em relação ao extrato *R05B* (da linhagem *A. oryzae* P21C3) e à enzima comercial *Celluclast 1.5L*. O extrato *R05B* foi obtido após 24 horas de cultivo, em reator, da linhagem P21C3, com 10 g.L<sup>-1</sup> de farelo de trigo lavado. O extrato bruto foi apenas centrifugado para ser utilizado nos ensaios. Os resultados dos níveis de atividade observados estão apresentados na **Tabela 3**. Em termos de atividade, o preparado comercial excede em muitas vezes os níveis do extrato *R05B*. Entretanto, não foi detectada atividade de feruloil esterase no preparado comercial sobre o substrato MFA. Ao passo que *R05B* apresentou um nível de 47,02 U/L de FAE, o que pode ser um diferencial em termos de eficiência de hidrólise. Em virtude de o extrato *R05B* apresentar uma baixa concentração de proteínas (0,20 mg/mL), algumas atividades específicas foram mais elevadas que do preparado comercial, como foi o caso da xilanase.

Vale ressaltar que os resultados obtidos em relação à *Celluclast 1.5L* foram próximos dos demonstrados por Sipos *et al.* (2010), sendo 39,17 mg/mL de proteína; 805,73 UI/mL de xilanase e 27,03 UI/mL de  $\beta$ -glucosidase.

**Tabela 3.** Pannel de atividade enzimática do extrato *R05B* e de *Celluclast 1.5L*.

<i>R05B</i>								
	<b>FPase</b>	<b>Xilanase</b>	<b>Pectinase</b>	<b>Xiloglucanase</b>	<b>Celobiohidrolase</b>	<b>β-glucosidase</b>	<b>FAE<sup>3</sup></b>	<b>Proteínas<sup>4</sup></b>
<b>Atividade (UI/mL)<sup>1</sup></b>	0,027 ± 0,001	74,85 ± 3,6	2,59 ± 0,11	2,07 ± 0,05	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,00	47,02 ± 0,58	0,20 ± 0,01
<b>Atividade específica (UI/mg)<sup>2</sup></b>	0,13	373,58	12,92	10,32	0,43	0,48	0,23	
<i>Celluclast 1.5L</i>								
	<b>FPase</b>	<b>Xilanase</b>	<b>Pectinase</b>	<b>Xiloglucanase</b>	<b>Celobiohidrolase</b>	<b>β-glucosidase</b>	<b>FAE<sup>3</sup></b>	<b>Proteínas<sup>4</sup></b>
<b>Atividade (UI/mL)<sup>1</sup></b>	94,87 ± 3,5	798,1 ± 30,6	14,34 ± 1,52	3386,3 ± 154,9	32,46 ± 1,03	32,96 ± 1,09	0	46,59 ± 0,81
<b>Atividade específica (UI/mg)<sup>2</sup></b>	2,04	17,13	0,31	72,69	0,70	0,71	0	

<sup>1</sup> Atividade enzimática por volume de extrato enzimático bruto;

<sup>2</sup> Atividade enzimática por massa de proteína;

<sup>3</sup> A atividade de FAE foi expressa em "UI.L<sup>-1</sup>" e a específica em "UI.mg<sup>-1</sup>";

<sup>4</sup> Unidade da concentração de proteína "mg.mL<sup>-1</sup>".

## 5.7 Curva de saturação

A fim de se avaliar a aplicação do extrato enzimático da linhagem P21C3, foram realizados ensaios de hidrólise do bagaço hidrotérmico. Este é obtido por um processo que emprega água quente em elevadas temperatura e pressão, também denominado pré-tratamento em água líquida quente, o qual possui algumas vantagens econômicas e ambientais em relação a outros métodos de pré-tratamento, uma vez que não necessita da adição de agentes químicos nem de equipamentos com material especial contra a corrosão, por exemplo (LI *et al.*, 2013). A caracterização do bagaço hidrotérmico utilizado nos ensaios de hidrólise enzimática está apresentada na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Caracterização do bagaço com pré-tratamento hidrotérmico utilizado nos ensaios de hidrólise enzimática.

Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina total (%)	Cinzas (%)
60,56 ± 0,09	3,13 ± 0,04	29,88 ± 0,10	6,20 ± 0,00

Os resultados estão expressos em porcentagem de massa em base seca.

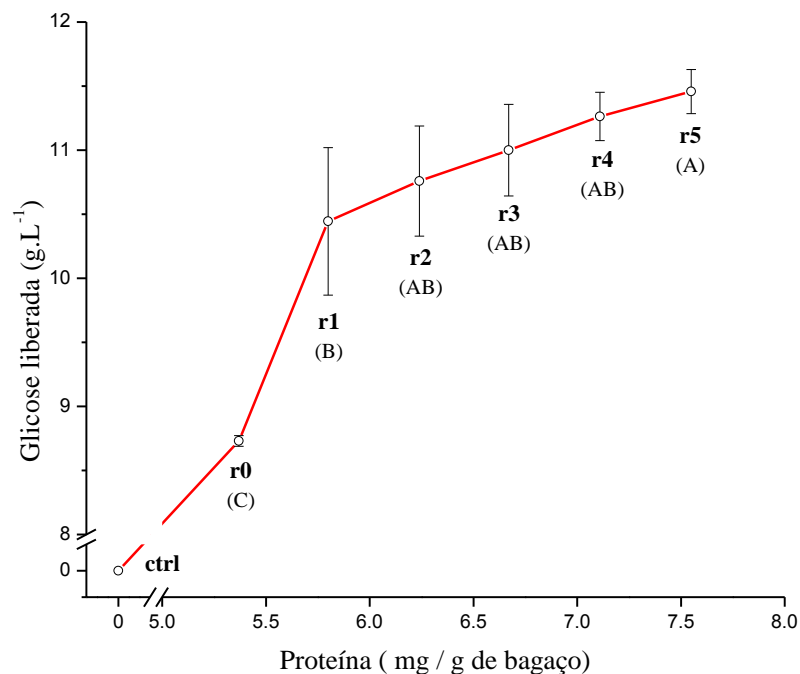
Inicialmente, foi construída uma curva de saturação ou de dose-resposta, com o intuito de se verificar até que ponto a adição do extrato enzimático *R05B* proporciona uma contribuição significativa para a hidrólise de bagaço de cana. Esse ensaio foi realizado com uma dosagem fixa de enzima comercial (10 FPU por grama de bagaço) e quantidades crescentes de extrato *R05B*, produzido pelo fungo P21C3. Dessa forma, foram realizados seis tratamentos, sendo r0 o controle, sem o extrato *R05B*; e os tratamentos r1, r2, r3, r4 e r5, com 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, respectivamente, em volume de *R05B* na reação. As dosagens finais de proteína, xilanase e FAE estão apresentadas na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Quantidades relativas de proteína, xilanase e FAE adicionadas em cada tratamento por grama de bagaço seco.

Tratamento	R05B mL <sup>1</sup>	Celluclast μL <sup>1</sup>	Proteína mg / g de bagaço	Xilanase UI / g bagaço	FAE mUI / g bagaço	β-glucosidase UI / g bagaço
r0	0	5,3	5,37	92,0	0	3,80
r1	0,1	5,3	5,80	254,7	102,2	4,00
r2	0,2	5,3	6,24	417,4	204,5	4,20
r3	0,3	5,3	6,67	580,1	306,7	4,40
r4	0,4	5,3	7,11	742,8	408,9	4,60
r5	0,5	5,3	7,55	905,5	511,1	4,81

O ensaio foi realizado com uma dosagem fixa de enzima comercial (Celluclast) e quantidades crescentes de extrato bruto R05B. Em (1) estão os volumes adicionados de cada um deles em uma reação de 1,0 mL.

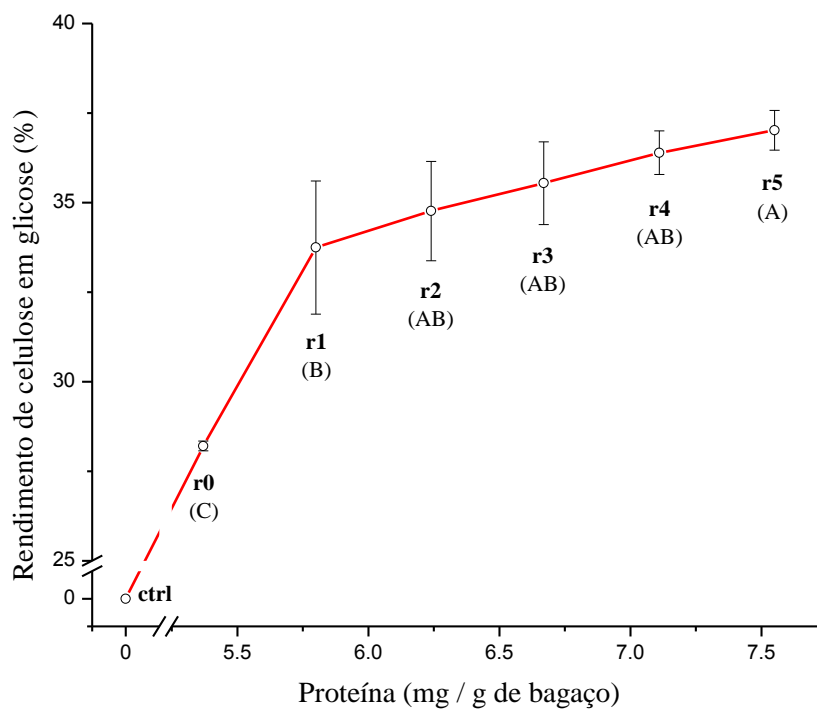
A partir dos dados de liberação de glicose, foi construída a curva de saturação (**Figura 20**). Todos os tratamentos contendo o extrato R05B (r1-r5) foram estatisticamente diferentes, ao nível de 5% de significância, comparados ao controle r0. Houve uma liberação de até 11,46 g.L<sup>-1</sup> de glicose, no tratamento r5. Pôde-se verificar também que não foi detectada diferença estatística entre os tratamentos r2, r3 e r4 e o tratamento r5.



**Figura 20** – Curva de saturação: liberação de glicose a partir de bagaço hidrotérmico através de tratamentos com diferentes níveis de proteína, após 24 horas de ensaio.

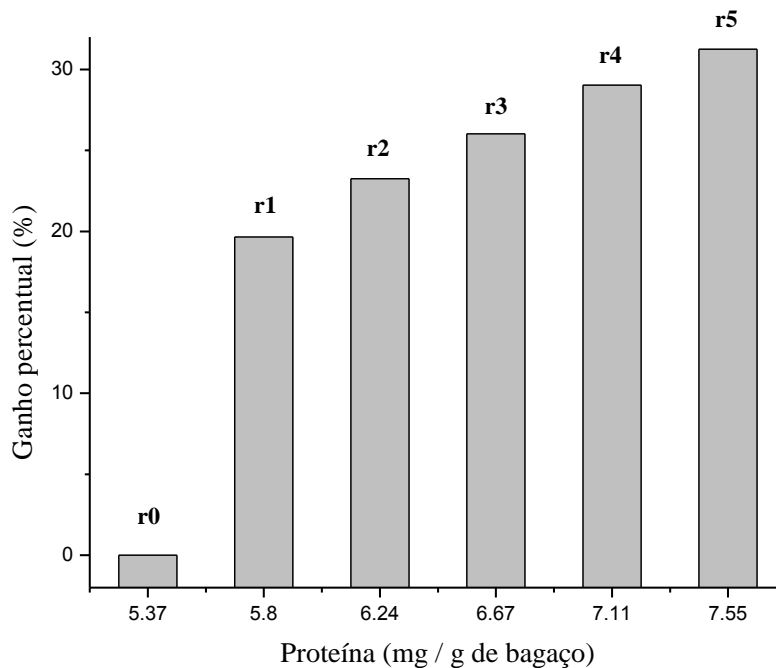
Os resultados correspondem à média a partir de reações realizadas em triplicata e as barras de erro correspondem ao desvio padrão. Letras abaixo das siglas r0-r5, quando iguais, correspondem a médias sem diferença significativa a 5% de significância. "Ctrl" corresponde ao controle do ensaio feito apenas com tampão e substrato.

Foram calculados também os níveis de conversão de celulose em glicose (**Figura 21**). O ganho percentual dos tratamentos r1-r5 em relação ao controle r0 (feito apenas com *Celluclast*) está apresentado na **Figura 22**. No tratamento r1 (5,8 mg de proteína / g de bagaço), obteve-se uma conversão de celulose em glicose de 28,21%, o que correspondeu a um aumento de 19,6% em relação ao controle. Ao passo que em r5 (7,55 mg de proteína / g de bagaço), o rendimento de celulose em glicose foi de 37,02%, com um ganho de 31,2% em relação ao controle (r0).



**Figura 21** – Rendimento de celulose em glicose da curva de saturação.

Os resultados correspondem à média a partir de reações realizadas em triplicata e as barras de erro correspondem ao desvio padrão. Letras (abaixo das siglas r0-r5) iguais correspondem a médias sem diferença significativa a 5% de significância. "Ctrl" corresponde ao controle do ensaio feito apenas com tampão e substrato.



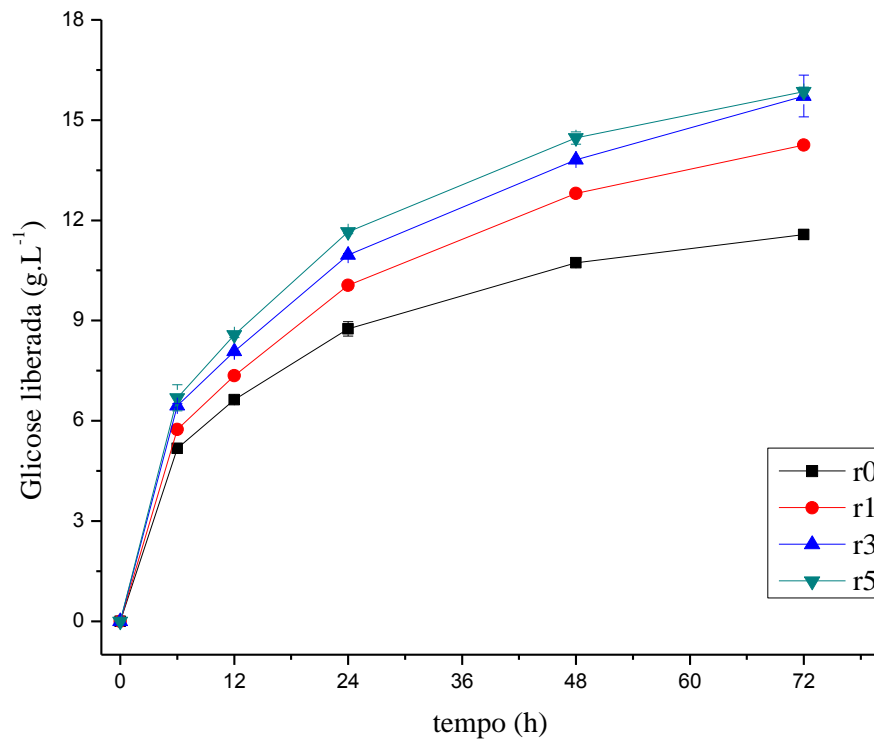
**Figura 22** – Ganho percentual na liberação de glicose em relação ao controle feito apenas com *Celluclast* (r0).

### 5.8 Hidrólise em frascos agitados

Após a construção da curva de saturação, alguns tratamentos foram escolhidos para a realização de um ensaio de hidrólise de bagaço de cana com tratamento hidrotérmico. Neste, foram mantidas as mesmas proporções do ensaio anterior (item 4.7), porém ele foi executado em frascos Erlenmeyers e o volume da reação foi de 50 mL. Os níveis de produção de glicose, ao longo do tempo, estão apresentados na **Figura 23**, e os valores de conversão de celulose em glicose na **Figura 24**. As comparações de médias, por meio do teste de Tukey, estão apresentadas na **Tabela 6**. O ganho percentual de liberação de glicose está apresentado na **Figura 25**.

Considerando cada tratamento em particular, todas as médias foram diferentes, ao nível de 5% de significância, ao longo do período de amostragem, que foi de até 72 horas. Os tratamentos r3 e r5, proporcionaram um rendimento de celulose em glicose de 50,8% e 51,2% (sem diferença estatística), respectivamente, após 72 horas, o que correspondeu a um ganho de 35,8% e de 36,9% em relação ao controle r0 feito apenas com enzima comercial.





**Figura 23** – Perfis de liberação de glicose ao longo do tempo, a partir de diferentes tratamentos, no experimento de hidrólise em frascos agitados.

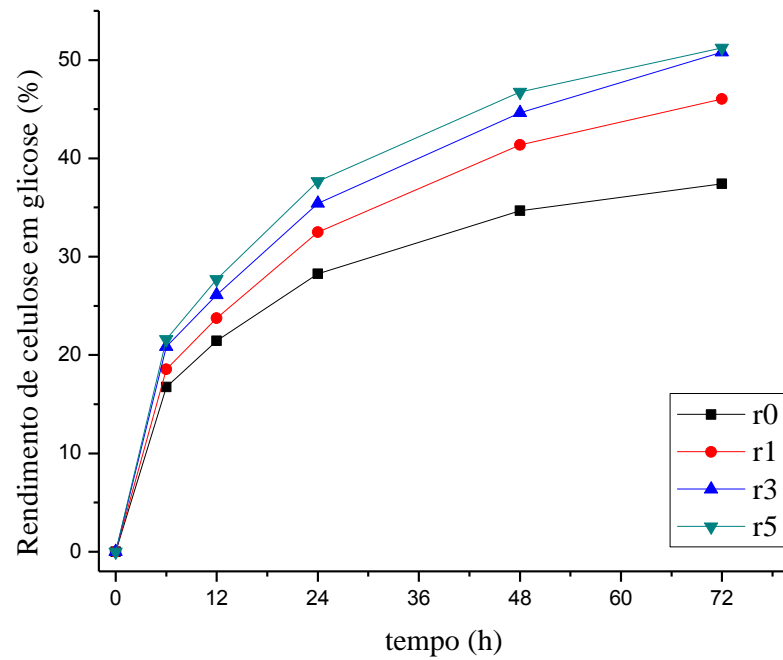
r0 corresponde ao controle contendo apenas *Celluclast*; r1, r3 e r5 correspondem aos tratamentos com a adição de 10%, 30% e 50% de extrato *R05B*, respectivamente.

**Tabela 6.** Comparação de médias por meio de teste de Tukey aplicado aos dados de liberação de glicose do experimento de hidrólise em frascos agitados.

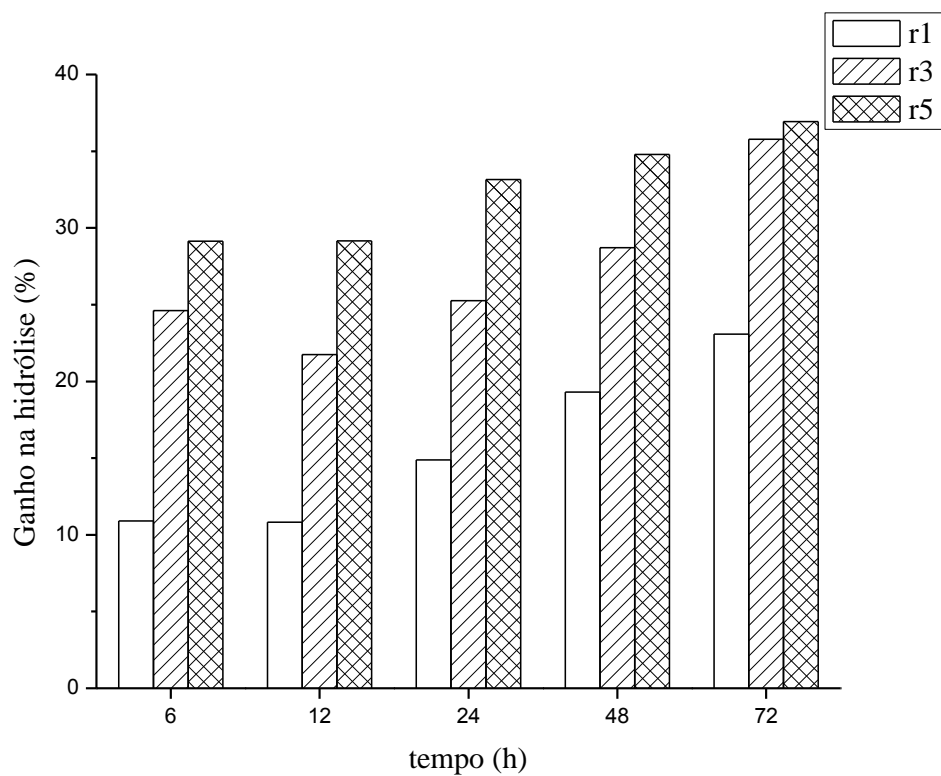
Tratamento	Tempo (h)					
	0	6	12	24	48	72
<b>r0</b>	-	E   c	D   d	C   d	B   d	A   c
<b>r1</b>	-	E   bc	D   c	C   c	B   c	A   b
<b>r3</b>	-	E   ab	D   b	C   b	B   b	A   a
<b>r5</b>	-	E   a	D   a	C   a	B   a	A   a

Comparam-se letras maiúsculas na mesma linha e minúsculas na mesma coluna.

Letras distintas correspondem a médias com diferença estatística, ao nível de 5% de significância.

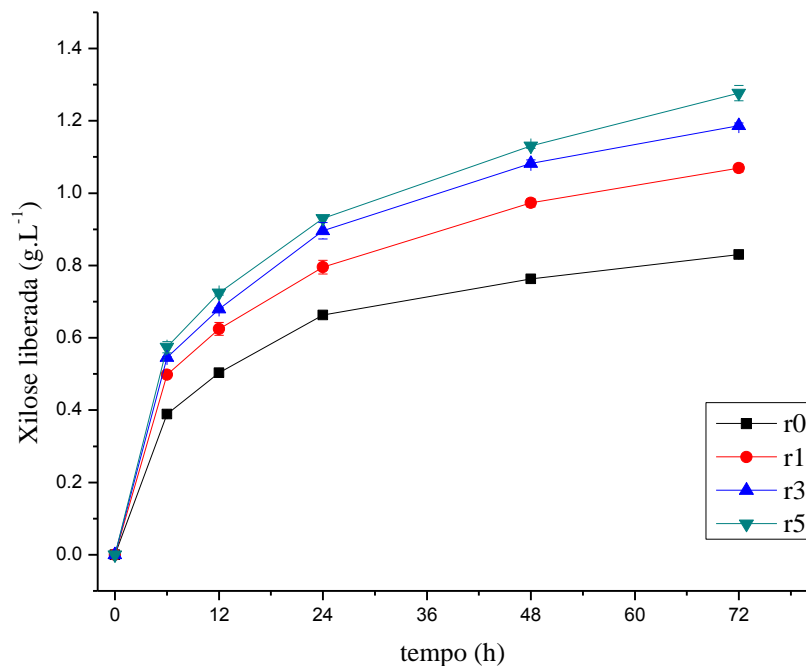


**Figura 24** – Rendimento de celulose em glicose obtido no ensaio de hidrólise em frascos agitados.



**Figura 25** – Ganho percentual na liberação de glicose em relação ao controle "r0", no ensaio de hidrólise em frascos agitados.

Além da glicose, monitorou-se a liberação de xilose ao longo do experimento de hidrólise, conforme mostra a **Figura 26**. As comparações de médias, segundo Teste de Tukey, encontram-se na **Tabela 7**. As baixas concentrações de xilose são reflexo do teor de hemicelulose presente no bagaço hidrotérmico, sendo de 3,13% em base seca. Entretanto, obtiveram-se 78,1% de conversão de hemicelulose em xilose, após 72 horas (**Figura 27**) através do tratamento r5 (905,5 U xilanase / g de bagaço), correspondendo a um ganho de 53,8% em relação ao controle r0 (92 U de xilanase / g de bagaço) (**vide Figura 28**).



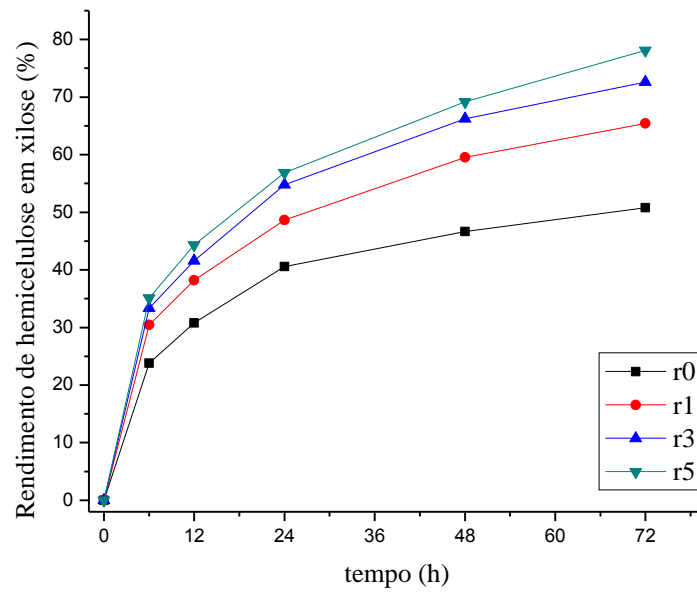
**Figura 26** – Perfis de liberação de xilose ao longo do tempo, a partir de diferentes tratamentos, no experimento de hidrólise em frascos agitados.

**Tabela 7.** Comparação de médias por meio do teste de Tukey aplicado aos dados de liberação de xilose do experimento de hidrólise em frascos agitados.

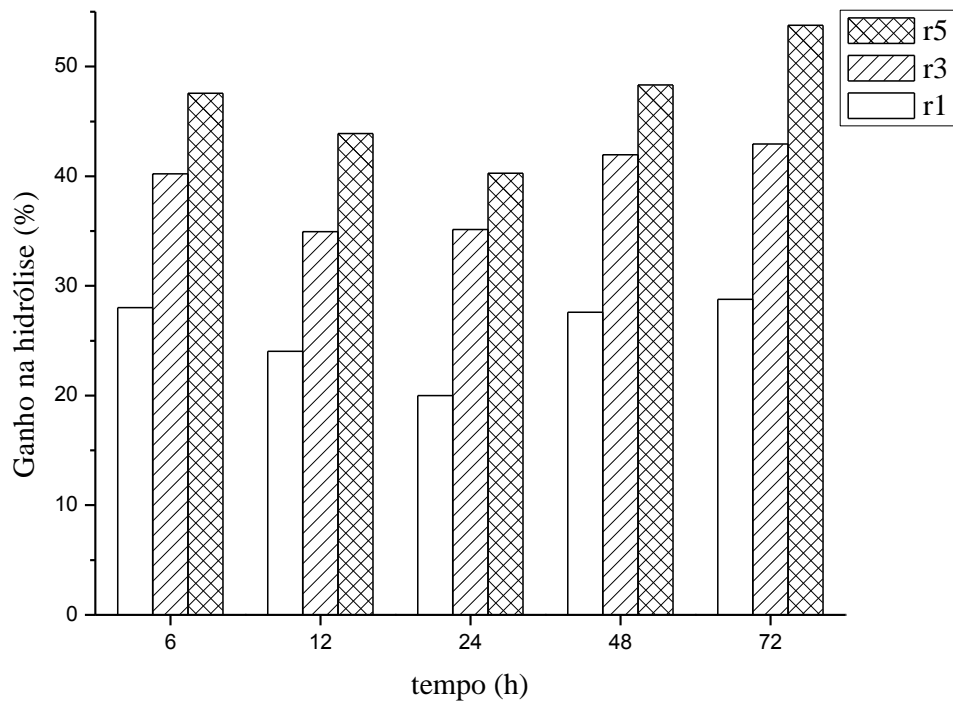
Tratamento	Tempo (h)					
	0	6	12	24	48	72
r0	-	E   c	D   d	C   c	B   d	A   d
r1	-	E   b	D   c	C   b	B   c	A   c
r3	-	E   a	D   b	C   a	B   b	A   b
r5	-	E   a	D   a	C   a	B   a	A   a

Comparam-se letras maiúsculas na mesma linha e minúsculas na mesma coluna.

Letras distintas correspondem a médias com diferença estatística, ao nível de 5% de significância.

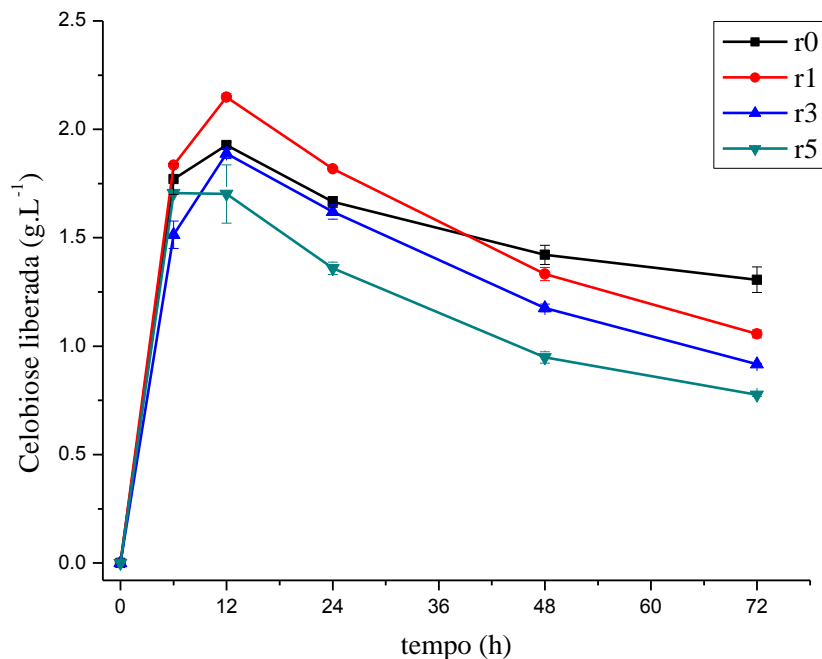


**Figura 27** – Rendimento de hemicelulose em xilose obtido no ensaio de hidrólise em frascos agitados.



**Figura 28** – Ganho percentual na liberação de xilose em relação ao controle "r0" no ensaio de hidrólise em frascos agitados.

Durante o experimento de hidrólise, houve também o monitoramento da liberação de celobiose, como apresentado na **Figura 29**. Após 72 horas de ensaio, a concentração de celobiose no controle r0 (3,8 U de  $\beta$ -glucosidase / g de bagaço) foi de 1,31 g.L<sup>-1</sup> e, no tratamento r5 (4,81 U de  $\beta$ -glucosidase / g de bagaço), a concentração observada foi de 0,78 g.L<sup>-1</sup>, ou seja, cerca de 40% menor que do controle r0.



**Figura 29** – Perfis de liberação de celobiose ao longo do tempo, a partir de diferentes tratamentos, no experimento de hidrólise em frascos agitados.

É importante ressaltar que o substrato utilizado na hidrólise foi o bagaço hidrotérmico. O tipo de pré-tratamento utilizado em sua obtenção emprega água quente sobre alta pressão, que fica em contato com o material por um determinado período de tempo. Quando o material é submetido a esse tratamento, há remoção de grande parte da hemicelulose. Haja vista que o bagaço não tratado pode apresentar 26% desse componente (CANILHA *et al.*, 2012), enquanto que o bagaço aqui utilizado apresentou 3,13%, como já mencionado. É provável que a fração da hemicelulose residual possua uma natureza recalcitrante e seja associada com a lignina, a qual representa cerca de 30% do material. Em contrapartida, o emprego do extrato enzimático produzido pelo fungo P21C3, rico em xilanase e feruloil esterase, contribuiu de modo significativo para a conversão da hemicelulose e, por conseguinte, para a conversão da celulose pelas enzimas do extrato comercial, uma vez que a celulose tornou-se mais acessível. Além disso, a atividade da  $\beta$ -

glucosidade fornecida pelo extrato *R05B* pode ter uma importante contribuição na conversão da celulose do material, uma vez que a presença da celobiose poderia inibir a atividade das enzimas exo e endoglucanase, presentes no preparado comercial. Portanto, a atividade de diferentes enzimas que agem de modo sinérgico é fundamental para a decomposição do material vegetal.

### 5.9 Identificação dos isolados P21C3, P27C3 e P6B2

Desejou-se identificar a espécie de três fungos que foram isolados do solo da região amazônica e que apresentaram bons resultados neste trabalho. Assim, foi realizada a extração do DNA dos isolados P21C3, P27C3 e P6B2. O fragmento de um gene responsável pelo RNA ribossomal foi amplificado pela técnica de PCR e, posteriormente, foi realizado o sequenciamento de bases desse fragmento.

Ao se comparar a sequência obtida com o banco de dados do NCBI, verificou-se 100% de identidade com sequências de *Aspergillus oryzae* e de *A. flavus*. A literatura relata que a distinção entre essas duas espécies é muito difícil. De forma que se considera que o *A. oryzae* é uma forma domesticada do *A. flavus*, ou seja, o primeiro diferencia do segundo, apenas por não expressar genes relacionados à patogenicidade (PAYNE *et al.*, 2006; MACHIDA *et al.*, 2005).

Assim sendo, foi realizada uma análise para detecção de aflatoxinas. O ensaio foi conduzido por um laboratório de referência (Instituto de Tecnologia de Alimentos, em Campinas-SP). Como resultado, não foi detectada a produção das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> por alguma das três linhagens analisadas.

Portanto, considerando-se os resultados de homologia de sequência de DNA e de produção de aflatoxinas, supõe-se que os três isolados analisadas são da espécie *Aspergillus oryzae*. A propósito, esse fungo é utilizado milenarmente na produção de alimentos na cultura oriental e tem recebido um crescente interesse para produção de enzimas a nível industrial.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, foi realizado um teste de seleção em placas contendo ferulato de etila. Entretanto, o ensaio apresentou falsos negativos, mostrando-se ineficaz para que se correlacione seus resultados com a capacidade de produção de feruloil esterase de um determinado fungo.

Os fungos estudados foram também selecionados por cultivo submerso, com farelo de trigo como substrato. Como resultado, três linhagens de *Aspergillus oryzae* (P21C3, P27C3 e P6B2) foram escolhidas para o cultivo em reator convencional de tanque agitado. A partir desse cultivo, obteve-se um extrato com 74,85 UI.mL<sup>-1</sup> de xilanase e 47,02 UI.L<sup>-1</sup> de FAE. Esse extrato, junto com um preparado comercial, proporcionou uma conversão de celulose em glicose de até 51,2% e uma conversão de hemicelulose em xilose de 78,1%, a partir de bagaço-de-cana com tratamento hidrotérmico. A adição do extrato produzido pelo fungo P21C3 foi responsável por um acréscimo de 35,8% na liberação de glicose e de 53,8% na liberação de xilose.

Assim, os resultados obtidos ressaltam a importância da presença de enzimas acessórias, em coquetéis enzimáticos desenvolvidos para a degradação e aproveitamento da biomassa vegetal.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASTHER, M. et al. Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 685-691, 2002.
- BAILEY, M. J.; POUTANEN, K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 5-10, 1989.
- BAKRI, Y.; AL-JAZAIRI, M.; AL-KAYAT, G. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus niger* SS7 in submerged culture. **Polish Journal of Microbiology**, v. 57, p. 249-251, 2008.
- BENOIT, I. *et al.* Feruloyl esterase as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial byproducts. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 1820-1827, 2006.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BURTON, R. A.; GIDLEY, M. J.; FINCHER, G. B. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. **Nature Chemical Biology**, v. 6, p. 724-732, 2010.
- BUTT, M. S. et al. Xylanases and their applications in baking industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, p. 22-31, 2008.
- CANILHA, L. et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-15, 2012.
- CREPIN, V. F.; FAULDS, C. B.; CONNERTON, I. F. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 647-652, 2004.
- DELABONA, P. S. et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012.
- de VRIES, R. P. et al. The *Aspergillus niger faeB* gene encodes a second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation and is specifically induced in the presence of aromatic compounds. **Biochemical Journal**, v. 363, p. 377-386, 2002.
- de VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 497-522, 2001.
- de VRIES, R. P.; VISSER, J. Regulation of the feruloyl esterase (*faeA*) gene from *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5500-5503, 1999.
- DOI, R. H.; KOSUGI, A. Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 541-551, 2004.



DONAGHY, J.; KELLY, P. F.; MCKAY, A. M. Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and lactobacilli. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 257-260, 1998.

FAULDS, C. B *et al.* Arabinoxylan and mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's grain and wheat bran by feruloyl esterases and glycosyl hydrolases from *Humicola insolens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 644-650, 2004.

FAULDS, C. B.; WILLIAMSON, G. Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose. **Microbiology**, v. 140, p. 779-787, 1994.

FAZARY, A. E.; JU, Y. Feruloyl esterases as biotechnological tools: current and future perspectives. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 11, p. 811-828, 2007.

FAZARY, A. E.; JU, Y. The large-scale use of feruloyl esterases in industry. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, p. 95-110, out. 2008.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C.; SVENDSEN, J. A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 581-585, 1983

GAWANDE, P. V.; KAMAT, M. Y. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 511-519, 1999.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOUVEIA, E. R. *et al.* Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, p. 1500-1503, 2009.

GUIMARAES, N. C. A. *et al.* Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate. **SpringerPlus**, v. 2, p. 1-7, 2013.

HAMES, B. D. **Gel electrophoresis of protein: a practical approach**. 3.ed. Oxford: Oxford University Press, 1998. 372 p.

HEGDE, S.; MURALIKRISHNA, G. Isolation and partial characterization of alkaline feruloyl esterases from *Aspergillus niger* CFR 1105 grown on wheat bran. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p.1963-1969, 2009.

HELDT, H. W. **Plant biochemistry**. 3.ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. 630 p.

HORN, S. J. *et al.* Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 45, p. 1-12, 2012.

- HU, J. et al. The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a “cellulase mixture” but is highly substrate specific. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1-12, 2013.
- JONES, L. et al. A conserved functional role of pectic polymers in stomatal guard cells from a range of plant species. **Planta**, v. 221, p. 255-264, 2005.
- JORDAN, D. B. et al. Plant cell walls to ethanol. **Biochemical Journal**, v. 442, p. 241-252, 2012.
- KITAMOTO, N. et al. Purification and characterization of the overexpressed *Aspergillus oryzae* xylanase, XynF1. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 63, p. 1791-1794, 1999.
- KHONZUE, P. et al. Optimization of xylanase production from *Aspergillus niger* for biobleaching of eucalyptus pulp. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, p. 1129-1134, 2011.
- KOSEKI, T. et al. Occurrence, properties, and applications of feruloyl esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 803-810, 2009.
- KROON, P. A.; WILLIAMSON, G. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 355-361, 1999.
- LI, H. Q. et al. Pretreatment on *Miscanthus lutarioriparius* by liquid hot water for efficient ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1-10, 2013.
- MACHIDA, M. et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v. 438, p. 1157-1161, 2005.
- MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 391-414, 1969.
- MATHEW, S.; ABRAHAM, E. Studies on the production of feruloyl esterase from cereal brans and sugar cane bagasse by microbial fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 565-570, 2005.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MITCHELL, D. J. et al. Effect of the degree of acetylation on the enzymatic digestion of acetylated xylans. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 10, p. 111-121, 1990.
- MUKHERJEE, G. et al. Ferulic acid esterase production by *Streptomyces* sp. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 211-213, 2007.
- NELSON, D. L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

- ODA, K. et al. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3448-3457, 2006.
- PANAGIOTOU, G.; OLAVARRIA, R.; OLSSON, L. *Penicillium brasilianum* as an enzyme factory; the essential role of feruloyl esterases for the hydrolysis of the plant cell wall. **Journal of Biotechnology**, v. 130, p. 219-228, 2007.
- PAYNE, G. A. et al. Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. **Medical Mycology**, v. 44, p 9-11, 2006.
- PEREIRA, B. M. P. et al. Cellulase on-site production from sugar cane bagasse using *Penicillium echinulatum*. **BioEnergy Research**, v. 6, p. 1052-1062, 2013.
- RALET, M. C. et al. Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*. **Carbohydrate Research**, v. 263, p. 257-269, 1994.
- ROCHA, G. J. M. et al. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 275-279, 2012.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3.ed. Cold Spring Harbor: CSH Laboratory Press, 2001. 2100p.
- SHARMA, R. et al. Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 2083-2094, 2009.
- SHIN, H. D.; CHEN, R. R. Production and characterization of a type B feruloyl esterase from *Fusarium proliferatum* NRRL 26517. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 478-485, 2006.
- SHIN, H. D. et al. A complete enzymatic recovery of ferulic acid from corn residues with extracellular enzymes from *Neosartorya spinosa* NRRL185. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, n. 6, 2006.
- SIPOS, B. et al. Characterisation of specific activities and hydrolytic properties of cell-wall-degrading enzymes produced by *Trichoderma reesei* Rut C30 on different carbon sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 347-364, 2010.
- SPECHT, C. A. et al. A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytical Biochemistry**, v. 119, n.1, p 158-163, 1982.
- STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 433-443, jun. 2008.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

SWEENEY, M. D.; XU, F. Biomass converting enzymes as industrial biocatalysts for fuels and chemicals: recent developments. **Catalysts**, v. 2, p. 244-263, 2012.

SZWAJGIER, D. JAKUBCZYK, A. Production of extracellular ferulic acid esterases by *Lactobacillus* strains using natural and synthetic carbon sources. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 10, n. 3, p. 287-302, 2011.

TENKANEN, M. et al. Production, purification and characterization of an esterase liberating phenolic acids from lignocellulosics. *Journal of Biotechnology*, v. 18, p. 69-83, 1991.

THE WORLD BANK. **Fossil fuel energy consumption**. Disponível em: <<http://data.worldbank.org/indicator/EG.USE.COMM.FO.ZS/countries?display=graph>>. Acesso em: 27 nov. 2013.

TOPAKAS, E.; VAFIADI, C.; CHRISTAKOPOULOS, P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 497-509, 2007.

TRZCIŃSKA, M. et al. Possibility of applying feruloyl esterase from *Aspergillus niger* A.n.8 for degradation of a cell wall complex in selected cereals. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 14/55, n. 2, p. 171-176, 2005.

UDATHA, D. B. R. K et al. Common and distant structural characteristics of feruloyl esterase families from *Aspergillus oryzae*. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-14, 2012.

VAFIADI, C. et al. The feruloyl esterase system of *Talaromyces stipitatus*: determining the hydrolytic and synthetic specificity of TsFaeC. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 210-221, 2006.

VENEGAS, I. M. et al. Characteristics of *Aspergillus niger* xylanases produced on rice husk and wheat bran in submerged culture and solid-state fermentation for an applicability proposal. **International Journal of Food Science and Technology**, v., 48, p. 1798-1807, 2013.

WALDRON, K.W.; FAULDS, C.B. Cell wall polysaccharides: composition and structure. In: KAMERLING, J.P. **Comprehensive glycoscience**: from chemistry to system biology. Oxford: Elsevier, 2007.

WANG, X. et al. Release of ferulic acid from wheat bran by an inducible feruloyl esterase from an intestinal bacterium *Lactobacillus acidophilus*. **Food Science and Technology Research**, v. 11, n. 3, p. 241-247, 2005.

WATANABE, J. et al. Loss of *Aspergillus oryzae amyR* function indirectly affects hemicellulolytic and cellulolytic enzyme production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, p. 408-413, 2011.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS et al. **PCR protocols**: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, Inc., 1990.

WILLIAMSON, G.; KROON, P. A.; FAULDS, C. B. Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases. **Microbiology**, v. 144, p. 2011-2023, 1998.

WONG, D. W. S. Feruloyl esterase: a key enzyme in biomass degradation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 133, p. 87-112, out. 2006.

WYMAN, C. E. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 50, p. 3-15, 1994.

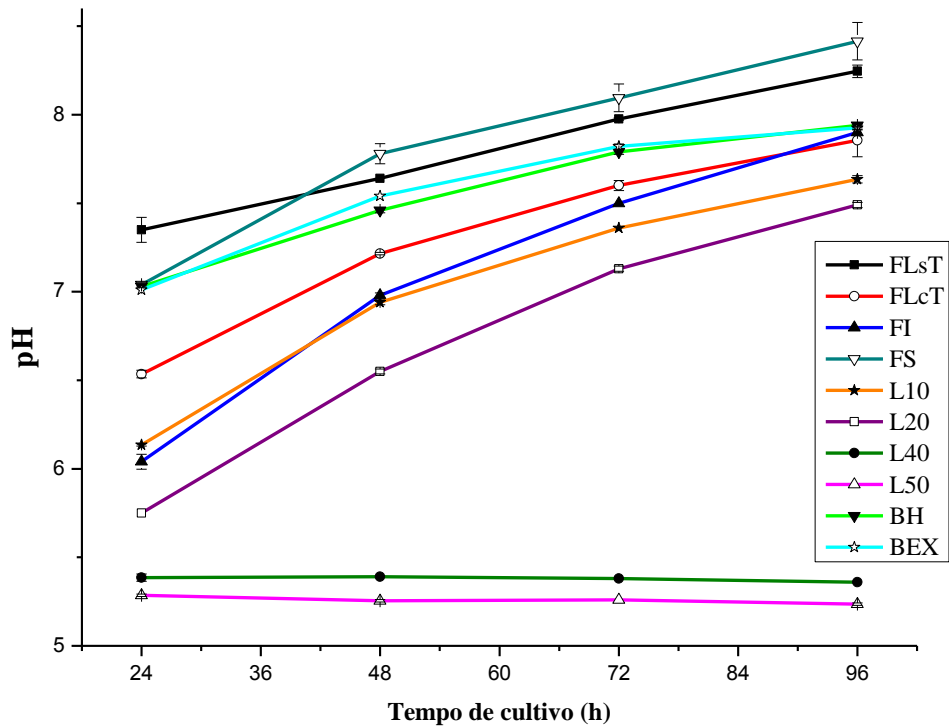
YUE, Q. et al. A comparison of HPLC and spectrophotometrical methods to determine the activity of ferulic acid esterase in commercial enzyme products and rumen contents of steers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 153, p. 169–177, 2009.

ZERINGUE, H. J. Identification and effects of maize silk volatiles on cultures of *Aspergillus flavus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 921-925, 2000.

ZHANG, Y. H. P.; HONG, J.; YE, X. Cellulase assays. **Methods in Molecular Biology**, v. 581, p. 213-231, 2009.

## APÊNDICE A - MONITORAMENTO DE pH

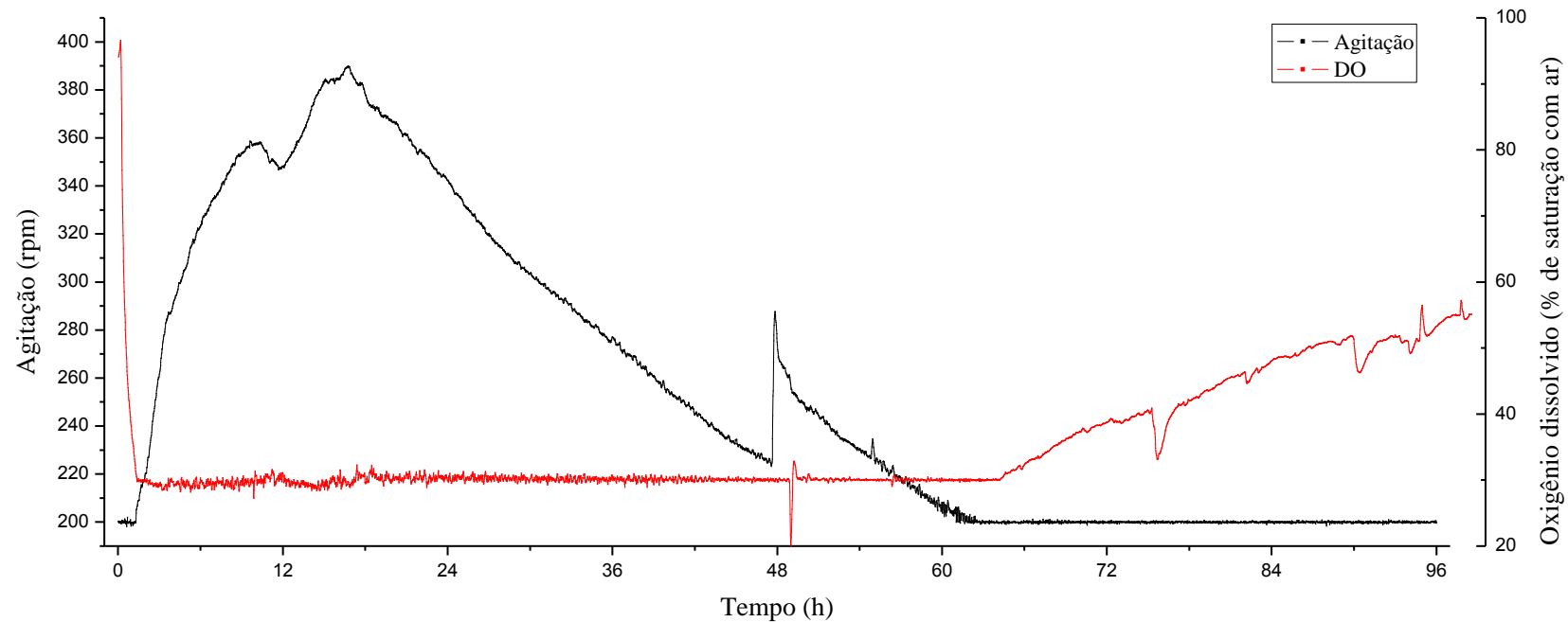
No ensaio de avaliação do efeito de fontes de carbono sobre a produção das enzimas de interesse (item 4.4), foi realizado o monitoramento do pH ao longo do cultivo do fungo P21C3 (**Figura A1**).



**Figura A1** – Monitoramento do pH ao longo do cultivo em shaker do fungo P21C3 durante ensaio para avaliação do efeito de fontes de carbono sobre a produção de xilanase e FAE.

## APÊNDICE B – PERFIS DE AGITAÇÃO E OXIGÊNIO DISSOLVIDO EM BIORREATOR

Nos ensaios de cultivo em reator convencional de tanque agitado (item 4.5.1), os três fungos P21C3, P27C3 e P6B2 apresentaram um perfil muito parecido de crescimento, considerando os parâmetros agitação e oxigênio dissolvido. Para manter o nível de oxigênio dissolvido em 30% de saturação de ar, foi empregada uma cascata com ajuste automático da agitação e da vazão de ar. Na **Figura A2**, estão apresentadas as curvas de agitação e de oxigênio dissolvido (DO) ao longo de uma batelada com o fungo P21C3, a partir das quais se pode ter uma ideia sobre o consumo de oxigênio.



**Figura A2** – Perfis de agitação (rpm) e oxigênio dissolvido (% de saturação com ar) ao longo do cultivo do fungo P21C3 em biorreator convencional.

A variação em 48 horas ocorreu devido a um procedimento para desobstrução da sonda de oxigênio dissolvido.