



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC**

**DESENVOLVIMENTO DE COQUETÉIS ENZIMÁTICOS A PARTIR DE
DIFERENTES FUNGOS FILAMENTOSOS E APLICAÇÃO NA
HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**

Pamella Suely Santa Rosa Pimentel

Orientadores: Dr. Nei Pereira Jr
Dr. Spartaco Astolfi Filho

Manaus, 2019

PAMELLA SUELY SANTA ROSA PIMENTEL

**DESENVOLVIMENTO DE COQUETÉIS ENZIMÁTICOS A PARTIR DE
DIFERENTES FUNGOS FILAMENTOSOS E APLICAÇÃO NA
HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia-PPGBIOTEC da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito para obtenção do título de Doutor em biotecnologia.

Manaus, 2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P644d Pimentel, Pamella Suely Santa Rosa
Desenvolvimento de coquetéis enzimáticos a partir de diferentes fungos filamentosos e aplicação na hidrólise da biomassa lignocelulósica / Pamella Suely Santa Rosa Pimentel. 2019
117 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Nei Pereira Junior
Coorientador: Spartaco Astolfi Filho
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Produção enzimática. 2. Otimização. 3. Caracterização. 4. Misturas enzimáticas. 5. Hidrólise. I. Pereira Junior, Nei II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

*À Deus, fonte de paz;
À minha querida mãe pela educação, e
dedicação de sua vida à minha, sempre;
Ao meu esposo com amor e gratidão por
sua compreensão, presença e apoio no
decorrer da elaboração deste trabalho.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus bondoso, que por sua graça me concedeu saúde, força, coragem e sabedoria para alcançar meus objetivos. Agradeço também a minha família, minha mãe e meu esposo, pelo amor, incentivo, compreensão nas ausências e apoio incondicional.

Ao meu orientador prof. Dr. Nei Pereira Jr, pela disponibilidade, confiança depositada, pela paciência, pelos ensinamentos, críticas e sugestões.

Ao meu coorientador professor Dr. Spartaco Astolfi-Filho, pela oportunidade de ter trabalhado sob sua direção, por todo incentivo e encorajamento recebido.

Aos professores Dr.Carlos Gustavo Nunes-silva, e Dr. Edmar Andrade, pelo apoio e direcionamento em algumas etapas deste trabalho.

A profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues, pela gentileza e apoio prestado em ensinamentos de planejamentos de experimentos.

Ao programa Sinapse da Inovação, pela oportunidade de desenvolver um projeto de empreendimento, e pelos treinamentos recebidos. Agradeço também à FAPEAM que por meio do Sinapse viabilizou financeiramente o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por fomentar a pesquisa por meio da bolsa de estudo de doutorado recebida.

Ao Laboratório de Bioprocessos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro -Ladebio, por todo apoio concedido, na padronização de técnicas, treinamentos, e por todo aprendizado lá adquirido, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao laboratório de Abertura de Amostras e Ensaio Químicos -LAEQ da Central Analítica-CA da Universidade Federal do Amazonas, por conceder o uso de equipamentos e espaço para a quantificação das biomassas vegetais.

Ao prof. Dr. Adolfo Mota, a MsC Suelen Dias, e a Dra. Enedina, um agradecimento especial, pela colaboração na identificação molecular dos fungos estudados nesta tese.

Aos colegas e colaboradores de pesquisa da Amazonzyme, Msc. Anita Souza, Dr. Edson Carmo e Biotecnol. Jessica Batista, pelas discussões científicas, ajuda e sugestões.

Aos colegas dos Laboratórios de Microbiologia Industrial e Fermentações, Laboratório de Biologia Molecular, e companheiros de café: Lanna Lôbo, Samanta Gabrielly, Hayssa Nunes, Luciana Belmont, obrigada pela amizade, pelos momentos de discussão de nossos trabalhos e também pelos momentos de descontração. Saudações de café e mandioca.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desse trabalho, meu muito obrigada!

*“Mera mudança não é crescimento.
Crescimento é a síntese de mudança e
continuidade, e onde não há continuidade
não há crescimento.”*

C.S. Lewis

RESUMO

A utilização da biomassa tem emergido como uma das principais estratégias para geração de biocombustíveis renováveis. E as biorefinarias do segmento demandam coquetéis enzimáticos de eficiência aprimorada para geração açúcares fermentescíveis. Neste cenário, os fungos lignocelulolíticos possuem um enorme potencial para o desenvolvimento de plataformas enzimáticas eficientes. Nesse trabalho, duas amostras fúngicas LMI01 e LMI03 isoladas do ambiente na região amazônica foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. A formulação completa do meio de fermentação para produção de celulasas e xilanases por estes isolados foi otimizada utilizando técnicas do planejamento experimental e superfície de resposta, onde se reduziu a quantidade de reagentes ao mesmo tempo em que se alcançou um aumento significativo na produção enzimática. O perfil eletroforético do extrato enzimático bruto do fungo *Penicillium* LMI01 apresenta proteínas com atividade celulolítica de massa molecular aproximada entre ~100kDa a 50kDa e de 35kDa, e o fungo *Aspergillus* LMI03 produz celulasas de ~80 a 52kDa, 37kDa e ~29kDa. Os parâmetros cinéticos das atividades enzimáticas aparentes de *Penicillium* LMI01 possuem $K_m=17,95 \text{ g/L}^{-1}$ $V_{m\acute{a}x}=39,84 \text{ g/L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (CMCásica), $K_m=1,67 \text{ mMol/L}^{-1}$ $V_{m\acute{a}x}=0,485 \text{ mMol/L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (betaglucosidásica), $K_m=12,54 \text{ g/L}^{-1}$ $V_{m\acute{a}x}=270,02 \text{ g/L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (xilanásica) e as atividades aparentes CMCásica, betaglucosidásica e xilanásica de *Aspergillus* LMI03 apresentam valores de K_m : $64,50 \text{ g/L}^{-1}$, $2,17 \text{ mMol/L}^{-1}$, 18 g/L^{-1} e velocidades máximas de: $147,06 \text{ g/L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $0,95 \text{ mMol/L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $625 \text{ g/L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectivamente. O coquetel enzimático otimizado para hidrólise da biomassa polpa de celulose (coquetel UFAM1) é composto por 43% de extrato enzimático de *Aspergillus sp* LMI03 e 57% de *T. reesei* QM9414, e o coquetel ótimo para hidrólise da casca de mandioca (coquetel UFAM 2) é formado por 50% de extrato enzimático de *Aspergillus sp* LMI03, 25% de *P.citrinum* e 25% de *T. reesei*. A relação entre carga de sólido e proteína para atuação do coquetel UFAM1 é de 52g/L de sólido e 30mg de proteína/g com eficiência hidrolítica de 93,2%. Para o coquetel UFAM2, a eficiência hidrolítica foi de 75,0% para relação otimizada de 78g/L de sólido e 19mg de proteína/g de sólido. Esses resultados indicam que os coquetéis formulados com os extratos enzimáticos proteicos de *P.citrinum* LMI01, *Aspergillus sp* LMI03 e *T. reesei* podem ser uma alternativa para hidrólise de biomassas vegetais e para outros processos que dependem de biocatálise.

ABSTRACT

The use of biomass has emerged as one of the main strategies for the generation of renewable biofuels and chemicals. In addition, lignocellulosic biorefineries demand enzymatic cocktails of improved efficiency for generating fermentable sugars. In this scenario, lignocellulolytic fungi have enormous potential for the development of efficient enzymatic cocktails. In this work two fungal samples LMI01 and LMI03 isolated from the environment in the Amazon region and identified as belonging to the genera *Penicillium* and *Aspergillus*, had the fermentation medium optimized for a higher production of cellulases and xylanases. The complete formulation of the fermentation medium for the production of cellulases and xylanases by these isolates was optimized using experimental design and response surface techniques, where the amount of reagents was reduced at the same time as a significant increase in the enzymatic production was achieved. The electrophoretic profile of the enzymatic crude extracts of the *Penicillium* LMI01 fungus presents proteins with cellulolytic activity of approximate molecular mass ~100kDa to 50kDa e 35kDa, and the *Aspergillus* LMI03 fungus produces cellulases of ~80 a 52kDa, 37kDa e ~29kDa. The kinetic parameters of the apparent enzymatic activities of *Penicillium* LMI01 have: $K_m=17,95 \text{ g/L}^{-1}$ $V_{m\acute{a}x} =39,84 \text{ g/L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (CMCase), $K_m= 1,67 \text{ mMol/L}^{-1}$ $V_{m\acute{a}x} = 0,485 \text{ mMol/L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (β -glucosidase), $K_m= 12,54 \text{ g/L}^{-1}$ $V_{m\acute{a}x} = 270,02 \text{ g/L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (xylanase). Moreover, apparent activities CMCase, β -glucosidase and xylanase of *Aspergillus* LMI03 showed values of K_m : 64, 50 g/L^{-1} , 2, 17 mMol/L^{-1} , 18 g/L^{-1} and maximum velocities: 147, 06 $\text{g/L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, 0, 95 $\text{mMol/L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, 625 $\text{g/L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectively. The optimized enzymatic cocktail for enzymatic hydrolysis of the pretreated pulp cellulose (cocktail UFAM1) is composed of 43% enzymatic extract of *Aspergillus sp* LMI03 and 57% of *T. reesei* QM9414, and the optimum cocktail for enzymatic hydrolysis of cassava husk (cocktail UFAM 2) consists of 50% enzymatic extract of *Aspergillus sp* LMI03, 25% *P.citrinum* and 25% *T. reesei*. The solid protein load is 52g / L of solid and 30mg of protein / g of substrate for cocktail UFAM1 with EH yield of 93,2%. For the cocktail UFAM2, the EH yield was 75,0 % for an optimized loading of 78g / L of solid and 19mg of protein / g of substrate for cocktail UFAM2. These results indicate that the enzymatic cocktails formulated with the proteic enzymatic extracts of *P.citrinum* LMI01, *Aspergillus sp* LMI03 and *T. reesei* may be an interesting alternative for hydrolysis of pretreated or untreated plant biomasses and for other processes that depend on biocatalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da estrutura do complexo lignocelulósico	22
Figura 2 - Esquema da degradação enzimática da celulose e da hemicelulose	27
Figura 3- Esquema simplificado da degradação da celulose	29
Figura 4- Biomassas vegetais utilizadas	50
Figura 5- Etapas para a concentração dos extratos enzimáticos	52
Figura 6 - imagem ilustrativa dos preparados enzimáticos otimizados	54
Figura 7- Curvas de calibração determinadas pelo método DNS	58
Figura 8 - Curvas de calibração de glicose determinadas com reagente GOD	58
Figura 9 - Curva de calibração para determinação proteínas totais	59
Figura 10 - Imagens representativas do fungo <i>Penicillium citrinum</i> LMI01	61
Figura 11 - Imagens representativas do fungo <i>Aspergillus sp</i> LMI03	61
Figura 12 – Perfil de produção enzimática por <i>P.citrinum</i> LMI 01	64
Figura 13 -Perfil de produção das enzimas por <i>Aspergillus sp</i> LMI03	65
Figura 14 - Perfil de produção das enzimas por <i>T. reesei</i> QM9414	67
Figura 15 - Diagrama de Pareto do delineamento Screening - <i>Plackett & Burman</i> para LMI01	69
Figura 16 - Diagrama de Pareto com os efeitos <i>Plackett & Burman</i> para LMI01	71
Figura 17 - Superfícies de resposta – CMCases- LMI01	74
Figura 18 - Superfícies de resposta – betaglucosidases – LMI01	75
Figura 19 - Superfícies de respostas –Xilanases – LMI01	76
Figura 20 - Níveis de atividades enzimáticas nas etapas de delineamentos – LMI01	77
Figura 21 - Superfícies de resposta da função <i>Desirability</i> para otimização LMI01	78
Figura 22 - Diagrama de Pareto delineamento <i>Screening - Plackett & Burman</i> para LMI03	78
Figura 23 - Acompanhamento das atividades enzimáticas nos ensaios do delineamento PB II	81
Figura 24 - Gráfico de Pareto do delineamento fatorial fracionado -LMI03	84
Figura 25 - Superfícies de respostas enzimática LMI03	87
Figura 26 – Níveis de atividades enzimática nas etapas de delineamento experimentais	88
Figura 27 - Superfície de resposta da função <i>Desirability</i> -LMI03	89
Figura 28 - Faixas ótimas de pH e temperatura ótima para celulases e xilanases de LMI03	90
Figura 29 - Estabilidade térmica das atividades enzimáticas de LMI03	91
Figura 30 - Características de atuação de xilanases produzidas por LMI01	92
Figura 31- Efeito de íons metais sobre as atividades enzimáticas de LMI01 e LMI03	93
Figura 32-Gráficos de Michaelis-Menten para celulases e xilanases de LMI01	95
Figura 33- Gráficos de Michaelis-Menten para celulases e xilanases de LMI03	96
Figura 34 - Perfil eletroforético de proteínas e zimograma para celulases	98
Figura 35 - Gráficos de Pareto do design <i>simplex centroid</i>	102
Figura 36 - Superfícies de contorno para os modelos quadráticos do <i>design</i> de mistura	103

Figura 37 - Eficiência hidrolítica das plataformas enzimáticas individuais e das misturas otimizadas	106
Figura 38-Superfícies de resposta para otimização do carregamento sólido/proteína – coquetel UFAM1	107
Figura 39- Superfícies de resposta para produção de glicose g/L e eficiência hidrolítica %	108
Figura 40- Produção de glicose (g/L) e eficiência hidrolítica (%) após 48h de hidrólise a 30°C	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Nomes de celulases, códigos EC e Famílias	24
Tabela 2 - Nomes de xilanases, códigos EC e Famílias	25
Tabela3- Divisão de subfamílias e atividades conhecidas nas famílias AA	30
Tabela4-Aplicações industriais de celulases e xilanases	34
Tabela 5 - Padronização do inóculo nas etapas dos delineamentos experimentais	42
Tabela 6 - Níveis das variáveis para o delineamento Plackett & Burman etapa 1	44
Tabela 7 - Fatores e níveis do segundo PB – Isolado LMI01	44
Tabela 8 - Fatores e níveis do segundo PB – Isolado LMI03	45
Tabela 9- Fatores e níveis do fatorial fracionado 24-1 para o isolado LMI01	45
Tabela 10 - Fatores e níveis do fatorial fracionado 26-2 para LMI03	46
Tabela 11 Fatores e níveis do DCCR para o isolado LMI01	46
Tabela 12 Fatores e níveis do DCCR para o isolado LMI03	46
Tabela 13 - Combinações de fosfato e ácido cítrico para obtenção do tampão nos pH's requerido	47
Tabela 14- Matriz do design <i>Simplex-centroid</i> e soma total das misturas dos componentes	53
Tabela 15- Fatores e níveis do DCCR para otimização do carregamento sólido/ proteína	55
Tabela 16 -Identificação molecular do isolado LMI01 após alinhamento da sequência de nucleotídeos	62
Tabela 17- Alinhamento da sequência de nucleotídeos do isolado LMI03	63
Tabela 18 - Composição das biomassas vegetais utilizadas	68
Tabela 19-ANOVA para a resposta: atividade CMCásica de <i>P. citrinum</i> LMI01	72
Tabela 20 - ANOVA para a resposta: Atividade betaglucosidásica de <i>P.citrinum</i> LMI01	73
Tabela 21-ANOVA para a resposta: atividade xilanásica de <i>P.citrinum</i> LMI01	73
Tabela 22 - Condições dos componentes do meio utilizados para validação do modelo	79
Tabela 23 - Resultados experimentais e valores preditos pela função <i>Desirability</i>	79
Tabela 24-Meio otimizado para produção de celulases e xilanases por <i>P.citrinum</i> LMI01	79
Tabela 25-Efeitos sobre a atividade CMCásica no PB II para <i>Aspergillus sp</i> LMI03	82
Tabela 26-Efeitos sobre a atividade betaglucosidásica no PB II para <i>Aspergillus sp</i> LMI03	83
Tabela 27-Efeitos sobre a atividade xilanásica no PB II para <i>Aspergillus sp</i> LMI03	83
Tabela 28- ANOVA para atividade CMCásica	85
Tabela 29- ANOVA para atividade betaglucosidásica	85
Tabela 30- ANOVA para a atividade xilanásica	85
Tabela 31 -Condições ótimas previstas pela função <i>Desirability</i>	89
Tabela 32- Valores experimentais e preditos pela função <i>Desirability</i>	89
Tabela 33 - Composição do meio otimizado para produção de celulases e xilanases por <i>Aspergillus sp</i> LMI03	90
Tabela 34- Atividades enzimáticas nos extratos bruto e concentrado	99
Tabela 35-Concentração de proteínas totais nos extratos enzimáticos concentrados	100
Tabela 36- Resultados do Design <i>simplex-centroid</i> para hidrólise da polpa de celulose (25g/L)	100

Tabela 37-Resultados do Design <i>simplex-centroid</i> para hidrólise da casca de mandioca (25g/L)	101
Tabela 38 - Resultados da validação da otimização dos coquetéis	103
Tabela 39- Atividades enzimáticas e proteína total nas formulações otimizadas	104
Tabela 40-Resultados do DCCR para o carregamento sólido/proteína utilizando o coquetel UFAM1	107
Tabela 41-Resultados do DCCR para o carregamento sólido/proteína utilizando o coquetel UFAM2	108
Tabela 42- Resultados da validação da otimização da proporção sólido /proteína	109

ABREVIACÕES

ANOVA: análise de variância

BDA: batata dextrose ágar

BLAST: basic local alignment search toll

BSA: *bovine serum albumin* (albumina de soro bovino)

CAZY: carbohydrate-active enzymes data base

CMC: carboximetilcelulose

CMCASE: atividade enzimática em CMC

DNS: Ácido 3,5-Dinitrosalicílico

EC: enzyme commission

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EH: eficiência hidrolítica

FPASE: atividade enzimática em papel de filtro

GH: glicosil hidrolases

GOD: glicose oxidase

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada

kDa: kiloDalton

K_M : constante de Michaelis

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PCR: polymerase chain reaction

Q.M.: quadrado médio

r DNA : DNA ribossomal

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio

$V_{m\acute{a}x}$: velocidade máxima

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO	17
-------------------------	-----------

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA	21
------------------------------------	-----------

2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	21
2.2 ENZIMAS CELULOLÍTICAS E XILANOLÍTICAS	22
2.2.1 Celulases	23
2.2.2 Xilanases	25
2.3 CELULASES E XILANASES NA DEGRADAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	26
2.4 ATIVIDADES AUXILIARES.....	27
2.5 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS.....	31
2.6 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE CELULASES E XILANASES.....	33

CAPÍTULO 3

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	37
--	-----------

OBJETIVO GERAL:	37
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37

CAPÍTULO 4

MATERIAL E MÉTODOS	39
---------------------------------	-----------

4.1. MICRORGANISMOS.....	39
4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS LMI01 E LMI03.....	40
4.3 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	41
4.4 AVALIAÇÃO DA FONTE DE CARBONO CELULÓSICA PARA PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA	42
4.5 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS – DOE´S	43
4.5.1 Delineamento Plackett & Burman	43
4.5.2 Delineamento Fatorial fracionado.....	45
4.5.3 Delineamento Composto Central Rotacional - DCCR.....	46

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS ENZIMÁTICOS DE LMI01 E LMI03.....	47
4.6.1 Avaliação da faixa de pH ótimo.....	47
4.6.2 Avaliação da temperatura ótima e Estabilidade Térmica.....	48
4.6.3 Efeito de íons metais nas atividades enzimáticas.....	48
4.6.4. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	48
4.6.5 Avaliação do perfil eletroforético.	49
4.7 QUANTIFICAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO DAS BIOMASSAS VEGETAIS.....	49
4.8 ELABORAÇÃO DOS COQUETÉIS ENZIMÁTICOS	51
4.8.1 Preparação e concentração dos extratos enzimáticos.....	51
4.8.2 Formulação dos coquetéis enzimáticos.....	52
4.8.3 Hidrólise enzimática das biomassas polpa de celulose e casca de mandioca	54
4.9 OTIMIZAÇÃO DA PROPORÇÃO DE SÓLIDO E CARREGAMENTO PROTEICO.....	54
4.10 ENSAIOS ENZIMÁTICOS E DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL	55
4.10.1 – Atividade CMCásica (endoglucanases)	55
4.10.2 – Atividade betaglucosidásica.....	56
4.10.3 – Atividade em papel de filtro (FPASE).....	56
4.10.4 – Atividade de Xilanásica	57
4.10.5 – Determinação de proteínas totais	57
4.10.6 - Curvas de calibração	57
4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	59

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS LMI01 E LMI03.....	60
5.1.3 Identificação molecular.....	61
5.2 - AVALIAÇÃO DA FONTE DE CARBONO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA.	63
5.3 COMPOSIÇÃO DAS BIOMASSAS UTILIZADAS	67
5.4 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE LMI01	68
5.4.1 Validação experimental das condições ótimas.....	78
5.5 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE LMI03.....	79
5.5.1 Validação experimental das condições ótimas	88
5.6 PRODUÇÃO DE BETAGLUCOSIDASE E CMCASE TERMOESTÁVEIS POR PENICILLIUM SP LMI01 ISOLADO DA REGIÃO AMAZÔNICA.....	90

5.7 CARACTERIZAÇÃO E CINÉTICA ENZIMÁTICA DE CELULASES E XILANASES	89
5.7.1 pH e Temperatura ótima, e estabilidade térmica	89
5.7.2 Efeito de íons metais	92
5.7.3 Parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$	93
5.7.4 Perfil eletroforético e zimograma para celulasas.	97
5.8 FORMULAÇÃO DOS COQUETÉIS ENZIMÁTICOS	99
5.8.1 Validação da otimização dos coquetéis enzimáticos	103
5.9 .. OTIMIZAÇÃO DA PROPORÇÃO DE SÓLIDO E CARREGAMENTO PROTEICO PARA HIDRÓLISE DE BIOMASSA VEGETAL.	106
5.9.1 Validação da otimização do carregamento sólido/proteína	109

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

Capítulo 1

Introdução

A Amazônia é detentora de rica biodiversidade microbiana e representa uma fonte de novas enzimas para gerar processos eficientes em diversos setores industriais. No cenário atual, existe um desafio de tornar o bioetanol economicamente viável em escala industrial, logo, pesquisas e inovação voltadas para o processo de conversão da biomassa são fundamentais para o desenvolvimento de tecnologias próprias e fortalecimento da produção de biocombustíveis no país. E neste contexto, a utilização da biomassa tem sido uma alternativa para a redução da dependência de combustíveis fósseis, cujas reservas estão desaparecendo gradativamente. Pode-se definir biomassa do ponto de vista energético, como qualquer matéria orgânica, que possa ser transformada em energia térmica, mecânica ou elétrica.

As biomassas vegetais como, por exemplo, resíduos agrícolas, do processamento de mandioca, bagaço ou farelo de mandioca, palha de arroz, farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e etc., tem emergido como uma das principais estratégias para geração de biocombustíveis obtidos por via enzimática. O principal componente da biomassa é a matéria lignocelulósica. Segundo Jeffries (1990), as biomassas lignocelulósicas são constituídas por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, as quais são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa, resistente a ataques microbianos. A lignina confere rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais.

De acordo com Xu e colaboradores (2007) as frações fermentáveis de matérias-primas de origem vegetal incluem: Celulose que é um homopolímero linear não ramificado constituído por cerca de 10 a 15 mil unidades de glicose, cristalina, insolúvel em água e altamente resistente a despolimerização, na celulose as unidades de glicose estão unidas por ligações glicosídicas do tipo (β 1-4). A hemicelulose é uma fração substancial heterogênea composta de xilose e açúcares menores de cinco e seis carbonos, composta por vários polissacarídeos ramificados e suas unidades monoméricas que a constituem são: pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e desoxiexoses, sendo a xilose a pentose predominante (BECKHAM, 2011).

As enzimas capazes de desconstruir as moléculas de celulose e gerar açúcares fermentescíveis são uma parte fundamental no processo biológico de obtenção de etanol a partir

da biomassa, e a viabilidade destes biocatalisadores precisa estar relacionada com alta eficiência de conversão a baixos custos de produção. Neste sentido, quanto mais potente e eficiente for um coquetel enzimático mais econômico será o processo de sacarificação da biomassa (produção de açúcares a partir de material vegetal). Uma das estratégias para se aumentar os níveis de produção das enzimas por microrganismo é a otimização do processo de fermentação. A maioria das enzimas utilizadas no setor de biocombustíveis no Brasil assim como em outros setores (indústrias: têxtil e de detergentes) vem de empresas estrangeiras; logo, o desenvolvimento de processos eficientes com novas fontes de enzimas representa um potencial inovador.

Muitos países principalmente os Estados Unidos têm investido fortemente em tecnologia na produção do etanol de segunda geração para tornar seu uso viável. Alguns dos principais centros de pesquisas como o *National Renewable Energy Laboratory* (NREL), e algumas empresas como a Genecor nos EUA e Novozymes na Europa estão focando suas pesquisas em busca de soluções para: pré-tratamento da biomassa, otimização, diminuição do custo da hidrólise enzimática, produção de misturas de enzimas, e maximização da conversão de açúcares (incluindo pentoses) a etanol.

Em um contexto mundial, o Brasil possui elevada potencialidade no quesito fontes renováveis, uma vez que é um dos maiores produtores de biomassa lignocelulósica como os oriundos da produtividade agrícola (cana-de-açúcar, soja, arroz, etc.). Portanto, é fundamental para o Brasil o desenvolvimento de pesquisas voltadas para os processos de conversão da celulose, desenvolvendo tecnologias próprias, que poderão ser transferidas para indústrias e empresas e assim fortalecer a participação do país na produção de biocombustíveis.

O texto desta tese inicia-se com uma revisão da literatura, abordando as principais informações a respeito das pesquisas voltadas para utilização de biomassa como recurso energético, enzimas envolvidas na degradação de biomassa lignocelulósica, microrganismos produtores destas enzimas, e as principais aplicações industriais de enzimas microbianas nos setores que envolvem hidrólise de materiais de conteúdo lignocelulósico. Em seguida apresenta-se a justificativa e importância desta pesquisa, e os objetivos propostos. O material e métodos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos no capítulo 4. No capítulo 5 são apresentados os resultados finais e discussões a respeito das constatações feitas, embasando-se na literatura disponível. Em seguida é apresentado as perspectivas futuras. E finalmente apresenta-se as referências bibliográficas utilizadas para o embasamento teórico e construção do conhecimento, para desenvolvimento desta pesquisa.

No âmbito de desenvolvimento da pesquisa desta tese, foi possível a divulgação de trabalhos científicos, tanto partes integrais da tese, como do resultado de coorientação de iniciação científica, e do envolvimento em trabalhos de pesquisa realizados no Centro de Apoio Multidisciplinar na UFAM relacionados com enzimas celulolíticas, bioprospecção e caracterização. Os trabalhos e estão descritos abaixo:

Artigos completos:

SANTA-ROSA, P.S., SOUZA, A.L., ROQUE, R.A, ANDRADE, E.V., ASTOLFI-FILHO S., MOTA, A.J., NUNES-SILVA, C.G. **Production of thermostable β -glucosidase and CMCase by *Penicillium sp.* LMI01 isolated from the Amazon region.** Electronic Journal of Biotechnology, Volume 31, Pages 84-92, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.11.005>

OLIVEIRA, J.B., SANTA-ROSA, P. S., NUNES-SILVA, C. G. **Determination of the Physical-Chemical Characteristics of the Activity β -glucosidase Present in the Enzymatic Complex of *Aspergillus versicolor*.** Scientia Amazonia, S1, 94-103, 2018. Disponível em: <<http://scientia-amazonia.org/wp-content/uploads/2018/05/s1-94-103-2018.pdf>>

BÜCKER A., SILVA, I. F., PINHEIRO W. D., SOUZA I. F., MORAIS L.M., SANTA-ROSA P.S, NUNES-SILVA C.G. **Avaliação da atividade enzimática de fungos isolados do Bioma Amazônico/Evaluation of the enzymatic activity of fungi isolated from the Amazonian Biome.** Brazilian Applied Science Review, Curitiba, v. 2, n. 3, p. 779-787, jul./set. 2018. Disponível em: <<http://www.brjd.com.br/index.php/BASR/article/view/452>>

Trabalhos em eventos:

SANTA-ROSA P. S., OLIVEIRA J. B., BELMONT E. L. L., SILVA S. D., NUNES-SILVA C. G., **Perfil enzimático do fungo L3 Isolado de celulose reciclada e atuação sinérgica com enzimas de *Trichoderma reesei* comercial.** 7º Congresso sobre Diversidade Microbiana da Amazônia-CDMICRO/2018.

OLIVEIRA¹, J. B., SANTA-ROSA, P. S., BELMONT, E. L. NUNES-SILVA, C. G. **Determination of the physico-chemical characteristics of the cellulolytic activity by *Penicillium sp.* isolated from gut of aquatic insect** In: XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. ENZITEC 2018, Florianópolis-SC. Anais do XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. ENZITEC, 2018, disponível em: <<http://www.enzitecfloripa2018.com.br/site/anaiscomplementares2?AREA=3#D>>

BELMONT, E. L., OLIVEIRA¹, J. B, Mar, H. B., SANTA-ROSA, P. S, Hamada, N., NUNES-SILVA, C. G. Isolamento e potencial enzimático de fungos associados ao intestino de larvas de *Stenochironomus* (Insecta: Diptera: Chironomidae)” In 7º Congresso sobre Diversidade Microbiana da Amazônia, Manaus-AM. Anais do 7º Congresso sobre Diversidade Microbiana da Amazônia, 2018.

SANTA-ROSA P.S.P., OLIVEIRA, J.B., ASTOLFI-FILHO S., NUNES-SILVA C.G.
**Produção De β -Glucosidases Por *Aspergillus Versicolor* Utilizando Celulose
Microcristalina Como Fonte De Carbono.** In: 6º Congresso Sobre Diversidade Microbiana
Da Amazônia-Cdmicro, Manaus-AM. Anais Do 6º Congresso Sobre Diversidade Microbiana
Da Amazônia-Cdmicro, 2016.

Capítulo 2

Revisão da Literatura

2.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa vegetal pode ser obtida de fontes florestais como a madeira, ou vinda de rejeitos urbanos e industriais sólidos ou líquidos, ou pode ainda ser de origem agrícola como o arroz, milho, soja e cana de açúcar entre outros. Os materiais lignocelulósicos são os componentes mais abundantes da face do planeta, participam aproximadamente de 50% da biomassa terrestre, logo, a utilização desses resíduos, tem uma grande relevância e constitui um dos mais importantes tópicos da biotecnologia moderna (PEREIRA JR *et al.*, 2008).

As biomassas lignocelulósicas são formadas por três principais frações: macromoleculares: lignina, hemicelulose e celulose, as quais são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa, resistente a ataques microbianos (JEFFRIES, 1990). A lignina confere rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais. As frações fermentáveis destas matérias-primas incluem celulose (moléculas de glicose unidas entre si por ligações β -1,4-) e hemicelulose, uma fração substancial heterogênea composta de xilose e açúcares de cinco e seis carbonos (XU *et al.*, 2007).

A figura 1 apresenta um esquema representativo da estrutura da lignocelulose da biomassa vegetal. A celulose constitui cerca de 50% da composição desses materiais (SAJITH *et al.* 2016), sendo um homopolissacarídeo linear não ramificado constituído por cerca de 10 a 15 mil unidades de glicose. Grande parte da estrutura da celulose é cristalina, insolúvel em água e altamente resistente a despolimerização. As unidades monossacarídicas de glicose são unidas por ligação β 1-4 ao longo de cadeias da celulose cristalina e se apresentam invertidas com ângulo de 180° uma em relação à outra, fazendo que o dissacarídeo (celobiose) seja a unidade de repetição (BECKHAM, 2011; HORN *et al.*, 2012). A celulose possui uma estrutura organizada, na qual as cadeias estão intimamente unidas entre si por uma rede de ligações de hidrogênio intra e inter-moleculares forte e altamente complexa (ZHOU; Wu, 2012).

A hemicelulose é o segundo maior componente dos materiais vegetais, correspondendo, aproximadamente, 20-30% da biomassa vegetal. A hemicelulose é um heteropolissacarídeo ramificado composto, em sua grande maioria, por uma mistura de polissacarídeos de baixa

massa molecular: xilanas, arabinanas, arabinoxilanas, mananas e galactomananas. As unidades fundamentais (monômeros) são, basicamente, moléculas de D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose, L-arabinose, ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico, α -D-4-O- ácido metilglucurônico e também alguns produtos de oxidação, como por exemplo, acetatos (Pereira Jr et al., 2008; Sajith et al. 2016).

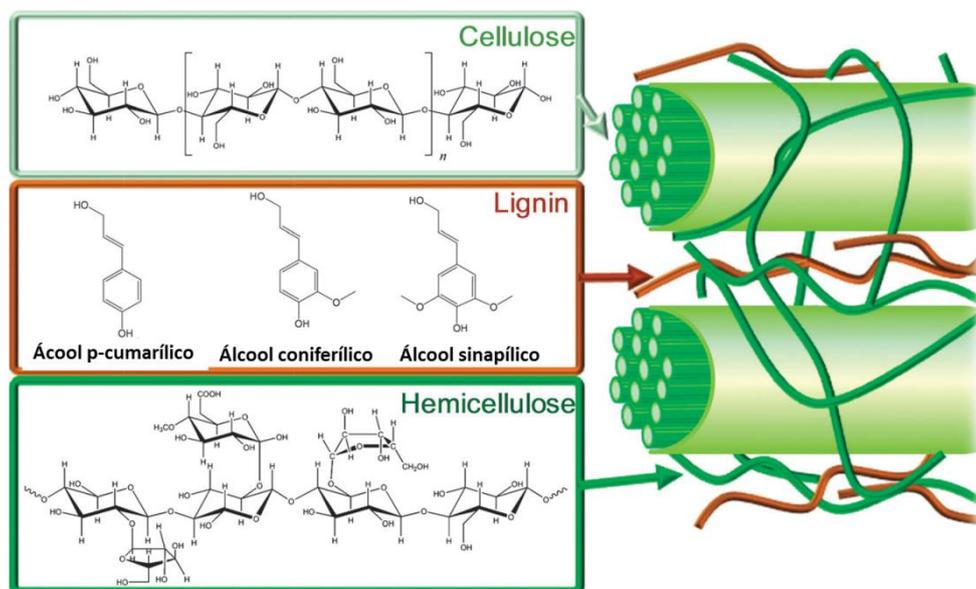


Figura 1 - Esquema da estrutura do complexo lignocelulósico. Celulose, hemicelulose e os precursores primários da lignina. Fonte: Alonso et al. (2012)

2.2 Enzimas celulolíticas e xilanolíticas

Celulases e xilanases são enzimas do complexo lignocelulolítico capazes de hidrolisar as porções polissacarídicas constituintes de materiais lignocelulósicos, como o homopolissacarídeo celulose, e o heteropolissacarídeo hemicelulose. Essas enzimas compõem um grupo de enzimas que atuam em conjunto para a completa degradação da biomassa vegetal. No processo de desconstrução da celulose existem outras proteínas que atuam sinergicamente com celulases promovendo a eficiência de enzimas celulolíticas agindo sobre as superfícies da celulose cristalina gerando quebras de cadeia nas cadeias de polissacarídeos através da clivagem oxidativa, e são tidas como proteínas auxiliares de celulases, ou proteínas acessórias (LYND *et al.*, 2002; TOLAN *et al.*, 2002; HORN *et al.*, 2012).

A importância industrial de celulases e xilanases se deve ao fato da ampla aplicabilidade em diversos setores, como na indústria de alimentos e bebidas, têxtil, polpa de celulose e papel, na agricultura, e no setor de biocombustíveis obtidos a partir de biomassa lignocelulósica. Considerando esse amplo uso de enzimas celulolíticas e xilanolíticas, e somando-se ao advento

crescente da necessidade de substituição de combustíveis fósseis por renováveis, estas enzimas irão tornar-se as enzimas de maior valor comercial, se o etanol, butanol ou qualquer outro produto de fermentação de açúcares, produzidos por enzimas a partir da biomassa, se tornar o principal combustível para transportes (BALSAN *et al.*, 2012).

De acordo com a IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), a classificação numérica para enzimas são os códigos que representam o número da Comissão de Enzima (*Enzyme Commission Number*), os números de EC não classificam enzimas, mas as reações catalisadas por elas, uma vez que essa classificação é baseada nas reações químicas que as enzimas catalisam. Os códigos EC podem ser aplicados apenas a enzimas cuja função tenha sido bioquimicamente identificada. Quando uma enzima catalisa mais de uma reação e se encaixam em mais de uma classe, devem conter mais de um número EC.

A classificação de enzimas baseando-se nas semelhanças de sequências de aminoácidos foi proposta por Henrissat (1997), por existir uma relação direta entre sequência de aminoácidos e semelhanças de dobramento. As glicosil-hidrolases (GH) são classificadas em mais de 100 famílias, cada família GH contém proteínas que são relacionadas por sequência e por dobra, assim é possível fazer várias previsões úteis, já que há muito tempo se observou que o mecanismo catalítico e o mecanismo molecular são conservados para a grande maioria das famílias de glicosidases (HENRISSAT, 1991; GEBLER *et al.*, 1992). As famílias de GH estão disponíveis no banco de dados do Carbohydrate Active Enzyme (CAZy) (LOMBARD *et al.* 2013).

2.2.1 Celulases

Dentro da classificação EC as celulases fazem parte do grupo EC 3.2.1 (glicosilhidrolases) que hidrolisam ligações glicosídicas entre carboidratos. Na tabela 1 está mostrada a classificação de enzimas com atividade de celulases de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia molecular (IUBMB). De um modo geral, conforme o local de atuação das enzimas na fibra de celulose, elas são designadas em três classes gerais:

- ✓ **Endoglucanases:** Agem nas regiões acessíveis da fibra celulósica (amorfos). Elas quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose, liberando oligossacarídeos de diversos tamanhos com terminais redutores e não redutores.
- ✓ **Exoglucanases:** Agem nos terminais redutores da fibra celulósica e sobre os novos terminais gerados pelas endoglucanases e liberam moléculas menores como dímeros de glicose (celobiose) e celodextrinas. São também chamadas de celobiohidrolases (CBH), e divididas

em dois tipos: CBH's do tipo I, que hidrolisam terminais redutores e CBH's do tipo II, que hidrolisam terminais não redutores.

✓ **β-glucosidases:** Completam a hidrólise da celulose, liberando D-glicose a partir das unidades dos produtos de reação liberados pelas exoglucanases, como celobiose, celodextrinas e outros oligossacarídeos solúveis com menos de sete unidades monoméricas.

Tabela 1- Nomes de Celulases, códigos EC e Famílias.

Número EC e Nome	Outros nomes	Reação catalisada	Famílias
3.2.1.4 Celulase	Endo-1,4-β-D-glucanase; β-1,4-glucanase; β-1,4-endoglucano hidrolase; Celulase A; Cellulosina AP; Endoglucanase D; Celulase alcalina; Celulase A 3; Celudextrinase; 9.5 celulase; Avicelase; Pancelase SS; 1,4-(1,3;1,4)-β-D-glucano 4-glucanohidrolase	Endohidrólise de ligações (1→4)-β-D-glicosídicas em celulose, liquenina e cereais β-D-glucanos. Hidrolisa as ligações 1,4 em β-D-glucanos contendo também ligações-1,3	5,6,7,8,9, 10, 1226, 44, 45, 48,51, 74, 124
3.2.1.91 Celulose 1,4-β-celobiohidrolase (extremidade não-redutora)	Exo-celobiohidrolase; β-1,4-glucano celobiohidrolase; β-1,4-glucano celobiosilhidrolase; 1,4-β-glucano celobiosidase; exoglucanase; avicelase; CBH 1; celulase C1; celobiohidrolase I; celobiohidrolase; exo-β-1,4-glucano celobiohidrolase; 1,4-β-D-glucano celobiohidrolase; celobiosidase.	Hidrólise de ligações (1→4)-β-D-glucosídica em celulose e celotetraose, liberando celobiose das extremidades não redutoras das cadeias	5, 6, 9
3.2.1.21 β-glucosidase	gentiobiase; celobiase; emulsina; elaterase; aril-β-glucosidase; β-D-glucosidase; β-glucoside glucohidrolase; arbutinase; amigdalina; <i>p</i> -nitrophenyl β-glucosidase; amigdalase; linamarase; salicilina; β-1,6-glucosidase.	Hidrolise de terminais, não-redutores β-D-glicosil com liberação de D-glicose	1,2,3,5, 9,30,39, 116
3.2.1.176 Celulose 1,4-β-celobiohidrolase (terminais redutores)	CelS; CelSS; endoglucanase SS; celulase SS; celobiohidrolase CelS; Cel48A	Hidrolise de ligações (1→4)-β-D-glicosídica em celulose e substratos similares liberando celobiose das extremidades redutoras da cadeia.	7, 9 48
3.2.1.74 glucano 1,4-β-glucosidase	Exo-1,4-β-glucosidase; exocelulase; exo-β-1,4-glucosidase; exo-β-1,4-glucanase; β-1,4-β-glucanase; β-glucosidase; exo-1,4-β-glucanase; 1,4-β-D-glucano glucohidrolase	Hidrolise de ligações (1→4)-em (1→4)-β-D-glucanos, para remover unidades de glicose sucessivas.	1, 3, 5, 9

Fonte: Lombard *et al.*, 2013 - Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZY) – retirado de <<http://www.cazy.org>> Acesso: 14 junho 2017; Xu et al. 2011 (modificado).

2.2.2 Xilanases

As xilanases são classificadas dentro do grupo das glicosil hidrolases (EC 3.2.1.), assim como as celulases. Também são classificadas de acordo com a IUBMB conforme sua ação catalítica. As enzimas com atividade xilanolítica, que atuam sobre as moléculas de hemicelulose, estão descritas na tabela 2, de acordo com seus números EC, tipo de reação que catalisam e as famílias a quem pertencem. A classificação das famílias de xilanases é feita com base na massa molecular e no ponto isoelétrico (PI) e semelhanças nas sequências de aminoácidos (COLLINS *et al.*, 2005; MOTTA *et al.*, 2013). A família 10 comporta xilanases com massa molecular maiores que 30kD, enquanto que a família 11 compreende endo- β -xilanases de baixa massa molecular (<30kDa) (HENRISSAT; BAIROCH 1993).

Tabela 2 - Nomes de Xilanases, códigos EC e Famílias.

Numero EC	Outros nomes	Reação catalisada	Famílias
3.2.1.8 Endo-1,4- β -xilanase	endo-(1 \rightarrow 4)- β -xylan 4-xylanohidrolase; endo-1,4-xylanase; xylanase; β -1,4-xylanase; endo-1,4-xylanase; endo- β -1,4-xylanase; endo-1,4- β -D-xylanase; 1,4- β -xylan xylanohidrolase; β -xylanase; β -1,4-xylan xylanohidrolase; endo-1,4- β -xylanase; β -D-xylanase.	Endohidrolise de ligações (1 \rightarrow 4)- β -D-xilosídicas em xilanos	3, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43,44, 51, 62, 98, 141
3.2.1.37 1,4-Beta-xilosidase	xilobiase; β -xilosidase; exo-1,4- β -xilosidase; β -D-xilopiranosidase; β -xilosidase; β -xilosidase; exo-1,4-xilosidase; exo-1,4- β -D-xilosidase; 1,4- β -D-xilano xilohidrolase.	Hidrolise de (1 \rightarrow 4)- β -D-xilanos, para remover resíduos de D-xilose sucessivos dos terminais não-redutores	1, 3,5, 30, 39, 43, 51, 52, 54, 116, 120
3.2.1.32 Endo-1,3-Beta-xilanase	xilanase; <i>endo</i> -1,3- β -xilosidase; 1,3- β -xilanase; 1,3-xilanase; β -1,3-xilanase; <i>endo</i> - β -1,3-xilanase; 1,3- β -D-xilano xilano hidrolase; xilano <i>endo</i> -1,3- β -xilosidase.	Hidrólise aleatória de ligações (1 \rightarrow 3) - β -D-glicosídicas em (1 \rightarrow 3) - β -D-xilanos	11, 26
3.2.1.136 glucuronoarabinoxilano endo-1,4- β -xilanase	endoxilanase; endoarabinoxilanase; glucuronoxilano xilohidrolase; glucuronoxilanase;	Endohidrolise de ligações (1 \rightarrow 4)- β -D-xilosil em alguns glucuronoarabinoxilanos	30

glucuronoxilano
xilanhidrolase;
glucuronoarabinoxilano 1,4- β -
D-xilanhidrolase

Fonte: Lombard *et al.*, 2013 - Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZY) – retirado de <<http://www.cazy.org>> Acesso: 14 junho 2017; Xu *et al.* 2011 (modificado).

2.3 Celulases e Xilanases na degradação de materiais lignocelulósicos

Como mencionado anteriormente, a celulose é hidrolisada por ação das enzimas do complexo celulolítico, que atuam em sinergia nas cadeias que compõem as microfibrilas de celulose, para a liberação de glicose (DEVAUX, 2005). As enzimas celulolíticas (endoglucanases) iniciam a hidrólise ao atuarem sobre regiões da fibra celulósica que apresentam certa desorganização, chamada de região amorfa. Em seguida, as demais celulases agem para completa desconstrução da fibra desse biopolímero (Figura 2 A).

A xilana é um dos principais constituintes da hemicelulose. É hidrolisada por xilanases que assim como celulases também atuam em conjunto para liberar unidades de xilose (HECK *et al.*, 2002). A hidrólise enzimática eficiente da xilana requer a ação conjunta de enzimas com diversas especificidades (Figura 2B). As endo-1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) atuam aleatoriamente atacando o esqueleto de xilana; e as beta-xilosidases (EC 3.2.1.37) quebram os xilooligosacarídeos liberando monômeros de xilose. A remoção dos grupos laterais da hemicelulose é catalisada por α -arabinofuranosidases, α -glucuronidase e acetilxilana esterase, ácido feruloil esterase (esterase de ácido ferúlico), que removem os ramos laterais acetil e fenólicos (HECK *et al.*, 2002; PASTOR *et al.*, 2007, YANG *et al.*, 2009).

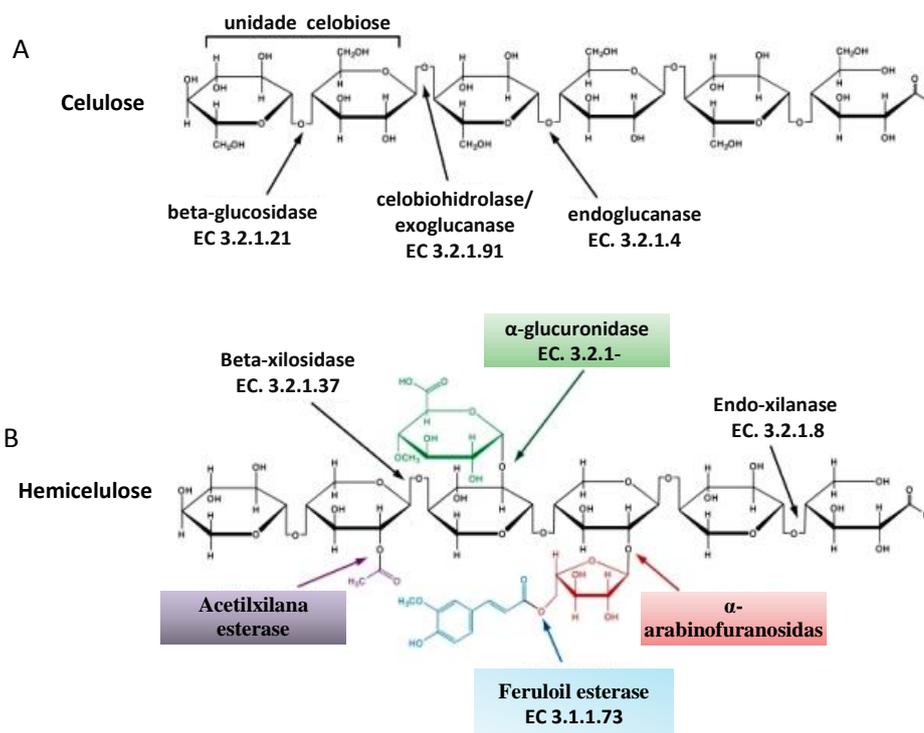


Figura 2 - Esquema da degradação enzimática da celulose e da hemicelulose.
Fonte: (YANG *et al.*, 2009)

2.4 Atividades auxiliares

O modelo clássico de degradação enzimática da celulose é descrito por um conjunto de enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases que atuam sinergicamente para hidrolisar a fibra de celulose. No entanto, tem-se elucidado a atuação de outras proteínas e enzimas que não são as hidrolases clássicas das famílias de celulasas e hemicelulasas, estas proteínas agem de forma a cooperar com o poder de catalise de celulasas, aumentando assim a eficiência da desconstrução de materiais lignocelulósicos e geração de açúcares (HORN *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2015; VALADARES *et al.*, 2016). Essas proteínas foram inicialmente classificadas dentro da família CMB33 (modulo de ligação de carboidratos) e na família GH61 (glicosilhidrolase família 61). Estudos recentes têm demonstrado que esses biocatalisadores descritos anteriormente como GH61 são na verdade mono-oxigenases polissacarídicas líticas (LPMO), que são incluídas nas famílias AA9, AA10 e AA11, dependentes de cobre e estão envolvidos na clivagem oxidativa da celulose, aumentando a degradação da celulose em conjunto com as enzimas clássicas (HORN *et al.*, 2012; LEVASSEUR *et al.*, 2013).

A ação das LPMO's é influenciada pela presença de desidrogenases de celobiose (CDH's). As CDH's são hemoflavoenzimas fúngicas que pertencem à superfamília de oxidoreduases.

CDH's catalisam a oxidação de dois elétrons da celobiose (KRACHER *et al.*, 2016). Tem-se descrito que as CDH's são secretadas por fungos em condições de degradação da celulose, e atuam em conjunto com LPMO's, aumentando a conversão da celulose a glicose (BEY *et al.*, 2013; VALADARES *et al.*, 2016). As LPMO's não necessitam de regiões desordenadas (amorfas) no polissacarídeo para começar a agir; elas atuam na região cristalina da celulose, gerando extremidades da cadeia oxidadas e não-oxidadas e requerem um doador de elétrons externo para indução da sua atividade (ZIFCÁKOVÁ; BALDRIAN, 2012; DIMAROGONA *et al.*, 2012).

Outras proteínas também reportadas por sua ação sinérgica com celulases na degradação de materiais lignocelulósicos são as expansinas e swolleninas. As expansinas são proteínas extracelulares que ocorrem em plantas, essas proteínas induzem a extensão e o relaxamento da parede celular vegetal ocasionando um afrouxamento da matriz lignocelulósica rígida (COSGROVE *et al.*, 2000). Expansinas ocorrem também em microrganismos como bactérias e fungos e são descritas com o papel de ajudar os microrganismos patógenos ou colonizadores a penetrar plantas. As expansinas bacterianas apresentam efeitos semelhantes às de plantas sobre a parede celular vegetal, mas com menos intensidade. As Swolleninas são um tipo de expansinas produzidas por fungos que apresentam atividade disruptiva em vários substratos celulósicos, como papel de filtro, algodão e paredes celulares vegetais, sem, no entanto, liberar quantidades detectáveis de açúcares (SALOHEIMO *et al.*, 2002; EIBINGER *et al.*, 2016).

As swolleninas fúngicas apresentam o domínio de uma família CBM no N-terminal, e têm sido classificadas dentro da família CBM1. Os CBM's consistem em módulos de aproximadamente 40 resíduos de aminoácidos encontrados quase que exclusivamente em fungos. A função de ligação à celulose foi demonstrada em muitos casos e parece ser mediada por três resíduos aromáticos separados por cerca de 10,4 angstroms e que formam uma superfície plana (MATTINEN *et al.*, 1998; BROTMAN *et al.*, 2008).

A presença de swolleninas no conteúdo extracelular de cultivos fúngicos tem sido identificada com o intuito de se purificar e adicionar essas proteínas em coquetéis enzimáticos visando um aumento no poder de catálise sobre substratos lignocelulósicos complexos. *Trichoerma* é o gênero de fungos mais estudado quanto à identificação de swolleninas, seguido de fungos filamentosos do gênero *Penicillium*. Hapeng e colaboradores (2014) identificaram a presença de swollenina no secretoma de *Penicillium oxalicum* GZ-2 em diferentes substratos. *Trichoderma harzianum* crescido em bagaço-de-cana (celulignina parcialmente deslignificada) apresentou 1% de swolleninas em seu secretoma de um total de 117 proteínas

identificadas (ROCHA *et al.*, 2015). A figura 3 mostra o modelo esquemático de atuação das proteínas auxiliares e swolleninas em conjunto com celulases na fibra de celulose.

Diante das novas descobertas a respeito das enzimas AA9 e CBM33, tornou-se necessário uma reclassificação dessas famílias em uma categoria adequada. As famílias de degradação de lignina também foram realocadas e unidas às famílias LPMO's dando origem a uma nova classe no CAZy, nomeada de "atividades auxiliares" (AA) para acomodar uma variedade de mecanismos enzimáticos e substratos, esta seção do banco de dados CAZy apresenta uma classificação dessas enzimas em famílias e subfamílias com base nas similaridades de sequência de aminoácidos. As enzimas que degradam a lignina podem não atuar sobre os carboidratos, mas como a lignina está invariavelmente e intimamente associada com os carboidratos na parede celular da planta, as enzimas lignolíticas cooperam com as polissacarídicas clássicas (LEVASSEUR, *et al.*, 2013). Na tabela 3 está sendo mostradas as famílias e subfamílias de atividades auxiliares.

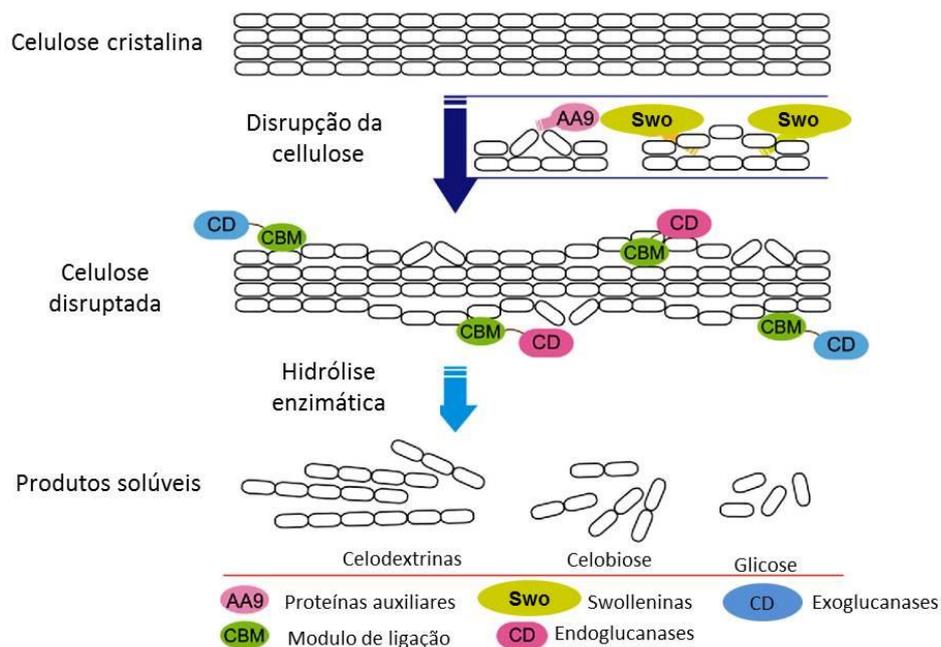


Figura 3 - Esquema simplificado da degradação da celulose, envolvendo Exoglucanases, Endoglucanases, Proteínas auxiliares da família AA (monoxigenases líticas de polissacarídeos – PMO's) e Swolleninas.

Tabela 3 - Divisão de subfamílias e atividades conhecidas nas famílias AA

Subfamílias	Atividades conhecidas	Número CE
AA1	Multicopper oxidase	
AA1_1	Laccase	EC 1.10.3.2
AA1_2	Ferroxidase	EC 1.10.3.2
AA1_3	Oxidase multicopper Lacase-like	EC 1.10.3.2
AA2	Peroxidase classe II	
	Peroxidase de manganês	EC 1.11.1.13
	Lignina peroxidase	EC 1.11.1.14
	Peroxidase versátil	EC 1.11.1.16
AA3	Oxirredutase GMC	
AA3_1	Cellobiose desidrogenase	EC 1.1.99.18
AA3_2	Oxidase de álcool arílico / Glucose oxidase	EC 1.1.3.7 / 1.1.3.4
AA3_3	Álcool oxidase	EC 1.1.3.13
AA3_4	Piranose oxidase	EC 1.1.3.10
AA4	Álcool vanílico oxidase	EC 1.1.3.38
AA5	Oxidase de cobre radical	
AA5_1	Glioxal oxidase	EC 1.1.3.-
AA5_2	Galactose oxidase	EC 1.1.3.9
AA6	1,4-benzoquinona redutase	EC 1.6.5.6
AA7	Glucooligosaccharide oxidase	EC 1.1.3.-
AA8	Domínio de redutase de ferro	
AA9	monooxigenase lítica de polissacarídeo (GH61)	EC 1.-.-.-
AA10	monooxigenase lítica de polissacarídeo (CBM33)	
AA11	Polissacarídeo lítico monooxigenase. distantemente relacionada à família AA9.	
AA12	Atividade oxidorredutase Dependente de quinona	
AA13	monooxigenase lítica de polissacarídeo	
AA14	monooxigenase lítica de polissacarídeo - xilana lítico monooxygenase	EC 1.-.-.-
AA15	Celulose lítica monooxigenase	EC 1.-.-.-

Fonte: Levasseur *et al.*, 2013 - Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZY) – retirado de <<http://www.cazy.org>> Acesso: junho /2018;

2.5 Microrganismos produtores de enzimas lignocelulolíticas

Enzimas lignocelulolíticas são produzidas por organismos que utilizam o açúcar presente em materiais vegetais como fonte de energia. Recentemente, muitos estudos têm emergido comprovando a produção de celulases por alguns animais invertebrados, como nematoides, moluscos, cordatos, protozoários e alguns insetos, em que se constatou a presença de genes que codificam celulases, sendo estas enzimas não relacionadas a um microrganismo simbiote, dentre estes, o mecanismo celulolítico de insetos tem sido amplamente investigado (LO *et al.*, 2003; WATANABE *et al.*, 2001, WATANABE *et al.*, 2010, OPPERT *et al.*, 2010).

No entanto, os microrganismos “não-animais” continuam em alta como os maiores produtores destas enzimas, devido à vasta diversidade de bactérias, fungos, leveduras e actinomicetes de diversos gêneros amplamente reportados por produzirem uma gama de enzimas relacionadas com a degradação de biomassa vegetal (SUKUMARAN *et al.*, 2005; SHARMA *et al.*, 2016; BEHERA *et al.*, 2017). As bactérias aeróbias possuem sistemas de celulases não complexados assim como os fungos, secretam enzimas para o meio, e algumas bactérias produzem β -glucosidades intracelulares, diferentemente, em bactérias anaeróbicas as celulases estão presentes como estruturas agregadas nas células, formando um aparato proteico chamado de celulosomo, que apresenta uma região não catalítica ligada a uma região catalítica, dentre as bactérias celulolíticas mais estudadas destacam-se as dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Clostridium* (JUTURU *et al.*, 2013; SADHU; MAITI, 2013; BEHERA *et al.*, 2017).

Os fungos são considerados os melhores produtores de enzimas lignocelulolíticas por produzirem naturalmente as celulases necessárias para a sacarificação completa de lignocelulose, são também o grupo mais bem estudado, devido à alta capacidade de secreção de proteínas que possuem, além de produzirem múltiplas enzimas (isoformas) com elevada atuação sinérgica celulolítica (LYND *et al.*, 2002; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; OBENG 2017). Os gêneros de fungos filamentosos *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* destacam-se por apresentarem um gama de espécies descritas como excelentes produtoras de celulases e xilanases.

Trichoderma reesei é até o momento a espécie fúngica mais amplamente estudada. Um acervo de informações a respeito do mecanismo de produção de enzimas, bem como genomas e proteomas estão disponíveis para este gênero (MARTINEZ *et al.*, 2008). Pesquisas com *T. reesei* foram pioneiras na concepção de sacarificação enzimática da celulose por uma combinação sinérgica de atividades de diferentes celulases. (REESE, 1956). Das espécies de

Trichoderma sp isoladas durante a segunda guerra mundial e em seguida analisadas pelos pesquisadores Mary Mandels e Ewyn Reese, a linhagem QM6 (sexta das 6 culturas de fungos do gênero *Trichoderma*) da coleção Quartermaster (U.S. Army Quartermaster Research and Development Center), apresentou uma excelente capacidade de degradação da celulose, essa estirpe é considerada referência de *Trichoderma reesei* e a partir da qual se derivaram todas as linhagens mutantes que hoje são utilizadas na indústria (BISCHOF *et al.*, 2016), como *T. reesei* RUT-30 e QM9414, esta última produz 2 a 4 vezes mais celulasas do que o *Trichoderma* original Qm6a (DASHTBAN *et al.*, 2011).

Outros gêneros de fungos filamentosos também têm ganhado destaque como o gênero *Penicillium* que têm sido amplamente estudados quanto a sua capacidade de produção de enzimas de interesse biotecnológico. Olutiola (1976) descreveu a liberação de um complexo de enzimas celulolíticas por *Penicillium citrinum*, durante o crescimento deste fungo em um meio líquido com fonte de carbono celulósica. Tanaka e colaboradores (2005) purificaram uma enzima ligada à degradação da biomassa, a endo-xilanase, a partir do filtrado de culturas do fungo *P. citrinum* crescidas em xilano de madeira. Fungos do gênero *Penicillium* estão entre os que produzem altos índices de enzimas do complexo lignocelulolítico, *P. funiculosum*, *P. decumbens* e *P. echinulatum*, são exemplares de fungos deste gênero, reportados como ótimos produtores de celulasas com características importantes de hidrólise, como estabilidade térmica, resistência a pH ácidos, utilização de diferentes substratos celulósicos como fonte de carbono (MAEDA *et al.*, 2013; GAO *et al.*, 2011; ZAMPIERE *et al.*, 2013).

O gênero *Aspergillus* compreende várias espécies de fungos filamentosos comumente encontrados em alimentos, solo e sobre a vegetação em decomposição, sendo mais frequentemente ocorrentes em áreas tropicais e subtropicais (WARD *et al.*, 2006). Várias espécies do gênero *Aspergillus*, são descritas como importantes produtores de enzimas, como celulasas, xilanases, hemicelulasas e pectinases, atuando sobre vários polímeros presentes na parede celular de plantas (DE VRIES; VISSER, 2001). Qaisar e colaboradores (2014) isolaram uma estirpe de *Aspergillus versicolor* e demonstraram o potencial celulolítico desta espécie ao avaliar uma máxima produção de CMCases (endoglucanases). Os fungos do gênero *Aspergillus* no geral têm sido destacados por uma maior produção de betaglucosidases, o fungo *Aspergillus sydowii* isolado na Índia, por exemplo, apresenta altos níveis de produção desta enzima em relação a endoglucanases (MATKAR *et al.*, 2013) e *Aspergillus versicolor* isolado do solo na região amazônica, foi reportado por produzir betaglucosidases com atuação ótima em temperaturas altas (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

2.6 Aplicações industriais de celulases e xilanases

As principais aplicações industriais de celulases e xilanases incluem os setores: têxtil, alimentício, de detergentes, polpa de celulose e papel, agricultura, pecuária e bioconversão, na tabela 4 estão descritos os principais setores industriais onde são aplicadas enzimas do complexo lignocelulolítico e xilanases, e suas funções. Devido ao alto e superior desempenho de enzimas de diferentes microrganismos, que atuam bem sob uma variada gama de condições físicas e químicas, a utilização de enzimas de origem microbianas é um fato necessário nos setores industriais (SAJITH *et al.*, 2016). Visto que, muitos processos industriais apresentam várias desvantagens: baixa eficiência catalítica, falta de especificidade, necessidade de alta temperatura, baixo pH e alta pressão, além disso, o uso de solventes orgânicos leva a resíduos orgânicos e poluentes (NIGAM *et al.*, 2013). Neste sentido, as enzimas são mais úteis para essas aplicações, pois funcionam sob condições de reação moderadas, por exemplo, temperatura, pH e condições atmosféricas (XU *et al.*, 2007; JUTURU; WU, 2014).

Dentre as características desejáveis em celulases para aplicação industrial, destacam-se a capacidade de atuação em temperatura elevada, acima de 40°C e a estabilidade térmica. Principalmente para as celulases aplicadas na indústria de sacarificação de celulose, uma vez que o processo de degradação de material celulósico ocorre em altas temperaturas (SUKUMARAN *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2007; SAJITH *et al.*, 2016). As xilanases assim como celulases, também são aplicadas em uma variedade de setores industriais, dentre estes, destacam-se seu amplo uso na indústria de polpa de celulose, na etapa de branqueamento, onde se requer a atuação de xilanases em condições alcalinas de pH e altas temperaturas (KOHLI *et al.*, 2001).

Enzimas lignocelulósicas já fazem parte das enzimas comerciais com maiores geração de lucros (WILSON, 2009), e poderão tornar-se ainda as enzimas de maior valor comercial, considerando a ampla aplicabilidade e somando-se ao advento crescente da necessidade de substituição de combustíveis fósseis por renováveis, se o etanol, butanol ou qualquer outro produto de fermentação de açúcares, produzidos por enzimas a partir da biomassa, se tornar o principal combustível para transportes (KUHAD *et al.*, 2011; BALSAN *et al.*, 2012; SAJITH *et al.*, 2016).

Tabela 4 - Aplicações industriais de celulasas e xilanases

Setor industrial	Enzima	Função	Referências
Têxtil	Celulasas (endoglucanases) Ácidas e neutras	Bio-lapidação de jeans; bio-polimento de fibras têxtis; melhora da qualidade de tecidos; suavização de peças de vestuário; remoção do excesso de corantes dos tecidos; restauração do brilho da cor.	Kuhad <i>et al.</i> , 2011; Singh <i>et al.</i> , 2016
Polpa de celulose e papel	Celulasas (endoglucanases) xilanases	Bio-branqueamento de polpas Kraft, destintagem enzimática, desidratação, bio-polpação, melhoramento da drenagem em fábricas de papel.	Singh <i>et al.</i> , 2016
Detergentes	Celulasas alcalinas	Como aditivos de detergentes - modificam fibrilas de celulose e melhoram o brilho da cor. Removem protuberâncias ásperas deixando o tecido mais suave e brilhoso.	Kuhad <i>et al.</i> , 2011
Alimentos	Celulasas Betaglucosidases	Melhoria de rendimentos na extração de amido e proteínas; aumento de rendimento na extração de óleo de oliva melhoria na maceração e extração de cores de frutas e legumes; clarificação de sucos de frutas; melhoria da textura e qualidade dos produtos de padaria; melhoria na viscosidade de purês de frutas; melhoria da textura, sabor, aroma e propriedades voláteis de frutas e verduras; controle do sabor amargo de frutas cítricas.	Soares <i>et al.</i> , 2016
Bebidas	Celulasas Betaglucosidases	Melhoria do aroma de vinhos, maltagem de cereais - melhoria na fermentação primária e qualidade da cerveja, melhora na taxa de filtração e estabilidade do vinho.	Chakraborty <i>et al.</i> , 2016
Bio-Combustíveis	Celulasas Xilanases	Conversão de materiais celulósicos em açúcares fermentáveis- produção de etanol de fontes renováveis	Castro <i>et al.</i> , 2010; Carrigan 2016

O mercado global de enzimas industriais é muito competitivo, sendo a Novozymes o maior *player* do setor, seguido pela DSM e pela DuPont (depois de ter adquirido participação majoritária na Danisco e sua divisão Genencor), entre outros. As empresas competem principalmente com base na qualidade do produto, no desempenho, no uso de direitos de propriedade intelectual e na capacidade de inovar, entre outros fatores. A América do Norte e a Europa são os maiores consumidores de enzimas industriais, embora a região da Ásia-Pacífico poderá ter um rápido aumento na demanda de enzimas na China, Japão e Índia, refletindo o tamanho e a força das economias desses países.

A aplicação mais importante e comercialmente atrativa de enzimas lignocelulolíticas é na produção de bicomcombustíveis. No contexto de biorefinarias, utilizando biomassa lignocelulósica para geração de açúcares fermentescíveis, o alto custo destas enzimas torna o processo de produção de etanol de biomassa vegetal limitado, as enzimas representam cerca de 20% do custo operacional de uma planta industrial (SHARMA *et al.*, 2016, BARCELOS *et al.*, 2016; WINGREN *et al.*, 2003).

Questões relacionadas com a etapa de sacarificação da biomassa vegetal continuam sendo um dos principais fatores que determinam o desempenho e custo dos processos de obtenção do etanol celulósico, com isso, muitas pesquisas tem se voltado para melhorar a de sacarificação enzimática visando uma produção mais barata de bioetanol (WYMAN *et al.*, 2007, PEREIRA JR *et al.*, 2008; MADADI *et al.*, 2017). A hidrólise da biomassa vegetal à açúcares fermentescíveis, por via biológica requer a ação de múltiplas enzimas com diferentes especificidades para desconstruir a complexa estrutura lignocelulósica de biomassas vegetais. (BOYCE; WALSH, 2015). A busca para se obter um alto nível de açúcares fermentáveis a partir da biomassa lignocelulósica depende da produção eficiente de enzimas e misturas de celulases, hemicelulases, lignases, e outras proteínas que atuem de maneira sinérgica (OBENG *et al.*, 2017).

O desafio para produção de etanol utilizando biomassas lignocelulósicas é o baixo rendimento de etanol, devido à baixa obtenção de açúcares fermentescíveis que resulta da natureza da biomassa e dificuldades técnicas do processo, como pré-tratamento, o tipo, fonte e quantidade de enzimas, microrganismos utilizados, condições do processo e tipo de biorreatores (ZABED *et al.*, 2016). Neste sentido, estudos de proteínas envolvidas na degradação de material lignocelulósico tem permitido o conhecimento mais amplo das principais proteínas lignocelulolíticas que podem ser aplicadas na biorrefinaria (LIAO *et al.*, 2014; BORIN, *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2016). Um número significativo de proteínas, enzimas e outros componentes que fazem parte do aparato para degradação de biomassa vegetal, tem sido identificado nos exoproteomas de fungos filamentosos, que aliado com a genômica tem ajudado a elucidar o mecanismo de ação do arsenal lignocelulolítico produzidos por eles (JUN *et al.*, 2011; CASTRO *et al.*, 2014; KOLBUSZ *et al.*, 2014; OGUNMOLU *et al.*, 2018).

O conhecimento das proteínas lignocelulósicas excretadas por microrganismos lignocelulolítico fornece um subsídio necessário para elaboração de coquetéis enzimáticos balanceados. A ação sinérgica de lignocelulases: celulases, hemicelulases, lignases, mono-oxigenases polissacarídicas líticas e outras proteínas auxiliares é extremamente necessária para

a desconstrução efetiva de biomassa de origem vegetal (OBENG *et al.*, 2017). Arias *et al.*, 2016 demonstrou um rendimento de hidrólise de bagaço de cana pré-tratado de 91% utilizando uma mistura com carga enzimática balanceada, formulado com 15% de *T. harzianum*, 50% de *Penicillium funiculosum* e 35% de *Aspergillus niger*.

Linhagens de fungos da espécie *T. reesei* possuem um sistema de produção de celulasas eficaz (endoglucanases e exoglucanases), mas exibem baixa produção de betaglucosidases (AHAMED *et al.*, 2008), enquanto que fungos do gênero *Aspergillus*, são descritas por produzirem níveis elevados de enzimas betaglucosidases (BHAT *et al.*, 2000). As formulações de enzimas comerciais mais conhecidas e utilizadas industrialmente são produzidas com enzimas de *T. reesei* como a Accellerase® e Cellic® e Multifect®. A preparação de celulasas comerciais Multifect® foi complementada com preparados celulósicos de *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma reesei* e apresentou uma maior eficiência do que quando utilizado sozinho, a maior eficiência hidrolítica foi correlacionada com um nível adequado das atividades de betaglucosidase e xilanase (MAEDA *et al.*, 2011).

As contribuições científicas das pesquisas com celulasas têm aumentado de modo contínuo, e vão desde a prospecção de microrganismos produtores destas enzimas, o melhoramento genético de espécies celulolíticas para aumentar a produção, a otimização do processo de produção, a demonstração do potencial industrial dessas enzimas, dentre outros (CASTRO; PEREIRA JR., 2010). Outro estudo tem destacado a necessidade de complementar as atividades enzimáticas com enzimas de diferentes fontes e proteínas auxiliares (MOHANRAM *et al.*, 2013; VALADARES *et al.*, 2016).