

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS* DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS – CCMF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – PCF

***Trichoderma koningiopsis* 2012A1M: PRODUÇÃO DE ENZIMAS DO COMPLEXO
HEMICELULOLÍTICO E APLICAÇÃO NA SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE
CEVADA**

CAROLINE MARLENE DA CRUZ KERBER

CASCAVEL
2020

CAROLINE MARLENE DA CRUZ KERBER

***Trichoderma koningiopsis* 2012A1M: PRODUÇÃO DE ENZIMAS DO COMPLEXO HEMICELULOLÍTICO E APLICAÇÃO NA SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CEVADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas em Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Kimiko Kadowaki

CASCADEL
2020

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Kerber, Caroline Marlene da Cruz

Trichoderma koningiopsis 20I2A1M: produção de enzimas do complexo hemicelulolítico e aplicação na sacarificação do bagaço de cevada / Caroline Marlene da Cruz Kerber; orientador(a), Marina Kimiko Kadowaki, 2020.

59 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2020.

1. Endo-xilanase. 2. Screening enzimático. 3. Conversão de biomassa. 4. Açúcares fermentáveis. I. Kadowaki, Marina Kimiko. II. Título.


Caroline Marlene da Cruz Kerber

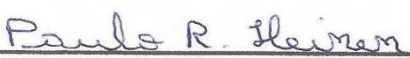
***Trichoderma koningiopsis* 2012A1M: PRODUÇÃO DE ENZIMAS DO
COMPLEXO HEMICELULOLÍTICO E APLICAÇÃO NA SACARIFICAÇÃO DO
BAGAÇO DE CEVADA**

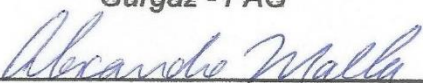
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas em Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marina Kimiko Kadowaki

BANCA EXAMINADORA:


Prof^a. Dr^a. Marina Kimiko Kadowaki
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná- UNIOESTE
Orientadora


Dr. Paulo Ricardo Heinen
Centro Universitário da Fundação Assis
Gurgaz - FAG


Prof. Dr. Alexandre Maller
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná- UNIOESTE

BIOGRAFIA RESUMIDA

Caroline Marlene da Cruz Kerber, natural de Marechal Cândido Rondon (Paraná), nascida em 12 de julho de 1991, possui graduação em Tecnologia em Estética e Cosmética pela Universidade Paranaense, *campus* de Toledo (2012) e graduação em Farmácia pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel (2017). Atualmente atua como Farmacêutica Responsável Técnica da Farmácia Básica do Município de Nova Santa Rosa (Paraná). Além disso, é discente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa intitulada Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, sob orientação da professora Dra. Marina Kimiko Kadowaki.

*“O período de maior ganho de conhecimento e experiência é o período de maior
dificuldade na vida de cada um.”*

Dalai Lama

Dedico à pequena Helena.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Maria de Fatima Campos da Cruz e Antonio Donizeti da Cruz, por serem meu porto seguro, onde sempre encontrei aconchego e carinho nos momentos difíceis. Vocês, que sempre me incentivaram em todas as escolhas da vida acadêmica e profissional, minha eterna gratidão.

Ao meu marido, Rafael Luiz Kerber, pelo incentivo, paciência e apoio durante todo o processo.

À minha admirada orientadora, professora Dra. Marina Kimiko Kadowaki, pela confiança depositada em mim nesses anos de iniciação científica e pós-graduação. Sua dedicação ao exercer as funções de professora, pesquisadora e orientadora inspiram-nos a buscar o conhecimento e o crescimento profissional.

À minha sincera amiga Letícia Rasbold, por não ter medido esforços em me ajudar em todos os momentos que precisei, seu ombro amigo foi fundamental durante todo o processo, além de alegrar os meus finais de semana no laboratório. Sua parceria foi essencial.

Aos docentes e demais colegas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, por todo conhecimento transmitido, pelas contribuições teóricas e práticas ao longo do trabalho, assim como pela amizade compartilhada nos momentos de lazer.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

À CAPES e à FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA pela concessão da bolsa.

Registro aqui minha gratidão a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

Muito obrigada!

***Trichoderma koningiopsis* 2OI2A1M: PRODUÇÃO DE ENZIMAS DO COMPLEXO HEMICELULOLÍTICO E APLICAÇÃO NA SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CEVADA**

RESUMO

Fungos filamentosos são excelentes fontes de enzimas industriais, em razão da elevada capacidade de produção e secreção dessas para o meio extracelular. Xilanases, celulasas, pectinases, amilases e invertases são exemplos de hidrolases, as quais possuem ampla aplicação nos diferentes setores industriais. Diversas são as utilizações dessas enzimas, merecendo destaque as indústrias alimentícia e de bebidas, de ração animal, têxtil e de polpa e papel. Além disso, é crescente o interesse pela utilização de resíduos agrícolas como matéria-prima na produção de bioetanol. Os fungos do gênero *Trichoderma* são bem conhecidos e explorados por produzirem múltiplas enzimas para a degradação de polissacarídeos, como a celulose e a hemicelulose. A espécie *Trichoderma koningiopsis* é relatada como cosmopolita, porém, ainda é pouco explorada no campo biotecnológico. Dessa forma, este estudo teve como objetivo principal, investigar a habilidade do fungo *T. koningiopsis* 2OI2A1M, previamente isolado do Bioma da Mata Atlântica do Paraná, em produzir enzimas que atuem na despolimerização da biomassa lignocelulósica encontrada em subprodutos agroindustriais, visando uma aplicação dessas enzimas na sacarificação do bagaço de cevada. Ao avaliar-se a produção xilanásica pelo fungo *T. koningiopsis* 2OI2A1M, utilizando diferentes resíduos agroindustriais, verificou-se que o bagaço de cevada exibiu maior atividade enzimática (83,91 U mL⁻¹). Adicionalmente, verificou-se que o papel kraft é capaz de induzir a produção de xilanase (51,93 U mL⁻¹). Dentre as β -xilosidases e β -glicosidases extracelulares, o sorgo biomassa e a carboximetilcelulose foram os melhores indutores com 22,63 e 36,40 U mL⁻¹, respectivamente. A xilanase do extrato bruto de *T. koningiopsis* 2OI2A1M exibiu pH e temperatura de máxima atividade em 5,0 e 60 °C, respectivamente. A atividade xilanásica manteve-se totalmente preservada por 6 dias de incubação a 4 °C, na faixa de pH 3,5-7,0, porém, a sua atividade foi afetada quando incubada por mais de 60 min em temperaturas superiores a 40 °C. Para a produção de açúcares fermentáveis a partir da sacarificação enzimática do bagaço de cevada, a condição *in natura* foi a melhor resposta para obtenção de glicose (5,9%), açúcares redutores totais (13,3%) e xilose (2,6%) após 48 h de hidrólise enzimática. A análise comparativa da estrutura morfológica do bagaço de cevada por microscopia eletrônica de varredura demonstrou que a ação conjunta das enzimas de *T. koningiopsis* 2OI2A1M não necessita de modificações estruturais no bagaço de cevada para eficácia no processo de sacarificação, portanto, sendo dispensável os pré-tratamentos químico ou físico do substrato. Diante do exposto, o fungo *T. koningiopsis* 2OI2A1M apresenta potencial em produzir enzimas que atuam na despolimerização da biomassa lignocelulósica e o bagaço de cevada torna-se uma alternativa sustentável para produção de açúcares fermentáveis, com foco primordial na produção de combustíveis de segunda geração, como o bioetanol.

PALAVRAS-CHAVE: açúcares fermentáveis; β -glicosidase; conversão de biomassa; endo-xilanase; pré-tratamento; *screening* enzimático.

***Trichoderma koningiopsis* 2OI2A1M: ENZYME PRODUCTION OF THE COMPLEX HEMICELLULOLYTIC AND APPLICATION IN THE SACCHARIFICATION OF BARLEY BAGASSE**

ABSTRACT

Filamentous fungi are excellent sources of industrial enzymes because of their high production and secretion capacity to the extracellular environment. Xylanases, cellulases, pectinases, amylases and invertases are examples of hydrolases, which have wide application in different industrial sectors. There are several uses of these enzymes, notably the food and beverage, animal feed, textile and pulp and paper industries. In addition, there is growing interest in the use of agricultural waste as a raw material in the production of bioethanol. *Trichoderma* fungi are well known and exploited for producing multiple enzymes for polysaccharide degradation, such as cellulose and hemicellulose. The *Trichoderma koningiopsis* species is reported as cosmopolitan but is still little explored in the biotechnological field. Thus, this study aimed to investigate the ability of *T. koningiopsis* 2OI2A1M fungus, previously isolated from the Paraná Atlantic Forest Biome, to produce enzymes that act on the depolymerization of lignocellulosic biomass found in agroindustrial byproducts, aiming at an application of these enzymes in saccharification of barley bagasse. The production of xylanase by *T. koningiopsis* 2OI2A1M fungus using different agroindustrial residues showed that barley bagasse provided higher enzymatic activity (83.91 U mL⁻¹). Additionally, it has been found that kraft paper is capable of inducing xylanase production (51.93 U mL⁻¹). Among the extracellular β -xylosidases and β -glucosidases, sorghum biomass and carboxymethylcellulose were the best inducer with 22.63 and 36.40 U mL⁻¹, respectively. The crude extract xylanase of *T. koningiopsis* 2OI2A1M exhibited maximum activity pH and temperature at 5.0 and 60 °C, respectively. The xylanase activity remained totally preserved for 6 days of incubation at 4 °C, in the pH range 3.5-7.0, however, its activity was affected when incubated for more than 60 min at temperatures above 40 °C. The production of fermentable sugars from the enzymatic saccharification of barley bagasse, the *in natura* condition, yielded a higher concentration of glucose (5.9%), total reducing sugars (13.3%), and xylose (2.6%) after 48 h. The comparative analysis of the morphological structure of the barley bagasse by scanning electron microscopy demonstrated that the simultaneous action of *T. koningiopsis* 2OI2A1M enzymes does not require previous structural modifications in the barley bagasse for effectiveness in the saccharification process. Thus, the fungus *T. koningiopsis* 2OI2A1M has potential to produce enzymes that act on the depolymerization of lignocellulosic biomass and barley bagasse is an attractive candidate for a sustainable alternative for the production of fermentable sugars, a primary focus in the production of second-generation fuels such as bioethanol.

KEYWORDS: fermentable sugars; β -glucosidase; biomass conversion; endo-xylanase; pretreatment; enzymatic screening.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1 Objetivo geral.....	2
2.2 Objetivos específicos.....	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
3.1 <i>Trichoderma koningiopsis</i>	2
3.2 Parede celular vegetal.....	4
3.3 Hemicelulose e o sistema xilanolítico.....	6
3.4 Enzimas hidrolíticas e suas aplicações	8
3.5 Bagaço de cevada.....	10
3.6 Sacarificação enzimática e produção de bioetanol.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 Isolamento e identificação do microrganismo.....	12
4.2 Manutenção do fungo.....	13
4.3 Condições de cultivo e obtenção do extrato bruto extracelular.....	13
4.4 Determinação da atividade enzimática e quantificação de proteínas.....	13
4.5 <i>Screening</i> enzimático.....	14
4.5.1 Determinação da atividade enzimática através da reação com DNS.....	14
4.5.2 Determinação da atividade de β -glicosidase, β -xilosidase e quitinase.....	14
4.5.3 Determinação da atividade de protease.....	15
4.6 Caracterização bioquímica da xilanase do extrato bruto extracelular.....	15
4.6.1 Efeito da temperatura.....	15
4.6.2 Efeito do pH.....	15
4.7 Influência de fontes de carbono celulósicas na produção de enzimas do complexo hemicelulolítico.....	15
4.8 Sacarificação do bagaço de cevada.....	16
4.9 Análise morfológica do bagaço de cevada por MEV após hidrólise enzimática.....	16
4.10 Purificação parcial da xilanase de <i>T. koningiopsis</i> 2012A1M.....	17
4.11 Análise dos produtos de degradação do xilano pela xilanase por cromatografia em camada delgada (CCD).....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18

5.1 Identificação taxonômica do fungo <i>T. koningiopsis</i> 2OI2A1M e árvore filogenética.....	18
5.2 <i>Screening</i> enzimático.....	18
5.3 Caracterização bioquímica da xilanase do extrato bruto extracelular.....	23
5.4 Influência de fontes de carbono celulósicas na produção de enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico.....	25
5.5 Sacarificação do bagaço de cevada.....	28
5.6 Análise morfológica do bagaço de cevada por MEV após hidrólise enzimática....	30
5.7 Purificação parcial da xilanase extracelular de <i>T. koningiopsis</i> 2OI2A1M.....	32
5.8 Análise dos produtos de degradação do xilano por CCD.....	34
6. CONCLUSÕES.....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 <i>Screening</i> de enzimas produzidas por <i>T. koningiopsis</i> 2OI2A1M sob fermentação submersa a 28 °C.....	21
Tabela 2 Atividade específica de diferentes amostras obtidas de cultivos de <i>T. koningiopsis</i> 2OI2A1M sob fermentação submersa a 28 °C.....	22
Tabela 3 Influência das fontes de carbono na indução de enzimas do complexo xilanolítico e celulolítico pelo <i>T. koningiopsis</i> 2OI2A1M em cultivo líquido.....	27
Tabela 4 Efeito de diferentes pré-tratamentos na produção de açúcares fermentáveis a partir da sacarificação enzimática do bagaço de cevada.....	29
Tabela 5 Sumário das etapas de purificação parcial da xilanase de <i>T. koningiopsis</i> 2OI2A1M	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação da parede celular vegetal.....	4
Figura 2 Representação esquemática dos elementos estruturais da pectina.....	5
Figura 3 Representação da molécula de celulose e celulose cristalina.....	6
Figura 4 Estrutura esquemática da hemicelulose.....	7
Figura 5 Estrutura do xilano e das enzimas xilanolíticas envolvidas na sua degradação.....	7
Figura 6 Representação esquemática da degradação de hemicelulose por β -xilosidases que liberam xilose a partir de xilobiose.....	8
Figura 7 Árvore filogenética construída a partir de sequência das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do <i>T. koningiopsis</i>	18
Figura 8 Influência do pH e temperatura sobre a atividade da enzima xilanase do extrato bruto de <i>T. koningiopsis</i> 2OI2A1M.....	23
Figura 9 Estabilidade térmica da enzima xilanase do extrato bruto de <i>T. koningiopsis</i> 2OI2A1M.....	24
Figura 10 Estabilidade ao pH da enzima xilanase do extrato bruto de <i>T. koningiopsis</i> 2OI2A1M.....	24
Figura 11 Microscopia MEV do bagaço de cevada <i>in natura</i> e após tratamento com extrato enzimático de <i>T. koningiopsis</i> 2OI2A1M.....	31
Figura 12 Perfil cromatográfico da xilanase de <i>T. koningiopsis</i> 2OI2A1M em CM-Sephadex	33
Figura 13 Análise dos produtos de hidrólise do xilano pela xilanase de <i>T. koningiopsis</i> 2OI2A1M	34

1. INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos são microrganismos comercialmente explorados, por apresentarem uma ampla capacidade em produzir e secretar enzimas para o meio extracelular, utilizando diferentes fontes de carbono, como os resíduos agroindustriais, os quais se mostram acessíveis e economicamente vantajosos. Esses resíduos são fontes interessantes de biomassa lignocelulósica, constituídos principalmente de três polímeros, a celulose, a hemicelulose e a lignina.

O principal componente da hemicelulose é o xilano, sendo as endo- β -xilanasas as enzimas responsáveis por degradar sua cadeia principal, liberando moléculas menores, denominadas xilo-oligossacarídeos. Esses, por sua vez, são hidrolisados em D-xilose pelas β -xilosidasas. As xilanasas têm sido amplamente estudadas ao longo dos anos, em razão das suas diversas aplicações industriais.

Dentre essas aplicações, podem ser citadas o biobranqueamento da polpa celulósica, a clarificação de sucos e vinhos, no biopolimento e na bioestonagem do *jeans*, na melhoria da qualidade de pães, na indústria de ração animal, na sacarificação de biomassa lignocelulósica, na produção de bioetanol e entre tantas outras aplicações.

A cevada (*Hordeum vulgare*, L.) é o quarto cereal produzido em maior quantidade no mundo, depois do trigo, arroz e milho. Seu principal uso é na indústria cervejeira e na alimentação animal. No Brasil, a região sul concentra a maior produção de cevada, superando 400 mil toneladas anualmente. O bagaço de cevada é um subproduto da fabricação de cervejas, em que um grande volume é gerado após o processo, sendo importante aproveitar esse resíduo como fonte alternativa de matéria-prima para produtos biotecnológicos ou produção de energia.

Fungos do gênero *Trichoderma* são bem conhecidos por produzirem diversas enzimas para a degradação de polissacarídeos. São diversos estudos sobre a sua utilização como agentes de biocontrole de fitopatógenos. Entretanto, a espécie *Trichoderma koningiopsis*, um fungo cosmopolita, ainda foi pouco explorado no campo biotecnológico e carece de informações sobre o seu potencial na produção de enzimas de interesse industrial.

Dentro desse contexto, essa proposta foi fundamentada no estudo de prospecção de enzimas hidrolíticas de *T. koningiopsis*, um fungo filamentoso proveniente da Mata Atlântica do Oeste do Paraná, com escassez de conhecimento

sobre o seu potencial biotecnológico. Além disso, foi avaliado também a utilização de subprodutos agrícolas como componente do meio de cultura do fungo, bem como a hidrólise enzimática do bagaço de cevada para produção de açúcares fermentáveis, buscando assim, uma ampliação do conhecimento sobre as propriedades catalíticas das enzimas produzidas por essa espécie fúngica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste estudo foi investigar o potencial do fungo *Trichoderma koningiopsis* 2OI2A1M isolado do Bioma da Mata Atlântica em produzir enzimas hidrolíticas, visando a aplicação dessas na sacarificação do bagaço de cevada.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção de amilase, avicelase, CMCase, FPase, invertase, pectinase, poligalacturonase, protease, xilanase, β -glicosidade, β -xilosidase e quitinase em cultivos submersos, com diferentes fontes de carbono;
- Verificar a produção de enzimas do complexo hemicelulolítico utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono;
- Determinar as características bioquímicas aparentes da xilanase proveniente do extrato bruto enzimático, tais como a temperatura e o pH de máxima atividade, estabilidade à temperatura e ao pH;
- Purificar a xilanase através de cromatografia de troca iônica;
- Analisar os produtos de hidrólise de xilano pela enzima purificada;
- Realizar diferentes pré-tratamentos do bagaço de cevada e utilizá-lo na sacarificação a partir do extrato bruto enzimático de *T. koningiopsis* 2OI2A1M;
- Analisar os produtos de hidrólise enzimática do bagaço de cevada por microscopia eletrônica de varredura.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Trichoderma koningiopsis*

Os fungos pertencentes ao gênero ascomiceto *Trichoderma* são encontrados em diversos ecossistemas, sendo o solo, o ambiente natural mais comum destes microrganismos. O gênero acomoda mais de 260 espécies (BISSETT et al., 2015), descritas durante as últimas duas décadas, com base em análises filogenéticas de

dados da sequência de DNA. Esse gênero dispõe de um número limitado de características morfológicas que são variáveis em algum grau, levando à sobreposição entre espécies, o que torna difícil a identificação de espécies de *Trichoderma* (SAMUELS et al., 1998; SAMUELS, 2006; PLESSIS et al., 2018).

Apesar de serem principalmente colonizadores micotróficos e/ou secundários de madeiras, as espécies de *Trichoderma* são consideradas benéficas, pois esses microrganismos possuem um alto oportunismo ambiental e expressam uma significativa competência sob a rizosfera de plantas, com capacidade de antagonizar vários fitopatógenos. Por esta característica de endofitismo, algumas cepas de *Trichoderma* são utilizadas para o controle biológico de doenças em plantas (DRUZHININA et al., 2011; BLASZCZYK et al., 2016).

O conceito morfológico de *Trichoderma koningii* inclui várias espécies que diferem umas das outras em detalhes fenotípicos como morfologia do conídio e velocidade de crescimento, além de sua biogeografia. Análises filogenéticas indicam que os caracteres fenotípicos de *T. koningii* evoluíram independentemente, em três linhagens principais bem distintas. O fungo *Trichoderma koningiopsis* é uma espécie comumente tropical, cosmopolita e que pertence a uma das linhagens de *T. koningii*, sendo comum na América tropical, entretanto, já foi isolado de substratos naturais na África Oriental, Europa e Canadá. Seis cepas de *T. koningiopsis* foram isoladas como endófitos de troncos de espécies de *Theobroma*, no Brasil, Equador e Peru (SAMUELS et al., 2006).

A temperatura ótima para crescimento de *T. koningiopsis* em batata dextrose ágar (BDA) é em torno de 30 °C. As colônias cultivadas em BDA formam frequentemente conídios após 48 h, em um gramado denso ou o centro permanece estéril, formando às vezes, pústulas de algodão. As massas conidiais são de coloração verde claro à verde escuro, raramente sendo de coloração amarela, sem difundir pigmento através do ágar (SAMUELS et al., 2006).

De maneira geral, espécies de *Trichoderma* são conhecidas por produzirem diversas enzimas para a degradação de homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos, em sua maioria, classificadas como glicosil hidrolases. Essas enzimas catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas de polímeros, para liberar açúcares menores. As glicosil hidrolases exercem papel fundamental na degradação

de biomassa, como celulose e hemicelulose (SILVA; STEINDORFF; MONTEIRO, 2014).

3.2 Parede celular vegetal

Apesar de sua complexidade, a parede celular vegetal (Figura 1) é uma estrutura composta principalmente dos polissacarídeos celulose, hemicelulose e pectina, além de proteínas e lignina, um biopolímero fenólico heterogêneo. Compreende o principal reservatório de carbono terrestre, sendo a matriz do componente polissacarídico, uma das estruturas mais adaptáveis dentro da parede celular, além de ser também, uma relevante matéria-prima (biomassa) empregada em diversos processos economicamente importantes. A biomassa lignocelulósica é utilizada principalmente na indústria de polpa e papel, mas nos últimos anos, essa biomassa representou uma matéria-prima para têxteis, bioplásticos, nanocelulose e biocombustíveis de segunda geração (ALVES et al., 2019; RAUTENGARTEN; HEAZLEWOOD; EBERT, 2019; WIERZBICKI et al., 2019a).

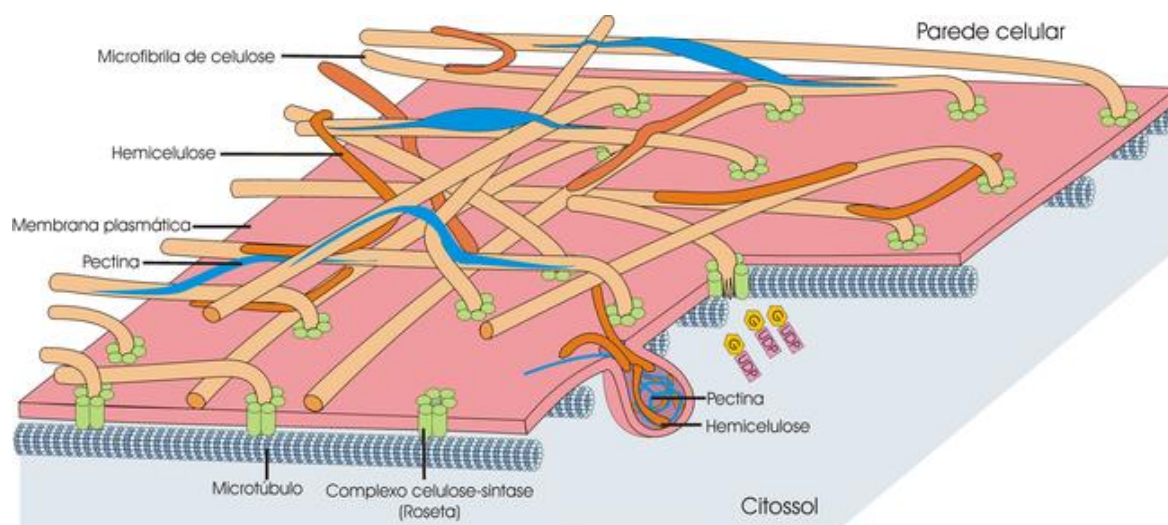


Figura 1 Representação da parede celular vegetal (KRAUS et al., 2012).

Para compreender a arquitetura da parede celular vegetal, é importante entender as características estruturais dos polissacarídeos constituintes e as interações entre esses polissacarídeos. A pectina (Figura 2) é definida como um heteropolissacarídeo contendo predominantemente resíduos de ácido galacturônico, nos quais diferentes proporções dos grupos ácidos estão presentes como ésteres metoxílicos, enquanto certa quantidade de açúcares neutros pode estar presente como cadeias laterais. A homogalacturonana é o principal tipo de pectina na parede

celular, composto apenas de resíduos de ácido galacturônico (GalA) unidos por ligações α -1,4. Já a ramnogalacturonana I (RG-I) é composta por resíduos alternados de GalA e ramnose. Por sua vez, os resíduos de ramnose em RG-I podem ser substituídos por cadeias laterais de açúcar neutro, compostos de arabinose e galactose (VORAGEN, 2009; BROXTERMAN; SCHOLS, 2018).

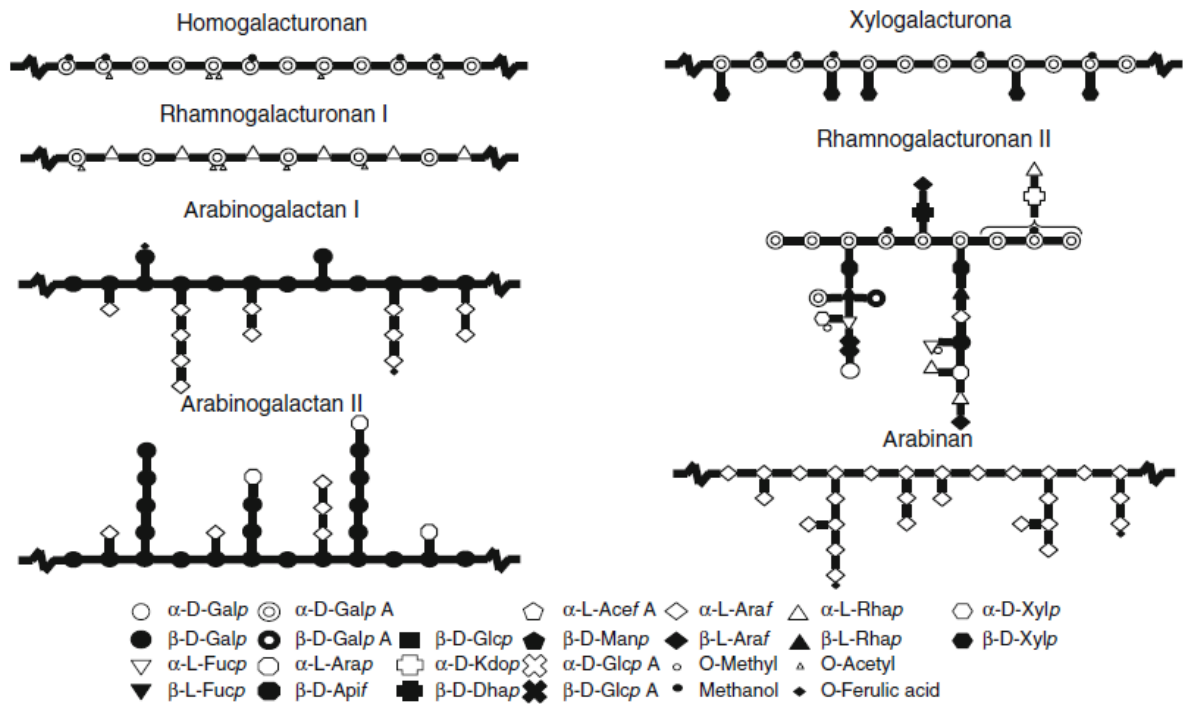


Figura 2 Representação esquemática dos elementos estruturais da pectina (HILZ, 2007).

A celulose natural (Figura 3) é um polímero cristalino e linear, um material inelástico e mecanicamente resistente. Suas cadeias são compostas de milhares de resíduos de D-glicose, unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, que formam microfibrilas cristalinas e altamente organizadas através de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares e forças de Van der Waals. A celulose amorfa corresponde a regiões onde essas ligações são quebradas e seu arranjo ordenado é desfeito. Moléculas de D-glicose consecutivas ao longo de cadeias em celulose cristalina são giradas em 180° , significando que o dissacarídeo celobiose é a unidade de repetição. A celulose encontra-se emaranhada nos outros dois componentes da parede celular, onde a pectina envolve a hemicelulose para formar uma camada flexível sobre a celulose. Esse polímero é considerado o mais abundante e renovável recurso de

biomassa e reserva de matéria-prima (QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2013; ALVES et al., 2019).

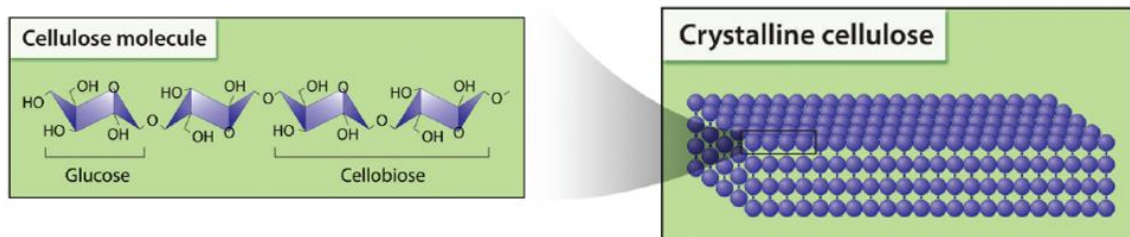


Figura 3 Representação da molécula de celulose e celulose cristalina (Adaptado de QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2013).

A hidrólise completa da celulose à glicose requer as ações combinadas de um complexo de enzimas celulolíticas, composto por três principais enzimas, as endoglucanases (CMCase; EC 3.2.1.4), as exoglucanases (avicelase; EC 3.2.1.91) e as β -glicosidases (EC 3.2.1.21). As endoglucanases clivam ligações internas da fibra celulósica, gerando oligossacarídeos com diferentes tamanhos e criando cadeias que podem, por sua vez, serem hidrolisadas por exoglucanases. Essas, atuam nas extremidades reductoras e não reductoras, para liberar celobiose ou monômeros de glicose solúvel. Por fim, as β -glicosidases hidrolisam a celobiose liberando duas moléculas de glicose (ARO et al., 2005; QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2013).

3.3 Hemicelulose e o sistema xilanólico

A hemicelulose (Figura 4) é um heteropolissacarídeo de estrutura complexa, formada pela condensação de 80 a 200 unidades de monossacarídeos e ácido urônico, dos quais se destacam as pentoses D-xilose, L-arabinose e L-ramnose, as hexoses D-glicose, D-galactose, D-manose, e ácidos glucurônico e galacturônico, sendo classificada de acordo com suas unidades monoméricas. Esses resíduos estão presentes nos heteropolímeros de xilano, xiloglucana, glucomanana, galactoglucomanana e arabinogalactana (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

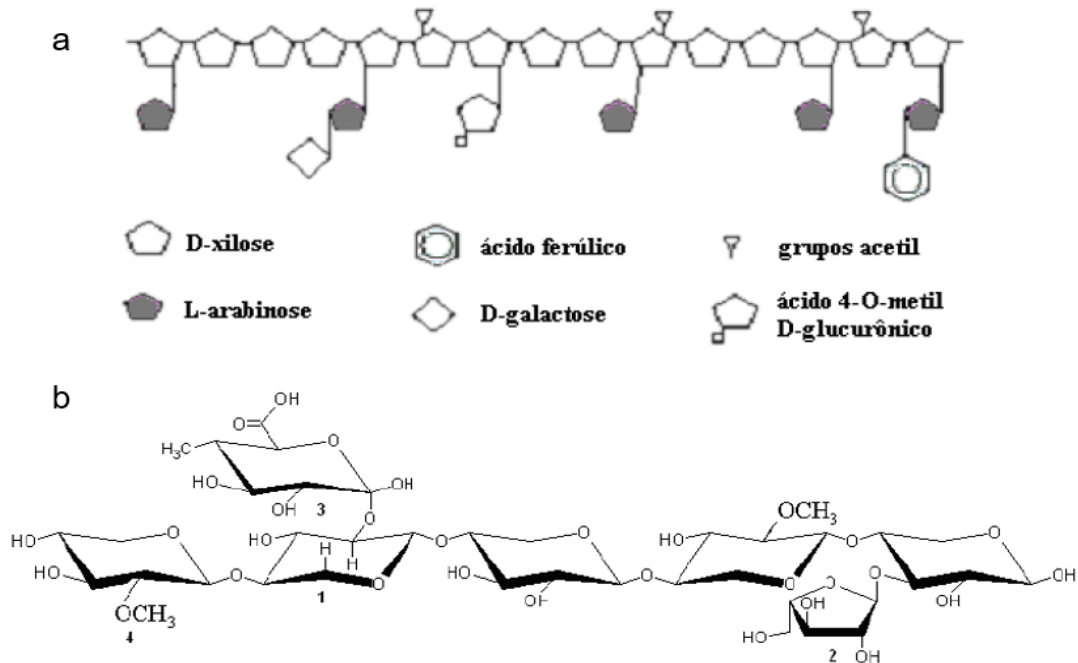


Figura 4 Estrutura esquemática da hemicelulose (a); Estrutura representativa de L-arabino-(4-O-metil-D-glucurono)-D-xilana: 1- Xilopirranose; 2- L-arabinofuranose; 3- ácido 4-O-metil-glucurônico; 4- grupo acetil (b) (BRIENZO, 2010).

O xilano (Figura 5) é um polissacarídeo hemicelulósico e possui em sua estrutura uma cadeia principal composta por resíduos de D-xilose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, uma seqüência final redutora de xilose, ramnose e ácido galacturônico e é altamente modificado com grupos laterais acetil e ácido metil glucurônico (WIERZBICKI et al., 2019b). A quantidade e os tipos de ramificação (grupos funcionais) variam dependendo da fonte de matéria-prima (LIMAYEM; RICKE, 2012).

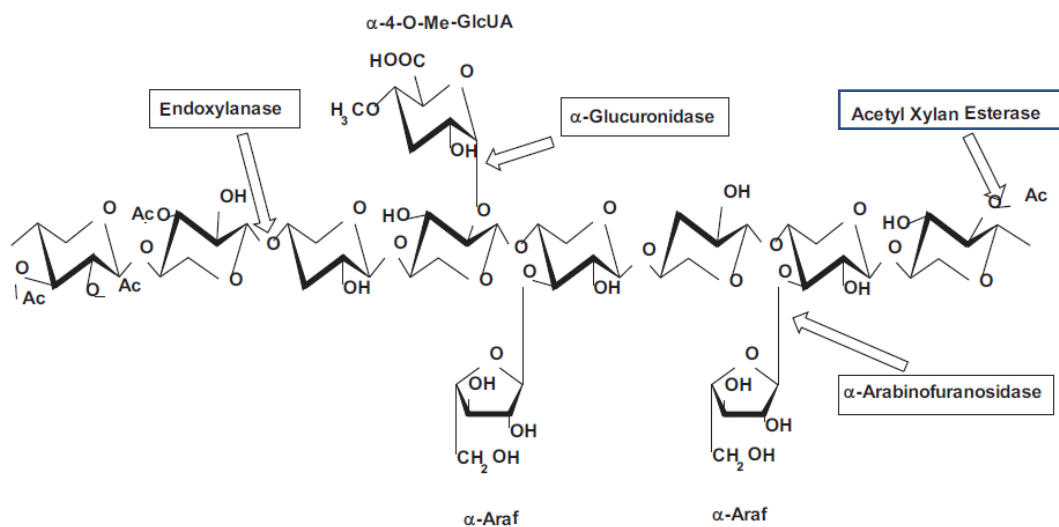


Figura 5 Estrutura do xilano e das enzimas xilanólíticas envolvidas na sua degradação. Ac: grupo acetil; α -Araf: α -arabinofuranose; α -4-O-Me-GlcA: ácido α -4-O-metilglucurônico (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

Por ser uma estrutura heterogênea, a hidrólise completa do xilano requer a atividade de diferentes enzimas, classificadas como glicosil hidrolases (GH) e carboidrato esterases, compondo o sistema xilanolítico. As enzimas responsáveis pela degradação da cadeia principal de xilano são as endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8) e as responsáveis por hidrolisar a extremidade não redutora de xilo-oligosacarídeos (XOS) em D-xilose são as β -xilosidases (EC 3.2.1.37) (Figura 6). Estas duas enzimas são essenciais para finalizar a hidrólise da hemicelulose nativa e conversão da biomassa lignocelulósica, sendo os fungos filamentosos fontes acessíveis, que podem a partir de resíduos agroindustriais produzir elevadas quantidades de endo-1,4- β -xilanases e β -xilosidases (GOSWAMI; PATHAK, 2013). Entretanto, outras enzimas também são necessárias para a completa despolimerização do xilano, a saber, α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -glucuronidasas (EC 3.2.1.1), acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72), ácido ferúlico esterases (EC 3.1.1.73) e ácido p -cumárico esterases (EC 3.1.1.x) (Figura 5) (MARTINS et al., 2011; WONGWISANSRI et al., 2013).

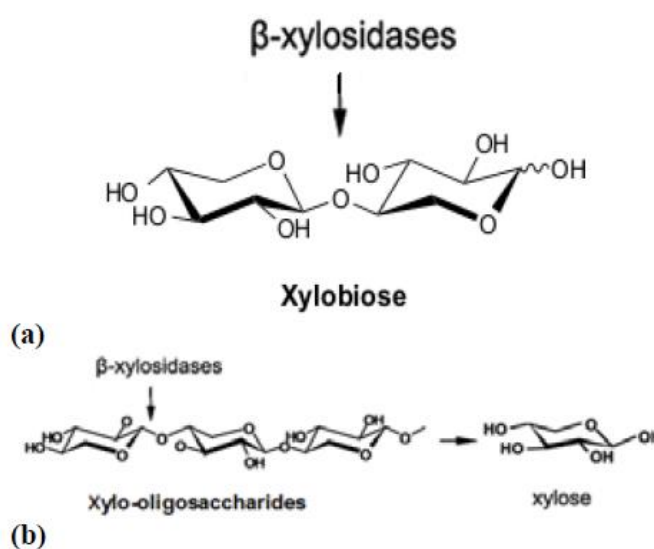


Figura 6 Representação esquemática da degradação de hemicelulose por β -xilosidases que liberam xilose a partir de xilobiose (a) e xilo-oligosacarídeos (b) (KOUSAR et al., 2013).

3.4 Enzimas hidrolíticas e suas aplicações

As enzimas de origem microbiana são interessantes para o setor industrial, por serem produzidas em quantidades elevadas em um curto tempo, além de permitirem a possibilidade de manipulação genética de células bacterianas, objetivando-se elevar a produção enzimática. Essas enzimas receberam maior atenção devido à sua

natureza ativa e estável, em comparação às enzimas de origem animal ou vegetal (ANBU et al., 2017).

No campo da biotecnologia, os produtos biológicos como enzimas, hormônios e antibióticos oriundos de fungos filamentosos são de grande interesse ao se considerar que esses microrganismos são excelentes fontes de enzimas industriais, devido à grande capacidade de produção e secreção dessas para o meio extracelular (UDAY et al., 2016). Além disso, a atividade catalítica dessas enzimas é altamente específica, agindo de forma ecologicamente correta ao comparar esta atividade à hidrólise química. Entretanto, o custo da hidrólise enzimática da biomassa é um fator que limita a viabilidade econômica deste processo e justifica a necessidade de desenvolver estratégias para aumentar a produção de enzimas, diminuindo seus custos (KUMAR et al., 2009; SHARMA; KUMAR, 2013).

As hidrolases representam um grande grupo de enzimas, composto por celulasas, amilases, pectinases, invertases e hemicelulasas. As amilases (E.C. 3.2.1.1/2) são utilizadas na indústria de papel, têxtil, alimentícia, farmacêutica, além de serem empregadas na elaboração de detergentes e químicos finos (ABDULAAL, 2018). As celulasas são empregadas em diversos ramos industriais, como na indústria alimentícia, têxtil, de papel e celulose, na produção de rações e na obtenção de etanol (McKELVEY; MURPHY, 2017). As quitinases (E.C. 3.2.1.14) são enzimas pouco exploradas comercialmente, apesar de seu grande potencial biotecnológico. São empregadas na indústria farmacêutica (KUDDUS, 2014), na gestão de resíduos industriais (POMMER et al., 2019) e são consideradas enzimas promissoras no controle biológico e no desenvolvimento de biopesticidas com base enzimática (BALDONI et al., 2020).

As invertases (E.C. 3.2.1.26) são utilizadas na fabricação de mel artificial (NASCIMENTO et al., 2019), na síntese de frutooligossacarídeos (FOS) (AUNG et al., 2019), no desenvolvimento de eletrodos enzimáticos para detecção de sacarose em alimentos e bebidas (PARK; RO; KIM, 1991), na produção de açúcar invertido (OZCAN et al., 2019), além de ser uma das enzimas mais utilizadas na indústria confeitaria (NADEEM et al., 2015). As pectinases (E.C. 3.2.1.15/67/82) são utilizadas na produção de sucos de frutas (UENOJO; PASTORE, 2007), vinhos e na fermentação de chá e café. Também são empregadas na produção de ração animal, na indústria têxtil, na indústria de papel e celulose, na extração de óleos vegetais, na sacarificação de substratos agrícolas e na reciclagem de papel (GARG et al., 2016).

As proteases (E.C. 3.4.21-24) são utilizadas na indústria alimentícia, especialmente na fabricação de queijos, sendo também empregadas na formulação de detergentes, rações e na indústria farmacêutica e de químicos finos (McKELVEY; MURPHY, 2017). As endo-xilanase (E.C. 3.2.1.8) e β -xilosidase (E.C. 3.2.1.37) são consideradas enzimas-chave no processo de branqueamento da polpa de celulose, além de serem empregadas na indústria alimentícia, na extração e clarificação de sucos de frutas e vinhos, na produção de ração animal e biocombustíveis (ROHMAN et al., 2019), na extração de óleos vegetais, amido e café, na sacarificação de biomassa lignocelulósica para obtenção de açúcares fermentáveis e também na obtenção de XOS de cadeia curta (HEINEN et al., 2014).

Os efeitos prebióticos de XOS têm sido muito estudados por apresentarem aplicações na área da saúde. Estudos mostram que os XOS chegam intactos ao intestino e estimulam seletivamente o crescimento de *Bifidobacterium*, além de inibir o crescimento de *Clostridium* e *Escherichia coli* (OKAZAKI; FUJIKAWA; MATSUMOTO, 1990). Os XOS podem ser obtidos a partir de materiais lignocelulósicos em duas etapas, em que a primeira é baseada na extração da hemicelulose, pelos processos de autohidrólise, hidrólise ácida ou pré-tratamento alcalino, já a segunda etapa, baseia-se na hidrólise ácida ou tratamento enzimático da hemicelulose pela utilização de xilanases (CARVALHO et al., 2013).

3.5 Bagaço de cevada

O Brasil se destaca como um grande gerador de biomassa lignocelulósica em virtude das atividades agroindustriais, as quais resultam em enormes quantidades de resíduos durante a colheita ou no processamento de suas matérias-primas. Esses resíduos tornam-se um problema ambiental quando não são tratados e escoados de forma correta, apresentando potenciais riscos de contaminação de solos e águas. Dentre estes remanescentes agrícolas, existem vários que podem ser aproveitados para produção final de alimentos e bioenergia como por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar, a casca de arroz, o farelo de trigo, o sabugo de milho, a palha de feijão e a cevada. Destaque para o último, o qual é gerado em grandes volumes durante o ano todo (MORAES et al., 2017; PEREIRA SCARPA et al., 2019).

A cevada (*Hordeum vulgare*, L.) é o quarto cereal mais importante do mundo em termos de produção total, depois de trigo, arroz e milho. É utilizado principalmente na indústria cervejeira e para alimentação animal (YALÇIN et al., 2007). Para fins cervejeiros, a região sul do Brasil concentra a maior produção brasileira de cevada,

cuja produção em 2019 superou 428 mil toneladas, em cerca de 118,8 mil hectares (CONAB, 2019; EMBRAPA TRIGO, 2019).

Relatos de potenciais aplicações da cevada sem casca incluem a preparação de malte alimentar, produção de etanol, extração e enriquecimento de β -glucana, preparação de amidos nativos e modificados, e a preparação de farelo e farinha. O grão da cevada é composto principalmente de amido, fibra dietética e proteína, sendo a composição química afetada por fatores genotípico e ambiental. A fração insolúvel da fibra dietética total contém grande proporção de celulose (YALÇIN et al., 2007). Nesse sentido, aproveitar esses resíduos como fonte alternativa de matéria-prima para produtos biotecnológicos ou produção de energia, torna-se uma opção renovável, de baixo custo e sustentável.

3.6 Sacarificação enzimática e produção de bioetanol

Com o intuito de diminuir a elevada dependência de combustíveis fósseis, a lignocelulose é considerada um recurso alternativo na produção de açúcares fermentáveis, para serem convertidos em combustíveis e produtos químicos (LYND; WYMAN; GERNGROSS, 1999). A glucana é a principal fonte de açúcar fermentável, representada pela celulose. Para obtenção eficiente de açúcares fermentáveis a partir da lignocelulose por sacarificação enzimática, o pré-tratamento e alguns passos de sacarificação são necessários, haja vista que a celulose presente na lignocelulose não é facilmente acessível às enzimas celulasas, devido à proteção por hemicelulose e lignina (KUMAR et al., 2009; KIM et al., 2019).

Algumas propriedades estruturais da celulose, como o seu grau de cristalinidade, o grau de polimerização e a área de superfície, limitam a acessibilidade da enzima ao substrato. Os métodos de pré-tratamento que interrompem o elevado grau de ordenamento das fibras de celulose, removem a lignina e aumentam a área de superfície acessível às enzimas, promovem a hidrólise e aumentam a sua taxa em vários resíduos lignocelulósicos. A hidrólise enzimática completa dos polissacarídeos presentes na lignocelulose exigem a ação combinada de uma gama complexa de hidrolases, que incluem celulasas, xilanases, pectinases e outras enzimas de clivagem de grupos laterais (EL-SHISHTAWY et al., 2015).

De maneira geral, a produção de bioetanol proveniente da biomassa lignocelulósica envolve principalmente quatro etapas: o pré-tratamento para remover a lignina; a hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada para produzir monômeros de

açúcar; a fermentação de monômeros de açúcar em etanol por leveduras e a destilação. O pré-tratamento pode ser por métodos físicos, químicos ou biológicos e é uma das etapas mais caras envolvidas na conversão da biomassa em açúcares. Reduzir o custo geral para tornar o processo economicamente viável e competitivo são o foco de muitas pesquisas sobre o bioetanol (PRASAD et al., 2019).

Dentro desse contexto, este trabalho buscou realizar a prospecção de enzimas hidrolíticas do complexo hemicelulolítico a partir de *T. koningiopsis* 2OI2A1M, um fungo mesófilo isolado do bioma da Mata Atlântica do Paraná, com total escassez de conhecimento sobre o seu potencial biotecnológico. Além disso, o bagaço de cevada foi utilizado como componente indutor para produção de enzimas, bem como substrato de hidrólise no processo de sacarificação desse resíduo, em que se aplicou o extrato bruto enzimático de *T. koningiopsis* 2OI2A1M para produção de açúcares fermentáveis, visando a aplicação posterior destes na produção de bioetanol.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento e identificação do microrganismo

Para esse estudo foi utilizado o fungo filamentosso *Trichoderma koningiopsis* 2OI2A1M, isolado de uma amostra coletada do rio Bela Vista localizado (53°35'41" O, 25°26'43" S) no Refúgio Biológico Bela Vista (Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil), conforme metodologia padronizada pelo projeto em rede SISBIOTA – Brasil. O microrganismo isolado foi identificado taxonomicamente através do sequenciamento das regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossomal do fungo conforme metodologia descrita por White et al. (1990). O fragmento de DNA da região ITS foi amplificado com o par de oligonucleotídeos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' direto) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' reverso). O sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 foi realizado pela empresa Helixxa® (Campinas-SP). A determinação da espécie foi realizada através da comparação com outras sequências depositadas no banco de dados do Centro Nacional de Informações em Biotecnologia (NCBI) utilizando a ferramenta BLAST. A sequência ITS do fungo *T. koningiopsis* 2OI2A1M encontra-se depositada no banco de dados GenBank do NCBI sob o número de acesso MN662532.1. A árvore filogenética foi construída a partir de sequência das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do *T. koningiopsis* 2OI2A1M, em comparação com sequências de outras linhagens de fungos obtidas a partir do banco de dados GenBank™ do NCBI, com auxílio do programa MEGA 6.0.

4.2 Manutenção do fungo

O fungo *T. koningiopsis* 2OI2A1M foi mantido na Coleção de Fungos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste). A manutenção rotineira da linhagem em laboratório foi realizada em tubos de ensaios estéreis contendo meio BDA e os repiques periódicos incubados em estufa bacteriológica a 28 °C, por 10 dias, sendo em seguida, conservados em geladeira.

4.3 Condições de cultivo e obtenção do extrato bruto extracelular

O cultivo do fungo *T. koningiopsis* 2OI2A1M foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio mineral Czapek (WISEMAN, 1975) suplementado com 1,5% de diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono, em seguida, esterilizado em autoclave durante 20 min, a 121 °C e 1 atm de pressão. Após esterilização do meio, foi inoculado 1 mL de suspensão de esporos com padronização prévia ($2,2 \times 10^5$ esporos mL⁻¹) e a fermentação submersa foi conduzida em condição estacionária a 28 °C, em estufa incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand) por 5 dias.

O extrato bruto extracelular foi obtido através da filtração a vácuo das culturas em funil de Büchner com papel-filtro e dialisado contra água deionizada por aproximadamente 18 h à 4 °C. O filtrado livre de células foi utilizado para determinação da atividade enzimática e da quantificação de proteínas.

4.4 Determinação da atividade enzimática e quantificação de proteínas

A atividade enzimática foi determinada através da reação de 50 µL do extrato bruto extracelular e 50 µL de seu respectivo substrato enzimático, incubados à 50 °C, por diferentes intervalos de tempo (min) adequados a cada enzima, sendo interrompida com a adição de 100 µL do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Esses tubos foram submetidos à fervura por 10 min e então adicionado 1 mL de água destilada, sendo os açúcares redutores produzidos na reação, estimados conforme o método de Miller (1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio. A quantificação de proteínas foi estimada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovina como padrão. A atividade específica foi expressa em unidade de atividade total por miligrama de proteína total (U mg⁻¹).

4.5 Screening enzimático

Com o intuito de ampliar os conhecimentos sobre *T. koningiopsis*, foi realizado o *screening* de 12 enzimas de interesse biotecnológico. Os extratos foram obtidos de cultivos de *T. koningiopsis* 2OI2A1M conforme mencionado no item 4.3. As seguintes fontes de carbono (1%) foram utilizadas: bagaço de cana, bagaço de cevada, casca de maçã, cascudinho (*Alphitobius diaperinus*), palha de milho, palha de soja, pupa (*Spodoptera frugiperda*), resíduo fibroso de mandioca, sabugo de milho e sorgo biomassa.

4.5.1 Determinação da atividade enzimática através da reação com DNS

A reação com DNS descrita por Miller (1959) foi utilizada para a determinação da atividade enzimática de amilase, invertase, pectinase, poligalacturonase, xilanase, além das enzimas do complexo celulolítico avicelase, CMCCase e FPase. Os substratos utilizados para estas enzimas foram respectivamente, amido, sacarose, pectina cítrica, ácido poligalacturônico, xilano de beechwood, avicel®, carboximetilcelulose e papel-filtro, todos à 1%, exceto a sacarose, onde a concentração utilizada foi 0,2 mol L⁻¹. Todos os substratos foram solubilizados em tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹ pH 5,0 e as reações foram conduzidas à 50 °C por 10 min. Para as enzimas do complexo celulolítico o tempo de reação foi de 30 min. As curvas de calibração foram preparadas em água milli-Q utilizando glicose (para amilase, avicelase, CMCCase, FPase e invertase), ácido galacturônico (para pectinase e poligalacturonase) e xilose (para xilanase). Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de produto formado por minuto, nas condições de ensaio (pH 5,0 e 50 °C).

4.5.2 Determinação da atividade de β-glicosidase, β-xilosidase e quitinase

A atividade enzimática de β-glicosidase e β-xilosidase foram determinadas empregando-se a metodologia descrita por Tan et al. (1987). A quitinase foi quantificada utilizando-se a técnica descrita por Yan e Fong (2018). Os substratos utilizados foram p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo 2 mmol L⁻¹ (β-glicosidase), p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo 2 mmol L⁻¹ (β-xilosidase) e p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina 0,2 mg mL⁻¹ (quitinase). Os substratos foram solubilizados em tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹ pH 5,0. As reações aconteceram à 50 °C por 60 min e o produto formado foi quantificado em espectrofotômetro à 410 nm. A curva de calibração foi preparada utilizando p-nitrofenol 1 mmol L⁻¹ dissolvido em água milli-Q. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária

para liberar 1 μmol de p-nitrofenol formado por minuto nas condições de ensaio (pH 5,0 e 50 °C).

4.5.3 Determinação da atividade de protease

A atividade enzimática da protease foi determinada empregando-se a metodologia de Sandhya et al. (2005) com modificações. O substrato utilizado foi a caseína 1% solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. A reação foi conduzida à 50 °C por 10 min e o produto formado foi quantificado em espectrofotômetro à 660 nm. A curva de calibração foi preparada utilizando tirosina 0,2 mg mL⁻¹ dissolvida em água milli-Q. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de tirosina livre formada por minuto nas condições de ensaio (pH 7,0 e 50 °C).

4.6 Caracterização bioquímica da xilanase do extrato bruto extracelular

4.6.1 Efeito da temperatura

Para determinar a temperatura de maior atividade de xilanase foram realizados ensaios utilizando o substrato xilano de beechwood 1% (dissolvido em tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹ pH 5,0) na presença do extrato bruto enzimático, em temperaturas de 40 a 70 °C. A estabilidade térmica da xilanase foi conduzida pela incubação da enzima, sem substrato, em banho-maria nas temperaturas entre 40 a 70 °C, por até 360 min, onde foram retiradas alíquotas em diferentes tempos para determinação da atividade xilanásica residual, mediante incubação com respectivo substrato à temperatura ótima, utilizando o método de Miller (1959).

4.6.2 Efeito do pH

A determinação do pH de maior atividade de xilanase foi realizada através da reação da enzima com o seu respectivo substrato (xilano de beechwood 1%), em tampão citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹ (McILVAINE, 1921), no intervalo de pH entre 3,0 e 8,0. A estabilidade ao pH de xilanase foi investigada durante 7 dias à 4 °C, mediante incubação da enzima na ausência de seu substrato, em uma faixa de pH entre 3,5 e 7,0. Alíquotas foram retiradas para determinação da atividade enzimática em temperatura e pH ótimos da enzima, conforme metodologia de Miller (1959).

4.7 Influência de fontes de carbono celulósicas na produção de enzimas do complexo hemicelulolítico

Com o intuito de escolher uma fonte de carbono para sacarificação enzimática de *T. koningiopsis* 2OI2A1M, foi verificada a produção das enzimas xilanase,

CMCase, FPase, β -xilosidase e β -glicosidase utilizando 1% de fontes de carbono celulósicas como o algodão, avicel[®], bagaço (cana e cevada), carboximetilcelulose (CMC), celulose, casca de nozes, papel (filtro, jornal, kraft e sulfite), palha (arroz, feijão e milho), pó de serra, sabugo de milho e bagaço da panícula de sorgo. A determinação da atividade enzimática foi executada conforme descrito nos itens 4.5.1 e 4.5.2.

4.8 Sacarificação do bagaço de cevada

A hidrólise enzimática do bagaço de cevada foi realizada como descrito por Saha e Gosh (2014), com modificações. O bagaço de cevada lavado com água destilada e seco em estufa a 50 °C foi submetido a três diferentes pré-tratamentos (alcalino, ácido e térmico), além do bagaço de cevada sem tratamento, denominado bagaço de cevada *in natura*. O resíduo equivalente a 5% (p/v) foi pré-tratado com NaOH 0,1 mol L⁻¹ ou HCl 0,1 mol L⁻¹ por 16 h, ou autoclavado a 121 °C, por 1 h a 1 atm. Ao final de cada pré-tratamento, os resíduos foram lavados com água destilada até atingir neutralidade do pH e secos em estufa a 50 °C. A sacarificação foi realizada para um volume final de 10 mL, em que o meio reacional consistiu em 100 mg da biomassa pré-tratada ou *in natura* ressuspensa em tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹ pH 5,5 e o extrato bruto enzimático de *T. koningiopsis* 20I2A1M (1 UI/mg de substrato) obtido de cultivo induzido também com o bagaço de cevada 1,5% como fonte de carbono. A reação de hidrólise foi conduzida a 40 °C em incubadora tipo *shaker* sob agitação orbital de 200 rpm durante os tempos 24 e 48 h. Ao final do processo, as amostras foram filtradas a vácuo, obtendo-se um filtrado livre de células e o bagaço de cevada hidrolisado, que após secagem foi analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os filtrados foram centrifugados a 1500 rpm por 5 min e utilizados para determinação de açúcares redutores totais (ART) pelo método de DNS (Miller, 1959) utilizando xilose como padrão, quantificação de D-xilose (Kit D-xilose, Megazyme) e D-glicose (Kit Glicose-oxidase, Laborclin). O percentual de sacarificação foi calculado a partir da equação descrita por Baig et al. (2004) com base na produção de açúcares fermentáveis (açúcar redutor, xilose e glicose) durante a reação de hidrólise.

4.9 Análise morfológica do bagaço de cevada por MEV após hidrólise enzimática

O efeito da ação enzimática sobre o bagaço de cevada *in natura* (sem tratamento prévio) foi verificado em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). As amostras submetidas à análise foram preparadas sobre uma plataforma de alumínio

utilizando fita de carbono dupla face, cobertas com 20 nm de ouro em evaporador (DENTON VACUUM DESK V) e analisadas em aparelho TESCAN VEGA3 40XVP operado à 25kV. O controle consistiu no bagaço de cevada *in natura* sem tratamento enzimático.

4.10 Purificação parcial da xilanase de *T. koningiopsis* 2OI2A1M

Para a purificação parcial da enzima xilanase de *T. koningiopsis* 2OI2A1M, o extrato bruto foi dialisado e aplicado na coluna de cromatografia de troca iônica Carboxi-Metil-Sephadex (CM-Sephadex) (2 x 20 cm) previamente equilibrada com 2 volumes de tampão acetato de sódio 20 mmol L⁻¹ pH 5,0. Frações de 5 mL foram coletadas em tubo com fluxo de 2,0 mL/min utilizando o mesmo tampão para eluição da enzima, com gradiente de 0,05 a 1 mol L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl). As frações coletadas foram monitoradas quanto a proteína (A₂₈₀) e atividade enzimática, sendo reunidas as que possuíam alta atividade xilanásica e dialisadas contra água por aproximadamente 16 h sob refrigeração (4 °C). Em seguida, a amostra foi concentrada em liofilizador, ressuspensa e congelada, sendo posteriormente, submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida.

4.11 Análise dos produtos de degradação do xilano pela xilanase por cromatografia em camada delgada (CCD)

O modo de ação da xilanase parcialmente purificada por cromatografia de troca iônica (Carboxi-Metil-Sephadex) foi avaliado através da análise de seus produtos de hidrólise. A reação consistiu na mistura de 400 µL de enzima xilanase devidamente diluída e 400 µL de substrato xilano de beechwood 1% em tampão acetato de sódio 0,05 mol L⁻¹ pH 5,0. A reação de hidrólise ocorreu a 50 °C e alíquotas foram retiradas nos seguintes tempos: 15, 30, 60 e 120 min, sendo então fervidas por 5 min. Os produtos da hidrólise do xilano de beechwood foram analisados qualitativamente por CCD ascendente, em que as placas de sílica (fase estacionária) foram desenvolvidas em uma cuba de vidro contendo a fase móvel, constituída de n-butanol, etanol e água na proporção de 5:3:2 (v/v/v), respectivamente. Os produtos foram revelados por orcinol 0,2% (p/v) em solução de metanol/ácido sulfúrico na proporção de 9:1 (v/v), respectivamente. Após secas, as placas foram colocadas em estufa a 100 °C até o aparecimento de manchas referentes à hidrólise. Os padrões utilizados foram xilose, xilobiose, xilotriose e xilotetraose, todos na concentração de 3 mg mL⁻¹.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação taxonômica do fungo *T. koningiopsis* 2OI2A1M e árvore filogenética

A sequência de 562 pb referente as regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do *T. koningiopsis* 2OI2A1M foi comparada com outras sequências depositadas no banco de dados do NCBI utilizando a ferramenta BLAST, que resultou na identificação taxonômica da espécie *Trichoderma koningiopsis* e mostrou 99% de identidade com outras linhagens do gênero *Trichoderma*. A árvore filogenética construída com base no alinhamento das sequências dos genes ribossomais mostra que *T. koningiopsis* 2OI2A1M está agrupado com outras linhagens de *T. koningiopsis* conforme consta na Figura 7. Este fungo pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Hypocreaceae (NCBI Taxonomy).

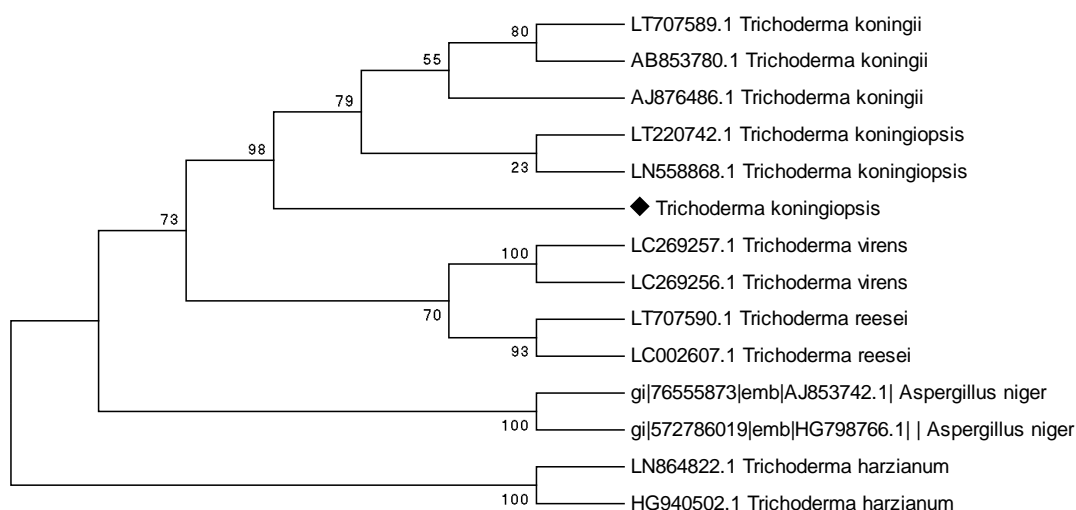


Figura 7 Árvore filogenética construída a partir de sequência das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do *T. koningiopsis*, em comparação com sequências de outras linhagens de fungos obtidas a partir do banco de dados GenBank™ do NCBI, com auxílio do programa MEGA 6.0.

5.2 Screening enzimático

Os extratos extracelulares obtidos a partir do cultivo com diferentes fontes de carbono indicaram que o fungo *T. koningiopsis* 2OI2A1M produz quantidades significativas de várias enzimas de interesse biotecnológico em cultivo líquido. A fermentação submersa em condição estacionária é economicamente mais vantajosa comparada à condição de agitação, por demandar menor gasto de energia no processo e por não necessitar de equipamento específico. Além da condição de fermentação, o meio de cultivo é um fator relevante no custo de produção de

compostos biológicos, por esse motivo, é crescente o interesse no aproveitamento de resíduos agroindustriais como matéria-prima barata em processos biotecnológicos. O reuso destes subprodutos é uma forma de diminuir o impacto ambiental gerado pelo descarte incorreto de tais resíduos (SILVA et al., 2016; BARBIERI et al., 2017).

As atividades das enzimas do complexo celulolítico (avicelase, CMCase e FPase) não foram expressivas como tem sido relatado para fungos do gênero *Trichoderma*. O melhor indutor para as enzimas avicelase ($1,41 \text{ U mL}^{-1}$) e CMCase ($2,05 \text{ U mL}^{-1}$) foi a casca de maçã (Tabela 1), porém ainda foi superior ao reportado para avicelase ($0,37 \text{ U mL}^{-1}$) de *T. koningiopsis* T-1 (ZHANG et al., 2014) e CMCase ($0,68 \text{ U mL}^{-1}$) de *T. koningiopsis* TM3 (NUTONGKAEW et al., 2019). A produção de FPase por *T. koningiopsis* 2OI2A1M, apesar de ser a menor dentre as enzimas celulolíticas avaliadas ($0,92 \text{ U mL}^{-1}$) (Tabela 1), mostrou ser superior ao *T. koningiopsis* AN251 com $0,16 \text{ U mL}^{-1}$ (BLASZCZYK et al., 2016).

Entretanto, a produção da β -glicosidase com bagaço de cevada por *T. koningiopsis* 2OI2A1M atingiu os maiores valores com $22,63 \text{ U mL}^{-1}$ (Tabela 1). Este valor foi maior que o reportado para *T. citrinoviride* (CHANDRA et al., 2013), onde a atividade enzimática encontrada foi de $1,10 \text{ U mL}^{-1}$. Em relação a atividade específica de β -glicosidase, foi encontrado $25,76 \text{ U mg}^{-1}$ (Tabela 2), valor superior ao reportado para as β -glicosidases de *T. citrinoviride* ($3,07 \text{ U mg}^{-1}$) (CHANDRA et al., 2013) e *T. reesei* QM9414 ($0,21 \text{ U mg}^{-1}$) (CHIRICO; BROWN, 1987), porém, menor que o encontrado para a enzima de *T. harzianum* ($35,40 \text{ U mg}^{-1}$) (YUN et al., 2001).

A maior produção enzimática por *T. koningiopsis* 2OI2A1M foi a xilanase em cultivo suplementado com resíduos agroindustriais, especialmente com as fontes: bagaço de cevada ($83,91 \text{ U mL}^{-1}$), sorgo biomassa ($77,68 \text{ U mL}^{-1}$), bagaço de cana ($57,83 \text{ U mL}^{-1}$), palha de milho ($50,43 \text{ U mL}^{-1}$) e sabugo de milho ($43,19 \text{ U mL}^{-1}$) (Tabela 1). Existem relatos na literatura sobre produção de xilanases por linhagens de *T. koningii*, porém com valores de atividade enzimática inferiores, tais como as reportadas por Blaszczyk et al. (2016) com *T. koningii* AN399 com atividade xilanásica de $2,00 \text{ U mL}^{-1}$ e *T. koningii* AN398, onde a produção enzimática foi de $2,05 \text{ U mL}^{-1}$. A β -xilosidase, enzima pertencente ao complexo xilanolítico, exibiu a maior produção no cultivo suplementado com sorgo biomassa, alcançando atividade enzimática de $22,63 \text{ U mL}^{-1}$ (Tabela 1) e atividade específica de $30,87 \text{ U mg}^{-1}$ (Tabela 2). A produção de β -xilosidase também foi reportada para *T. harzianum* ($0,26 \text{ U mg}^{-1}$) (XIMENES; SILVEIRA; FILHO, 1996), *T. lignorum* ($0,17 \text{ U mg}^{-1}$) (JOHN; SCHMIDT, 1988) e *T.*

viride (0,43 U mg⁻¹) (MATSUO; YASUI, 1984), mas não foram encontrados até o momento, relatos sobre a produção desta enzima por *T. koningiopsis*.

A produção de amilase foi melhor com a fonte de carbono bagaço de cevada, alcançando 4,62 U mL⁻¹ (Tabela 1) e atividade específica de 5,26 U mg⁻¹ (Tabela 2). Embora não tenham sido encontrados relatos na literatura sobre a produção de amilases por *T. koningiopsis*, a produção desta enzima foi reportada para outros integrantes do gênero *Trichoderma*, como *T. viride* que exibiu atividade enzimática de 0,51 U mL⁻¹ (MAHMOOD; RAHMAN, 2008) e como o *T. pseudokoningii* com atividade específica de 34,00 U mg⁻¹ (ABDULAAL, 2018).

O bagaço de cana foi um bom indutor na produção de quitinase, alcançando 9,00 U mL⁻¹ (Tabela 1). Baldoni et al. (2020) verificaram que *T. koningiopsis* UFSMQ40 é um bom produtor de quitinase em fermentação em estado sólido com farelo de trigo. A fonte de carbono que induziu a maior produção de pectinase por *T. koningiopsis* 2OI2A1M foi a casca de maçã com 6,55 U mL⁻¹ (Tabela 1) e atividade específica de 22,74 U mg⁻¹ (Tabela 2). Embora já tenham sido descritas pectinases produzidas por espécies deste gênero como para *T. viride* (7,34 U mg⁻¹) (MAHMOUD; ABO-ELMAGD; HOUSSEINY, 2018), não foram encontrados relatos sobre a produção desta enzima por *T. koningiopsis*. Já a poligalacturonase, enzima pertencente ao grupo das pectinases, alcançou atividade máxima de 2,98 U mL⁻¹ quando o fungo *T. koningiopsis* 2OI2A1M foi suplementado com palha de soja.

O *T. koningiopsis* 2OI2A1M produziu em baixas quantidades as enzimas invertase e protease em cultivo suplementado com resíduos agroindustriais. Os valores encontrados de atividade invertásica e proteásica foram 1,20 e 0,55 U mL⁻¹, respectivamente, ambos detectados no extrato obtido a partir do cultivo com bagaço de cevada.

Tabela 1 *Screening* de enzimas produzidas por *T. koningiopsis* 20I2A1M sob fermentação submersa a 28 °C.

Atividade enzimática (U mL ⁻¹)	Fonte de carbono (1%)									
	Bagaço de cana	Bagaço de cevada	Casca de maçã	Cascudinho	Palha de milho	Palha de soja	Pupa	Resíduo fibroso da mandioca	Sabugo de milho	Sorgo biomassa
Amilase	0,00±0,00	4,62±0,28	0,00±0,00	0,00±0,00	3,74±0,13	0,00±0,00	2,34±0,11	0,00±0,00	0,00±0,00	3,16±0,41
Avicelase	0,80±0,00	0,00±0,00	1,41±0,49	0,00±0,00	0,26±0,07	0,99±0,04	0,00±0,00	0,00±0,00	0,17±0,03	0,18±0,06
CMCase	0,09±0,02	0,47±0,07	2,05±0,11	0,27±0,07	1,65±0,01	0,06±0,01	0,00±0,00	0,04±0,01	0,45±0,01	0,29±0,04
FPase	0,00±0,00	0,33±0,01	0,20±0,14	0,06±0,02	0,92±0,11	0,18±0,06	0,11±0,01	0,44±0,04	0,23±0,03	0,48±0,11
Invertase	0,54±0,02	1,20±0,30	0,86±0,24	0,00±0,00	0,26±0,04	0,60±0,09	0,00±0,00	1,10±0,11	0,00±0,00	0,71±0,02
Pectinase	1,29±0,31	0,00±0,00	6,55±0,49	0,00±0,00	0,00±0,00	2,91±0,14	3,99±0,28	0,00±0,00	1,01±0,02	0,00±0,00
Poligalacturonase	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,94±0,33	2,89±0,02	2,98±0,26	0,00±0,00	0,00±0,00	0,70±0,14	2,58±0,23
Protease	0,17±0,03	0,55±0,03	0,00±0,00	0,22±0,02	0,00±0,00	0,27±0,07	0,00±0,00	0,15±0,02	0,10±0,00	0,07±0,00
β-glicosidase	4,45±0,03	22,63±0,43	0,56±0,03	2,88±0,03	4,11±0,01	2,46±0,05	1,61±0,05	0,17±0,01	3,34±0,00	9,40±0,33
β-xilosidase	19,53±0,27	4,60±0,04	0,25±0,01	0,80±0,01	3,42±0,00	0,54±0,00	0,14±0,01	0,12±0,02	2,12±0,01	22,63±0,77
Xilanase	57,83±0,43	83,91±0,46	0,00±0,00	0,00±0,00	50,43±0,29	8,84±0,72	0,00±0,00	11,30±1,74	43,19±0,29	77,68±2,61
Quitinase	9,00±0,20	3,89±0,18	2,39±0,06	2,73±0,03	3,25±0,13	1,75±0,10	2,88±0,01	0,81±0,08	2,87±0,00	5,87±0,58

Tabela 2 Atividade específica de diferentes amostras obtidas de cultivos de *T. koningiopsis* 20I2A1M sob fermentação submersa a 28 °C.

Atividade específica (U mg ⁻¹)	Fonte de carbono (1%)									
	Bagaço de cana	Bagaço de cevada	Casca de maçã	Cascudinho	Palha de milho	Palha de soja	Pupa	Resíduo fibroso da mandioca	Sabugo de milho	Sorgo biomassa
Amilase	0,00±0,00	5,26±0,04	0,00±0,00	0,00±0,00	7,41±0,04	0,00±0,00	6,81±0,03	0,00±0,00	0,00±0,00	4,31±0,00
Avicelase	0,27±0,02	0,00±0,00	1,59±0,03	0,00±0,00	0,51±0,03	1,28±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	0,57±0,00	0,24±0,01
CMCase	0,13±0,01	0,54±0,05	7,12±0,01	0,31±0,02	3,27±0,04	0,07±0,01	0,00±0,00	0,30±0,02	1,49±0,01	0,24±0,03
FPase	0,00±0,00	0,38±0,03	2,14±0,00	0,07±0,01	1,82±0,05	0,46±0,02	0,33±0,05	3,07±0,03	0,76±0,01	0,65±0,05
Invertase	0,75±0,02	1,37±0,06	0,82±0,02	0,00±0,00	0,51±0,02	0,78±0,03	0,00±0,00	7,70±0,05	0,00±0,00	0,97±0,02
Pectinase	1,81±0,03	0,00±0,00	22,74±0,04	0,00±0,00	0,00±0,00	3,76±0,02	11,59±0,06	0,00±0,00	3,33±0,03	0,00±0,00
Poligalacturonase	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,08±0,04	5,72±0,06	3,85±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00	2,33±0,02	3,52±0,01
Protease	0,24±0,03	0,63±0,05	0,00±0,00	0,26±0,04	0,00±0,00	0,35±0,02	0,00±0,00	1,09±0,01	0,34±0,02	0,09±0,01
β-glicosidase	6,24±0,03	25,76±0,02	1,94±0,03	3,33±0,05	8,14±0,02	3,17±0,01	4,68±0,04	1,20±0,02	11,04±0,01	12,82±0,05
β-xilosidase	27,42±0,05	5,23±0,03	0,87±0,01	0,92±0,02	6,78±0,03	0,69±0,01	0,41±0,05	0,85±0,02	7,00±0,01	30,87±0,07
Xilanase	81,16±0,02	95,49±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	99,93±0,04	11,41±0,01	0,00±0,00	79,33±0,07	142,62±0,01	105,94±0,08
Quitinase	12,63±0,01	4,43±0,05	8,31±0,03	3,14±0,01	6,44±0,05	2,26±0,01	8,35±0,04	6,73±0,02	9,49±0,02	8,01±0,05

5.3 Caracterização bioquímica da xilanase do extrato bruto extracelular

A determinação do pH e da temperatura de máxima atividade da enzima xilanase proveniente do extrato bruto de *T. koningiopsis* 2OI2A1M está representada na Figura 8. É possível observar o pH 5,0 como o ideal para a atividade xilanolítica de *T. koningiopsis* 2OI2A1M (Figura 8a), adicionalmente, foi encontrada a atividade xilanásica máxima quando o extrato foi incubado a temperatura de 60 °C (Figura 8b).

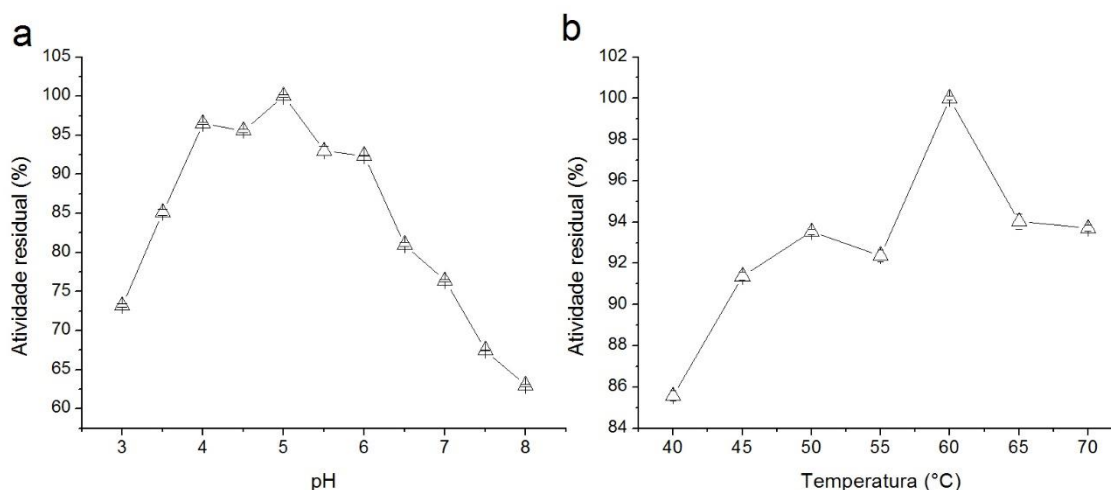


Figura 8 Influência do pH (a) e da temperatura (b) sobre a atividade da enzima xilanase do extrato bruto de *T. koningiopsis* 2OI2A1M.

Na Figura 9 está representada a estabilidade térmica de xilanase. Assim, foi possível determinar que a atividade xilanolítica relativa não se manteve em 100% nas temperaturas superiores à 40 °C após 60 min de incubação, porém, manteve-se a meia-vida da enzima a 60 °C por aproximadamente 300 min. Estabilidade térmica maior é um dos requisitos para aplicações de enzimas em processos industriais, ao atuarem em temperaturas elevadas e extremos de pH, podem ser aplicadas na sacarificação de biomassa lignocelulósica (TORRE; KADOWAKI, 2017). Na produção de etanol, a hidrólise enzimática que utiliza enzimas termoestáveis apresenta vantagens ao reduzir a necessidade de pré-tratamento primário com ácidos (SHOKRKAR; EBRAHIMI; ZAMANI, 2017).

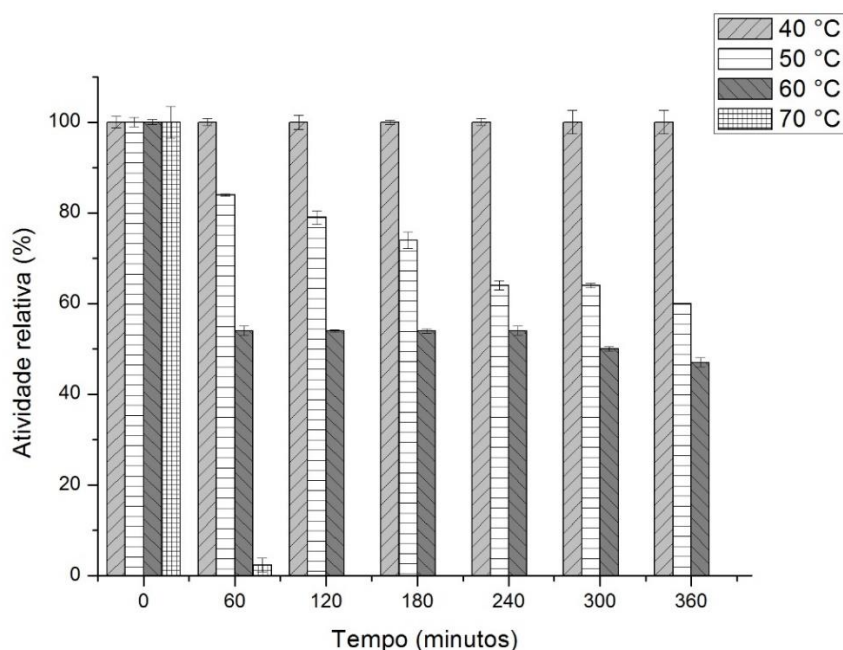


Figura 9 Estabilidade térmica da enzima xilanase do extrato bruto de *T. koningiopsis* 2OI2A1M.

Uma das principais áreas de interesse que envolvem o uso de enzimas hidrolíticas, está na transformação de biomassa lignocelulósica em produtos de valor agregado. No entanto, atividade enzimática inadequada e estabilidade apenas em uma faixa estreita de pH e temperatura, muitas vezes limitam seu uso eficiente (MANISHA; YADAV, 2017). Na Figura 10 é possível verificar que a atividade xilanásica de *T. koningiopsis* 2OI2A1M manteve-se estável em todos os pH testados (3,5-7,0) por até 6 dias.

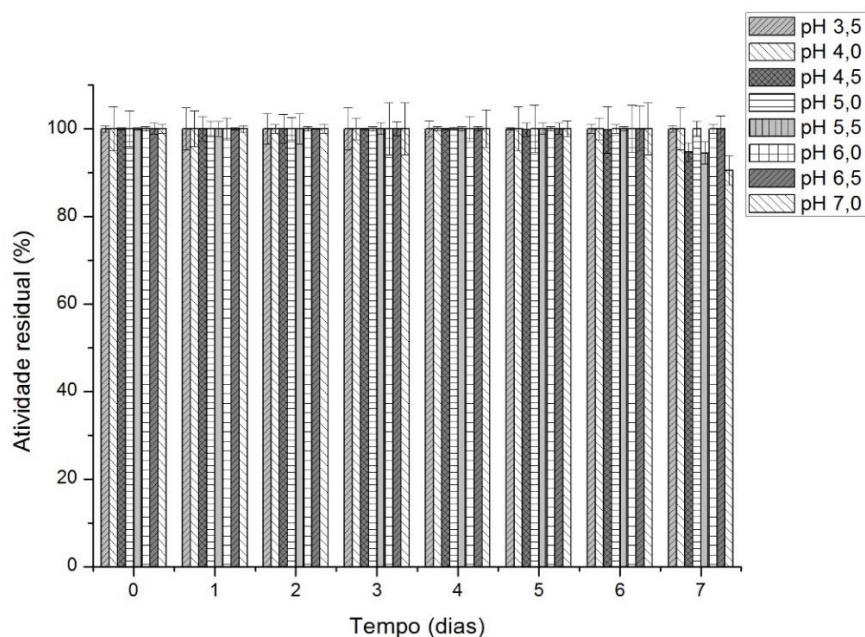


Figura 10 Estabilidade ao pH da enzima xilanase do extrato bruto de *T. koningiopsis* 2OI2A1M.

5.4 Influência de fontes de carbono celulósicas na produção de enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico

Ao avaliar-se diferentes fontes de carbono com maior teor de celulose, observou-se que o fungo *T. koningiopsis* 2OI2A1M exibe potencial para produção principalmente das enzimas endo-xilanase, β -xilosidase e β -glicosidase (Tabela 3). A produção da xilanase alcançou os maiores valores de atividade ($53,68 \text{ U mL}^{-1}$) no extrato obtido a partir do cultivo com bagaço de cevada, seguido do cultivo de papel kraft ($51,93 \text{ U mL}^{-1}$). Entretanto, outras fontes de carbono ricas em celulose também foram capazes de induzir a produção de xilanase, como avicel[®] ($47,28 \text{ U mL}^{-1}$), bagaço de cana ($40,93 \text{ U mL}^{-1}$) e CMC ($37,13 \text{ U mL}^{-1}$). Para produção de hemicelulases de alto rendimento, tem sido relatado como um dos fatores de indução, a suplementação com substratos insolúveis oriundos de polímeros vegetais, a exemplo dos polímeros de hemicelulose e celulose presentes nos resíduos agroindustriais (DA SILVA DELABONA et al., 2017).

Considerando essa característica, a produção de xilanase e β -xilosidase extracelulares foi mais eficiente na presença de fonte de carbono de origem vegetal como o bagaço de cana ($40,93$ e $11,88 \text{ U mL}^{-1}$, respectivamente), comparado às atividades enzimáticas ($37,13$ e $4,73 \text{ U mL}^{-1}$, respectivamente) obtidas com substrato comercial como a CMC. Esses valores de atividade xilanásica foram consideravelmente maiores que o descrito para *T. koningiopsis* TM3 ($8,27 \text{ U mL}^{-1}$) (NUTONGKAEW et al., 2019) e *T. koningiopsis* AN251 ($2,14 \text{ U mL}^{-1}$) (BLASZCZYK et al., 2016). Até o presente momento, não existem relatos na literatura sobre a produção de β -xilosidases por *T. koningiopsis*, por outro lado, uma nova cepa de *T. gamsii* M501 cultivada em meio otimizado composto de celulose microcristalina como fonte de carbono, alcançou $0,60 \text{ U mL}^{-1}$ de atividade β -xilosidase (BASKARAN; KRISHNAN, 2020).

A β -glicosidase exibiu maior produção enzimática ($36,40 \text{ U mL}^{-1}$) em cultivo suplementado com CMC, seguido de bagaço de cevada ($16,43 \text{ U mL}^{-1}$). Esses resultados obtidos foram superiores ao reportado para *T. koningiopsis* FCD3-1 ($1,18 \text{ U mL}^{-1}$) suplementado com celulose microcristalina (ZHANG et al., 2014).

Distintamente, as atividades celulolíticas das enzimas CMCase e FPase por *T. koningiopsis* 2OI2A1M não foram expressivas. A maior atividade de CMCase foi alcançada quando suplementado com CMC ($2,17 \text{ U mL}^{-1}$). Castrillo et al. (2015) avaliaram a produção de endo-1,4- β -glucanases por *T. koningiopsis* utilizando CMC

como fonte de carbono e encontraram um valor de aproximadamente 100 U L⁻¹. Blaszczyk et al. (2016) estudaram a capacidade de espécies de *Trichoderma* em degradar celulose (atividade FPase), em que um menor potencial de decomposição da celulose (papel filtro) foi registrado para *T. koningiopsis*. Esse resultado é similar à baixa atividade de FPase (0,32 U mL⁻¹) encontrada no presente estudo, em que o cultivo do fungo *T. koningiopsis* 2OI2A1M foi suplementado com a palha de milho.

Para degradação de biopolímeros da parede celular vegetal é requerido a ação sinérgica de diversas enzimas extracelulares. Várias espécies de *Trichoderma* são conhecidas por serem boas produtoras de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, especialmente a espécie *T. reesei*, amplamente estudada pela elevada produção de celulasas (BLASZCZYK et al., 2016). O fungo *T. koningiopsis* 2OI2A1M não se mostrou um bom produtor de celulasas, por outro lado, demonstrou potencial na produção de enzimas hemicelulolíticas, como as endo-xilanases e β -xilosidases.

Tabela 3 Influência das fontes de carbono na indução de enzimas do complexo xilanolítico e celulolítico pelo *T. koningiopsis* 2O12A1M em cultivo líquido.

Fonte de carbono (1%)	Atividade enzimática (U mL ⁻¹)				
	CMCase	FPase	β-glicosidase	Xilanase	β-xilosidase
<i>Algodão</i>	1,06 ± 0,01	0,00 ± 0,00	10,32 ± 0,15	22,22 ± 0,91	0,70 ± 0,38
<i>Avicel®</i>	1,00 ± 0,01	0,00 ± 0,00	13,35 ± 0,08	47,28 ± 0,20	1,45 ± 0,02
<i>Bagaço de cana</i>	1,01 ± 0,09	0,19 ± 0,04	5,84 ± 0,04	40,93 ± 1,51	11,88 ± 0,31
<i>Bagaço de cevada</i>	1,18 ± 0,09	0,28 ± 0,02	16,43 ± 0,75	53,68 ± 1,97	6,26 ± 0,04
<i>Casca de nozes</i>	0,42 ± 0,04	0,00 ± 0,00	2,08 ± 0,04	1,33 ± 0,06	0,88 ± 0,02
<i>Celulose</i>	0,52 ± 0,04	0,00 ± 0,00	7,75 ± 0,47	20,06 ± 0,12	1,19 ± 0,01
<i>CMC</i>	2,17 ± 0,08	0,19 ± 0,00	36,40 ± 0,20	37,13 ± 0,81	4,73 ± 0,17
<i>Papel filtro</i>	0,81 ± 0,01	0,10 ± 0,02	4,83 ± 0,14	35,59 ± 1,97	8,14 ± 0,14
<i>Papel de jornal</i>	0,94 ± 0,05	0,00 ± 0,00	6,28 ± 0,19	19,01 ± 1,86	1,81 ± 0,18
<i>Papel kraft</i>	0,79 ± 0,04	0,13 ± 0,01	7,28 ± 0,22	51,93 ± 0,22	6,25 ± 0,12
<i>Papel sulfite</i>	0,27 ± 0,01	0,00 ± 0,00	1,37 ± 0,03	5,62 ± 0,17	0,39 ± 0,01
<i>Palha de arroz</i>	0,18 ± 0,05	0,00 ± 0,00	2,48 ± 0,26	5,91 ± 0,35	0,55 ± 0,02
<i>Palha de feijão</i>	0,14 ± 0,01	0,21 ± 0,00	7,38 ± 0,11	15,71 ± 1,10	2,23 ± 0,02
<i>Palha de milho</i>	1,40 ± 0,05	0,32 ± 0,00	10,08 ± 0,10	31,65 ± 0,12	10,08 ± 0,34
<i>Pó de serra</i>	0,36 ± 0,01	0,00 ± 0,00	1,28 ± 0,11	3,54 ± 0,29	0,70 ± 0,18
<i>Sabugo de milho</i>	0,74 ± 0,01	0,00 ± 0,00	5,63 ± 0,10	28,06 ± 0,70	6,23 ± 0,01
<i>Bagaço da panícula de Sorgo</i>	0,20 ± 0,01	0,00 ± 0,00	2,72 ± 0,07	2,03 ± 0,99	1,01 ± 0,01

Devido à complexidade dos polímeros que compõem a biomassa lignocelulósica, coquetéis contendo enzimas hemicelulolíticas se tornaram recursos valiosos no contexto industrial. Considerando a importância da β -glicosidase na decomposição da celulose associado ao papel chave de β -xilosidases e xilanases na hidrólise da hemicelulose, a ação combinada dessas enzimas é essencial no processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica, visando a obtenção de açúcares fermentáveis como glicose e xilose (GOLDBECK et al., 2016; SINGH et al., 2016; ALOKIKA; SINGH, 2019).

5.5 Sacarificação do bagaço de cevada

A produção de açúcares fermentáveis a partir do processo de hidrólise enzimática do bagaço de cevada encontra-se sumarizada na Tabela 4. O extrato bruto de *T. koningiopsis* 2OI2A1M cultivado com bagaço de cevada 1,5% como fonte de carbono foi utilizado na reação. As melhores condições para a liberação desses produtos ocorreram em reações durante 48 h, quando à 40 °C e agitação de 200 rpm. Embora a formação de glicose já tenha alcançado o seu maior resultado em 24 h de reação do extrato enzimático de *T. koningiopsis* 2OI2A1M com o resíduo de bagaço de cevada *in natura* (5,9%), somente em 48 h obteve-se resultados próximos na produção de glicose com os resíduos que sofreram tratamento prévio para remoção de lignina, a saber, pré-tratamento ácido (5,5%), pré-tratamento térmico (5,3%) e pré-tratamento alcalino (5,2%). A produção superior do monossacarídeo glicose deve-se à atuação da enzima β -glicosidase presente em elevadas quantidades no extrato bruto de *T. koningiopsis* 2OI2A1M.

O uso amplo em vários processos biotecnológicos dessas enzimas inclui a produção de biocombustível e etanol a partir de resíduos agrícolas celulósicos (SINGH et al., 2016). A produção de bioetanol pode ser resumida em três etapas, o pré-tratamento que envolve a preparação da matéria-prima, a sacarificação em que ocorre a hidrólise da celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis e a etapa de fermentação, fase final de conversão desses açúcares em bioetanol (GOPALAKRISHNAN et al., 2020).

Tabela 4 Efeito de diferentes pré-tratamentos na produção de açúcares fermentáveis a partir da sacarificação enzimática do bagaço de cevada.

Pré-tratamento	Tempo (h)	Sacarificação (%)		
		Açúcar		
		reductor total (ART)	Glicose	Xilose
<i>In natura</i>	24	10,7	5,9	1,6
	48	13,3	5,9	2,6
Ácido	24	7,0	2,3	1,2
	48	11,3	5,5	2,4
Alcalino	24	6,7	2,4	2,1
	48	12,8	5,2	3,4
Térmico	24	9,1	4,1	2,2
	48	11,3	5,3	2,5

Ainda que a formação de xilose tenha sido maior com a reação do extrato enzimático de *T. koningiopsis* 2O12A1M com o resíduo de bagaço de cevada que sofreu pré-tratamento alcalino (3,4%), a liberação de ART foi mais expressiva na reação com o bagaço de cevada *in natura*, onde o percentual de sacarificação detectado foi 13,3%. A partir desse resultado, pode-se concluir que na hidrólise enzimática do bagaço de cevada por *T. koningiopsis* 2O12A1M, não seria necessário tratamento químico, nem físico prévio, haja vista que os melhores resultados alcançados foram com o bagaço de cevada *in natura* em 48 horas para glicose (5,9%) e ART (13,3%), seguido do valor de xilose (2,6%). Por outro lado, Mussatto et al. (2008) avaliaram a hidrólise enzimática de grão gasto de cevada a partir de celulase comercial, em que o resíduo não tratado proporcionou a menor formação de glicose e a menor taxa de conversão de celulose, sugerindo que a composição química do substrato presente na amostra, afetou negativamente a hidrólise enzimática da celulose.

A eficácia na formação de açúcares fermentáveis a partir da hidrólise enzimática de resíduos submetidos à pré-tratamento ácido ou alcalino já foram relatadas em estudos anteriores (XU et al., 2019; GOPALAKRISHNAN et al., 2020). De acordo com Phadtare et al. (2017), o uso de álcalis é mais efetivo, pois atua removendo a lignina da biomassa, tornando mais acessível a celulose e hemicelulose à ação enzimática. Entretanto, sabe-se que a conversão enzimática da biomassa

lignocelulósica em açúcares fermentáveis é preferível quando comparado aos métodos químicos, pois evitam-se a liberação de compostos inibidores como ácidos fracos, furanos e compostos fenólicos, os quais dificultam o processamento downstream (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

O bagaço de cevada é composto principalmente por celulose (12,3%), hemicelulose (23,4%) e lignina (26,1%) (BERNARDI et al., 2019). Em relação aos açúcares redutores obtidos a partir da sacarificação do bagaço de cevada *in natura*, observa-se um resultado positivo quando comparado ao bagaço de cevada tratado por álcali, haja vista que o percentual foi superior para o resíduo não tratado no tempo de 48 h, demonstrando não ser necessário o tratamento prévio nas condições de ensaio avaliadas. Desta forma, os resultados obtidos neste estudo são promissores, uma vez que a porcentagem de açúcares redutores formados nos ensaios de sacarificação demonstra a eficiência da ação conjunta das enzimas celulolíticas e xilanolíticas produzidas por *T. koningiopsis* 2OI2A1M.

5.6 Análise morfológica do bagaço de cevada por MEV após hidrólise enzimática

A micrografia MEV do bagaço de cevada *in natura* sem tratamento enzimático (controle) revelou uma morfologia organizada, porém irregular com estruturas fibrosas disformes e revestimento fragmentado, lembrando as estruturas de cascas de árvores (Figura 11a). Embora a superfície demonstre certa irregularidade estrutural, a exposição das fibras indica que os constituintes lignocelulósicos estão presentes. Na Figura 11b é possível verificar um revestimento liso, efeito da aplicação do extrato enzimático bruto de *T. koningiopsis* 2OI2A1M na hidrólise da biomassa, mesmo sem o tratamento prévio para remoção de lignina.

Resultados similares foram reportados por Ibarra-Díaz et al. (2020), sobre a morfologia da palha de cevada analisada por MEV, antes e após o tratamento com enzimas comerciais, inicialmente sendo observada uma estrutura organizada e característica do material lignocelulósico com alongamento das fibras de celulose rodeadas por uma estrutura composta de hemicelulose e lignina assemelhando-se à estrutura de uma rede, entretanto, após a hidrólise enzimática da palha de cevada com tratamento alcalino, foi relatado um material sem estrutura definida, apenas grânulos isolados.

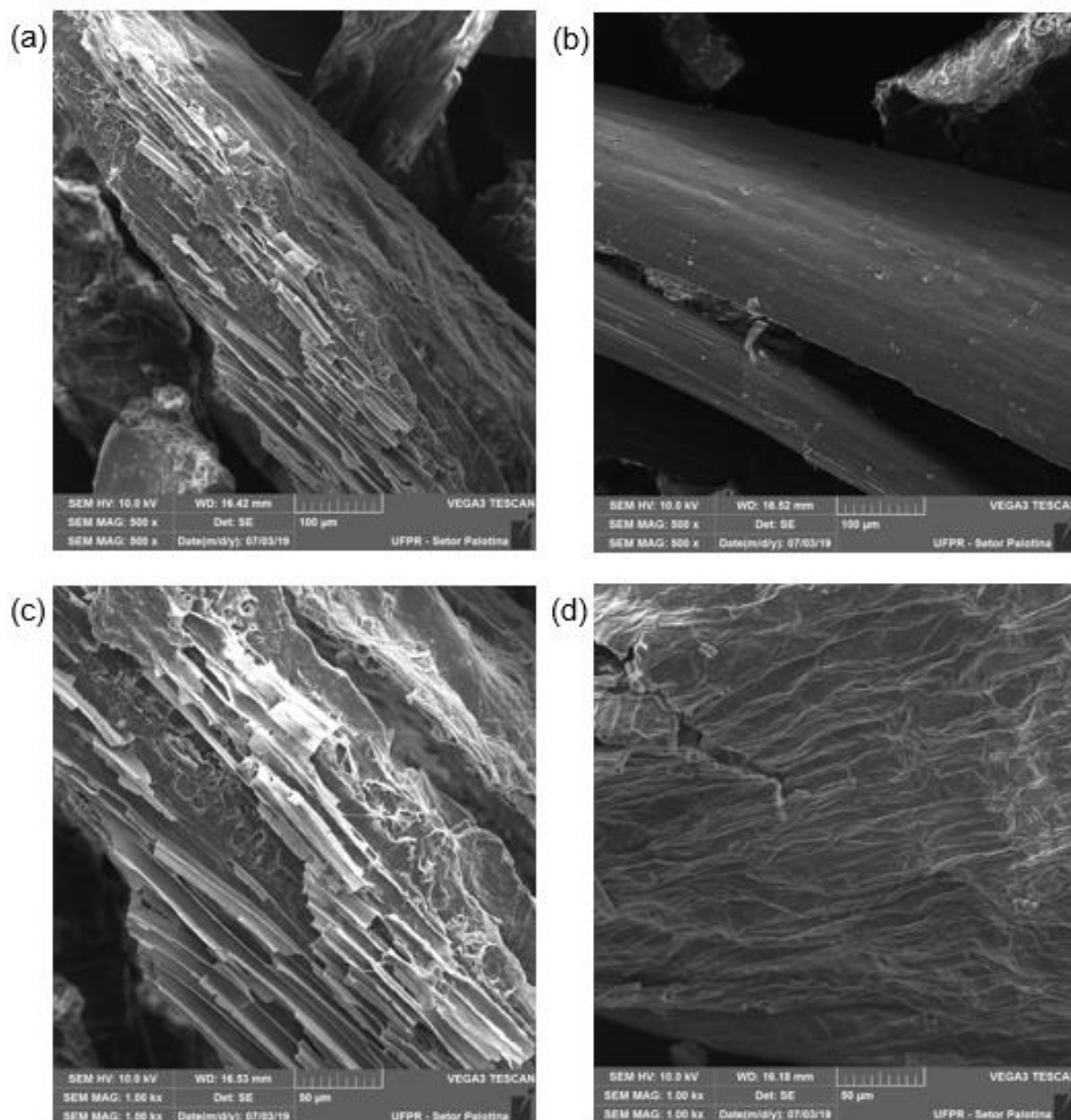


Figura 11 Microscopia MEV do bagaço de cevada *in natura* ampliado 500x (a, b) e ampliado 1000x (c, d). Controle, bagaço de cevada sem tratamento enzimático (a, c); Bagaço de cevada após tratamento com extrato enzimático de *T. koningiopsis* 2O12A1M (b, d) por 48 h à 40 °C.

Em um aumento de 1000x (Figura 11d), a análise morfológica do resíduo apontou uma extensa área superficial lisa, em que grande parte do material de celulose foi degradado, indicando a eficácia da ação de enzimas do complexo hemicelulolítico de *T. koningiopsis* 2O12A1M na remoção de lignina e hemicelulose, resultando na elevada acessibilidade às fibras de celulose cristalina. Em oposto aos resultados encontrados por Mussatto et al. (2008), ao avaliarem a hidrólise enzimática de grão gasto de cevada por celulase comercial, a estrutura do substrato não tratado praticamente não foi modificada, confirmando a baixa eficiência da hidrólise obtida,

entretanto, quando tratado e removida a lignina, a estrutura do material foi fortemente modificada, sendo altamente hidrolisada.

A eficácia dos pré-tratamentos em melhorar a taxa de hidrólise pode estar relacionada com a modificação estrutural causada no substrato, após o tratamento. Além disso, outra limitação relatada na hidrólise enzimática da celulose, corresponde ao tipo e a composição do sistema celulolítico utilizado no processo (RAMOS; NAZHAD; SADDLER, 1993). Com o estudo de hidrólise enzimática da biomassa de bagaço de cevada, o fator limitante estrutura do substrato pareceu não interferir na ação das enzimas presentes no extrato bruto de *T. koningiopsis* 2OI2A1M sobre o bagaço de cevada *in natura*, haja vista que mesmo com os 3 tipos de pré-tratamentos utilizados no estudo, o melhor rendimento de sacarificação foi obtido com o substrato sem tratamento. A partir da MEV, observa-se que as enzimas produzidas por *T. koningiopsis* 2OI2A1M têm um grande potencial de aplicação na sacarificação de biomassa de bagaço de cevada, sem a necessidade de um tratamento prévio desse substrato.

5.7 Purificação parcial da xilanase extracelular de *T. koningiopsis* 2OI2A1M

O extrato bruto dialisado foi aplicado na coluna de troca iônica CM-Sephadex, como única etapa cromatográfica. Foram aplicados 18 mL de amostra, obtido do cultivo líquido de *T. koningiopsis* 2OI2A1M cultivado a partir de bagaço de cevada 1,5%, resultando no perfil cromatográfico apresentado na Figura 12.

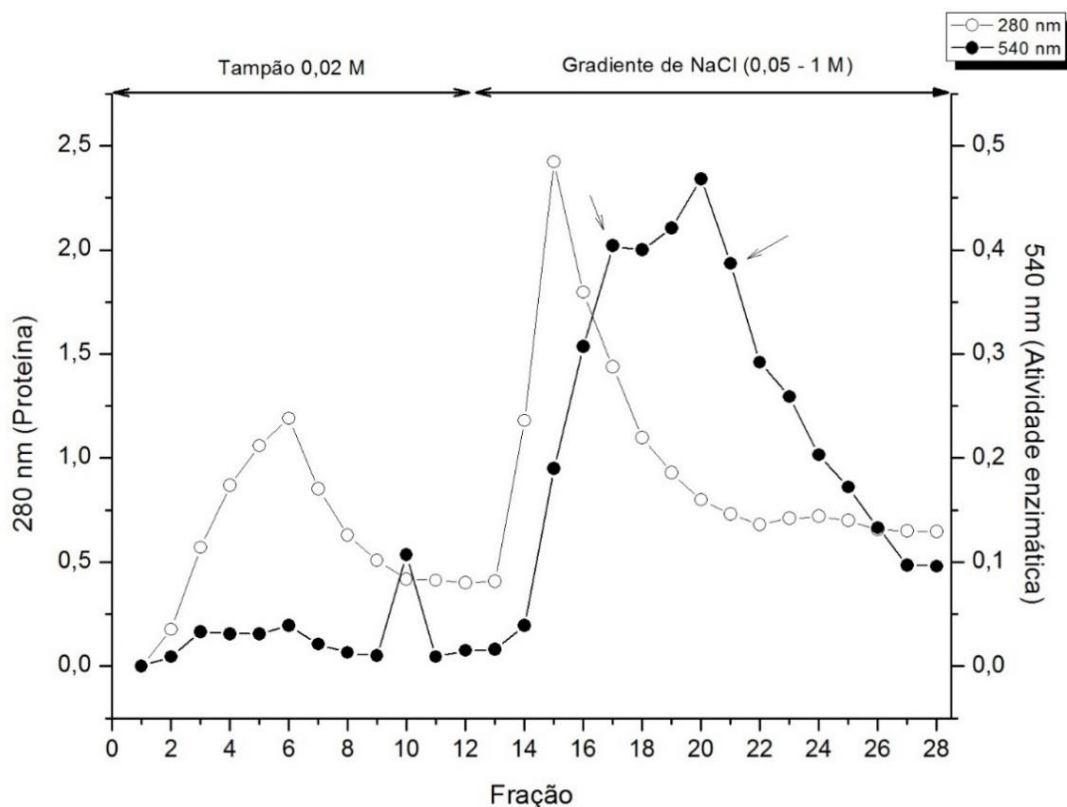


Figura 12 Perfil cromatográfico da xilanase de *T. koningiopsis* 2O12A1M em CM-Sephadex. Atividade xilanásica (●) e absorvância a 280 nm (○). As frações reunidas estão indicadas pelas setas (→).

Na Figura 12 é possível verificar dois picos proteicos, os quais não estão contidos no pico de atividade xilanásica. A xilanase foi eluída entre os gradientes de NaCl 0,175 e 0,300 mol L⁻¹, sendo o pico de atividade correspondente ao gradiente de 0,250 mol L⁻¹. As frações recolhidas foram divididas em duas alíquotas, denominadas *Pool 1* (0,175 e 0,200 mol L⁻¹) e *Pool 2* (0,225; 0,250 e 0,300 mol L⁻¹). A atividade enzimática recuperada e a quantidade de proteína estão disponíveis na Tabela 5.

Tabela 5 Sumário das etapas de purificação parcial da xilanase de *T. koningiopsis* 2O12A1M.

Etapa de purificação	Volume (mL)	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U mg ⁻¹)	Purificação (fator)	Recuperação (%)
Extrato bruto	18	2646	15,7	168,9	1	100
CM-Sephadex						
<i>Pool 1</i>	8	288	0,8	360	2,1	11
<i>Pool 2</i>	13,5	594	1,2	495	2,9	22

5.8 Análise dos produtos de degradação do xilano por CCD

A análise dos produtos de hidrólise do xilano indicou a presença de xilose, xilobiose, xilotriose e xilotetraose (Figura 13). Estes resultados sugerem uma ação combinada de duas enzimas, endo-xilanases que atuam na cadeia principal do xilano liberando XOS e β -xilosidases que catalisam a hidrólise da extremidade não-redutora dos XOS, liberando xilose. Menos evidente foi a formação do monossacarídeo xilose, o que está de acordo com os demais achados desse estudo, como no processo de sacarificação, em que foi encontrado maior concentração de açúcares redutores totais e menor concentração a xilose, bem como nas dosagens de atividade enzimática do extrato bruto de *T. koningiopsis* 20I2A1M, o qual apresentou atividade consideravelmente superior de endo-xilanase, em comparação à atividade de β -xilosidase.

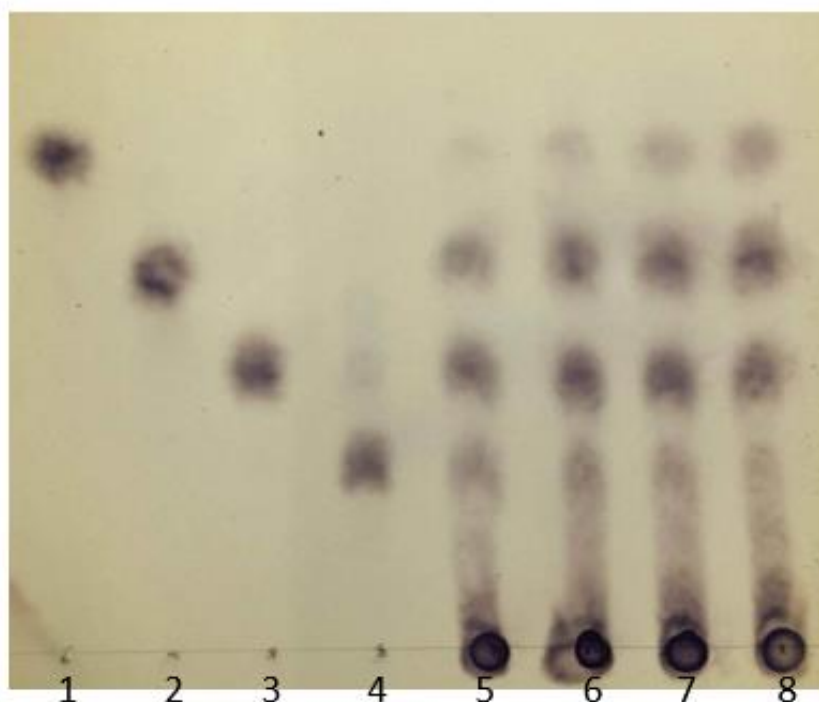


Figura 13 Análise dos produtos de hidrólise do xilano pela xilanase de *T. koningiopsis* 20I2A1M. Raias: (1) xilose; (2) xilobiose; (3) xilotriose; (4) xilotetraose; (5 - 8) tempos de reação enzimática à 15, 30, 60 e 120 min, respectivamente.

Devido à sua grande complexidade estrutural, a completa hidrólise do heteropolissacarídeo xilano requer ação de várias enzimas do complexo xilanolítico como a endo-xilanase e β -xilosidase (HEINEN et al., 2018). Embora existam diversos relatos sobre endo-xilanases (SILVA; TERRASAN; CARMONA, 2015; HEINEN et al., 2017) e β -xilosidases fúngicas (CORRÊA et al., 2016; YE; LI; ZHAO, 2017), existem

poucos relatos sobre fungos nativos produtores em níveis consideráveis de ambas as enzimas. Desta forma, coquetéis enzimáticos contendo endo-xilanases e β -xilosidases apresentam grande importância no contexto biotecnológico, uma vez que a ação sinérgica dessas enzimas aumenta significativamente a eficácia da hidrólise da biomassa nos processos industriais.

Na sacarificação do xilano, a β -xilosidase é uma enzima crucial, pois cliva o maior número de ligações glicosídicas da hemicelulose, em comparação às demais enzimas xilanolíticas (JORDAN et al., 2013). Os XOS são potentes inibidores das endo-xilanases e celulasas, então a atividade de β -xilosidase pode melhorar a eficiência do processo de sacarificação, ao degradar os XOS, e assim, diminuir os componentes inibitórios dessas enzimas no meio reacional (ROHMAN et al., 2019). A degradação do xilano revelada nesse estudo demonstra haver a presença de xilanases com especificidades diferentes, como a endo-xilanase e a β -xilosidase, consideradas enzimas-chave no processo de degradação desse heteropolissacarídeo complexo.

6. CONCLUSÕES

O fungo *T. koningiopsis* 2OI2A1M demonstrou potencial para produção de diferentes enzimas de interesse biotecnológico, como pectinase, quitinase, β -xilosidase e β -glicosidase, entretanto, a enzima xilanase foi a hidrolase que merece destaque, alcançando os maiores valores de atividade enzimática utilizando o bagaço de cevada como fonte de carbono. Além disso, quantidades significativas de açúcar redutor total foram obtidas utilizando extrato bruto enzimático na hidrólise do bagaço de cevada, principalmente nas condições *in natura* e com tratamento alcalino. Sendo assim, os resultados encontrados neste estudo são promissores, uma vez que a porcentagem de açúcares redutores formados nos ensaios de sacarificação demonstra a eficiência da ação conjunta das enzimas celulolíticas e xilanolíticas produzidas por *T. koningiopsis* 2OI2A1M.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULAAL, W. H. Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. **BMC Biochemistry**, v. 19, n. 1, p. 1-6, 2018.

ALOKIKA; SINGH, B. Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 8763-8784, 2019.

ALVES, L. C.; LLERENA, J. P. P.; MAZZAFERA, P.; VICENTINI, R. Diel oscillations in cell wall components and soluble sugars as a response to short-day in sugarcane (*Saccharum* sp.). **BMC Plant Biology**, v. 19, p. 1-14, 2019.

ANBU, P.; GOPINATH, S. C. B.; CHAULAGAIN, B. P.; LAKSHMIPRIYA, T. Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2016. **BioMed Research International**, v. 2017, p.1-3, 2017.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005.

AUNG, T.; JIANG, H.; LIU, G. L.; CHI, Z.; HU, Z.; CHI, Z. M. Overproduction of a β -fructofuranosidase1 with a high FOS synthesis activity for efficient biosynthesis of fructooligosaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 988–996, 2019.

BAIG, M. M. V.; BAIG, M. L. B.; BAIG, M. I. A.; YASMEEN, M. Saccharification of banana agro-waste by cellulolytic enzymes. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 447-450, 2004.

BALDONI, D. B.; ANTONIOLLI, Z. I.; MAZUTTI, M. A.; JACQUES, R. J. S.; DOTTO, A. C.; SILVEIRA, A. O.; FERRAZ, R. C.; SOARES, V. B.; SOUZA, A. R. C. Chitinase production by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 using solid state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2020.

BARBIERI, G. S.; OLIVEIRA, F.; EBINUMA, V. C. S. Produção de xilanases por cultivo submerso de *Talaromyces amestolkiae* utilizando resíduos industriais. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 38, p. 1-1, 2017.

BASKARAN, R.; KRISHNAN, C. Enhanced production of cellulase from a novel strain *Trichoderma gamsii* M501 through response surface methodology and its application in biomass saccharification. **Process Biochemistry**, v. 99, p. 48-60, 2020.

BERNARDI, A. V.; YONAMINE, D. K.; UYEMURA, S. A.; DINAMARCO, T. M. A Thermostable *Aspergillus fumigatus* GH7 Endoglucanase Over-Expressed in *Pichia pastoris* Stimulates Lignocellulosic Biomass Hydrolysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, 2019.

BISSETT, J.; GAMS, W.; JAKLITSCH, W.; SAMUELS, G. J. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **IMA Fungus**, v. 6, p. 263-295, 2015.

BLASZCZYK, L.; STRAKOWSKA, J.; CHELKOWSKI, J.; GABKA-BUSZEK, A.; KACZMAREK, J. *Trichoderma* species occurring on wood with decay symptoms in mountain forests in Central Europe: genetic and enzymatic characterization. **Journal of Applied Genetics**, v. 57, p. 397-407, 2016.

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, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRIENZO, M. **Extração de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.

BROXTERMAN, S. E.; SCHOLS, H. A. Interactions between pectin and cellulose in primary plant cell walls. **Carbohydrate Polymers**, v. 192, p. 263-272, 2018.

CARVALHO, A. F. A.; NETO, P. O.; SILVA, D. F.; PASTORE, G. M. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, p. 75-85, 2013.

CASTRILLO, M.; BICH, G.; KRAMER, G.; VELAZQUEZ, J.; RODRIGUEZ, M.; ZAPATA, P.; VILLALBA, L. Evaluation of synthetic and semi-synthetic culture media for endo-1,4- β -glucanases secretion by *Trichoderma koningiopsis*. **Procedia Materials Science**, v. 8, p. 786-792, 2015.

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SANGWAN, N. S.; SANGWAN, R. S. Biochemical and proteomic characterization of a novel extracellular β -Glucosidase from *Trichoderma citrinoviride*. **Molecular Biotechnology**, v. 53, p. 289-299, 2013.

CHIRICO, W. J.; BROWN, R. D. Purification and characterization of a beta-glucosidase from *Trichoderma reesei*. **European Journal of Biochemistry**, v. 165, p. 333-341, 1987.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: monitoramento agrícola safra 2019/20**. Terceiro levantamento, Brasília, v. 7, n. 3, p. 1-109, 2019. ISSN 2318-6852.

CORRÊA, J. M.; CHRISTI, D.; TORRE, C. L. D.; HENN, C.; CONCEIÇÃO-SILVA, J. L.; KADOWAKI, M. K.; SIMÃO, R. C. G. High levels of β -xylosidase in *Thermomyces lanuginosus*: potential use for saccharification. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 680-690, 2016.

DA SILVA DELABONA, P.; RODRIGUES, G. N.; ZUBIETA, M. P.; RAMONI, J.; CODIMA, C. A.; LIMA, D. J.; FARINAS, C. S.; DA CRUZ PRADELLA, J. G.; SEIBOTH, B. The relation between xyr1 overexpression in *Trichoderma harzianum* and sugarcane bagasse saccharification performance. **Journal of Biotechnology**, v. 246, p. 24-32, 2017.

DRUZHININA, I. S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B. A.; KENERLY, C. M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P. K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749-759, 2011.

EL-SHISHTAWY, R. M.; MOHAMED, S. A.; ASIRI, A. M.; GOMAA, A. M.; IBRAHIM, I. H.; AL-TALHI, H. A. Saccharification and hydrolytic enzyme production of alkali pre-treated wheat bran by *Trichoderma virens* under solid state fermentation. **BMC Biotechnology**, v. 15, Article 37, 2015.

EMBRAPA TRIGO – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Indicações técnicas para a produção de cevada cervejeira nas safras 2019 e 2020**: Sistemas de produção 10. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2019. 116 p. ISSN 1806-664X.

GARG, G.; SINGH, A.; KAUR, A.; SINGH, R.; KAUR, J.; MAHAJAN, R. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **3 Biotech**, v. 6, Article 47, 2016.

GOLDBECK, R.; GONÇALVES, T. A.; DAMASIO, A. R. L.; BRENELLI, L. B.; WOLF, L. D.; PAIXÃO, D. A. A. P.; ROCHA, G. J. M.; SQUINA, F. M. Effect of hemicellulolytic enzymes to improve sugarcane bagasse saccharification and xylooligosaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 131, p. 36-46, 2016.

GOPALAKRISHNAN, R. M.; MANAVALAN, T.; RAMESH, J.; THANGAVELU, K. P.; HEESE, K. Improvement of Saccharification and Delignification Efficiency of *Trichoderma reesei* Rut-C30 by Genetic Bioengineering. **Microorganisms**, v. 8, 2020.

GOSWAMI, G. K.; PATHAK, R. R. Microbial xylanases and their biomedical applications: a review. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**, v. 2, n. 3, p. 237-246, 2013.

HEINEN, P. R.; HENN, C.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A.; SIMÃO, R. C. G.; SILVA, J. L. C.; POLIZELI, M. L. T. M.; KADOWAKI, M. K. Xylanase from *Fusarium heterosporum*: properties and influence of thiol compounds on xylanase activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 9, p. 1047-1055, 2014.

HEINEN, P. R.; PEREIRA, M. G.; RECHIA, C. G. V.; ALMEIDA, P. Z.; MONTEIRO, L. M. O.; PASIN, T. M.; MESSIAS, J. M.; CEREIA, M.; KADOWAKI, M. K.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Immobilized endo-xylanase of *Aspergillus tamaritii* Kita: an interesting biological tool for production of xylooligosaccharides at high temperatures. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 145-152, 2017.

HEINEN, P. R.; BAUERMEISTER, A.; RIBEIRO, L. F.; MESSIAS, J. M.; ALMEIDA, P. Z.; MORAES, L. A. B.; VARGAS-RECHIA, C. G.; OLIVEIRA, A. H. C.; WARD, R. J.; FILHO, E. X. F.; KADOWAKI, M. K.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. GH11 xylanase from *Aspergillus tamaritii* Kita: Purification by one-step chromatography and xylooligosaccharides hydrolysis monitored in real-time by mass spectrometry. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 291-299, 2018.

HILZ, H. Characterization of cell wall polysaccharides in bilberries and black currants. Doctoral Thesis, Wageningen University, 2007.

IBARRA-DÍAZ, N.; CASTAÑÓN-RODRÍGUEZ, J. F.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, J.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Optimization of peroxide-alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of barley straw (*Hordeum vulgare* L.) to produce fermentable sugars using a Box–Behnken design. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2020.

JOHN, M.; SCHMIDT, J. Xylanases and β -xylosidase of *Trichoderma lignorum*. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 662-671, 1988.

JORDAN, D. B.; WAGSCHAL, K.; GRIGORESCU, A. A.; BRAKER, J. D. Highly active β -xylosidases of glycoside hydrolase family 43 operating on natural and artificial substrates. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, p. 4415-4428, 2013.

KIM, D. H.; PARK, H. M.; JUNG, Y. H.; SUKYAI, P.; KIM, K. H. Pretreatment and enzymatic saccharification of oak at high solids loadings to obtain high titers and high yields of sugars. **Bioresource Technology**, v. 284, p. 391-397, 2019.

KOUSAR, S.; MUSTAFA, G.; JAMIL, A. Microbial Xylosidases: Production and Biochemical Characterization. **Pakistan Journal of Life and Social Sciences**, v. 11, n. 2, p. 85-95, 2013.

KRAUS, J. E. et al. A Célula Vegetal. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. (Eds.). **Anatomia Vegetal**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2012. p. 31-84.

KUDDUS, M. Potential applications of microbial chitinase: recent development. **Biochemical and Cellular Archives**, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2014.

KUMAR, K. S.; MANIMARAN, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Production of β -xylanase by a *Thermomyces lanuginosus* MC 134 mutant on corn cobs and its application in biobleaching of bagasse pulp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 5, p. 494-498, 2009.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 449-467, 2012.

LYND, L. R.; WYMAN, C. E.; GERNGROSS, T. U. Biocommodity engineering. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 777-793, 1999.

MAHMOOD, S.; RAHMAN, S. Production and Partial Characterization of Extracellular α -Amylase by *Trichoderma viride*. **Bangladesh Journal of Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 99-103, 2008.

MAHMOUD, K. F.; ABO-ELMAGD, H. I.; HOUSSEINY, M. M. Micro- and nano-capsulated fungal pectinase with outstanding capabilities of eliminating turbidity in freshly produced juice. **Food Science and Technology International**, v. 24, n. 4, p. 330-340, 2018.

MANISHA; YADAV, S. K. Technological advances and applications of hydrolytic enzymes for valorization of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1727-1739, 2017.

MARTINS, D. A. B.; PRADO, H. F. A.; LEITE, R. S. R.; FERREIRA, H.; MORETTI, M. M. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production. In: Kumar, S. (Ed). *Integrated Waste Management - Volume II*: Intech, 2011, p. 319-361.

MATSUO, M.; YASUI, T. Purification and some properties of β -Xylosidase from *Trichoderma viride*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 1845-1852, 1984.

McILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, p. 183-186, 1921.

McKELVEY, S. M.; MURPHY, R. A. (2017). Biotechnological Use of Fungal Enzymes. In: KAVANAGH, K. (Ed.). **Fungi: Biology and Applications**. 3 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2017. p. 201-225.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 424-426, 1959.

MORAES, S. L.; MASSOLA, C. P.; SACCOCCIO, E. M.; SILVA, D. P.; GUIMARÃES, Y. B. T. Brazilian scenario of production and use of densified biomass. **Revista IPT**, v. 1, n. 4, 2017.

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**. InTech, 2013. Cap. 10, p. 251-276. ISBN 978-953-51-1119-1

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, I. C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 124-129, 2008.

NADEEM, H.; RASHID, M. H.; SIDDIQUE, M. H.; AZEEM, F.; MUZAMMIL, S.; JAVED, M. R.; ALI, M. A.; RASUL, I.; RIAZ, M. Microbial invertases: a review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1202-1210, 2015.

NASCIMENTO, G. C.; BATISTA, R. D.; SANTOS, C. C. A. A.; SILVA, E. M.; PAULA, F. C.; MENDES, D. B.; OLIVEIRA, D. P.; ALMEIDA, A. F. β -Fructofuranosidase and β -D-Fructosyltransferase from New *Aspergillus carbonarius* PC-4 strain isolated from canned peach syrup: effect of carbon and nitrogen sources on enzyme production. **The Scientific World Journal**, v. 2019, Article 6956202, p. 1-13, 2019.

NUTONGKAEW, T.; PRASERTSAN, P.; O-THONG, S.; CHANTHONG, S.; SUYOTHA, W. Improved methane production using lignocellulolytic enzymes from *Trichoderma koningiopsis* TM3 through co-digestion of palm oil mill effluent and oil palm trunk residues. **Waste and Biomass Valorization**, 2019.

OKAZAKI, M.; FUJIKAWA, S.; MATSUMOTO, N. Effects of xylo-oligosaccharides on growth of bifidobacteria. **Bifidobacteria and Microflora**, v. 9, p. 77-86, 1990.

OZCAN, O.; YILDIRIM, R. M.; TOKER, O. S.; AKBAS, N.; OZULKU, G.; YAMAN, M. The effect of invertase concentration on quality parameters of fondant. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p. 4242-4250, 2019.

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

PARK, J. K.; RO, H. S.; KIM, H. S. A new biosensor for specific determination of sucrose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* and invertase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 217-223, 1991.

PEREIRA SCARPA, J. D. C.; MARQUES, N. P.; MONTEIRO, D. A.; MARTINS, G. M.; PAULA, A. V.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; GOMES, E.; BOCCHINI, D. A. Saccharification of pretreated sugarcane bagasse using enzymes solution from *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 and cellulosic ethanol production. **Industrial Crops & Products**, v. 141, 2019.

PHADTARE, P.; JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T. Recombinant thermo-alkali-stable endoglucanase of *Myceliophora thermophila* BJA (rMt-egl): Biochemical characteristics and applicability in enzymatic saccharification of agro-residues. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 107-116, 2017.

PLESSIS, I. L.; DRUZHININA, I. S.; ATANASOVA, L.; YARDEN, O.; JACOBS, K. The diversity of *Trichoderma* species from soil in South Africa with five new additions. **Mycologia**, v. 110, n. 3, p. 559-583, 2018.

POMMER, V.; RASBOLD, L. M.; BITTENCOURT, J. W. F.; MALLER, A.; KADOWAKI, M. K. Avaliação de fontes alternativas de carbono na produção de quitinase extracelular por fungos filamentosos. In: OLIVEIRA, J. M. B. (Ed.). **Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza 2**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. p. 223-230.

PRASAD, S.; KUMAR, S.; YADAV, K. K.; CHOUDHRY, J.; KAMYAB, H.; BACH, Q.; SHEETAL, K. R.; KANNOJIYA, S.; GUPTA, N. Screening and evaluation of cellulolytic fungal strains for saccharification and bioethanol production from rice residue. **Energy**, v. 190, Article 116422, 2020.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; FOLCH-MALLOL, J. L. Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars. In: **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**. InTech, 2013. Cap. 6, p. 119-155. ISBN 978-953-51-1119-1

RAMOS, L. P.; NAZHAD, M. M.; SADDLER, J. N. Effect of enzymatic hydrolysis on the morphology and fine structure of pretreated cellulosic residues. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 821-831, 1993.

RAUTENGARTEN, C.; HEAZLEWOOD, J. L.; EBERT, B. Profiling cell wall monosaccharides and nucleotide-sugars from plants. **Current Protocols in Plant Biology**, v. 4, p. 1-18, 2019.

ROHMAN, A.; DIJKSTRA, B. W.; PUSPANINGSIH, N. N. T. β -Xylosidases: Structural Diversity, Catalytic Mechanism, and Inhibition by Monosaccharides. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, 2019.

SAHA, S. P.; GHOSH, S. Optimization of xylanase production by *Penicillium citrinum* xym2 and application in saccharification of agro-residues. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 188-196, 2014.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: Systematics, the Sexual State, and Ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195-206, 2006.

SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; LU, B. S.; PETRINI, O.; SCHROERS, H. J.; DRUZHININA, I. S. The *Trichoderma koningii* aggregate species. **Studies in Mycology**, v. 56, p. 67-133, 2006.

SAMUELS, G. J.; PETRINI, O.; KÜHLS, K.; LIECKFELDT, E.; KUBICEK, C.P. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. **Studies in Mycology**, v. 41, p. 1-54, 1998.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2689-2694, 2005.

SHARMA, M.; KUMAR, A. Xylanases: an overview. **British Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p.1-28, 2013.

SHOKRKAR, H.; EBRAHIMI, S.; ZAMANI, M. Bioethanol production from acidic and enzymatic hydrolysates of mixed microalgae culture. **Fuel**, v. 200, p. 380-386, 2017.

SILVA, R. N.; STEINDORFF, A. S.; MONTEIRO, V. N. Metabolic diversity of *Trichoderma*. In: **Biotechnology and Biology of Trichoderma**. Newnes, 2014. Cap. 27, p. 363-376. ISBN: 978-0-444-59576-8

SILVA, M. O. M. B.; BISPO, D. F.; PAGANO, R. L.; SILVA, A. S.; SANTOS, E. J.; SILVA, F. Isolation of microorganisms and lipase production study using agricultural residues. **Scientia Plena**, v. 12, n. 5, p. 1-9, 2016.

SILVA, L. A. O.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 307-313, 2015.

SINGH, G.; VERMA, A. K.; KUMAR, V. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. **3 Biotech**, v. 6, p. 1-14, 2016.

TAN, L. U. L.; MAYERS, P.; ILLING, M.; SADDLER, J. N. The copurification of P-glucosidase, P-xylosidase, and 1,3-P-glucanase in two separate enzyme complexes isolated from *Trichoderma harzianum* E58. **Biochemistry and cell biology**, v. 65, p. 822-832, 1987.

TORRE, C. L. D.; KADOWAKI, M. K. Thermostable xylanase from thermophilic fungi: Biochemical properties and industrial applications. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 2, p. 28-37, 2017.

UDAY, U. S. P.; CHOUDHURY, P.; BANDYOPADHYAY, T. K.; BHUNIA, B. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 1041-1054, 2016.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

VORAGEN, A. G. J.; COENE, G. J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Struct Chem**, v. 20, p. 263-275, 2009.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: INNIS, M.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.; WHITE, T. (Ed.) **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Cambridge: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WIERZBICKI, M. P.; CHRISTIE, N.; PINARD, D.; MANSFIELD, S. D.; MIZRACHI, E.; MYBURG, A. A. A systems genetics analysis in *Eucalyptus* reveals coordination of metabolic pathways associated with xylan modification in wood-forming tissues. **New Phytologist**, 2019a.

WIERZBICKI, M. P.; MALONEY, V.; MIZRACHI, E.; MYBURG, A. A. Xylan in the middle: Understanding xylan biosynthesis and its metabolic dependencies toward improving wood fiber for industrial processing. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1-29, 2019b.

WISEMAN, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. Chichester: Ltd John Wiley & Sons, editors, 1975. 148p. ISBN 10: 0470956178

WONGWISANSRI, S.; PROMDONKOY, P.; MATETAVIPAREE, P.; ROONGSAWANG, N.; EURWILAICHITR, L.; TANAPONGPIPAT, S. High-level production of thermotolerant b-xylosidase of *Aspergillus* sp. BCC125 in *Pichia pastoris*: Characterization and its application in ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 410-413, 2013.

XIMENES, F. A.; SILVEIRA, F. Q. P.; FILHO, E. X. P. Production of beta-xylosidase activity by *Trichoderma harzianum* strains. **Current Microbiology**, v. 33, p. 71-77, 1996.

XU, C.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; GUO, Y.; XU, H.; XU, J.; WANG, Z. Enhancement of high-solids enzymatic hydrolysis efficiency of alkali pretreated sugarcane bagasse at low cellulase dosage by fed-batch strategy based on optimized accessory enzymes and additives. **Bioresource Technology**, v. 292, 2019.

YALÇIN, E.; ÇELİK, S.; AKAR, T.; SAYIM, I.; KÖKSEL, H. Effects of genotype and environment on β -glucan and dietary fiber contents of hull-less barleys grown in Turkey. **Food Chemistry**, v. 101, p. 171-176, 2007.

YAN, Q.; FONG, S. S. Cloning and characterization of a chitinase from *Thermobifida fusca* reveals Tfu_0580 as a thermostable and acidic endochitinase. **Biotechnology Reports**, v. 19, p. 1-8, 2018.

YE, Y.; LI, X.; ZHAO, J. Production and characteristics of a novel xylose- and Alkali-tolerant GH 43 β -xylosidase from *Penicillium oxalicum* for promoting hemicellulose degradation. **Scientific reports**, v. 7, 2017.

YUN, S. I.; JEONG, C. S.; CHUNG, D. K.; CHOI, H. S. Purification and some properties of a beta-glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 9, p. 2028-2032, 2001.

ZHANG, Z; LIU, J. L.; LAN, J. Y.; DUAN, C. J.; MA, Q. S.; FENG, J. X. Predominance of *Trichoderma* and *Penicillium* in cellulolytic aerobic filamentous fungi from subtropical and tropical forests in China, and their use in finding highly efficient β -glucosidase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 107, p. 1-14, 2014.