



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Engenharia Química

CRISTIANE COSTA AMORIM

**LIQUEFAÇÃO DE FARELO DE TRIGO PARA PRODUÇÃO DE  
XILANASES POR CULTIVO SUBMERSO DE *Aspergillus niger***

CAMPINAS - SP

2017

CRISTIANE COSTA AMORIM

**LIQUEFAÇÃO DE FARELO DE TRIGO PARA PRODUÇÃO DE  
XILANASES POR CULTIVO SUBMERSO DE *Aspergillus niger***

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA POR CRISTIANE COSTA  
AMORIM E, ORIENTADA PELO PROF.  
DR. EVERSON ALVES MIRANDA.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 131263/2014-5

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

Am68L Amorim, Cristiane Costa, 1988-  
Liquefação de farelo de trigo para produção de xilanases por cultivo submerso de *Aspergillus niger* / Cristiane Costa Amorim. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Everson Alves Miranda.  
Coorientador: Cristiane Sanchez Farinas.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fermentação submersa. 2. Hidrólise enzimática. 3. Farelo de trigo. 4. Xilanases. I. Miranda, Everson Alves, 1959-. II. Farinas, Cristiane Sanchez. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Liquefaction of wheat bran for xylanase production by submerged culture of *Aspergillus niger*

**Palavras-chave em inglês:**

Submerged fermentation

Enzymatic hydrolysis

Wheat bran

Xylanases

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Titulação:** Mestra em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Everson Alves Miranda [Orientador]

Sônia Maria Alves Bueno

Gisele Atsuko Medeiros Hirata

**Data de defesa:** 23-02-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Cristiane Costa Amorim e aprovada em 23 de fevereiro de 2017 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

---

Prof. Dr. Everson Alves Miranda - Orientador  
Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP

---

Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno  
Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP

---

Profa. Dra. Gisele Atsuko Medeiros Hirata  
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

A Ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no processo de vida acadêmica do aluno.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Cleonice e Emídio e, à minha irmã Patrycia pelo apoio em todos os sentidos e, principalmente, pelo seu amor. Amor que amadureceu com a distância.

Ao Dr. Prof. Everson Alves Miranda, por todo incentivo, paciência e caridade para elaboração e finalização deste trabalho, especialmente pelas contribuições pessoais.

A Dra. Profa. Cristiane Sanchez Farinas pela disponibilidade, confiança e orientações durante o curso deste trabalho.

A minha família pela torcida, preocupação e pelo carinho nas voltas ao meu aconchego.

Aos amigos que fiz nessa jornada e que de alguma forma me apoiaram: Marta, Valquiria, Márcia, Gisele Pavan, Cecília, Grazielle, Gisele Saraiva, Kelly, do GOU Beraká, da Pastoral Universitária da Unicamp (...).

Aos colegas de trabalho do LEBp, LIMBio e LEBC pelos momentos de descontração.

Ao CNPq, Capes e Fapesp pelo suporte financeiro.

Sobretudo a Deus, que a todos trata com bondade, porque tudo é Dele, amigo da vida! (Sb 11, 26).

## RESUMO

As enzimas são biocatalisadores que possuem uma vasta aplicabilidade na área industrial, pesquisa e farmacêutica. Porém, os custos de sua produção dificultam seu emprego, especialmente, na conversão de biomassa lignocelulósica em biorrefinarias. Assim, estratégias que possam aumentar a produtividade e diminuir o custo da produção de enzimas são necessárias. Uma das estratégias está na utilização de substratos provindos de resíduos agrícolas, florestais e agroindustriais em fermentação submersa. Contudo, quando se usa elevados teores de sólidos na fermentação, há problemas de transferências de massa por causa da mistura não uniforme. Para tal inconveniente, antes da fermentação, pode-se utilizar a liquefação enzimática (hidrólise parcial) de modo a tornar a suspensão de biomassa facilmente agitada. A partir desta suspensão podem ser gerados diversos produtos de origem microbiana, particularmente enzimas devido à incompleta despolimerização da fonte de carbono. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a liquefação enzimática do farelo de trigo como recurso para produção de xilanases por *Aspergillus niger* A12 em fermentação submersa a altos teores de sólidos (20% m/v). A liquefação do farelo de trigo foi realizada por complexo enzimático celulolítico comercial a diferentes temperaturas (30-50 °C), pH (4,4-5,8), cargas enzimáticas (0,29-3,50 FPase/mL) e tempos de incubação (6-24 h). Esta estratégia resultou em até cinco vezes mais atividade de xilanases perante atividade obtida em cultivo com farelo de trigo não liquefeito (controle), isto é, 31,7 contra 6,1 UI/g de farelo de trigo, respectivamente e, cerca de quatro vezes menos concentração de proteínas totais com substrato liquefeito do que a obtida no controle. Portanto, este trabalho corroborou com a proposição do uso da liquefação enzimática de biomassa como método para produção de enzimas em cultivos a alto teor de sólidos.

**Palavras-chaves:** fermentação submersa, liquefação enzimática, farelo de trigo e xilanases.

## ABSTRACT

Enzymes are biocatalysts that have a wide applicability in the industrial, research and pharmaceutical areas. However, the costs of production hinder your use, especially in the conversion of lignocellulosic biomass to biorefineries. Thus, strategies to increase productivity and reduce the cost of enzyme production are needed. One of the strategies is the use of substrates from agricultural, forestry and agroindustrial residues in submerged fermentation. However, when using high solids contents in the fermentation, there are problems of mass transfer due to non-uniform mixing. For such a drawback, before fermentation, can be used enzymatic liquefaction (partial hydrolysis) to make a biomass suspension easily stirrable. From this suspension can be generated several microbial products, particularly enzymes due incomplete depolymerization of the carbon source. Thus, this study had as objective to evaluate the enzymatic liquefaction of wheat bran as a resource for the production of xylanases by *Aspergillus niger* A12 in submerged fermentation at high solids content (20% w/v). Liquefaction of wheat bran was carried out by commercial cellulolytic enzyme complex at different temperatures (30-50 °C), pH (4.4-5.8), enzymatic loads (0.29-3.50 FPU/mL), and incubation time (6-24 h). This strategy resulted in up to five times more xylanases activity when compared to non-liquefied wheat bran (control), that is, 31.7 against 6.1 IU/g of wheat bran, respectively, and around four times less concentration of total proteins with liquefied substrate than that obtained in the control. Therefore, this work corroborated with proposition of use enzymatic liquefaction of biomass as method for the production of enzymes in cultures with high solids content.

**Keywords:** submerged fermentation, enzymatic liquefaction, wheat bran and xylanases.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. 1 - Etapas da pesquisa. ....	15
Figura 2. 1 - Produção de enzimas em FSm com substrato liquefeito (Cunha <i>et al.</i> , 2014). ...	22
Figura 2. 2 - Estrutura do grão de trigo. Disponível em: <a href="http://www.nabim.org.uk/wheat/wheat-structure">http://www.nabim.org.uk/wheat/wheat-structure</a> .....	23
Figura 2. 3 - Esquema das ações das enzimas xilanolíticas na estrutura do polímero xilana. Adaptação de Kirikyali e Connerton (2015).....	27
Figura 2. 4 - Esquema hipotético da regulação do complexo xilanolítico envolvendo endoxilanase e $\beta$ -xilosidase. Adaptação de Polizeli <i>et al.</i> (2005). ....	30
Figura 3. 1 - Modelo do quadriculado na câmara de Neubauer. Disponível em: <a href="http://www.celeromics.com/en/resources/Technical%20Notes/cells-chamber-concentration.php">http://www.celeromics.com/en/resources/Technical%20Notes/cells-chamber-concentration.php</a> .....	32
Figura 3. 2 - Esquema da preparação do inóculo. ....	33
Figura 3. 3 - Esquema da preparação do FT liquefeito e FSm. ....	34
Figura 4. 1 - Cinética da produção de xilanases em FSm de <i>A. niger</i> com FT liquefeito. Liquefação: 30% (m/m); pH 4,8 e CC3 a 1,20 FPase/mL; 6 h a 50°C e a 200 rpm. Barras representam desvio padrão. ....	40
Figura 4. 2 - Efeito da temperatura na liquefação enzimática do substrato FT sobre a atividade xilanásica (■) e proteínas totais (●) produzidas em FSm por <i>A. niger</i> . Liquefação: 30% (m/m); pH 4,8; 6 h; CC3 a 1,20 FPase/mL. Controle C (□). Barras representam desvio padrão. ....	42
Figura 4. 3 - Efeito do pH na liquefação enzimática do substrato FT sobre a atividade xilanásica (■) e proteínas totais (●) produzidas em FSm por <i>A. niger</i> sem ajuste de pH. Liquefação: 30% (m/m); 50 °C; 6 h; CC3 a 1,20 FPase/mL. Controle C (□). Barras representam desvio padrão. Letras gregas iguais representam valores estatisticamente semelhantes, de acordo com o teste de Tukey, $p < 0,05$ . ....	44
Figura 4. 4 - Efeito do pH na liquefação enzimática do substrato FT sobre a atividade xilanásica (■) e proteínas totais (●) produzidas em FSm (com pH inicial ajustado para 5,0) por <i>A. niger</i> . Liquefação: 30% (m/m); 50 °C; 6 h; CC3 a 1,20 FPase/mL. Controle C (□). Barras representam desvio padrão. Letras gregas iguais representam valores estatisticamente semelhantes, de acordo com o teste de Tukey, $p < 0,05$ . ....	44



Figura 4. 5 – Concentração de proteínas totais em diferentes tempos de FSm com FT liquefeito. Liquefação: 30% (m/m); pH 4,8 e CC3 a 1,20 FPase/mL; 6 h a 50°C e a 200 rpm. Barras representam desvio padrão.....	46
Figura 4. 6 – Efeito da carga enzimática e o tempo na liquefação do substrato FT sobre a atividade xilanásica (a) e proteínas totais (b) produzidas em FSm por <i>A. niger</i> . Liquefação: 30% (m/m); 50 °C; pH 4,8; 0, 6, 18 e 24 h; CC3 a 0,29 FPase/mL (■), 1,20 FPase/mL (■) e 3,50 FPase/mL (■). Controle sob agitação, CA (■) e Controle, C (□). Barras representam desvio padrão. Letras gregas iguais representam valores estatisticamente semelhantes, de acordo com o teste de Tukey, $p < 0,05$ . .....	49
Figura 4. 7 - Cinética da liquefação enzimática do FT. Liquefação enzimática: 30% (m/m), 50 °C; pH 4,8; CC3 a 0,29 (■), 1,20 (■) e 3,50 FPase/mL (■). Controle sob agitação, CA(■). Barras representam desvio padrão. ....	51
Figura 4. 8 – Efeito de diferentes concentrações de glicose na composição do meio nutriente adaptado do descrito por Mandels e Weber (1969) na FSm por <i>A. niger</i> sobre a produção de xilanases (■) e proteínas totais (●) com FT liquefeito. Liquefação enzimática: 30% (m/m), 6 h, 50 °C, pH 4,8 e CC3 a 1,20 FPase/mL. Barras representam desvio padrão.....	52
Figura A. 1 - Esporos de <i>A. niger</i> em PDA após 72 h de incubação à 32 °C.....	65
Figura A. 2 - Transformação do farelo de trigo em diferentes tempos de liquefação enzimática. (a) FT “ <i>in natura</i> ”. Tempos de liquefação: (b) 0 h, (c) 6 h, (d) 18 h, (e) 24 h. Liquefação: 30% (m/m) com 1,20 FPase/mL, a 50 °C e a 200 rpm.....	65
Figura A. 3 - FSm por <i>A. niger</i> em escala de bancada com FT liquefeito. ....	66
Figura A. 4 - Sobrenadante da FSm. ....	66

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1.OBJETIVO .....	14
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
2.1.PRODUÇÃO DE ENZIMAS .....	16
<b>2.1.1. Visão geral: bioprocessos e estratégias para o aumento da produtividade enzimática.....</b>	<b>16</b>
2.2.LIQUEFAÇÃO ENZIMÁTICA .....	18
<b>2.2.1. Fatores que afetam a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica .....</b>	<b>22</b>
2.3.FARELO DE TRIGO .....	23
2.4.ENZIMAS XILANOLÍTICAS .....	26
<b>2.4.1. Ação catalítica de xilanases.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4.2. Regulação de enzimas por <i>Aspergillus niger</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1.MATERIAIS .....	31
<b>3.1.1. Microrganismo .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.2. Farelo de trigo .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.3. Complexo enzimático comercial .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.4. Composição do meio de cultura.....</b>	<b>31</b>
3.2.MÉTODOS.....	32
<b>3.2.1. Preparação do inóculo .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.2. Metodologia de liquefação enzimática .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.3. Fermentação submersa a elevado teor de sólidos .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.4. Separação da fase líquida do FT liquefeito para determinação da concentração de açúcares redutores.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.5. Métodos analíticos .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.6. Análise estatística.....</b>	<b>38</b>

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
4.1.CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE XILANASES EM FSM COM FT LIQUEFEITO .....	39
4.2.INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DA LIQUEFAÇÃO DO FT NA PRODUÇÃO DE XILANASES .....	41
4.3.INFLUÊNCIA DO pH DA LIQUEFAÇÃO DO FT NA PRODUÇÃO DE XILANASES .....	43
4.4.INFLUÊNCIA DA CARGA ENZIMÁTICA E TEMPO DA LIQUEFAÇÃO DO FT NA PRODUÇÃO DE XILANASES .....	48
4.5.EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE GLICOSE AO MEIO NUTRIENTE NA FSM ...	52
<b>5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....</b>	<b>54</b>
5.1.CONCLUSÕES .....	54
5.2.SUGESTÕES .....	55
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Enzimas são de interesse devido sua origem natural, alta especificidade e sua vasta aplicabilidade. Estes biocatalisadores são importantes para conversões mais eficientes e menos agressivas, principalmente, no cenário atual na biotecnologia e biorrefinaria: que busca e aplica novas fontes de carbono e de energia renováveis. Os principais segmentos que os utilizam são: alimentos e bebidas, produtos de limpeza, produção de biocombustíveis, ração animal, pesquisa, diagnóstico e outros (SANT'ANNA JR, 2001). Por causa dessa demanda, ainda se busca estratégias para a redução dos custos na produção destes biocatalisadores bem como o aumento da produtividade (FARINAS, 2011).

Para a produção de enzimas, utiliza-se de preferência a fermentação submersa (FSm), pelo fácil manuseio das condições operacionais em grande escala, do que a fermentação em estado sólido (FES). Na FSm, o crescimento do microrganismo geralmente ocorre em substrato dissolvido em excesso de água livre, havendo casos que o substrato pode estar suspenso na fase líquida. Já a FES ocorre em matriz sólida com pouca água livre (COLLA *et al.*, 2010; GRAMINHA *et al.*, 2008; PANDEY, 2003; PANDEY *et al.*, 2008). Nas duas fermentações, o tipo de substrato de grande interesse nas últimas décadas é oriundo de material lignocelulósico, em especial, os subprodutos agroindustriais, agrícolas e florestais que são ricas fontes de carbono a baixo valor agregado.

Para o uso eficiente dos constituintes desta biomassa renovável, pré-tratamentos são empregados para facilitar o acesso do microrganismo sobre o emaranhado lignocelulósico resistente formado pelas estruturas da celulose, hemicelulose e lignina. Os pré-tratamentos podem aumentar a digestão dos açúcares disponíveis, por meio da desorganização da estrutura cristalina da celulose e do aumento da porosidade na biomassa lignocelulósica (CAMASSOLA; DILLON, 2007). Os diferentes tipos de pré-tratamentos podem ainda ser combinados para melhoria das etapas posteriores do bioprocessamento (por exemplo, hidrólise que pode ser por via ácida ou enzimática e, a fermentação).

Dentro do escopo dos pré-tratamentos (físicos, químicos, físico-químicos e biológicos), o biológico sobressai-se pela brandura e menor potencial de liberar inibidores à fermentação (MOSIER *et al.*, 2005; SUN; CHENG, 2002); no entanto, este requer um tempo elevado para despolimerização da biomassa (MOOD *et al.*, 2013), pois depende do metabolismo e crescimento do microrganismo. Ainda assim, os microrganismos contribuem

para a digestibilidade da biomassa com a secreção de enzimas para o ambiente que pode iniciar a hidrólise enzimática do material.

Em suma a hidrólise da lignocelulose acontece em duas principais etapas: liquefação e sacarificação. A liquefação enzimática providencia o encurtamento das microfibrilas e redução da viscosidade, ou seja, hidrólise parcial; enquanto a sacarificação libera a maioria dos monômeros disponíveis na biomassa, a hidrólise completa (THYGESSEN *et al.*, 2011).

Na literatura, embora a hidrólise enzimática seja bastante utilizada para obtenção de biocombustíveis, no intuito de se ter um meio de cultivo com maior concentração de açúcares fermentescíveis (MOSIER *et al.*, 2005; PANDEY *et al.*, 2011; SUN; CHENG, 2002; THOMAS; PARAMESWARAN; PANDEY, 2016; PERVEZ *et al.*, 2014), ela também pode ser uma estratégia para produção de enzimas específicas com uso da hidrólise parcial. Isso uma vez que, a biomassa que sofre apenas liquefação enzimática possui fonte de carbono não totalmente despolimerizada.

A liquefação enzimática pode ser realizada diretamente por microrganismos, tais como os fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp., ótimos secretores de enzimas de alta estabilidade (HARRIS *et al.*, 1997; POLIZELI *et al.*, 2005; SHARMA; KUMAR, 2013), ou por complexos enzimáticos comerciais. Esta aplicação foi mencionada no trabalho de Cunha e coautores (2014), que desenvolveram uma liquefação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado por explosão a vapor, com *Aspergillus niger* em FES.

Este fermentado (FES) foi o substrato para a consecutiva FSm a alto teor de sólidos em suspensão (23% m/v) com *A. niger* visando a produção de enzimas. A FSm com substrato liquefeito rendeu cerca de 15 vezes mais atividade da enzima endoglucanase (2,5 UI/mL) do que a FES tradicional (0,17 UI/mL). Em Cunha e coautores (2014) avaliou-se, também, o efeito da FSm (23% m/v) do *A. niger* com bagaço de cana-de-açúcar liquefeito pela enzima comercial endoglucanase C (Genecor, EUA) sobre a atividade endoglucanásica. No caso deste fermentado a atividade foi 2,0 UI/mL. Logo, a fermentação com substrato liquefeito enzimaticamente quer por via microbiana (pré-tratamento biológico), quer com enzima comercial produziu atividade enzimática maior do que a FES tradicional.

Estes resultados podem ser similares com outros tipos de materiais lignocelulósicos. Uma biomassa de interesse em bioconversões é o farelo de trigo (FT), um subproduto abundante no Brasil pelo volume gerado em torno de 25% da indústria de moagem de grão de trigo (ABITRIGO, 2016) e, ainda subutilizado. O FT torna-se diferenciado por conter um teor relativamente elevado de proteínas 13,5-18,4% (DOBREV *et al.*, 2007; DORNEZ *et al.*, 2006; PALMAROLA-ADRADOS *et al.*, 2005; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, 2010) e, principalmente, pela quantidade de lignina 4,9% (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, 2010), o que possibilita uma despolimerização mais fácil, além de ser rica fonte de carboidratos, gorduras e minerais (APPRICH *et al.*, 2014; DOBREV *et al.*, 2007; DORNEZ *et al.*, 2006; PALMAROLA-ADRADOS *et al.*, 2005; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, 2010). Ademais, por causa do alto teor de xilana neste substrato (SUBRAMANYAN; PREMA, 2002), as enzimas xilanases podem ser biossintetizadas em FT, pois é de conhecimento que, a ativação completa de transcrição do gene que codifica as xilanases é dependente da presença de xilana e hidratos de carbono derivados de hemicelulose (POLIZELI *et al.*, 2005).

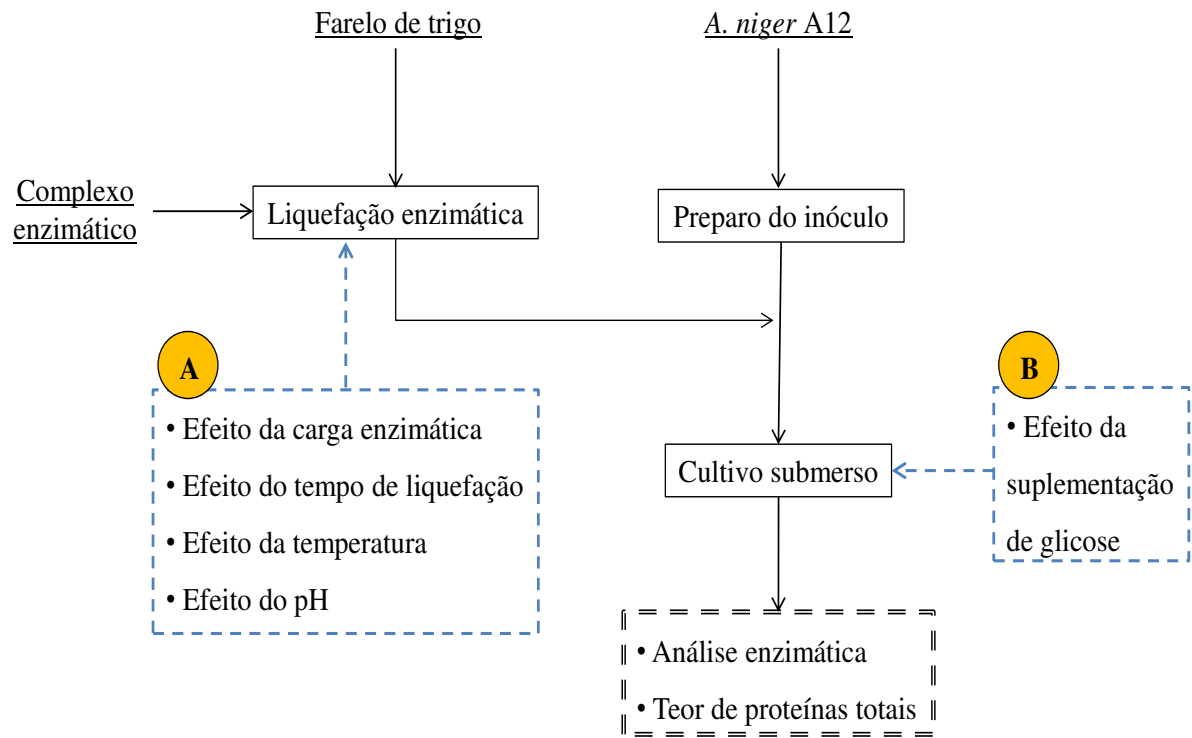
Fundamentando-se nos dados positivos de Cunha e colaboradores (2014), esta estratégia sugeriu a investigação do uso da liquefação enzimática em outras matérias-primas, por exemplo farelo de trigo, como plataforma para produção de outros produtos em FSm, visto que não são frequentes os trabalhos nesta linha até o presente.

### 1.1. OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a liquefação enzimática do farelo de trigo para produção de xilanases por *Aspergillus niger* A12 em fermentação submersa, a alto teor de sólidos. Esta estratégia de fermentação com o substrato farelo de trigo liquefeito via complexo celulolítico comercial visou o aumento da produção destas enzimas no processo fermentativo.

Para tanto, as etapas ilustradas na Figura 1.1 foram executadas. Os estudos em “A” com as variações das condições na liquefação enzimática foram dependentes dos resultados do cultivo submerso. Em “A”, a liquefação foi estudada a diferentes temperaturas, pH, cargas enzimáticas e tempos de incubação observando-se a atividade xilanásica do sobrenadante no fermentado. Em “B” foram realizados a suplementação no meio de cultura com glicose para a verificação da repressão catabólica no cultivo submerso para produção de xilanases.

Figura 1. 1 - Etapas da pesquisa.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção apresenta-se uma revisão da literatura tratando da produção de enzimas e do uso de tratamentos para despolimerização da biomassa lignocelulósica destinada a processos fermentativos.

### 2.1. PRODUÇÃO DE ENZIMAS

#### 2.1.1. Visão geral: bioprocessos e estratégias para o aumento da produtividade enzimática

A literatura reporta larga produção de enzimas pelo bioprocessos fermentação no seu sentido mais amplo do que o metabólico, isto é, o cultivo controlado de microrganismos segundo Mitchell e colaboradores (2006). O cultivo pode ser realizado em algum substrato dissolvido em excesso de água livre, a FSm, ou em matriz sólida com pouca ou nenhuma água livre, a FES (PANDEY, 2003; PANDEY *et al.*, 2008). Ambas fermentações têm suas limitações e vantagens (Tabela 2.1). O melhor processo em termos de custo para determinado bioproduto é ditado pela disponibilidade da infraestrutura, substratos e microrganismo, assim como os tratamentos de efluentes. Além do mais, as diferenças nas condições na FES e na FSm podem alterar a expressão de genes que podem afetar vários fenótipos, tais como o crescimento, desenvolvimento e a produção de enzimas (IWASHITA, 2002). Porém, cabe ressaltar que, em termos de processos industriais em grande escala a produção de enzimas é desenvolvida geralmente em FSm (POLIZELI *et al.*, 2005).

Técnicas para o aumento da produção enzimática e sua redução de custo são empregadas junto à fermentação. Na literatura, encontra-se a técnica da engenharia genética (OTTEN; QUAX, 2005), a otimização da composição do meio de cultura com o planejamento experimental (DOBREV *et al.*, 2007; THOMAS; PARAMESWARAN; PANDEY, 2016; XU *et al.*, 2008), uso de substratos de baixo valor agregado (GUIMARAES *et al.*, 2013) e o uso de tratamentos nos substratos sólidos para processos fermentativos (CUNHA *et al.*, 2014; DAS *et al.*, 2013; MICHELIN *et al.*, 2012).



Tabela 2. 1 – Vantagens (+) e desvantagens (-) da FSm e FES (COLLA *et al.*, 2010; GRAMINHA *et al.*, 2008; PANDEY, 2003).

<b>FSm</b>	<b>FES</b>
+ Microrganismos suspensos em nutrientes dissolvidos em meio líquido	+ Condições de crescimento de fungos filamentosos similares ao da natureza
+ Controle de temperatura e pH	+ Substratos naturais (resíduos agrícolas, agroindustriais) ou sintéticos (quimicamente definidos)
+ Difusão de nutrientes e troca de gases homogênea	+ Pouca geração de efluentes, e rendimento superior
+ Bons rendimentos com enzimas extracelulares	+ Simplicidade e menores equipamentos
- Aeração difícil em meios com alta viscosidade	+ Baixo consumo de energia
- Grandes volumes de efluentes	+ Alta produtividade volumétrica
- Requer muito espaço para equipamentos	- Controle e monitoramento de parâmetros do processo limitado
- Alto custo com aeração e agitação	- Umidade reduzida requer microrganismos específicos
- Formação de espuma	- Heterogeneidade do meio em termos de população microbiana e concentração de solutos

Da engenharia genética vieram grandes avanços nas fermentações, pois os microrganismos recombinantes promoveram elevadas produções em condições industriais (GUDYNAITE-SAVITCH; WHITE, 2016). Pesquisadores e a indústria fazem uso das técnicas de mutação e da tecnologia do DNA recombinante em bactérias, fungos e leveduras, já que esses apresentam uma taxa de crescimento elevada, fácil manuseio e por a maioria ser geralmente reconhecida como segura (PANDEY *et al.*, 2008). Para produção de enzimas, os fungos filamentosos são mais utilizados, pois estes produzem e secretam um amplo espectro de enzimas mais estáveis do que as oriundas de leveduras e bactérias (BAJPAI, 2014). Quando as enzimas são secretadas para o meio elimina-se a necessidade de rompimento celular, simplificando assim a purificação. Porém, ainda assim o custo com substratos é importante.

É de conhecimento que a adoção do substrato de baixo valor agregado, oriundos de biomassa lignocelulósica (os resíduos florestais, agroindustriais e agrícolas), reduz o custo em bioprocessos, a poluição ambiental e agrega valor as matérias-primas subutilizadas (CHOTEBORSKÁ *et al.*, 2004; GUIMARAES *et al.*, 2013; DE CASTRO; DE CASTRO, 2012; BADHAN *et al.*, 2007; ROJAS-REJÓN *et al.*, 2011). Na literatura encontra-se um leque de aplicações destas biomassas renováveis na produção de bioetanol, ácidos orgânicos, proteínas, enzimas e outros, porém tem-se dado mais atenção para a produção de biocombustíveis (MADHAVAN *et al.*, 2012; MATANO *et al.*, 2012; SARKAR *et al.*, 2012). No Brasil, isso se dá principalmente, devido ao grande volume da biomassa derivada de cana-de-açúcar. Ademais, no Brasil há subprodutos da moagem do grão de trigo, resíduos do milho, do arroz, do café, algodão, feijão e outros (DIAS *et al.*, 2012), que, como mencionado, podem ser utilizados como substratos para produção de enzimas e outros produtos da fermentação.

Estratégias para se ter um meio-termo entre a FES e FSm podem ser implementadas quando se desenvolve uma FSm a altos teores de sólidos, aliando a alta produtividade volumétrica em FES com o fácil monitoramento de parâmetros na FSm. Esta estratégia torna-se promissora, principalmente, para produção de enzimas secretadas no meio, pois à medida que há o crescimento microbiano a viscosidade do substrato reduz-se pela despolimerização dos seus componentes lignocelulósicos, facilitando a homogeneidade do crescimento microbiano, como também dos produtos. Porém, a simples adoção destes substratos no meio de cultura não implica no aumento da produtividade, visto o emaranhado dos principais componentes da lignocelulose (celulose, hemicelulose e lignina), da natureza cristalina da celulose e das propriedades inibidoras da lignina. Desse modo, os pré-tratamentos e/ou a hidrólise parcial (liquefação enzimática) podem atenuar essa resistência, possibilitando o uso de seus componentes mais simples pelos microrganismos de modo eficiente (MERINO; CHERRY, 2007; QI *et al.*, 2011).

## 2.2. LIQUEFAÇÃO ENZIMÁTICA

Sabe-se que a hidrólise enzimática se dá em duas principais etapas: liquefação e sacarificação. A liquefação enzimática ocorre durante a fase que antecede a sacarificação (liberação de monômeros), na qual as enzimas degradam parcialmente a estrutura da biomassa lignocelulósica. Assim, há o encurtamento das microfibrilas, redução das interações intermoleculares entre as fibras (por pontes de hidrogênio e ligações de Van der Waals) e

redução da viscosidade, o que resulta numa suspensão de biomassa que pode ser facilmente agitada (SZIJARTO *et al.*, 2011; THYGESEN *et al.*, 2011).

A liquefação enzimática pode ser realizada diretamente por microrganismos secretores de enzimas ou por complexos enzimáticos. Complexos enzimáticos para tal fim são compostos geralmente por celulases, endoglucanases, celobiohidrolases e  $\beta$ -glucosidases, responsáveis pela hidrólise da celulose e, xilanases que degradam a hemicelulose (THYGESEN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011). Os fornecedores comerciais desses complexos de maior visibilidade são a Novozymes e Daniso da Dinamarca, Genecor dos EUA, DMS da Holanda e a BASF da Alemanha (BINOD *et al.*, 2008; BINOD *et al.*, 2013).

Devido à tendência para produção de biocombustíveis, a hidrólise dos materiais lignocelulósicos tem como finalidade tornar mais eficiente a conversão da celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis. Os custos do processamento da biomassa não hidrolisada a elevada carga de sólido (mais que 15% m/m, SKOVGAARD *et al.*, 2014) podem também serem reduzidos com a hidrólise. Com a hidrólise reduz-se o consumo de água, gastos com energia e de equipamentos requeridos para a movimentação do material lignocelulósico a elevada carga de sólido não hidrolisado. Assim, o uso da hidrólise a elevada carga de lignocelulose fornece maior concentração de monômeros para a fermentação e consecutivo aumento no rendimento para produção de biocombustíveis, salvo quando há inibição.

A hidrólise completa pode gerar inibição do crescimento microbiano, quando ela ocorre liberando ácido acético pela hidrólise do grupo acetil na hemicelulose, furfural formado pela degradação das pentoses, hidroximetilfurfural formado pela degradação das hexoses e ácidos fenólicos (FITZPATRICK *et al.*, 2010; MERINO; CHERRY, 2007; ROMANI *et al.*, 2010). Estes inibidores são tóxicos para microrganismos mesmo em baixas concentrações e a presença deles em separado ou em conjunto pode também alterar o pH do meio e o metabolismo. Os inibidores podem danificar a estrutura celular, inibindo assim o crescimento celular, reduzindo as atividades enzimáticas por causarem danos ao DNA, inibindo a síntese de proteínas e, por fim, do produto desejado (JONSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013; PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Para atenuar os efeitos dos inibidores derivados da lignocelulose, há a detoxificação física (por membrana e evaporação), química (neutralização, hidróxido de

cálcio, etc), e bioquímica (microbiana e enzimática), mas estes tratamentos elevam o custo do processo (CHANDEL; SILVA; SINGH, 2011; GUPTA *et al.*, 2011). Por isso, pré-tratamentos (Tabela 2.2) adequados ao material lignocelulósico, bem como uma hidrólise amena (liquefação enzimática) são de interesse.

Tabela 2. 2 – Pré-tratamentos aplicados à biomassa lignocelulósica.

<b>Pré-tratamentos</b>		<b>Referências</b>
• Físicos	Moagem, trituração, ultrassom, micro-ondas e radiação.	(Silva <i>et al.</i> , 2010)
• Químicos	Processos ácidos, alcalinos e líquidos iônicos.	(Saha <i>et al.</i> , 2005; Zhu <i>et al.</i> , 2012)
• Físico-químicos	Auto-hidrólise e explosão com vapor.	(Chen <i>et al.</i> , 2010; Kaar <i>et al.</i> , 1998; Michelin <i>et al.</i> , 2012)
• Biológicos	Fungos da podridão branca ou castanha.	(Keller <i>et al.</i> , 2003)

Dentre os pré-tratamentos, o biológico é mais brando em termos de valores de pH e temperatura, tem baixa toxicidade (ausência ou mínima geração de inibidores para a fermentação) e baixa corrosão em comparação com os pré-tratamentos via ácida (concentrado ou diluído) ou alcalina, além de requerer menos energia do que, por exemplo, o hidrotérmico (MOSIER *et al.*, 2005; SUN; CHENG, 2002). Contudo, somente utilizá-lo para se obter a sacarificação pode exigir longos tempos de cultivo (MOOD *et al.*, 2013) e consecutivo acréscimo nos gastos, mas este pré-tratamento aliado a outros antes da fermentação submersa, pode contribuir para a melhoria da produção enzimática.

A liquefação, para produção de enzimas em fermentação com sólidos, não exige uma solubilização completa da celulose e hemicelulose, pois são os oligossacarídeos remanescentes que induzem o microrganismo a iniciar ou continuar a síntese das enzimas específicas para clivagem das ligações que os mantêm ainda estruturados. Portanto, quando se pretende aplicar a hidrólise enzimática de forma incompleta, ou seja, a liquefação, o objetivo não é obter substratos com excelentes conversões a monômeros; assim, a geração de inibidores é diminuída e a quantidade de enzimas necessárias é relativamente pequena. Entretanto, a deformação e escoamento da biomassa lignocelulósica são influenciados pelas propriedades físicas de cada tipo de lignocelulose, das enzimas empregadas e das condições

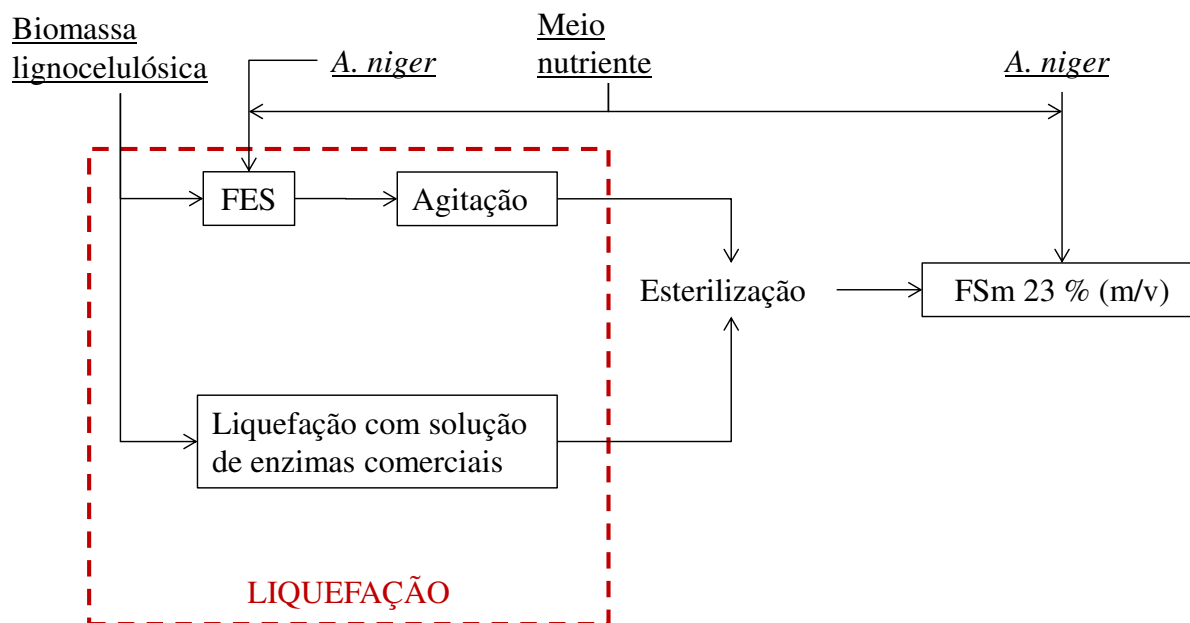
em que a hidrólise é conduzida (SKOVGAARD *et al.*, 2014). Na Tabela 2.3 estão citados alguns trabalhos que utilizaram (ou não) biomassa pré-tratada para produção de enzimas.

Tabela 2. 3 – Enzimas produzidas em processos fermentativos com agroresíduos pré-tratados como substrato.

Enzimas	Fonte de carbono	Tratamento	Microrganismo	Referências
Endoglucanases	Bagaço de cana-de-açúcar	Biológico	<i>A. niger</i>	(Cunha <i>et al.</i> , 2014)
Xilanases	Palha e farelo de trigo	Auto-hidrólise	<i>A. ochraceus</i>	(Michelin <i>et al.</i> , 2012)
Xilanases	Farelo de trigo	Nenhum	<i>A. terricola</i>	(Michelin <i>et al.</i> , 2011)
Xilanases	Farelo de trigo	Autoclavagem	<i>A. niger</i> XY-1	(Xu <i>et al.</i> , 2008)
Xilanases	Farelo de trigo e palha de arroz	Alcalino	<i>A. fumigatus</i> ABK9	(Das <i>et al.</i> , 2013)
Xilanases	Bagaço de cana	Hidrotérmico	<i>A. niger</i> DR02	(Robl <i>et al.</i> , 2015)

Cunha e coautores (2014) avaliaram a produção de endoglucanase por *A. niger* em FSm a 23% (m/v) com bagaço de cana-de-açúcar (pré-tratado por explosão de vapor) liquefeito por enzima comercial endoglucanase C (Genecor, EUA) e pela combinação da liquefação microbiana em FES e enzima comercial (Figura 2.1). A liquefação microbiana do bagaço por FES com *A. niger* ocorreu por 12 h e completada com mais 36 h de liquefação com adição de enzima comercial (endoglucanase C) sob agitação. Já a liquefação do bagaço somente com enzima comercial foi realizada em batelada alimentada até atingir 30% (m/v) de teor de sólidos em 12 h de alimentação com mais 36 h de agitação. Depois, os dois bagaços liquefeitos seguiram para esterilização para servirem como substrato para FSm suplementada com meio nutriente. A FSm, a 32 °C por 72 h, com o bagaço liquefeito por FES e enzima comercial propiciou um aumento de cerca de 15 vezes em atividade de endoglucanase (2,5 UI/mL); nas mesmas condições citadas de fermentação, a FSm com o bagaço liquefeito com enzima comercial aumentou em 12 vezes a produção de endoglucanase (2,0 UI/mL) quando foram comparados somente a FES tradicional (0,17 UI/mL), ou seja, sem o substrato liquefeito.

Figura 2. 1 - Produção de enzimas em FS<sub>m</sub> com substrato liquefeito (Cunha *et al.*, 2014).



Assim, o trabalho de Cunha e coautores (2014) mostrou que ao se utilizar materiais lignocelulósicos mais complexos e a alta carga de sólidos, a via de tratamento direto com enzimas pode exigir uma adequação no modo de alimentação na liquefação. Esta adequação na alimentação visa evitar a ineficiência da hidrólise pela alta concentração de sólidos em uma única batelada, que impede uma mistura eficiente pela alta viscosidade. Isto pode demandar maior tempo para a hidrólise total, como observado em Puri e colaboradores (2013), que desenvolveram o processo de hidrólise em duas fases para obter uma conversão global de 88% para produção de etanol.

### 2.2.1. Fatores que afetam a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica

Os principais fatores que influenciam a hidrólise enzimática completa são fatores relacionados ao substrato e as enzimas (MANSFIELD *et al.*, 1999). A taxa e o grau de hidrólise são dependentes da eficiência das interações enzima-substrato, que por sua vez são influenciadas pelas propriedades físico-químicas do substrato, ou seja, da natureza da matéria-prima e das condições de pré-tratamento em que esta foi submetida e assim da:

- a) cristalinidade: a parte cristalina pode ser hidrolisada mais rápido com a combinação de enzimas que atuem nas partes amorfas;
- b) grau de polimerização: que representa o número médio de meros (número de unidades estruturais repetidas) existentes numa molécula;

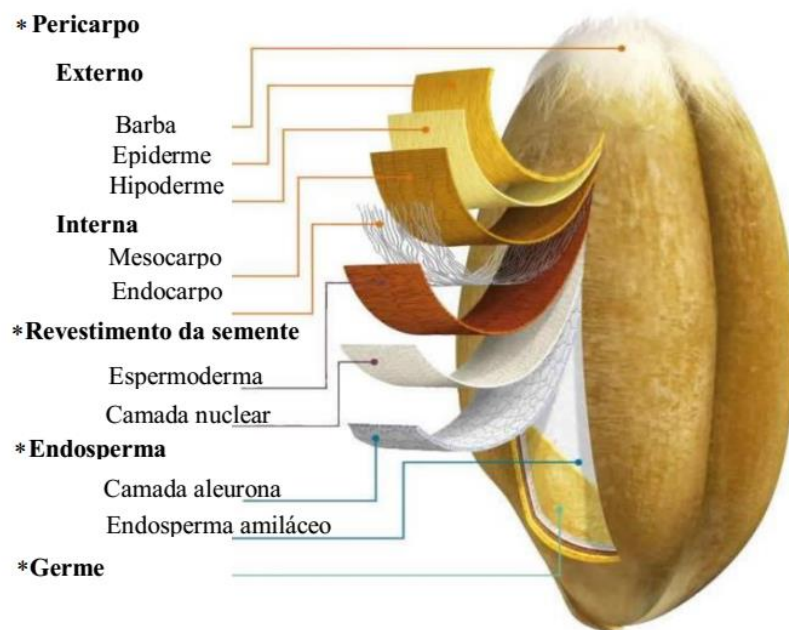
- c) teor de lignina: a lignina impede o acesso das enzimas à celulose e hemicelulose e a sua interação com as enzimas pode ser irreversível ( MOONEY *et al.*, 1998);
- d) tamanho das fibras, porosidade bem como a área superficial: maior área superficial significa mais locais de adsorção disponíveis por massa de substrato e, com a redução do tamanho de partícula, a área superficial específica aumenta, assim como o volume de poros acessíveis às enzimas.

Fatores relacionados com a enzima podem ser, por exemplo, a perda gradativa da atividade enzimática no decorrer da hidrólise (inibição por produto final, inativação térmica ou pelo pH do meio) e a separação de componentes enzimáticos pela difusão em poros do substrato e a adsorção irreversível das enzimas (MANSFIELD *et al.*, 1999).

### 2.3. FARELO DE TRIGO

O farelo de trigo (FT) consiste da cobertura mais externa do grão de trigo que inclui tecidos do pericarpo e tegumento (EVERS; MILLAR, 2002) (Figura 2.2). Este subproduto é proveniente da produção de farinha de trigo na indústria de moagem de grãos de trigo.

Figura 2. 2 - Estrutura do grão de trigo. Disponível em:  
<http://www.nabim.org.uk/wheat/wheat-structure>



O FT é de grande interesse para bioprocessos pelas seguintes razões:

- a) pela quantidade gerada: cerca de 25% da produção da farinha de trigo, equivalente a 2.606 mil toneladas em 2015 (ABITRIGO, 2016);
- b) é um subproduto e, assim, não necessita de espaço geográfico específico com agricultura;
- c) apresenta baixo valor agregado em relação a meios de cultura sintéticos (definidos quimicamente);
- d) é de grande heterogeneidade química sendo fonte rica de carboidratos, proteínas, gorduras e minerais (Tabela 2.4) (PRÜCKLER *et al.*, 2014).

O teor relativamente elevado de proteínas (até 18%), bem como a pequena quantidade de lignina (menor de 5%) são os principais diferenciadores do FT para a outras biomassas lignocelulósicas (Tabela 2.5) (APPRICH *et al.*, 2014; JAVED *et al.*, 2012), pois a lignina é de difícil solubilização e potencial geradora de inibidores para o crescimento microbiano (PANDEY *et al.*, 2011). Apesar disso, o FT tem sido destinado basicamente à alimentação animal e humana (CHERUBINI, 2010; JAVED *et al.*, 2012).

Assim, o FT pode ser utilizado como um substrato para produção de biomassa (microrganismos), biocombustíveis e metabólitos diversos (APPRICH *et al.*, 2014). No caso de produção de enzimas, o FT é empregado para induzir endoglucanase (CMCase), glicosidade,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, amilase, protease,  $\alpha$ -galactosidade e outras (JAVED *et al.*, 2011). A produção de xilanases em grande escala também é feita utilizando o FT como substrato por este ser um ótimo indutor devido ao seu elevado teor de xilana (SUBRAMANYAN; PREMA, 2002; DOBREV *et al.*, 2007; DORNEZ *et al.*, 2006; PALMAROLA-ADRADOS *et al.*, 2005).



Tabela 2. 4 – Composição típica do farelo de trigo. Adaptado de Apprich *et al.* (2014).

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade (%)</b>	<b>Referências</b>
Água	12,1	(Dobrev <i>et al.</i> , 2007; Roberts <i>et al.</i> , 1985)
Proteínas	13,5-18,4	(Dobrev <i>et al.</i> , 2007; Dornez <i>et al.</i> , 2006; Palmarola-Adrados <i>et al.</i> , 2005; Rodríguez-Zúñiga, 2010)
Gordura	2,6-3,4	(Dobrev <i>et al.</i> , 2007; Roberts <i>et al.</i> , 1985)
Total de carboidratos	50,4-79,1	(Beaugrand <i>et al.</i> , 2004; Dobrev <i>et al.</i> , 2007)
Amido	24,9	(Dornez <i>et al.</i> , 2006)
Celulose	10,9	(Rodríguez-Zúñiga, 2010)
Hemicelulose	28,9	(Rodríguez-Zúñiga, 2010)
Arabinosilanos	10,7-28,4	(Dobrev <i>et al.</i> , 2007; Dornez <i>et al.</i> , 2006; Palmarola-Adrados <i>et al.</i> , 2005)
$\beta$ -glucana	13,2	(Dobrev <i>et al.</i> , 2007)
Lignina	4,9	(Rodríguez-Zúñiga, 2010)
Cinzas	2,7-6,1	(Dobrev <i>et al.</i> , 2007; Dornez <i>et al.</i> , 2006; Roberts <i>et al.</i> , 1985)

Tabela 2. 5 - Percentual de lignina e proteínas em biomassas lignocelulósicas segundo Rodríguez-Zúñiga (2010).

<b>Biomassa lignocelulósica</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Proteínas (%)</b>
Bagaço de cana-de-açúcar	21,7	1,52
Casca de arroz	18,72	2,35
Farelo de soja	9,78	43,22
Farelo de trigo	4,89	17,61

## 2.4. ENZIMAS XILANOLÍTICAS

### 2.4.1. Ação catalítica de xilanases

A biomassa lignocelulósica é constituída predominantemente de polímeros de hidratos de carbono (celulose e hemicelulose) e um polímero aromático (lignina) (SAHA, 2003) e sua despolimerização de modo enzimático requer um conjunto de diferentes enzimas. Deste conjunto, tem-se as xilanases que clivam as ligações entre os constituintes da hemicelulose (ZHU *et al.*, 2006). Por causa desta ação, xilanases têm aplicações comerciais na fabricação de papel, ração animal, panificação, indústrias de suco e vinho, produção de xilitol e outros (POLIZELI *et al.*, 2005).

Referente à hidrólise, a hemicelulose é mais suscetível do que a celulose. A celulose, por ser um polímero linear construído por subunidades de D-glicose, associadas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, de cadeias longas interligadas por ligações de hidrogênio, tendo uma natureza cristalina e pouco amorfa, é muito recalcitrante à degradação (RAVEN *et al.*, 1999). Já a hemicelulose, formada de heteropolímeros de cadeia ramificada, é relativamente amorfa, constituída de carboidratos poliméricos, que incluem xiloglucana (heteropolímero de D-xilose e D-glicose), glucomanana (heteropolímero de D-glicose e D-manose), galactoglucomanana (heteropolímero de D-galactose, D-glicose e D-manose), arabinogalactana (heteropolímero de D-galactose e arabinose) e xilana (homopolímero de  $\beta$ -1,4-D-xilopiranoose com diferentes grupos substituintes na cadeia lateral) (BAJPAI, 1997; FENGEL; WEGENER, 1984; POLIZELI *et al.*, 2005; SAHA; BOTHAST, 1999; SHALLOM; SHOHAM, 2003). Essa estrutura amorfa torna a hemicelulose mais suscetível à hidrólise sob condições brandas, por causa da sua maior área superficial e facilidade de penetração das moléculas de água no interior das fibras (RAVEN *et al.*, 1999).

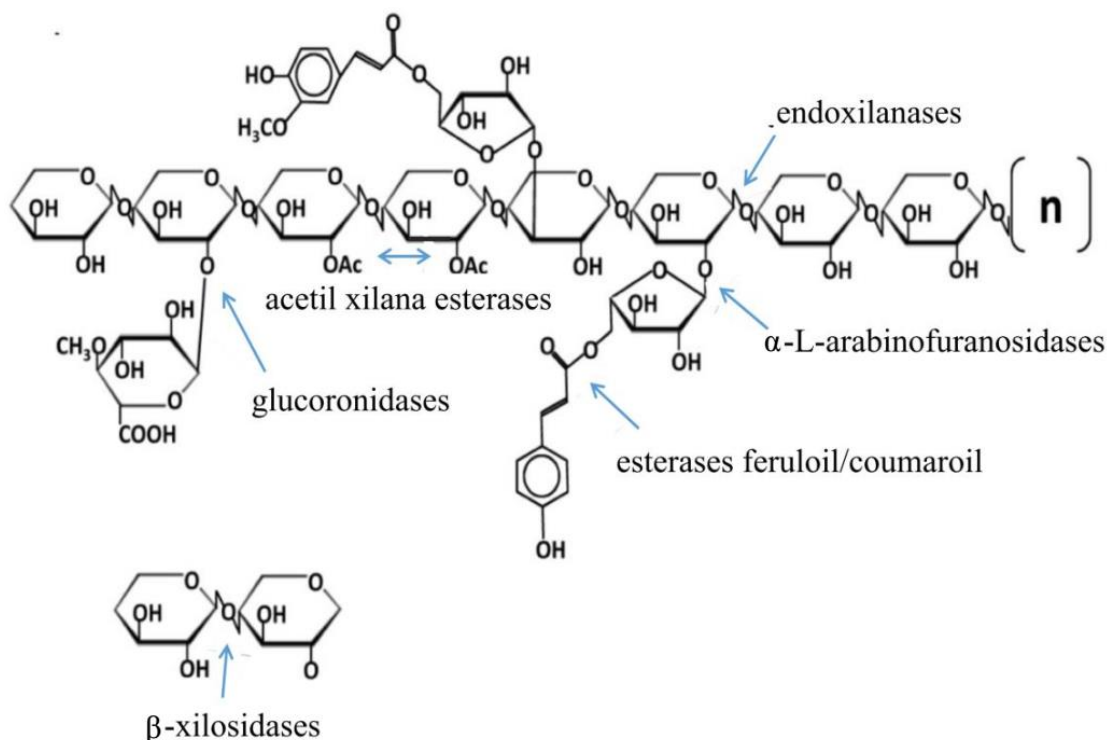
O modo e a extensão da clivagem enzimática da hemicelulose são influenciados pela quantidade e tipo de cadeias laterais, pois estas determinam a conformação física e a reatividade da cadeia principal (KULKARNI *et al.*, 1999; MOTTA *et al.*, 2013). Tal composição e teor dos componentes da hemicelulose diversificam-se conforme a fonte vegetal, a idade da planta, parte da planta, o tipo de solo e outros (PANDEY *et al.*, 2011). Normalmente, o componente predominante da hemicelulose em biomassas agrícolas é a xilana, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose (SAHA, 2003; ZHU *et al.*, 2006). Dependendo das ramificações presentes, as xilanas podem ser

denominadas como arabinoxilanas, glucuronoxilanas, glucuronoarabinoxilanas ou homoxilanas.

Em razão da heterogeneidade e natureza química complexa da hemicelulose, a sua despolimerização requer a ação de um amplo espectro de enzimas xilanases com especificidade catalítica e modos de ação diversificados, a fim de liberar unidades de xilose e xilo-oligossacarídeos da xilana (BAJPAI, 1997; POLIZELI *et al.*, 2005; SAHA; BOTHAST, 1999).

Para liberar essas unidades, as xilanases atuam de modos diferentes de acordo com o tipo de ação (Figura 2.3). As mais importantes são as endo-1-4- $\beta$ -D-xilanases, que clivam as ligações glicosídicas  $\beta$ -1-4 internas da cadeia principal da xilana, resultando em xilo-oligossacarídeos com diferentes comprimentos, e as exo-1,4- $\beta$ -xilosidases, que hidrolisam xilo-oligômeros curtos em unidades de xilose individuais.

Figura 2. 3 - Esquema das ações das enzimas xilanolíticas na estrutura do polímero xilana. Adaptação de Kirikyali e Connerton (2015).



Ademais, há as enzimas acessórias que atuam nas desramificações como as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases,  $\alpha$ -glucuronidases,  $\alpha$ -galactosidases e outras (SHALLOM; SHOHAM,

2003). Esta etapa de desramificação inicia a hidrólise enzimática removendo os bloqueios para clivagem da cadeia principal de xilana.

#### **2.4.2. Regulação de enzimas por *Aspergillus niger***

Na degradação de materiais lignocelulósicos, os fungos filamentosos são bem adequados, pois produzem e secretam um conjunto amplo de enzimas específicas, que são sintetizadas de acordo com a fonte de carbono (AMORE; GIACOBBE; FARACO, 2013), o microrganismo envolvido e as condições fisiológicas do meio. De modo geral, os fungos filamentosos produzem elevados títulos enzimáticos quando comparados aos obtidos a partir de bactérias e leveduras (POLIZELI *et al.*, 2011).

Dentre os fungos filamentosos mais utilizados na produção de celulasas e hemicelulasas têm-se os dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* (STRICKER, MARCH, GRAFF, 2008). *Aspergillus* sp. (*A. niger*, *A. terreus*, *A. oryzae* e *A. awamori*) é largamente utilizado na indústria (MEYER *et al.*, 2011) por ter baixa toxicidade, sendo a maioria das espécies consideradas microrganismos GRAS (“generally regarded as safe”) (NASSER *et al.*, 2003).

O *Aspergillus* sp. cresce naturalmente dentro e sobre substratos sólidos, de modo que sua reprodução se dá tanto com esporos assexuados quanto sexuados (exceto a espécie *A. fumigatus*, patógeno de seres humanos segundo Brookman e Denning, 2000) e as suas condições de crescimento também não são exigentes, pois podem degradar uma ampla variedade de substâncias orgânicas (KRIJGSHELD *et al.*, 2013). O crescimento vegetativo se inicia pela germinação do esporo, formando hifas, que crescem de modo polar e apical (extremidade das células). A ramificação das hifas forma uma rede de micélio responsável pela aquisição dos nutrientes do meio (PRADE; TIMBERLAKE, 1993).

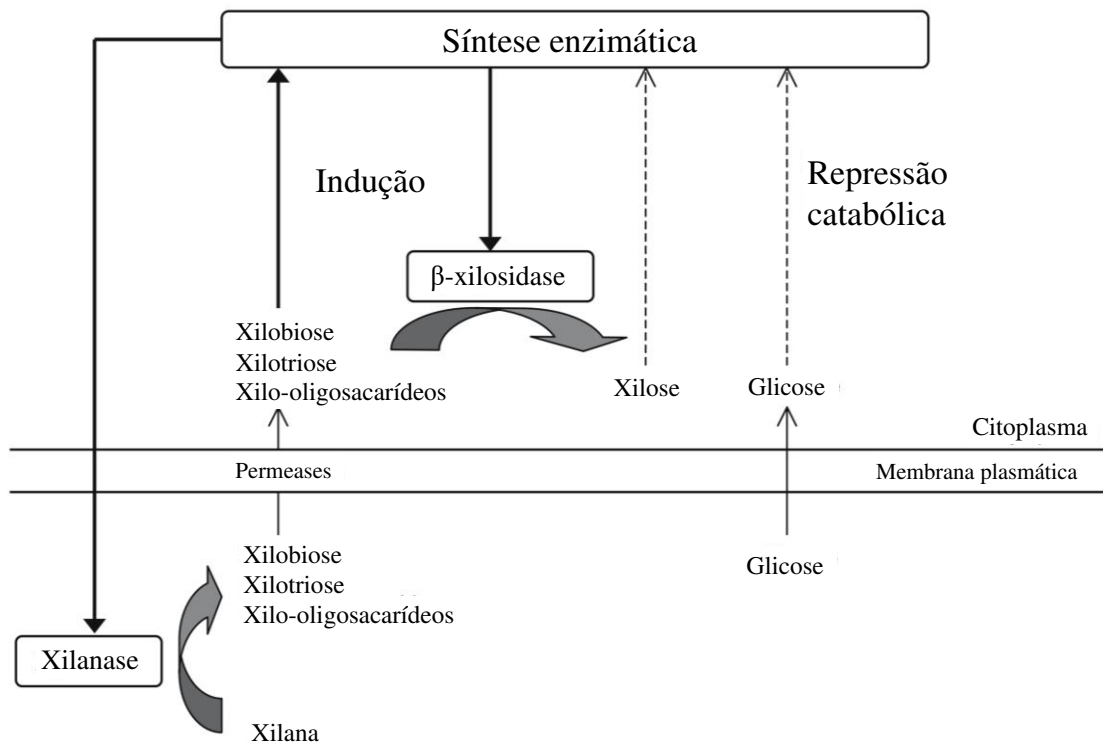
No entanto, o metabolismo dos fungos filamentosos pode ser alterado, quando este é exposto a baixa quantidade de água (GERVAIS; MOLIN, 2003), causando a desnaturação de enzimas-chaves, levando assim ao desequilíbrio metabólico, o que pode alterar a taxa de crescimento e sua secreção de enzimas (PANDEY *et al.*, 1999). Porém, o *Aspergillus*, em particular a espécie *A. niger* é resistente à baixa atividade de água (com limite para o crescimento de 0,88), cresce em amplas faixas de pH (1,4-9,8) e temperatura (6-47°C, com temperatura ótima de 35-37°C) (SCHUSTER *et al.*, 2002). Logo, o *A. niger* é adequado para várias condições, principalmente, condições de cultivo em ambientes quente e úmidos.

Além das enzimas xilanases (HARRIS *et al.*, 1997; MONTI *et al.*, 2003), o *A. niger* produz pectinases, proteases,  $\alpha$ -amilase, glucomilase, celulase, ácidos orgânicos e proteínas recombinantes (WARD *et al.*, 2005). No entanto, há um grande gasto energético do fungo para a transcrição e regulação dos genes codificadores das enzimas. Dessa forma, o fungo passa a produzir enzimas para degradar o material polissacarídeo em condições de exaustão de nutrientes livres.

Sabe-se que as enzimas são reguladas e induzidas na presença dos polímeros do substrato, mono e oligossacarídeos. A indução da via catabólica de pentoses nas espécies de *Aspergillus* ocorre na presença de D-xilose ou L-arabinose. A presença de D-xilose no meio ativa a transcrição de enzimas xilanolíticas pelo fator de transcrição XlnR, que regula a expressão de genes xlnB, xlnC e xlnD em *Aspergillus* sp. que codificam enzimas degradantes da xilana (endoxilanases B, endoxilase C e  $\beta$ -xilosidase) (STRICKER; MARCH; GRAFF, 2008; VAN PEIJ *et al.*, 1998). Contudo, a indução de enzimas é prejudicada com a presença de carboidratos prontamente metabolizáveis como é o caso da glicose e nitrogênio (por exemplo, amônia), beneficiando, assim, a sobrevivência do microrganismo sem elevados gastos metabólicos (WARD *et al.*, 2005). Deve-se ressaltar que a regulação das enzimas xilanolíticas não é igual em todos os *Aspergillus* sp. (AMORE, GIACOBBE, FARACO, 2013).

A síntese de xilanases pode ser compreendida pelo esquema hipotético apresentado na Figura 2.4. De início, as xilanases constitutivas, que possuem baixa atividade, são expressas para degradarem os fragmentos de baixa massa molecular da xilana em xilobiose, xilotriose entre outros. Os xilo-oligossacarídeos são absorvidos pela célula com ajuda de permeases de  $\beta$ -xilósido, desencadeando a indução e expressão dos genes do sistema xilanolítico (KULKARNI *et al.*, 1999). A  $\beta$ -xilosidase pode ser produzida constitutivamente e/ou indutivamente e converte xilobiose em xilose, uma fonte assimilável pelo microrganismo. Esta enzima pode ser mantida dentro do micélio do fungo filamentoso ou pode ser liberada no meio de crescimento (POLIZELI *et al.*, 2005).

Figura 2. 4 - Esquema hipotético da regulação do complexo xilanolítico envolvendo endoxilanase e  $\beta$ -xilosidase. Adaptação de Polizeli *et al.* (2005).



Na Figura 2.4 também está esquematizada a repressão catabólica, que reprime a síntese enzimática, já que a biossíntese de xilanase ocorre na ausência de monômeros digeríveis (POLIZELI *et al.*, 2005).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAIS

##### 3.1.1. Microrganismo

A cepa produtora de xilanases utilizada foi a *Aspergillus niger* A12 da coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos (RJ, Brasil) mantida a  $-15^{\circ}\text{C}$ . O armazenamento dos esporos de *A. niger* A12 se deu em microtubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL com solução de glicerol a 20% v/v e NaCl a 0,1% m/v. A manipulação dos esporos fúngicos ocorreu sobre a superfície da câmara de fluxo laminar unidirecional vertical FUV 06 Veco (Brasil).

##### 3.1.2. Farelo de trigo

O farelo de trigo (FT) fino, com granulometria de 150 – 1000  $\mu\text{m}$ , foi cedido pela empresa Richard Saigh Indústria e Comércio S/A (São Caetano do Sul, SP, Brasil) e armazenado à  $-5^{\circ}\text{C}$ . Este FT foi seco a  $35^{\circ}\text{C}$  por 12 h antes da esterilização e das etapas de liquefação e fermentação. A amostra de FT utilizada não passou por fracionamento.

##### 3.1.3. Complexo enzimático comercial

Para a hidrólise do FT utilizou-se o complexo enzimático Cellic CTec3 da Novozymes (Dinamarca), denominado neste trabalho como CC3, composto basicamente por celulases e hemicelulases (BIOENERGY NOVOZYMES, 2012).

##### 3.1.4. Composição do meio de cultura

O meio nutriente utilizado para os cultivos foi uma adaptação do meio descrito por Mandels e Weber (1969). Este continha (g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,4;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,0;  $\text{CaCl}_2$ , 0,3;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,2; peptona de soja, 5,0; extrato de levedura, 2,0; ureia, 0,3; Tween 80, 1,0;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,5;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,16;  $\text{ZnSO}_4$ , 0,14 e  $\text{CoCl}_2$ , 0,2. A glicose foi acrescentada ao meio nutriente para uma concentração final de 30,0 g/L para o pré-cultivo (inóculo) e 10,0 g/L para o cultivo. O meio foi esterilizado com a solução de glicose à parte em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 min em frasco de vidro.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Preparação do inóculo

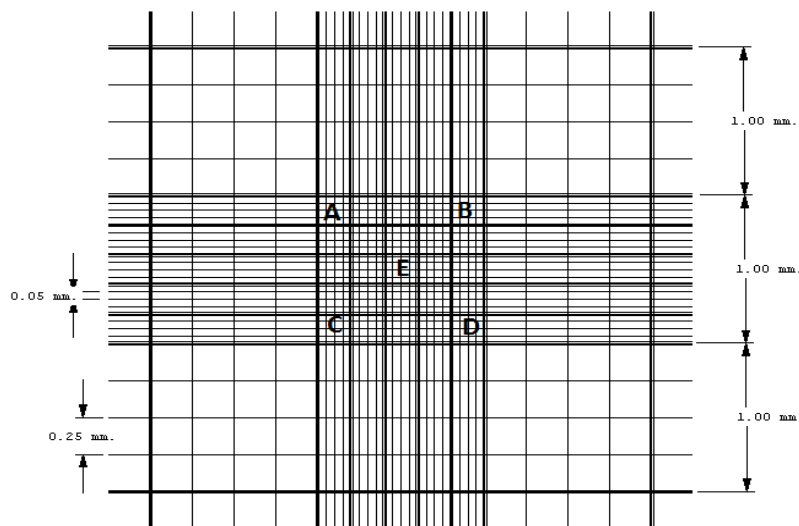
#### 3.2.1.1. Preparo da suspensão de esporos

Os esporos em solução de glicerol (descrito no item 3.1.1) foram reativados em placas com meio ágar dextrose de batata (PDA) incubados por 72 h e a 32°C em estufa bacteriológica (Tecnal TE 392/1, Brasil) (Figura A.1, Apêndice). Após este período, uma suspensão de esporos foi obtida com adição de cerca de 10 mL da solução do surfactante de Tween-80 (0,3% v/v) e leve raspagem com auxílio de alça estéril.

#### 3.2.1.2. Determinação da concentração de esporos da suspensão e preparo do pré-cultivo

A concentração de esporos em suspensão foi determinada a partir da alíquota desta suspensão diluída em água. A contagem de esporos foi realizada na câmara de Neubauer Improved (Alemanha) (Figura 3.1) nos cinco quadrados medianos (A,B,C,D e E) de lados de 0,2 mm, área de 0,04 mm<sup>2</sup> e 0,1 mm de profundidade, subdivididos em 16 quadrados.

Figura 3. 1 - Modelo do quadriculado na câmara de Neubauer. Disponível em: <http://www.celeromics.com/en/resources/Technical%20Notes/cells-chamber-concentration.php>



O cálculo do volume da suspensão de esporos a ser acrescentado ao caldo fermentativo do pré-cultivo foi realizado pelo uso das seguintes equações:

$$C_{\text{susp}} \cdot V_{\text{susp}} = C_{\text{esp}} \cdot V_{\text{meio}}$$

Eq. 3. 1



$$C_{\text{susp}} = (\bar{N} \cdot \text{FD}) / V_{\text{campo}} \quad \text{Eq. 3.2}$$

$$V_{\text{susp}} \text{ (mL)} = C_{\text{esp}} \cdot V_{\text{meio}} / (\bar{N} \cdot \text{FD} / V_{\text{campo}}) \quad \text{Eq. 3.3}$$

nas quais,

$C_{\text{esp}}$  = concentração de esporos desejada para o cultivo de  $1 \times 10^7$  (esporos/mL);

$C_{\text{susp}}$  = concentração de esporos na suspensão (esporos/mL);

$V_{\text{meio}}$  = volume de meio de cultura desejado (100 mL);

$V_{\text{campo}}$  = volume de um campo dos quadrados medianos ( $4 \times 10^{-6}$  mL);

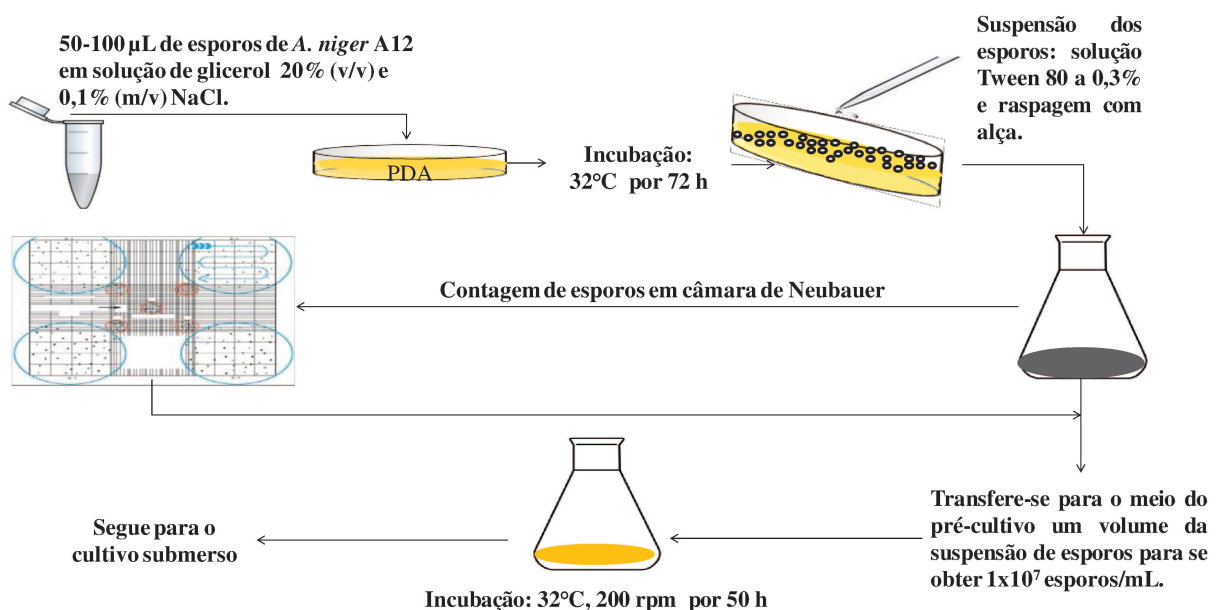
$\bar{N}$  = número médio de esporos dos cinco campos dos quadrados medianos de  $0,04 \text{ mm}^2$ ;

FD = fator de diluição.

### 3.2.1.3. Preparo do pré-cultivo (inóculo)

A preparação do inóculo para as FSM consistiu na combinação do volume da suspensão de esporos calculado com o uso da equação 3.2 com 100 mL de meio Mandels estéril (descrito no item 3.1.5) em frasco Erlenmeyer de 500 mL (Figura 3.2). A suspensão resultante foi cultivada a  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ , 200 rpm em shaker com agitação orbital (Tecnal TE-4200, Brasil) durante 50 h, período necessário para a obtenção homogênea dos esporos germinados. Logo depois, desta suspensão (pré-cultivo) um volume equivalente a 10% (v/v) do cultivo (item 3.2.3) foi inoculado em frascos Erlenmeyers para os ensaios de FSM.

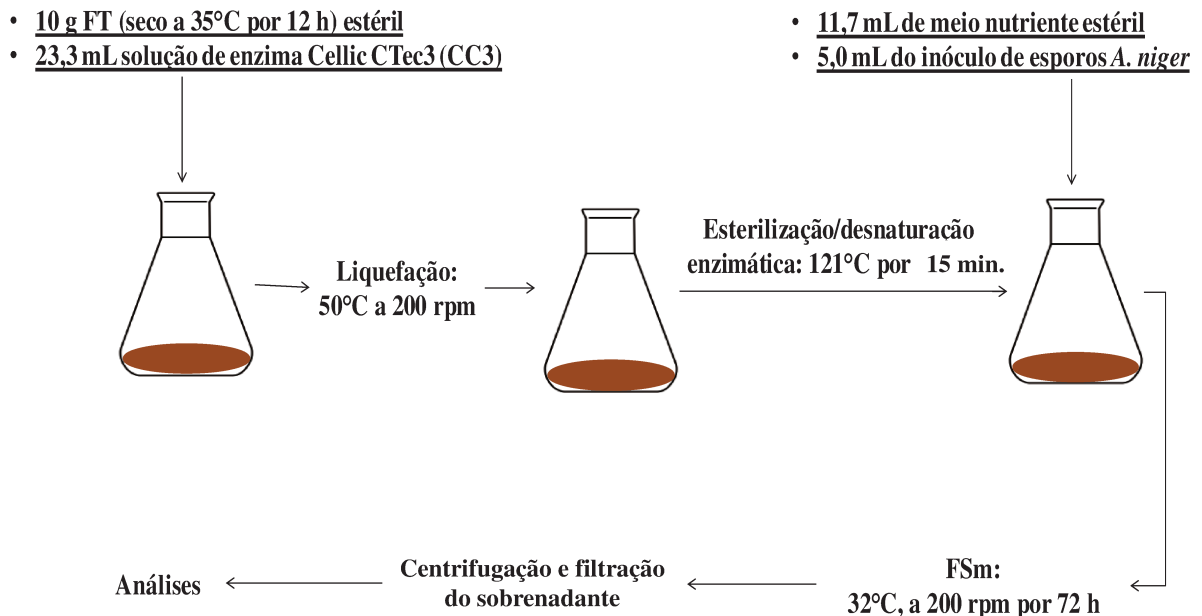
Figura 3. 2 - Esquema da preparação do inóculo.



### 3.2.2. Metodologia de liquefação enzimática

As etapas de liquefação enzimática do FT e de FSm estão esquematizadas na Figura 3.3. Antes da etapa de liquefação, 10 g de FT seco a 35 °C por 12 h foi inserido em frasco Erlenmeyer de 250 mL e, este conjunto foi esterilizado em autoclave vertical CS (Prismatec, Brasil) a 121 °C durante 15 min. Após despressurização da autoclave e resfriamento do frasco, 23,3 mL de solução do CC3 diluída em tampão citrato de sódio estéril (0,05 mol/mL a pH 4,8) foi adicionado ao frasco. A manipulação de todo material estéril ocorreu sobre a superfície da câmara de fluxo laminar unidirecional vertical FUV 06 Veco (Brasil).

Figura 3. 3 - Esquema da preparação do FT liquefeito e FSm.



A liquefação do FT sucedeu com a incubação desta mistura reacional em shaker com agitação orbital a 200 rpm em diferentes temperaturas (30,40 e 50 °C) e tempos de hidrólise ( $t_h$ ) (0, 6, 18 e 24 h) em triplicata. O FT liquefeito a diferentes tempos sob a carga de 1,20 FPase/mL pode ser visualizado na Figura A.2 do Apêndice. Depois da liquefação, os frascos com a suspensão de FT liquefeito (fechados por algodão hidrófilo) seguiram para esterilização e desnaturação enzimática a 121°C por 15 min em autoclave para serem utilizados na FSm.

### 3.2.3. Fermentação submersa a elevado teor de sólidos

Aos frascos Erlenmeyer contendo o FT liquefeito, inoculou-se 5,0 ml dos esporos germinados de *A. niger* (pré-cultivo) e 11,7 ml de meio Mandels estéril. Nesta composição, o FT *in natura* inicialmente submetido à liquefação representou 20% (m/v) do volume final do cultivo de 50 mL considerando perda nula de líquido desde o início da hidrólise. O teor de sólidos na FSm adotado seguiu o apresentado por Cunha e coautores (2012).

Os ensaios com o pH inicial da FSm ajustado foram corrigidos com HCl a 5 mol/L estéril. O volume desta solução adicionado aos frascos foi mensurado com o uso de “frascos Erlenmeyer sacrifícios” (descartados ao se ter conhecimento do volume de solução de HCl adequado para o ajuste do pH igual a 5,0). Portanto, o volume de solução gasto nestes frascos foi a base para realização dos ajustes de pH nos demais ensaios.

O cultivo ocorreu em shaker orbital com a incubação por 72 h, a 32°C e a 200 rpm. Decorrido o tempo de incubação, o fermentado foi centrifugado (centrífuga Eppendorf 5804 R, Alemanha) a 8.228 g por 10 min, a 4°C e o sobrenadante filtrado (papel filtro quantitativo faixa branca) para mensuração de sua concentração de proteínas totais e atividade xilanásica.

Para fins de comparação com os resultados do cultivo com FT liquefeito a alto teor de sólidos, três tipos de cultivos controles foram realizados (Tabela 3.1):

- a) Cultivo controle (C): substituiu-se o FT liquefeito pela mistura de 10 g de FT seco (12 h à 35 °C) com 23,3 mL de tampão citrato de sódio (0,05 mol/L a pH 4,8), todos estéreis.
- b) Cultivo controle sob agitação (CA): mesma composição do controle C, porém a mistura FT seco e tampão foi agitada em diferentes tempos em shaker a 200 rpm a 50°C.
- c) Cultivo controle com enzima (CE): mesmos procedimento e composição do controle C, mas substituindo-se o tampão por 23,3 mL de solução do CC3 diluída em tampão citrato de sódio (0,05 mol/mL a pH 4,8, estéril), seguida de imediata esterilização em autoclave a 121 °C por 15 min.

Tabela 3. 1 - Cultivo submerso com controles da liquefação enzimática do FT.

Insumos/ condições	Controles		
	Controle C	Controle sob agitação CA	Controle com enzima CE
FT	✓	✓	✓
Tampão	✓	✓	
Solução CC3 em tampão			✓
Agitação (6, 18 e 24 h; 200 rpm e a 50 °C)		✓	
Liquefação a 0 h			✓
FSm (32 °C, 200 rpm por 72 h)			
Meio nutriente	✓	✓	✓
Inóculo <i>A. niger</i>	✓	✓	✓

Ao frasco Erlenmeyer contendo os controles, seguiu o mesmo procedimento realizado para a FSm com FT liquefeito, ou seja, inoculou-se 5,0 ml dos esporos germinados de *A. niger* e 11,7 ml de meio Mandels estéril. Todos os cultivos foram feitos em triplicata.

#### 3.2.4. Separação da fase líquida do FT liquefeito para determinação da concentração de açúcares redutores

Após as liquefações com CC3, todo o conteúdo dos frascos foi centrifugado (8.228 g a 4°C por 10 min) e os tubos contendo sobrenadantes foram colocados em água fervente por 5 min para desnaturação das enzimas. Em seguida, o sobrenadante foi resfriado e filtrado (papel filtro quantitativo faixa branca). A concentração dos açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS de Miller (1959) descrito no item 3.2.5.2.

#### 3.2.5. Métodos analíticos

No sobrenadante proveniente da FSm determinou-se a concentração de proteínas totais pelo método de Bradford (1976), a concentração de açúcares redutores (AR) pelo método do DNS (Miller, 1959), a atividade xilanásica pela adaptação do método descrito por Bailey *et al.* (1992) e a atividade celulolítica pelo método de Ghose (1987).

#### 3.2.5.1. Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976) que se baseia na ligação do corante azul brilhante Coomassie G-250 as proteínas. As amostras diluídas (100,0 µL) em tampão acetato de sódio (0,2 mol/L e pH 5,0) foram misturadas a 1,0 mL do reagente Bradford (preparado em laboratório, segundo Bradford, 1976 em Anexo) em tubos 1,5 mL. Após 10 min de reação, a mistura foi transferida para cubetas de 2,0 mL e a sua absorvância medida a 595 nm ( $A_{595}$ ) em espectrofotômetro Beckman DU 640 (Beckman Instruments, EUA). A concentração proteica foi estimada pela interpolação da curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de soluções de albumina de soro bovino (BSA).

#### 3.2.5.2. Determinação da concentração de açúcares redutores (AR)

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959) que está embasado na redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico por conta da ação de AR em condições alcalinas a cerca de 100 °C. Esse composto aromático absorve a luz, sendo possível assim, estabelecer uma relação direta entre a medida colorimétrica e a quantidade de açúcares redutores presente (GONÇALVES, 2010). Para isso, em tubos de ensaio misturou-se 250 µL do reagente DNS com 250 µL da mistura reacional contendo os açúcares liberados por ação enzimática. Depois da devida homogeneização, estes tubos seguiram para reação em água fervente por 5 min e foram resfriados em banho de gelo para findar a reação de redução. Aos tubos resfriados foram adicionados 3,25 mL de água deionizada e estes foram homogeneizados. Esta solução diluída teve sua absorção a 540 nm ( $A_{540}$ ) medida. A concentração de AR foi estimada pela interpolação da curva padrão analítica construída a partir de concentrações conhecidas de soluções de glicose.

#### 3.2.5.3. Determinação da atividade xilanásica

A determinação da atividade de xilanases foi realizada pelo método descrito por Bailey *et al.* (1992) com adaptação no tempo de reação e concentração do substrato. O método apoia-se na reação da liberação de açúcares redutores do substrato xilana. A reação ocorreu em tubos de ensaio a 50°C em banho termostático (Tecnal TE-2000, Brasil), durante 30 min, com 2,0 mL de solução de substrato 2% (m/v) de xilana (xilana de *beechwood*, X4252 Sigma, EUA) e 200 µL de amostra. Com o tempo reacional transcorrido, uma alíquota de 250 µL da mistura reacional foi retirada dos tubos e acrescentada a tubos contendo 250 µL do reagente DNS procedendo como descrito no item 3.2.5.2.

O controle da reação foi realizado com 2,0 mL de solução de xilana 2% (m/v) mantidos a 50 °C por 30 min, que foram misturados a 200 µL das amostras durante 5 s; desta mistura, 250 µL foram transferidos para tubos com 250 µL do reagente DNS, seguindo para reação de redução como descrito no item 3.2.5.2.

Uma unidade de atividade enzimática (UI) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores por minuto nas condições deste ensaio. A atividade total foi calculada multiplicando as unidades (µmol/ min) pelo volume total de extrato enzimático e, a atividade por grama de FT seco (UI/g de FT) foi calculada dividindo a atividade total pela massa de FT utilizada na liquefação.

#### 3.2.5.4. Determinação da atividade celulolítica

A carga enzimática do CC3 foi determinada a partir da mensuração da atividade total celulolítica do complexo CC3 pelo método de Ghose (1987). Uma massa de 50 mg de papel filtro Whatman n° 1 foi utilizado como substrato para liberação durante 60 min a 50 °C de 2,0 mg de glicose por 0,5 mL de solução CC3. Com o tempo reacional transcorrido, uma alíquota de 250 µL da mistura reacional foi retirada dos tubos e acrescentada a tubos contendo 250 µL do reagente DNS procedendo como descrito no item 3.2.5.2. Em que uma unidade FPase equivale a 2,0 mg de glicose liberados por minuto sob as condições do ensaio, obtendo assim uma atividade de cerca de 171,0 FPase/mL do complexo CC3.

#### **3.2.6. Análise estatística**

A comparação dos resultados numéricos da atividade enzimática obtida nas fermentações com FT liquefeito sob variações dos valores de pH, da carga enzimática e do tempo de liquefação foi realizada pelo teste de comparação de médias de Tukey, com nível de confiança de 95%. O software Minitab versão 16.2.1 foi utilizado para tal.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos com o uso do substrato liquefeito enzimaticamente em fermentação submersa de *A. niger* a alto teor de sólidos. Para tanto, analisou-se o perfil da produção de xilanases na fermentação com farelo de trigo liquefeito em diferentes condições (pH, temperatura, tempo de liquefação e carga enzimática) e o efeito da suplementação de glicose ao meio de cultura na fermentação com FT liquefeito.

Os primeiros estudos visaram determinar parâmetros básicos da fermentação com FT liquefeito e da liquefação enzimática do FT. Referente à FSm, investigou-se a cinética de produção de xilanases e, quanto à liquefação enzimática do FT, os parâmetros básicos investigados foram a temperatura e o pH. Os estudos iniciais com a liquefação possibilitaram gerar um substrato liquefeito que aumentou a atividade de xilanases pelo fungo *A. niger* em FSm quando comparada à atividade obtida com FSm com substrato não liquefeito.

Os estudos foram realizados utilizando como estratégia a análise de um parâmetro de cada vez (método OFAT, “one factor at a time”).

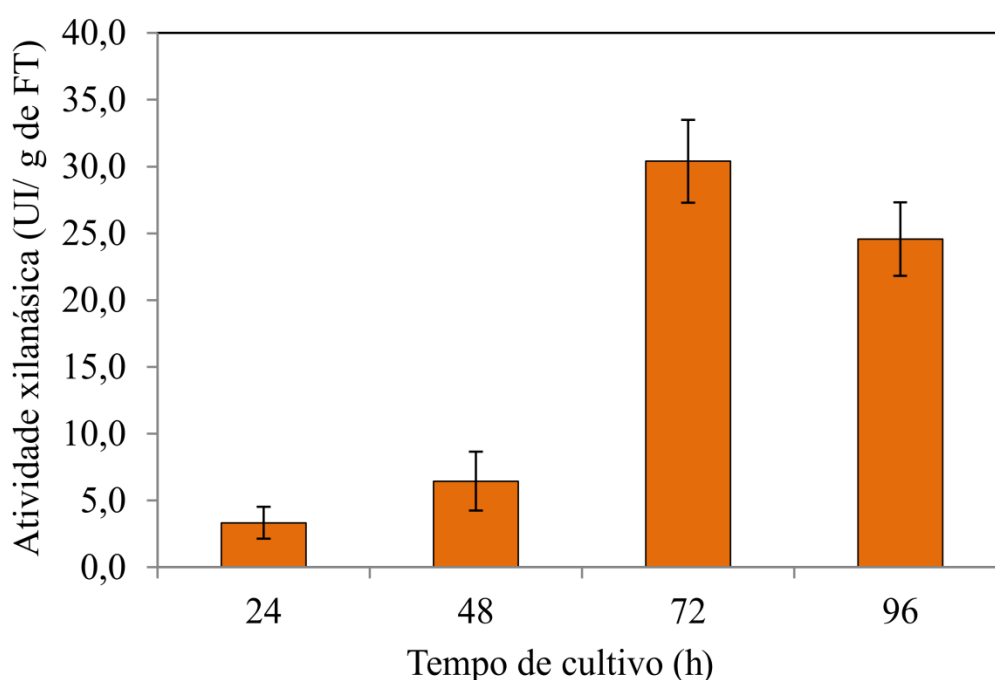
### 4.1. CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE XILANASES EM FSM COM FT LIQUEFEITO

O estudo cinético da produção de xilanases foi realizado para se determinar o tempo de cultivo para os estudos seguintes. A cinética de produção de xilanases (Figura 4.1) foi realizada somente com uma condição de FT liquefeito. Pela Figura 4.1, pode-se notar que houve uma produção xilanásica crescente até 72 h de incubação, de  $3,3 \pm 1,2$  a  $30,4 \pm 3,1$  UI/g de FT. No tempo de cultivo de 96 h, notou-se uma produção enzimática de  $24,6 \pm 2,8$  UI/g de FT.

Supõe-se com este resultado que no início da FSm a presença de açúcares consumíveis provinda da liquefação reprimiu a produção de xilanases nas primeiras 48 h de tempo de cultivo (geralmente induzida durante o crescimento fúngico, KULKARNI *et al.*, 1999). Em 96 h de cultivo houve uma leve redução da produção de xilanases (não significativa) quando comparada a obtida em 72 h. Quando há redução de bioprodutos no cultivo, possivelmente, deve-se pela redução de nutrientes bem como a formação de metabólitos que inibem o crescimento fúngico e a secreção de enzimas (FEROZA; BEGUM; HOSSAIN, 1998). No caso de enzimas, pode haver a desnaturação/inativação.

Além disso, Ward e colaboradores (2005) apontam o aumento do teor de biomassa (microrganismo) com o cultivo a tal ponto, que isto passa a limitar os processos de transferência de massa no sistema, com um possível aumento da viscosidade da mistura do cultivo; isto faz com que a produção de proteínas (dentre elas, enzimas) desejada alcance um ápice e depois decresça.

Figura 4. 1 - Cinética da produção de xilanases em FSm de *A. niger* com FT liquefeito. Liquefação: 30% (m/m); pH 4,8 e CC3 a 1,20 FPase/mL; 6 h a 50°C e a 200 rpm. Barras representam desvio padrão.



Considerando o alto teor de sólidos (> 15% m/v) adotado no cultivo submerso no presente trabalho, a comparação dos resultados obtidos foi estendida às fermentações em estado sólido. Rodriguez-Zuñiga (2010) obteve uma produção de xilanases por *A. niger* em FES com farelo de trigo similar ao obtido neste presente trabalho (34 UI/g). No entanto, a semelhança de rendimentos entre a FES em Rodriguez-Zuñiga (2010) e a FSm com FT liquefeito pôde ser observada somente no tempo de 72 h, uma vez que o contrário ocorreu com os outros tempos analisados de 24 e 48 h; nestes tempos de cultivo em Rodriguez-Zuñiga (2010) a atividade xilanásica foi superior à obtida neste trabalho nos mesmos tempos (24 h, cerca de 15 UI/g; em 48 h cerca de 25 UI/g).

Isto pode ser explicado devido à reprodução do ambiente natural na FES de crescimento fúngico, ou seja, a junção de suporte físico e recurso de nutrientes segundo



Pandey (2003) e, por o substrato “*in natura*”, possivelmente, não conter uma considerada quantidade de açúcares metabolizáveis livres de início, o oposto ao início da FSm com FT liquefeito o que tarda a síntese de enzimas pelo fungo. Além do mais, sabe-se que o cultivo é influenciado por muitos fatores, tais como o tipo de microrganismo, de substrato, das condições operacionais físicas (temperatura), físico-químicas (pH) e bioquímicas (idade e tamanho do inóculo), bem como o tipo de fermentação (PANDEY, 2003).

Para a metodologia empregada neste trabalho (uso de substrato liquefeito na fermentação), percebeu-se que a produção de xilanases esteve dependente do tempo de cultivo, uma vez que o fungo secreta enzimas em ambiente escasso de nutrientes livres. Em outros trabalhos tem-se para produção de xilanases tempos semelhantes (ou não), como no estudo de Jin e coautores (2012) que o tempo de cultivo foi de 48 h em FES por *A. niger* com substrato palha de trigo e sabugo de milho; em Delabona e colaboradores (2012) o pico de atividade xilanásica foi em 48 h seguida de 72 h em FES de *A. fumigatus* com fonte de carbono farelo de trigo e, Pal e Khanum (2010) utilizaram farelo de trigo e de soja em FES de *A. niger* obtendo maior atividade após 6 dias (144 h) de incubação.

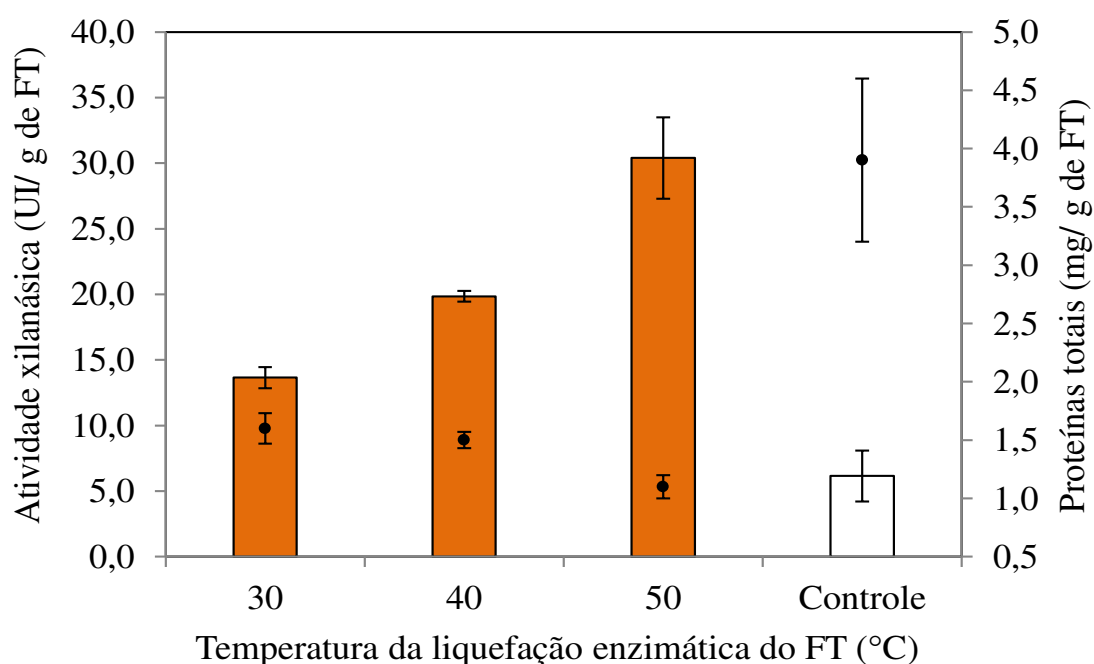
Assim, diante dos resultados expostos na Figura 4.1, a FSm a 20% (m/v), a 32°C e a 200 rpm com 72 h de cultivo foi a adotada para os ensaios seguintes, não só pela produção de xilanases obtida, mas também pelo menor tempo (72 h contra 96 h) em que esta produção ocorreu, uma vez que, no âmbito industrial, a redução de tempo de processo aumenta a produtividade bem como proporciona uma redução de custos.

#### 4.2. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DA LIQUEFAÇÃO DO FT NA PRODUÇÃO DE XILANASES

O estudo referente à temperatura de liquefação do FT foi realizado em três temperaturas, 30, 40 e 50 °C (Figura 4.2). Notou-se neste estudo um aumento, em torno de duas vezes, da atividade xilanásica à medida que a temperatura de liquefação aumentou de 30 para 50 °C.

Ao confrontar estes resultados com o ensaio “controle C” (FSm com 10 g de FT seco à 32 °C por 12 h, 11,7 mL de meio nutriente e 5 mL do inóculo de *A. niger*), constatou-se uma superioridade na produção de xilanases de todas as temperaturas testadas sobre este ensaio, principalmente, com a produção obtida à 50 °C que resultou em 30,4 contra 6,2 UI/g de FT do controle, ou seja, cerca de cinco vezes mais atividade xilanásica.

Figura 4. 2 - Efeito da temperatura na liquefação enzimática do substrato FT sobre a atividade xilanásica (■) e proteínas totais (●) produzidas em FSm por *A. niger*. Liquefação: 30% (m/m); pH 4,8; 6 h; CC3 a 1,20 FPase/mL. Controle C (□). Barras representam desvio padrão.



Quanto à concentração de proteínas totais (Figura 4.2), houve um leve decréscimo com o aumento da temperatura sem variação significativa. Ao contrário do que ocorreu com a produção de xilanases, a produção proteica em todos os testes foi inferior ao controle, com uma diferença máxima de cerca de quatro vezes obtida na condição a 50 °C (1,1 contra 4,0 mg/g de FT do controle C).

A temperatura de liquefação que proporcionou maior atividade xilanásica coincidiu com a temperatura ótima de conversão do complexo enzimático CC3, fato previsto, pois a faixa ótima varia de 50-55 °C segundo relato da Bioenergy Novozymes (2012). Possivelmente, a 50 °C houve uma maior liberação de indutores de xilanases durante as 6 h de liquefação do que nas demais temperaturas estudadas. No entanto, temperaturas maiores do que 50 °C não foram avaliadas neste trabalho.

### 4.3. INFLUÊNCIA DO pH DA LIQUEFAÇÃO DO FT NA PRODUÇÃO DE XILANASES

Sabe-se que os principais fatores que afetam a atividade enzimática são a temperatura, o pH, a força iônica e as concentrações de substratos (BISSWANGER, 2014). Por ora, os fatores testados foram a temperatura (Figura 4.2) e o pH (Figura 4.3 e 4.4), visto que a concentração de substrato e enzimas, bem como a força iônica não foram alteradas.

A atividade xilanásica na FSm foi realizada com FT liquefeito a vários valores de pH (pH de 4,4-5,8). Quando o parâmetro pH na liquefação foi alterado, pôde-se notar um comportamento diferente da produção de xilanases com e sem o ajuste de pH na FSm (Figura 4.3 e 4.4, respectivamente).

Os ensaios com ajuste do pH inicial da FSm para 5,0 foram corrigidos com solução de HCl 5,0 mol/L (Figura 4.4), com o intuito de acrescentar a mínima quantidade de líquido para não haver alteração no teor de sólidos na FSm (20% m/v). Este valor de pH adotado está em torno do pH do meio nutriente utilizado na FSm (meio adaptado do descrito em Mandels e Weber, 1969). Com este estudo, percebeu-se um perfil de atividades xilanásicas próximas, contudo a maior atividade obtida foi a pH de liquefação a 4,8 (34,4 UI/g de FT). Entretanto, estatisticamente, a variação de atividades obtidas não foi significativa pelo teste de Tukey. Já a diferença das concentrações de proteínas foram significativas com relação ao controle e outros ensaios.

Para a avaliação sem ajuste do pH inicial para FSm o teste de Tukey apontou diferença não significativa entre as atividades xilanásicas obtidas nas condições de pH (5,2, 5,4 e 4,8) e a pH (4,4 e 5,8) e que o resultado da atividade no controle C foi significativamente diferente da liquefação conduzida a pH (4,4-5,8). Quanto às concentrações de proteínas, todos os resultados foram iguais, exceto o controle C.

Figura 4. 3 - Efeito do pH na liquefação enzimática do substrato FT sobre a atividade xilanásica (■) e proteínas totais (●) produzidas em FSm por *A. niger* sem ajuste de pH. Liquefação: 30% (m/m); 50 °C; 6 h; CC3 a 1,20 FPase/mL. Controle C (□). Barras representam desvio padrão. Letras gregas iguais representam valores estatisticamente semelhantes, de acordo com o teste de Tukey,  $p < 0,05$ .

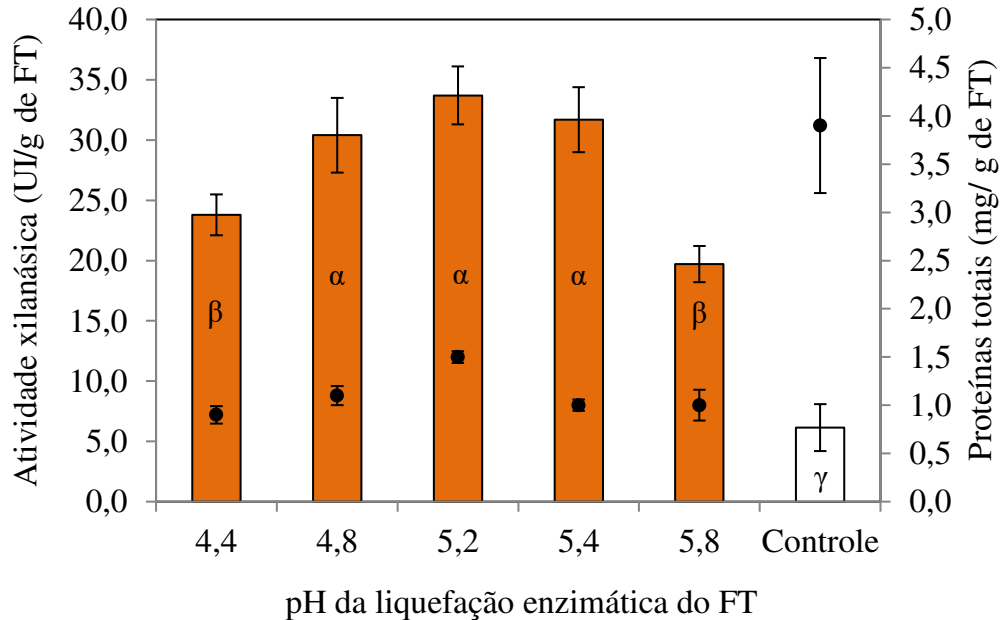
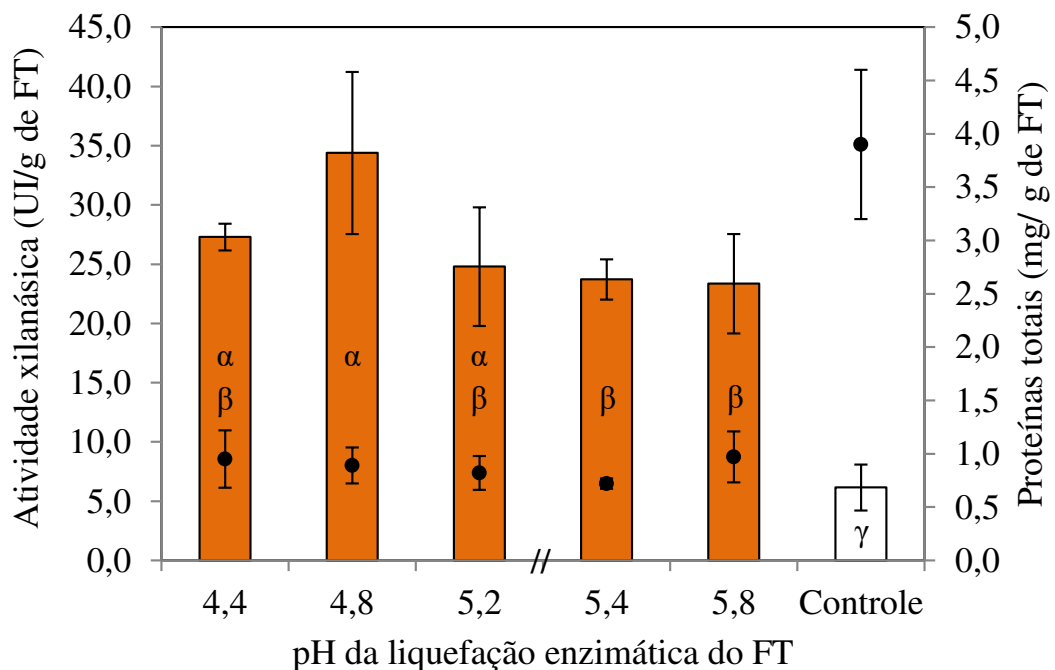


Figura 4. 4 - Efeito do pH na liquefação enzimática do substrato FT sobre a atividade xilanásica (■) e proteínas totais (●) produzidas em FSm (com pH inicial ajustado para 5,0) por *A. niger*. Liquefação: 30% (m/m); 50 °C; 6 h; CC3 a 1,20 FPase/mL. Controle C (□). Barras representam desvio padrão. Letras gregas iguais representam valores estatisticamente semelhantes, de acordo com o teste de Tukey,  $p < 0,05$ .



Para os ensaios sem ajuste de pH para a FSm (Figura 4.3), o melhor desempenho das xilanases foi quando as enzimas contidas no CC3 ambientaram em seu pH ótimo de ação na liquefação. Na liquefação houve a ação do complexo enzimático CC3, que segundo a Bioenergy Novozymes (2012), tem como pH ótimo entre 4,75 e 5,25 para bioconversões de 18% de teor de sólidos de palha de trigo pré-tratada. Esta faixa de pH refletiu nas melhores atividades xilanásicas obtidas com a variação de pH na liquefação sem ajuste de pH para FSm.

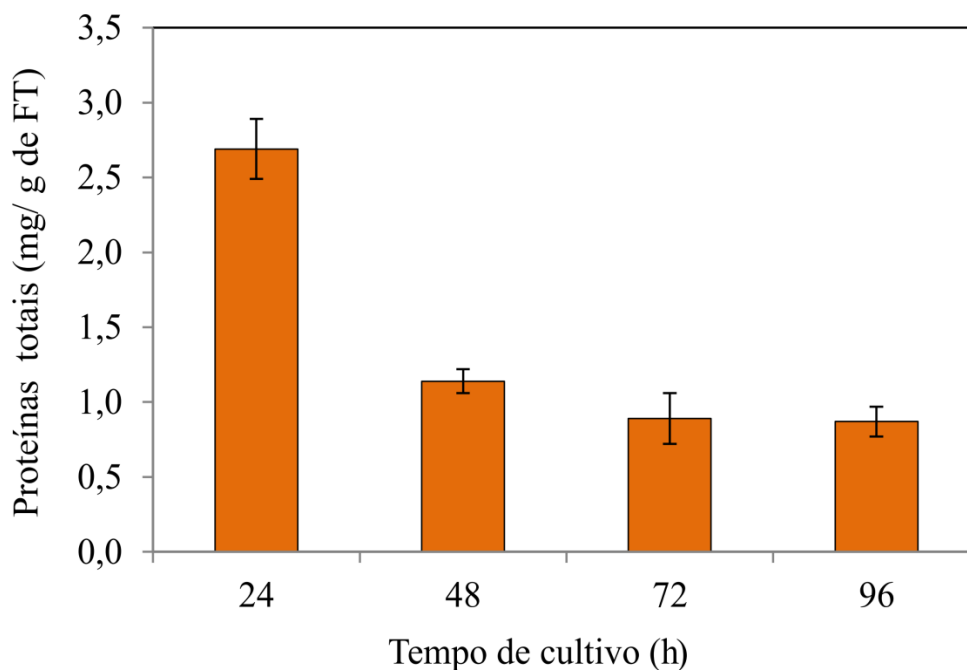
Para os ensaios com o pH da FSm ajustado (Figura 4.4), têm-se o mesmo pH inicial de cultivo, isto é, somente o efeito da liquefação do FT foi contabilizado, já que as enzimas secretadas no meio da FSm tiveram o mesmo pH para a hidrólise e o crescimento fúngico. Somente a variação de pH na liquefação nas condições de FSm com pH ajustado, adotadas neste trabalho, não foram significativas para alterar a produção de xilanases em cultivo.

Em Jin e coautores (2012) investigou-se o efeito do pH na estabilidade da atividade de xilanases do cultivo em palha de trigo e sabugo de milho por FES de *A. niger*. Os resultados indicaram que a atividade enzimática em condições ácidas foi maior do que em condições alcalinas, obtendo pico de atividade em pH 5,0.

Por fim, para tentar compreender a baixa concentração de proteínas totais no final da FSm com FT liquefeito, acompanhou-se o total de proteínas presentes no sobrenadante da FSm em diferentes tempos de cultivo (Figura 4.5).

Notou-se um decréscimo na quantidade de proteínas totais à medida que o tempo de cultivo aumentou, mantendo-se constante de 72 a 96 h de cultivo, tempo máximos estudados. A concentração relativamente alta de proteínas nas primeiras 24 h de cultivo, possivelmente, deve-se pela composição do substrato em questão: farelo de trigo, rico em proteínas de 13,5-18,4% em 100 g de FT (Dobrev *et al.*, 2007; Dornez *et al.*, 2006; Palmarola-Adrados *et al.*, 2005; Rodríguez-Zúñiga, 2010).

Figura 4. 5 – Concentração de proteínas totais em diferentes tempos de FSm com FT liquefeito. Liquefação: 30% (m/m); pH 4,8 e CC3 a 1,20 FPase/mL; 6 h a 50°C e a 200 rpm. Barras representam desvio padrão.



Assim, estes resultados de perfil proteico *versus* tempo de cultivo mostraram que houve uma redução de proteínas com o crescimento fúngico. Este crescimento fúngico é mais propício em substratos menos complexos e recalcitrantes, visto uma menor heterogeneidade de enzimas requerida para a clivagem das ligações, que mantém os componentes estruturados. De fato, Moreira e coautores (2012) relataram que a diversidade de enzimas sintetizadas pelo microrganismo é induzida proporcionalmente pela complexidade do substrato lignocelulósico.

Logo, a maior concentração de proteínas totais no ensaio controle, com FT não liquefeito, frente às FSm com FT liquefeito (Figura 4.2, 4.3 e 4.4) pode ser explicada pela complexidade e composição do substrato, no qual o microrganismo é exposto.

Na literatura, encontram-se também alguns estudos que fizeram uso do tratamento biológico da biomassa para promover o aumento da produção enzimática (Cunha *et al.*, 2014; Cunha *et al.*, 2012; Florencio *et al.*, 2016; Michelin *et al.*, 2012). Florencio e colaboradores (2016) e Cunha e colaboradores (2012) empregaram um tipo de cultivo microbiano, com *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar (pré-tratado por explosão a vapor), denominado processo de fermentação sequencial (FS), que consiste da transferência da massa de um cultivo em estado sólido para uma fermentação submersa. Neste processo, a liquefação microbiana

inicia-se na FES com a síntese e secreção de enzimas pelo fungo. Esta estratégia, nas duas pesquisas (Cunha *et al.*, 2012; Florencio *et al.*, 2016), resultou no aumento da produção enzimática e atividades específicas relativamente altas tanto em celulases quanto em hemicelulases. Em Florencio e colaboradores (2016) relatou-se 3,4 vezes mais atividade xilanásica em termos volumétricos do que a FSm convencional (sem liquefação microbiana em FES) com *A. niger*. Em Cunha e colaboradores (2012) um resultado similar foi obtido em biorreator de coluna de bolha, porém a atividade de endoglucanase foi cerca de 3 vezes mais alta que em FSm convencional por *A. niger* no mesmo biorreator.

Michelin e colaboradores (2012) também estudaram a produção das enzimas xilanases por *A. ochraceus* usando como substrato a combinação do farelo de trigo, o licor hemicelulósico derivado da auto-hidrólise da palha de trigo e meio nutriente. Esta combinação, em 72 h de cultivo, resultou numa atividade total em torno de 550 UI (em 1 L de volume trabalhado durante a fermentação em biorreator de capacidade de 2 L). Esta atividade foi superior às atividades resultantes dos cultivos somente com o licor de palha de trigo ou com farelo de trigo ou com xilana de madeira de bétula (*birchwood xylan*). Ao analisar os resultados desse estudo tomando como referência a atividade xilanásica obtida pelo cultivo com xilana de madeira de bétula (substrato custoso), pôde-se notar que o cultivo com a combinação farelo de trigo e licor rendeu 54% mais atividade, o com farelo de trigo foi 28% maior e o somente com licor da auto-hidrólise de palha de trigo rendeu 20% mais atividade do que o cultivo com xilana.

Isto apoia a ideia que um substrato possuindo fase líquida com xilo-oligossacarídeos aliado à fase sólida estimula mais a síntese de enzimas pelo fungo, devido a melhor interação entre as células fúngicas e o substrato para promover a indução. Nos cultivos do presente trabalho ambas as fases compunham o substrato, isto é, FT liquefeito. A liquefação do FT a elevado teor de sólidos resultou num substrato composto de fase líquida com xilo-oligossacarídeos e fase sólida com material lignocelulósico ainda não despolimerizado (Figura A. 2).

A fase líquida com oligossacarídeos também foi utilizada por Robl e coautores (2015) que adotaram como substrato na FSm uma solução aquosa 50% (v/v) de licor derivado do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar, rico em xilose e xilo-oligossacarídeos (10 e 5 g/L, respectivamente) para produção de xilanases por *A. niger* DR02. Obteve-se nesse estudo a máxima atividade 229,3 UI/mL em 144 h de cultivo em biorreator.

Neste trabalho também foi verificado o consumo da fonte de carbono durante o cultivo, constatando que a exaustão das fontes de carbono foi associada à produção de xilanases.

Por fim, os resultados do presente trabalho estão de acordo com o trabalho já mencionado de Cunha e colaboradores (2014), ratificando que a liquefação enzimática do material lignocelulósico proporciona um aumento na produção de enzimas em FSm quando comparada as fermentações sem a liquefação do substrato.

#### 4.4. INFLUÊNCIA DA CARGA ENZIMÁTICA E TEMPO DA LIQUEFAÇÃO DO FT NA PRODUÇÃO DE XILANASES

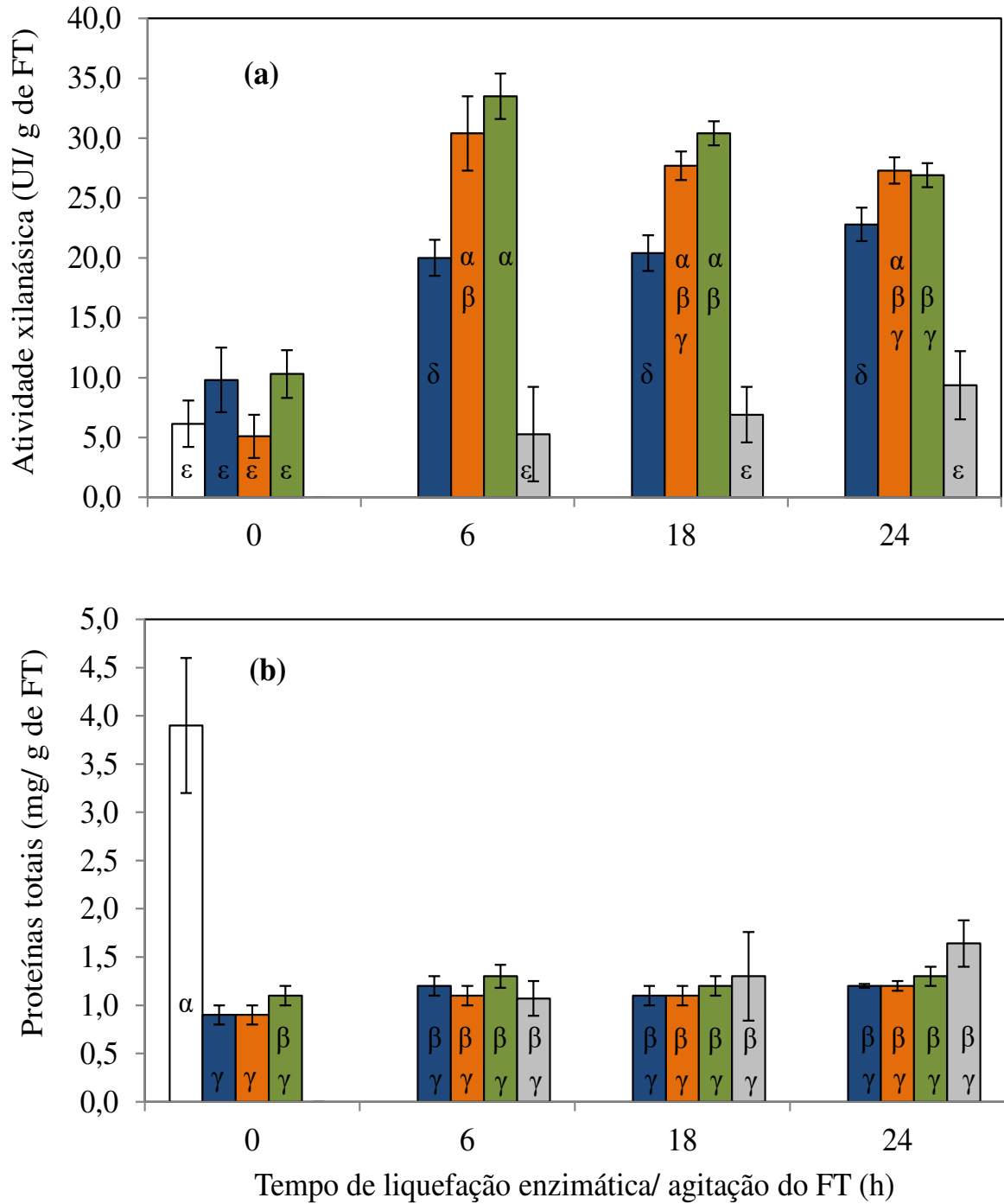
De posse dos resultados anteriores a respeito dos parâmetros temperatura e pH, os estudos da variação da carga enzimática e tempo de liquefação foram executados a valores fixos de temperatura a 50 °C e pH 4,8 (Figura 4.3), sem ajuste do pH para FSm. A variação de carga enzimática do complexo CC3 foi 0,29, 1,20 e 3,50 FPase/ml e o tempo de liquefação variou de zero a 24 h.

A Figura 4.6 agrupa tanto as atividades de xilanases dos ensaios de fermentação com FT liquefeito quanto as atividades obtidas com os controles. Houve três tipos de controles (descritos no item 3.2.3) em que o FT liquefeito foi substituído por: FT não liquefeito (controle, C), mistura de FT e tampão agitada a 50 °C (controle sob agitação, CA) e o controle com enzimas (CE), em que a mistura do complexo enzimático CC3 com FT foi seguida de imediata esterilização sem incubação. O controle com enzimas está ilustrado nos tempos de 0 h de liquefação nas três cargas enzimáticas (0,29, 1,20 e 3,50 FPase/mL).

Os ensaios controle e controle com enzimas (0 h de liquefação a 0,29, 1,20 e 3,50 FPase/mL) tiveram produções de xilanases equivalentes e, cerca de 5 a 6 vezes menores que os ensaios com FT liquefeito a 6, 18 e 24 h. Resultado semelhante ocorreu com a produção de xilanases no controle sob agitação, cujo aumento de 6 a 24 h de incubação foi cerca de 1,7 vezes, porém a maior atividade obtida foi de 9,4 UI/ g de FT em 24 h. Obteve-se resultados de atividade xilanásica entre todos os controles sem diferença significativa de acordo com o teste de Tukey.



Figura 4. 6 – Efeito da carga enzimática e o tempo na liquefação do substrato FT sobre a atividade xilanásica (a) e proteínas totais (b) produzidas em FS<sub>m</sub> por *A. niger*. Liquefação: 30% (m/m); 50 °C; pH 4,8; 0, 6, 18 e 24 h; CC3 a 0,29 FPase/mL (■), 1,20 FPase/mL (■) e 3,50 FPase/mL (■). Controle sob agitação, CA (■) e Controle, C (□). Barras representam desvio padrão. Letras gregas iguais representam valores estatisticamente semelhantes, de acordo com o teste de Tukey,  $p < 0,05$ .



Percebeu-se também um aumento da produção de xilanases por volta de 1,5 vezes nos tempos de 6 e 18 h com o aumento das cargas enzimáticas de 0,29 a 3,50 FPase/mL (Figura 4.6a). Para o tempo de 24 h, nas três cargas enzimáticas empregadas, a variação de carga enzimática não foi significativa para a atividade xilanásica.

Pelo teste de Tukey não houve diferença significativa (Figura 4.6a) com cargas enzimáticas e tempos, (0,29 FPase/mL a 6,18 e 24 h), (1,20 FPase/mL a 6,18 e 24 h e 3,50 FPase/mL a 6, 18 e 24 h).

A Figura 4.6b somente reproduziu o perfil de proteínas totais detectado nos ensaios já relatados. Entretanto, o fermentado resultante do controle com enzimas (0 h de liquefação a 0,29, 1,20 e 3,50 FPase/mL) apresentou concentrações de proteínas totais semelhantes ao perfil das demais condições sob liquefação enzimática (carga enzimática 0,29, 1,20 e 3,50 FPase/mL a 6, 18 e 24 h); apesar da atividade xilanásica deste fermentado (CE) ter sido inferior a estas mesmas condições citadas. Os resultados do fermentado do controle sob agitação foram similares ao controle com enzimas.

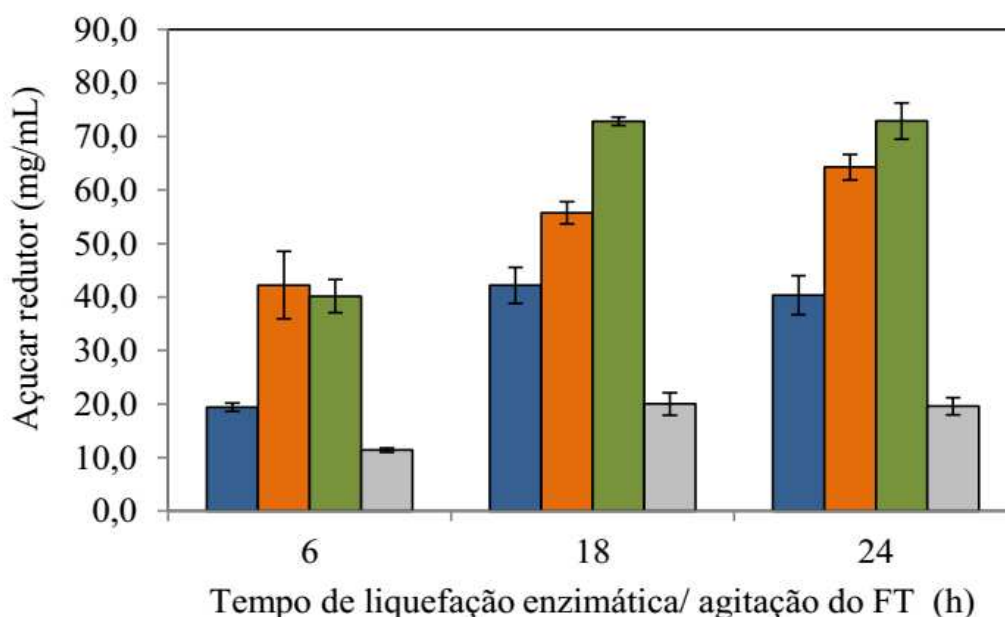
A redução da concentração final de proteínas totais no controle com enzimas e controle sob agitação pode indicar que houve um maior crescimento fúngico, confirmando que a liquefação (CE e a solubilização do FT sob ação do tampão, CA) age na liberação de oligossacarídeos e visualmente no melhor escoamento da biomassa lignocelulósica no cultivo, principalmente em fermentações a alto teor de sólidos, retardando, também visualmente, a conidiação. A conidiação é comum no desenvolvimento assexuado de espécies de *Aspergillus* em que um grande número de esporos assexuais é produzido em órgãos multicelulares chamados conidióforos (ADAMS *et al.*, 1998). Ela também é considerada como uma resposta às condições ambientais que limitam o crescimento vegetativo, como a escassez de nitrogênio ou de açúcares (BRODERICK; GREENSHIELDS, 1981).

Referente ainda à concentração de proteína totais baixa, além da explicação já mencionada sobre o consumo das proteínas contidas no FT pelo fungo, autores apontam a digestão proteolítica como causa da redução do rendimento de proteínas secretadas a partir de fungos filamentosos (CHAVEZ *et al.*, 2002; SEGURA *et al.*, 1998; SUNG *et al.*, 1995). Isto pode ser possível, uma vez que espécies do *Aspergillus* secretam para o ambiente proteases ácidas, proteases alcalinas, serina-proteases e cisteína-proteases (PEL *et al.*, 2007). Florencio e colaboradores (2016), que além da avaliação da produção enzimática, também identificaram

o perfil de atividades proteicas secretadas por análise proteômica do processo de fermentação sequencial por *A. niger* A12 com o bagaço de cana-de-açúcar. A fermentação sequencial foi realizada com a liquefação do substrato em FES seguida de FSm. Constatou-se que das enzimas produzidas, cerca de 9% foram proteases, mas em contrapartida o dobro foi de hemicelulases incluindo as xilanases. Assim, apesar de ter havido produção de proteases, a sua interferência no rendimento de outras enzimas não foi capaz de alterar o resultado positivo com a FS.

Por fim, para melhor compreensão destes resultados (Figura 4.6a), a liberação de açúcares redutores referentes aos sobrenadantes resultantes da liquefação do FT a tempos e cargas enzimáticas diferentes, bem como os liberados somente com o FT sob agitação (200 rpm) a 50°C em diferentes tempos está apresentada na Figura 4.7.

Figura 4. 7 - Cinética da liquefação enzimática do FT. Liquefação enzimática: 30% (m/m), 50 °C; pH 4,8; CC3 a 0,29 (■), 1,20 (■) e 3,50 FPase/mL (■). Controle sob agitação, CA(■). Barras representam desvio padrão.



A concentração de açúcares aumentou para todas as cargas enzimáticas com o tempo de liquefação e a variação da concentração de açúcares foi cerca de 1,8 a 2,0 vezes da carga enzimática 0,29 a 3,50 FPase/mL. A máxima liberação de açúcares ocorreu com a carga enzimática 3,50 FPase/mL, em torno de 75 mg/mL, em tempos de 18 e 24 h. Já a concentração de açúcares redutores solubilizados em CA aumentou em torno de 2 vezes de 6 h de incubação para os tempos de 18 e 24 h, em 24 h obteve-se cerca de 19,6 mg/mL.

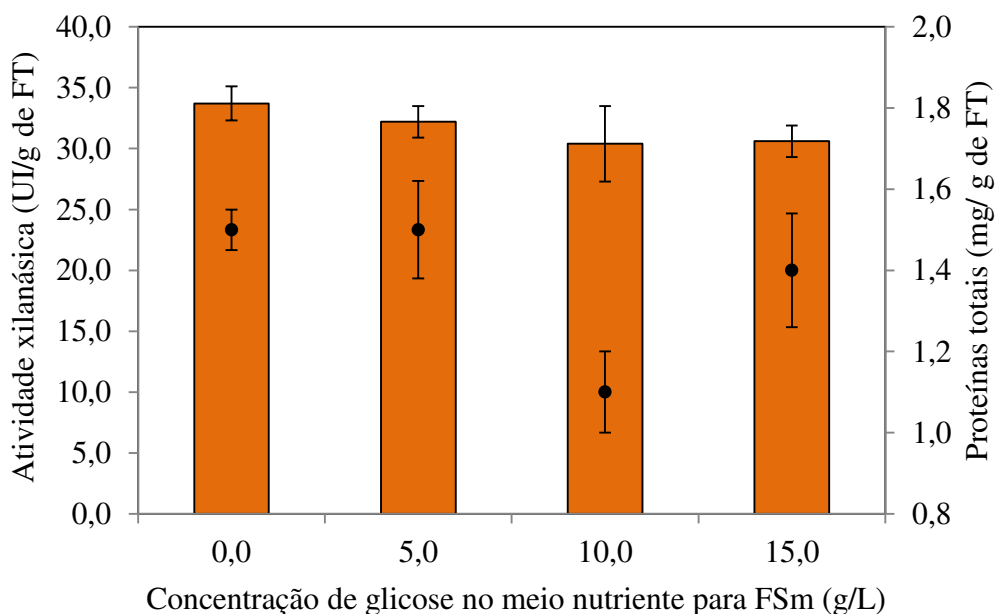
Este estudo da cinética enzimática mostrou a concentração de monômeros solubilizados e metabolizáveis para o início da FSm. O perfil cinético repercutiu no perfil da produção de xilanases (Figura 4.6a), uma vez que, o comportamento da produção de xilanases foi crescente à medida que o FT foi liquefeito a cargas maiores.

Contudo, a concentração de açúcar redutor equivalente em tempos de liquefação de 18 e 24 h com a carga 3,50 FPase/mL permite afirmar que o tempo de 24 h não é efetivo para aumentar a produção de xilanases.

#### 4.5. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE GLICOSE AO MEIO NUTRIENTE NA FSM

O meio nutriente utilizado neste trabalho contém sais minerais, fontes de nitrogênio, glicose, além do substrato indutor, FT. Contudo, o crescimento de um microrganismo numa fonte rica em glicose reprime a síntese de enzimas requeridas para despolimerizar fontes de carbono alternativas metabolizáveis, como o caso da xilana (KULKARNI *et al.*, 1999), consecutivamente reprimindo a produção de xilanases. Assim, para verificação da repressão catabólica pela presença de glicose no meio de cultura, foram efetuadas FSm a diferentes concentrações de glicose (Figura 4.8). A concentração de glicose somente foi alterada no meio adaptado descrito em Mandels e Weber (1969).

Figura 4. 8 – Efeito de diferentes concentrações de glicose na composição do meio nutriente adaptado do descrito por Mandels e Weber (1969) na FSm por *A. niger* sobre a produção de xilanases (■) e proteínas totais (●) com FT liquefeito. Liquefação enzimática: 30% (m/m), 6 h, 50 °C, pH 4,8 e CC3 a 1,20 FPase/mL. Barras representam desvio padrão.



Verificou-se que para a concentração de até 15,0 g/L de glicose adicionada ao meio nutriente não houve influência alguma na atividade xilanásica em FSm com tempo de cultivo de 72 h. A glicose disponível no início da FSm provinda da liquefação do FT e da composição do meio nutriente adaptado do descrito por Mandels e Weber (1969) pode ter sido consumida pela cultura microbiana rapidamente.

Além da glicose, a suplementação da fonte de nitrogênio no meio nutriente para FSm é importante para produção enzimática. Rodriguez-Zuñiga (2010) apontou a deficiência de nitrogênio do farelo de trigo na produção de celulases por *A. niger* em fermentação em estado sólido a 50% de umidade quando comparado a outras fontes de carbono como o farelo de soja.

Contudo, ao se tratar do metabolismo do nitrogênio em espécies de *Aspergillus*, as fontes de nitrogênio secundárias são bem reguladas em vias metabólicas (WARD *et al.*, 2005), uma vez que, estas espécies utilizam muitos compostos contendo nitrogênio como única fonte de nitrogênio, tais como: amônia, nitrato, nitrito, purinas, amidas, aminoácidos, glutamina e glutamato (MARZLUF *et al.*, 1997).

## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1. CONCLUSÕES

Neste trabalho avaliou-se a liquefação enzimática do farelo de trigo como estratégia para o aumento da produção de xilanases por *A. niger* em fermentação submersa. No geral, os resultados evidenciaram que o uso do farelo de trigo liquefeito como substrato pode ser uma alternativa para a produção de xilanases em FSm a alto teor de sólidos, visto que, a atividade xilanásica específica obtida foi elevada. A atividade foi até cinco vezes maior do que a atividade obtida em cultivo com farelo de trigo não liquefeito, ou seja 31,7 contra 6,1 UI/g de FT do controle C.

O uso de elevada carga de sólidos isento de qualquer tipo de tratamento acarreta aumento nos gastos do processo que necessitam de agitação para a movimentação da mistura. Conhecida esta problemática, a liquefação enzimática possibilita uma mistura mais fluida. Neste estudo, a liquefação enzimática da elevada carga de sólidos em períodos curtos (6 h) foi suficiente para promover um farelo de trigo liquefeito com um misto de fase sólida umedecida e fase líquida rica em monômeros metabolizáveis pelo fungo *A. niger*, fases importantes como indutores e substrato, promovendo assim uma contribuição aos estudos de fermentações com materiais lignocelulósicos a elevado teor de sólidos.

Essa estratégia de cultivo pode viabilizar o processo de fermentação: com indutores específicos; maior fluidez nos reatores convencionais; um ciclo fechado no caso do produto 'enzima' ser utilizado na liquefação do material lignocelulósico, possibilidade esta de grande relevância na redução dos custos, pois o uso de complexos celulolíticos comerciais seria secundário. Outro ponto de observância é a elevada atividade específica alcançada com esta metodologia, de modo empírico, induz-se que as etapas posteriores de recuperação e purificação da enzima contida no fermentado seriam facilitadas e, consecutivamente, menos dispendiosas.

Apesar deste trabalho ter implicações significativas, suas limitações abrange a estabilidade do produto obtido, estudos em grande escala, o aprofundamento da liquefação enzimática bem como otimização do processo como todo (liquefação e fermentação).

## 5.2. SUGESTÕES

Recomenda-se para a complementaridade deste trabalho:

- a) Avaliação da atividade de outras enzimas produzidas no sistema de fermentação adotado neste trabalho para verificação da atividade específica de xilanases, bem como outros produtos de valor;
- b) Extração das enzimas adsorvidas na parte sólida do fermentado;
- c) Emprego de outros tipos de biomassa lignocelulósica na fermentação;
- d) Mensurar o curso da liquefação enzimática a alto teor de sólidos, por exemplo, com a medição da redução do tamanho da partícula.
- e) Utilização do extrato enzimático bruto obtido na fermentação para a liquefação do material lignocelulósico na etapa inicial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABITRIGO – Associação Brasileira da Indústria do Trigo. Evolução moagem e consumo de farinha – 2005 - 2015. Disponível em <<http://abitrito.com.br/associados/arquivos/06.Evol Moagem Indl-2005-2015.pdf>> Acesso em setembro de 2016.

ADAMS, T. H.; WIESER, J. K.; YU, J. H. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n. 1, p. 35-54, 1998.

AMORE, A.; GIACOBBE, S.; FARACO, V. Regulation of Cellulase and Hemicellulase Gene Expression in Fungi. *Current Genomics*, v. 14, n. 4, p. 230-249, 2013.

APPRICH, S.; TIRPANALAN, Ö.; HELL, J.; REISINGER, M.; BÖHMDORFER, S.; SIEBENHANDL-EHN, S.; NOVALIN, S.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. *LWT - Food Science and Technology*, v. 56, n. 2, p. 222-231, 2014.

APPRICH, S.; TIRPANALAN, Ö.; HELL, J.; REISINGER, M.; BÖHMDORFER, S.; SIEBENHANDL-EHN, S.; NOVALIN, S.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. *LWT - Food Science and Technology*, v. 56, n. 2, p. 222-231, 2014.

BADHAN, A.K., CHADHA, B.S., KAUR, JATINDER., SAINI, H.S., BHAT, M.K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *myceliophthora* sp. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 504–510, 2007.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, v. 23, n. 3, p. 257-270, 1992.

BAJPAI, P. Chapter 5 - Sources, Production, and Classification of Xylanases. *Xylanolytic Enzymes*. Amsterdam: Academic Press, p.43-52, 2014.

BAJPAI, P. Enzymes in pulp and paper processing. Miller Freeman, San Francisco, 1997.

BEAUGRAND, J.; CRÔNIER, D.; DEBEIRE, P. et al. Arabinoxylan and hydroxycinnamate content of wheat bran in relation to endoxylanase susceptibility. *Journal of Cereal Science*, v.40, p.223-230, 2004.

BINOD, P.; PALKHIWALA, P.; GAIKAIWARI, R.; NAMPOOTHIRE, K. M.; DUGGAL, A.; DEY, K.; PANDEY, A. Industrial Enzymes: present status and future perspectives for India. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v. 72, p. 271-286, 2013.

BINOD, P.; SINGHANIA, R. R.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Industrial enzymes. In: PANDEY, A. et al. (Ed.). *Advances in fermentation technology*. New Deli: Asiatech Publishers, Inc, p. 291-319, 2008.

BIOENERGY NOVOZYMES. Cellic CTec3. Disponível em: <[http://bioenergy.novozymes.com/en/cellulosic-ethanol/CellicCTec3/Documents/AS\\_2012-04051-02\\_PT.pdf](http://bioenergy.novozymes.com/en/cellulosic-ethanol/CellicCTec3/Documents/AS_2012-04051-02_PT.pdf)>. Acesso em maio/2016.

BISSWANGER, H. Enzyme assays. *Perspectives in Science*, v.1, p. 41-55, 2014.

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.



BRODERICK, A. J.; GREENSHIELDS, R. N. Sporulation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* in Continuous Submerged Liquid Culture. *Journal of General Microbiology*, v. 126, p. 193-202, 1981.

BROOKMAN, J. L.; DENNING, D. W. Molecular genetics in *Aspergillus fumigatus*. *Current Opinion in Microbiology*, v. 3, p. 468–474, 2000.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium achinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid state fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, n. 6, p. 2196–2204, 2007.

CHANDEL, A.K., SILVA, S. S., SINGH, O. V. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioconversion of bioethanol. In: Bernardes MAS (ed) Biofuel production-recent developments and prospects. InTech, Rijeka, p. 225–246, 2011.

CHAVEZ, R.; SCHACHTER, K.; NAVARRO, C.; PEIRANO, A.; AGUIRRE, C.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. Differences in expression of two endoxylanase genes (*xynA* and *xynB*) from *Penicillium purpurogenum*. *Gene*, v. 293, p. 161–168, 2002.

CHENG, D.; GUO, Y.; HUANG, R.; LU, Q.; HUANG, J. Pretreatment by ultra-high pressure explosion with homogenizer facilitates cellulose digestion of sugarcane bagasses. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5592-5600, 2010.

CHERUBINI, F. The Biorefinery Concept: Using Biomass Instead of Oil for Producing Energy and Chemicals. *Energy Conversion and Management*, v. 51, n. 7, p. 1412-1421, 2010.

CHOTEBORSKÁ, P.; PALMAROLA-ADRADOS, B.; GALBE, M.; ZACCHI, G.; MELZUCH, K.; RYCHTERA, M. Processing of wheat bran to sugar solution. *Journal of Food Engineering*, v. 61, n. 4, p. 561-565, 2004.

COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresource Technology*, v. 101, p.8308–8314, 2010.

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

CUNHA, F. M.; KREKE, T.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S.; XIMENES, E.; LADISCH, M. R. Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production. *Bioresource Technology*, v. 172, p. 249-252, 2014.

DAS, A.; PAUL, T.; HALDER, S. K.; JANA, A.; MAITY, C.; DAS MOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus fumigatus* ABK9 in wheat bran-rice straw mixed substrate and use of cocktail enzymes for deinking of waste office paper pulp. *Bioresource Technology*, v. 128, p. 290-296, 2013.

DE CASTRO, S. M.; DE CASTRO, A. M. Assessment of the Brazilian potential for the production of enzymes for biofuels from agroindustrial materials. *Biomass Conversion and Biorefinery*, v. 2, n. 1, p. 87-107, 2012.

DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, R. C.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S.. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass and Bioenergy*, v. 37, p. 243–250, 2012.

DIAS, J. M. C. de; SOUZA, D. T. de; BRAGA, M.; ONOYAMA, M. M.; MIRANDA, C. H. B.; BARBOSA, P. F. D.; ROCHA, J. D. Produção de briquetes e péletes a partir de resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais. 1ª Ed. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2012.

- DOBREV, G. T.; PISHTIYSKI, I. G.; STANCHEV, V. S.; MIRCHEVA, R. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. *Bioresource Technology*, v. 98, p.2671-2678, 2007.
- DORNEZ, E.; GEBRUERS, K.; WIAME, S.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Insight into the Distribution of Arabinoxylans, Endoxylanases, and Endoxylanase Inhibitors in Industrial Wheat Roller Mill Streams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 8521-8529, 2006.
- EVERS, T.; MILLAR, S. Cereal grain structure and development: some implications for quality. *Journal of Cereal Science*, v. 36, p. 261–284, 2002.
- FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. 1ª Ed. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood, chemistry, ultrastructure, reactions. New York :Waster & Grugter, p. 613,1984.
- FEROZA, B.; BEGUM, S.; HOSSAIN, M. Production of glucoamylase by *Aspergillus niger* in liquid culture and determination of its cultural condition. *Bangladesh Journal Scientific and Industrial Research*, v. 33, p. 309-311, 1998.
- FITZPATRICK, M.; CHAMPAGNE, P.; CUNNINGHAM, M. F.; WHITNEY, R. A. A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology*, v.101, n. 23, p. 8915-8922, 2010.
- FLORENCIO, C.; CUNHA, F. M.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S.; XIMENES, E.; LADISCH, M. R. Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: Enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 90, p. 53-60, 2016.
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, n. 2–3, p. 85-101, 2003.
- GHOSE TK. Measurement of Cellulase Activities. *Pure Applied Chemistry*, v. 59, p. 257–268, 1987.
- GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R., GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, v. 144, p. 1–22, 2008.
- GUDYNAITE-SAVITCH, L.; WHITE, T. C. Fungal Biotechnology for Industrial Enzyme Production: Focus on (Hemi)cellulase Production Strategies, Advances and Challenges. In: SCHMOLL, M. e DATTENBÖCK, C. (Ed.). *Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications*. Cham: Springer International Publishing. p. 395-439, 2016.
- GUIMARAES, DE A.; CAVALIERI, N.; SORGATTO, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. DE C.; BETINI, J. H. A.; ZANOELO, F. F.; MARQUES, M. R.; POLIZELI, M. DE L. T. DE M.; GIANNESI, G. C. Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substract. *SpringerPlus*, v. 2, p. 380, 2013.
- GUPTA, R., MEHTA, G., KHASA, Y. P., KUHAD, R. C. Fungal delignification of lignocellulosic biomass improves the saccharification of cellulose. *Biodegradation*, v. 22, p.797–804, 2011.

HARRIS, G.W.; PICKERSGILL, R.W.; CONNERTON, I.; DEBEIRE, P.; TOUZEL, J.-P.; BRETON, C.; PÉREZ, S. Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase. *Proteins*, v. 29, n. 1, p. 77-86, 1997.

IWASHITA, K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi-review. *Journal of Bioscience Bioengineering*, v. 94, p. 530–535, 2002.

JAVED, M. M.; ZAHOOR, S.; SHAFAT, S.; MEHMOODA, I.; GUL, A.; RASHEED, H.; BUKHARI, S. A. I.; AFTAB, M. N.; IKRAM-UL-HAQ. Wheat bran as a brown gold: Nutritious value and its biotechnological applications. *African Journal of Microbiology Research*, v. 6, n. 4, p. 724-733, 2012.

JAVED, M. R.; RASHID, M. H.; MUKHTAR, Z.; RIAZ, M.; NADEEM, H.; HUMA, T.; ASHIQ, N. Kinetics and thermodynamics of high level  $\beta$ -glucosidase production by mutant derivative of *Aspergillus niger* under submerged growth conditions. *African Journal Microbiology Research*, v. 5, n. 17, p. 2528-2538, 2011.

JIN, N.; MA, S.H.; LIU, Y.; YI, X. L.; HE, R.; XU, H.; QIAO, D. R.; CAO, Y. Thermophilic xylanase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using wheat straw and corn cob. *African Journal of Microbiology Research*, v. 6, p. 2387–2394, 2012.

JONSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, Sweden, v. 6, n. 16, p. 1-10, 2013.

KAAR, W. E.; GUTIERREZ, C. V.; KINOSHITA, C. M. Steam exploding of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. *Biomass Bioenergy*, v. 14, p. 277-287, 1998.

KELLER, F.; HAMILTON, J.; NGUYEN, Q. Microbial pretreatment of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105, p. 27-41, 2003.

KIRIKYALI, N.; CONNERTON, I.F. Xylan Degrading Enzymes from Fungal Sources. *Journal of Proteomics Enzymology*, v.4, n. 1, 2015.

KRIJGSHELD, P.; BLEICHRODT, R.; VAN VELUW, G. J.; WANG, F.; MÜLLER, W. H.; DIJKSTERHUIS, J.; WÖSTEN, H. A. B. Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, v. 74, n. 1, p. 1–29, 2013.

KULKARNI, N., SHENDYE, A., RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 23, p. 411–456, 1999.

MADHAVAN, A.; SRIVASTAVA, A.; KONDO, A.; BISARIA, V. S. Bioconversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Critical Review Biotechnology*, v. 32, n.1, p. 22-48, 2012.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. *Advances in Chemistry Series*, v. 95, p. 391-414, 1969.

MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress*, v. 15, p. 804-816, 1999.

MARZLUF, G. A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, p. 17–32, 1997.

MATANO, Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Display of cellulases on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* for high yield ethanol production from high-solid lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 108, p. 128–133, 2012.

- MERINO, S. T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, v. 108, p. 95-120, 2007.
- MEYER, V.; WU, B.; RAM, A. F. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. *Biotechnol Letters*, v. 33, n. 3, p. 469-76, 2011.
- MICHELIN, M.; POLIZELI, M. D. L. T. D. M.; SILVA, D. P. D.; RUZENE, D. S.; VICENTE, A. A.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; TEIXEIRA, J. A. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus terricola* in stirred tank and airlift tower loop bioreactors. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 38, n. 12, p. 1979-1984, 2011.
- MICHELIN, M.; POLIZELI, M. D. L. T. M.; RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; VICENTE, A. A.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; TEIXEIRA, J. A. Xylanase and  $\beta$ -Xylosidase Production by *Aspergillus ochraceus*: New Perspectives for the Application of Wheat Straw Autohydrolysis Liquor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 166, n. 2, p. 336-347, 2012.
- MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426, 1959.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIČ, M. Solid-state fermentation bioreactors fundamentals: introduction and overview, in *Solid-State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation*, ed. By Mitchell D. A, Krieger, N e Berovič, M., Berlin, p. 1-12, 2006.
- MONTI, R.; CARDELLO, L.; CUSTÓDIO, M. F.; GOULART, A. J; SAYAMA, A. H.; CONTIERO, J. Production and purification of an endo-1,4- $\beta$ -xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* by electroelution. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 124-128, 2003.
- MOOD, S. H., GOLFESHAN, A. H., TABATABAEI, M., JOUZANI, G. S., NAJAFI, G. H., GHOLAMI, M., ARDJMAND, M. Lignocellulosic Biomass to Bioethanol, a Comprehensive Review with a Focus on Pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 77-93, 2013.
- MOONEY, C. A.; MANSFIELD, S. D.; TUOHY, M. G.; SADDLER, J. N. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. *Bioresource Technology*, v. 64, p. 113-119, 1998.
- MOREIRA, L. R. S.; FERREIRA, G. V.; SANTOS, S. S. T.; RIBEIRO, A. P. S.; SIQUEIRA, F. G.; FILHO, E. X. F. The hydrolysis of agro-industrial residues by holocellulose-degrading enzymes. *Brazilian. Journal Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 498-505, 2012.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.
- MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications In *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-Techniques, Applications and Commercialization*. AK. Chandel & SS. da Silva. InTech., 2013.
- NASSER, P. P.; CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R.; MERCER, J. R. Implicações do fungo *Aspergillus niger* var *niger* sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* seção *Circumdati* e produção de ochratoxina A. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, v. 27, p. 1172-1175, 2003.

OTTEN, L. G.; QUAX, W. J. Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomolecular Engineering*, v. 22, n. 1–3, p. 1-9, 2005.

PAL, A.; KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 7563-7569, 2010.

PALMAROLA-ADRADOS, B., CHOTEBORSKÁ, P., GALBE, M., & ZACCHI, G. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresource Technology*, v. 96, n.7, p. 843-850, 2005.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, Essex, v. 74, p. 17-24, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, n. 2–3, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P.; SOCCOL CR.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, v. 77, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, C. S.; DUSSAP, C-G; GNANSOUNOU, E. *Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes*. 1st ed. Oxford: Elsevier, 2011.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. General considerations about solid-state fermentation processes. In: Pandey A, Fernandes M, Larroche C (eds) *Current developments in solid state fermentation*. Springer, New Delhi, p. 13–25, 2008.

PEL, H.J.; DE WINDE, J. H.; ARCHER, D.B.; DYER, P. S.; HOFMANN, G.; SCHAAP, P. J.; TURNER, G.; DE VRIES, R.P.; ALBANG, R.; ALBERMANN, K.; ANDERSEN, M. R.; BENDTSEN, J. D.; BENEN, J. A.; VAN DEN BERG, M.; BREESTRAAT, S.; CADDICK, M. X.; CONTRERAS, R.; CORNELL, M.; COUTINHO, P. M.; DANCHIN, E. G.; DEBETS, A. J.; DEKKER, P.; VAN DIJCK, P. W.; VAN DIJK, A.; DIJKHUIZEN, L.; DRIESSEN, A. J.; D'ENFERT, C.; GEYSSENS, S.; GOOSEN C.; GROOT, G. S.; DE GROOT, P. W.; GUILLEMETTE, T.; HENRISSAT, B.; HERWEIJER, M.; VAN DEN HOMBERGH, J. P.; VAN DEN HONDEL, C.A.; VAN DER HEIJDEN, R. T.; VAN DER KAAIJ, R. M.; KLIS, F. M.; KOOLS, H. J.; KUBICEK, C. P.; VAN KUYK, P.A.; LAUBER, J.; LU, X.; VAN DER MAAREL, M. J.; MEULENBERG, R.; MENKE, H.; MORTIMER, M. A.; NIELSEN, J.; OLIVER, S. G.; OLSTHOORN, M.; PAL, K.; VAN PEIJ, N. N.; RAM, A. F.; RINAS, U.; ROUBOS, J. A.; SAGT, C. M.; SCHMOLL, M.; SUN, J.; USSERY, D.; VARGA, J.; VERVECKEN, W.; VAN DE VONDERVOORT, P.J.; WEDLER, H.; WÖSTEN, H. A.; ZENG, A. P.; VAN OUYEN, A. J.; VISSER, J.; STAM, H. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, v. 25, n. 2, p. 221-231, 2007.

PERVEZ, S., AMAN, A., IQBAL, S. SIDDIQUI, N. N., QADER, S. A. Saccharification and liquefaction of cassava starch: an alternative source for the production of bioethanol using amylolytic enzymes by double fermentation process. *BMC Biotechnology*, v. 14, p. 49, 2014.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 67, p. 577-591, 2005.

PRADE, R. A.; TIMBERLAKE, W. E. The *Aspergillus nidulans* brlA regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. *EMBO Journal*, v. 12, p. 2439–2447, 1993.

- PRÜCKLER, M.; SIEBENHANDL-EHN, S.; APPRICH, S.; HÖLTINGER, S.; HAAS, C.; SCHMID, E.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. *LWT - Food Science and Technology*, v. 56, n. 2, p. 211-221, 2014.
- PURI, J. D.; HEAVEN, S.; BANKS, C. J. Improving the performance of enzymes in hydrolysis of high solids paper pulp derived from MSW. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, 2013.
- QI, B.; CHEN, X.; SU, Y.; WAN, Y. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 3, p. 2881-2889, 2011.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biology of plants*, 6th ed. Freeman Co., New York, 1999.
- ROBERTS, P. J.; SIMMONDS, D. H.; WOOTTON, M.; WRIGLEY, C. W. Extraction of Protein and Solids from Wheat Bran. *Journal of the Science of Food Agriculture*, v.36, p. 5-10, 1985.
- ROBL, D.; DELABONA, P. D S.; COSTA, P. D S.; DEISE LIMA, J. D S.; RABELO, S. C.; PIMENTEL, I. C.; BÜCHLI, F.; SQUINA, F. M.; PADILLA, G.; PRADELLA, J. G. D C. Xylanase production by endophytic *Aspergillus niger* using pentose-rich hydrothermal liquor from sugarcane bagasse. *Biocatalysis and Biotransformation*, p. 1-13, 2015.
- RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulases específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração. Tese (Doutorado na área de Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos, SP – Brasil, 2010.
- ROJAS-REJÓN, O. A .; POGGI-VARALDO, H. M.; RAMOS-VALDIVIA, A. C.; MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, A.; CRISTIANI-URBINA, E.; DE LA TORRE MARTÍNEZ, M.; PONCE-NOYOLA, T. Production of cellulases and xylanases under catabolic repression conditions from mutant PR-22 of *Cellulomonas flavigena*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 38, n. 1, p. 257-264, 2011.
- ROMANÍ, A.; GARROTE, G.; ALONSO, J. L.; PARAJÓ, J. C. Experimental assessment on the enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated *Eucalyptus globulus* wood. *Industrial Engineering Chemical Resource*, v. 49, p. 4653-4663, 2010.
- SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 5, p. 279-291, 2003.
- SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Enzymology of xylan degradation. In: Imam, S.H., Greene, R. V., Zaidi, B.R. (Eds.), *Biopolymers: utilizing nature's advanced materials*. American Chemical Society, Washington, DC, p. 167-194, 1999.
- SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3693-3700, 2005.
- SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). *Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., p. 351-362, 2001.
- SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

- SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J.; VAN DIJCK, P. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, n. 4, p. 426-435, 2002.
- SEGURA, B. G.; DURAND, R.; FÈVRE, M. Multiplicity and expression of xylanases in the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 164, p. 47–53, 1998.
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, v.6, n. 3, p. 219-228, 2003.
- SHARMA, M.; KUMAR, A. Xylanases: an overview. *British Biotechnology Journal*, v. 3, n. 1, p. 1-28, 2013.
- SILVA, A. S.; INOUE, H., ENDO, T.; YANO, S.; BOM, E. P. S. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 19, p. 7402-7409, 2010.
- SKOVGAARD, P. A.; THYGESSEN, L. G.; JØRGENSEN, H.; CARDONA, M.; TOZZI, E.; MCCARTHY, M.; SIIKA-AHO, M.; JEOH, T. The Role of Endoglucanase and Endoxylanase in Liquefaction of Hydrothermally Pretreated Wheat Straw. *Biotechnology Progress.*, v. 0, n.0, 2014.
- STRICKER, A. R., MACH, R. L., DE GRAFF, L. H. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 78, p. 211–220, 2008.
- SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 22, n. 1, p. 33-64, 2002.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.
- SUNG, W. L.; LUK, C. K.; CHAN, B.; WAKARCHUK, W.; YAGUCHI, M.; CAMPBELL, R.; WILLICK, G.; ISHIKAWA, K.; ZAHAB, D .M. Expression of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma viride* xylanases in *Escherichia coli*. *Biochemistry and Cell Biology*, v. 73, p. 253–259, 1995.
- SZIJÁRTÓ, N.; HORAN, E.; ZHANG, J. H.; PURANEN, T.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Thermostable endoglucanases in the liquefaction of hydrothermally pretreated wheat straw. *Biotechnol Biofuels*, v. 4, p. 2–10, 2011.
- THOMAS, L.; PARAMESWARAN, B.; PANDEY, A. Hydrolysis of pretreated rice straw by an enzyme cocktail comprising acidic xylanase from *Aspergillus* sp. for bioethanol production. *Renewable Energy*, v. 98, p. 9-15, 2016.
- THYGESSEN, L. G.; HIDAYAT, B. J.; JOHANSEN, K. S.; FELBY, C. Role of supramolecular cellulose structures in enzymatic hydrolysis of plant cell walls. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 38, n. 8, p. 975-983, 2011.
- VAN PEIJ, N.; GIELKENS, M. M. C.; DE VRIES, R. P.; VISSER, J.; DE GRAAFF, L. H. The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 3615–3619, 1998.
- WARD, O. P.; QIN, W. M.; DHANJOON, J.; YE, J.; SINGH, A. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*, v. 58, p. 1-75, 2005.

XU, Y-X.; LI, Y-L.; XU, S-C.; LIU, Y.; WANG, X.; TANG, J-W. Improvement of xylanase production by *Aspergillus niger* XY-1 using response surface methodology for optimizing the medium composition. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, v. 9, n. 7, p. 558-566, 2008.

ZHANG, J.; SIIKA-AHO, M.; TENKANEN, M.; VIKARI, L. The role of acetyl xylan esterase in the solubilization of xylan and enzymatic hydrolysis of wheat straw and giant reed. *Biotechnology for Biofuels*, v. 4, n. 40, p. 1-9, 2011.

ZHU, S.; WU, Y.; YU, Z.; WANG, C.; YU, F.; JIN, S.; DING, Y.; CHI, R.; LIAO, J.; ZHANG, Y. Comparison of three microwave/chemical pretreatment processes for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Biosystems Engineering*, v. 93, n. 3, p. 279-283, 2006.

ZHU, Z., ZHU, M.; WU, Z. Pretreatment of sugarcane bagasse with  $\text{NH}_4\text{OH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  and ionic liquid for efficient hydrolysis and bioethanol production. *Bioresource Technology*, v. 119, p. 199-207, 2012.



**APÊNDICE**

Figura A. 1 - Esporos de *A. niger* em PDA após 72 h de incubação à 32 °C.

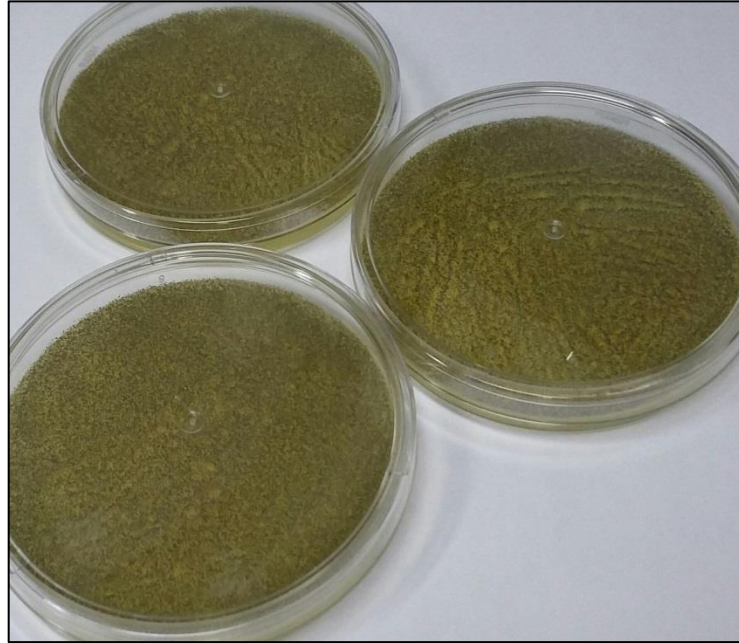


Figura A. 2 - Transformação do farelo de trigo em diferentes tempos de liquefação enzimática. (a) FT “*in natura*”. Tempos de liquefação: (b) 0 h, (c) 6 h, (d) 18 h, (e) 24 h. Liquefação: 30% (m/m) com 1,20 FPase/mL, a 50 °C e a 200 rpm.

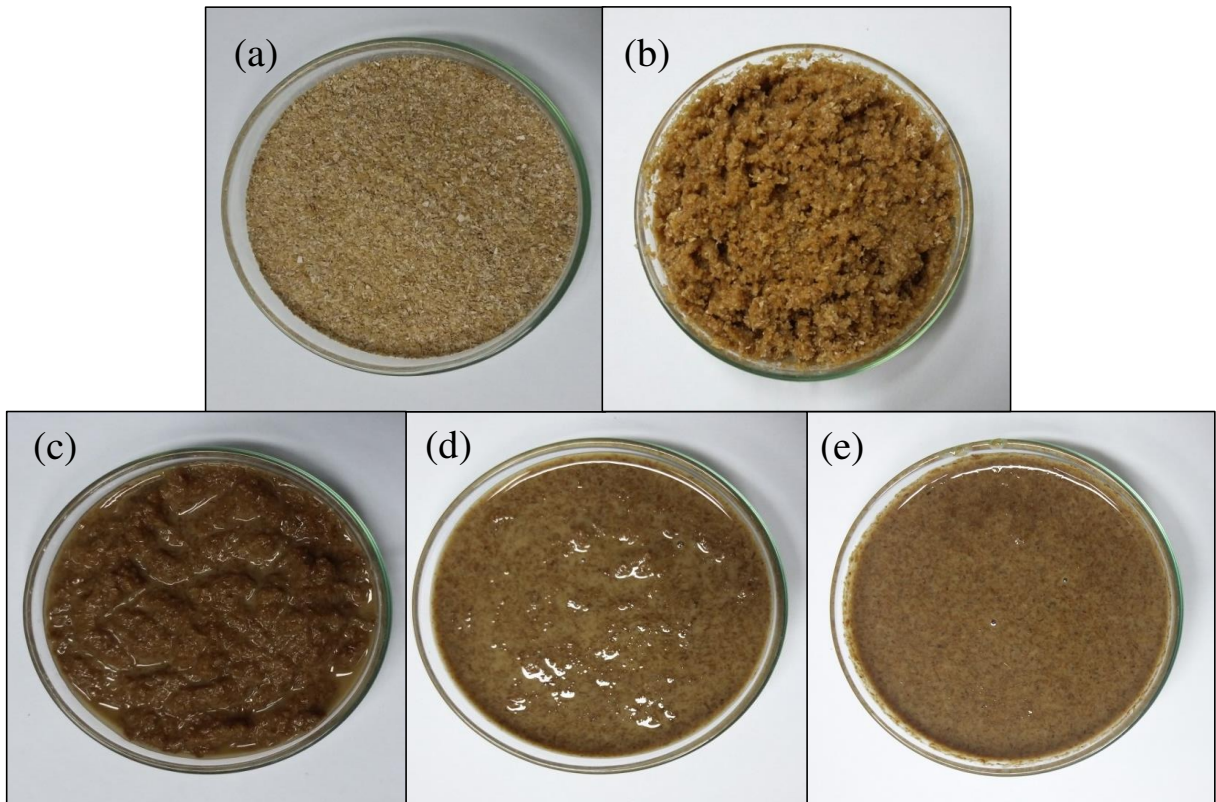
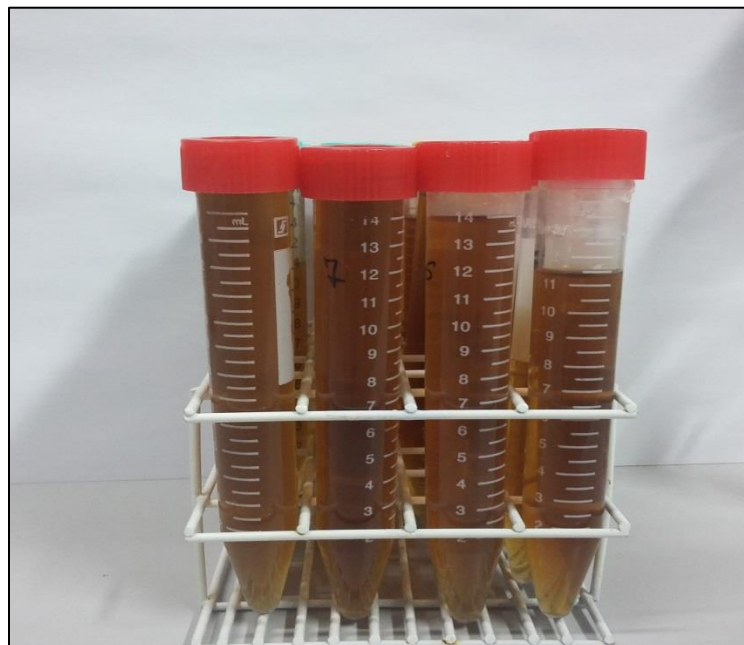


Figura A. 3 - FSm por *A. niger* em escala de bancada com FT liquefeito.



Figura A. 4 - Sobrenadante da FSm.



## ANEXO

### A – PREPARO DO REAGENTE DE BRADFORD

- a) Dissolver 0,1 g de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol 95%;
- b) Adicionar a esta solução 100 mL de ácido fosfórico 85 % sob agitação;
- c) Agitar a solução por 2 h e completar o volume para 1 L com água deionizada;
- d) Deixar sob agitação por no mínimo 6 h em recipiente protegido da luz;
- e) Após este período, filtra-se o reagente com papel de filtro para filtração rápida. Deixa-se o filtrato em repouso na geladeira por 24 h antes de utilizá-lo.