



Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Pós Graduação em Biologia Microbiana

**CARACTERIZAÇÃO DE MANANASE PRODUZIDA POR *Aspergillus*
*tamarii***

LUCAS SOUZA PIMENTA

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Coorientadora: Dra. Leonora Rios de Souza Moreira



Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Pós Graduação em Biologia Microbiana

LUCAS SOUZA PIMENTA

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Coorientadora: Dra. Leonora Rios de Souza Moreira

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre.

Brasília-DF, Fevereiro de 2020.

**CARACTERIZAÇÃO DE MANANASE PRODUZIDA POR *Aspergillus*
*tamarii***

LUCAS SOUZA PIMENTA

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luís Henrique Ferreira do Vale

Prof. Dr. Caio Oliveira Gorgulho Silva

Prof. Dr. Helder Andrey Rocha Gomes

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Coorientadora: Dra. Leonora Rios de Souza Moreira

Brasília-DF, Fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Émerson e Alessandra.

Por todo o incentivo aos estudos, desde o jardim de infância até a pós-graduação. Sou grato por todo carinho, amor, preocupação e por não deixarem nada me faltar. Agradeço pelos exemplos de trabalhadores que são, de honestidade e de humanidade. Espero um dia poder retribuir tudo isso.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Lethícia.

Por todos os momentos de felicidade, de companheirismo e irmandade.

À Gabriella.

Muito obrigado pelo amor e pela cumplicidade em todos os momentos felizes e tristes que já passamos. Não conseguiria fazer nada sem você ao meu lado, me motivando a seguir em frente. Obrigado pelas revisões neste trabalho, mesmo sem fazer ideia do que seja uma mananase. Sou muito grato por ter te conhecido.

Aos meus amigos de Brasília.

Pelos momentos de futebol, bar e resenha.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edivaldo Ximenes e coorientadora Dra. Leonora Rios.

Pelo acolhimento, paciência, puxões de orelha e por disponibilizarem todas as condições possíveis para a realização de um bom trabalho. Vocês são exemplos de que a ciência no nosso país possui excelentes profissionais, éticos e corretos. Obrigado por todo o conhecimento transmitido.

Aos colegas de Laboratório.

Agradeço aos colegas do laboratório de Enzimologia pelo companheirismo, cooperação e empatia. Aprendi que almoçar acompanhado é bem mais divertido. Sou muito grato por todos os ensinamentos, ajudas com métodos e técnicas. Agradeço em especial à Diandra, por todo o suporte que me ofereceu, toda paciência e solidariedade; aprendi muito com você. Também agradeço aos outros colegas do nosso grupo de pesquisa pela aceitação e boa vontade em ajudar.

Ao Dr. Luis do Vale e ao Dr. Caio Gorgulho.

Pelo conhecimento transmitido no decorrer do mestrado, e em especial pela ajuda com a parte estatística do trabalho.

À empresa Filhos e ao Instituto Proeza.

Por terem me apresentado a profissão de professor, acrescentando ao mestrado experiências gratificantes. Agradeço pela confiança e por me fazerem esquecer a escassez de bolsa de mestrado.

À técnica de laboratório Marísia.

Pela boa vontade, cooperação e pelo cafezinho.

Ao Sr. Antônio.

Pela manutenção do nosso local de trabalho sempre limpo e organizado. Obrigado pelo bom humor e otimismo que transmite.

APOIO FINANCEIRO

Esta pesquisa foi desenvolvida com o apoio financeiro do CNPq e FAPDF.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. BIOMASSA E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	1
1.1.1. BAGAÇO DE CANA.....	2
1.1.2. CASCA DO GRÃO DE SOJA.....	2
1.1.3. PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	3
1.2. PAREDE CELULAR VEGETAL.....	5
1.2.1. CELULOSE.....	6
1.2.2. HEMICELULOSE.....	7
1.2.3. MANANA.....	7
1.2.4. PECTINA.....	10
1.2.5. LIGNINA.....	11
1.3. ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS.....	12
1.3.1. CELULASES.....	12
1.3.2. HEMICELULASES.....	14
1.3.3. MANANASES.....	15
1.3.3.1 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE MANANASES.....	18
1.3.4. PECTINASES.....	21
1.3.5. LIGNINASES.....	22

1.4. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS.....	23
1.4.1. O GÊNERO <i>Aspergillus</i>	23
1.4.2. O FUNGO FILAMENTOSO <i>Aspergillus tamarii</i>	25
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. MICRORGANISMO.....	27
4.2. BIOMASSA.....	28
4.3. CULTIVO SUBMERSO DE <i>A. tamarii</i>	28
4.4. ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA E QUANTIFICAÇÃO PROTEICA.....	29
4.5. ULTRAFILTRAÇÃO.....	30
4.6. CROMATOGRAFIAS.....	30
4.7. ELETROFORESE E ZIMOGRAMA.....	31
4.8. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	31
4.8.1. EFEITO DA TEMPERATURA.....	31
4.8.2. EFEITO DO pH.....	32
4.8.3. AVALIAÇÃO DE TERMOESTABILIDADE.....	32
4.8.4. EFEITO DE ÍONS METÁLICOS E EDTA.....	32
4.8.5. EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	32
4.9. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	33
4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1. CULTIVO EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E EM CASCA DE SOJA.....	34
5.2. CURVA DE INDUÇÃO ENZIMÁTICA.....	36
5.3. ULTRAFILTRAÇÃO.....	38
5.4. CROMATOGRAFIAS.....	39

5.5. ELETROFORESE E ZIMOGRAMA.....	42
5.6. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	44
5.6.1. EFEITO DA TEMPERATURA E pH.....	44
5.6.2. TERMOESTABILIDADE.....	47
5.6.3. EFEITO DE ÍONS METÁLICOS E EDTA NA ATIVIDADE DE MANANASE.....	50
5.6.4. EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA ATIVIDADE DE MANANASE.....	52
5.6.5. CARACTERIZAÇÕES DE MANANASES NA LITERATURA.....	54
5.7. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	56
6. CONCLUSÕES.....	58
7. PERSPECTIVAS.....	59
8. REFERÊNCIAS.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cana-de-açúcar e seus resíduos mais comuns..	2
Figura 2: Casca do grão de soja obtida após extração do embrião.....	3
Figura 3: Esquema de pré-tratamento em biomassa lignocelulósica.....	4
Figura 4: Estrutura de parede celular vegetal.....	5
Figura 5: Estrutura da celulose.....	6
Figura 6: Representação esquemática de diferentes polissacarídeos hemicelulósicos.	7
Figura 7: Diferentes estruturas de fibras de mananas.....	8
Figura 8: Estrutura de Homogalacturonana.....	10
Figura 9: Unidades estruturais básicas da lignina	11
Figura 10: Celobiohidrolase, Endoglicanase e β -glicosidase.....	12
Figura 11: Estrutura de polímero de xilana	15
Figura 12: Hidrólise por retenção em mananases (Mhlongo et al., 2014).	16
Figura 13: Polímeros de manana e enzimas utilizadas em suas degradações.	17
Figura 14: Local de ação de pectinases	21
Figura 15: Espécies do gênero <i>Aspergillus</i>	24
Figura 16: Fluxograma ilustrando etapas do trabalho realizado.	27
Figura 17: Diferenças de produção de enzimas lignocelulolíticas	34

Figura 18: Curva de indução enzimática	36
Figura 19: Perfil de produção enzimática de extrato bruto	37
Figura 20: Ultrafiltração	38
Figura 21: Perfil cromatográfico de extrato bruto concentrado aplicado em coluna de exclusão molecular Sephadex G-50. O tampão utilizado foi o fosfato de sódio, a 50 mM e pH7,0.....	40
Figura 22: Sephadex G-75.....	41
Figura 23: Sephacryl S-100.....	41
Figura 24: Géis de eletroforese SDS-PAGE e zimograma.....	43
Figura 25: Efeito da temperatura.....	44
Figura 26: Efeito da variação de pH.....	45
Figura 27: Termoestabilidade do extrato bruto.	48
Figura 28: Termoestabilidade da fração de G-75.	49
Figura 29: Hidrólise Enzimática utilizando casca de soja como substrato.	56
Figura 30: Hidrólise enzimática utilizando manana como substrato.	57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Composições de polímeros de parede celular em casca do grão de soja por diferentes referências.....35
- Tabela 2:** Efeito de íons metálicos e EDTA sob a atividade enzimática de mananase em duas concentrações diferentes: 1 mM e 10 mM. Desvios padrões estão representados ao lado dos valores de atividade relativa.51
- Tabela 3:** efeito de compostos fenólicos sob as atividades enzimáticas de mananase do Extrato Bruto e da fração de G-75. Desvios padrões estão representados ao lado dos valores de atividade relativa.53
- Tabela 4:** Resultados de caracterizações de mananase purificadas ou semipurificadas. A utilização de traços significa que o trabalho não abordou a característica relacionada.55

LISTA DE ABREVIATURAS

CB: Celobiohidrolase

CMCASE: Carboximetilcelulase

C50: Fração concentrada em membrana de 50 kDa

DNS: Ácido 3,5-dinitro-salicílico

EB: Extrato Bruto

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EG: Endoglicanase

G-75: Coluna Sephadex G-75 e/ou Fração semipurificada em coluna Sephadex G-75.

LPMO: Monooxigenases líticas de polissacarídeos

PI: Ponto isoelétrico

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TCA: Ácido tricloroacético

UI: Unidade Internacional

U50: Fração ultrafiltrada em membrana de 50 kDa

RESUMO

A casca de soja é um resíduo agroindustrial abundante no Brasil, que é o segundo maior produtor do grão no mundo. Esse resíduo foi utilizado como fonte de carbono para o cultivo do fungo filamentosso *Aspergillus tamaraii*. O objetivo do cultivo foi produzir e caracterizar mananase, enzima que possui diversas aplicações industriais em processos que utilizam biomassa vegetal para obter produtos de valor agregado. As mananases também são aplicadas em processos da indústria de ração animal, clareamento de suco de frutas e branqueamento de papel, por exemplo. Neste trabalho, a mananase produzida por *A. tamaraii* em cultivo submerso na presença de casca de soja foi semi-purificada, caracterizada e submetida a hidrólise enzimática. O cultivo do fungo em meio submerso na presença de casca de soja teve como o melhor tempo de cultivo o período de 4 dias. Decorrido esse período, o meio foi filtrado, obtendo-se o extrato bruto. Esse extrato enzimático passou por etapa de ultrafiltração em membrana de 50 kDa, apresentando 4,5 UI/mL de atividade enzimática de mananase no concentrado. Em seguida, o extrato bruto concentrado foi aplicado em colunas cromatográficas de exclusão molecular, encontrando maior nível de purificação em coluna Sephadex G-75. As temperaturas de maiores atividades das amostras enzimáticas foram 60°C e 50°C, e as enzimas mantiveram suas atividades na faixa de pH 4,0 a 9,0. A termoestabilidade (meia vida) do extrato bruto foi de 6 dias na temperatura 50 °C. O íon metálico que mais inibiu a atividade de mananase foi o Ferro, e os compostos fenólicos de maiores inibições foram ácido cinâmico e vanilina. A hidrólise enzimática em casca de soja utilizando o extrato bruto liberou 0,23 ug/mL de açúcares redutores em 24h. A hidrólise de manana ocorreu utilizando extrato bruto e a fração de Sephadex G-75, com maior liberação de açúcar redutor (3,8 ug/mL, pelo extrato bruto) no período de 24h.

Palavras-chave: *Aspergillus tamaraii*, casca de soja, mananase

ABSTRACT

The soybean hull is an abundant agroindustrial residue in Brazil, which is the second largest producer of grains in the world. This residue was used as a carbon source for the cultivation of filamentous fungi *Aspergillus tamaritii*. The purpose of cultivation was to produce and characterize mannanase, an enzyme that has several industrial applications in processes that use vegetable biomass to obtain value-added products. Mannanases are also applied in the animal feed industry, fruit juice bleaching and paper bleaching, for example. In this work, the mannanase produced by *A. tamaritii* in cultivation submerged in the presence of soybean hull was semi-purified, characterized and submitted to enzymatic hydrolysis. The cultivation of the fungus in the presence of soybean hull has the best cultivation time in 4 days. After this period, the medium was filtered, obtaining the crude extract. This enzymatic extract went through an ultrafiltration step in the 50 kDa membrane, with 4.5 IU / mL enzyme activity of mannanase in the concentrated. Then, the concentrated crude extract was applied to the chromatographic columns of molecular exclusion, finding a higher level of purification in the column Sephadex G-75. The highest activity temperatures were 60 ° C and 50 ° C, and the enzymes maintain their activities in the pH range of 4.0 to 9.0. The thermostability (half-life) of the crude extract was 6 days at a temperature of 50 ° C. The metal ion that most inhibited the mannanase activity was Iron, and the phenolic compounds with the greatest inhibitions were cinnamic acid and vanillin. Enzymatic hydrolysis in soybean hull using the crude extract released 0.23 µg / mL of reducing sugars in 24 hours. The hydrolysis in mannan occurred using crude extract and the fraction of Sephadex G-75, with greater release of reducing sugar (3.8 ug / mL, by the crude extract) in the period of 24h.

Keywords: *Aspergillus tamaritii*, soybean hull, mannanase

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com o esgotamento de recursos energéticos não renováveis e as mudanças climáticas relacionadas às emissões de gases na atmosfera pelo homem têm resultado em um crescente interesse global em utilização de energias oriundas de matérias primas renováveis como a biomassa vegetal (Doherty *et al.*, 2011). Essa biomassa pode ser encontrada em resíduos agroindustriais de baixo custo e utilizada em processos de obtenção de energia e produtos de valor agregado (Oliveira *et al.*, 2017).

A biomassa vegetal, ou lignocelulósica, está relacionada à parede celular vegetal, que é composta por polímeros de celulose, hemicelulose, pectina e lignina. Vários vegetais podem ser fontes de biomassa, desde herbáceas até plantas lenhosas (Bhowmick *et al.*, 2018). Entretanto, a produção de bioprodutos lignocelulósicos enfrenta o desafio tecnológico de superar a recalcitrância da parede celular vegetal. Essa recalcitrância, que dificulta a despolimerização da lignocelulose, pode ser atribuída a fatores morfológicos e fisiológicos como a concentração de lignina, grau de cristalinidade, grau de polimerização, revestimento hemicelulósico e acessibilidade às fibras interiores (Obeng *et al.*, 2017).

A utilização de biomassa vegetal, que representa o recurso renovável mais abundante do planeta (Ochoa-Villarreal *et al.*, 2012), demanda conhecimentos a respeito da composição da parede celular vegetal, além de demandar conhecimentos sobre enzimas lignocelulolíticas e sobre os microrganismos produtores dessas enzimas. Estudos focados nesses aspectos permitem a implementação de diversas aplicações biotecnológicas.

1.1. BIOMASSA E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Resíduos da agroindústria brasileira são abundantes devido ao contexto econômico histórico do Brasil, um país que sempre se destacou por sua produção agrícola. O agronegócio brasileiro, por meio de inovações tecnológicas, tem alcançado uma alta produtividade, principalmente no setor de grãos, como a soja (Filho, 2011). A agroindústria possui participação em cerca de 5,9% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro e o setor de grãos representa uma das maiores safras do mundo: em 2015/2016 alcançou 195,6 milhões de toneladas. Estima-se que em dez anos a safra do setor de grãos deve chegar a 255 milhões de toneladas (Embrapa, 2019).

Resíduos agroindustriais são fontes de biomassa vegetal de baixo custo, por serem tratados muitas vezes como lixo, mas em biorrefinarias podem ser utilizados como matéria

prima e também como fontes de carbono para crescimento microbiano, de acordo com o interesse, como para a produção de enzimas lignocelulolíticas (Siqueira *et al.*, 2010).

1.1.1. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) (fig. 1) é uma planta monocotiledônea pertencente à família Poaceae e de extrema importância econômica em vários países, sendo a matéria prima principal para a produção de açúcar e álcool de primeira geração (Río, del *et al.*, 2015).

O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo orgânico fibroso que se acumula após a retirada do caldo de açúcar e é considerado uma possível fonte de etanol de segunda geração em países em desenvolvimento como Brasil e Índia. Sua composição gira em torno de 42% de celulose, 22% de lignina, e 28% de hemicelulose dentre outros conteúdos (Siqueira *et al.*, 2010). Segundo a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento, 2019), a produção de cana-de-açúcar no Brasil foi de 620,4 milhões de toneladas, com uma área plantada de 8,6 milhões de hectares na safra 2018/2019. As usinas de açúcar geram aproximadamente 270 a 280 kg de bagaço para cada tonelada de cana-de-açúcar utilizada (Soccol *et al.*, 2010). Essa proporção permite chegar ao valor de 170,6 milhões de toneladas de bagaço na última safra.



Figura 1: Cana-de-açúcar e seus resíduos mais comuns: bagaço e palha. Adaptado de Río, del *et al.*, (2015).

1.1.2. CASCA DO GRÃO DE SOJA

A soja (*Glycine max*) é uma espécie de leguminosa e está entre as principais fontes de proteína e óleo do mundo (Nawaz *et al.*, 2017). No Brasil, a produção do grão de soja abrange cerca de 35,87 milhões hectares de área plantada e uma produtividade de 3,2 toneladas por hectare, o que representa uma produção de aproximadamente 115 milhões de toneladas no país

durante a safra 2018/2019 (Conab, 2019). A soja cultivada atualmente possui ancestrais da China, mais especificamente ao longo do rio Yangtse. A planta foi domesticada e melhorada por cientistas e agricultores, tornando-se um produto estratégico para o Brasil já em meados dos anos 60 (Embrapa, 2019).

Industrialmente, a casca da soja é separada do grão (embrião), formando um resíduo que pode ser utilizado em rações animais, por conter apenas cerca de 2,5% de lignina (quantidade menor que em outros resíduos como o bagaço de cana) e um conteúdo de proteína por volta de 12%, além de fibras de celulose e hemicelulose (Célia *et al.*, 2012). Por possuir esses polissacarídeos, processos hidrolíticos de sacarificação que liberem açúcares fermentescíveis são potencialmente disponíveis para a bioconversão em bioetanol e outros produtos químicos como o xilitol (Cassales *et al.*, 2011). A casca do grão de soja (fig. 2) também pode ser utilizada para crescimento microbiano e produção de enzimas (Infante de Marco *et al.*, 2015).



Figura 2: Casca do grão de soja obtida após extração do embrião. Extraído de (Tapia-Blácido *et al.*, 2017).

1.1.3. PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Um dos processos mais utilizados para o aproveitamento de biomassa lignocelulósica é o pré-tratamento desse material vegetal. Devido às características da parede celular, esse material é bastante recalcitrante, o que reduz a eficiência do processo. Tendo em vista que a lignina está ligada à celulose e à hemicelulose, busca-se removê-la ao máximo, visando uma ampliação da área de superfície destinada à hidrólise enzimática, conservando os polissacarídeos de interesse (fig. 3). Esse é um dos principais objetivos do pré-tratamento (Saratale *et al.*, 2008; Sivagurunathan *et al.*, 2017).

Muitos tipos de pré-tratamentos de biomassa lignocelulósica foram desenvolvidos e podem ser classificados em quatro categorias: físico-químico, físico, químico e biológico. Devido às diferenças entre os materiais lignocelulósicos, não existe um método de pré-tratamento universal (Capolupo e Faraco, 2016). Além de terem o objetivo de separar a lignina da celulose e da hemicelulose, pré-tratamentos auxiliam na redução da cristalinidade da celulose, melhorando a formação de açúcares menores (Saratale *et al.*, 2008).

A biomassa lignocelulósica pode ser pré-tratada através da metodologia de explosão à vapor, caracterizando um método de pré-tratamento a vapor que utiliza alta temperatura e alta pressão para afrouxar as fibras do material. Esse método é efetivo e não prejudicial ao meio ambiente, resultando em uma amostra mais suscetível ao ataque de enzimas (Debiagi *et al.*, 2019). Outro método de pré-tratamento físico-químico que pode ser aplicado é o LHW (liquid hot water) que utiliza a água em seu estado líquido em alta temperatura e alta pressão, podendo ser realizado em autoclave. É um método eficiente e bastante usado para pré-tratamento de biomassa lignocelulósica (Capolupo e Faraco, 2016).

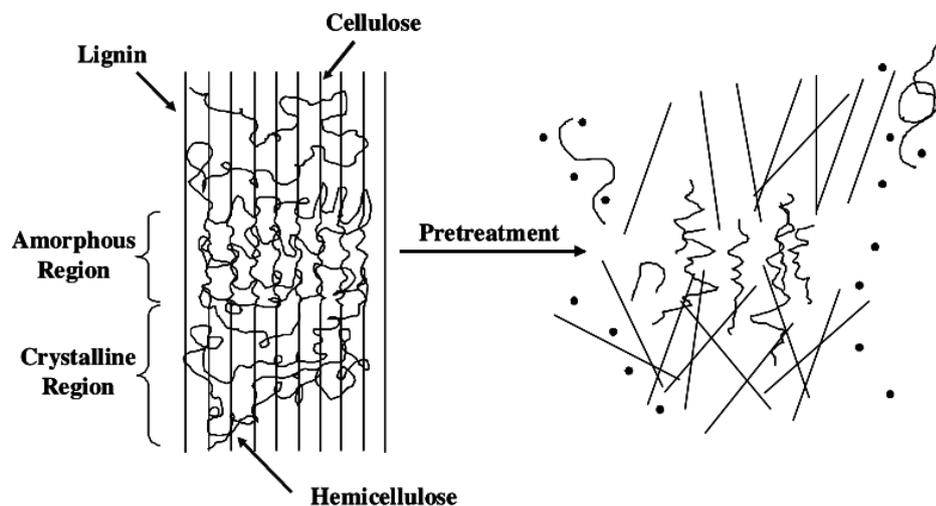


Figura 3: Esquema de pré-tratamento em biomassa lignocelulósica e seu efeito de afrouxar as ligações entre lignina, celulose e hemicelulose (Saratale *et al.*, 2008).

Após tratamento em vapor, o material também pode ser submetido à processos de moagem, com intuito de aumentar a superfície de contato, sendo muito comum em resíduos como bagaço de cana, palha de arroz e casca de soja (Silva, Da *et al.*, 2010).

1.2. PAREDE CELULAR VEGETAL

A parede celular vegetal pode ser classificada em primária ou secundária, de acordo com a fase de vida ou função da célula. Enquanto as células estão crescendo, elas são rodeadas pela parede celular primária, formada principalmente por polímeros de hemicelulose, pectina e relativamente pouca quantidade de celulose. Esses polímeros são embebidos em um teor de água que varia de 60% a 70%. Quando o alongamento cessa, uma parede secundária é depositada em alguns tipos de células (fig. 4). As paredes secundárias também são compostas por polissacarídeos e contêm menores quantidades de pectina, possuindo um teor de água bem reduzido, por volta de 5%, devido a presença de lignina (Caffall e Mohnen, 2009; Loqué *et al.*, 2015).

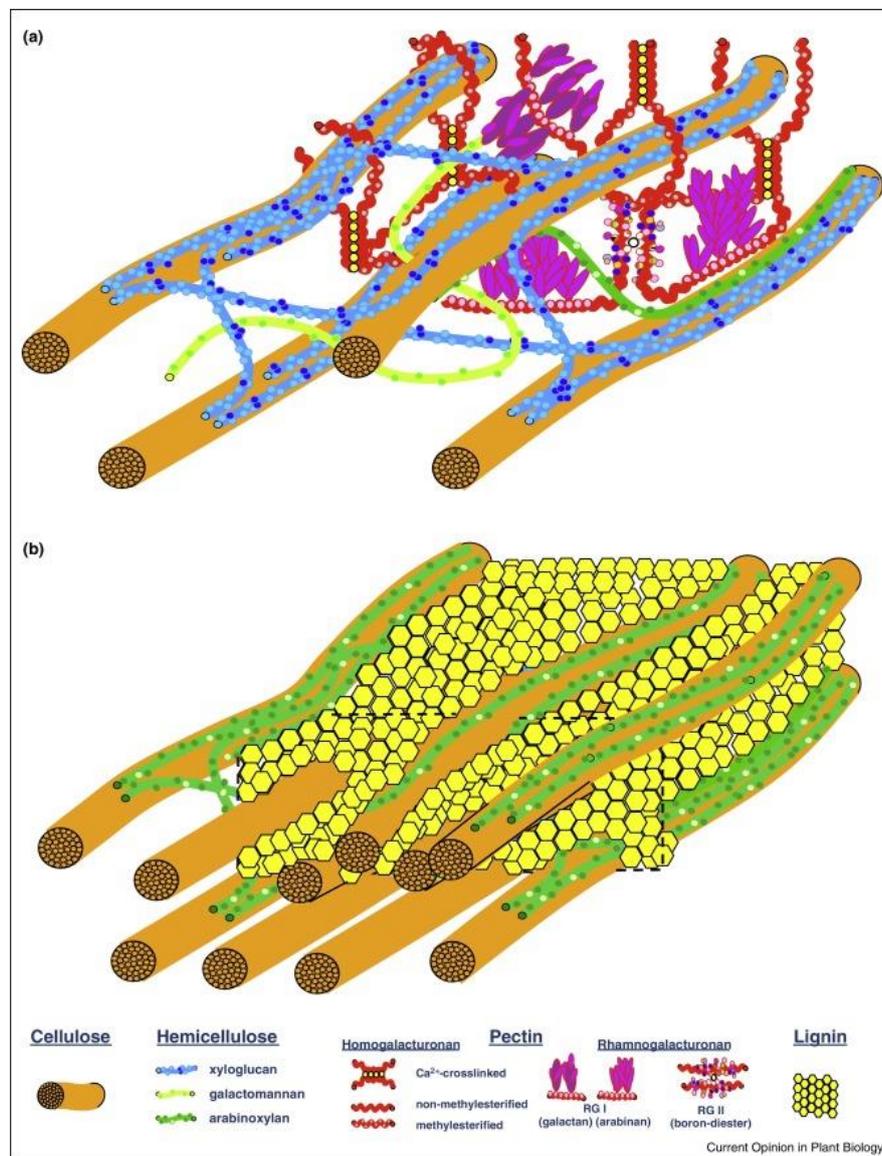


Figura 4: Estrutura de parede celular vegetal. Em a), parede celular primária, aquosa, rica em pectina e com menos fibras de celulose. Em b), parede celular secundária, lignificada, com maior quantidade de fibras de celulose (Loqué *et al.*, 2015).

1.2.1. CELULOSE

A celulose, que é o principal polímero da parede celular conferindo suporte à planta, é um polímero linear, não ramificado e insolúvel, composto por resíduos de β -(1,4)-D-Glicose associados com outras cadeias de celulose por ligações de hidrogênio e força de Van der Waals (Ochoa-Villarreal *et al.*, 2012). Cada resíduo de glicose é rotacionado 180° em relação ao próximo, formando então a unidade básica celobiose (fig. 5a). As fibras de celulose podem se arranjar de maneira ordenada e uniforme, formando a parte cristalina da celulose, mas também podem ser dispostas de modo aleatório e desorganizado, caracterizando uma região amorfa (fig.5b) (Beguin *et al.*, 1994).

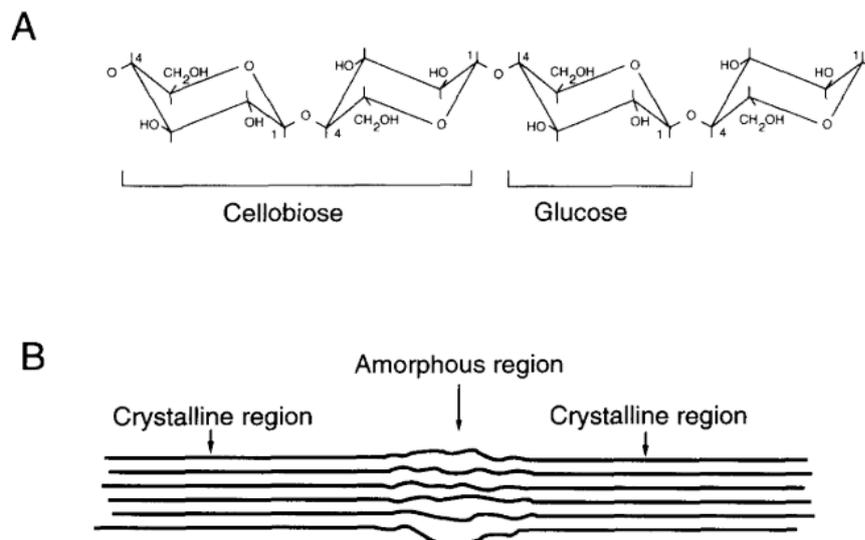


Figura 5: Estrutura da celulose. Em a), resíduos de glicose formando a celobiose, unidade básica da celulose. Em b), regiões cristalinas de celulose intervaladas por região amorfa (Beguin *et al.*, 1994).

A região cristalina da celulose possui muitos grupos hidroxila, que formam grandes quantidades de ligações de Hidrogênio. Essas ligações formam grandes redes que contribuem diretamente para a cristalinidade da estrutura (Chen, 2014).

A celulose se tornou uma matéria prima importante para indústria de papel, têxtil, química e de fibras; além de ser matéria prima para a produção de bioetanol.

1.2.2. HEMICELULOSE

A principal função da hemicelulose é interagir com outros polímeros estruturais de modo a garantir as propriedades físicas da parede celular vegetal. No entanto, a hemicelulose também pode ser utilizada na função de reserva energética em sementes (Scheller *et al.*, 2010). A hemicelulose é uma família de polissacarídeos que contêm a cadeia principal formada por resíduos, com ligações do tipo β -(1-4), de glicose, manose ou xilose. Esses polissacarídeos são denominados xiloglicanos, xilanas, mananas, galactomananas, glicomananas, galactoglicomananas e β -(1-3, 1-4) glicanos (fig. 6). O principal polímero hemicelulósico é o xiloglicano, que é encontrado na parede celular primária de várias plantas superiores (Costa *et al.*, 2016).

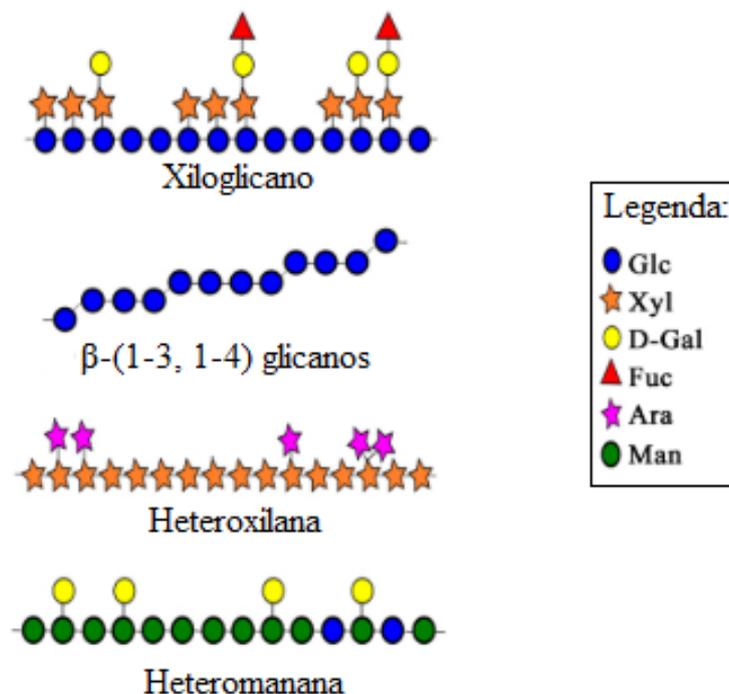


Figura 6: Representação esquemática de diferentes polissacarídeos hemicelulósicos (xiloglicano β -(1-3, 1-4) glicanos, heteroxilana e heteromanana. Extraído e modificado de Costa e Plazanet, 2016.

1.2.3. MANANA

Os componentes da família das mananas incluem a homomanana, galactomanana, glicomanana e galactoglicomanana. Resíduos de manose utilizam ligações do tipo β -(1-4) para formar a cadeia principal da homomanana (fig. 7a), mas, se essa cadeia principal possuir ramificações de galactose, unidas por meio de ligação α -(1-6), forma-se galactomanana (fig.

7b). A glicomanana possui a cadeia principal heterogênea, composta por resíduos de manose e glicose (fig. 7c). Se essa cadeia heterogênea possuir galactose em ramificações, configura-se a galactoglicomanana (Chen, 2014).

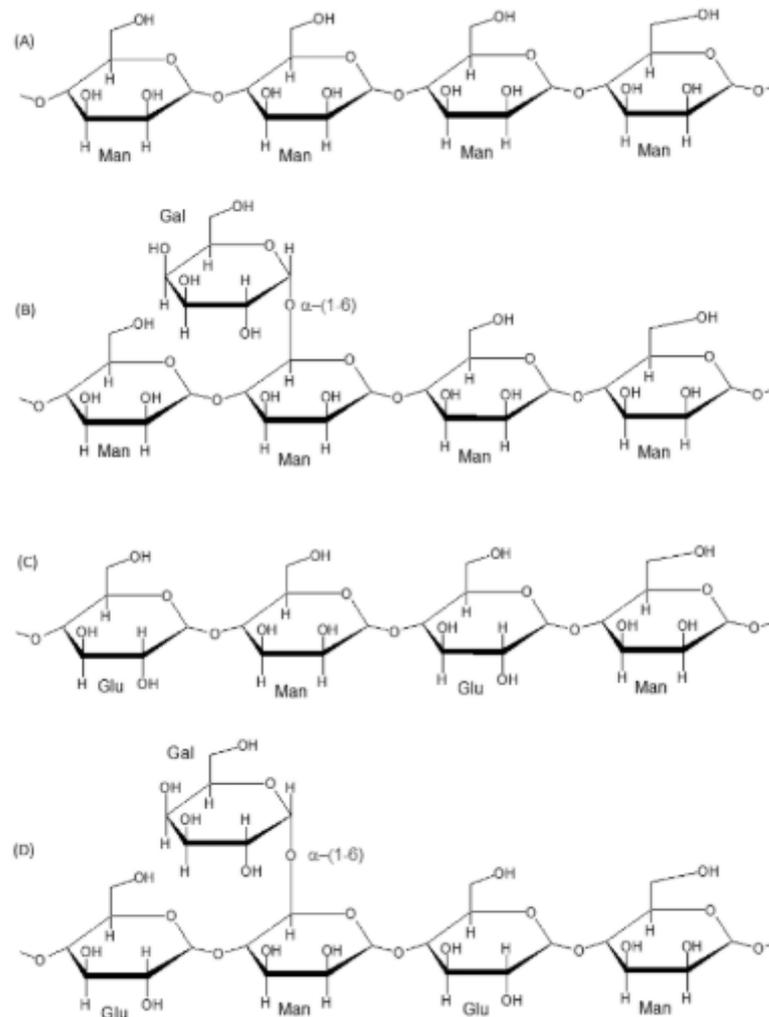


Figura 7: Diferentes estruturas de fibras de mananas. Em A), manana pura, ou homomannana, formada apenas por resíduos de manose. Em B), Galactomannana, um esqueleto de manose ligado de modo α -(1-6) com monômero de galactose. Em C), Glicomanana, cadeia principal composta por glicose e manose. Em D), cadeia principal formada por manose e glicose, e ligação a monômero de galactose, configurando uma galactoglicomanana. Extraído de Cruz, (2013).

Esses polímeros são encontrados em ligações cruzadas com fibras de celulose, quando desempenham função estrutural, mas também possuem função de carboidrato de reserva em diversas plantas. Na função de reserva energética, são encontradas na parede celular primária e

as fibras mais comuns são galactomananas, mananas (ambas em sementes) e glicomananas (em bulbos e tubérculos). Nessa disposição, esses carboidratos estão disponíveis para que embriões e brotos os degradem e metabolizem como fonte de energia (Schröder et al., 2009). Além das funções citadas acima, mananas também podem participar do crescimento e desenvolvimento de plantas como moléculas sinalizadoras (Moreira e Filho, 2008).

As mananas lineares podem participar de funções estruturais em diversas plantas (principalmente em sementes) como o café verde, nozes de marfim e coco, mas também são encontradas nas paredes celulares de alguma algas (Chauhan *et al.*, 2012). Algumas dessas homomananas apresentam propriedades terapêuticas e imunofarmacológicas, principalmente as mananas encontradas na planta babosa (Moreira e Filho, 2008).

Galactomananas são polímeros formados por manose e que possuem mais de 5% em peso de resíduos de galactose (Moreira e Filho, 2008). Essa taxa (manose : galactose) influencia na solubilidade em água dessas fibras. Galactomananas em sementes de feno grego são as mais solúveis na natureza, apresentando proporção de 1:1, enquanto as mais usadas industrialmente, como goma de guar, goma de tara e goma de alfarroba, possuem taxas de 2:1, 3:1 e 3,5:1 respectivamente. Essas galactomananas podem, por exemplo, ser adicionadas a preparos de sorvete para reduzir o derretimento (Aulitto *et al.*, 2019).

Glicomananas são mais presentes em hemiceluloses de gimnospermas do que em angiospermas, onde apresentam apenas 3% a 5% de todo o total de material da parede celular. Já em madeiras de coníferas, constituem cerca de 50% da fração hemicelulósica. Dentre as aplicações de glicomananas, encontram-se a prevenção de doenças crônicas e a participação como agente de controle de peso (Moreira e Filho, 2008).

A galactoglicomanana possui a cadeia principal formada por resíduos de manose e glicose, contendo resíduos de galactose ligados em ambos (Moreira e Filho, 2008). Oligossacarídeos de galactoglicomanana já foram reportados no alívio do estresse de cádmio em *Arabidopsis thaliana* e também como agentes anti-fibróticos para a prevenção de lesão hepática e fibrose, quando extraídos da planta *Dendrobium huoshanense* (Srivastava e Kapoor, 2017a).

1.2.4. PECTINA

A pectina é um polissacarídeo presente principalmente na parede celular primária, possuindo estrutura complexa. Existem evidências que indicam algumas funções para a pectina, como crescimento da planta, desenvolvimento, defesa e composição da estrutura celular (Mohnen, 2008).

A classe estrutural dos polissacarídeos pécicos inclui homogalacturonana (HG), rhamnogalacturonanas I (RG-I), e rhamnogalacturonanas II (RG-II), sendo que xilanogalacturonana (XGA) e apiogalacturonana (AGA) são incluídas na classe por alguns autores. Todas essas moléculas possuem uma grande quantidade de ácidos galacturônicos que apresentam ligações do tipo α -(1-4) (Ochoa-Villarreal *et al.*, 2012; Zablackis *et al.*, 1990).

A homogalacturonana (fig. 8) é o polímero pécico mais abundante, sendo formado por uma cadeia linear de ácido galacturônico em que alguns grupos carboxila são metil esterificados (Ochoa-Villarreal *et al.*, 2012; Ridley *et al.*, 2001).

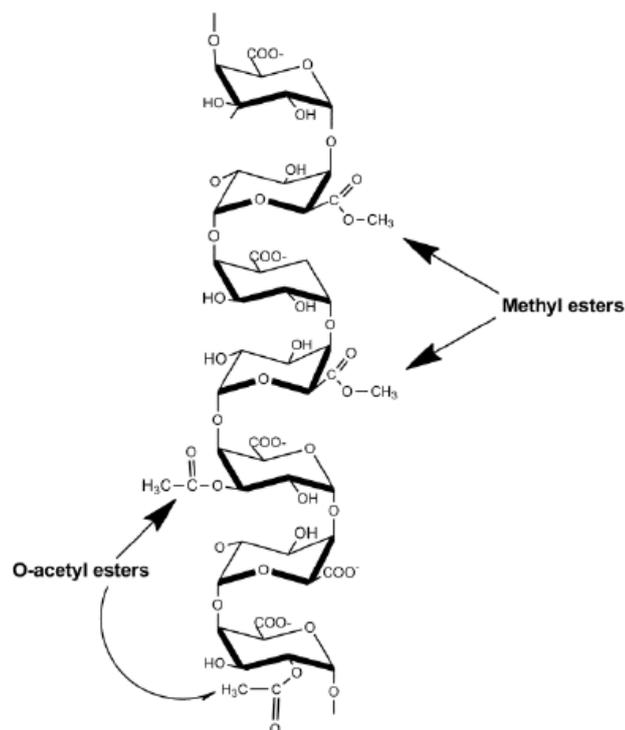


Figura 8: Estrutura de Homogalacturonana, configuração mais abundante em polímeros de pectina, evidenciando a esterificação de alguns resíduos de ácido galacturônico (Ridley *et al.*, 2001).

1.2.5. LIGNINA

A lignina é um complexo fenólico presente na parede celular secundária que possui função estrutural, impermeabilizante (devido à sua característica hidrofóbica) e de preservação da célula contra potenciais microrganismos invasores. A lignina também proporciona resistência a estresses oxidativos e aumenta a dureza da parede celular (Chen, 2014; Pérez *et al.*, 2002). Lignina é um fenilpropionato aromático que consiste em ligações de três monômeros de álcoois aromáticos que diferem no grau de metoxilação: álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool *p*-cumarílico (fig. 9). A quantidade e a composição das ligninas variam de acordo com a taxonomia do organismo, tipos de células e camadas individuais da parede celular. Fenômenos ambientais e de desenvolvimento também podem influenciar as disposições de lignina (Boerjan *et al.*, 2003; Costa e Plazanet, 2016).

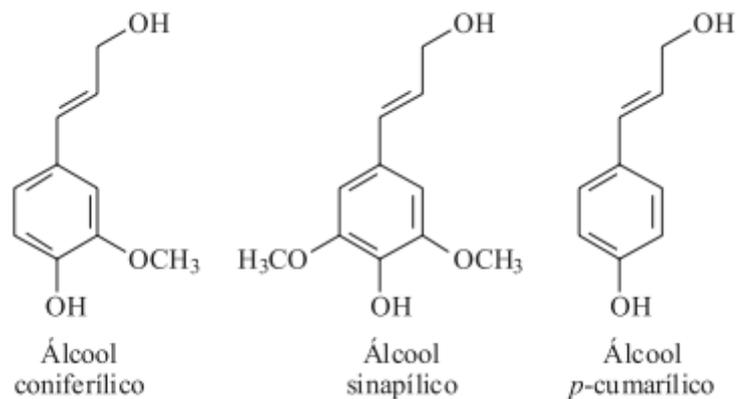


Figura 9: Unidades estruturais básicas da lignina (Barbosa *et al.*, 2008).

Por não ser fonte de açúcares fermentescíveis, sendo um composto polifenólico, a lignina é utilizada, de maneira diferente dos polissacarídeos, como fonte de calor e energia em processos biotecnológicos. A lignina também é utilizada na produção de químicos aromáticos, adesivos de fenol-formaldeído, espumas de vanilina e poliuretano (Paula, de *et al.*, 2019).

Quando a biomassa lignocelulósica é submetida à pré-tratamentos sua parte composta de lignina é frequentemente modificada, o que resulta em formação de compostos fenólicos simples e oligoméricos, dentre outras modificações decorrentes desses processos. Esses compostos fenólicos podem interferir de maneira inibitória nas atividades de enzimas hidrolíticas resultando em menores níveis de liberações de açúcares (Tejirian e Xu, 2011).

1.3. ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

Para se obter açúcares fermentescíveis é necessária a ação de enzimas, dentre outros fatores. É nesse contexto que a hidrólise enzimática da lignocelulose surge como solução tecnológica, liberando açúcares para utilização em processos biotecnológicos (Oliveira *et al.*, 2017). Conhecendo-se as características da parede celular vegetal, sabe-se que o processo de hidrólise total de carboidratos requer diferentes tipos de enzimas: celulases, hemicelulases e pectinases. Tais enzimas pertencem ao grupo das holocelulases, que apresentam dois mecanismos conservados de hidrólise ácida ou básica das ligações glicosídicas, com retenção ou inversão da configuração anomérica do carbono no ponto de clivagem (Siqueira, de e Filho, 2010).

1.3.1. CELULASES

As celulases são enzimas que degradam celulose e pertencem ao grupo das glicosil hidrolases (GH), sendo classificadas em três tipos: endoglicanases, celobiohidrolases e β -glicosidases (fig. 10). Essas três enzimas agem de formas diferentes e em locais específicos das fibras de celulose (Juturu e Wu, 2014; Passos *et al.*, 2018).

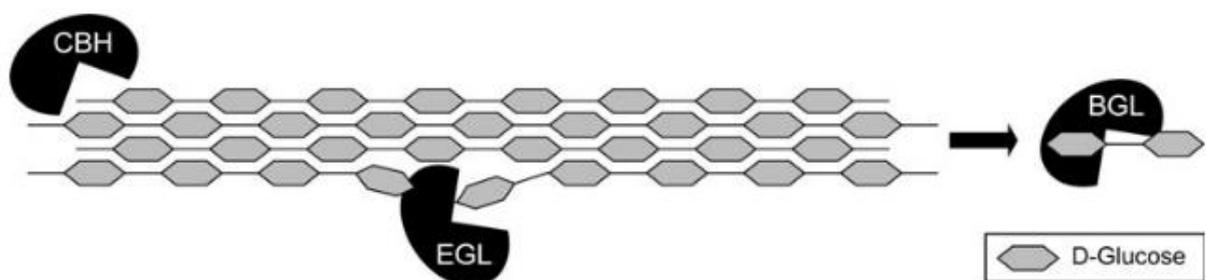


Figura 10: Celobiohidrolase (CBH), Endoglicanase (EGL) e β -glicosidase (BGL) agindo na hidrólise da fibra de celulose com afinidades para diferentes substratos e regiões (Brink, Van Den e Vries, De, 2011).

As Endoglicanases também podem ser chamadas de carboximetilcelulases (CMCases), devido ao substrato artificial utilizado para medir suas atividades enzimáticas. Endoglicanase é um tipo de celulase que inicia a degradação de celulose atacando a região amorfa da fibra, clivando preferencialmente as ligações glicosídicas internas, de modo a liberar resíduos de

tamanhos variados e, conseqüentemente, aumentar a quantidade de extremidades terminais (Behera *et al.*, 2017). Esse mecanismo de ação facilita a atuação de celobiohidrolases, que são enzimas que hidrolisam a partir de extremidades terminais redutoras e não redutoras.

Endoglicanases fúngicas geralmente são monômeros com pouca ou nenhuma glicosilação e possuem fenda de ligação aberta (Dashtban *et al.*, 2009). O pH de atuação é por volta de 4,0 e 5,0 e a temperatura de atividade é 50°C. Muitos fungos são descritos como produtores de endoglicanases, como por exemplo, o *Trichoderma reesei*, que produz ao menos 5 tipos dessa enzima (Dashtban *et al.*, 2009).

As endoglicanases podem ser utilizadas em processos industriais de vários tipos. Endoglicanase produzida por *Thermonospora fusca* é utilizada na indústria têxtil pelo desempenho no desgaste de peças de jeans, enquanto endoglicanases de *Trichoderma longibrachiatum* são usadas em detergentes para melhorar a capacidade de limpeza do produto (Juturu e Wu, 2014).

Celobiohidrolases também são conhecidas como exoglicanases, porque hidrolisam preferencialmente as ligações glicosídicas partindo das extremidades terminais redutoras e não redutoras, liberando celbiose como produto (normalmente na região cristalina da fibra de celulose), complementando a ação das endoglicanases. (Kumar *et al.*, 2008). Semelhante às endoglicanases, as celbiohidrolases possuem maior atividade em pH ácido e temperatura de 50°C.

O *T. reesei* possui maiores níveis de expressão de dois tipos de celbiohidrolases, a Celbiohidrolase I e a Celbiohidrolase II, que atuam de modo sinérgico. A primeira age nas extremidades redutoras, enquanto a outra age nas extremidades não redutoras (Brink, Van Den e Vries, De, 2011).

As β -glicosidases constituem o grupo de celulasas mais heterogêneo, sendo produzidas por fungos, bactérias, plantas e mamíferos. São enzimas que clivam ligações glicosídicas do tipo β -(1-4) no dímero de celbiose, por exemplo, formando dois monômeros de glicose como produtos (Kumar *et al.*, 2008).

Enquanto algumas β -glicosidases possuem estrutura monomérica com aproximadamente 35 KDa de peso molecular (enzima produzida por *Pleurotus ostreatus*), outras podem possuir estruturas diméricas (produzidas por *Sporobolomyces singularis* com 146 KDa, por exemplo) ou triméricas (β -glicosidase produzida por *Pisolithus tinctorius* podendo

possuir um peso molecular de 450 KDa). Além disso, β -glicosidases podem ser agrupadas de acordo com suas localizações: extracelulares, intracelulares e associadas à parede celular (Dashtban *et al.*, 2009). Temperaturas e pHs de maiores atividades também são características que variam para esse tipo de enzima.

As β -glicosidases são usadas industrialmente, como por exemplo na indústria de vinho, em que a enzima é utilizada para melhorar o aroma dos vinhos modificando precursores glicosilados. Na indústria alimentícia, β -glicosidases possuem o potencial de alterar a textura, o sabor e outras propriedades sensoriais de alguns alimentos (Behera *et al.*, 2017).

1.3.2. HEMICELULASES

As hemicelulases são enzimas que agem na clivagem de hemicelulose da parede celular vegetal. Devido à heterogeneidade desse substrato, várias enzimas podem participar do processo de sacarificação desses polissacarídeos, como endoxilanas, xilosidases, arabinofuranosidases, endomananas e manosidases, dentre outras (Brink, Van Den e Vries, De, 2011). Na maioria das vezes, hemicelulases são aplicadas juntamente a celulasas com o objetivo de otimizar a despolimerização de fibras lignocelulósicas (Obeng *et al.*, 2017). A maioria dos estudos envolvendo hemicelulases são focados nas xilanas, que são enzimas que degradam xilana. Por outro lado, enzimas que hidrolisam polímeros de manana ainda são pouco estudadas (Dhawan e Kaur, 2007).

A xilana é um heteropolissacarídeo formado basicamente por uma cadeia principal de xilose, contendo cadeias laterais de arabinose e ácido glicurônico, dentre outras. Assim, as xilanas podem ser agrupadas em dois tipos: aquelas que clivam ligações da cadeia principal (endoxilanas e β xilosidases) e aquelas que clivam ligações das cadeias laterais (enzimas auxiliares (fig. 11) (Monclaro *et al.*, 2019).

As endoxilanas se dividem em dois grupos que se diferem entre si quanto à especificidade pelo substrato, porém, ambos atuam em ligações da parte interior da fibra, liberando xilooligômeros. Os xilooligômeros formados a partir da ação das endoxilanas podem ser degradados por β xilosidases, liberando monômeros de xilose. (Brink, Van Den e Vries, De, 2011; Monclaro *et al.*, 2019).

Dentre as principais enzimas auxiliares que participam da completa degradação das fibras de xilana, encontram-se as arabinofuranosidases e as glicuronidases. Essas enzimas

clivam as ligações de arabinose e ácido glicurônico que constituíam as ramificações do heteropolímero de xilana (Chávez *et al.*, 2006). Algumas vezes, ácido ferúlico pode ser esterificado ao resíduo de arabinose, de modo que sua despolimerização requisita uma esterase específica (Dornez *et al.*, 2009).

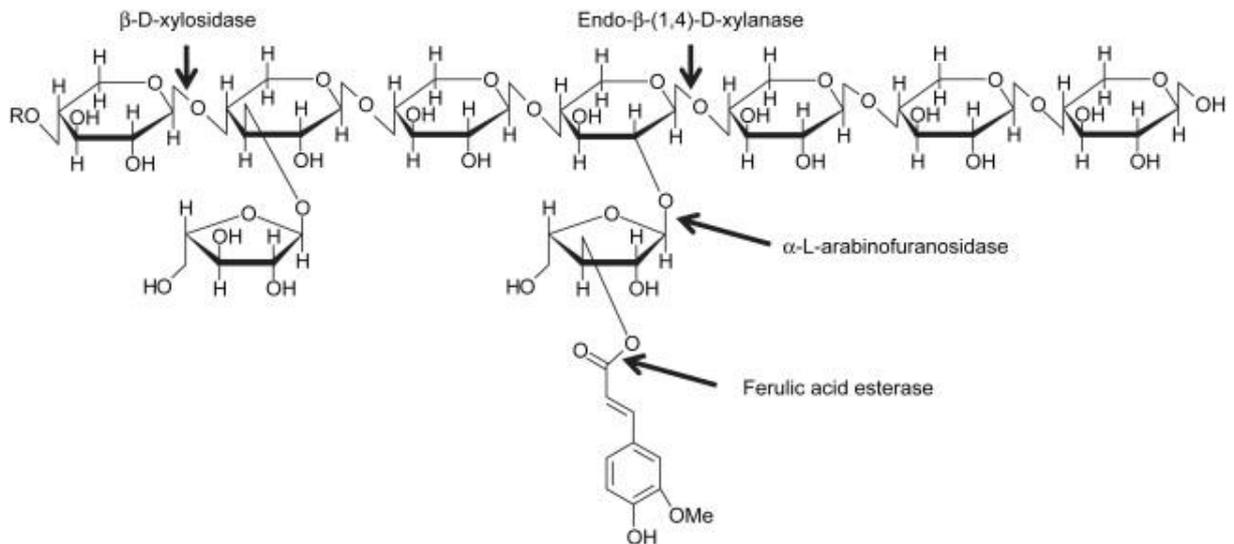


Figura 11: Estrutura de polímero de xilana e enzimas necessárias para sua despolimerização: endoxilanases, β-xilosidasas, arabinofuranosidasas e esterase de ácido ferúlico (Dornez *et al.*, 2009).

1.3.3.MANANASES

A manana, polissacarídeo presente na hemicelulose de paredes celulares vegetais, é um polímero que apresenta vários monômeros em sua composição, como manose, glicose e galactose, além de grupos acetil (Chen, 2014). Portanto, sua completa despolimerização exige diferentes tipos de enzimas, conhecidas como mananases. Para a degradação de manana é necessário que haja associações e sinergismo entre as enzimas que atuam na cadeia principal e enzimas que atuam nas cadeias laterais do polissacarídeo. As enzimas que atuam na degradação de manana são as endo-β-mananase, exo-β-manosidase, β-glicosidase, acetilmanana esterases e α-galactosidase (fig. 13). Essas enzimas contribuem para o metabolismo energético microbiano e também para o crescimento de plantas em fase de maturação (Srivastava e Kapoor, 2017a).

As mananases microbianas pertencem às família 5 e 26 de glicosil hidrolases (GH 5 e GH 26), e ambas apresentam como modo de ação o duplo deslocamento com retenção de configuração (Moreira e Filho, 2008). O mecanismo de ação dessas acontece em duas etapas (fig. 12). Primeiramente, um intermediário é formado pela combinação de ataque nucleofílico ao carbono anomérico e protonação do oxigênio glicosídico. No segundo estágio, o complexo enzima-substrato é clivado pelo ataque hidrolítico ao carbono anomérico do grupo glicosil, liberando os produtos formados e devolvendo à enzima, e ao seu carbono anomérico, suas configurações iniciais (Cruz, da, 2016; Srivastava e Kapoor, 2017a).

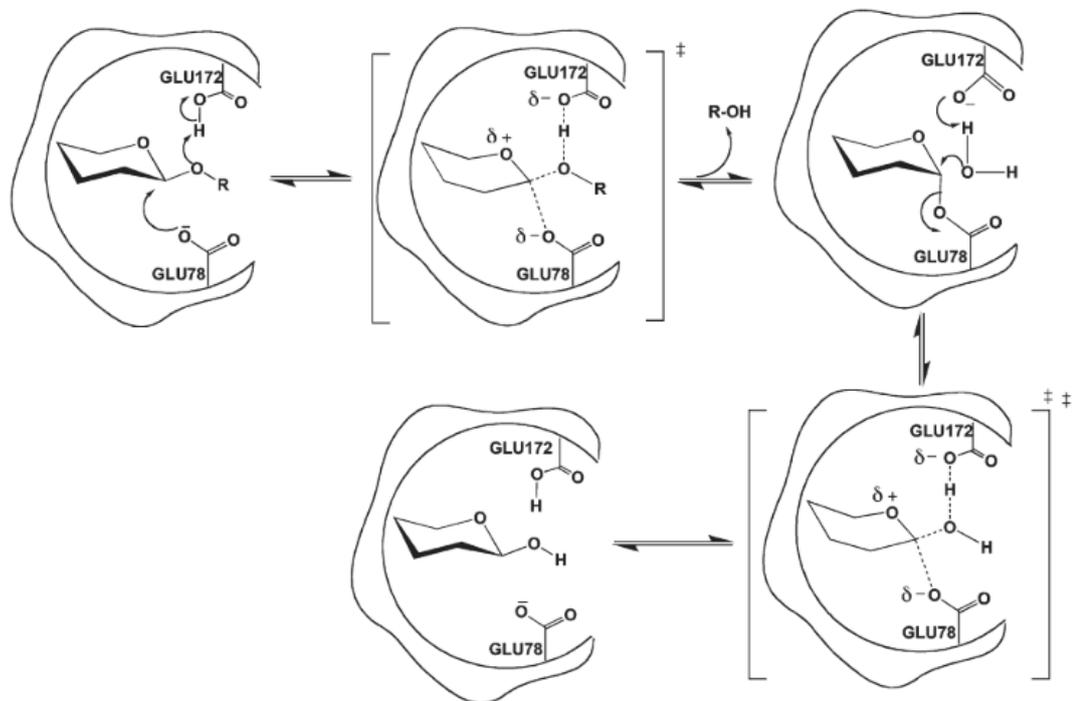


Figura 12: Hidrólise por retenção em mananases (Mhlongo *et al.*, 2014).

As endo- β -mananases são enzimas do tipo “endo”, ou seja, agem nas ligações internas da fibra. Endo- β -mananase cliva ligações β -(1-4) formando manooligossacarídeos com novas extremidades terminais (Moreira e Filho, 2008). A maioria das endo- β -mananases liberam resíduos de manobiose e manotriose (dímeros e trímeros de manose) e poucas delas são reportadas liberando monômeros de manose (Weingartner, 2010).

Sinergicamente à β -mananase, a exo- β - manosidase hidrolisa manooligômeros, atacando regiões terminais não redutoras, liberando resíduos de manose (Shallom e Shoham,

2003). Exo- β - manosidasas possuem mecanismos de ação igual às β -mananases, que envolvem reações de duplo deslocamento. Além disso, se as concentrações de açúcares como galactose e manobiose forem suficientes, manosidasas podem conduzir a transglicosilação do intermediário glicosil-enzima, contribuindo para a formação de glicosídeos (Chauhan *et al.*, 2012; Chauhan e Gupta, 2017).

Algumas fibras de manana podem possuir glicose em sua composição, é o caso das glicomananas e galactoglicomananas. Por esse motivo, β -glicosidasas também participam da degradação desses heteropolímeros. Essas enzimas hidrolisam ligações β -(1-4) nas regiões terminais não redutoras de glicomanooligossacarídeos, removendo resíduos de glicose preferencialmente em cadeias curtas (Chauhan *et al.*, 2012; Cruz, da, 2016).

A α -galactosidase catalisa a hidrólise de cadeias laterais contendo galactose em galactomananas e galactoglicomananas. O foco dessas enzimas são as ligações α -(1-6) que ligam resíduos de galactose às cadeias principais desses açúcares. Por fim, acetilmanana esterases retiram grupos acetil das galactoglicomananas (Moreira e Filho, 2008; Shallom e Shoham, 2003).

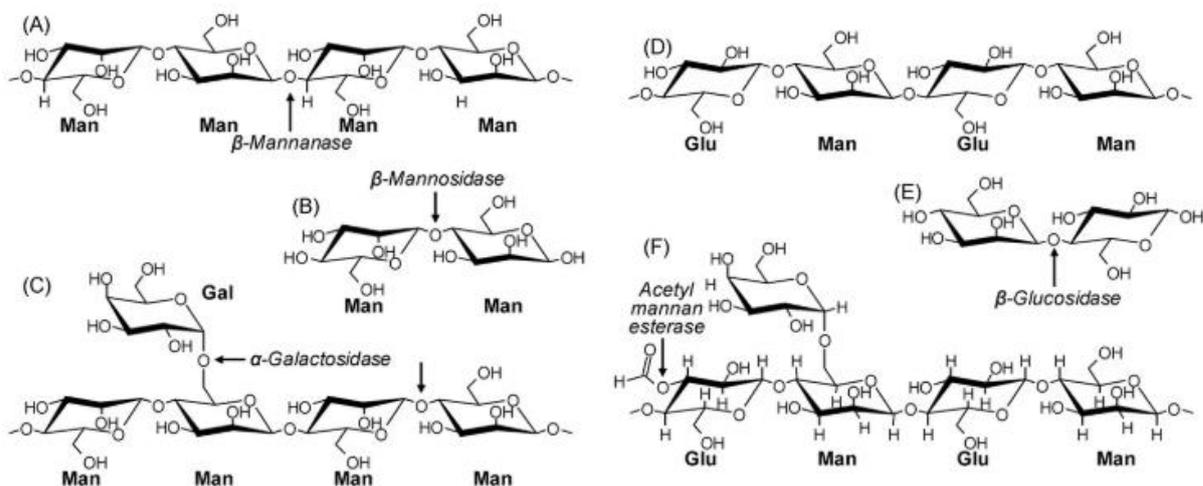


Figura 13: Polímeros de manana e enzimas utilizadas em suas degradações. Em (A), homomanana sendo clivada por endo- β -mananase, gerando resíduo de manobiose que é degradado em (B), pela enzima β -manosidase. Em (C), galactomanana tendo sua cadeia lateral de galactose clivada por α -galactosidase. Em (D), fibra de glicomanana é clivada gerando resíduo de glicomanose, que é clivado pela β -glicosidase em (E). Em (F), o grupo acetil presente em galactoglicomanana é clivado pela enzima acetilmanana esterase.

Mananases são enzimas comuns na natureza e já foram relatadas sendo produzidas em bactérias, fungos, plantas e animais. A produção microbiana é a mais explorada podendo ser

realizada em fermentação submersa e fermentação em estado sólido (Srivastava e Kapoor, 2017a). A forma de cultivo mais comum é a submersa, utilizando materiais como goma de alfarroba e farelo de trigo como substratos indutores. Variações de pH, temperatura, agitação e tempo de cultivo, também são variáveis importantes para a produção de mananases (Cruz, da, 2016; Moreira e Filho, 2008).

1.3.3.1. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE MANANASES

Ultimamente, a expansão do conhecimento a respeito de microrganismos e seus respectivos metabólitos, como enzimas, vem ampliando a diversidade de processos industriais e biotecnológicos (Dhawan e Kaur, 2007). Diversos microrganismos produtores e métodos de obtenção de mananases já são conhecidos, porém essas enzimas ainda não são tão exploradas como celulasas e xilanasas, por exemplo (Albuquerque *et al.*, 2018).

As mananases utilizadas em processos biotecnológicos industriais precisam ser bem definidas bioquimicamente. Características como pH e temperatura de maior atividade, termoestabilidade e interações com aditivos são fundamentais para adequações de processos e utilização de enzimas (Srivastava e Kapoor, 2015).

1) Produção de biocombustíveis.

A busca por alternativas energéticas renováveis tem encontrado soluções nos açúcares de parede celular vegetal. O biocombustível mais citado nesse aspecto de reaproveitamento de resíduos é o etanol de segunda geração. A diferença entre o etanol de primeira e segunda geração está na fonte de açúcares fermentescíveis. O primeiro utiliza a extração de altos teores de açúcares já prontos para serem fermentados por leveduras produtoras de álcool. Esses açúcares podem ser extraídos de plantas como a cana-de-açúcar, beterraba e milho (Albuquerque *et al.*, 2018). Já na produção de etanol 2G (de segunda geração), a fonte de açúcares fermentescíveis é proveniente de materiais lignocelulósicos, muitas vezes resíduos agroindustriais. É nessa etapa que as mananases são aplicáveis, na despolimerização de polissacarídeos formando os açúcares fermentescíveis (Srivastava e Kapoor, 2017a).

A utilização de coquetéis enzimáticos contendo celulasas, mananases e xilanasas pode explorar melhor o potencial total de hidrólise de materiais lignocelulósicos, de modo a otimizar o processo de sacarificação (Srivastava e Kapoor, 2017b).

2) Presença em detergentes.

A utilização de lipases, amilases e celulases já são bem comuns em formulações de detergentes de limpeza, porém mananases (principalmente as alcalinas) também passaram a ser aplicadas para intensificar a remoção de manchas (Dhawan e Kaur, 2007). Fibra de manana é de difícil remoção graças a sua habilidade de adesão às fibras de celulose, gerando por vezes um “efeito cola”(Dhawan e Kaur, 2007; Srivastava e Kapoor, 2017b).

Vários produtos com potencial de formar manchas indesejadas são compostos por gomas, seja como agente espessante ou estabilizador, como sorvetes, molhos, géis e cremes para cabelo, e creme dental (Albuquerque *et al.*, 2018; Dhawan e Kaur, 2007). A ação hidrolítica das mananases forma açúcares menores, que são mais hidrossolúveis, podendo ser retirados no enxágue (Dhawan e Kaur, 2007). Mananases produzidas por *Rhizomucor miehei* e por *Humicola insolens* já são utilizadas nesses detergentes (Aulitto *et al.*, 2019).

3) Indústria de papel e celulose.

O papel produzido industrialmente passa por processos de branqueamento, em que fragmentos de lignina devem ser removidos. Essa remoção é feita tradicionalmente com pré-tratamentos, onde se utilizam altas temperaturas e produtos alcalinos que podem criar problemas ambientais devido a liberação de compostos clorados (Chauhan *et al.*, 2012; Dhawan e Kaur, 2007). Entretanto, a lignina também pode ser removida através da hidrólise das fibras de hemicelulose na qual está ligada. Para essa aplicação, as mananases devem ser altamente específicas, para que não danifiquem as fibras de celulose que compõem o papel. Para esse fim, xilanases podem cooperar sinergicamente com as mananases, preferencialmente em temperaturas elevadas e soluções alcalinas (Albuquerque *et al.*, 2018; Chauhan *et al.*, 2012; Dhawan e Kaur, 2007).

4) Indústria de alimentos, sucos e extratos de café.

As mananases já são efetivamente utilizadas na maceração e clarificação de sucos de frutas e vinhos (Aulitto *et al.*, 2019; Moreira e Filho, 2008). Mananases produzidas por

Lactobacillus plantarum e por *Bacillus pumilus* foram relatadas na clarificação de sucos de pêssego, laranja e maçã (Srivastava e Kapoor, 2017b).

Tendo em vista uma redução na viscosidade do café, mananases são utilizadas para hidrolisar polissacarídeos de manana. Esse processo permite que o extrato de café seja concentrado em um processo de evaporação de baixo custo (Chauhan *et al.*, 2012). A viscosidade no extrato de café pode ser prejudicial para a produção de café instantâneo, por isso mananases também são utilizadas nessa função (Moreira e Filho, 2008).

Na indústria alimentícia, as mananases estão relacionadas à produção de prébióticos, que muitas vezes são compostos por oligomanossacarídeos. Esses fragmentos clivados de fibras de manana induzem mudanças específicas na microbiota intestinal de animais. Por falta de enzimas digestivas apropriadas no todo digestório, essas fibras chegam intactas ao intestino grosso, onde servirão para fermentação por microrganismos probióticos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*, melhorando o funcionamento intestinal (Albuquerque *et al.*, 2018; Dhawan e Kaur, 2007; Srivastava e Kapoor, 2017b).

O óleo de coco pode ser extraído através da ação de hemicelulases, tendo em vista que o coco maduro contém grandes quantidades de polissacarídeos, chegando a 61% de galactomananas e 26% de manana (Kaira *et al.*, 2016). A extração enzimática evita o uso de solventes e preserva as características originais do óleo, e ainda pode obter aglomerados proteicos como subprodutos (Dhawan e Kaur, 2007; Moreira e Filho, 2008).

5) Alimentação animal.

Rações animais podem conter vários ingredientes ricos em fibras de manana, como soja, coco e goma de alfarroba (Dhawan e Kaur, 2007). Esses alimentos não podem ser completamente digeridos por animais como porcos e aves, gerando prejuízos nutricionais. Por isso, rações animais podem ser suplementadas com mananases, juntamente com proteases para metabolizar essas fibras (Aulitto *et al.*, 2019).

A suplementação com mananases melhorou a utilização de nutrientes e a produção de ovos em aves, além disso, amenizou problemas de flatulência em porcos (Srivastava e Kapoor, 2017b; Zyl, van *et al.*, 2010). Também houve maior aproveitamento nutricional em rações a base de casca de soja acrescidas de mananases (Srivastava e Kapoor, 2017b).

1.3.4. PECTINASES

As pectinases são outro grupo de enzimas envolvidas no processo de aproveitamento da biomassa lignocelulósica. Essas enzimas podem ser produzidas por microrganismos, como fungos filamentosos, leveduras e bactérias, e são bastante utilizadas em processos industriais, como na diminuição de viscosidade em sucos de frutas, melhorando também a filtração e a clarificação dessas bebidas. Enzimas pectinolíticas também são aplicadas para reduzir o amargor em cascas de citrus e melhorar a firmeza de pêssegos e picles processados (Uenojo e Pastore, 2007).

As pectinases são enzimas que agem nas ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica, e são classificadas como despolimerizantes ou desesterificantes, de acordo com o mecanismo de ação. As pectinases despolimerizantes clivam a molécula de pectina entre os monômeros de ácido galacturônico, são elas: poligalacturonase (PG), pectinaliase (PL) e pectatoliase (PAL). As pectinases desesterificantes catalisam desesterificações de grupamentos metoxil na molécula de pectina. A pectinesterase (PE) é um exemplo de pectinase desesterificante (Berger, 2014; Martos *et al.*, 2013; Uenojo e Pastore, 2007).

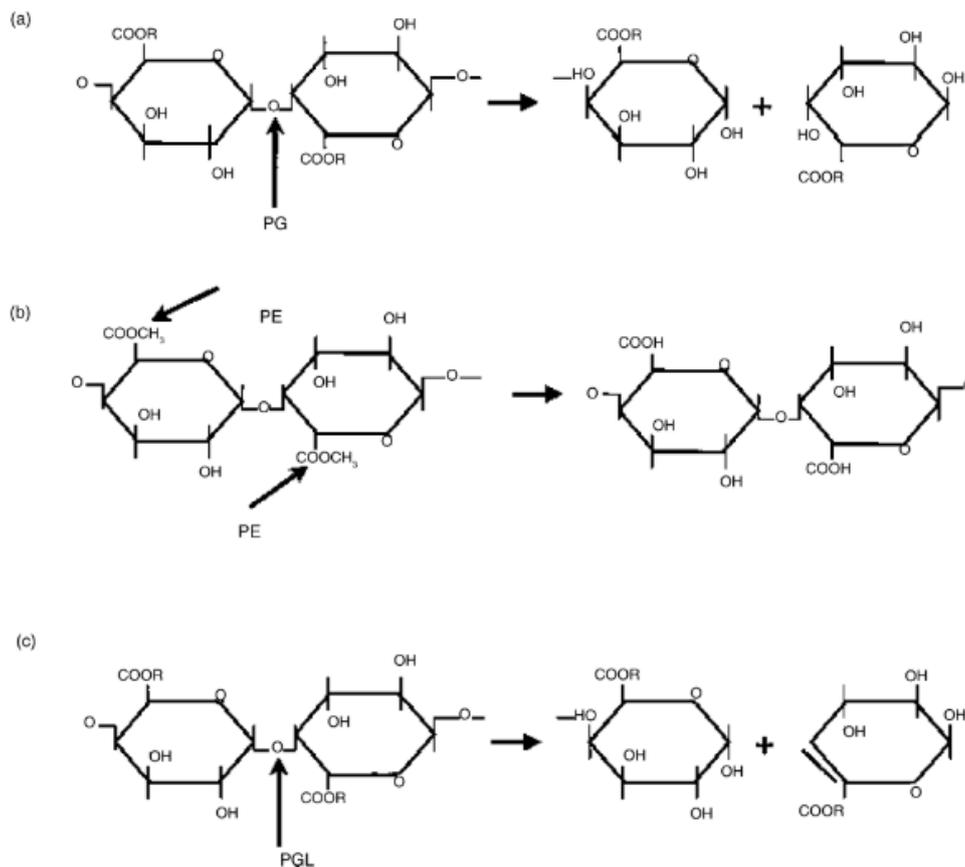


Figura 14: Local de ação de pectinases indicados por setas. No esquema estão representadas as poligalacturonases (PG), pectinesterases (PE) e pectinaliase (PGL). Adaptado de (Jayani *et al.*, 2005).

1.3.5. LIGNINASES

As ligninases são enzimas que catalisam a degradação de lignina. São necessárias nos processos que envolvem refino de biomassa lignocelulósica e, naturalmente, são utilizadas para a reciclagem de carbono em ecossistemas terrestres. A complexidade da estrutura da lignina, seu alto peso molecular e sua insolubilidade são características que dificultam o processo de despolimerização. Os fungos são os principais produtores de enzimas lignolíticas, que atuam de forma extracelular e oxidativa. Dentre esses fungos, os fungos de podridão branca são os microrganismos que degradam mais eficientemente as fibras de lignina provenientes de madeiras, com destaque para o *Phanerochaete chrysosporium*. As enzimas mais importantes para o processo de degradação de lignina são as peroxidases de lignina, manganês peroxidases e as lacases (Ayuso-Fernández *et al.*, 2018; Carvalho, 2005; Pérez *et al.*, 2002).

A lignina peroxidase, que é uma enzima bem conhecida como parte do sistema lignolítico de fungos basidiomicetes, degrada compostos não fenólicos das moléculas de lignina. É uma enzima que contém grupo prostético heme em seu sítio ativo e catalisa diversas oxidações nas cadeias laterais da lignina por meio de abstrações de um elétron para formar radicais reativos. Ligninas peroxidases também podem completar a transformação de fragmentos liberados pela manganês peroxidase no processo lignolítico. As LiPs (lignina peroxidase) podem ser usadas para refinar vários compostos aromáticos recalcitrantes, como corantes, por exemplo (Pérez *et al.*, 2002; Wesenberg *et al.*, 2003).

As manganês peroxidases são as enzimas lignolíticas mais produzidas por fungos de podridão branca do filo Basidiomycota. MnPs possuem semelhanças moleculares com as lignina peroxidases, por serem proteínas glicosiladas e apresentarem grupo prostético heme, apesar de possuírem maior peso molecular. O mecanismo de ação dessas enzimas envolve a oxidação de Mn^{2+} em Mn^{3+} , permitindo a oxidação e despolimerização de lignina, de alguns xenobióticos recalcitrantes e de corantes têxteis (Tuomela *et al.*, 2000; Wesenberg *et al.*, 2003).

As lacases podem ser produzidas por fungos, sendo muito difundidas em basidiomicetes. São enzimas que possuem átomos de cobre em seus sítios ativos, catalisam reações de oxidação em compostos fenólicos e não fenólicos na presença de mediadores químicos, descarbonizam e atacam seus grupos metil (Pérez *et al.*, 2002; Wesenberg *et al.*, 2003). Lacases vêm sendo aplicadas na oxidação de compostos recalcitrantes, como clorofenóis, estruturas relacionadas a lignina e corantes aromáticos (Wesenberg *et al.*, 2003).

1.4. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

A exploração dos polissacarídeos de parede celular vegetal tem sido foco de intensa pesquisa científica. Bactérias e fungos são constantemente descritos em processos de degradação desses polissacarídeos, com destaque para os fungos, consolidados como os mais descritos. Sabe-se que os microrganismos degradam lignocelulose de modo extracelular, utilizando sistemas enzimáticos com duas estratégias diferentes: produção de hidrolases para degradar celulose e hemicelulose, e produção de enzimas oxidativas lignolíticas para degradar a lignina, além da produção das monooxigenases, LPMOS (Pérez *et al.*, 2002). Desse modo, os microrganismos podem suprir a demanda enzimática em processos tecnológicos de aproveitamento de biomassa lignocelulósica.

Os microrganismos podem ser utilizados em suas formas selvagens naturais, mas também podem ser modificados por técnicas de biologia molecular e engenharia genética para produzirem maiores quantidades de enzimas e melhores características bioquímicas. Além disso, microrganismos não lignocelulolíticos podem ser modificados geneticamente para produzir enzimas de interesse, o que agrega diversificação de processos e produtos (Kondo *et al.*, 2012). A bioprospecção de novos microrganismos é um passo importante para o desenho de novos processos e pode apontar microrganismos aptos a desempenhar Bioprocesso Consolidado (CBP), que é a aplicação do mesmo microrganismo tanto no processo de despolimerização de fibras lignocelulosicas, quanto no processo fermentativo dos açúcares consequentemente obtidos, gerando produtos de valor agregado (Escamilla-Alvarado *et al.*, 2017).

Muitos fungos são utilizados como produtores enzimáticos. O *Trichoderma reesei*, por exemplo, é reconhecido por suas exoglicanases e endoglicanases (CBH1, CBH2, EG1, EG2, EG3 e EG5). Também são utilizados fungos dos gêneros *Fusarium*, *Piptoporus* e *Aspergillus*, (Kumar *et al.*, 2008).

1.4.1. O GÊNERO *ASPERGILLUS*

O gênero *Aspergillus* pertence ao filo Ascomycota possuindo várias espécies registradas com um alto impacto econômico, sendo também reconhecido como causador de doenças em

humanos e animais. A classificação e identificação de espécies de *Aspergillus* eram feitas por análises morfológicas, entretanto, atualmente os métodos mais utilizados são caracterizações moleculares e quimiotaxonômicas (Samson *et al.*, 2014).

As espécies desse gênero ocorrem em todo o mundo, sendo encontradas em diversos habitats, podendo inclusive contaminar alimentos (fig. 14), produzir micotoxinas e parasitar humanos e animais (Samson *et al.*, 2014).

Por outro lado, fungos de gênero *Aspergillus* possuem várias características que os permitem ser utilizados para diversas aplicações industriais. Tais características incluem capacidade de fermentação e altos níveis de secreção de proteínas (enzimas, dentre outras). Enzimas lignocelulolíticas de *Aspergillus* são de grande importância nas indústrias de alimentos e rações para animais (Vries e Visser, 2001). Muitas espécies também são utilizadas tecnologicamente para a produção de antibióticos, ácidos orgânicos e medicamentos (Samson *et al.*, 2014).

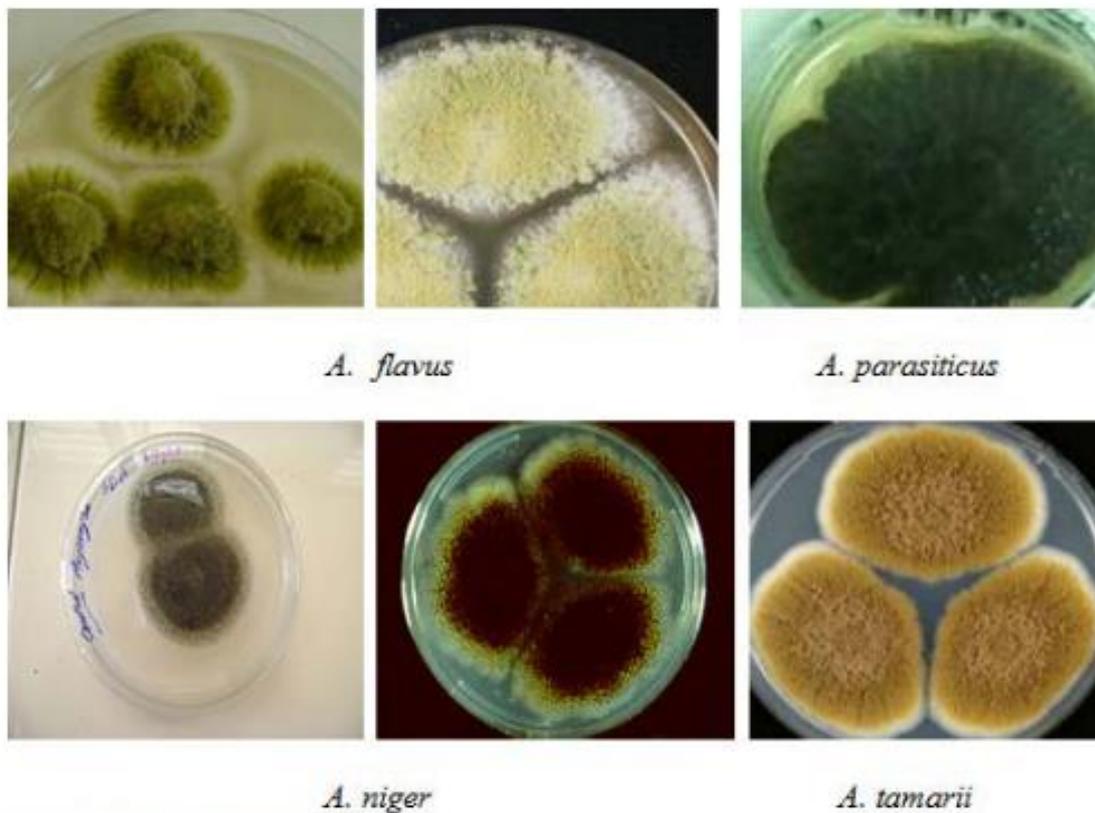


Figura 15: Espécies do gênero *Aspergillus* isoladas a partir de sementes de amendoim. Extraído e adaptado de (Guchi *et al.*, 2014)

1.4.2. O FUNGO FILAMENTOSO *Aspergillus tamarii*

Aspergillus tamarii (fig. 14) pertence à ordem dos Eurotiales, juntamente com fungos do gênero *Penicillium*, e são reconhecidos, como outros pertencentes aos gênero *Aspergillus*, pelo potencial de produção de metabólitos, como antibióticos, ácidos orgânicos, enzimas de coagulação de leite e proteases extracelulares (Silva, da *et al.*, 2018). *A. tamarii* pode ser encontrado em diversos habitats, incluindo plantações de algodão (Monclaro, 2018).

O *A. tamarii* é um fungo não produtor de aflatoxina, apesar de possuir os genes referentes a essa toxina em seu genoma. Essa produção de aflatoxina é o que diferencia o *A. tamarii* de outro fungo, o *Aspergillus pseudotamarii* (Ito *et al.*, 2001). Entretanto, o *A. tamarii* pode produzir outra micotoxina, o ácido ciclopiazínico, que é menos tóxica que aflatoxina, porém já foi relatado como substância alergênica (Monclaro, 2018). O *A. tamarii* também se destaca pela produção de xilanases, lipases e por conseguir degradar cafeína, molécula que costuma ser tóxica para alguns microrganismos (Gutiérrez-Sánchez *et al.*, 2004; Monclaro *et al.*, 2019). Outra aplicação para o *A. tamarii* é na produção de alimentos fermentados, como o molho Tamari, um molho soja japonês (Park *et al.*, 2017).

O transcriptoma do *A. tamarii* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar revela a presença de transcritos para o holocelulases, incluindo mananases, galactosidase e glicosidases. Essa capacidade de produção enzimática permite a utilização desse fungo em diversos processos que demandam esses tipos de enzimas hidrolíticas, como na produção de etanol de segunda geração (Midorikawa *et al.*, 2018).

A produção de mananase pelo *A. tamarii* já foi estudada em outros trabalhos utilizando goma de alfarroba e galactomanana como substratos para crescimento do fungo (Civas *et al.*, 1984; Saad *et al.*, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Carboidratos de parede celular vegetal são uma fonte de açúcares barata e abundante, sendo encontrados na composição da biomassa lignocelulósica. A heterogeneidade desses carboidratos sugere variadas utilizações, além de permitir o reaproveitamento de resíduos agroindustriais sustentavelmente.

A utilização eficiente dessa biomassa requer diferentes tipos de enzimas. Essas enzimas podem ser produzidas por microrganismos encontrados na natureza, como bactérias e fungos conhecidos e cultivados pelo ser humano. Portanto, é fundamental desenvolver tecnologias enzimáticas que permitam desenhar processos inovadores para gerar produtos de valor agregado. Nesse contexto, os processos biotecnológicos devem explorar conhecimentos a respeito da composição das biomassas lignocelulósicas, das enzimas necessárias para a despolimerização e dos microrganismos produtores dessas enzimas, com o objetivo de reduzir custos e atingir uma maior produtividade de modo sustentável.

O fungo filamentososo *A. tamarii* já é descrito como produtor de xilanases e lipases, mas ainda existem poucos trabalhos elucidando a produção e a caracterização bioquímica de mananase desse microrganismo.

3. OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho incluem a avaliação de potencial do *A. tamarii* para a produção de enzimas hidrolíticas com foco em mananase, avaliação da capacidade de resíduos agroindustriais na indução enzimática de mananase em cultivo submerso, semipurificação e caracterização de mananase do *A. tamarii*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas do trabalho estão ilustradas na figura (fig.15) a seguir. Os processos estão relacionados desde o cultivo do fungo em meio de cultivo líquido contendo casca de soja até as caracterizações enzimáticas de mananase do Extrato Bruto e de Sephadex G75. Os passos para a semipurificação e as hidrólises enzimáticas também estão representadas.

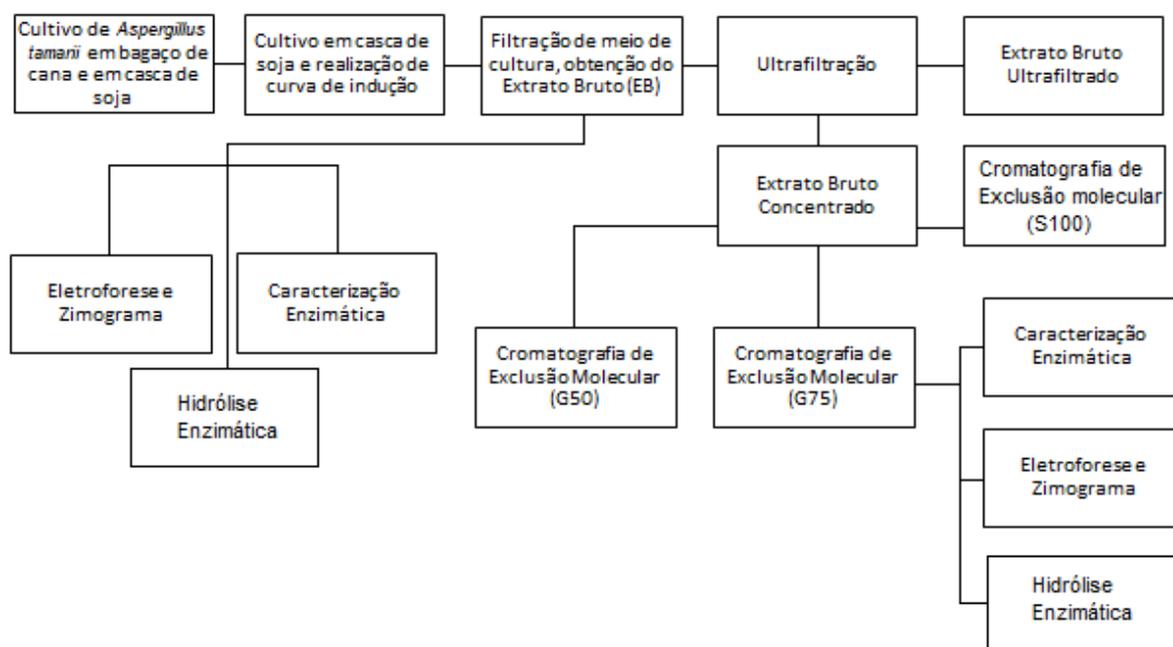


Figura 16: Fluxograma ilustrando etapas do trabalho realizado.

4.1. MICRORGANISMO

O fungo *A. tamarii* pertencente à linhagem RCFS6 foi obtido da coleção micológica do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília (UnB), onde estava armazenado em unidade de conservação a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esse fungo faz parte da micoteca do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília, UnB. A autorização de acesso e remessa de amostra de componente de patrimônio genético é de número 010237/2015-1. A micoteca também foi depositada no banco de microrganismos para controle de patógenos e plantas daninhas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). A micoteca da Laboratório de Enzimologia é também registrada no Centro Mundial de Dados para microrganismos (WDCM), sob o código MCPPW 1128.

Os esporos do fungo foram repicados em placa de Petri contendo meio de cultura sólido, formado por 10% de batata, 1% de dextrose e 2% de ágar dissolvidos em água (meio BDA). Em seguida, as placas foram incubadas a temperatura ambiente e foram mantidas até a esporulação do fungo. O meio de cultura sólido foi suplementado com o antibiótico Cloranfenicol na concentração de 30 mg/100 mL. Amostras esporuladas do fungo foram armazenadas a -80°C em criotubos contendo solução de glicerol a 50%, Tween 80 a 0,01% e NaCl a 0,9%.

4.2. BIOMASSA

Inicialmente, a fim de selecionar a melhor biomassa vegetal para a indução enzimática do fungo, foram utilizados como fontes de carbono o bagaço de cana-de-açúcar e a casca do grão de soja, gentilmente cedidos pelo Dr. Félix Siqueira (Embrapa Agroenergia).

As biomassas foram pré-tratadas em autoclave a 121°C por 2 horas em recipiente contendo água destilada. Em seguida, os materiais foram lavados e colocados em estufa para secagem. Resíduos como caules e vagens foram retirados dos recipientes. Com os materiais já secos, foi feita a moagem e os produtos finais foram armazenados em caixas de isopor em temperatura ambiente embalados por sacos plásticos.

4.3. CULTIVO SUBMERSO DE *Aspergillus tamaraii*

O cultivo em meio líquido foi realizado usando meio básico suplementado, composto por (g/v): 0,7% de fosfato de potássio monobásico, 0,2% de fosfato de potássio dibásico, 0,05% de sulfato de magnésio 7 vezes hidratado, 0,1% de sulfato de amônio, 0,06% de extrato de levedura, 1% de biomassa (bagaço de cana ou casca de soja). O antibiótico Cloranfenicol foi utilizado na concentração de 30 mg/100mL. O pH do meio foi ajustado para 7,0. Erlenmeyers contendo o meio foram autoclavados a 121°C por 30 minutos. O volume do cultivo utilizado normalmente foi de 1,8L, dividido em 6 erlenmeyers.

O inóculo foi preparado com 50 mL de solução salina contendo 0,9% de cloreto de sódio e 1mL de Tween 80 a 1%. Os esporos foram obtidos através de raspagem das placas de Petri de *A. tamaraii* já esporulado. A quantidade de esporos no inóculo foi calculada utilizando câmara de Neubauer e microscópio óptico, chegando a um valor de 10^7 esporos por mL. O inóculo foi feito a 1% de volume do meio líquido.

Inicialmente, o fungo foi cultivado em 3 erlenmeyers contendo casca de soja e outros 3 erlenmeyers contendo bagaço de cana, por 7 dias. Em seguida, após resultados preliminares, os cultivos foram feitos apenas com a casca de soja como fonte de carbono.

O cultivo também foi submetido a uma curva de indução enzimática, em que foi analisado o melhor tempo de cultivo para a produção de enzimas hidrolíticas, por meio de amostras coletadas a cada 24 horas de cultivo.

Todos os cultivos foram feitos com uma concentração de 1% de substrato, a 28°C, sob agitação a 120 rpm, em triplicata. Após cada cultivo, o meio líquido foi filtrado a vácuo em funil de Büchner com papel filtro *Whatman* n° 1, a fim de eliminar os resíduos sólidos, e obter, então, um extrato enzimático denominado Extrato Bruto (EB). O armazenamento desse extrato foi feito em recipientes de vidro, com acréscimo de azida sódica, em câmara fria, na temperatura de 4°C.

4.4. ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA E QUANTIFICAÇÃO PROTEICA

Foram realizados ensaios de atividade enzimática utilizando como substratos: manana (galactomanana – locust bean), xilana (oat spelt xylan), carboximetil celulose (CMC) e pectina (citrus fruit), adquiridos junto a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO. USA). Os microensaios foram feitos em termocicladores a 50°C por 30 minutos, onde eram incubados 10 uL de cada substrato juntamente com 5 uL de amostra enzimática. Os ensaios eram realizados em quintuplicatas. Ao fim, eram adicionados 30 uL de DNS (ácido 3,5-Dinitro-Salicílico), submetendo as amostras à fervura por 10 minutos a 97 °C. Seguidamente, foi adicionado 150 uL de água destilada e foi feita leitura de absorbância no comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices Co., EUA).

O cálculo de atividade enzimática foi feito com base em curvas padrões de absorbâncias no comprimento de onda 540nm aferidas previamente com os monossacarídeos formadores das cadeias principais dos substratos analisados: glicose, manose, xilose e ácido galacturônico. A unidade utilizada para quantificar as atividades enzimáticas foi UI/mL (Unidade Internacional por mililitro).

Para quantificação de proteínas nas amostras foi utilizado o reagente de Bradford (Bradford, 1976), a partir do kit *Protein assay* da Bio-Rad Laboratories. O método permite

quantificar proteínas em ug/mL. Outro método utilizado para quantificar proteínas foi a leitura de absorvância a 280 nm (UV) em espectrofotômetro.

4.5. ULTRAFILTRAÇÃO

O extrato bruto foi ultrafiltrado em membranas de retenção (*Millipore Co.*) com poros de 30 kDa ou poros de 50 kDa, gerando duas amostras ultrafiltradas e outras duas amostras concentradas 10 vezes em relação ao volume inicial. O processo foi feito com sistema de ultrafiltração do tipo Amicon, a uma temperatura de 4°C e pressão de 5kg.f/cm² fornecida por bomba de ar comprimido.

4.6. CROMATOGRAFIAS

O extrato bruto concentrado foi submetido à análises cromatográficas da categoria exclusão molecular em colunas do tipo *Sephadex G-50* (com dimensões 3 cm x 47 cm), *Sephadex G-75* (com dimensões 3 cm x 50 cm) e *Sephacryl S-100* (2 cm x 60 cm). As colunas foram lavadas com água destilada após os empacotamentos com resina específica, e em seguida foram lavadas com tampão fosfato de sódio pH 7,0 a 50 mM. A quantidade de amostra de extrato bruto concentrado aplicada foi de 2% em relação ao volume das colunas, e o fluxo de eluição a 0,333 mL/min para colunas G-50 e G-75, e 0,2 mL/min para a coluna com resina S-100.

As frações de 5 mL foram eluídas em tubos de ensaio, coletadas e submetidas a ensaios de atividade enzimática e quantificação de proteínas (absorvância a 280 nm) em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices Co., EUA).

As cromatografias de exclusão molecular foram realizadas em bancada, com exceção da cromatografia em coluna S-100, que foi realizada no sistema de purificação Akta (*GE Helthcare*).

4.7. ELETROFORESE E ZIMOGRAMA

Géis de eletroforese de poliacrilamida foram feitos de acordo com a metodologia escrita por Laemmli (1970). Para isso, as amostras proteicas foram precipitadas em TCA a 10%, a 4°C, por 1 hora. Em seguida foram centrifugadas a 14000 rpm, a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. Depois as amostras foram acrescidas de acetona e lavadas 3 vezes, também sob centrifugação, nas mesmas condições anteriores. Ao final da última lavagem, as amostras foram colocadas para secar em temperatura ambiente.

Após a secagem, as proteínas foram ressuspensas quando fervidas na presença de tampão de amostra 1X (Tris-HCL 125 mM pH 6,8; SDS 2,0%; azul de bromofenol 0,05%; glicerol 20% e β -mercaptoetanol 5,0%). O gel foi polimerizado na concentração de 12%. A corrente elétrica utilizada foi de 25 mA. Ao final da corrida, o gel foi corado seguindo protocolo de coloração por nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987).

O zimograma foi realizado de acordo com metodologia de Bischoff *et al.*, (1998). O gel foi copolimerizado com o substrato manana a uma concentração final de 0,1%. Após o fim da eletroforese, o gel foi cortado e incubado em solução Triton 100x 2,5% por 1h, sob agitação. Em seguida, o gel foi incubado em tampão 50 mM de fosfato de sódio, pH 7,0, por 1,5 h a 50°C. Passado o tempo, a reação enzimática foi interrompida pela incubação a 4°C. Em seguida, o gel foi revelado utilizando solução de vermelho congo a 1% e descorado em solução 1M de NaCl e ácido acético 0,5%.

4.8. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

4.8.1. EFEITO DA TEMPERATURA

As mananases do extrato bruto e da fração obtida da cromatografia em coluna G-75 foram submetidas a microensaios de atividade enzimática em diferentes temperaturas. Em termocicladores, os ensaios em quintuplicatas foram realizados em temperaturas de 30°C a 80°C, com intervalos de 5 °C.

4.8.2. EFEITO DO PH

Para a determinação do pH de maior atividade enzimática, o substrato (manana) foi tamponado em uma faixa de pH entre 3,0 e 9,0, em intervalos de 1 unidade. O tampão utilizado foi o tampão universal (glicina, fosfato e citrato) a 50mM, ajustado para cada faixa de pH. Em seguida foram realizados microensaios de atividade enzimática.

4.8.3. AVALIAÇÃO DE TERMOESTABILIDADE

Para avaliação de termoestabilidade, as amostras enzimáticas foram incubadas, na ausência de substratos, em temperaturas diferentes (40°C, 50°C, 60°C e 70°C). As amostras foram coletadas de hora em hora, ou em outros intervalos de tempo, de acordo com a temperatura analisada. Microensaios foram realizados, e a atividade enzimática do instante 0h foi tomada por 100%, representando o máximo de atividade, enquanto as demais atividades residuais foram avaliadas em função dessa referência. O experimento visou calcular a meia-vida da enzima, ou seja, o tempo necessário para atingir metade do valor máximo de atividade enzimática.

4.8.4. EFEITO DE ÍONS METÁLICOS E EDTA

A influência de íons metálicos e EDTA foi mensurada por meio de ensaios enzimáticos. Previamente aos ensaios, as amostras enzimáticas foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente na presença de EDTA, CaCl₂, CoCl₂, CuSO₄, FeCl₃, FeSO₄, KCl, MgCl₂, MgSO₄ e ZnSO₄ nas concentrações de 1mM e 10mM. Para o controle, as amostras foram incubadas em água. As atividades residuais foram calculadas com base na atividade enzimática na ausência de íons metálicos e EDTA.

4.8.5. EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

As amostras enzimáticas também foram incubadas por 20 minutos, em temperatura ambiente, na presença dos compostos fenólicos vanilina e ácido tânico (dissolvidos em água); ácido 4-hidroxibenzóico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico e ácido cinâmico (dissolvidos em etanol 50%). A concentração utilizada foi de 1mg/mL (concentrações maiores podem interferir no método de DNS). Microensaios de atividade enzimática foram realizados, com as atividades

residuais sendo calculadas com base na atividade enzimática na ausência de compostos fenólicos. Os controles das atividades enzimáticas foram feitos utilizando água ou etanol 50%.

4.9. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados em *vortemp* (*Labnet*) nos períodos de 0, 8, 24, 48, 72 e 96 horas. As amostras de extrato bruto e da fração obtida em cromatografia em coluna G-75 foram incubadas na presença dos seguintes substratos: manana a 1% e casca do grão de soja, ambos seguindo a proporção de 1 : 2 (amostra : substrato). O experimento ocorreu a 40°C e agitação de 720 rpm. Os ensaios foram realizados em triplicatas, e os controles enzimáticos foram feitos utilizando tampão fosfato de sódio. As alíquotas de cada período foram retiradas e armazenadas em tubos a -20°C até o fim do experimento. Em seguida, as amostras foram fervidas e submetidas a quantificação de açúcares pelo método usando DNS (ácido 3,5-Dinitro-Salicílico).

4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas desse trabalho foram realizadas usando o software *Past 3.24*, em que os dados foram submetidos a testes do tipo *one-way ANOVA* e teste de pareamento *Mann-Whitney* com nível de significância de 0,05 (5%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CULTIVOS EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E EM CASCA DE SOJA

O cultivo do *A. tamaritii* em casca de soja gerou um perfil de produção enzimática diferente do cultivo em bagaço de cana-de-açúcar (fig.16). O cultivo em bagaço de cana mostrou-se menos eficiente para a produção de mananase (atividade enzimática 10 vezes menor que a atividade do cultivo em casca de soja) e CMCase (5 vezes menor), com ausência de atividade de pectinase. O bagaço de cana usado como fonte de carbono mostrou-se adequado para a produção de xilanases, pois obteve uma atividade enzimática de 0,43 UI/mL.

Já o cultivo utilizando a casca do grão de soja como fonte de carbono obteve maiores atividades em todas enzimas analisadas, quando comparado ao mesmo feito com bagaço de cana. Nesse caso, destaca-se a produção de mananases e xilanases com atividades enzimáticas por volta de 0,5 UI/mL. Portanto, o cultivo em casca de soja ficou estabelecido como mais adequado para produção de enzimas lignocelulolíticas, principalmente mananases.

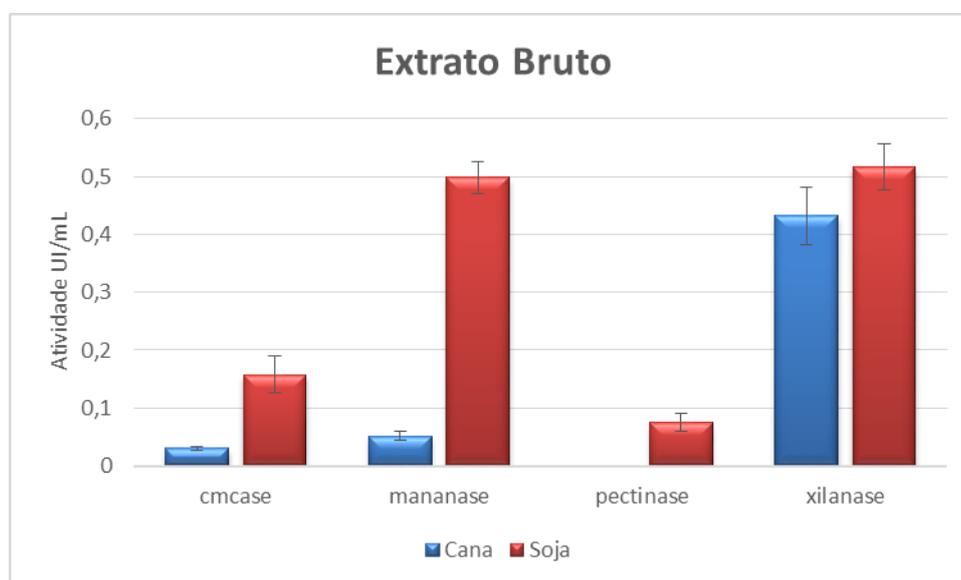


Figura 17: Produções de enzimas lignocelulolíticas obtidas do cultivo de *A. tamaritii* na presença de bagaço de cana-de-açúcar ou casca do grão de soja. As barras representam médias obtidas de cultivos em triplicata. Valores de erro padrão também são representados no gráfico.

A explicação para esse resultado pode estar nas composições das paredes celulares dos vegetais em questão.

A parede celular do bagaço de cana-de-açúcar produzido no território brasileiro é composta por cerca de 38,4 % a 45,5% de celulose, 22,7 % a 27 % de hemicelulose, e 19,1 % a 32,4 % de lignina (Canilha *et al.*, 2012).

Quanto à composição da casca de soja, Rojas, (2012), encontrou aproximadamente 35,8% de celulose, 23,1% de hemicelulose e 4,3% de lignina. Embora a casca de soja não possua altos níveis de manana em sua hemicelulose, esse resíduo possui maior capacidade de indução de produção de mananases no *A. tamarii* em comparação ao bagaço de cana. A menor quantidade de lignina na casca de soja em comparação ao bagaço de cana-de-açúcar favorece a utilização desse substrato, assim como seu maior teor proteico, servindo como fonte de nitrogênio para o fungo produzir enzimas hidrolíticas. A casca de soja também possui cerca de 4,3% de galactana (Mielenz *et al.*, 2009). A presença desse polissacarídeo pode ser responsável pela indução de enzimas relacionadas às degradações de polissacarídeos que possuem galactose em sua composição, como galactomanana e galactoglicomanana.

Outras composições da parede celular de soja divulgadas por outros trabalhos podem ser observadas na tabela 1.

Infante, (2014), cultivou o fungo filamentoso *Aspergillus foetidus* em casca de soja obtendo uma atividade enzimática de mananase de aproximadamente 1 UI/mL, e aproximadamente 0,6 UI/mL de atividade de xilanase.

Tabela 1: Composições de polímeros de parede celular em casca do grão de soja por diferentes referências.

Referências	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
(Rojas, 2012)	35,8	23,1	4,3
(Mielenz <i>et al.</i> , 2009)	30 a 51	10 a 20	2,8
(Cassales <i>et al.</i> , 2011)	31	26	3,4 a 5,7
(Siqueira <i>et al.</i> , 2010)	51,9	10,4	9,4
(Retore <i>et al.</i> , 2010)	48	20,42	5,26

Com os resultados obtidos, optou-se por continuar o trabalho utilizando apenas a casca de soja como biomassa, para a produção de mananases.

5.2. CURVA DE INDUÇÃO ENZIMÁTICA

Já com o substrato lignocelulósico definido, foi necessário ajustar o melhor tempo de cultivo para a produção de mananases pelo *A. tamarii*.

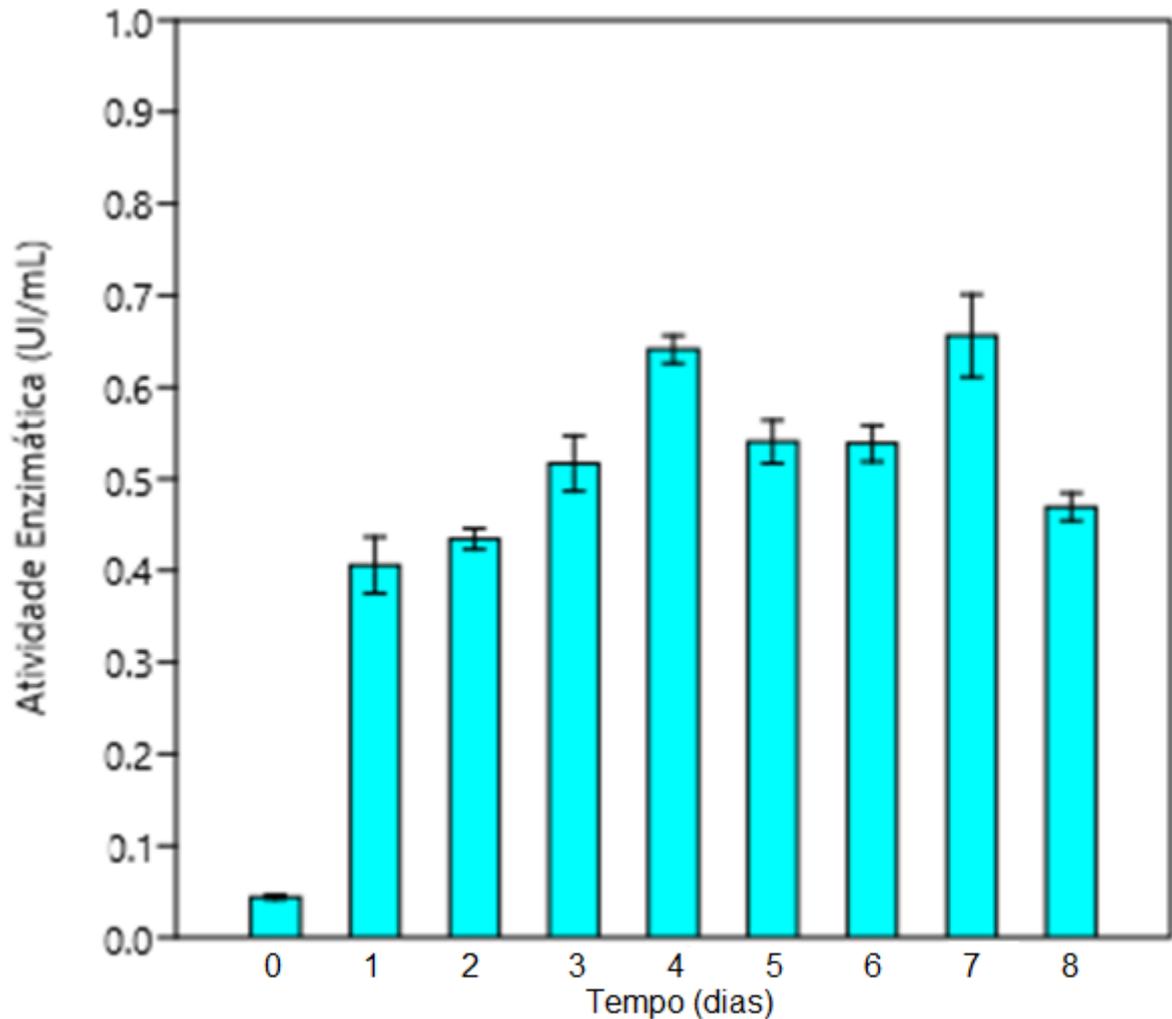


Figura 18: Curva de indução enzimática para a produção de mananases pelo *A. tamarii* na presença de casca de soja. As barras representam os dias como tempo de cultivo, juntamente com barras de erro padrão. O gráfico foi gerado pelo software *Past*, onde também foi analisado estatisticamente.

Analisando o gráfico, padronizou-se o dia 4 como melhor tempo de cultivo por fermentação submersa. A escolha foi feita com base no seu maior valor de atividade enzimática, que se equivale ao dia 7, no entanto, não há diferenças estatísticas significantes entre os dois pontos. O dia 4 demonstrou ser diferente estatisticamente dos dias 1, 2 e 3, mostrando ser o tempo de cultivo mais vantajoso nos aspectos de atividade enzimática e tempo, características altamente relevantes para aplicabilidade industrial. As estatísticas foram feitas conforme metodologia 4.10, além disso aplicou-se o teste de pareamento de Tukey.

Em um experimento utilizando a linhagem NRC3 do fungo *A. tamarii*, Saad e colaboradores, (2016), encontraram uma maior atividade de β -mananase no sexto dia de cultivo em meio líquido contendo goma de alfarroba como substrato, em um experimento onde as alíquotas eram retiradas em intervalos de 2 dias. Similarmente, Alsarrani (2013), também estudou o melhor tempo de cultivo para produção de mananase (porém com o fungo *Aspergillus niger*), encontrando o extrato bruto do sexto dia com maiores atividades mananolíticas, porém as atividades enzimáticas do quarto e oitavo dia foram bem próximas ao sexto. Em outro trabalho, Dhawan e colaboradores (2016), definiram o tempo de 2 dias para a produção de β -mananase da bactéria termotolerante *Paenibacillus thiaminolyticus* utilizando um substrato rico em fibras de manana refinadas.

Após padronizações de tempo de cultivo e substrato, um novo cultivo foi feito gerando o perfil de produção enzimático apresentado a seguir (fig. 18). A produção de mananases e xilanases se destacaram das demais, com atividades enzimáticas de 0,87 UI/mL e 0,76 UI/mL, respectivamente. O extrato bruto obtido desse cultivo foi utilizado para todos os experimentos posteriores.

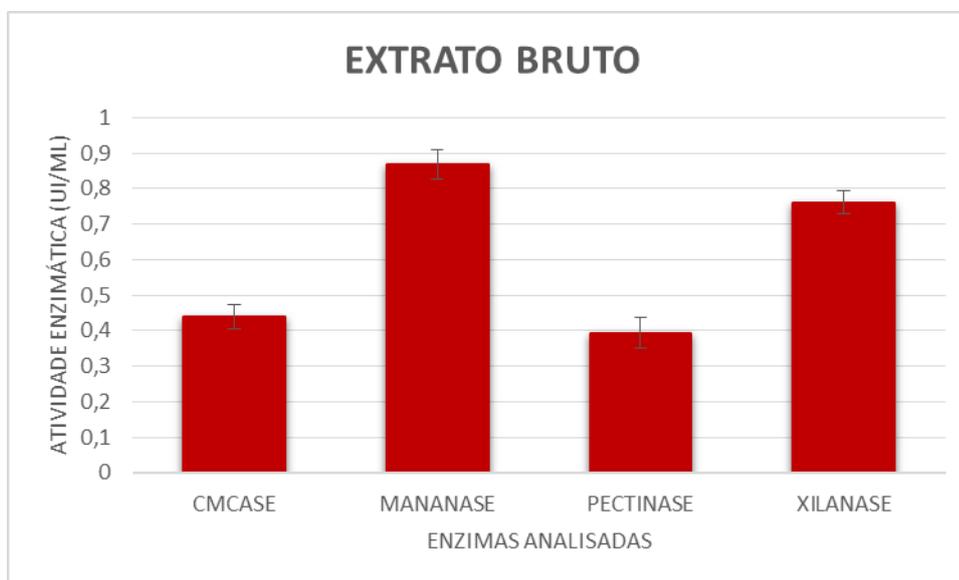


Figura 19: Perfil de produção enzimática de extrato bruto de cultivo de *A. tamarii* em casca de soja por 4 dias. As barras representam tipos de enzimas, acompanhadas de barras de erro padrão.

5.3. ULTRAFILTRAÇÃO

O extrato bruto foi filtrado a vácuo em papel filtro após os 4 dias de cultivo. Em seguida, o extrato enzimático obtido foi submetido ao processo de ultrafiltração. A ultrafiltração utilizando membrana com poros de tamanhos determinados permite a obtenção de informações a respeito das massas moleculares das enzimas estudadas, por meio da retenção (ou não retenção) da enzima na fração concentrada. Além disso, a ultrafiltração também serve para possibilitar a retirada de sais e outras moléculas pequenas, manter o pH do meio, e remover açúcares e outros compostos que podem inibir a ação das enzimas (Kuhad *et al.*, 2011; Weingartner, 2010).

Para a purificação de enzimas, o método ainda possui pouca resolução, porque moléculas com configurações lineares passam mais facilmente as membranas do que moléculas com configurações tridimensionais e globulares (Harris e Angal, 1994). Portanto, é um método que facilita a purificação, mas requer outras técnicas em sequência.

Nesse trabalho, o extrato bruto foi ultrafiltrado utilizando membrana de 50 kDa, gerando um extrato bruto ultrafiltrado (U50) e um extrato bruto concentrado (C50). As retenções de atividades enzimáticas podem ser observadas a seguir (fig. 19).

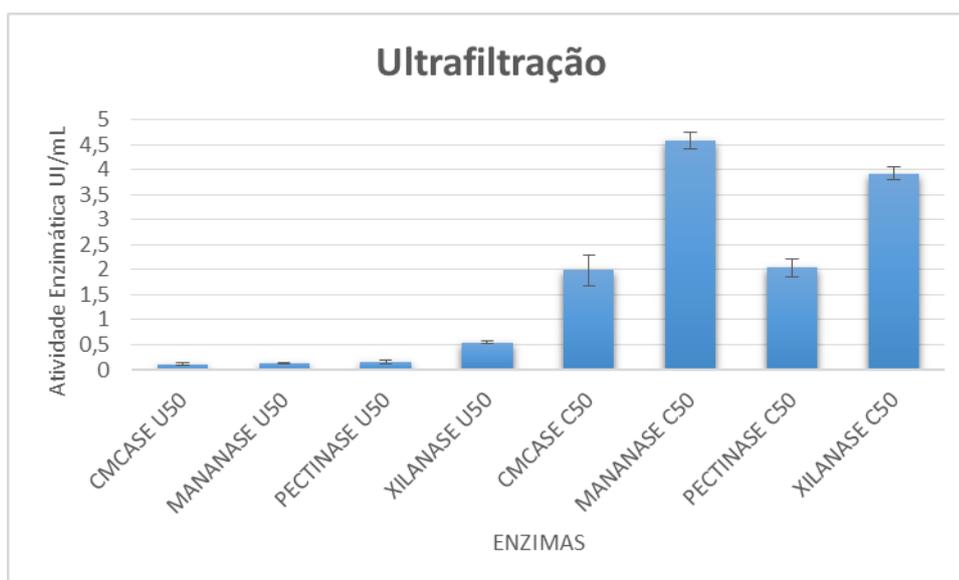


Figura 20: Ultrafiltração de extrato bruto utilizando membrana porosa de 50 kDa. As barras representam as atividades enzimáticas de diferentes enzimas nas frações ultrafiltradas e concentradas, com a representação de erros padrões. A amostra de extrato bruto foi concentrada 10 vezes pelo volume.

De acordo com o resultado encontrado, a maior parte das enzimas ficou retida na fração concentrada da ultrafiltração. Na parte concentrada as maiores atividades enzimáticas foram de mananase (4,58 UI/mL) e de xilanase (3,9 UI/mL), assim como no extrato bruto. O resultado sugere que a mananase produzida pelo *A. tamaritii* possui um peso molecular maior que 50 kDa, não conseguindo atravessar os poros da membrana. A retenção de mananases nas frações concentradas de ultrafiltrações são comumente relatadas na literatura (Costa, 2017; Infante 2014; Weingartner, 2010).

Costa (2017) utilizou na purificação de mananases produzidas por *Clonostachys byssicola* o método de ultrafiltração em membrana de 30 kDa, de modo que a maior parte da atividade enzimática da enzima (4,18 UI/mL) ficou retida na fração concentrada, com apenas 0,11 UI/mL na parte ultrafiltrada. Após realização de ultrafiltração de extrato bruto, Weingartner, (2010), concluiu que a mananase estudada possuía peso molecular entre 30 kDa e 100kDa, em um experimento onde utilizou membranas com poros de variados tamanhos. Ferreira e Filho (2004), ultrafiltraram extrato bruto do cultivo de *Trichoderma harzianum* como parte de processo de purificação de uma β -mananase, utilizando membrana de 30 kDa.

Em seguida, o extrato bruto concentrado passou por experimentos cromatográficos que buscaram purificar a mananase.

5.4. CROMATOGRAFIAS

A amostra de extrato bruto do *A. tamaritii*, cultivado por 4 dias na presença de casca de soja, e posteriormente concentrado 10 vezes em experimento de ultrafiltração, foi denominada C50 e foi submetida a variados testes cromatográficos. No primeiro, a amostra passou por cromatografia do tipo exclusão molecular, em coluna do tipo Sephadex G-50 em temperatura ambiente. O cromatograma apresentando as atividades enzimáticas encontradas e a absorbância proteica a 280 nm pode ser visualizado abaixo (fig. 20). Previamente ao processo cromatográfico, a coluna foi lavada com água destilada seguida de tampão, enquanto a amostra enzimática foi dialisada em água destilada na câmara fria a 4 °C.

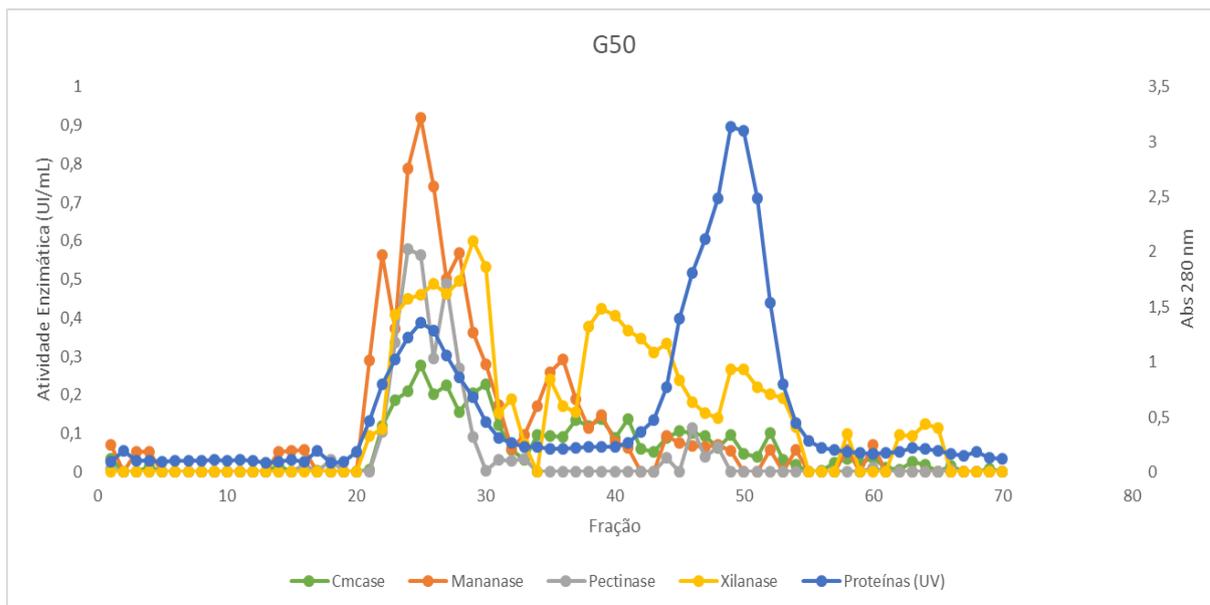


Figura 21: Perfil cromatográfico de extrato bruto concentrado aplicado em coluna de exclusão molecular Sephadex G-50. O tampão utilizado foi o fosfato de sódio, a 50 mM e pH7,0.

O gráfico permite a observação de dois picos de proteínas: o primeiro entre as frações 21-29 e o segundo entre as frações 43-53. A atividade de mananase ficou posicionada no primeiro pico, juntamente com os picos de pectinase, cmcase e um dos picos de xilanase. A maior atividade enzimática registrada foi a de mananase, que se mostrou bem próxima à atividade encontrada no extrato bruto.

Em seguida, outras colunas de exclusão molecular foram utilizadas: a Sephadex G-75 (fig. 21) e a Sephacryl S-100 (fig. 22).

As cromatografias em colunas G-75 e S-100 também não obtiveram frações purificadas de mananase, porém o perfil de proteínas eluídas na cromatografia em Sephadex G-75 mostrou-se mais vantajoso.

A principal diferença entre as três cromatografias apresentadas se dá na quantidade de picos proteicos eluídos. A cromatografia em Sephacryl S-100 foi a menos eficiente quanto à separação de proteínas, pois gerou apenas 1 pico (frações 6 a 12). Já as cromatografias Sephadex G-50 e Sephadex G-75 apresentaram 2 e 3 picos de proteínas, respectivamente. Quanto aos valores de atividade enzimática de mananase, o pico em G-75 obteve o valor mais alto, cerca de 1,4 UI/mL. Portanto, o pico de atividade de mananase obtido na cromatografia em G-75, nas frações 24 a 34, foi escolhido para caracterização enzimática.

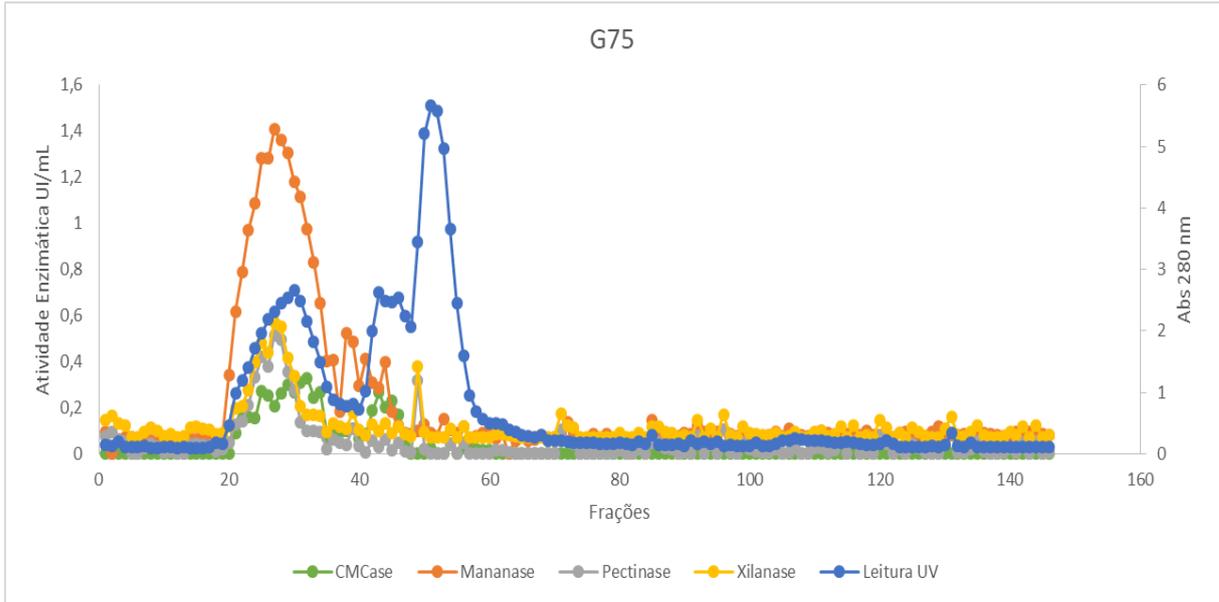


Figura 22: Perfil cromatográfico de extrato bruto concentrado em coluna de exclusão molecular Sephadex G-75. O tampão utilizado foi o fosfato de sódio, a 50 mM e pH7,0.

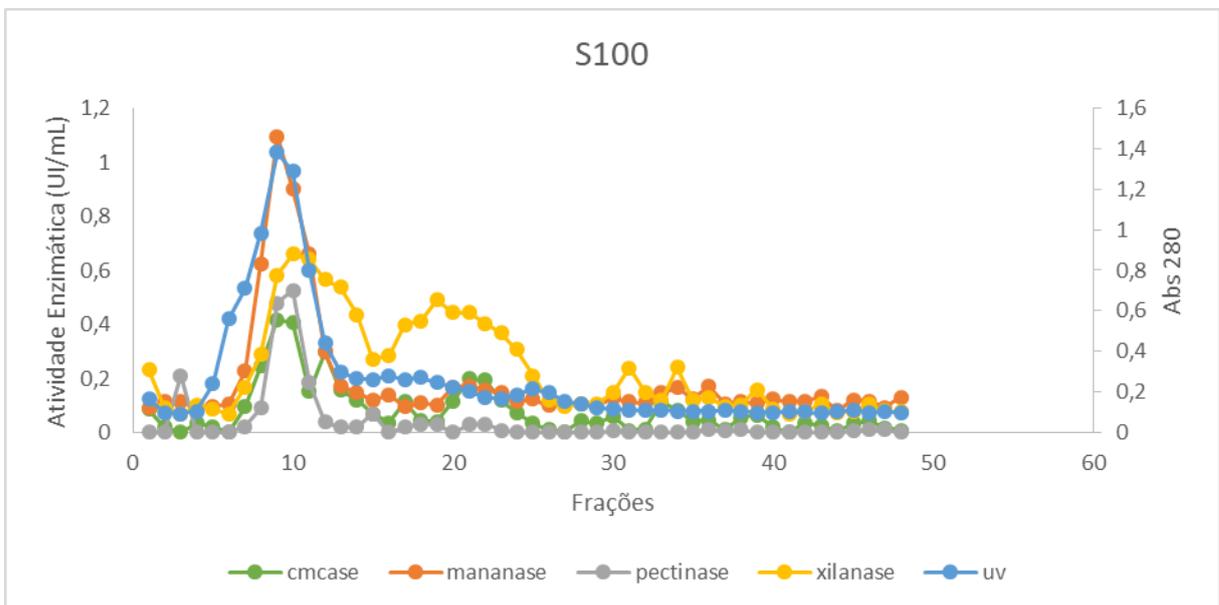


Figura 23: Perfil cromatográfico de extrato bruto concentrado em coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100. O tampão utilizado foi o fosfato de sódio, a 50 mM e pH7,0.

Várias outras colunas cromatográficas e estratégias de combinações (citadas a seguir) também foram utilizadas a fim de se purificar a mananase, porém, sem sucesso. Os picos de atividade enzimática de mananase obtidos das cromatografias em Sephadex G-50 e Sephadex

G-75 foram submetidos a cromatografias em coluna de troca aniônica, do tipo DEAE Sepharose Fast Flow. Entretanto, o novo pico de mananase foi co-eluído com picos de outras enzimas e também o pico de proteína. Nessa troca iônica, a mananase foi eluída após a adição de gradiente salino, mostrando certa afinidade pela resina aniônica quando usado o tampão Tris – HCl 50 mM em pH 8,0, o que demonstra que essa proteína possui um pI menor que 8,0. Também foram experimentadas colunas de troca catiônica, porém as atividades enzimáticas de mananase e xilanase continuaram sendo eluídas nas mesmas frações.

Luo *et al.* (2017) utilizaram a levedura *Pichia pastoris* para expressão heteróloga de mananase de *Bacillus subtilis*, e para purificar a enzima exploraram técnicas de ultrafiltração e cromatografia de exclusão molecular. A membrana de ultrafiltração utilizada foi de 10 kDa e a coluna de exclusão molecular usada foi a Sephadex G-75 em tampão de pH 5,5. A mananase estudada nesse trabalho possuía um tamanho molecular entre 36 kDa e 42 kDa. Infante *et al.* (2015) purificaram parcialmente uma mananase produzida pelo fungo *A. foetidus* utilizando técnicas de ultrafiltração, cromatografia em coluna por exclusão molecular do tipo Sephacryl S-100 e zimografia.

5.5. ELETROFORESE E ZIMOGRAMA

O experimento de eletroforese foi realizado juntamente ao zimograma para se observar os perfis proteicos e de atividade de mananase do extrato bruto e da fração semi-purificada em cromatografia de exclusão molecular G-75, assim como o tamanho aproximado das mananases presentes nas amostras. Em relação ao extrato bruto, a fração semipurificada apresentou menores quantidades de proteínas, principalmente na parte mais baixa do gel, onde ficam retidas as proteínas de massas moleculares menores (fig. 23).

O zimograma permitiu a realização de um cálculo de massa molecular através do método de migração relativa, tendo como base a degradação do gel copolimerizado com o substrato manana. A primeira banda de proteína com atividade de mananase foi maior, no alto do gel, apresentando massa molar na faixa de 54 kDa a 83,3 kDa tanto na amostra de extrato bruto quanto na amostra de G-75. Mais abaixo também houve, nas duas amostras, bandas de proteínas com atividades de mananase, porém com menores intensidades (devido ao processo

de ultrafiltração), indicando outra forma de mananase com massa molecular de aproximadamente 28,2 kDa.

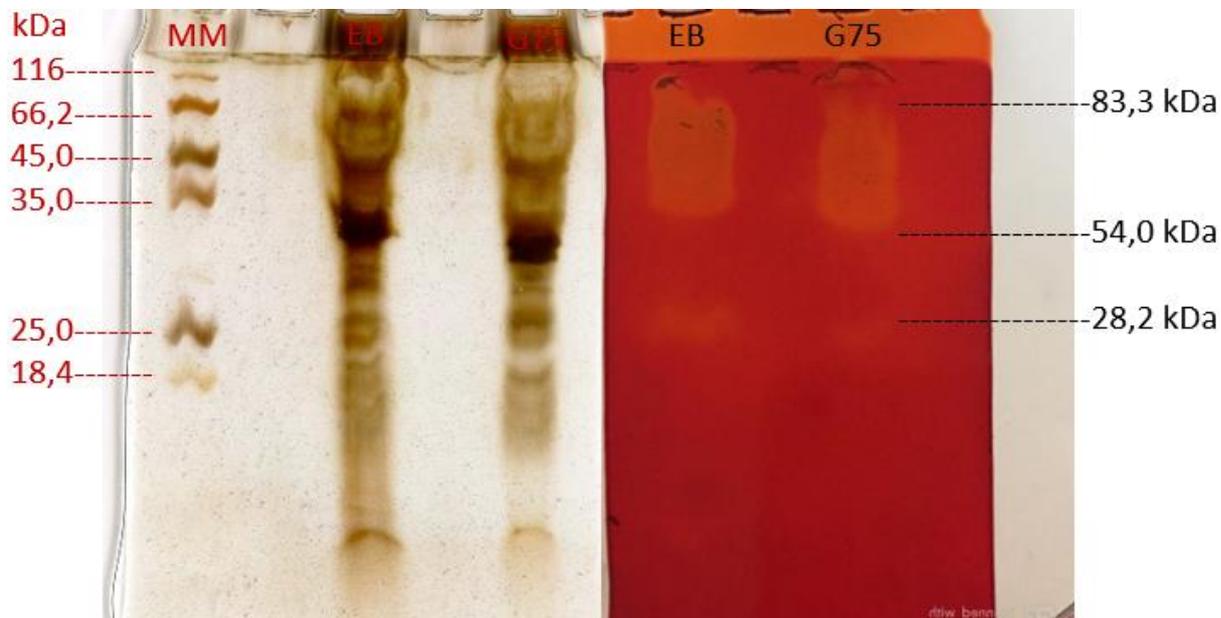


Figura 24: Géis de eletroforese SDS-PAGE e zimograma com amostras de extrato bruto e fração semi-purificada de G-75. As indicações referem-se a marcadores moleculares (MM), Extrato Bruto (EB) e Fração semi-purificada (G-75). Foram utilizados como marcadores moleculares: β -galactosidase, albumina bovina, ovalbumina, desidrogenase de lactato, Bsp98I REase e β -lactoglobulina (do maior para o menor).

Civas *et al.* (1984) cultivaram o *A. tamaritii* em galactomanana e determinaram a massa molecular da mananase purificada em 53 kDa. As mananases produzidas por diferentes microrganismos possuem massas moleculares variadas. Naganagouda *et al.* (2009) purificaram uma mananase de *A. niger* por meio cromatografia de troca iônica, e aferiram uma massa molecular de 66 kDa por meio de zimograma. Já utilizando o cultivo de *Penicillium freii* para a produção de mananases, Wang *et al.* (2012) encontraram uma massa molecular aparente de 72 kDa.

Mananases com massas moleculares menores também são descritas na literatura. Weingartner (2010) cultivou o *A. niger* em casca de soja encontrando uma massa molecular aparente de 45 kDa. Costa (2017) estimou a massa molecular de mananases produzidas por *C. byssicola* entre 36,6 kDa e 53 kDa.

5.6. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

5.6.1. EFEITO DA TEMPERATURA E PH

As amostras de extrato bruto e da fração de G-75 foram caracterizadas quanto ao efeito da temperatura nas suas atividades enzimáticas de mananase. Os ensaios foram realizado em quintuplicatas e envolveram diversas temperaturas. Os resultados obtidos podem ser observados abaixo (fig. 24).

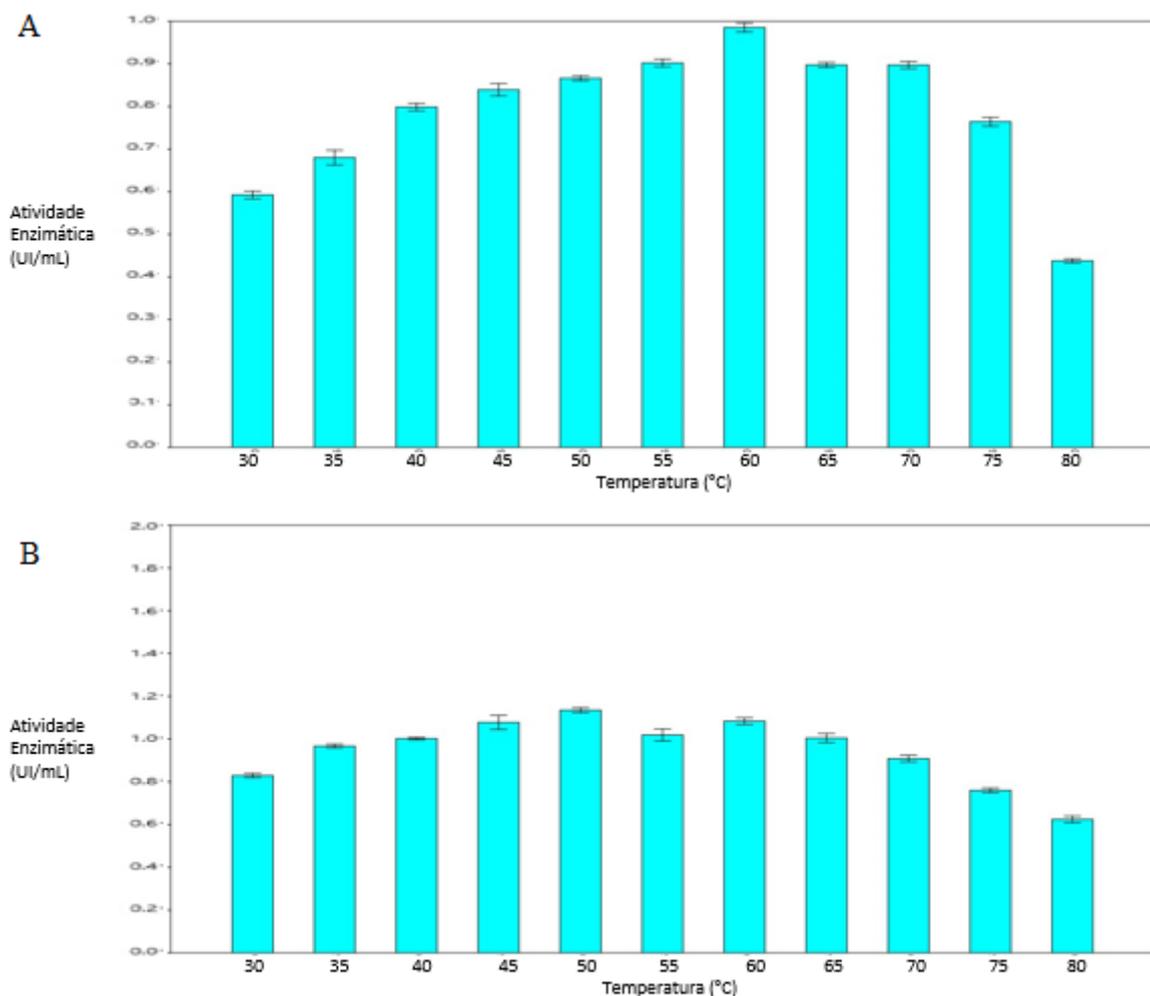


Figura 25: Efeito da temperatura na atividade enzimática de mananases presentes no Extrato bruto (A) e na fração de g75 (B).

Para as mananases do extrato bruto, a temperatura de maior atividade enzimática foi 60°C, já as mananases da fração semi-purificada apresentaram maior atividade na temperatura de 50°C. Os dados foram analisados estatisticamente, apontando diferenças significativas entre as temperaturas de maiores atividade e as demais.

As mesmas amostras citadas acima também foram submetidas a ensaios enzimáticos para a determinação do efeito do pH na atividade enzimática. Os ensaios ocorreram em quintuplicatas e a faixa de pH utilizada foi de 3,0 a 9,0. Os resultados do experimento podem ser observados abaixo (fig. 25).

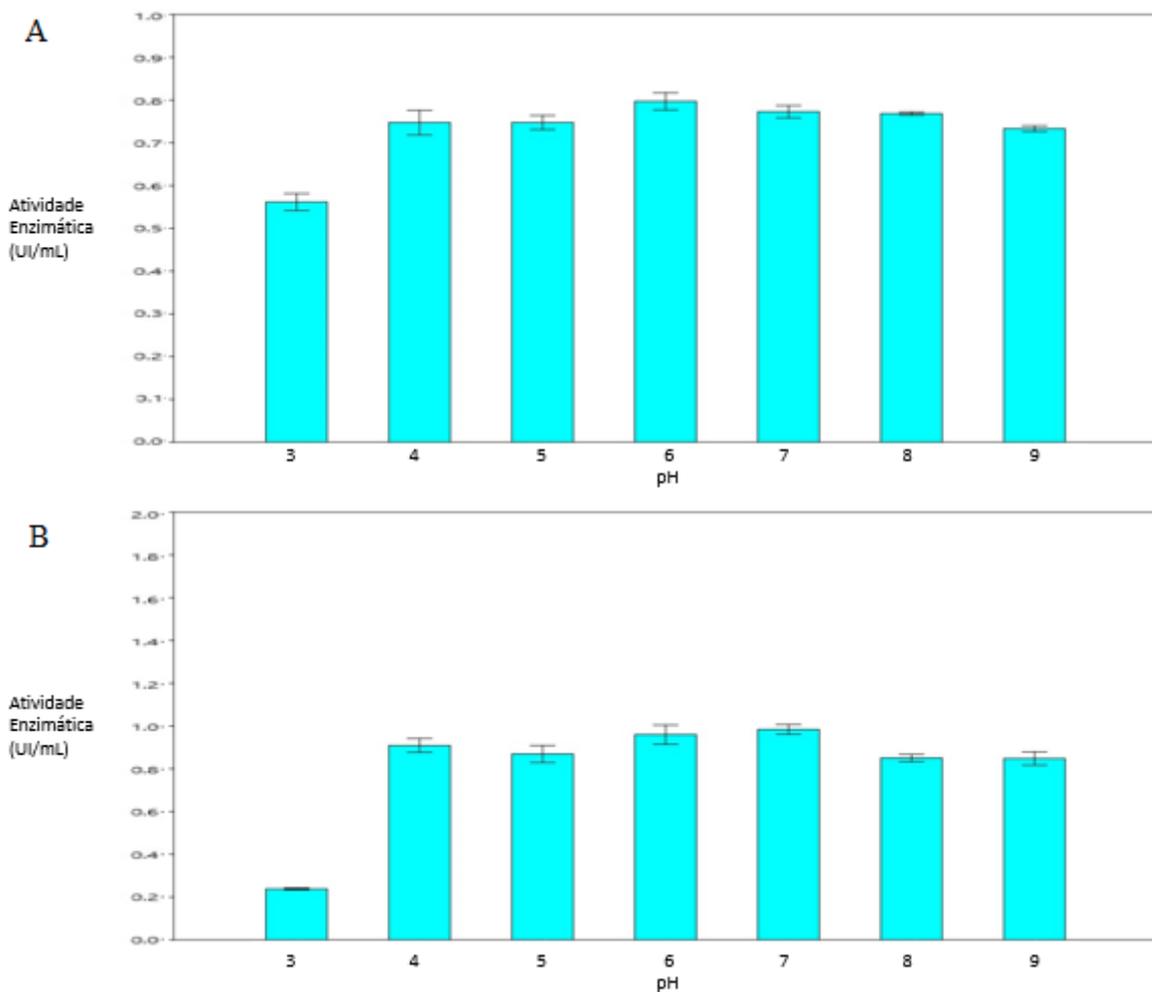


Figura 26: Efeito da variação de pH na atividade enzimática de mananases presentes no Extrato bruto (A) e na fração de g75 (B).

Os resultados dos experimentos de efeito de pH demonstram que as mananases presentes nas amostras de extrato bruto e na fração de G-75 não sofrem mudanças significativas nas atividades enzimáticas, com exceção do pH 3,0.

As análises estatísticas utilizadas (ANOVA e pareamento de Tukey) apontaram diferenças significativas apenas em relação ao pH 3,0 e os demais. Desse modo, as amostras podem ser utilizadas nas faixas de pH que variam de 4,0 a 9,0, sem que haja grandes perdas de atividade enzimática.

A maioria das mananases produzidas por fungos filamentosos possuem maiores atividades enzimáticas em faixas de pH ácidas. Naganagouda *et al.* (2009) encontraram o pH de maior atividade de sua mananase estudada na faixa de 5,5. Chai *et al.* (2006) e Zhang *et al.* (2019) também encontraram maiores atividades enzimáticas em pH ácido: 6,0. Entretanto, todos esses trabalhos citados registram quedas bruscas de atividades enzimáticas devido às variações de pH.

Mananases com maiores atividades enzimáticas em pH alcalino também são citadas na literatura, entretanto, não costumam ultrapassar a faixa de pH 10,0. Ootsuka *et al.* (2006) isolaram e uma mananase produzida pelo molusco marinho *Haliothis discus hannai* que possui maior atividade enzimática em pH 7,5. Os autores desse trabalho sugeriram aplicação dessa mananase em processos que envolvam degradação de materiais ricos em manana em pH ligeiramente alcalino, como na digestão de folhas de algas marítimas. Zheng *et al.* (2016) purificaram mananases que apresentaram maiores atividades enzimáticas em pH 9,5 e sugeriram suas aplicações em processos industriais que ocorrem em pH alcalino, como na indústria têxtil.

De modo semelhante, Sakai *et al.* (2017) caracterizou bioquimicamente uma mananase produzida por *A. oryzae* que apresenta retenção de atividade enzimática nas faixas de pH neutra e alcalinas, possibilitando aplicações em processos de indústrias de papel e celulose, produção de detergentes, e redução de viscosidade em extratos de café.

Quanto às temperaturas de maiores atividades enzimáticas encontradas para as amostras de extrato bruto e fração de G75, encontra-se resultados semelhantes na literatura. Nadaroglu *et al.* (2015) purificaram uma mananase produzida por *Lactobacillus plantarum* com maior atividade enzimática na temperatura de 50°C, assim como a mananase produzida pelo *A. tamarii* e semi-purificada nesse trabalho. Similarmente, Ximenes *et al.* (2005) purificaram uma

mananase de *Orpinomyces sp.* por meio de cromatografias de troca iônica e exclusão molecular, encontrando a temperatura de 50°C para maior atividade enzimática.

A temperatura de 60°C, definida como ponto de maior atividade para as mananases do extrato bruto desse trabalho, também é citada em outros estudos. Adiguzel *et al.* (2014) caracterizaram uma mananase de *Bacillus pumilus* e definiram 60°C como a temperatura de maior atividade enzimática. Essa enzima também manteve atividade constante em diferentes faixas de pH, possibilitando a aplicação em processos de clarificação de sucos de frutas como laranja, maçã e uva. Puchart *et al.* (2004) também encontraram maior atividade enzimática de mananase na temperatura de 60°C, utilizando o fungo *A. fumigatus* para a produção dessa enzima.

Experimentos a respeito dos efeitos de temperatura e pH são fundamentais para entender o funcionamento da enzima e para encontrar uma aplicação eficiente. Nesse aspecto, o resultado de efeito do pH permite a utilização da mananase em diversos processos biotecnológicos, assim como o resultado do efeito da temperatura, que apesar de variar em alguns pontos, não aponta perdas maiores que 50% na atividade enzimática, com exceção da temperatura de 80°C.

5.6.2. TERMOESTABILIDADE

A termoestabilidade enzimática é calculada com base no tempo de meia vida da enzima, que é o tempo necessário para que o valor de atividade enzimática original caia pela metade. A termoestabilidade é uma propriedade enzimática muito explorada em processos industriais que possuem diferentes tempos de duração e necessitam de enzimas que retenham uma quantidade considerável de atividade enzimática (Chauhan *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2015).

Amostras contendo mananases no extrato bruto e na fração semi-purificada G-75 foram incubadas em banho-maria em três temperaturas distintas: a temperatura de maior atividade enzimática, 10 °C acima da temperatura de maior atividade enzimática e 10 °C abaixo. O tempo de meia vida variou de acordo com a amostra e a temperatura, podendo ser expresso em minutos, horas ou até dias.

As mananases presentes no extrato bruto não apresentaram termoestabilidade a 70°C. Resultados como esse são comuns devido ao alto valor de temperatura, normalmente apresentando termoestabilidade nula, ou baixa. Cai *et al.* (2011) determinaram a

termoestabilidade a 70°C de mananase produzida por *Penicillium pinophilum*, encontrando o valor de 5 minutos, enquanto em outras temperaturas o tempo é consideravelmente maior.

Na temperatura de maior atividade enzimática (60°C), o tempo necessário para se alcançar a meia vida da enzima foi de 2 horas (fig. 26). Esse tempo é maior que o tempo encontrado no trabalho citado acima, em que Cai *et al.*(2011) determinaram uma meia vida de apenas 30 minutos a 60°C.

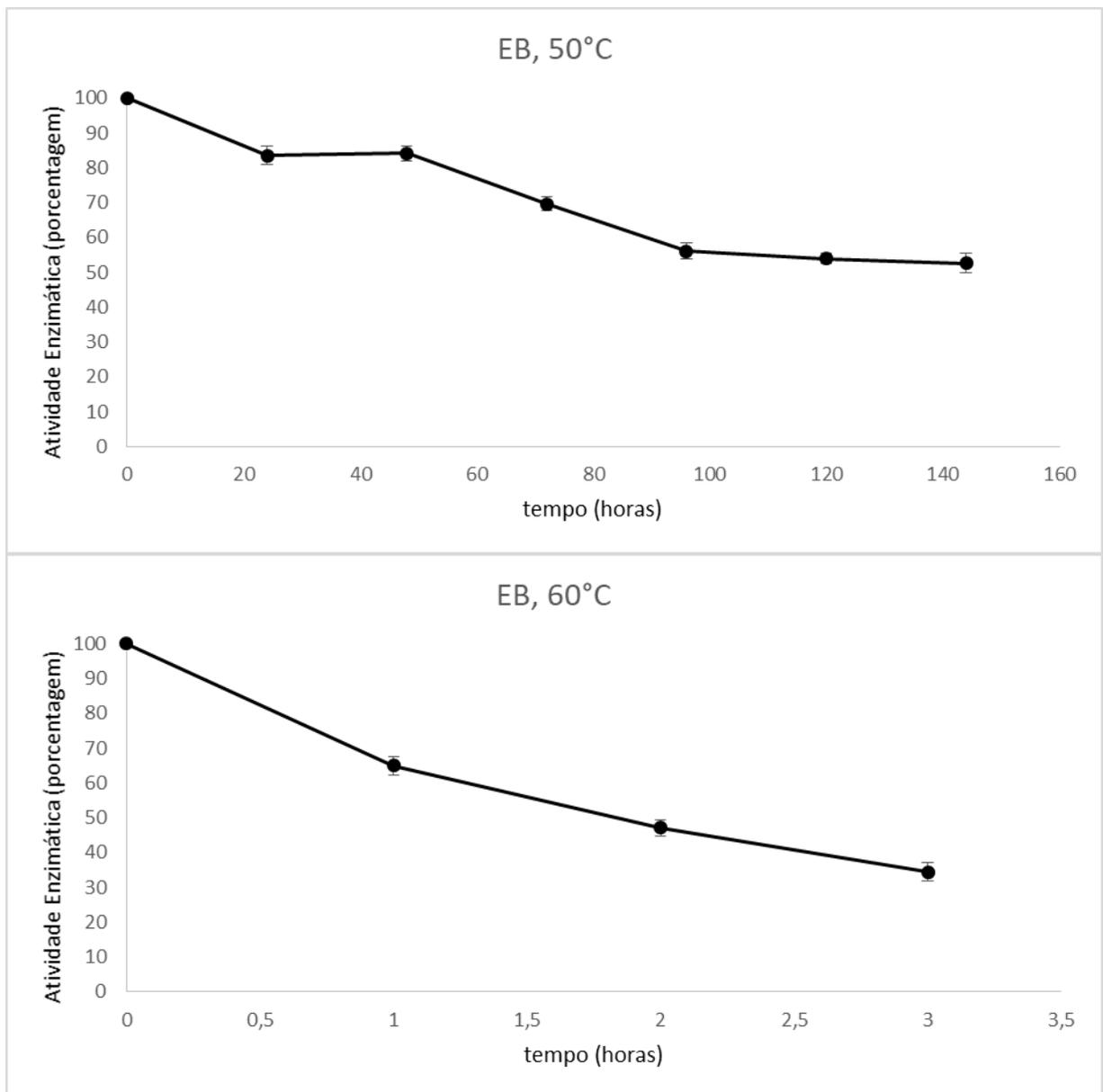


Figura 27: Determinação de termoestabilidade do extrato bruto a 50°C e 60 °C.

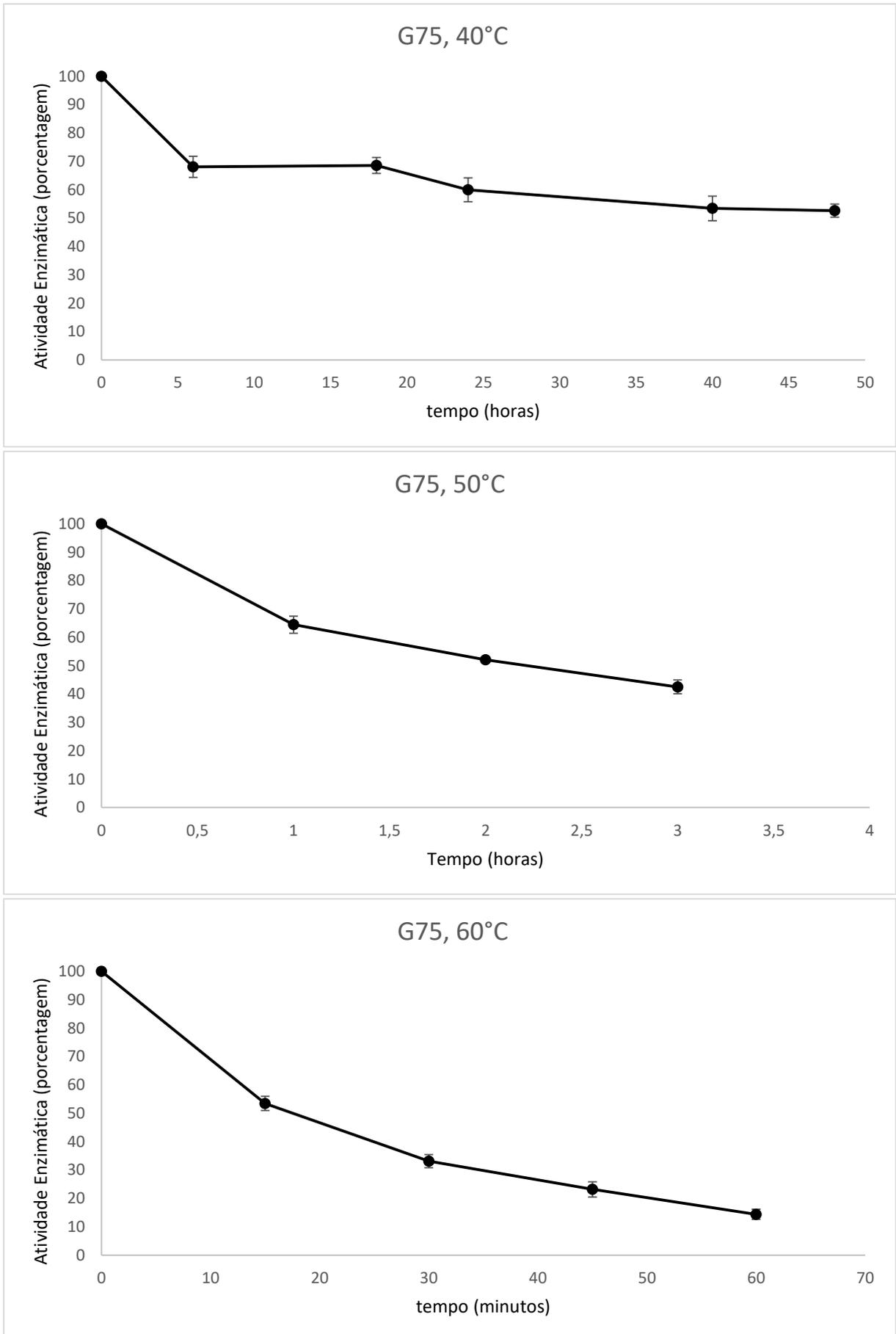


Figura 28: Determinação de termoestabilidade da fração de G-75 a 40 °C, 50°C e 60 °C.

Quando incubadas a 50 °C, as mananases do extrato bruto apresentaram o maior valor de termoestabilidade. As enzimas estudadas só perderam 50% do valor original de atividade enzimática após 144h (6 dias) de incubação. Nessa temperatura o valor de termoestabilidade costuma ser variado. You *et al.* (2016) encontram a meia vida de 60 minutos para mananases purificadas produzidas por *Enterobacter sp.* Costa, (2017) determinou a termoestabilidade a 50 °C de mananases presentes no extrato bruto concentrado, e essas enzimas, produzidas por *C. byssicola*, apresentaram meia vida de 4 horas nessa temperatura. A termoestabilidade é uma propriedade importante para viabilizar a utilização da enzima em processos biotecnológicos, principalmente em processos de branqueamento de papel (Chauhan *et al.*, 2012).

A termoestabilidade das mananases presentes na fração semi-purificada de Sephadex G-75 alcançou valores menores (fig. 27). Na temperatura de 60 °C a termoestabilidade foi de apenas 15 minutos. Sakai *et al.* (2017) cultivou o fungo *A. oryzae* para a produção e purificação de mananases, encontrando na fração purificada mananases com termoestabilidade de 120 minutos a 60°C.

A fração de Sephadex G-75 apresentou termoestabilidades de 48 horas e 2 horas, quando incubadas a 40 °C e 50 °C, respectivamente. Tempos menores que esses são descritos na literatura, como por exemplo, Song *et al.* (2008) encontraram a meia vida de atividade de mananase em 10 minutos utilizando temperaturas de 35 °C a 50 °C.

As mananases contidas no extrato bruto do cultivo de *A. tamaritii* apresentaram maiores termoestabilidades nas temperaturas estudadas em relação à fração obtida da cromatografia em coluna Sephadex G-75. Portanto, o extrato bruto mostrou-se mais adequado para utilização em processos biotecnológicos que exijam maior termoestabilidade de mananase.

5.6.3. EFEITO DE ÍONS METÁLICOS E EDTA NA ATIVIDADE DE MANANASE

Os fungos produtores de enzimas hidrolíticas estão constantemente em contato com íons metálicos na natureza, e essa interação pode interferir nas atividades enzimáticas. Segundo Júnior, (2014), os íons metálicos podem atuar como eletrófilos, podendo também interferir na relação enzima-substrato.

Ensaio de atividade enzimática na presença de íons metálicos e EDTA foram realizados em quintuplicata e utilizando variações de molaridade para mensurar a interação das mananases

do extrato bruto e da fração de G-75 de acordo com suas atividades enzimáticas relativas. Os resultados podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2: Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade enzimática de mananase nas concentrações 1 mM e 10 mM. Desvios padrões estão representados ao lado dos valores de atividade relativa.

	Atividade Relativa (%)			
	EB 1 mM	EB 10 mM	G75 1 mM	G75 10 mM
Controle	100 ± 1,247	100 ± 1,247	100 ± 1,676	100 ± 1,676
EDTA	82,114 ± 3,24	71,348 ± 0,864	96,661 ± 0,941	94,147 ± 3,117
CaCl₂	66,065 ± 5,152	65,124 ± 3,303	78,529 ± 6,764	75,294 ± 3,014
CoCl₂	79,039 ± 3,8	75,112 ± 5,918	85,691 ± 3,382	72,191 ± 1,367
CuSO₄	77,913 ± 2,986	61,678 ± 0,087	57,588 ± 2,352	54,073 ± 6,75
FeCl₃	75,014 ± 2,723	8,15 ± 0,579	86,647 ± 0,97	8,367 ± 1,397
FeSO₄	64,818 ± 0,054	4,321 ± 0,874	95,044 ± 4,661	7,911 ± 0,367
KCl	75,079 ± 5,524	77,157 ± 1,083	76,573 ± 7,661	77,617 ± 3,75
MgCl₂	74,532 ± 4,124	82,824 ± 0,492	74,205 ± 2,97	56,323 ± 2,235
MgSO₄	71,556 ± 3,041	64,041 ± 0,054	67,455 ± 3,897	57,985 ± 2,514
ZnSO₄	73,81 ± 0,164	74,991 ± 1,192	58,352 ± 4,014	61,485 ± 1,014

Os resultados indicam que os íons metálicos, Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Mg^{3+} e Zn^{2+} inibiram a atividade enzimática de mananase em diferentes níveis. Para as amostras de extrato bruto, as maiores inibições ocorreram nas presenças de Fe^{2+} e Fe^{3+} , ambos na concentração final de 10 mM. Em seguida, as maiores inibições foram nas presenças dos íons Ca^{2+} , Cu^{2+} e Mg^{3+} , também na concentração final de 10 mM.

Para as amostras de G-75, as maiores inibições também ocorreram perante incubação na presença de Fe^{2+} e Fe^{3+} a 10 mM. Na sequência, os valores de maiores inibições foram obtidos nas presenças de Mg^{2+} , Mg^{3+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} na concentração final de 10 mM.

Não houve aumentos de atividades enzimáticas de mananase do extrato bruto nem da fração semi-purificada de G-75, em ambas as concentrações finais analisadas.

Os íons bivalentes mais reportados como inibidores de enzimas hidrolíticas são Cobre e Ferro. Os mecanismos das ações inibitórias desses íons ainda não são bem explicados (Tejirian e Xu, 2010). Outros trabalhos também citam inibições pelos íons ferro e cobre. Costa, (2017) relatou níveis menores de inibições da atividade de mananase na presença de Ferro bivalente e trivalente, e também níveis maiores de inibição do íon bivalente Cobre em relação a esse trabalho. Entretanto, nesse mesmo trabalho, Costa, (2017) relatou aumento de atividade enzimática quando a enzima foi incubada na presença do íon bivalente cobalto (Co^{2+}). Contrariando as inibições citadas acima, Infante, (2014), encontrou um aumento na atividade enzimática de mananase quando incubada na presença de Ferro bivalente, tanto na concentração de 1 mM quanto na concentração de 10 mM. Nesse caso, a autora encontrou os maiores efeitos inibitórios devido às presenças de ferro trivalente e cobre bivalente na concentração de 10 mM.

As mananases do EB e de G-75 não sofreram perdas de atividades enzimáticas significativas quando incubadas nas presenças da maior parte dos íons analisados. A presença de íons metálicos e EDTA (com exceção dos íons de Ferro) não é um fator limitante para potenciais aplicações biotecnológicas dessa enzima.

5.6.4. EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA ATIVIDADE DE MANANASE

A parede celular vegetal é uma estrutura complexa formada principalmente por celulose, hemicelulose (manana, dentre outros polímeros), pectina e lignina. A despolimerização de lignina, que pode ocorrer por meio de processos enzimáticos ou pré-tratamentos, libera compostos fenólicos que podem interagir nas atividades das enzimas que serão utilizadas em

sequência. O pré-tratamento LHW (liquid hot water) comumente libera compostos fenólicos que atuam como inibidores de enzimas hidrolíticas (Moreira, *et al.*, 2013). Essa interação pode resultar em inibição parcial ou completa. Além disso, compostos fenólicos são frequentemente reportados atuando de forma inibitória na conversão de glicose, xilose e outros carboidratos em etanol, em processos fermentativos utilizando leveduras (Tejirian e Xu, 2011).

As amostras de extrato bruto e de G-75 foram incubadas em temperatura ambiente por 20 minutos na presença dos compostos fenólicos Vanilina, Ácido tânico, Ácido 4-hidróxi-benzóico, Ácido ferúlico e Ácido p-cumárico, em seguida tiveram suas atividades relativas calculadas. Os resultados podem ser observados abaixo (tab. 3).

Tabela 3: efeito de compostos fenólicos sob as atividades enzimáticas de mananase do Extrato Bruto e da fração de G-75. Desvios padrões estão representados ao lado dos valores de atividade relativa.

	Atividade Relativa (%)	
	EB	G75
Controle	100 ± 1,247	100 ± 1,676
Vanilina	68,964 ± 5,612	53,617 ± 1,514
Ácido tânico	63,308 ± 6,137	65,22 ± 1,926
Ácido 4-hidróxi-benzóico	68,121 ± 0,765	68,632 ± 4,735
Ácido ferúlico	85,679 ± 2,592	93,5 ± 3,8
Ácido p-cumárico	72,519 ± 5,666	72,911 ± 3,161
Ácido cinâmico	54,84 ± 3,467	59,897 ± 4,882

As amostras de extrato bruto incubadas com os compostos fenólicos tiveram atividades enzimáticas de mananase inibidas. A menor inibição foi registrada na presença de ácido ferúlico, por volta de 15% da atividade original. Já a maior inibição foi decorrente da incubação

com ácido cinâmico na concentração de 1 mg/mL, em que a atividade enzimática foi reduzida aproximadamente 45% em relação a atividade original. Costa, (2017) também apontou o ácido cinâmico como o maior inibidor de atividade enzimática de mananase do extrato bruto concentrado, com uma inibição em 43,3 % da atividade original. Nesse mesmo trabalho, todos os compostos fenólicos causaram inibições na atividade de mananase.

As amostras de G-75 foram submetidas ao mesmo processo de incubação e apresentaram valores de inibição semelhantes. A menor inibição aconteceu na presença de ácido ferúlico, apenas 6,5 % de perda de atividade enzimática. Gomes, (2014), relatou um aumento de 150 % na atividade de mananase em uma fração semi-purificada quando incubada na presença de ácido ferúlico. No mesmo trabalho citado, a incubação com ácido cinâmico apresentou a maior inibição enzimática. A tabela 3 mostra a vanilina como o composto fenólico de maior inibição, registrando uma diminuição de 46 % em relação à atividade enzimática original. A vanilina também já foi reportada agindo como composto inibidor de atividades enzimáticas de xilanases. Monclaro *et al.* (2019), relataram uma inibição de 27 % na atividade enzimática, que foi a mais alta inibição encontrada dentre os compostos fenólicos utilizados. Moreira *et al.*, (2013), reportaram o ácido cinâmico e a vanilina como os maiores inibidores para as xilanases estudadas, apontando que esses efeitos inibitórios são motivados devido a alterações conformacionais que resultam em inativações estéricas.

Os compostos fenólicos são moléculas que colaboram para a recalcitrância da parede celular vegetal, portanto, a remoção desses compostos podem facilitar o processo de aproveitamento de biomassa lignocelulósica, além de obter coprodutos como a vanilina, que é utilizada como aromatizante artificial (Boukari *et al.*, 2011).

5.6.5. CARACTERIZAÇÕES DE MANANASES NA LITERATURA

A tabela (tab. 4) a seguir compara os valores obtidos na caracterização de mananase produzida por *A. tamaritii* com caracterizações encontradas em outros trabalhos, de mananases purificadas ou semi-purificadas.

De acordo com a tabela, as mananases são reportadas mais frequentemente com maiores atividades enzimáticas em pH ácido e temperaturas superiores ou iguais a 50 °C. As outras características (termoestabilidade, efeito de íons metálicos e efeito de compostos fenólicos) são mais diversas, assim como os microrganismos produtores de mananase.

Tabela 4: Caracterizações de mananase purificadas ou semipurificadas. A utilização de traços significa que o trabalho não abordou a característica relacionada.

Referência	Organismo	Temperatura de maior atividade	pH de maior atividade	Termoestabilidade	Maior inibição ión metálico	Maior inibição composto fenólico
Neste estudo	<i>A. tamaritii</i>	50 °C	7,0	48h, a 40°C	Fe ²⁺	Vanilina
Adesina <i>et al.</i> , (2013)	<i>A. niger</i>	30 °C	5,5	—	Fe ³⁺	—
Kumagai <i>et al.</i> , (2011)	<i>S.thermolacinus</i>	50 °C	5,5	30 min a 80 °C	Fe ²⁺	—
Liao <i>et al.</i> , (2014)	<i>P. oxalicum</i>	80 °C	4,0	30 min a 70 °C	Hg ²⁺	—
Pradeep <i>et al.</i> , (2016)	<i>Streptomyces sp.</i>	60 °C	12,5	30 min a 70 °C	Cu ²⁺	—
Infante <i>et al.</i> , (2015)	<i>A. foetidus</i>	60 °C	5,5	11 dias, a 50°C	Fe ³⁺	Ácido cinâmico
Weingartnr, (2010)	<i>A. niger</i>	60 °C	4,0	—	Zn ²⁺	—
Costa, (2017)	<i>C. byssicola</i>	45 °C	5,0	20 min a 50°C	Fe ²⁺	Ácido p-cumárico
Pangsri <i>et al.</i> , (2015)	<i>B. circulans</i>	60 °C	6,0	60 min a 60 °C	Ca ²⁺	—
Civas <i>et al.</i> , (1984)	<i>A. tamaritii</i>	—	4,5	20 min a 60 °C	—	—

5.7. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O experimento de hidrólise ocorreu em quintuplicatas utilizando como substratos a casca de soja e a manana (locust bean). Como amostras enzimáticas, foram utilizados 15 ug de proteínas do extrato bruto e da fração semipurificada de G-75.

Pela ação de enzimas do extrato bruto, a liberação de açúcares redutores aumentou até o tempo de 24 horas, decrescendo após esse período. A maior quantidade de açúcar redutor liberado foi de 0,23 ug/mL. Costa, (2017) utilizou o extrato bruto concentrado para hidrolisar a casca de soja, e obteve aumento de liberação de açúcar até 24h, mantendo o valor até 72h, aumentando após esse período.

A hidrólise em casca de soja só liberou açúcares redutores quando foram utilizadas as enzimas do extrato bruto (fig. 28). A incapacidade da fração semipurificada em hidrolisar a casca de soja foi observada em todos os intervalos de tempo, indicando que o método de purificação utilizado foi prejudicial no aspecto da hidrólise em resíduo agroindustrial, possivelmente por causa de perdas de outras enzimas durante o processo cromatográfico. Entretanto, o método utilizado para a detecção de açúcares redutores (DNS) não permite a identificação e quantificação de possíveis oligômeros liberados durante o experimento de hidrólise.

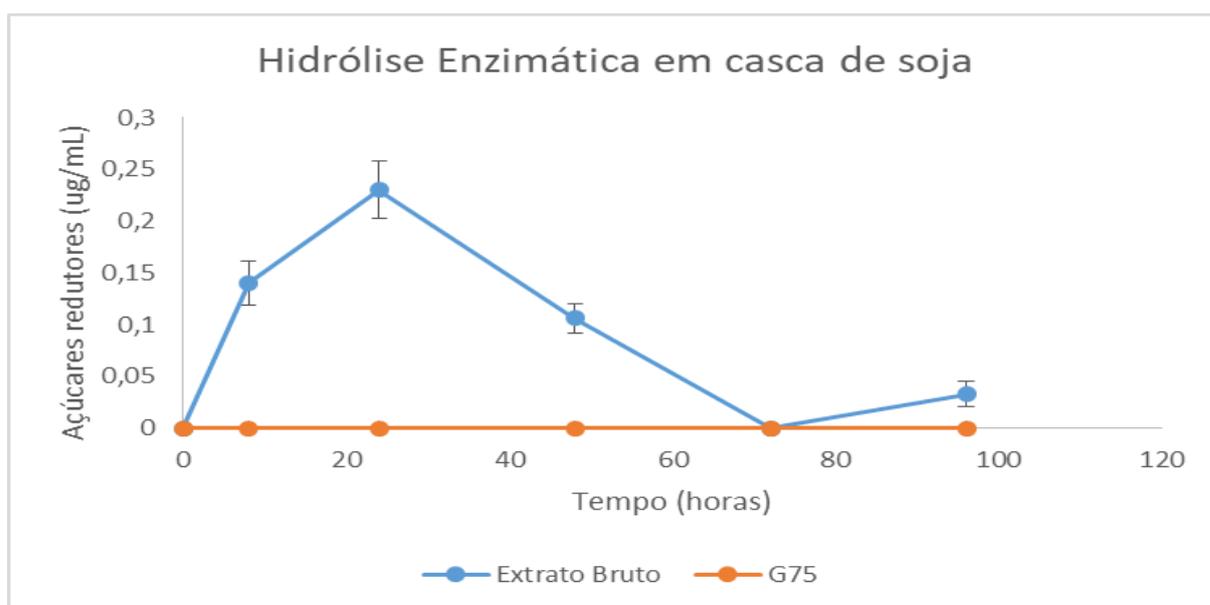


Figura 29: Hidrólise Enzimática utilizando casca de soja como substrato.

A hidrólise enzimática utilizando a manana como substrato apresentou maiores quantidades de açúcares redutores liberados. O valor máximo de açúcar liberado foi de 3,8 ug/mL, no tempo de 24h, utilizando o extrato bruto (fig. 29).

Assim como no ensaio utilizando casca de soja, o extrato bruto foi mais eficiente na hidrólise do substrato. A liberação de açúcares pelo EB aumentou até 24 h, registrando uma queda no período de 48h, voltando a aumentar significativamente no tempo de 96h. Já no ensaio utilizando G-75, a liberação também aumentou até 24h, entretanto, foi diminuindo a partir desse tempo. A hidrólise utilizando manana liberou quantidades significativamente maiores de açúcares redutores totais em relação à hidrólise em casca de soja. Esse resultado é devido às constituições dos substrato: a manana utilizada é rica em galactomanana, enquanto a casca de soja possui todos os polímeros de parede celular, como lignina, celulose, pectina e hemicelulose.

A diferença de recalcitrância também interfere na hidrólise desses substratos. A casca de soja possui uma estrutura muito mais complexa e recalcitrante em comparação à manana, que passou por processo de refino, aumentando a homogeneidade de polímeros na composição, e diminuindo a recalcitrância do substrato.

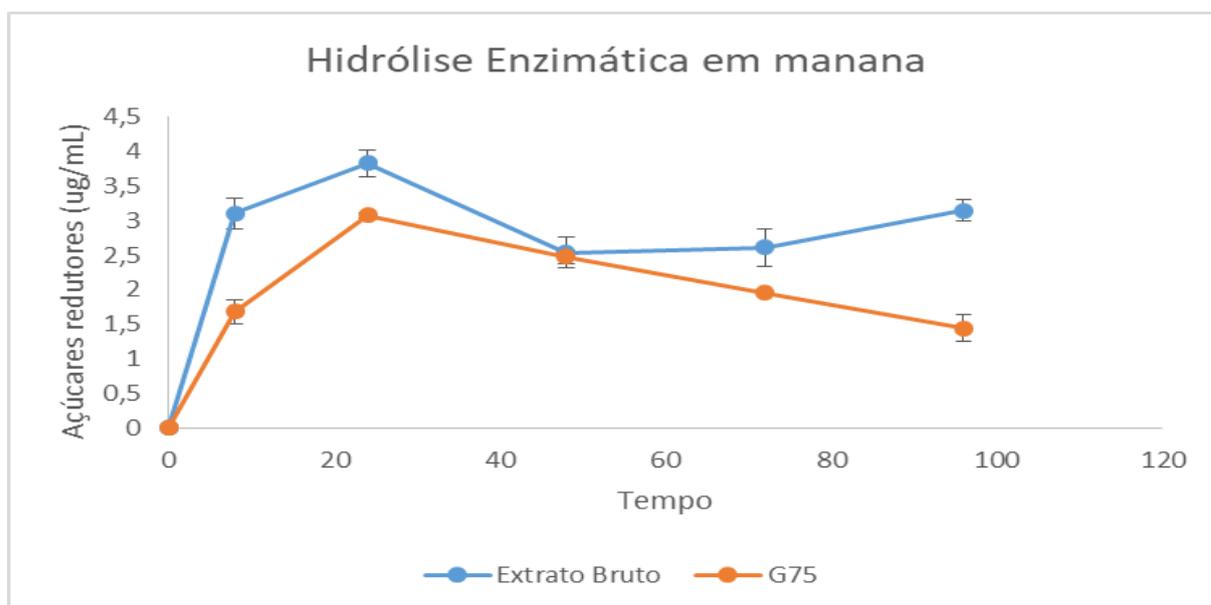


Figura 30: Hidrólise enzimática utilizando manana como substrato.

Amostras purificadas e semi-purificadas de mananase também são utilizadas em ensaios de hidrólise utilizando outros substratos. Al-Shorgani *et al.* (2016) utilizaram resíduos

agroindustriais obtidos da indústria de óleo de palma como substrato, em um experimento que utilizou enzimas comerciais. Nesse trabalho, os açúcares liberados foram utilizados para a produção de biobutanol.

Os resultados obtidos no experimento de hidrólise enzimática apontaram o extrato bruto como melhor fonte de enzimas para hidrólise em casca de soja e fibras de manana. Além de maior liberação de açúcares, o extrato bruto pode ser produzido com menor custo financeiro, demanda menos tempo e técnicas para obtenção, permitindo também um maior rendimento. As termoestabilidades das amostras de extrato bruto e da fração de G75 também colaboram para o resultado encontrado, tendo em vista que a mananase presente no extrato bruto alcança sua meia vida em um período de tempo maior.

A quantidade decrescente de açúcares redutores detectados após o período de 24 horas deve-se ao fenômeno de transglicosilação, que ocorre em algumas enzimas do tipo glicosil hidrolase, favorecendo a formação de oligossacarídeos a partir de monossacarídeos, como manose e glicose (Li *et al.*, 2015).

6. CONCLUSÕES

O cultivo do fungo filamentosso *A. tamaritii* para a produção de mananase ainda é pouco citado na literatura, sendo as xilanases as enzimas mais relacionadas a esse fungo. Neste trabalho, esse fungo mostrou capacidade de produzir enzimas lignocelulolíticas (principalmente mananase) quando cultivado em meio líquido na presença de casca de soja como fonte de carbono. Esse substrato por sua vez, apresentou maior capacidade de indução enzimática no *A. tamaritii* comparado ao bagaço de cana-de-açúcar, pois apresenta maior quantidade de hemicelulose e menores quantidades de lignina, características que podem facilitar a utilização desse resíduo agroindustrial em processos biotecnológicos, exigindo métodos de pré-tratamentos mais brandos.

As caracterizações da mananase presente no extrato bruto e na fração semipurificada apresentaram resultados com poucas diferenças. Os resultados de efeito de temperatura, efeito de pH e termoestabilidade permitem a aplicação em processos industriais como o branqueamento de papel, e clarificação de sucos. As enzimas em ambas amostras apresentaram

resultados relevantes quanto à variação de faixas de pH em que podem ser utilizadas sem sofrer perdas significativas de atividade enzimática de mananase. O extrato bruto apresentou um resultado considerável quanto a termoestabilidade a 50 °C (temperatura comum em processos industriais), em que mantém a atividade enzimática sem perdas relevantes por alguns dias. Não houve íons metálicos ou compostos fenólicos que aumentassem a atividade enzimática da mananase.

O processo de purificação da mananase de *A. tamaritii* ainda deve ser aprimorado a fim de tornar mais acurada a caracterização enzimática, entender as propriedades catalíticas e aumentar as possibilidades de aplicações que demandem diferentes níveis de pureza.

O ensaio de hidrólise enzimática revelou que o extrato bruto se sobressai em relação a amostra semi-purificada quanto a liberação de açúcares, característica que permite aplicação em processos que demandam monossacarídeos como matéria-prima, como ocorre nas indústrias de rações animais, alimentícias e farmacêuticas.

7. PERSPECTIVAS

- Os parâmetros de cultivo submerso, tais como pH, temperatura e agitação, devem ser aprimorados, de modo a desenhar uma produção enzimática mais eficiente e economicamente viável.
- Obter uma fração purificada da mananase a fim de se obter mais informações a respeito de suas características bioquímicas. A purificação também apontará a presença de um ou mais tipos de enzimas mananolíticas.
- Avaliar aplicações em processos que demandam enzimas que atuem em pH alcalinos como no branqueamento de papel.
- Considerar a viabilidade de clonagem e expressão da mananase.

8. REFERÊNCIAS

ADESINA, C.; OMOLOLA, A. O.; ABIODUN, A. O. Production, purification and characterisation of a α -mannanase by *Aspergillus niger* through solid state fermentation (SSF) of *Gmelina arborea* shavings. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 4, p. 282–289, 2013.

ADIGUZEL, A.; NADAROGLU, H.; ADIGUZEL, G. Purification and characterization of β -mannanase from *Bacillus pumilus* (M27) and its applications in some fruit juices. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 5292–5298, 2014.

AL-SHORGANI, N. K. N.; SHUKOR, H.; ABDESHAHIAN, P.; RAHMAN, N. A.; HAMID, A. A.; KALIL, M. S. Enhanced mannan-derived fermentable sugars of palm kernel cake by mannanase-catalyzed hydrolysis for production of biobutanol. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 257–264, 2016.

ALBUQUERQUE, D.; COSTA, L.; XIMENES, E.; FILHO, F. Microbial β -mannosidases and their industrial applications. 2018.

ALSARRANI, A. Q. Production of Mannan-degrading enzyme by *Aspergillus niger*. **Journal of Taibah University for Science**, v. 5, n. 1, p. 1–6, 2013.

AULITTO, M.; FUSCO, S.; LIMAURO, D.; FIORENTINO, G.; BARTOLUCCI, S.; CONTURSI, P. Galactomannan degradation by thermophilic enzymes: a hot topic for biotechnological applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 0, 2019.

AYUSO-FERNÁNDEZ, I.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; MARTÍNEZ, A. T. Evolutionary convergence in lignin-degrading enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 25, p. 6428–6433, 2018.

BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R.; SILVA, V. L.; COLODETTE, J. L. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI-CG/EM). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2035–2041, 2008.

BEGUIN, P., AUBERT, J. (1994). The biological degradation of cellulose. **Annual Review of Microbiology**, v. 2, n. 12, p. 25–58, 1994.

BEHERA, B. C.; SETHI, B. K.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K.; THATOI, H. N. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 197–210, 2017.

BERGER, M. Pectinases e pectina : aplicação comercial e potencial biotecnológico. **Caderno pedagógico**, p. 130–139, 2014.

BHOWMICK, G. DE; SARMAH, A. K.; SEN, R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1144–1154, 2018.

BISCHOFF, K. M.; SHI, L.; KENNELLY, P. J. The detection of enzyme activity following sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 260, n. 1, p. 1–17, 1998.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93–99, 1987.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 519–546, 2003.

BOUKARI, I.; O'DONOHUE, M.; RÉMOND, C.; CHABBERT, B. Probing a family GH11 endo- β -1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3–4, p. 130–138, 2011.

BRADFORD, M. M. Sistema séptico domiciliario | Rotomoldeo en Colombia Tanques Plasticos En Colombia Rotoplast. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRINK, J. VAN DEN; VRIES, R. P. DE. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1477–1492, 2011.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 14, p. 1879–1900, 2009.

CAI, H.; SHI, P.; LUO, H.; BAI, Y.; HUANG, H.; YANG, P.; YAO, B. Acidic β -mannanase from *Penicillium pinophilum* C1: Cloning, characterization and assessment of its potential for animal feed application. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 6, p. 551–557, 2011.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; SUZANE DOS SANTOS MILESSI, T.; ANTUNES, F. A. F.; LUIZ DA COSTA FREITAS, W.; GRAÇAS ALMEIDA FELIPE, M. DAS; SILVA, S. S. DA. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

CAPOLUPO, L.; FARACO, V. Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 22, p. 9451–9467, 2016.

CARVALHO, C. Produção de ligninases por basidiomicetos através de fermentação em estado sólido, caracterização e aplicação das enzimas. **Aleph**, 2005.

CASSALES, A.; SOUZA-CRUZ, P. B. DE; RECH, R.; ZÁCHIA AYUB, M. A. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4675–4683, 2011.

CÉLIA, L.; LESSA, T. B.; RAMOS, P.; RICI, R. E. G.; BOMBONATO, P. P.; AMBRÓSIO, C. E. Archives of Veterinary Science. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, n. 4, p. 63–69, 2012.

CHAI, P.; JIANG, Z.; LI, L.; WEI, Y.; KUSAKABE, I.; LI, D. High-level production, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 1, p. 88–96, 2006.

CHAUHAN, P. S.; GUPTA, N. Insight into microbial mannosidases: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 190–201, 2017.

CHAUHAN, P. S.; PURI, N.; SHARMA, P.; GUPTA, N. **Mannanases: Microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012.

CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 4, p. 413–433, 2006.

CHEN, H. **Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose**. [s.l: s.n.].

CIVAS, A.; EBERHARD, R.; DIZET, P. LE; PETEK, F. Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii*. Mycelial α -d-galactosidases. **Biochemical Journal**, v. 219, n. 3, p. 849–855, 1984.

COSTA, D. A. L. Caracterização parcial de Mananases produzidas por *Clonostachys byssicola* cultivado em Casca de Soja. p. 85, 2017.

COSTA, G.; PLAZANET, I. Plant Cell Wall, a Challenge for Its Characterisation. **Advances in Biological Chemistry**, v. 06, n. 03, p. 70–105, 2016.

CRUZ, A. DA. Mannan-Degrading Enzyme System. **Fungal Enzymes**, n. November, 2013.

CRUZ, A. F. DA. Mannan-degrading enzyme system. **Fungal Enzymes**, n. July 2013, p. 233–257, 2016.

DA, J.; INFANTE DE MARCO, C.; MARCO, J. DA C. I. DE. Produção e caracterização de mananase de *Aspergillus foetidus* cultivado em casca do grão da soja. p. 1–72, 2014.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; Opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578–595, 2009.

DEBIAGI, F.; MADEIRA, T. B.; NIXDORF, S. L.; MALI, S. Pretreatment Efficiency Using Autoclave High-Pressure Steam and Ultrasonication in Sugar Production from Liquid Hydrolysates and Access to the Residual Solid Fractions of Wheat Bran and Oat Hulls. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2019.

DHAWAN, S.; KAUR, J. Microbial mannanases: An overview of production and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 197–216, 2007.

DHAWAN, S.; SINGH, R.; KAUR, R.; KAUR, J. A β -mannanase from *Paenibacillus* sp.: Optimization of production and its possible prebiotic potential. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 5, p. 669–678, 2016.

DOHERTY, W. O. S.; MOUSAVIOUN, P.; FELLOWS, C. M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 2, p. 259–276, 2011.

DORNEZ, E.; GEBRUERS, K.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Grain-associated xylanases: occurrence, variability, and implications for cereal processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 11–12, p. 495–510, 2009.

E.L.V. HARRIS AND S. ANGAL. Protein Purification Methods: A Practical Approach. **Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation**, 1994.

ESCAMILLA-ALVARADO, C.; PÉREZ-PIMIENTA, J. A.; PONCE-NOYOLA, T.; POGGI-VARALDO, H. M. An overview of the enzyme potential in bioenergy-producing biorefineries. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 5, p. 906–924, 2017.

FERREIRA, H. M.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a β -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 1, p. 23–29, 2004.

FILHO, S. Biorrefinaria : um conceito sustentável para agregação de valor a resíduos. v. I, p. 98–105, 2011.

GOMES, H. A. R. Perfil e caracterização de holocelulases secretadas por *Penicillium fellutanum* com ênfase em mananase. p. 80, 2014.

GUCHI, E.; AYALEW, A.; DEJENE, M.; KETEMA, M.; ASALF, B.; FININSA, C. Occurrence of *Aspergillus* Species in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) along the Value Chain in Different Agro-Ecological Zones of Eastern Ethiopia. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 309–317, 2014.

GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; ROUSSOS, S.; AUGUR, C. Effect of the nitrogen source on caffeine degradation by *Aspergillus tamarii*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 50–55, 2004.

INFANTE DE MARCO, J. DA C.; SOUZA NETO, G. P. DE; SOUZA CASTRO, C. F. DE; MICHELIN, M.; POLIZELI, M. DE L. T. M.; FERREIRA FILHO, E. X. Partial purification and characterization of a thermostable β -mannanase from *Aspergillus foetidus*. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 5, n. 4, p. 881–893, 2015.

ITO, Y.; PETERSON, S. W.; WICKLOW, D. T.; GOTO, T. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *flavi*. **Mycological Research**, v. 105, n. 2, p. 233–239, 2001.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931–2944, 2005.

JÚNIOR, P. J. G. “Caracterização de holocelulases fúngicas na otimização da biomassa lignocelulósica”. p. 187, 2014.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188–203, 2014.

KAIRA, G. S.; PANWAR, D.; KAPOOR, M. Recombinant endo-mannanase (ManB-1601) production using agro-industrial residues: Development of economical medium and application in oil extraction from copra. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 220–227, 2016.

KONDO, A.; ISHII, J.; OKAZAKI, F.; HASUNUMA, T.; OKAI, N.; HARA, K. Y. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 513–522, 2012.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–10, 2011.

KUMAGAI, Y.; USUKI, H.; YAMAMOTO, Y.; YAMASATO, A.; ARIMA, J.; MUKAIHARA, T.; HATANAKA, T. Characterization of calcium ion sensitive region for β -Mannanase from *Streptomyces thermolilacinus*. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 9, p. 1127–1133, 2011.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377–391, 2008.

LAEMMLI, U. K. © 1970 Nature Publishing Group. **Nature Publishing Group**, 1970.

LI, Y. X.; LIU, Y.; YAN, Q. J.; YANG, S. Q.; JIANG, Z. Q. Characterization of a novel glycoside hydrolase family 5 β -mannosidase from *Absidia corymbifera* with high transglycosylation activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 265–274, 2015.

LIAO, H.; LI, S.; ZHENG, H.; WEI, Z.; LIU, D.; RAZA, W.; SHEN, Q.; XU, Y. A new acidophilic thermostable endo-1,4- β -mannanase from *Penicillium oxalicum* GZ-2: Cloning, characterization and functional expression in *Pichia pastoris*. **BMC Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2014.

LOQUÉ, D.; SCHELLER, H. V.; PAULY, M. Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 25, p. 151–161, 2015.

LUO, Z.; MIAO, J.; LI, G.; DU, Y.; YU, X. A Recombinant Highly Thermostable β -Mannanase (ReTMan26) from Thermophilic *Bacillus subtilis* (TBS2) Expressed in *Pichia pastoris* and Its pH and Temperature Stability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 4, p. 1259–1275, 2017.

MARTOS, M. A.; ZUBRESKI, E. R.; GARRO, O. A.; HOURS, R. A. Production of Pectinolytic Enzymes by the Yeast *Wickerhamomyces anomalus* Isolated from Citrus Fruits Peels. **Biotechnology Research International**, v. 2013, n. April, p. 1–7, 2013.

MHLONGO, N. N.; SKELTON, A. A.; KRUGER, G.; SOLIMAN, M. E. S.; WILLIAMS, I. H. A critical survey of average distances between catalytic carboxyl groups in glycoside hydrolases. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 82, n. 9, p. 1747–1755, 2014.

MIELLENZ, J. R.; BARDSLEY, J. S.; WYMAN, C. E. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3532–3539, 2009.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266–277, 2008.

MONCLARO, A. V. Estudos do potencial do fungo *Aspergillus tamaritii* na degradação da biomassa lignocelulósica. 2018.

MONCLARO, A. V.; RECALDE, G. L.; SILVA, F. G. DA; FREITAS, S. M. DE; FERREIRA FILHO, E. X. Xylanase from *Aspergillus tamaritii* shows different kinetic parameters and substrate specificity in the presence of ferulic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 120, n. June 2018, p. 16–22, 2019.

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 2, p. 165–178, 2008.

NADAROGLU, H.; ADIGUZEL, A.; ADIGUZEL, G. Purification and characterisation of β -mannanase from *Lactobacillus plantarum* (M24) and its applications in some fruit juices. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 5, p. 1158–1165, 2015.

NAGANAGOUDA, K., P. V. SALIMATH, AND V. H. M. Purification and Characterization of Endo- β -1,4 Mannanase from *Aspergillus niger* gr for Application in Food Processing Industry. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 3–5, 2009.

NAWAZ, M. A.; REHMAN, H. M.; IMTIAZ, M.; BALOCH, F. S.; LEE, J. D.; YANG, S. H.; LEE, S. I.; CHUNG, G. Systems Identification and Characterization of Cell Wall Reassembly and Degradation Related Genes in *Glycine max* (L.) Merrill, a Bioenergy Legume. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2017.

OBENG, E. M.; ADAM, S. N. N.; BUDIMAN, C.; ONGKUDON, C. M.; MAAS, R.; JOSE, J. Lignocellulases: a review of emerging and developing enzymes, systems, and practices. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, 2017.

OCHOA-VILLARREAL, M.; AISPURO-HERNNDEZ, E.; VARGAS-ARISPURO, I.; NGEL, M. Plant Cell Wall Polymers: Function, Structure and Biological Activity of Their Derivatives. **Polymerization**, n. May 2014, 2012.

OLIVEIRA GORGULHO SILVA, CAIO & P. VAZ, RAISSA & FERREIRA FILHO, E. DE. Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefi nery concept. **Biofuels, Bioprod. Bioref.**, p. 277–289, 2017.

OOTSUKA, S.; SAGA, N.; SUZUKI, K. Isolation and cloning of an endo - β -1 , 4-mannanase from Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. v. 125, p. 269–280, 2006.

PANGSRI, P.; PIWPANKAEW, Y.; INGKAKUL, A.; NITISINPRASERT, S.; KEAWSOMPONG, S. Characterization of mannanase from *Bacillus circulans* NT 6.7 and its application in mannooligosaccharides preparation as prebiotic. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 1–11, 2015.

PARK, H. S.; JUN, S. C.; HAN, K. H.; HONG, S. B.; YU, J. H. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. **Advances in Applied Microbiology**, v. 100, p. 161–202, 2017.

PASSOS, D. DE F.; PEREIRA, N.; CASTRO, A. M. DE. A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 14, p. 60–66, 2018.

PAULA, R. G. DE; ANTONIÊTO, A. C. C.; RIBEIRO, L. F. C.; SRIVASTAVA, N.; O'DONOVAN, A.; MISHRA, P. K.; GUPTA, V. K.; SILVA, R. N. Engineered microbial host selection for value-added bioproducts from lignocellulose. **Biotechnology Advances**, p. #pagerange#, 2019.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; LA RUBIA, T. DE; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53–63, 2002.

PRADEEP, G. C.; CHO, S. S.; CHOI, Y. H.; CHOI, Y. S.; JEE, J. P.; SEONG, C. N.; YOO, J. C. An extremely alkaline mannanase from *Streptomyces* sp. CS428 hydrolyzes galactomannan producing series of mannoooligosaccharides. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 5, 2016.

PUCHART, V.; VRŠANSKÁ, M.; SVOBODA, P.; POHL, J.; ÖGEL, Z. B.; BIELY, P. Purification and characterization of two forms of endo- β -1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1674, n. 3, p. 239–250, 2004.

RETORE, M.; SILVA, L. P.; TOLEDO, G. S. P.; ARAÚJO, I. G. Efeito da fibra de coprodutos agroindustriais e sua avaliação nutricional para coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1232–1240, 2010.

RIDLEY, B. L.; NEILL, M. A. O.; MOHNEN, D. **Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling**. [s.l: s.n.]. v. 57

RÍO, J. C. DEL; MARQUES, G.; LINO, A. G.; LIMA, C. F.; COLODETTE, J. L.; GUTIÉRREZ, A. Lipophilic phytochemicals from sugarcane bagasse and straw. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 992–1000, 2015.

ROJAS, M. J. Produção de etanol e hidrolisado protéico da casca de soja. **Dissertação de mestrado-UFSCar, São Carlos-SP**, p. 93, 2012.

SAAD, A. M.; SAAD, M. M.; HASSAN, H. M.; IBRAHIM, N. A.; EL-HADEDY, D. E.; IBRAHIM, E. I.; A-KARAM EL-DIN, A. Z. Optimization study for β -mannanase production from locust bean gum by a local *Aspergillus tamaris* NRC 3 isolate. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 7, n. 6, p. 2597–2609, 2016.

SAKAI, K. *et al.* Biochemical characterization of thermostable β -1,4-mannanase belonging to the glycoside hydrolase family 134 from *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 8, p. 3237–3245, 2017.

SAMSON, R. A. *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 141–173, 2014.

SARATALE, G. D.; CHEN, S. DER; LO, Y. C.; SARATALE, R. G.; CHANG, J. S. Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation - A review. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, n. 11, p. 962–979, 2008.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219–228, 2003.

SILVA-JUNIOR, O. B.; NORONHA, E. F.; MIDORIKAWA, G. E. O.; CORREA, C. L.; COSTA, M. M. DO C.; GRYNBERG, P.; TOGAWA, R. C.; MILLER, R. N. G.; FILHO, E. X. F. Analysis of the Transcriptome in *Aspergillus tamaris* During Enzymatic Degradation of Sugarcane Bagasse. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, n. September, p. 1–17, 2018.

SILVA, A. S. A. DA; INOUE, H.; ENDO, T.; YANO, S.; BON, E. P. S. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7402–7409, 2010.

SILVA, O. S. DA; ALMEIDA, E. M. DE; MELO, A. H. F. DE; PORTO, T. S. **Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamaris* URM4634**. [s.l.] Elsevier B.V, 2018. v. 117

SIQUEIRA, F. G. DE; FILHO, E. X. F. Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 7, n. May 2014, p. 54–60, 2010.

SIQUEIRA, F. G. DE; SIQUEIRA, E. G. DE; JARAMILLO, P. M. D.; SILVEIRA, M. H. L.; ANDREAUS, J.; COUTO, F. A.; BATISTA, L. R.; FILHO, E. X. F. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 20–26, 2010.

SIVAGURUNATHAN, P.; KUMAR, G.; MUDHOO, A.; RENE, E. R.; SARATALE, G. D.; KOBAYASHI, T.; XU, K.; KIM, S. H.; KIM, D. H. Fermentative hydrogen production using lignocellulose biomass: An overview of pre-treatment methods, inhibitor effects and detoxification experiences. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, n. March 2016, p. 28–42, 2017.

SOCCOL, C. R. *et al.* Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820–4825, 2010.

SONG, J. M.; NAM, K. W.; KANG, S. G.; KIM, C. G.; KWON, S. T.; LEE, Y. H. Molecular cloning and characterization of a novel cold-active β -1,4-d-mannanase from the Antarctic springtail, *Cryptopygus antarcticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 151, n. 1, p. 32–40, 2008.

SOUZA MOREIRA, L. R. DE; CARVALHO CAMPOS, M. DE; SIQUEIRA, P. H. V. M. DE; SILVA, L. P.; RICART, C. A. O.; MARTINS, P. A.; QUEIROZ, R. M. L.; FILHO, E. X. F. Two β -xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, n. December 2017, p. 46–52, 2013.

SRIVASTAVA, P. K.; KAPOOR, M. Recombinant GH-26 endo-mannanase from *Bacillus* sp. CFR1601: Biochemical characterization and application in preparation of partially hydrolysed guar gum. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 809–816, 2015.

_____. Production, properties, and applications of endo- β -mannanases. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 1, p. 1–19, 2017a.

_____. Production, properties, and applications of endo- β -mannanases. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 1, p. 1–19, 2017b.

TAPIA-BLÁCIDO, D. R.; MANIGLIA, B. C.; MARTELLI-TOSI, M. **Biopolymers from Sugarcane and Soybean Lignocellulosic Biomass**. [s.l: s.n.].

TEJIRIAN, A.; XU, F. Inhibition of cellulase-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 23, p. 7673–7682, 2010.

_____. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 3, p. 239–247, 2011.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; IT, M. <1-s2.0-S0960852499001042-main.pdf>. v. 72, p. 169–183, 2000.

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

VRIES, R. P. DE; VISSER, A. J. Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Proceedings of the Third International Conference on Science Education Research in the Knowledge Based Society, Vol. 1**, v. 65, n. 4, p. 435–437, 2001.

WANG, Y.; SHI, P.; LUO, H.; BAI, Y.; HUANG, H.; YANG, P.; XIONG, H.; YAO, B. Cloning, over-expression and characterization of an alkali-tolerant endo- β -1,4-mannanase from *Penicillium freii* F63. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 113, p. 710–714, 28 fev. 2012.

WEINGARTNER, V. PRODUÇÃO , PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MANANASE , OBTIDA POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO CASCAS DE SOJA E *Aspergillus niger* PRODUÇÃO , PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MANANASE , OBTIDA POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO CASCAS DE SO. p. 1–161, 2010.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 1–2, p. 161–187, 2003.

XIMENES, E. A.; CHEN, H.; FELIX, C. R. A mannanase, ManA, of the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2 has carbohydrate binding and docking modules. v. 51, n. 7, p. 559–568, 2005.

YOU, J.; LIU, J. F.; YANG, S. Z.; MU, B. Z. Low-temperature-active and salt-tolerant β -mannanase from a newly isolated *Enterobacter* sp. strain N18. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 2, p. 140–146, 2016.

YU, S.; LI, Z.; WANG, Y.; CHEN, W.; FU, L.; TANG, W.; CHEN, C.; LIU, Y.; ZHANG, X.; MA, L. High-level expression and characterization of a thermophilic β -mannanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 9, p. 1853–1859, 2015.

ZABLACKIS, E.; HUANG, J.; MÜLLERZ, B.; DARVILL, A. C.; ALBERSHEIM, P. Characterization of the Cell-Wall Polysaccharides of Leaves, *Arabidopsis*. v. 20115, n. Xxxix, 1990.

ZHANG, H. L.; WEI, J. K.; WANG, Q. H.; YANG, R.; GAO, X. J.; SANG, Y. X.; CAI, P. P.; ZHANG, G. Q.; CHEN, Q. J. Lignocellulose utilization and bacterial communities of millet straw based mushroom (*Agaricus bisporus*) production. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

ZHENG, H.; YU, Z.; FU, X.; LI, S.; XU, J.; SONG, H.; MA, Y. High level extracellular production of a truncated alkaline β -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Escherichia coli* by the optimization of induction condition and fed-batch fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 7, p. 977–987, 2016.

ZYL, W. H. VAN; ROSE, S. H.; TROLLOPE, K.; GÖRGENS, J. F. Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1203–1213, 2010.