



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Escola de Química
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia
de Processos Químicos e Bioquímicos

**DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO ENZIMÁTICO E
AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DE PROTEÍNAS ACESSÓRIAS
PARA EFICIENTE HIDRÓLISE DE CELULOSE**

Johanna Méndez Arias

Orientador:

Nei Pereira Jr., *PhD* (EQ/UFRJ)

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

2016

DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO ENZIMÁTICO E AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DE PROTEÍNAS ACESSÓRIAS PARA EFICIENTE HIDRÓLISE DE CELULOSE

Johanna Méndez Arias

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências (DSc.).

Orientador:

Nei Pereira Jr., *PhD* (EQ/UFRJ)

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

2016

A 696d Arias, Johanna Méndez
Desenvolvimento de produto enzimático e avaliação
do sinergismo de proteínas acessórias para eficiente
hidrólise de celulose / Johanna Méndez Arias. --
Rio de Janeiro, 2016.
164 f.

Orientador: Nei Pereira Jr.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós
Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e
Bioquímicos, 2016.

1. Celulases . 2. Sinergismo. 3. Hidrólise
enzimática. 4. Proteínas acessórias. 5. Etanol 2G. I.
Pereira Jr, Nei, orient. II. Título.

DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO ENZIMÁTICO E AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DE PROTEÍNAS ACESSÓRIAS PARA EFICIENTE HIDRÓLISE DE CELULOSE

Johanna Méndez Arias

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências (*DSc.*).

Aprovada em

Prof. Nei Pereira Jr., *PhD.* EQ-UFRJ (Orientador)

Prof^a. Andréa Medeiros Salgado, *DSc.* EQ-UFRJ

Prof. Ivaldo Itabaiana Júnior, *DSc.* EQ-UFRJ

Prof^a. Flávia Duta Pimenta, *DSc.* SENAI-RJ

Prof. Antônio Carlos Augusto Costa, *DSc.* IQ-UERJ

Prof. Alvaro José Boareto Mendes, *DSc.* IME-RJ

Aos meus pais,
dedico esta tese.

Agradecimentos

A esse Deus sempre presente de formas difíceis de explicar.

À minha família, porque me apoiou mesmo sabendo que ia ser difícil a distância. Ao Taro, que passou comigo grande parte desse processo, sendo meu suporte, escutando-me, pendente de cada experimento e de cada noite sem dormir.

Ao professor Nei Pereira Jr, meu querido orientador, por ser esse grande exemplo de dedicação e amor à ciência, sempre visionário, com uma capacidade enorme de criar e “lapidar” pesquisadores, que confiou e acreditou em mim quando as portas pareciam fechadas. Vou ser sempre grata. Também agradeço enormemente por me ensinar o amor à pesquisa e o desejo de sempre estar aprendendo.

À Carol Barcelos, porque fez meus dias mais agradáveis e alegres, porque foi por muito tempo minha colega de risadas, academia, compras, saídas, e porque mesmo estando longe neste momento está sempre presente, nada que Skype não resolva.

Aos meus amigos que me ensinaram a amar o Rio de Janeiro e farão eu voltar algum dia, Mari Faber, Tassio, Daiana, Paulo, Carol, por serem minha família aqui no Brasil. Família linda que a vida me deu o prazer de conhecer.

Agradeço às famílias da Mari, Marina e Carol, por abrirem as portas dos seus lares para mim e para minha família.

Aos meus amigos e colegas do laboratório, sempre com essa energia linda, pendentes dos meus experimentos e dispostos a ajudar: Tulio, Isis, Douglas, Anelize, Ana, Vanessa, Roberto, Carina, Rodrigo, Paty, Manu, Fernando, Fabio, Leonard, Luiz André, Camylle, Monica, Miguel, Angela, Mariana, Hanna.

Ao Luiz Felipe, por ser essa pessoa íntegra e coerente que me ensinou muito da vida, pelas caminhadas pela praia escutando pacientemente todos meus dilemas e dramas, por revisar sempre meus escritos de forma tão dedicada e paciente.

Ao Luiz, Jorge e Janaina por estarem sempre dispostos a me ajudar e a resolver qualquer problema administrativo.

Ao professor Igor Polikarpov, por me receber gentilmente dentro do seu grupo de pesquisa. A Vanessa Pellegrini, pelas ajudas nos meus estudos de sinergismo, e especialmente a Amanda Bernandes por ter a paciência de me ensinar e a disposição de discutir comigo, todo um sinergismo com esse grupo lindo.

Ao Laboratório de Processo de Separação com Membranas – PAM (PEQ - COPPE/UFRJ), pela disponibilização e suporte nas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV);

À professora Yordanka e ao René, por me permitirem usar a centrífuga e estarem sempre dispostos a colaborar.

Aos meus amigos de outros países latinoamericanos e não menos importantes: Vivis, Joselaine, Rodrigues, Grecia que entendem o sentimento de estar longe de casa, que me ensinaram outras culturas e que estragavam meu português, mas alegravam meus dias.

Agradeço à Lidiane, por alegrar meus finais de semana com o seu bom humor.

Enfim, agradeço ao Brasil por me permitir estudar e crescer profissionalmente, permitindo levar conhecimento valioso para meu país.

Agradeço aos meus fiadores, amigos do meu pai, que acreditaram em mim e apoiaram-me na realização neste sonho.

A don Georges Govaere e don Alvaro Guillen, pelo apoio e por acreditarem que os estudos de pós-graduação fora do país ajudarão na educação e na ciência da Costa Rica. Agradeço à Assembleia da *Escuela de Ingenieria Industrial* pelo apoio e pela *reserva de plaza*, e à Universidad de Costa Rica pelo apoio financeiro.

RESUMO

Méndez, Johanna Arias. **Desenvolvimento de produto enzimático e avaliação do sinergismo de proteínas acessórias para eficiente hidrólise de celulose.** Rio de Janeiro, 2016. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Orientador: Nei Pereira Jr., *PhD* (EQ/UFRJ)

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um preparado enzimático que fosse eficaz na hidrólise de celulose, bem como competitivo com os preparados comerciais, de modo a fortalecer o entendimento da produção de celulases dentro do conceito de Biorrefinaria. Um planejamento experimental de mistura do tipo *simplex centroide* foi realizado a fim de otimizar a proporção proteica de enzimas produzidas por diferentes plataformas fúngicas (*Trichoderma harzianum* IOC 3844, *Penicillium funiculosum* ATCC 11797 e *Aspergillus niger* ATCC 1004), tendo sido obtida a seguinte mistura proteica ótima: 15% de *T. harzianum*, 50% de *P. funiculosum* e 35% *A. niger*. Esta mistura mostrou-se capaz de hidrolisar celulignina parcialmente deslignificada (CLPD) com uma eficiência de 91%, para uma carga de sólidos de 25 g/L e uma baixa carga de proteína, de 10 mg/g celulose, um resultado correspondente a uma produtividade volumétrica de 0,36 g/(L·h), valor competitivo em relação ao obtido com o preparado comercial *Cellic Ctec2®*, de 0,39 g/(L·h). Com o propósito de aumentar a quantidade de glicose no hidrolisado celulósico, tendo em vista uma posterior aplicação na produção de etanol, foi utilizado um planejamento experimental do tipo composto central rotacional (DCCR), buscando otimizar as condições de hidrólise que propiciassem incrementos na liberação de glicose e na eficiência de hidrólise ao aumentar a carga de sólidos e minimizar a carga de proteína. Neste caso, como resultado ótimo, foram obtidas uma carga de sólidos de 196 g/L e uma carga de proteína de 24 mg/g de celulose, com uma liberação de glicose de (94±8) g/L. A aplicação destas condições num processo *Separated Hydrolysis and Fermentation* (SHF) resultou numa produção de etanol de 33 g/L, correspondente a uma eficiência de fermentação de 89%, e a uma elevada produtividade volumétrica, de 11 g/(L·h). A etapa de sacarificação, por sua vez, apresentou uma produtividade de 3,8 g/(L·h), similar à obtida com *Cellic Ctec2®* (4,2 g/(L·h)), demonstrando que o preparado otimizado neste estudo compete com os preparados comerciais de última geração, tanto em condições diluídas como em condições com altas cargas de sólidos. Outros ensaios conduzidos permitiram constatar que proteínas acessórias que auxiliam na amorfogênese do material lignocelulósico atuam em sinergismo com a mistura otimizada, como, por exemplo, os módulos de ligação ao carboidrato (CBMs), que aumentam a liberação de glicose principalmente nas primeiras horas de hidrólise, com incrementos de até 66% nas primeiras 12 h. Já as swoleninas atuam em sinergismo no início do processo, aumentando principalmente a liberação de xilose, com aumentos de 30% em 12 h de hidrólise. Aditivos como PEG 4000 e BSA também aumentam as eficiências de hidrólise, porém o seu efeito positivo depende do tipo de material, da composição do coquetel enzimático e das condições do processo.

Palavras-chave: Celulases, sinergismo, engenharia de produto, coquetéis enzimáticos, hidrólise enzimática, proteínas acessórias, etanol 2G, aditivos, planejamento experimental.

ABSTRACT

Méndez, Johanna Arias. **Desenvolvimento de produto enzimático e avaliação do sinergismo de proteínas acessórias para eficiente hidrólise de celulose.** Rio de Janeiro, 2016. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Advisor: Nei Pereira Jr., *PhD* (EQ/UFRJ)

The present work, with the purpose of consolidating cellulase production within the Biorefinery concept, aimed at the development of an enzymatic cocktail that could efficiently hydrolyze cellulose and still be competitive with the commercial preparations. A simplex-centroid design was applied for the optimization of the proportions of enzymatic proteins produced by different fungal platforms: (*Trichoderma harzianum* IOC 3844, *Penicillium funiculosum* ATCC 11797 and *Aspergillus niger* ATCC 1004), and the following optimized mixture was obtained: 15% of *T. harzianum*, 50% of *P. funiculosum* and 35% of *A. niger*. This mixture could hydrolyze partially delignified cellulignin (PDCL) with 91% of hydrolysis efficiency, for a 25 g/L solids loading and a 10 mg/g of cellulose protein loading, a results that corresponds to a volumetric productivity of 0.36 g/(L·h), a value that is competitive with the one achieved once *Cellic Ctec2*® commercial preparation was used (0.39 g/(L·h)). With the objective of increasing the amount of glucose in the cellulosic hydrolysate for further conversion into ethanol, a central composite rotational design (CCRD) methodology was applied, seeking the optimization of conditions that allowed increases in both glucose levels and hydrolysis efficiency, while simultaneously raising the solids loading and minimizing the protein loading. In this case, the optimized conditions corresponded to 196 g/L of solids loading and 24 mg/ g of cellulose of protein loading, which resulted in (94±8) g/L of released glucose. A *Separated Hydrolysis and Fermentation* (SHF) process, carried out with these optimized conditions, resulted in 33 g/L of ethanol and 89% of fermentation efficiency, along with a high volumetric productivity (11 g/(L·h)). The saccharification step achieved 3.8 g/(L·h) of volumetric productivity, very close to the results using *Cellic Ctec2*® (4.2 g/(L·h)), therefore demonstrating that the mixture optimized in this work is able to compete with the commercial preparations, whether at high or low solids loadings. Other assays, comprising the addition of accessory proteins that promote the amorphogenesis of the lignocellulosic material, were also performed. It was observed that they act in synergism with the optimized mixture: the carbohydrate-binding-molecules (CBMs), for example, which enhance the glucose release mainly during the first 12 hours of hydrolysis, with increases of 66%. Swollenins also act in synergism with the optimized mixture during the first hours of the process, increasing mostly xylose release, with increments of 30% during the initial 12 hours. Additives such as PEG 4000 and BSA also promoted increases in the hydrolysis efficiency, however, their effects depend on the material, the enzymatic cocktail composition and the process conditions.

Keywords: cellulases, synergism, product engineering, enzymatic cocktails, enzymatic hydrolysis, accessory protein, ethanol 2G, additives, experimental design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura da biomassa vegetal.	25
Figura 2.2. Esquema representativo da estrutura de celulose.	25
Figura 2.3. Esquema representativo da estrutura de celulose e das ligações de hidrogênio.	26
Figura 2.4. Esquema representativo da estrutura da molécula de xilana.	27
Figura 2.5. Álcoois precursores da biossíntese da lignina.	27
Figura 2.6. Esquema representativo da estrutura de lignina de eucalipto.	28
Figura 2.7. Esquema representativo da estrutura da pectina.	29
Figura 2.8. Representação das microfibras de material lignocelulósico submetidas ao processo de pré-tratamento.	30
Figura 2.9. Exemplo das etapas de hidrólise enzimática catalisada por uma exoglucanase com módulo de ligação ao carboidrato (CBM).	34
Figura 2.10. Representação esquemática de alguns fatores limitantes da hidrólise enzimática da celulose. (1) Inibição das enzimas por seus produtos (celobiose e glicose); (2) Impedimento estérico das celulases à celulose pela presença de hemicelulose; (3) Impedimento estérico das celulases à celulose pela presença de lignina; (4) Adsorção não produtiva da enzima à lignina; (5) desativação das enzimas por desnaturação térmica e/ou por cisalhamento por agitação excessiva.	35
Figura 2.11. Três topologias apresentadas no sítio ativo de glicosil hidrolases: A) fenda B) túnel C) bolsão.	38
Figura 2.12. Esquema das etapas de hidrólise enzimática da celulose.	39
Figura 2.13. Esquema do mecanismo de inversão das glicosil hidrolases.	40
Figura 2.14. Esquema do mecanismo de retenção das glicosil hidrolases.	40
Figura 2.15. Esquema da ação das diferentes enzimas xilanolíticas na hidrólise da fração hemicelulósica.	42
Figura 2.16. Esquema representativo das enzimas envolvidas na degradação da lignina por basidiomicetes.	45
Figura 2.17. Esquema da amorfogênese da fibra da celulose por meio de CBMs.	50
Figura 2.18. Esquema representativo da atuação dos diferentes tipos de CBMs nas diferentes regiões do polissacarídeo.	51
Figura 2.19. Esquema representativo da ação das expansinas no material lignocelulósico.	52
Figura 2.20. Esquema representativo do mecanismo de ação das monooxigenases cobre-dependentes.	54
Figura 2.21. Esquema da degradação de celulose, envolvendo celulases e monooxigenases.	55
Figura 2.22. Concepções tecnológicas e integração de processo na produção de Etanol 2G segundo a plataforma bioquímica da biorrefinaria. SHF: Hidrólise e Fermentação Separadas; SSF: Sacarificação e Fermentação Simultânea; dSSF: Sacarificação e Fermentação Simultânea com inoculação tardia; SSCF: Sacarificação e Cofermentação Simultânea; CBP: Bio Processamento Consolidado.	60
Figura 4.1. Bagaço de cana-de-açúcar a) <i>in natura</i> b) após pré-tratamento ácido c) após pré-tratamentos ácido e alcalino.	65
Figura 4.2. Esporos em placa dos fungos filamentosos. a) <i>Trichoderma harzianum</i> IOC 3844, b) <i>Penicillium funiculosum</i> ATCC 11797, c) <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1004.	68

Figura 4.3. Biorreator Biostat B utilizado para produção de celulases.	70
Figura 4.4. Sistema de filtração tangencial <i>Hollow Fiber</i> ® utilizado para concentração do extrato bruto de celulases.	71
Figura 4.5. Esquema representativo do método de determinação de atividade enzimática	75
Figura 4.6. Ensaio de fermentação alcoólica a partir do hidrolisado celulósico de CLPD com a linhagem <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (JP1). Temp.: 30 °C; pH: 6,0; velocidade de agitação: 200 rpm.	81
Figura 4.7. Esquema representativo da produção da mistura otimizada e das etapas de fermentação.	87
Figura 4.8. Esquema de processos de hidrólise e estudos de sinergismo.	88
Figura 5.1. Microscopia eletrônica de varredura da fibra lignocelulósica de bagaço de cana <i>in natura</i> e após pré-tratamentos ácido e alcalino.	91
Figura 5.2. Proporções relativas das atividades aparentes Avicelásica (azul), CMCásica (vermelho) e β -glucosidásica (verde) nos preparados enzimáticos concentrados do LADEBIO.	94
Figura 5.3. Gel de eletroforese SDS-PAGE. P (padrão de proteína); Th (concentrado de <i>T. harzianum</i>); Pf (concentrado de <i>P. funiculosum</i>) e An (concentrado de <i>A. niger</i>).	94
Figura 5.4. Zimograma para endoglucanase. Th (concentrado de <i>T. harzianum</i>); Pf (concentrado de <i>P. funiculosum</i>) e An (concentrado de <i>A. niger</i>).	96
Figura 5.5. Diagrama de Pareto para modelo cúbico especial. Planejamento de mistura <i>simplex centroide</i> .	98
Figura 5.6. Gráfico de normalidade, modelo cúbico especial. Planejamento de mistura <i>simplex centroide</i>	99
Figura 5.7. Gráfico de otimização de proporções das variáveis independentes, Planejamento de mistura <i>simplex centroide</i>	100
Figura 5.8. Gel de eletroforese SDS-PAGE. P (padrão de proteína); MO (mistura otimizada); Th (concentrado de <i>T. harzianum</i>); Pf (concentrado de <i>P. funiculosum</i>) e An (concentrado de <i>A. niger</i>).	101
Figura 5.9. Eficiência de hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada (25 g/L) utilizando uma carga de proteína de 10 mg/g de celulose. Condições: pH 5, temperatura 50 °C e tempo de hidrólise de 48 h.	102
Figura 5.10. Cinética de hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada de bagaço de cana. Concentração de sólidos: 25 g/L. Mistura 10 mg proteína/g celulose (15% <i>T. harzianum</i> ; 50% <i>P. funiculosum</i> ; 35% <i>A. niger</i>); <i>P. funiculosum</i> (5 mg proteína/g celulose); <i>T. harzianum</i> (1,5 mg proteína/g celulose); <i>A. niger</i> (3,5 mg proteína/g celulose). Condições: pH 5, temperatura 50 °C.	104
Figura 5.11. Grau de sinergismo em diferentes tempos no transcórper da hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada (25 g/L), utilizando preparado de <i>T. harzianum</i> ; <i>P. funiculosum</i> e <i>A. niger</i> . Condições: pH 5, temperatura 50 °C.	104
Figura 5.12. Glicose liberada na hidrólise de CLPD utilizando a mistura otimizada e a enzima comercial <i>Cellic Ctec2</i> ®, em função do tempo. Carga de sólidos de 25 g/L e carga de proteínas de 10 mg/g celulose. Condições: pH 5, temperatura 50 °C.	105

Figura 5.13. Eficiência de hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada (25 g/L), utilizando carga de proteína de 10 mg/g de celulose da mistura otimizada. Condições: pH 5, temperatura 50 °C e tempo de hidrólise de 48 h.	107
Figura 5.14. Eficiência de hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada para diferentes cargas de sólido, utilizando como carga de proteína de 10 mg/ g celulose da mistura otimizada. Condições: pH 5, temperatura 50 °C e tempo de hidrólise de 48 h.	110
Figura 5.15. Eficiência de hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada, utilizando carga de sólidos de 150 g/L, carga de proteína de 10 mg/g celulose da mistura otimizada. Comparação entre processos de batelada simples e batelada alimentada. Condições: pH 5, temperatura 50 °C e tempo de hidrólise de 48 h.	110
Figura 5.16. Hidrólise de bagaço de cana após 48 h, com carga de sólidos de 150 g/L e carga enzimática de 10 mg proteína/g celulose. A) hidrólise batelada simples B) hidrólise batelada alimentada.	111
Figura 5.17. Eficiência de hidrólise de CLPD com diferentes cargas enzimáticas. (Carga de sólidos 100 g/L; tempo 48 h; temperatura 50°C.).	112
Figura 5.18. Superfície de resposta da liberação de glicose em função da carga de sólidos e da carga de proteína.	114
Figura 5.19. Superfície de resposta da eficiência de hidrólise em função da carga de sólidos e da carga de proteína.	115
Figura 5.20. Perfil cinético da hidrólise de CLPD com a mistura otimizada. Carga de sólidos (196 g/L) e carga de proteína (24 mg/g celulose)	116
Figura 5.21. Aspecto dos frascos após a hidrólise de CLPD utilizando diferentes coquetéis enzimáticos após 24 h. Carga de sólidos: 196 g/L; Carga de proteína: 24 mg/g celulose.	117
Figura 5.22. Eficiências da hidrólise enzimática de CLPD obtidas com diferentes coquetéis enzimáticos (Pf: <i>P. funiculosum</i> ; MO: mistura otimizada). Condições: carga de sólidos: 196 g/L e carga proteína: 24 mg/g celulose, tempo de hidrólise de 24 h, temperatura 50°C e pH 5.	118
Figura 5.23. Liberação de glicose na hidrólise de CLPD utilizando os coquetéis enzimáticos MO e <i>Cellic Ctec2®</i> , após 24 h. Carga de sólidos: 196 g/L, carga de proteína de 24 mg/g celulose.	120
Figura 5.24. Fermentação alcoólica, empregando a levedura industrial <i>S. cerevisiae</i> JP1, a partir do hidrolisado de CLPD obtido via hidrólise enzimática utilizando a mistura otimizada.	121
Figura 5.25. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado com carvão ativo, utilizando <i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS5774.	124
Figura 5.26. Gel de eletroforese dos CMBs, CBM1 (endoglucanase de <i>T. harzianum</i>) CBM2 (<i>B. licheniformes</i>), P (padrão).	126
Figura 5.27. Grau de sinergismo entre a mistura otimizada e CBMs purificados (CBM1: CBM de <i>T. harzianum</i> ; CBM2: CBM de <i>B. licheniformes</i>) em função do tempo. Condições: carga de sólidos: 25 g/L e carga da MO: 7,5 mg/g celulose. MO e CBMs numa relação de 1:1 (m:m).	127

Figura 5.28. Eficiências da hidrólise enzimática de resíduo da indústria de papel com a mistura otimizada com e sem adição de CBM purificado (CBM1: CBM de <i>T. harzianum</i> ; CBM2: CBM de <i>B. licheniformes</i>) em função do tempo. Condições: carga de sólidos: 25 g/L e carga da MO: 7,5 mg/g celulose. MO e CBMs numa relação de 1:1 (m:m).	129
Figura 5.29. Microscopia eletrônica de varredura do efeito de CBM na fibra de bagaço de cana.	130
Figura 5.30. Gel de eletroforese da swolenina recombinante de <i>T. harzianum</i> expressada por <i>A. niger</i> (Sw), <i>P</i> (padrão).	131
Figura 5.31. Grau de sinergismo entre a mistura otimizada e Sw (Relação de 1:1 em concentração proteica) em função do tempo. Condições: carga de sólidos: 25 g/L e carga proteína: 7,5 mg/g celulose.	132
Figura 5.32. Microscopia eletrônica de varredura do efeito de adição da swolenina na fibra de bagaço de cana.	133
Figura 5.33. Glicose liberada na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado, utilizando mistura otimizada de <i>T. harzianum</i> , <i>P. funiculosum</i> e <i>A. niger</i> com e sem adição do concentrado enzimático de <i>M. thermophila</i> . Carga de sólidos: 25 g/L, temperatura: 50 °C, carga enzimática exibida no gráfico.	135
Figure 5.34. Liberação de glicose após hidrólise enzimática de bagaço de cana (celulignina e PDCL), utilizando diferentes coquetéis enzimáticos (<i>T. harzianum</i> e <i>P. Funiculosum</i>) com e sem adição de PEG 4000 e BSA. Carga de sólidos: 25 g/L, carga do coquetel enzimático: 7,5 mg/g celulose.	136
Figure 5.35. Liberação de glicose e eficiência após 48 h de hidrólise enzimática de CLPD. Cargas de sólidos: 25 g/L e 100 g/L, carga de proteína de 7,5 mg/ de celulose (<i>T. harzianum</i>), com e sem adição de PEG 4000 e BSA numa proporção de (1:1) (m:m)	139
Figure 5.36. Grau de sinergismo entre aditivos (PEG 4000 e BSA) e celulasas do preparado de <i>T. harzianum</i> para diferentes cargas de sólidos.	141
Figure 5.37. Liberação de glicose e eficiência de hidrólise enzimática (EH), após 48 h de hidrólise enzimática de CLPD. Carga de sólidos: 100 g/L, carga de proteína: 7,5 mg/ de celulose e 20 mg/ g celulose (<i>T. harzianum</i>) com e sem adição de PEG 4000 e BSA numa proporção de (1:1) (m:m)	142

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 2.1. Algumas das principais enzimas degradadoras do material lignocelulósico.	36
Quadro 2.2. Comparação entre a fermentação submersa e a fermentação no estado sólido	41
Quadro 2.3. Proteínas acessórias que atuam em sinergismo com celulasas na hidrólise enzimática da celulose.	49
Tabela 4.1. Composição do meio utilizado para produção de inóculo dos diferentes microrganismos utilizados para produção de celulasas em biorreator instrumentado.	69
Tabela 4.2. Composição do meio utilizado para produção de celulasas pelos diferentes microrganismos em biorreator instrumentado	69
Tabela 4.3. Atividades enzimáticas e seus respectivos substratos, tempo de incubação e método de quantificação de produto liberado	75
Tabela 4.4. Proporções dos extratos enzimáticos utilizados no planejamento de mistura.	76
Tabela 4.5. Matriz do planejamento experimental DCCR para 2 variáveis com triplicata do ponto central.	79
Tabela 4.6. Composição do meio de ativação e propagação para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (JP1).	80
Tabela 4.7. Composição do gel de separação e do gel de empilhamento para Eletroferese SDS-Page.	83
Tabela 4.8. Proteínas purificadas cedidas pelo grupo de biotecnologia molecular do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.	85
Tabela 4.9. Composição do meio CLS	86
Tabela 4.10. Composição do meio de fermentação	86
Tabela 5.1. Composição do bagaço de cana antes e após o pré-tratamento.	90
Tabela 5.2. Atividades enzimáticas obtidas nos extratos brutos da produção de celulasas por <i>T. harzianum</i> ; <i>P. funiculosum</i> e <i>A. niger</i> .	92
Tabela 5.3. Principais atividades enzimáticas obtidas dos preparados enzimáticos de <i>P. funiculosum</i> , <i>T. harzianum</i> e <i>A. niger</i> após a etapa de concentração.	93
Tabela 5.4. Matriz do planejamento de mistura e valores de resposta obtidos em cada experimento.	97
Tabela 5.5. Modelos matemáticos segundo análise estatística. Planejamento de mistura. 20 experimentos.	97
Tabela 5.6. Valor predito para as condições otimizadas de acordo com o programa <i>Statistica</i> .	100
Table 5.7. Atividade enzimática da mistura otimizada (<i>T. harzianum</i> 15%; <i>P. funiculosum</i> 50% and <i>A. niger</i> 35%).	101
Tabela 5.8. Composição de bagaço de cana <i>in natura</i> e após diferentes pré-tratamentos.	107
Tabela 5.9. Matriz do planejamento DCCR e valores das variáveis de resposta obtidos em cada experimento.	113
Tabela 5.10. Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose.	113

Tabela 5.11. Análise de variância (ANOVA) para eficiência de enzimática.	113
Tabela 5.12. Condições e resultados de eficiências de hidrólise utilizando alta carga de sólidos para diferentes substratos lignocelulósicos.	119
Tabela 5.13. Comparação dos resultados obtidos neste trabalho com a literatura, referentes ao processo de fermentação separada da hidrólise (SHF).	122
Tabela 5.14. Composição do hidrolisado hemicelulósico antes e depois de destoxificação com carvão ativo.	124
Tabela 5.15. Liberação de glicose com a mistura otimizada na hidrólise de CL e CLPD, com e sem adição de PEG 4000 e BSA. Após 48 h.	137
Tabela 5.16. Eficiência de hidrólise enzimática de diferentes materiais, utilizando <i>T. harzianum</i> . Carga de proteína: 7,5 mg/g celulose. Considerando teor de celulose de 47,8% para CL e de 67,1% para CLPD e CL*	138
Tabela 5.17. Liberação de xilose na hidrólise de CLPD, utilizando 7,5 mg/g celulose do coquetel <i>T. harzianum</i> , com e sem BSA e PEG 4000, numa relação 1:1 (m:m)	141

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1G: primeira geração
2G: segunda geração
AA10: *accessory activity proteins* (proteínas de atividade acessória família 10)
AA9: *accessory activity proteins* (proteínas de atividade acessória família 9)
AAD: aril álcool desidrogenase
AAO: aril álcool oxidase
Abs: absorvância
ALICEWEB: sistema de análise de comércio exterior
An: *Aspergillus niger*
ANOVA: análise de variância
AV: álcool veratril
BSA: albumina de soro bovino
BsEXLX1: expansina de *B. subtilis*
CAZy: *Carbohydrate-Active Enzymes Data Base* (Banco de Dados de Enzimas Carboidrato-Ativas)
CBH: celobiohidrolase
CBH I: celobiohidrolase I
CBH II: celobiohidrolase II
CBM: *carbohydrate-binding module* (módulo de ligação ao carboidrato)
CBP – Bioprocesso Consolidado
CDH: celobiose desidrogenase
CL: celulignina
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
CLPD: celulignina parcialmente deslignificada
CMC: carboximetilcelulose
CMCase: enzima com atividade em carboximetilcelulase
DCCR: Delinemaneto Central Composto Rotacional
DP: grau de polimerização
dSSF–Sacarificação e Fermentação Simultânea com inoculação tardia
EF: eficiência de fermentação
EG: endoglucanase
EH: eficiência de hidrólise
EXLA: proteínas semelhantes a expansinas tipo alfa
EXLB: proteínas semelhantes a expansinas tipo beta
EXPA: expansinas tipo alfa
EXPB: expansinas tipo beta
F: valor F de Fisher
FD: fator de diluição
FES: Fermentação no estado sólido

FPase: enzima com atividade em papel de filtro
FPU: unidade de atividade enzimática em papel de filtro
FS: Fermentação submersa
GH: glicosil hidrolases
GOD: glicose oxidase
GOx: glioxal oxidase
kDa: quiloDalton
LADEBIO: Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos
LC-MS/MS: *liquid chromatography tandem mass spectrometry* (cromatografia líquida acoplada a dois espectrômetros)
LiP: Lignina peroxidase
LPMO: monooxigenases polissacarídicas líticas
LMS: sistema lacase/mediador
MnP: Manganês peroxidase
MO: mistura otimizada
MT: *Myceliophthora thermophila*
P: padrão de massa molar
PMO: Monooxigenase polissacarídica
POD: peroxidase
PDA: *Potato Dextrose Agar* (Ágar Batata-Dextrose)
PEG: polietilenoglicol
Pf: *Penicilium funiculosum*
Qp: produtividade volumétrica
QR: quinonas redutases
rpm: rotações por minuto
SDS: *sodium dodecil sulfate* (dodecil sulfato de sódio)
SDS-PAGE: *polyacrilamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida)
SHF–Hidrólise e Fermentação Separadas
SSCF–Sacarificação e Cofermentação Simultânea
SSF–Sacarificação e Fermentação Simultânea
Sw: swolenina
Th: *Trichoderma harzianum*
UI: unidades internacionais
UV: ultra violeta
VP: Peroxidases versáteis
HMF: hidroximetilfurfural
SUMO: *small ubiquitin-like modifier*

SUMÁRIO

Capítulo 1 –APRESENTAÇÃO DO TEMA DA TESE	20
Capítulo 2 - LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	24
2.1. Materiais lignocelulósicos	24
2.2. Celulose	25
2.3. Hemicelulose	26
2.4. Lignina	27
2.5. Pectinas	28
2.6. Pré-tratamentos	29
2.6.1. Pré-tratamentos físicos	31
2.6.2. Pré-tratamentos químicos	31
2.6.3. Pré-tratamentos biológicos	32
2.6.4. Seleção do pré-tratamento	32
2.7. Hidrólise do material lignocelulósico	33
2.8. Hidrólise enzimática	33
2.9. Fatores que influenciam a hidrólise enzimática	34
2.10. Enzimas lignocelulolíticas	36
2.11. Celulases	36
2.11.1. Classificação	36
2.11.1.1. Endoglucanase	36
2.11.1.2. Exoglucanase	37
2.11.1.3. β -glucosidase	37
2.11.2. Mecanismos de atuação	39
2.11.3. Produção de celulases	41
2.12. Hemicelulases	41
2.13. Ligninases	43
2.13.1 Lignina peroxidase (LiP)	43
2.13.2. Manganês peroxidase (MnP)	43
2.13.3. Peroxidases versáteis	44
2.13.4. Lacases	44
2.13.5. Enzimas que produzem peróxido	45
2.14. Pectinases	46
2.15. Sinergismo	46
2.15.1. Sinergismo entre celulases	46
2.15.2. Sinergismo entre hemicelulases	47
2.15.3. Sinergismo entre celulases e hemicelulases	48

2.15.4. Sinergismo entre celulases e proteínas não hidrolíticas	49
2.15.4.1. Módulo de ligação ao carboidrato	49
2.15.4.2. Expansinas e swoleninas.	51
2.15.4.3. Proteína AA9	53
2.15.4.4. Outras proteínas não hidrolíticas	55
2.16. Surfactantes	55
2.17. Interação enzima-lignina	56
2.18. Engenharia de produto	57
2.19. Etanol de segunda geração	58
2.20. Considerações finais	61
Capítulo 3 –JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	63
3.1. Objetivo Geral	64
3.2. Objetivos específicos	64
Capítulo 4 - MATERIAIS E MÉTODOS	65
4.1. Pré-tratamento do bagaço de cana	65
4.2. Caracterização do bagaço de cana in natura e bagaço pré-tratado	66
4.3. Microrganismo	68
4.4. Produção de celulases em biorreator instrumentado	68
4.5. Filtração e concentração do extrato bruto enzimático em <i>Hollow Fiber</i> ®	70
4.6. Procedimentos analíticos	71
4.6.1. Quantificação de açúcares redutores totais	71
4.6.2. Quantificação de glicose	71
4.6.2.1. Método enzimático glicose oxidase	71
4.6.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	72
4.6.3. Quantificação de atividade Fpase	73
4.6.4. Quantificação de atividade CMCase, Avicelase e xilanase	74
4.6.5. Quantificação de atividade β -glucosidase	74
4.6.6. Quantificação de conteúdo proteico.	75
4.7. Otimização da mistura de extratos enzimáticos dos fungos <i>Trichoderma harzianum</i> IOC 3844, <i>Penicillium funiculosum</i> ATCC 11797 e <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1004.	76
4.8. Influência das características do substrato e da carga enzimática na hidrólise enzimática	77
4.8.1. Bagaço de cana com diferentes tipos de pré-tratamento	77
4.8.2. Diferentes cargas de sólidos	77
4.8.3. Hidrólise com batelada alimentada de sólidos	78
4.8.4. Diferentes cargas enzimáticas	78
4.9. Otimização das cargas de sólidos e de proteína	78

4.10. Fermentação alcoólica do hidrolisado enzimático de CLPD	79
4.11. Fermentação alcoólica do hidrolisado hemicelulósico	81
4.12. Eletroforese SDS-PAGE	83
4.13. Zimograma	83
4.14. Estudos de sinergismo com concentrado enzimático de <i>Myceliophthora thermophila</i>	84
4.15. Estudos de sinergismo utilizando CBMs	85
4.16. Estudos de sinergismo utilizando swolenina	85
4.17. Estudos de aplicação de surfactantes/ aditivos	86
4.18. Esquemas de metodologia	87
Capítulo 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
5.1. Caracterização do material lignocelulósico	89
5.2. Produção de celulasas por <i>T. harzianum</i> , <i>P. funiculosum</i> e <i>A. niger</i>	92
5.3. Otimização da mistura enzimática por planejamento experimental	96
5.4. Validação do modelo	100
5.5. Mistura otimizada e sinergismo entre os extratos enzimáticos na mistura otimizada	101
5.6. Influência das características do substrato na hidrólise enzimática	106
5.7. Otimização da carga de sólidos e da carga de proteína	112
5.8. Fermentabilidade do hidrolisado enzimático de celulose	121
5.9. Fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico	123
5.10. Estudos de sinergismo	126
5.10.1. Módulos de ligação ao carboidrato (CBM)	126
5.10.2. Swolenina	130
5.10.3. Concentrado enzimático de <i>Myceliophthora thermophila</i>	134
5.10.4. Aditivos/ surfactantes	135
5.10.4.1 Efeito de aditivos em relação à carga de sólidos	139
5.10.4.2. Efeito de aditivos em relação à carga de proteína	142
5.11. Considerações finais	143
Capítulo 6 - CONCLUSÕES	145
REFERÊNCIAS	149

Capítulo 1

APRESENTAÇÃO DO TEMA DA TESE

A demanda global por energia, combustíveis e materiais, bem como a crescente preocupação pela dependência de combustíveis fósseis – fontes de energia não renováveis cuja distribuição no mundo é desigual - além dos problemas relacionados à emissão de gases causadores do efeito estufa e à poluição do ar devido à combustão, têm resultado num maior interesse em se incorporar fontes renováveis à matriz energética mundial, em particular com a produção de biocombustíveis (RAHIKAINEN et al., 2013; FALKOSK et al., 2013).

O Brasil é o principal produtor tanto de cana-de-açúcar como de etanol de cana. Na safra 2015/2016, foram produzidos aproximadamente 666 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, enquanto a produção de etanol foi de 30 milhões de m³, um aumento de 185% em relação à safra 2000/2001. A Agência Internacional de Energia (2011) estima que a parcela global de biocombustível destinada ao transporte irá crescer dos 2% atuais para 27% em 2050.

A produção de etanol a partir do caldo de cana (primeira geração) caracteriza-se por ser uma tecnologia moderna e bem compreendida. Entretanto, dois terços da energia contida nos carboidratos da cana-de-açúcar são estocados sob a forma de polissacarídeos localizados na parede celular do vegetal (SOCCOL et al., 2010). Os polissacarídeos representam cerca de 75% dos componentes desta parede e podem ser convertidos em açúcares fermentáveis pela ação de enzimas hidrolíticas (LYND et al., 1991, BAYER et al., 2007; VAN DYK e PLETSCHE, 2012). Segundo a União da Indústria de Cana-de-Açúcar (Unica), o cultivo de cana-de-açúcar gerou

aproximadamente 166,5 milhões de toneladas de bagaço de cana (valor estimado) no período 2015/2016.

O processo de degradação do material lignocelulósico por rota bioquímica apresenta diversas etapas: 1) pré-tratamento do material; 2) hidrólise enzimática dos polissacarídeos; 3) fermentação dos açúcares e 4) separação do produto final (GURAGAIN et al., 2014; DIMAROGONA et al., 2013). Estudos relativos à otimização dessas etapas estão sendo conduzidos com o objetivo de viabilizar a produção em larga escala de etanol lignocelulósico.

O custo e a eficiência hidrolítica das enzimas utilizadas na degradação da biomassa são alguns dos fatores limitantes deste processo, constituindo relevantes gargalos tecnológicos e econômicos (ALVIRA et al., 2011; LE COSTAOUËC et al., 2013). Zhuang (2007) estabeleceu que o custo da produção de enzimas representa 25%-50% do custo total de produção de etanol lignocelulósico. Convém ressaltar que o preço de produção das enzimas celulolíticas não é o único fator a exercer influência sobre a viabilidade da produção de etanol a partir de biomassa (segunda geração), já que as cargas enzimáticas requeridas e os rendimentos de hidrólise são parâmetros altamente estudados para tornar-se viável a produção de etanol de segunda geração.

Segundo a base Aliceweb, no ano 2015 foram exportados US\$ 1.239.393 (FOB) e importados US\$ 2.109.434 (FOB) de preparados enzimáticos à base de celulasas. O Brasil atualmente depende de empresas estrangeiras para a produção de celulasas. Uma alternativa para tentar contornar este obstáculo é a produção de enzimas *in situ* a partir de bagaço de cana. Esta abordagem, além de apresentar vantagens econômicas, estaria de acordo com os preceitos da Biorrefinaria. Com o intuito de aumentar rendimentos de hidrólise, a “engenharia de produto”, processo aplicado para a obtenção de preparados enzimáticos com proporções ideais entre as diversas enzimas lignocelulósicas e proteínas acessórias, apresenta-se como possibilidade promissora.

Em relação às pesquisas envolvendo a produção de celulasas, processos de hidrólise enzimática e processos fermentativos, o Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos possui ampla trajetória e experiência. Neste laboratório, Castro (2006) avaliou as principais linhagens produtoras de celulasas, estudando propriedades cinéticas, físico-químicas e catalíticas. Maeda (2010) estudou a produção de celulasas por *Penicillium funiculosum* ATCC 11797, enquanto Dias (2011) desenvolveu uma pesquisa para produção de β -glucosidases a partir de *Aspergillus* ATCC 1004 e Rocha

(2014) estudou a produção de celulases por *Trichoderma harzianum* IOC 3844. Todos estes trabalhos empregaram bagaço de cana pré-tratado como fonte carbono para a produção enzimática.

Dando continuidade às pesquisas com as celulases, o presente trabalho buscou o desenvolvimento de um biocatalisador celulolítico balanceado, a partir de enzimas de *A. niger*, *P. funiculosum* e *T. harzianum*, no próprio laboratório, bem como promover estudos com proteínas acessórias para a eficiente conversão de biomassa em açúcares fermentáveis, para posterior fermentação e produção de etanol.

A presente tese de doutorado está estruturada em 6 capítulos: -capítulo 1: apresentação do tema de tese; -capítulo 2: revisão bibliográfica, incluindo aspectos de hidrólise enzimática, sinergismos entre enzimas e produção de etanol; - capítulo 3: justificativa e objetivos da tese; -capítulo 4: metodologia utilizada para obtenção dos resultados; -capítulo 5: resultados e discussão, divididos em: a) desenvolvimento de biocatalisador, processos de hidrólise e produção de etanol e b) estudos de sinergismo com proteínas acessórias e surfactantes; finalizando, são apresentadas as conclusões e sugestões para trabalhos futuros no capítulo 6.

O desenvolvimento desta tese permitiu a seguinte produção científica:

Artigos em periódicos:

Méndez, J. A; Moraes, A. O; Modesto, L. F. A.; Castro, A. M; Pereira Jr, N. (2016). Addition of Surfactants and Non-Hydrolytic Proteins and Their Influence on Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sugarcane Bagasse. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***.

Méndez, J. A; Modesto, L. F. A.; Polikarpov, I.; Pereira Jr, N. (2016). Design of an enzyme cocktail consisting of different fungal platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse and synergism studies. ***Biotechnology Progress***.

Trabalhos em eventos:

Passos, D. F; Mangia, L. H. R; Reis, L. A; Méndez, J. A; Pereira Jr, N. Produção de hidrolases por *Penicillium funiculosum* e estudo da viabilidade do reaproveitamento dos principais resíduos e efluentes do processo. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 25 a 29 de setembro de 2016, Fortaleza, Brasil.

Méndez, J. A; Pereira Jr, N. Desenvolvimento de produto enzimático para eficiente hidrólise de celulose utilizando celulasas de diferentes fungos filamentosos. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 25 a 29 de setembro de 2016, Fortaleza, Brasil.

Capítulo 2

LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

2.1. Materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos (biomassa lignocelulósica), geralmente encontrados na forma de resíduos, constituem uma valiosa fonte de matéria-prima renovável para a obtenção de bioprodutos como etanol, butanol, ácidos orgânicos, entre outros (PEREIRA Jr, COUTO e ANNA, 2008).

O termo biomassa abrange toda matéria orgânica que se origina imediatamente de um processo biológico. A biomassa das plantas está estruturada em: lamela média, parede celular e membrana plasmática (figura 2.1), sendo a parede celular tipicamente formada por microfibras de celulose entrelaçadas por hemicelulose e pectina. A lignina, por sua vez, cobre os espaços vazios entre a membrana e a lamela média e funciona como um elemento protetor (FENGEL e WEGENER, 1989; WELKER et al., 2015; ALVES, 2011).

A proporção dos componentes principais pode variar entre 25%-55% de celulose, 8%-25% de hemicelulose e 10%-35% de lignina (KAPOOR et al., 2014), em função dos fatores origem, idade e fase do crescimento, entre outros, podendo variar inclusive dentro de um mesmo tipo de planta (QUIROZ et al., 2015).

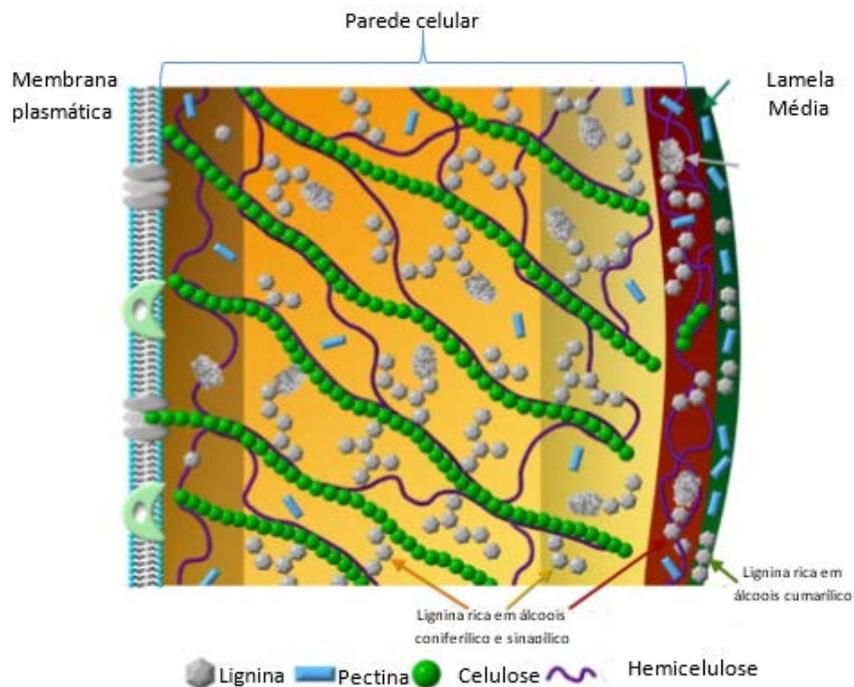


Figura 2.1. Estrutura da biomassa vegetal.
Fonte: adaptado de Achyuthan et al. (2014)

2.2. Celulose

A celulose é um homopolímero linear constituído por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 e é o principal componente do material lignocelulósico. Sua unidade repetida é a celobiose (BROWN et al., 1996), conforme apresentado na figura 2.2

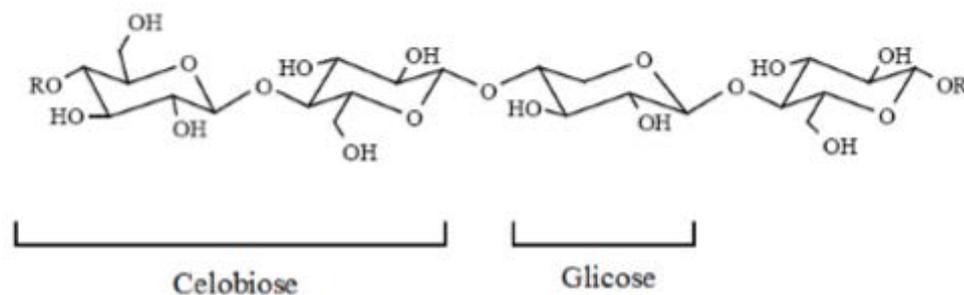


Figura 2.2. Esquema representativo da estrutura de celulose.
Fonte: Fengel e Wegener, (1989), apud Rabelo (2012)

O grau de polimerização da celulose presente na parede celular dos vegetais pode variar entre 7000 a 15000. A estrutura linear permite a formação de ligações de

hidrogênio intra e intermolecular (figura 2.3), sendo a primeira responsável pela rigidez das cadeias unitárias e a segunda pela formação da fibra vegetal (FENGEL e WEGENER, 1989). Estas interações levam a agregações de cadeias de celulose em microfibras, tornando sua natureza cristalina e recalcitrante, resistente ao ataque microbiano e aos tratamentos químicos (BROWN et al., 1996; ALVES, 2011).

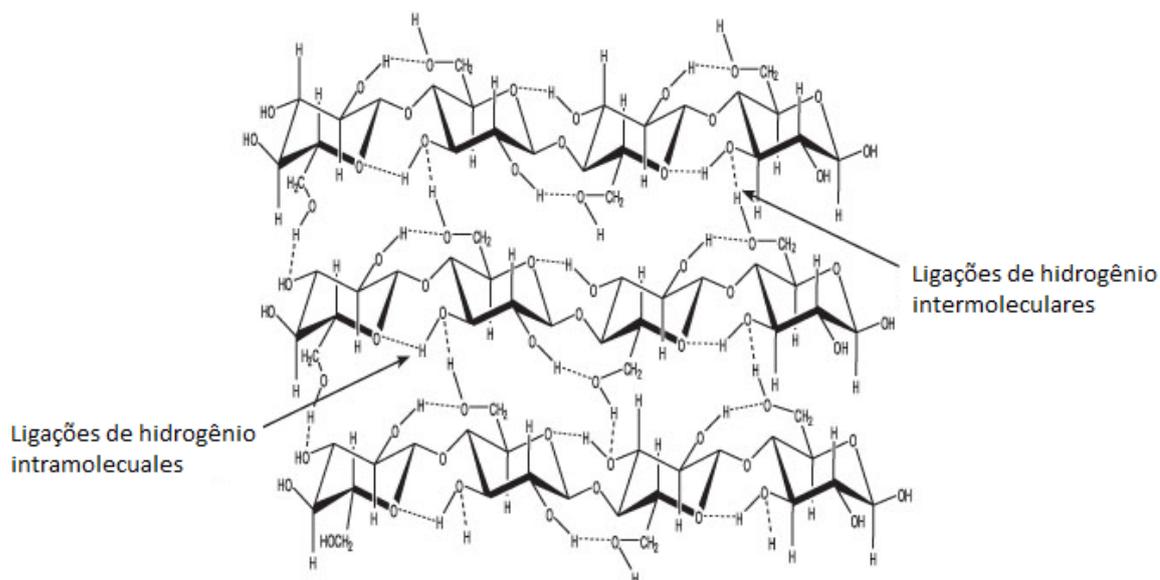


Figura 2.3. Esquema representativo da estrutura de celulose e das ligações de hidrogênio. Fonte: Santos et al. (2012)

A estrutura apresenta regiões ordenadas, denominadas regiões cristalinas, e regiões menos ordenadas, denominadas regiões amorfas. Na região cristalina, a fibra tem maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação, enquanto a região amorfa apresenta um grau de flexibilidade maior e é mais facilmente degradada (FENGEL e WEGENER, 1989; RABELO, 2012).

2.3. Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo constituído principalmente por pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e ácidos (acético, galacturônico e metil-glicurônico), conforme o esquema apresentado na figura 2.4. Quando comparada à celulose, a hemicelulose apresenta baixo grau de polimerização, cadeias mais curtas, não cristalinas e mais suscetíveis à hidrólise a açúcares simples (DIMAROGONA et al., 2013).

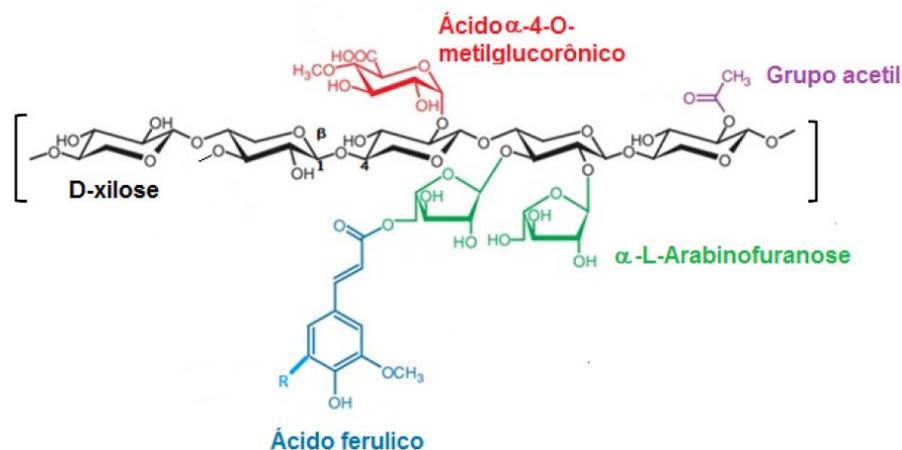


Figura 2.4. Esquema representativo da estrutura da molécula de xilana.
Fonte: Collins et al., (2005); apud Zimbardi (2014)

A estrutura da hemicelulose interage com a celulose, contribuindo para o alinhamento e organização das microfibrilas de celulose, de acordo com o demonstrado por Whitney et al. (1995).

2.4. Lignina

A lignina é uma macromolécula amorfa e tridimensional, composta principalmente por unidades de fenil propano. O acoplamento dessas unidades é sintetizado mediante uma série de oxidações utilizando álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (figura 2.5), gerando unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas (FENGEL e WEGENER, 1989; CARVALHO, 2011; PHITSUWAN et al., 2013).

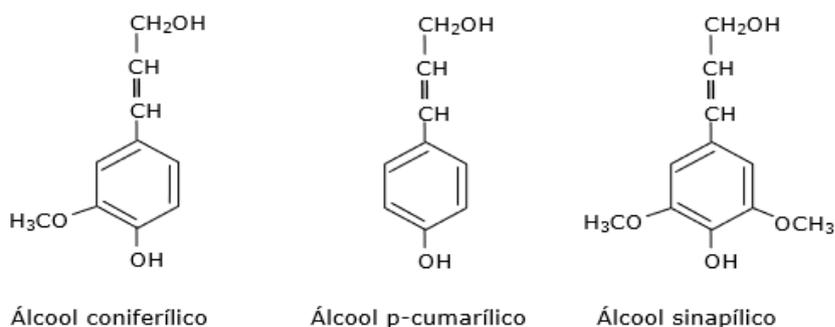


Figura 2.5. Álcoois precursores da biossíntese da lignina.
Fonte: Fendel e Wegener (1989); apud Maeda (2010)

A estrutura da lignina é irregular e heterogênea, podendo variar segundo a espécie (figura 2.6). A principal função desta macromolécula é dotar a parede vegetal de suporte estrutural, reforço mecânico, impermeabilidade e resistência à digestão enzimática (PHITSUWAN et al., 2013).

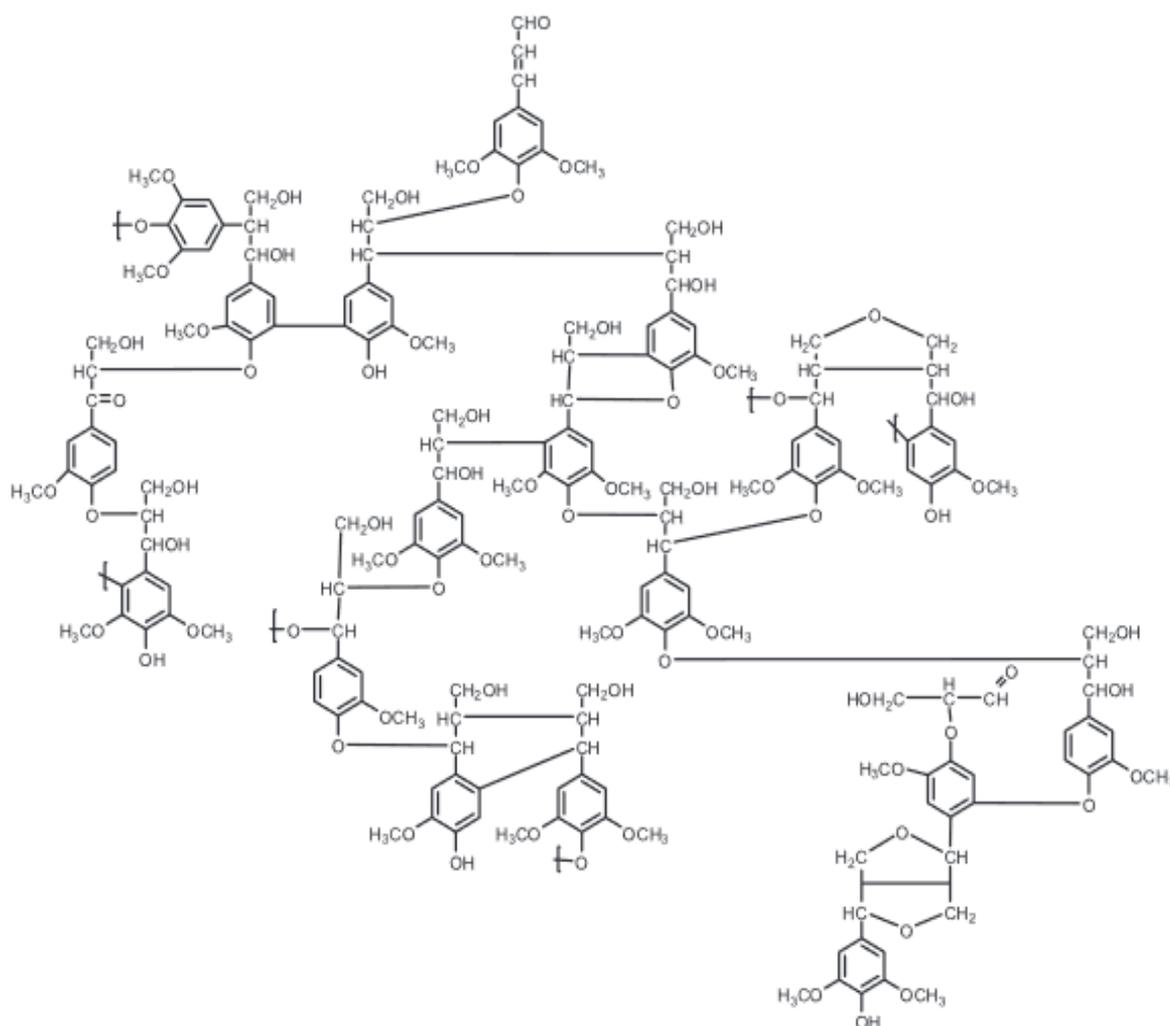


Figura 2.6. Esquema representativo da estrutura de lignina de eucalipto.
Fonte: Santos et al. (2012)

2.5. Pectinas

A pectina é um polissacarídeo heteromolecular constituído de uma longa cadeia principal, formada por inúmeros resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4. Um esquema representativo desta substância é exibido na figura 2.7. A cadeia principal é parcialmente esterificada por grupos metil-éster e associada a açúcares

como arabinose, xilose, ramnose, entre outros. A pectina está relacionada com a proteção celular e a manutenção da estrutura vegetal (EVANGELISTA, 2012).

Componente principal da parede vegetal, a pectina pode ser facilmente extraída, além de possibilitar a troca de cátions (Ca^{+2} , por exemplo) através da parede celular, visto que o ácido galacturônico é uma molécula carregada negativamente (RABELO, 2012).

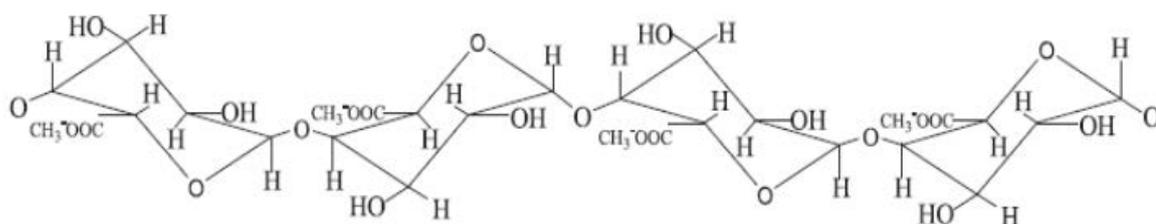


Figura 2.7. Esquema representativo da estrutura da pectina.
Fonte: Alkorta; Garbisu et al., (2008); apud Evangelista (2012)

Conforme mencionado anteriormente, a conversão de material lignocelulósico em bioprodutos requer basicamente quatro etapas: a) Pré-tratamento do material; b) Degradação da celulose e da hemicelulose em açúcares simples, com o auxílio, no caso na rota bioquímica, de enzimas que catalisam a hidrólise desses polímeros; c) Fermentação desses açúcares em bioprodutos, pela ação de leveduras ou bactérias e d) Purificação do produto final (GURAGAIN et al., 2014; DIMAROGONA et al., 2013). Nas próximas seções, cada uma dessas etapas será mais amplamente discutida.

2.6. Pré-tratamentos

A complexa estrutura da parede celular das plantas e sua natureza recalcitrante são fatores que obstaculizam processos de sacarificação enzimática (PHITSUWAN et al., 2013). Sendo assim, pré-tratamentos do material lignocelulósico têm sido estudados, com o objetivo principal de desorganizar as fibras da biomassa, expondo as glucanas e xilanas ao ataque enzimático (figura 2.8) (MAEDA, 2010).

O pré-tratamento do material lignocelulósico é uma etapa crucial para se obter altos rendimentos de hidrólise. Shin et al. (2009) estabelecem que apenas 10% - 20% dos polissacarídeos presentes na biomassa são convertidos em monossacarídeos via

processos de hidrólise enzimática utilizando material *in natura* (apud YOON et al., 2014). Os efeitos produzidos no material, por sua vez, variam segundo o tipo de pré-tratamento, porém todos podem beneficiar o processo hidrolítico.

Alguns dos efeitos apresentados por Van Dyk e Pletschke, (2012) são:

- Remoção da lignina, promovendo aumento da porosidade das fibras do material lignocelulósico;
- Remoção da hemicelulose, facilitando o acesso das celulasas à celulose;
- Redução da cristalinidade das fibras de celulose;
- Redução do grau de polimerização da celulose;
- Redução do tamanho das partículas do material lignocelulósico.

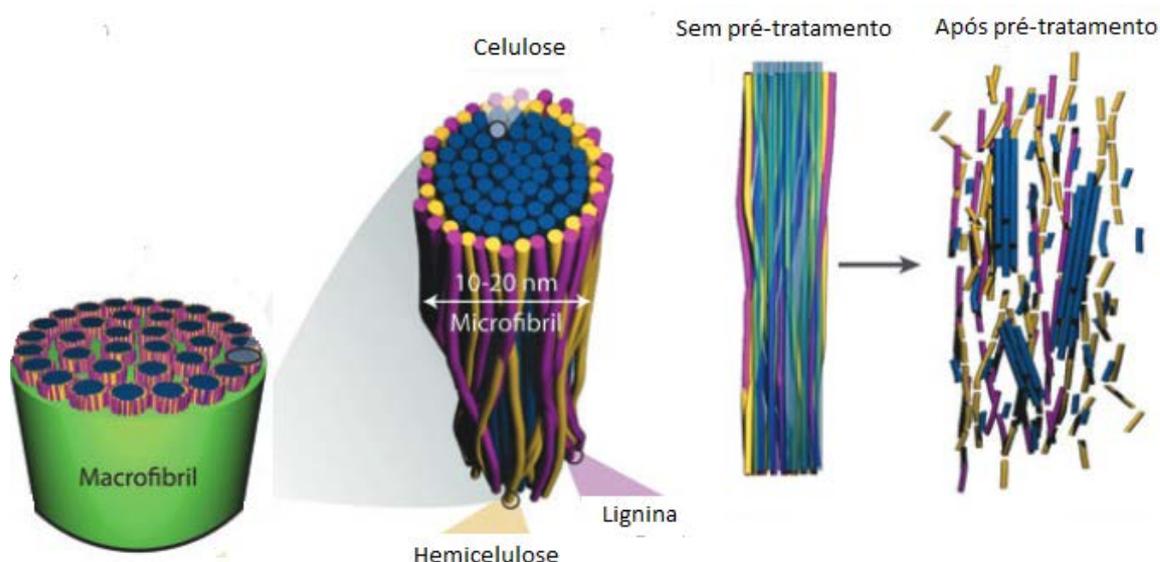


Figura 2.8. Representação das microfibras de material lignocelulósico submetidas ao processo de pré-tratamento. Fonte: adaptado de Rose et al. (2015)

Existem diversos tipos de pré-tratamento, comumente classificados em pré-tratamentos físicos, químicos e biológicos ou mesmo combinação destes.

2.6.1. Pré-tratamentos físicos

Este tipo de pré-tratamento tem a finalidade de reduzir o tamanho das fibras e aumentar sua área superficial. Entre os principais pré-tratamentos físicos, podem ser apontados: moagem (moinho de bolas, pressão, rolo duplo), altas temperaturas (explosão a vapor) e radiação (raios gama, micro-ondas) (ZHENG et al., 2009).

Alguns autores estabelecem como desvantagem dos pré-tratamentos físicos a maior demanda de energia, mas isso depende do tempo de residência. Uma das principais vantagens destes processos reside na menor geração de inibidores para a posterior etapa de fermentação (GUPTA e VERMA, 2015).

2.6.2. Pré-tratamentos químicos

O pré-tratamento químico é aquele que envolve a utilização de um agente químico, que pode ser: um ácido, uma base, um agente oxidante ou redutor, um solvente orgânico, dentre outros (CHANG, 1998). O propósito desta modalidade de pré-tratamento inclui a promoção do aumento da biodegradabilidade da celulose, mediante a diminuição do seu grau de polimerização e a redução da sua cristalinidade, bem como por meio da remoção da lignina e da hemicelulose ligadas às suas fibras (ZHENG et al., 2009).

Ácidos e bases têm sido amplamente empregados no pré-tratamento químico da biomassa lignocelulósica. No pré-tratamento com ácidos diluídos estão incluídos os ácidos sulfúrico, nítrico, clorídrico e fosfórico. O modo de ação consiste na solubilização da fração hemicelulósica, mantendo praticamente intactas a fração celulósica e a lignina. Para processos empregando este tipo de pré-tratamento, têm sido reportados rendimentos de remoção da fração hemicelulósica, em termos de xilose, de até 90% do valor teórico quando da utilização de ácido sulfúrico diluído (apud ZHENG et al., 2009). Porém, entre as desvantagens, estão os problemas relacionados com a corrosão em equipamentos, a necessidade de neutralização do hidrolisado previamente à fermentação e a formação de produtos inibitórios.

Por outro lado, o pré-tratamento alcalino envolve o uso de bases como hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, amônia, entre outros. Esta modalidade está relacionada basicamente com a deslignificação do material, porém também pode ocorrer a solubilização de pequenas quantidades de hemicelulose. A remoção de extrativos e

de grupos ligados à hemicelulose na forma de éster também ocorre, o que aumenta o acesso das enzimas às frações celulósica e hemicelulósica (ZHENG et al., 2009; VALADARES, 2013).

Assim, o processo de deslignificação propicia um maior acesso das enzimas à celulose. Estudos com aplicação de pré-tratamento alcalino em bagaço de cana alcançaram um incremento de 20% para 72% na digestão do material (PLAYNE, 1984).

2.6.3. Pré-tratamentos biológicos

A terceira modalidade de pré-tratamento utiliza micro-organismos, como fungos e bactérias, para degradar o complexo lignocelulósico, disponibilizando, assim, a celulose. Denominado pré-tratamento biológico, ajuda na degradação da lignina e da hemicelulose, bem como na formação de celulose amorfa.

Como vantagens deste tipo de pré-tratamento estão o fato de não serem empregados reagentes químicos, o menor custo de energia de entrada quando comparado aos demais pré-tratamentos e a utilização condições ambientais pouco severas. Entretanto, o processo é lento e requer grande área e controle das condições de crescimento. Segundo Zheng et al. (2009) este pré-tratamento é menos atraente comercialmente, visto que não é específico, podendo ocorrer também a degradação de celulose.

2.6.4. Seleção do pré-tratamento

A seleção do tipo de pré-tratamento mais adequado pode ser baseada nas seguintes considerações (VAN DYK e PLETSCHE, 2012):

- Economicidade do pré-tratamento, baseado nos custos com insumos e no custo energético;
- Deslignificação ou mudanças na estrutura da lignina;
- Necessidade de remoção da fração hemicelulósica;
- Minimização de produtos de degradação dos açúcares;
- Produção de inibidores;
- Aumento do rendimento de hidrólise enzimática após o pré-tratamento e impacto da carga enzimática utilizada.

2.7. Hidrólise do material lignocelulósico.

O material lignocelulósico pode ser convertido em açúcares simples, basicamente, por meio de duas técnicas: via enzimática ou via química intermediada por ácidos (diluídos ou concentrados) (MAITAN-ALFENAS et al., 2015)

A hidrólise ácida é caracterizada por ser um processo rápido, no entanto, dentro dos problemas relacionados a este tipo de tratamento, está a necessidade de reatores que ofereçam segurança operacional e sejam resistentes à corrosão. Além disso, nesses processos, a fração hemicelulósica é hidrolisada anteriormente e de forma rápida em comparação com a celulose, fazendo com que os monossacarídeos provenientes da hemicelulose fiquem expostos por muito tempo no meio reacional, o que leva à sua degradação a produtos potencialmente inibitórios à fermentação (ZHENG et al., 2009; CARVALHO, 2011).

Neste sentido, a hidrólise enzimática torna-se vantajosa, uma vez que ocorre em condições de operação consideradas brandas para o meio ambiente e apresenta menor toxicidade em comparação com a hidrólise ácida (GUPTA e VERMA, 2015; MAITAN-ALFENAS et al., 2015). Ademais, apresenta alta especificidade, não produz inibidores para a posterior etapa de fermentação e os rendimentos obtidos são maiores. Porém, entre as desvantagens, estão os tempos de reação e o alto custo na produção de enzimas (LI et al., 2005; BOLLÓK e RÉCZEY, 2000; ROCHA, 2014).

2.8. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos catalisada por celulasas é uma catálise heterogênea, em que o substrato e o reagente encontram-se em estados físicos diferentes. Dada a insolubilidade do substrato, esse processo requer enzimas solúveis que apresentem afinidade e sejam reativas na interface sólido-líquido (XU et al., 2008).

Dentro dos modelos de um processo de hidrólise catalisado por celulasas são apresentadas as seguintes etapas (ROSE et al., 2015; BANSAL et al., 2009) (Figura 2.9):

1. Difusão das enzimas em direção ao substrato celulósico;
2. Adsorção da enzima ao substrato e posterior difusão na superfície do substrato;

3. Formação do complexo ativo celulase-substrato;
4. Reação no sítio ativo;
5. Descomplexação do complexo ativo celulase-substrato;
6. Dessorção das enzimas.

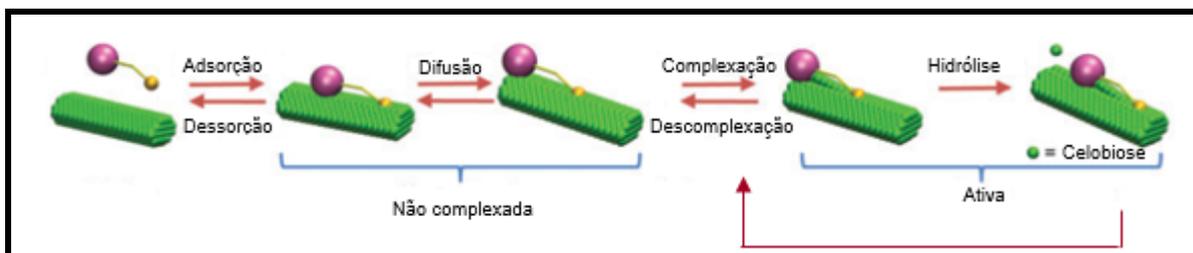


Figura. 2.9. Exemplo das etapas de hidrólise enzimática catalisada por uma exoglucanase com módulo de ligação ao carboidrato (CBM). Fonte: adaptado de Rose et al. (2015)

2.9. Fatores que influenciam a hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática é uma das etapas mais importantes na obtenção de bioetanol e de outros bioprodutos de alto valor agregado. Os fatores que influenciam no rendimento da hidrólise podem ser divididos em dois grupos: fatores relacionados à enzima e fatores relacionados ao substrato.

Entre os fatores limitantes para hidrólise enzimática, relacionados à enzima, estão incluídos (ANDERSEN, 2007):

- Concentração enzimática;
- Capacidade de adsorção da enzima;
- Sinergia entre as enzimas do complexo;
- Inibição pelo produto;
- Desativação mecânica;
- Ligações improdutivas à lignina;
- Atividade enzimática.

De acordo com Fan et al. (1981) entre os fatores que limitam a conversão enzimática dos polissacarídeos em açúcares fermentáveis, relacionados ao substrato, podem ser destacados (ANDERSEN, 2007):

- Cristalinidade da celulose;

- Grau de polimerização da celulose;
- Acessibilidade à área superficial;
- Organização da estrutura do complexo lignocelulósico;
- Presença de hemicelulose e lignina.

Estudos empregando diferentes formas de condução da hidrólise enzimática, em batelada simples ou alimentada, assim como avaliações dos efeitos relacionados à agitação mecânica, buscam contornar partes dos fatores mencionados anteriormente. Por exemplo, Sotaniemi et al. (2014) estudaram o efeito da adição, tanto de enzima como de substrato, na hidrólise de papelão corrugado, concluindo que a adição total da enzima no início do processo e a adição gradual de substrato, em bateladas alimentadas (total de 16% m/v), aumentam o rendimento de hidrólise e a liberação de açúcares redutores.

Igualmente, alguns pré-tratamentos buscam minimizar alguns dos fatores que influenciam a hidrólise enzimática, conforme visto na seção 2.6. Estudos de sinergismo entre enzimas e o uso de surfactantes ou proteínas não hidrolíticas serão apresentados nas seções 2.15 e 2.16.

A figura 2.10 apresenta, de forma esquematizada, alguns dos fatores mencionados como limitantes do processo de hidrólise enzimática.

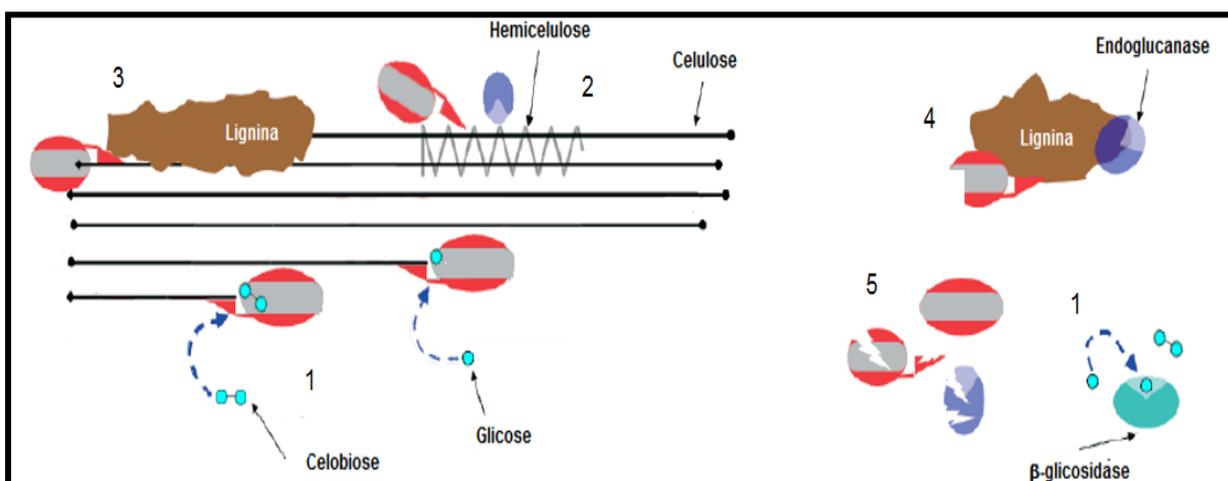


Figura 2.10. Representação esquemática de alguns fatores limitantes da hidrólise enzimática da celulose: (1) Inibição das enzimas por seus produtos (celobiose e glicose); (2) Impedimento estérico das celulasas à celulose pela presença de hemicelulose; (3) Impedimento estérico das celulasas à celulose pela presença de lignina; (4) Adsorção não produtiva da enzima à lignina; (5) desativação das enzimas por desnaturação térmica e/ou por cisalhamento em função de agitação excessiva. Fonte: adaptado de Jorgensen et al., 2007a; apud Carvalho 2009.

2.10. Enzimas lignocelulolíticas

Existem diferentes enzimas com capacidade para degradação do material lignocelulósico. A decomposição deste material envolve a ação de celulasas, hemicelulasas, ligninasas e pectinasas. No quadro 2.1 é apresentado um resumo das principais enzimas lignocelulolíticas.

Entretanto, existem ainda outras proteínas que auxiliam na degradação, como swoleninas, expansinas, CBMs e proteína acessória AA9, cujas ações/funções ainda não estão plenamente definidas (VAN DYK e PLETSCHE, 2012).

Quadro 2.1. Algumas das principais enzimas degradadoras do material lignocelulósico (VAN DYK e PLETSCHE, 2012)

Fração	Enzima
Celulose	Endoglucanase, celobiohidrolase, β -glucosidase
Hemicelulose	Endo-xilanase, β -xilosidase, endo-mananase, acetil xilana esterase, α -L-arabinofuranosidase, α -galactosidase
Lignina	Lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase
Pectina	Pectil metil esterase, poligalacturonase

2.11. Celulasas

As celulasas (EC 3.2.1) pertencem ao grupo das glicosil hidrolases (GH), grupo de enzimas que catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas. As celulasas apresentam especificidade por ligações glicosídicas β -1,4 presentes na celulose.

2.11.1. Classificação

Tradicionalmente, a hidrólise enzimática da fração celulósica é atribuída à ação de três principais grupos de enzimas: endoglucanase, exoglucanase e β -glucosidase, os quais atuam em sinergismo (CASTRO e PEREIRA, 2010).

2.11.1.1. Endoglucanase

As endoglucanases (EC 3.2.1.4) são responsáveis por iniciar a hidrólise, atuando randomicamente em regiões internas da fibra celulósica, liberando

oligossacarídeos, e, conseqüentemente, terminais redutores e não redutores (BAI et al., 2013; FALKOSKI, et al., 2013). Trata-se de enzimas celulolíticas responsáveis pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do grau de polimerização) e conseqüente fragmentação em oligossacarídeos (CASTRO e PEREIRA, 2010), atuando principalmente nas regiões amorfas. No entanto, algumas endoglucanases podem ser capazes de atuar em celulose cristalina (ZHANG e ZHANG, 2013).

Geralmente, seu sitio ativo consiste em um sulco aberto, tipo fenda, permitindo a acomodação na cadeia da celulose (DAVIES e HENRISSAT 1995; ZHANG e ZHANG, 2013).

2.11.1.2. Exoglucanase

As exoglucanases são constituídas por glucano-hidrolase (GH) e celobio-hidrolase (CBH). A GH (EC 3.2.1.74) é pouco reportada e se caracteriza por liberar glicose diretamente do polímero. As CBH atuam nas extremidades da cadeia, liberando como produto principal celobiose. Esse grupo é dividido em celobiohidrolase I (CBHI) (EC 3.2.1.176), que age nos terminais redutores e celobiohidrolase II (CBH II) (EC 3.2.1.91), que atua nos terminais não redutores (BAI et al., 2013; FALKOSKI et al., 2013). Os seus sítios, em geral, são em formato de túnel (DAVIES e HENRISSAT 1995; ZHANG e ZHANG, 2013).

2.11.1.3. β -glucosidase

O grupo das β -glucosidases (EC 3.2.1.21) participa da hidrólise de ligações β -glicosídicas em oligossacarídeos de cadeias pequenas, dissacarídeos, alquil e aril β -D-glicosídeos (SINGHANIA et al., 2013). Algumas dessas enzimas são capazes de atuar na hidrólise de β -D-galactosídeos, α -L-arabinosídeos, β -D-xilosídeos, β -D-fucosídeos (SORENSE et al., 2010).

As β -glucosidases podem ser classificadas em função da especificidade pelo substrato: 1) aril beta glucosidases, que atuam em aril beta glucosídeos; 2) as celobiasas, com afinidade por celobiose, liberando glicose e 3) *broad specificity* beta glucosidases, que atuam num amplo espectro de substratos (SINGHANIA et al., 2013).

Na hidrólise da celulose, as β -glucosidases atuam em sinergismo com as celulasas e são responsáveis por catalisar a hidrólise de oligossacarídeos de cadeia curta e de celobiose, liberando glicose (SINGHANIA et al., 2013). Em geral, as β -glucosidases apresentam uma topologia em formato de bolsão (ZHANG e ZHANG, 2013).

A figura 2.11 apresenta as topologias encontradas nas enzimas relacionadas com a degradação da celulose.

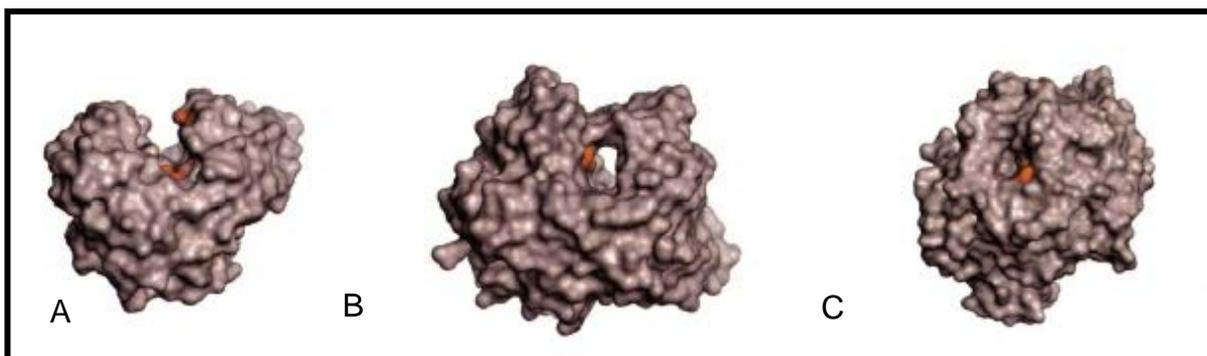


Figura 2.11. Três topologias apresentadas no sítio ativo de glicosil hidrolases: A) fenda; B) túnel; C) bolsão. Fonte: Davies e Henrissat (1995); adaptada de Stankovic (2014)

Henrissat (1991) classificou as glicosil hidrolases em famílias, segundo a similaridade entre sequências de aminoácidos. Atualmente, são conhecidas 133 famílias de enzimas glicosil hidrolases. As endoglucanases são encontradas nas famílias GH 5-10,12,26,44,45,48,51,74 e 124; as exoglucanases nas famílias GH 5-7,9 e 48; e as β -glucosidase nas famílias GH 1,3,5,9,30,116.

Além da classificação baseada na similaridade entre sequências de aminoácidos, com a determinação da estrutura terciária das glicosil hidrolases, algumas famílias foram agrupadas em clãs, com base no tipo de enovelamento do domínio catalítico. Atualmente, existem 14 grupos, nomeados de GH-A a GH-N, sendo o GH-A o mais comum, com um tipo de enovelamento $(\beta/\alpha)_8$ (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases>).

A figura 2.12 apresenta um esquema das etapas da hidrólise enzimática da celulose, com a atuação das principais enzimas envolvidas na sua degradação.

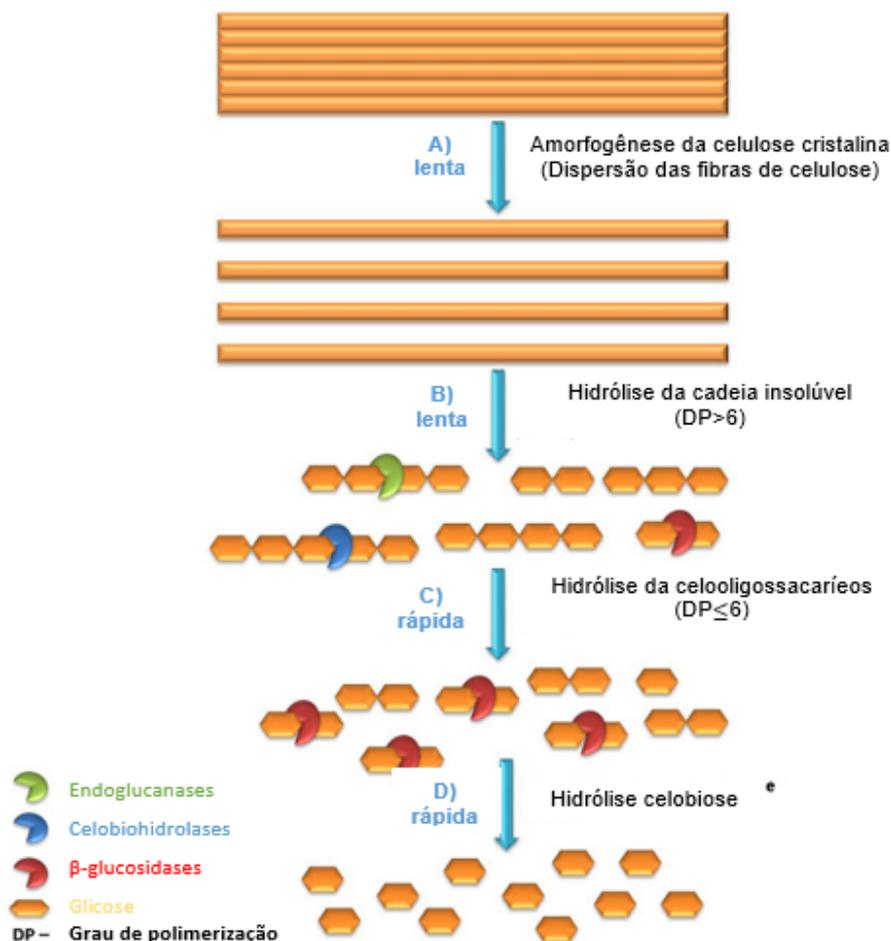


Figura 2.12. Esquema das etapas de hidrólise enzimática da celulose.
Fonte: Arantes e Saddler (2010).

2.11.2. Mecanismos de atuação

As glicosil hidrolases clivam ligações glicosídicas através de catálise ácido-base. A catálise pode ocorrer por dois mecanismos: (1) retenção da configuração do carbono anomérico; ou (2) inversão da configuração do carbono anomérico (SCHÜLEIN, 2000; RUBINI, 2009).

O mecanismo de inversão consiste em um simples deslocamento, dois aminoácidos carboxilados da enzima, os quais atuam como ácido e base. Neste caso, uma molécula de água ativada pelo resíduo básico ataca o centro anomérico mediante substituição nucleofílica, hidrolisando a ligação glicosídica e promovendo a inversão anomérica (SCHÜLEIN, 2000; KITAOKA et al., 2009; RUBINI, 2009) (Figura 2.13).

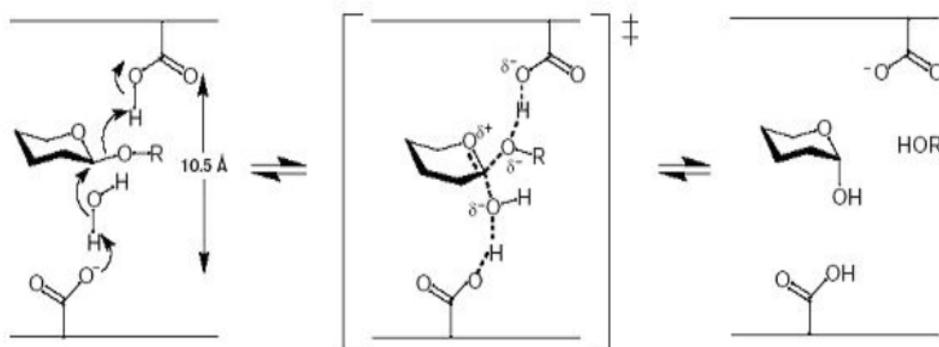


Figura 2.13. Esquema do mecanismo de inversão das glicosil hidrolases.
 Fonte: https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases; apud Rubini (2009)

O mecanismo de retenção consiste em uma substituição dupla com retenção da configuração do carbono anomérico após sua catálise. Duas carboxilas atuam como grupos catalisadores e executam duas etapas separadas. Na primeira etapa, um grupo carboxílico age como um ácido, promovendo a catálise ácida, o que protona o oxigênio glicosídico. Simultaneamente, o outro grupo carboxílico atua como uma base (nucleofílico) formando uma enzima intermediária covalente (glicosil-enzima). A segunda etapa da reação envolve o ataque de uma molécula de água ao intermediário glicosil-enzima, com a transferência simultânea de um próton da água para o doador de prótons da primeira etapa, ativando o reagente nucleofílico e, finalmente, hidrolisando o intermediário glicosil-enzima e liberando o produto (BRAS et al., 2009; RUBINI, 2009; MORANA et al., 2010) (Figura 2.14).

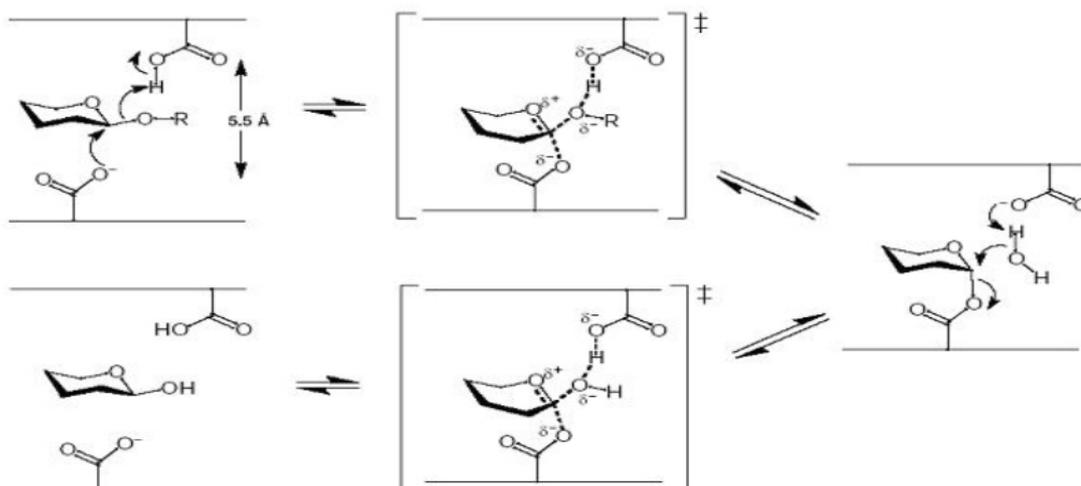


Figura 2.14. Esquema do mecanismo de retenção das glicosil hidrolases.
 Fonte: https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases; apud Rubini (2009)

2.11.3. Produção de celulases

As celulases são produzidas principalmente por dois tipos de fermentação, a saber: Fermentação Submersa (FS) e Fermentação em Estado Sólido (FES) (CASTRO e PEREIRA, 2010).

A fermentação em estado sólido é caracterizada pela ausência ou quase ausência de água livre (PANDEY, 2003). Já a fermentação submersa (FS) é caracterizada essencialmente pelo alto teor de água, que facilita a distribuição de nutrientes e a homogeneidade do sistema (CASTRO e PEREIRA, 2010).

Existe uma série de fatores que diferencia as duas estratégias de produção. O quadro 2.2 apresenta essas diferenças.

Quadro 2.2. Comparação entre a fermentação submersa e a fermentação no estado sólido

Fator	Fermentação submersa (FS)	Fermentação no estado sólido (FES)
Distribuição de Nutrientes	Homogênea	Heterogênea
Produtos no meio	Diluídos	Concentrados
Aeração	Grandes volumes de ar, para solubilizar o O ₂ em água	Dificuldade de dispersão homogênea de O ₂
Agitação mecânica	Homogeneidade do meio	Condições mais estáticas (Segundo o tipo de reator)
Contaminação	Alto risco	Baixo risco
Microrganismos	Crescimento uniforme distribuído no meio	Crescimento aderido ao meio sólido
Temperatura	Fácil controle de temperatura, homogeneidade do meio	Difícil controle de temperatura, baixa capacidade de transferência de calor no meio

Fonte: Adaptado de MITCHELL, 2000 e PEREIRA Jr. et al. 2008 (apud ROCHA, 2014)

2.12. Hemicelulases

A hidrólise da fração hemicelulósica requer um grupo mais complexo de enzimas em comparação com a fração celulósica. As enzimas que catalisam a degradação da hemicelulose podem ser divididas em enzimas que clivam a cadeia principal e as que removem os grupos laterais (VAN DYK e PLETSCHE, 2012).

A hidrólise completa de xilanas, um dos maiores polissacarídeos que podem compor a cadeia principal da hemicelulose, requer a ação das endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8), que atuam randomicamente nas ligações internas da cadeia principal, liberando xilooligossacarídeos, e das β -xilosidases (EC 3.2.1.37), que catalisam a hidrólise desses oligossacarídeos a partir de terminais não redutores, liberando xilose. (MAITAN-ALFENAS et.al., 2015). De igual forma, se a cadeia principal fosse formada por mananas, seria requerida a ação das endo-mananases e das β -mananases (VAN DYK e PLETSCHKE, 2012).

Diferentes grupos podem estar ligados à cadeia principal da hemicelulose, como arabinose, acetil, galactose e glicose. Portanto, para a remoção desses grupos laterais é necessária a ação de enzimas específicas, a exemplo de: α -L-arabinofuranosidases, α -D-glicuronidases, acetil xilana esterases, ácido ferúlico esterases e ácido p-cumárico esterases, α -galactosidase, entre outras (MAITAN-ALFENAS et al., 2015; OKEKE, 2009), de modo a permitir o acesso de enzimas que catalisam a clivagem da cadeia principal e, dessa forma, a degradação da fração hemicelulósica (VAN DYK e PLETSCHKE, 2012). A Figura 2.15 apresenta um esquema da ação das hemicelulases na hidrólise da hemicelulose.

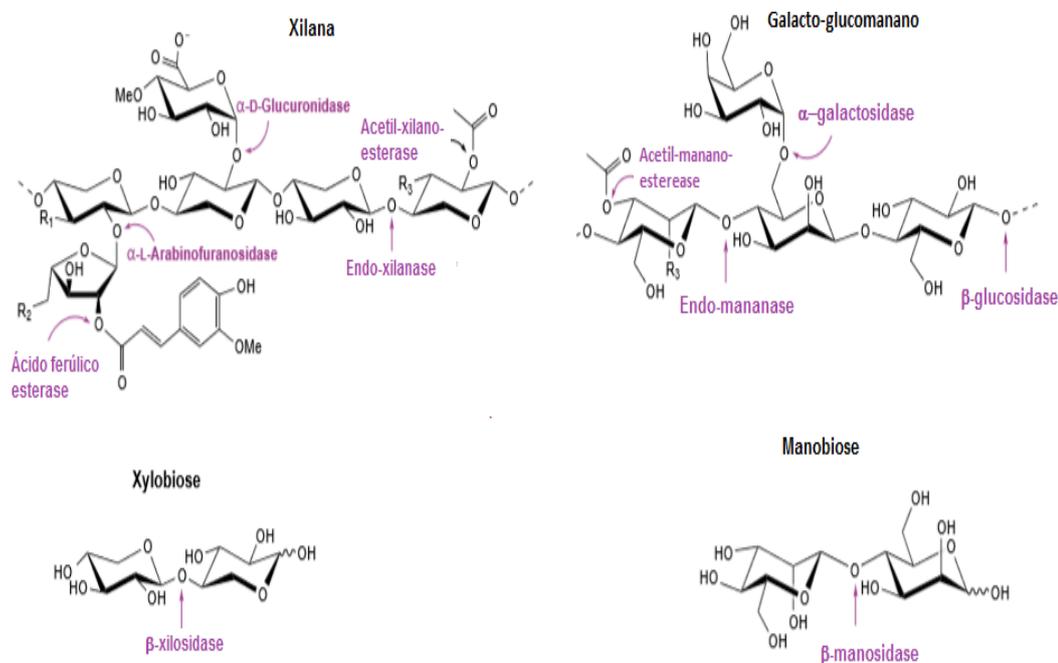


Figura 2.15. Esquema da ação das diferentes enzimas xilanolíticas na hidrólise da fração hemicelulósica. Fonte: adaptado de Shallom e Shoham (2003)

2.13. Ligninases

A degradação da lignina envolve uma série de processos de oxidação tanto de compostos fenólicos como não fenólicos por meio de enzimas ligninolíticas extracelulares (FASANELLA, 2008). No conjunto das ligninases, as principais enzimas são a lacase e as peroxidases: manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP) e peroxidase versátil (VP na sigla em inglês) (DASHTBAN et al., 2010; SOUZA, 2012).

2.13.1 Lignina peroxidase (LiP)

A lignina peroxidase é uma glicoproteína dependente do peróxido de hidrogênio e que apresenta ferroprotoporfirina IX (heme) como grupo prostético (DASHTBAN et al., 2010; COELHO, 2007).

No ciclo catalítico da LiP, o ferro (III) é oxidado a ferro (IV), pelo peróxido de hidrogênio, formando o denominado composto I, o qual é capaz de oxidar substratos fenólicos e não fenólicos, levando à formação de radicais catiônicos. Portanto, o composto I, por meio da transferência de um elétron, é reduzido a composto II, que posteriormente é reduzido, voltando, assim, a enzima à sua forma nativa, completando o ciclo catalítico (MARTÍNEZ, 2002; COELHO, 2007).

No processo de degradação da lignina, destaca-se o sistema Lip/álcool veratril (AV). O AV é um metabolito secundário que pode ser oxidado pela enzima LiP gerando um radical catiônico capaz de oxidar a lignina. No entanto, é um composto extremamente instável, o que indica não ser este o principal degradador inicial da lignina, mas sim um estabilizador da enzima, o qual atua como agente redutor do composto II, impedindo a inativação da enzima pelo excesso de peróxido de hidrogênio (AGUIAR e FERRAZ, 2011).

2.13.2. Manganês peroxidase (MnP)

Esta peroxidase contém o grupo prostético heme igual ao das LiP e depende de peróxido de hidrogênio e de Mn^{+2} . Seu ciclo catalítico é semelhante ao de LiP, entretanto, o Mn^{+2} pode atuar como doador de elétrons para gerar o composto II e é responsável por reduzi-lo, fazendo com que a enzima retorne à sua forma nativa, dessa forma, fechando o ciclo catalítico (COELHO, 2007; AGUIAR e FERRAZ, 2011).

Os íons Mn^{+3} gerados neste processo são estabilizados por ácidos orgânicos, a exemplo do oxalato, ou por outros agentes quelantes. Os Mn^{+3} quelados atuam como mediadores difusíveis de baixa massa molecular e oxidam a lignina (COELHO, 2007; DASHTBAN et al., 2010).

A MnP age principalmente em compostos fenólicos, no entanto, no processo conhecido como peroxidação lipídica, foi verificada a oxidação de substratos não fenólicos (COELHO, 2007; AGUIAR e FERRAZ, 2011).

2.13.3. Peroxidases versáteis

As peroxidases versáteis são glicoproteínas com capacidade de oxidar Mn^{+2} e substratos típicos das LiP, e apresentam características híbridas entre a LiP e a MnP (COELHO, 2007; DASHTBAN et al., 2010).

2.13.4. Lacases

Lacases são oxidoredutases multicobre responsáveis por oxidar uma variedade de compostos aromáticos usando oxigênio como aceptor de elétrons e produzindo água como subproduto (CAÑAS e CAMARERO, 2010). Apresentam íons de cobre em seu centro catalítico, os quais mediam os processos redox (DASHTBAN et al., 2010). São produzidas por bactérias, algas, plantas e fungos, principalmente basidiomicetos. Segundo Youn et al. (1995), estas enzimas possuem alta especificidade por compostos aromáticos que contêm grupos aminos e hidroxilas.

Assim como as LiP, são capazes de catalisar o rompimento de anéis aromáticos, produzindo radicais fenoxilas (SOUZA, 2012). Coelho (2007) menciona que, até 1990, acreditava-se que as lacases eram capazes de degradar somente compostos fenólicos. Porém, foi demonstrado que lacases de *Trametes versicolor* apresentavam a capacidade de oxidar ligninas não-fenólicas em presença de mediadores redox adequados, formando o sistema lacase/mediador (LMS, na sigla em inglês).

2.13.5. Enzimas que produzem peróxido

Para a atividade de peroxidases é necessária a presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) extracelular. A aril álcool oxidase (AAO) e a glioxal oxidase (GOx) são as principais enzimas produtoras de H_2O_2 extracelular, sendo denominadas de enzimas acessórias. Além destas enzimas, outras, tais como aril álcool desidrogenase (AAD) e quinonas redutases (QR) atuam na degradação da lignina (DASHTBAN et al., 2010; VALADARES, 2013).

Na figura 2.16 está ilustrado um esquema representativo da degradação da lignina, apresentando as principais enzimas envolvidas.

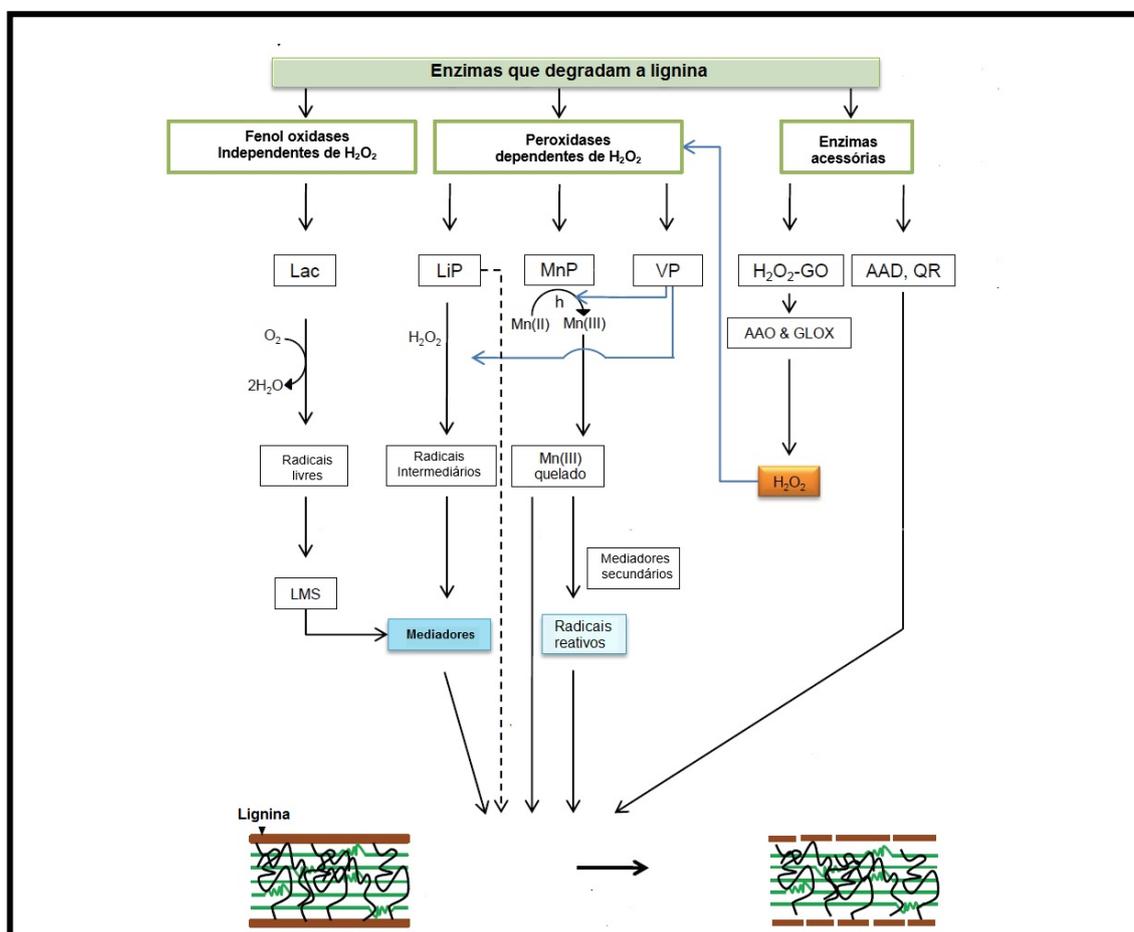


Figura 2.16. Esquema representativo das enzimas envolvidas na degradação da lignina por basidiomicetes. Fonte: Adaptado de Dashtban et al. (2010)

2.14. Pectinases

As pectinases são enzimas que atuam em substâncias pécicas e podem ser produzidas por bactérias, leveduras, fungos filamentosos e plantas (EVANGELISTA, 2012).

São classificadas segundo o mecanismo de ataque em 3 grupos: protopectinases; esterases e despolimerases. As protopectinases catalisam a dissociação da pectina aos demais componentes da parede celular solubilizando-a; as esterases participam na remoção dos grupos metil éster que se encontram ligados aos monômeros de ácido galacturônico; e as despolimerases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4, liberando os açúcares (EVANGELISTA, 2012).

2.15. Sinergismo

Sinergismo é caracterizado pela cooperação entre as enzimas de um mesmo complexo enzimático. Kumar e Wyman (2009b) definiram sinergismo como “o rendimento das enzimas quando atuam em conjunto é superior à soma dos rendimentos de cada uma delas atuando individualmente na mesma quantidade que as utilizadas na mistura”.

O sinergismo depende das proporções de enzimas utilizadas, (NIDETZKY et al.,1994), das características da enzima e das características do substrato. Este tipo de estudo tem sido utilizado para esclarecer o mecanismo de ação das enzimas, assim como a interação entre elas (VAN DYK e PLETSCHKE, 2012).

Existem vários estudos sobre sinergismo: entre celulases, entre hemicelulases, entre proteínas não hidrolíticas e complexos enzimáticos, assim como combinações dessas proteínas, alguns deles mencionados por Van dyk e Pletschke (2012).

2.15.1. Sinergismo entre celulases

O sinergismo entre celulases foi descrito pela primeira vez por Mandels e Reese (1964). Desde então, têm sido destacados dois tipos de sinergismo entre celulases: (a) o sinergismo entre as endoglucanases e exoglucanases; (b) o sinergismo da adição de β -glucosidases a um complexo de celulase (KYLOSOV, 2010).

O sinergismo entre endoglucanases e exoglucanases é descrito geralmente como a cooperação entre elas. Desta forma, as endoglucanases clivam as cadeias poliméricas da celulose criando novas extremidades da cadeia, que servem como substratos para as exoglucanases. Isto evidencia o motivo pelo qual a ação separada de endoglucanases e celobiohidrolases é significativamente menos eficiente do que a ação conjunta das duas enzimas (KYLOSOV, 2010).

O sinergismo do segundo tipo é explicado pela ação das β -glucosidases, que catalisam a conversão da celobiose em glicose, eliminando celobiose do meio reacional e, conseqüentemente, o problema de inibição pelo produto sofrido principalmente pelas enzimas do tipo exoglucanases (BUSSAMRA et al., 2015). Por exemplo, Ng et al. (2011) demonstraram que adição de diferentes β -glucosidase em celulases de *T. reesei*, aumenta as atividades endoglucanásica e exoglucanásica em até 8,9 vezes e diminui a inibição pelo produto.

Além do sinergismo entre as endoglucanases e exoglucanases, e entre β -glucosidases, outro tipo de sinergismo foi detectado durante a hidrólise da celulose cristalina por Rabinovich et al. (1986). o sinergismo entre endoglucanases, observado entre duas endoglucanases, uma firmemente adsorvida, e outra fracamente adsorvida. A ação conjunta destes dois tipos de endoglucanases conduz a uma maior hidrólise de celulose. Adicionalmente, é observado um aumento no grau de conversão do substrato, obtendo-se, segundo os autores, grau de conversão de celulose microcristalina superior a 75%. Estudos têm demonstrado que a combinação deste tipo de enzimas pode aumentar a taxa de hidrólise de 6 a 20 vezes. As enzimas fortemente adsorvidas podem penetrar nas regiões intercristalinas e abrir novos locais para a ação de enzimas fracamente adsorvidas, explicando assim o mecanismo de sinergismo entre endoglucanases fortemente e fracamente adsorvidas (KYLOSOV, 2010).

2.15.2. Sinergismo entre hemicelulases

O sinergismo entre hemicelulases pode ser dividido em: homo-sinergismo, hetero-sinergismo (KOVÁCS, 2009).

O homo-sinergismo é o sinergismo entre enzimas que clivam a cadeia principal, ou entre enzimas que clivam as cadeias laterais da hemicelulose. Por exemplo, já foram reportados sinergismos entre endoxilanases de diferentes espécies, entre

endoxilanasas e β -xilosidasas e um sinergismo entre ácido ferúlico esterase e α -arabinofuranosidase (KOVÁCS, 2009).

O hetero-sinergismo é o sinergismo entre hemicelulases que clivam a cadeia principal e as enzimas que clivam os grupos ramificados a exemplo do sinergismo já reportado entre ácido ferúlico esterase e endoxilanasas, entre α -arabinofuranosidasas e endoxilanasas e entre acetil-xilano esterase e endoxilanasas (KOVÁCS, 2009).

2.15.3. Sinergismo entre celulases e hemicelulases.

O acesso de enzimas celulolíticas à celulose é influenciado pela presença de xilanas (ZHANG et al., 2010), portanto, a adição de xilanasas a complexos celulolíticos poderia aumentar a conversão da celulose a glicose. Vários estudos demonstraram que a suplementação de celulases com β -xilosidase, α -arabinofuranosidase, acetil xilano esterase e outras enzimas acessórias pode alterar positivamente o rendimento de hidrólise de substratos como palha de milho, bagaço de cana e palha de trigo. Por exemplo, Delabona et al. (2013) estudaram o efeito de suplementar pectinase e α -L-arabinofuranosidase a um coquetel enzimático de *T. harzianum* e β -glucosidase comercial na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado com explosão a vapor seguido de pré-tratamento com NaOH. Obtendo um aumento de 116% na liberação de açúcares redutores totais.

Entretanto, fatores como a variação entre as estruturas de diferentes fontes de biomassas e o efeito de diferentes pré-tratamentos tornam mais complexo o processo de degradação do material lignocelulósico. Pryor et al. (2012) estudaram o efeito da suplementação de hemicelulases em substrato lignocelulósico pré-tratado com amônia em diferentes condições de tempo e temperatura. Foi demonstrado que o rendimento de hidrólise aumentou com a suplementação de hemicelulases no material pré-tratado em condições moderadas, enquanto, em condições mais brandas, a carga de hemicelulases empregada não foi suficiente para se obter um alto rendimento de hidrólise. Em contrapartida, o material pré-tratado em condições mais severas não demonstrou efeito positivo, apesar de ter sido este o pré-tratamento que possibilitou o mais alto grau de deslignificação.

2.15.4. Sinergismo entre celulases e proteínas não hidrolíticas

Estudos têm demonstrado que a presença de proteínas não hidrolíticas pode diminuir a recalcitrância da biomassa, favorecendo o ataque enzimático. Entre essas proteínas estão: módulo de ligação ao carboidrato (CBM), expansinas e swoleninas (DIMAROGONA et al., 2013). Outras proteínas consideradas como proteínas auxiliares (AA9), podem contribuir para a hidrólise da celulose mediante mecanismos oxidativos. O quadro 2.3 apresenta um resumo das principais proteínas não hidrolíticas que atuam em sinergismo para a hidrólise enzimática da celulose.

Quadro 2.3. Proteínas acessórias que atuam em sinergismo com celulases na hidrólise enzimática da celulose (adaptado KIM et al., 2014).

Classe de Proteína	Tipo	Função molecular ou biológica
Módulo de ligação ao carboidrato (CBM)	tipo A, tipo B e tipo C	Unir-se ao carboidrato/ desorganização.
Expansinas de plantas	EXPA, EXPB, EXLA e EXLB	Extensão, afrouxamento e desorganização da parede celular/ envolvidas no crescimento celular .
Expansinas microbianas	---	Desorganização da parede celular/ Facilita interação entre micro-organismo e plantas.
Swolenina	---	Inchaço em fibras de algodão, desorganização da celulose e da parede celular.
Monooxigenases	AA9 e AA10	Clivagem oxidativa da celulose cristalina

2.15.4.1. Módulo de ligação ao carboidrato

Celulases de fungos geralmente são bimodulares, apresentando um domínio catalítico interligado a um módulo de ligação ao substrato (CBM) (RAHKAINEN et al., 2013). O domínio catalítico catalisa a hidrólise de ligações β -1,4 na celulose, enquanto a função do CBM está relacionada ao processo de ligação à celulose. Os CBMs,

através da ligação à celulose, incrementam a ação enzimática, permitindo reconhecer o local específico nos substratos e, dessa forma, induzindo a desorganização da fibra. A figura 2.17 apresenta um esquema da amorfogênese da fibra por meio dos CBMs.

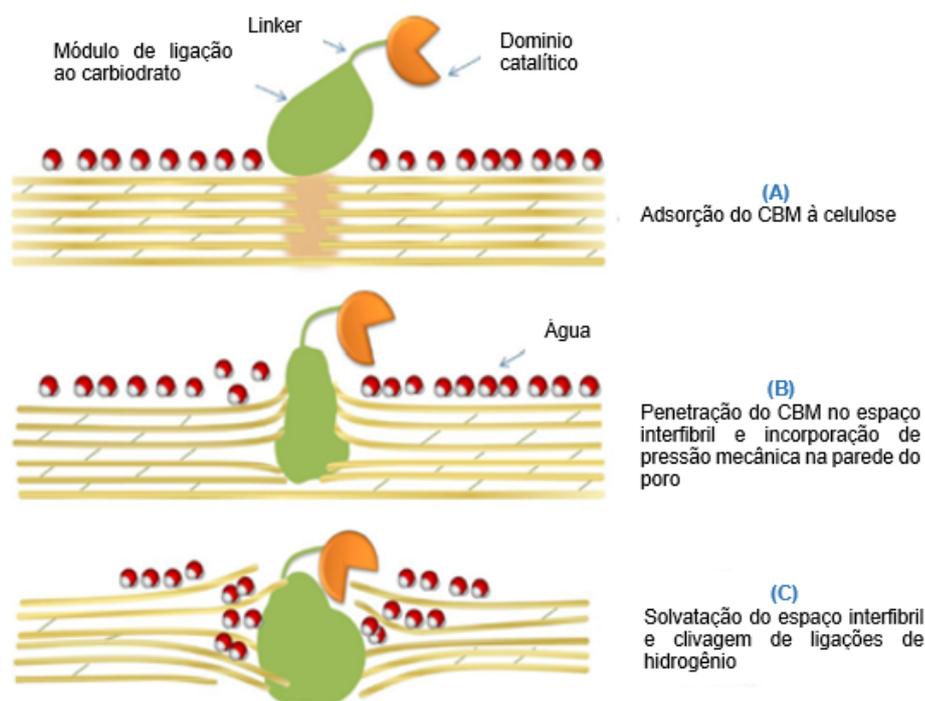


Figura 2.17. Esquema da amorfogênese da fibra da celulose por meio de CBMs.
Fonte: adaptado de Arante e Saddler (2010).

Gao et al. (2001) observaram experimentalmente alterações, relacionadas à ação dos CBMs, nas propriedades físicas da celulose em fibras de algodão. Foram verificados redução da cristalinidade, ruptura das ligações de hidrogênio entre as cadeias do polímero e formação de irregularidades na superfície da celulose, aspectos que favorecem os processos de hidrólise. Por outro lado, Le Costaouéc et al. (2013) estudaram o efeito da presença de CBM em enzimas de *T. aurantiacus* e *T. reesei*, concluindo que a eficiência hidrolítica das celulases é fortemente dependente da presença de CBMs em condições de hidrólise diluída. Contudo, em altas concentrações de substrato (10%-20% de massa seca) esse efeito é pouco notório.

Assim como as celulases, outras glicosil hidrolases possuem CBMs, a exemplo de xilanas, quitinases e amilases (KIM et al., 2014). De maneira similar às glicosil hidrolases, os CBMs são classificados em famílias, com base na semelhança entre as sequências de aminoácidos. Atualmente, estão descritas 71 famílias de CBMs. Essa

classificação, entretanto, não permite prever a função ou a especificidade dos CBMs. Desta forma, os CBMs foram classificados segundo as similaridades funcionais e estruturas em três tipos: A, B e C (BORASTON et al., 2004) (Figura 2.18).

Nos CBMs do tipo A, o local de ligação está relacionado a uma arquitetura planar hidrofóbica que seria complementar às estruturas planares apresentadas pela celulose cristalina e pela quitina (BORASTON et al., 2004).

O local de interação dos CBMs tipo B (ligação tipo *endo*; atuam nas ligações internas) está relacionado com a interação do tipo fenda, que permite a ligação com substratos que apresentam DP > 4 (GILBERT et al., 2013).

Os CBMs tipo C (ligação tipo *exo*, atuam nos terminais redutores e não redutores) ligam-se a mono, di ou trissacarídeos, apresentando uma interação tipo bolsa (GILBERT et al., 2013).

A figura 2.18 apresenta um esquema da atuação dos diversos tipos de CBMs nas diferentes regiões do polissacarídeo.

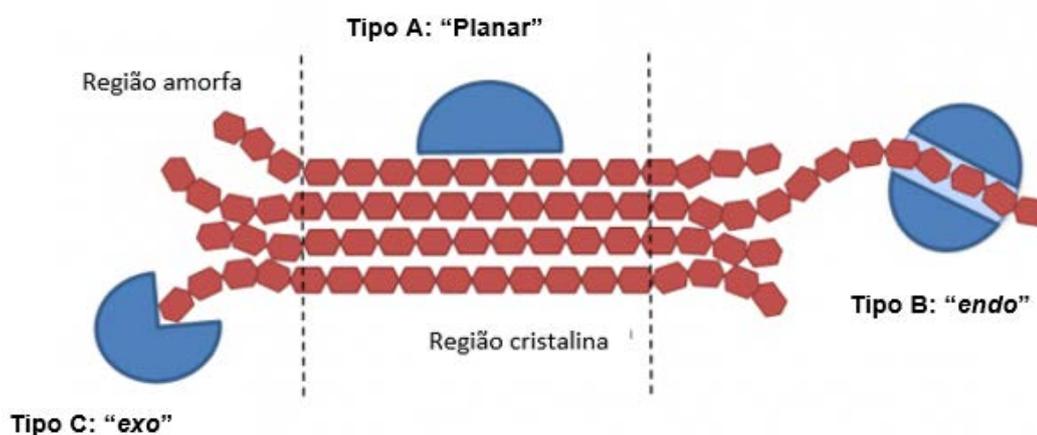


Figura 2.18. Esquema representativo da atuação dos diferentes tipos de CBMs nas diferentes regiões do polissacarídeo.

Fonte https://www.cazypedia.org/index.php/Carbohydrate-binding_modules

2.15.4.2. Expansinas e swoleninas.

Expansinas originalmente foram encontradas como proteínas extracelulares na parede celular da maioria das plantas terrestres. Essas proteínas induzem o relaxamento e a extensão da parede celular das plantas, resultando no afrouxamento

da matriz lignocelulósica (KIM et al., 2014). Existem diferentes tipos de expansinas: expansinas tipo α , tipo β e expansinas similares a expansinas tipo α e β (TOMAZINI, 2012). A figura 2.19 apresenta um esquema representativo da ação das expansinas no material lignocelulósico.

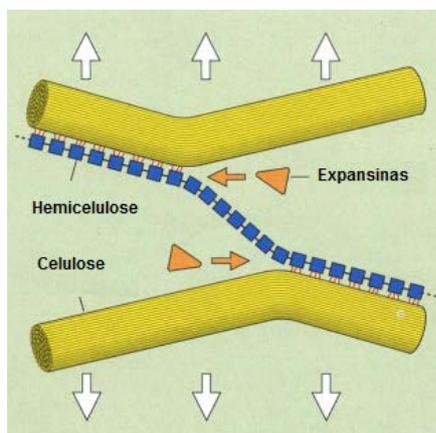


Figura 2.19. Esquema representativo da ação das expansinas no material lignocelulósico. Fonte: Fry, (1994).

Apesar da falta de atividade hidrolítica, alguns estudos têm demonstrado que expansinas aumentam os rendimentos de hidrólise enzimática da celulose. Acredita-se que esse aumento esteja associado à desorganização da fibra celulósica devido à quebra das ligações de hidrogênio entre as fibras da celulose e entre a celulose e a hemicelulose, melhorando o acesso das celulasas (TOMAZINI, 2012). Kim et al. (2014) destacam a expansina de *B. subtilis* (*BsEXLX 1*) como a primeira expansina de bactéria que apresentou sinergismo com celulasas, alcançando um aumento de 240% no rendimento de hidrólise de papel de filtro com baixa carga de celulasas.

Estudos posteriores adicionaram essa expansina a misturas de celulasas comerciais e β -glucosidase de *Aspergillus aculeatus* BCC 199, obtendo um aumento de 3,2 vezes no rendimento de hidrólise de palha de arroz (SUWANNARANGSEE et al., 2012).

As swoleninas, por sua vez, são similares às expansinas e foram nomeadas assim pela sua capacidade de provocar inchaço (*swelling*) em fibras de algodão. A primeira swolenina foi isolada de *Trichoderma reesei* por Saloheimo et al. (2002). As swoleninas apresentam capacidade de afrouxamento de vários substratos celulósicos sem, no entanto, serem detectadas quantidades significativas de liberação de açúcares redutores (KIM et al., 2014).

Estudos têm constatado que expansinas e swoleninas apresentam sinergismo tanto com celulases como com hemicelulases. Por exemplo, Gourlay et al. (2013) estudaram o efeito da adição de swolenina em endoglucanases, exoglucanases e duas endoxilanases isoladas e purificadas de *H. jecorina* na hidrólise de palha de milho pré-tratada com vapor. As swoleninas apresentaram elevado sinergismo com enzimas degradadoras de xilanas, alcançando graus de sinergismos de até 3,3. Essa situação poderia aumentar os rendimentos de hidrólise da fração celulósica como consequência da redução no impedimento do acesso das enzimas à celulose, representado pela fração hemicelulósica. Lee et al. (2013) estudaram o efeito da adição de expansinas de bactéria *Hahella chejuensis* na hidrólise de xilanas, atingindo aumentos de até 3,1 vezes.

2.15.4.3. Proteína AA9

A Proteína AA9, antigamente denominada de GH61, é uma proteína que atua com um mecanismo oxidativo e auxilia na degradação de material lignocelulósico. Denominadas de monooxigenases polissacarídicas líticas (LPMO) (BUSK e LENE, 2015; HORN et al., 2012; HARRIS et al., 2014).

A primeira proteína deste tipo, anteriormente classificada como CBM 33 (de *Serratia marcescens*), foi inicialmente identificada como proteína de ligação à quitina cristalina, aumentando a atividade hidrolítica das quitinases em virtude da modificação da estrutura do substrato. Posteriormente, a CBM 33 foi verificada como uma enzima oxidativa que cliva ligações glicosídicas em polissacarídeos, razão pela qual foi reclassificada à AA10, versão bacteriana homóloga à AA9 fúngica, um novo tipo de enzimas redox classificada como proteína com Atividade Auxiliar (AAs) (HORN et al., 2012; DIMAROGONA et al., 2013; KIM et al., 2014).

Empregando-se diversas técnicas espectroscópicas, definiu-se a proteína AA9 como enzima oxidativa que cliva ligações β -glucosídicas em polissacarídeos insolúveis. Este tipo de enzima é conhecido por ser cobre-dependente, requerendo oxigênio molecular e doador de elétrons, entre eles: glutathiona reduzida, ácido ascórbico e ácido gálico, para promover a atividade oxidativa (figura 2.20) (HORN et al., 2012).

Diferentes estudos corroboram que tanto AA10 quanto AA9 atuam em sinergismo com enzimas celulolíticas na degradação da celulose (FORSBERG et al., 2011; QUINLAN et al., 2011; DIMAROGANA et al., 2013). Hu et al. (2014) investigaram o efeito da adição de AA9 num coquetel de celulases comercial, na hidrólise de diferentes substratos. Foi observado sinergismo em presença de celulose pura, utilizando ácido gálico como doador de elétrons, e em presença de material lignocelulósico, sem a necessidade de adição de um doador externo de elétrons.

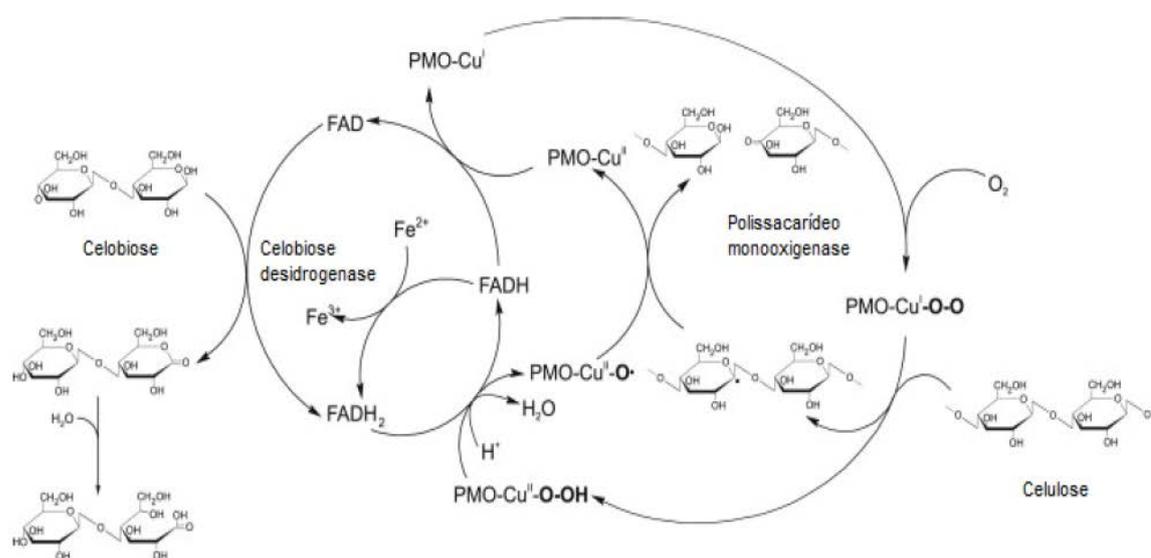


Figura 2.20. Esquema representativo do mecanismo de ação das monooxigenases cobre-dependentes. Fonte Baldrian e Valášková (2008); Phillips et al. (2011) e Žifčáková e Baldrian (2012)

A figura 2.21 representa um esquema de sinergismo proposto para celulases e monooxigenases na hidrólise da celulose, no qual monooxigenases atuam na região cristalina da celulose, liberando oligossacarídeos oxidados que servem como substrato para as celobiohidrolases.

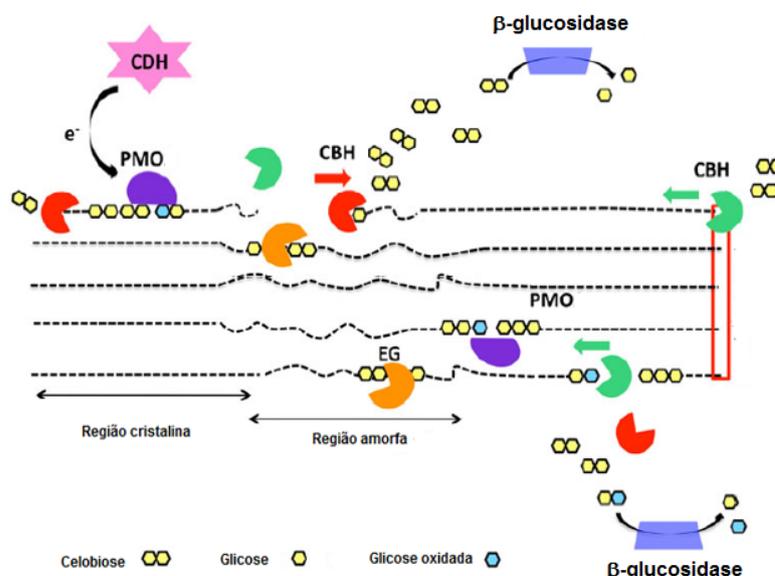


Figura 2.21. Esquema da degradação de celulose, envolvendo celulasas e monooxigenases. Fonte: adaptado de Dimarogana et al. (2013).

2.15.4.4. Outras proteínas não hidrolíticas

Na literatura tem sido mencionado o sinergismo de enzimas lignocelulolíticas com proteínas não hidrolíticas purificadas da palha de milho, uma proteína hidrofóbica, capaz de reduzir ligações improdutivas das celulasas em componentes lignocelulósicos, e outra proteína denominada Zea h, caracterizada por diminuir ligações de hidrogênio e o índice de cristalinidade em papel de filtro. Foi verificado que as proteínas proporcionaram aumento, na eficiência de hidrólise da celulose (HAN e CHEN, 2007; HAN e CHEN, 2010)

Outra proteína não hidrolítica reportada foi purificada do filtrado de *Pseudomonas oryzae*. Denominada POEP1, que foi mencionada por aumentar a hidrólise da celulose, agindo por meio de mecanismos similares àqueles apresentados pelas expansinas (QIN et al., 2013).

2.16. Surfactantes

Os surfactantes são moléculas anfífilas compostas por duas partes, sendo uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica, caracterizados por alterar as propriedades superficiais e estabilizar sistemas de duas fases (ECKARD et al., 2013).

Diversos estudos têm indicado a adição de surfactantes como estratégia para aumentar os rendimentos de hidrólise de celulose e diminuir cargas enzimáticas, o

que levaria a menores custos no aproveitamento de resíduos lignocelulósicos (ECKARD et al., 2013).

Existem várias hipóteses para explicar os efeitos positivos dos surfactantes na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos: 1) previnem ligações improdutivas das celulasas na lignina; 2) aumentam a estabilidade e atividade das enzimas; 3) modificam a estrutura do substrato e/ou 4) influenciam na interação enzima-substrato (KAAR e HOLTZAPPLE, 1998; ERICKSSON et al., 2002; YANG et al., 2015; BARDANT et al., 2013)

O mecanismo mais aceito por diversos autores está associado à influência dos surfactantes na interação da enzima com a superfície da lignina: a parte hidrofóbica do tensoativo se adsorveria à lignina, enquanto a parte hidrofílica do surfactante agiria de forma a promover um impedimento estérico à adsorção improdutiva das enzimas nesse componente (ERIKSSON et al., 2002; BORJESSON et al., 2013).

2.17. Interação enzima-lignina

A forma pela qual ocorre a inibição das celulasas pela lignina pode ser dividida em três tipos: 1) adsorção não produtiva das enzimas à lignina; 2) barreira física para as celulasas atuarem na cadeia da celulose e 3) inibição devido a compostos solúveis derivados da lignina (SAINI et al., 2016).

As ligações não específicas das celulasas na lignina podem ser mediadas por interações hidrofóbicas, eletrostáticas ou de ligações de hidrogênio. Mas, devido à complexa estrutura da biomassa lignocelulósica e da lignina, é difícil determinar qual dessas interações predomina, sendo altamente possível que mais de um tipo de interação esteja envolvida na ligação enzima-lignina (SAINI et al., 2016).

Em relação à formação de ligações de hidrogênio, a interação se dá entre os grupos hidroxil fenólicos, na interação das celulasas e a lignina. Já as interações eletrostáticas estão associadas às cargas da lignina e das enzimas, em função do ponto isoelétrico das celulasas e das condições operacionais (SAINI et al., 2016; LU et al., 2016).

A maioria dos estudos têm mencionado a interação hidrofóbica como a maior responsável pela ligação enzima-lignina. Este tipo de interação é principalmente mediado pelos CBMs. Os CBMs da família 1, por exemplo, apresentam uma estrutura

planar hidrofóbica, a qual favorece interação com superfícies ricas em lignina (VERMAAS et al., 2016; SAINI et al., 2016).

2.18. Engenharia de produto

Conforme exposto nas seções anteriores, o material lignocelulósico é rico em polissacarídeos, os quais funcionam como blocos de construção para a obtenção de biocombustíveis e produtos de alto valor agregado. O processo de hidrólise para conversão dos polissacarídeos em monômeros de açúcar pode ser realizado através de ácidos ou mediante rota bioquímica utilizando enzimas. A hidrólise enzimática surge como uma opção vantajosa em comparação com a hidrólise ácida, visto que não gera subprodutos inibitórios para o processo de fermentação, tais como furfural, hidroximetilfurfural e acetato, além de requerer condições menos severas.

Atualmente, é sabido que os rendimentos de hidrólise enzimática não alcançam 100% de conversão das frações celulósica e hemicelulósica. Assim, esforços na produção de enzimas com maior atividade enzimática, maior estabilidade e maior balanceamento das diferentes entidades enzimáticas têm sido alvo de estudos com o propósito de aumentar a viabilidade da obtenção de bioprodutos de material lignocelulósico por rota bioquímica.

Neste contexto, insere-se o conceito de engenharia de produto, definida de forma geral como a conversão de um produto descoberto em um produto útil e comercialmente competitivo, agregando tecnologias (CUSSLER e WEI, 2003). Este conceito pode, portanto, ser aplicado à tecnologia enzimática, uma vez que esta envolve uma série de modificações físicas, químicas e bioquímicas capazes de transformar extratos brutos em preparados enzimáticos de alto desempenho (GRAVINA, 2013).

Diferentes estratégias têm sido utilizadas para a prospecção de um novo e/ou mais eficiente biocatalisador celulolítico. Entre elas, a manipulação genética de micro-organismos com o objetivo, em primeiro lugar, de melhorar o rendimento de celulasas e em segundo lugar, de melhorar a qualidade das celulasas em termos de estabilidade térmica, tolerância aos inibidores e resistência a alterações ambientais (YOON et al., 2014).

Um exemplo de micro-organismo modificado altamente utilizado industrialmente é RUT-C30 de *Trichoderma reesei*, obtido pela Universidade de

Rutgers em 1977. Esta cepa é capaz de produzir de 15 a 20 vezes mais celulases que o fungo original, além de produzir enzimas do complexo enzimático, sem sofrer repressão por glicose (GUTIERREZ et al., 2015).

Co-cultivos também têm sido conduzidos para que sejam alcançados aumentos no rendimento da hidrólise enzimática. Essa técnica consiste no cultivo de mais de uma espécie de fungos compatíveis. Kolasa et al. (2014) avaliaram o co-cultivo de *Trichoderma reesei* RUT-C30 com linhagens de *Aspergillus sp*, atingindo eficiências de hidrólise de até 80%. Shahzad et al. (2014) estudaram o co-cultivo de *Trichoderma viride* e *Ganoderma lucidum*, tendo como objetivo a otimização das condições de cultivo, e obtiveram valores de exoglucanase de 485 U/mL e de β -glucosidase de 255 U/mL, aumentos de 4,2 vezes e 2,6 vezes, respectivamente, em relação àqueles prévios à otimização.

Os diferentes coquetéis enzimáticos variam quanto ao seu balanço de enzimas. Diferentes proporções têm sido obtidas, dependendo do gênero e da linhagem, de modo que estudos relacionados à investigação da proporção enzimática ótima para a hidrólise de diferentes substratos específicos encontram-se dentro das estratégias de engenharia de produto relacionadas com a tecnologia de enzimas (MAITAN-ALFENAS et al., 2015; MOHANRAM et al., 2013).

Outros estudos estão focados na adição de proteínas acessórias que aumentem a atividade catalítica dos preparados e no entendimento do sinergismo das proteínas em processos de hidrólise, assim como no uso de estabilizantes que aumentem a qualidade dos preparados enzimáticos (ECKARD et al., 2013).

2.19. Etanol de segunda geração

O etanol obtido a partir de biomassa lignocelulósica é denominado etanol de segunda geração (etanol 2G), cuja produção surge como uma alternativa para incrementar a produção de bioetanol sem a necessidade de expansão das áreas destinadas ao cultivo de alimentos (CHANDEL et al., 2014).

Em virtude da complexidade do material lignocelulósico, diferentes abordagens para a transformação eficiente desse recurso para a produção de etanol têm sido estudadas. Podem ser destacadas 5 estratégias, cada uma em diferente estágio de desenvolvimento:

SHF–Hidrólise e Fermentação Separadas: de acordo com esta estratégia, a hidrólise da celulose e da hemicelulose são conduzidas em suas condições ótimas para posterior fermentação da fração C6 (hexoses), proveniente da hidrólise da celulose, e da fração C5 (pentoses), proveniente da hemicelulose, em reatores separados. Entre as desvantagens desta abordagem pode-se citar o acúmulo de açúcares resultantes da hidrólise enzimática, os quais promovem inibição das enzimas que catalisam a hidrólise dos polissacarídeos e, dessa forma, reduzem a conversão final do material lignocelulósico, o que resulta em menos monômeros de açúcares disponíveis para o processo posterior de fermentação. Cabe ressaltar que, sob esta estratégia, também a produção de enzimas é realizada de forma independente (CASTRO e PEREIRA Jr., 2010).

SSF–Sacarificação e Fermentação Simultânea: neste processo, a produção de enzimas é realizada de forma independente, mas a hidrólise da celulose e a fermentação da glicose são realizadas no mesmo reator. Não obstante, a fermentação das pentoses provenientes da hemicelulose continua a ser realizada num reator separado. Deste modo, as celulasas estão menos sujeitas à inibição pelos produtos de hidrólise, já que a glicose liberada é simultaneamente fermentada, e são reduzidos os riscos relativos à contaminação no sistema, uma vez que a concentração de açúcar é mantida em níveis muito baixos (CASTRO e PEREIRA Jr., 2010).

dSSF–Sacarificação e Fermentação Simultânea com inoculação tardia: esta abordagem preconiza a realização de uma pré-hidrólise na temperatura ótima das enzimas (45°C-55°C dependendo do tipo de enzima), com posterior resfriamento para as condições de temperatura da fermentação e, então, imediatamente o sistema é inoculado com o microrganismo utilizado para fermentar. Esta situação incrementa as taxas de hidrólise e, conseqüentemente, a liberação de glicose. Além disso, é eliminado o problema de inibição pelo produto final que afeta algumas celulasas e a produção de etanol não fica limitada pela baixa concentração de fonte de carbono (PAULOVA, 2014).

SSCF–Sacarificação e Cofermentação Simultânea: diferentemente da estratégia SSF, neste caso a fermentação das pentoses e da glicose ocorre no mesmo reator. O processo SSCF consolida a hidrólise da celulose e das xilanas, com a fermentação direta de ambas as frações. Isto reduz o número de reatores envolvidos e evita os problemas de inibição do produto associado às enzimas. No entanto, investimentos são necessários para a construção de microrganismos recombinantes

capazes de fermentar ambos os açúcares (glicose e xilose), já que não há registros de microrganismos naturalmente ocorrentes capazes de fermentar eficientemente pentoses e hexoses (PAULOVA, 2014).

CBP – Bioprocesso Consolidado: de acordo com esta concepção, todas as operações de caráter biológico são realizadas simultaneamente. Tanto a produção de enzimas como a hidrólise enzimática dos polissacarídeos e a fermentação alcoólica ocorrem em um único reator (CASTRO e PEREIRA Jr., 2010).

A figura 2.22 apresenta um esquema que resume as diferentes estratégias utilizadas na obtenção de etanol de segunda geração.

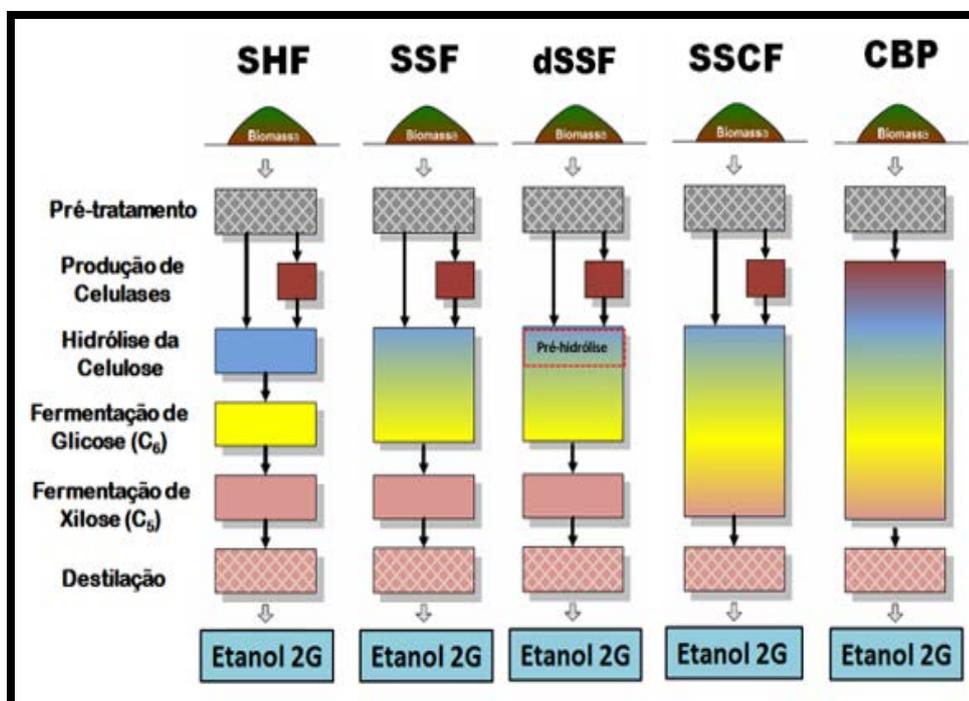


Figura 2.22. Concepções tecnológicas e integração de processo na produção de Etanol 2G segundo a plataforma bioquímica da biorrefinaria. **SHF:** Hidrólise e Fermentação Separadas; **SSF:** Sacarificação e Fermentação Simultânea; **dSSF:** Sacarificação e Fermentação Simultânea com Inoculação Tardia; **SSCF:** Sacarificação e Cofermentação Simultânea; **CBP:** Bio Processamento Consolidado. Fonte: adaptado de Pereira Jr. et al. (2008).

Geralmente, opta-se pela utilização de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação de hexoses. No caso de materiais lignocelulósicos, em razão de sua composição, etanol também pode ser produzido a partir das pentoses provenientes da fração hemicelulósica. Todavia, *Saccharomyces cerevisiae* naturalmente ocorrente é incapaz de fermentar xilose, já que esta espécie não pode converter eficientemente este substrato em xilulose para posterior conversão a etanol

(MATSUSHIKA et al., 2009). *Scheffersomyces stipitis*, *Scheffersomyces segobiensis*, *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus*, por sua vez, são algumas das espécies de leveduras capazes de assimilar naturalmente a xilose e produzir etanol (JEFFRIES, 2006).

2.20. Considerações finais

A conjuntura mundial de crescimento populacional associada a um aumento na demanda energética e aos consequentes problemas ambientais impele a busca por mudanças na matriz energética. Dentro deste contexto, os biocombustíveis buscam reduzir os problemas relacionados ao uso de petróleo e outras fontes fósseis, bem como ser uma fonte renovável plausível de aproveitamento.

No que diz respeito aos biocombustíveis, existem diversos paradigmas relacionados ao aumento da área para o plantio, o que leva à destruição de áreas de vegetação nativa e à competição por áreas destinadas a alimentos. Assim, o aproveitamento integral de biomassa, com destaque para os materiais lignocelulósicos, como fonte renovável para a produção de biocombustíveis, biomateriais e energia, surge como uma alternativa inserida no contexto de Biorrefinaria.

O Brasil destaca-se por ser um país agrícola, no qual a cana-de-açúcar é um dos principais produtos com potencial de aproveitamento. Segundo a União da Indústria de Cana-de-Açúcar (Única, 2015), para cada tonelada de cana-de-açúcar são gerados (250-270) kg de bagaço, uma matéria-prima renovável capaz de ser empregada na produção dos bioprodutos de segunda geração.

Para o aproveitamento do bagaço de cana há uma série de etapas até a obtenção dos bioprodutos, a exemplo de: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e purificação. Dentre estas etapas, a hidrólise enzimática, responsável pela conversão dos polissacarídeos em açúcares de interesse, se apresenta como um dos principais gargalos para o aproveitamento eficiente deste resíduo.

O principal problema está relacionado ao custo da produção de enzimas lignocelulolíticas e as suas eficiências na conversão do material aos seus respectivos monossacarídeos.

O Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO), possui ampla experiência na produção de enzimas, tendo contemplado estudos de otimização com

diferentes linhagens previamente classificadas pelo seu potencial de produção de celulasas. A expressão de celulasas utilizando fungos naturalmente ocorrentes apresenta coquetéis enzimáticos desbalanceados, o que repercute na eficiência de hidrólise.

Tendo em vista o aprimoramento destes preparados enzimáticos, busca-se, através de estudos de sinergismo, misturas enzimáticas balanceadas capazes de hidrolisar eficientemente a biomassa lignocelulósica, dentro do conceito de “engenharia de produto”. O uso destes resíduos de maneira eficiente do ponto de vista econômico-ambiental é capaz de diminuir o gargalo tecnológico provocado pela dependência nacional por esses biocatalisadores, bem como pelos altos custos da produção enzimática e pelas altas cargas enzimáticas utilizadas.

Capítulo 3

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O aumento na demanda por combustíveis, bem como as preocupações relacionadas ao meio ambiente, tem levado à busca por novas alternativas de energia, principalmente combustíveis. Neste âmbito, como fontes renováveis da chamada "energia limpa", destacam-se os materiais lignocelulósicos, enquanto o etanol 2G desponta como uma alternativa dessas energias renováveis, apresentando um forte apelo no mercado externo em virtude de sua baixa emissão de carbono.

O Brasil é líder na produção de etanol a partir de cana-de-açúcar (etanol 1G) e exibe potencial para a obtenção de combustíveis a partir do bagaço de cana gerado durante a própria produção do álcool. No entanto, o custo de produção do etanol 2G é maior do que o do etanol 1G. Portanto, cada vez mais empresas e pesquisadores têm se empenhado para aprimorar as técnicas do processo, visando torná-lo mais competitivo.

Dentre os principais gargalos tecnológicos da conversão bioquímica dos materiais lignocelulósicos, encontra-se a etapa de hidrólise enzimática. As limitações estão relacionadas ao alto custo das enzimas hidrolíticas, à dependência externa da produção de enzimas e às baixas eficiências de hidrólise. Logo, o estágio de hidrólise enzimática constitui-se num desafio a ser enfrentado e superado, requerendo maiores estudos e melhor entendimento do processo, a fim de se atender à necessidade do país na produção de biocatalisadores eficientes que apresentem elevados rendimentos.

Neste contexto, este doutoramento teve como objetivo os descritos a seguir.

3.1. OBJETIVO GERAL

Produzir um preparado enzimático de alto desempenho catalítico na hidrólise de celulose e que seja competitivo com os preparados comerciais, fortalecendo o entendimento de celulasas dentro do conceito de Biorrefinaria.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Produzir celulasas de diferentes microrganismos para compor preparados enzimáticos (biocatalisadores);
2. Caracterizar os componentes dos preparados enzimáticos quanto à composição majoritária;
3. Avaliar diferentes formulações dos preparados enzimáticos e estudar a forma de condução das hidrólises enzimáticas;
4. Otimizar a composição de um preparado enzimático com atividades de diferentes origens;
5. Estudar a influência de enzimas acessórias no desempenho catalítico de preparados enzimáticos produzidos;
6. Avaliar sinergismo e possível antagonismo entre o preparado enzimático e proteínas acessórias e aditivos.
7. Comparar o desempenho catalítico do preparado enzimático produzido com o preparado enzimático comercial *Cellic Ctec2*.
8. Aplicar os preparados enzimáticos (biocatalisadores) na produção de Bioetanol.

Capítulo 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Pré-tratamento do bagaço de cana

O bagaço de cana, previamente lavado com água 5 vezes e posteriormente secado em estufa, passou por um tratamento ácido com solução de ácido sulfúrico 1,09% (v/v), a 121 °C, em autoclave, e com uma relação sólido:líquido de 1:2,8 (m/v) por 27 min, de acordo com a metodologia descrita por Betancur e Pereira Jr. (2010). Foram obtidas com o pré-tratamento ácido duas frações: uma fração líquida, que corresponde ao hidrolisado hemicelulósico, e uma fração sólida, composta principalmente de celulose e lignina. Essa fração sólida passou por um tratamento alcalino com solução de hidróxido de sódio 4% (m/v), a 121 °C, utilizando uma relação sólido:líquido de 1:20 por 30 min, conforme estabelecido por Vásquez (2007). O sólido obtido após o tratamento ácido seguido do alcalino foi denominado de celulignina parcialmente deslignificada (CLPD).

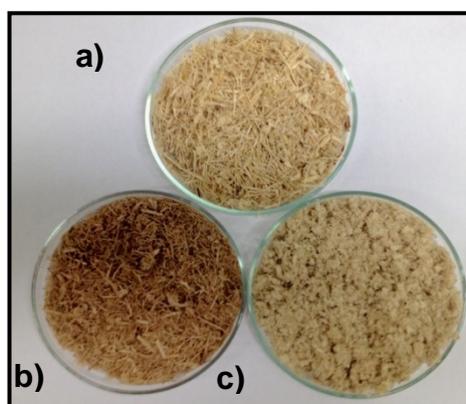


Figura 4.1. Bagaço de cana-de-açúcar: a) *in natura*; b) após pré-tratamento ácido; c) após pré-tratamentos ácido e alcalino.

4.2. Caracterização do bagaço de cana *in natura* e bagaço pré-tratado

Inicialmente, o bagaço de cana foi cominuído num moinho equipado com peneira para granulometria com 0,5 mm de abertura. Posteriormente, foram pesados 300 mg do bagaço cominuído em frascos erlenmeyer de 125 mL, em seguida, foi realizada a hidrólise química adicionando-se 3 mL de ácido sulfúrico 72% (v/v), por 1 h a 30 °C. Após este período, ao serem adicionados 84 mL de água deionizada no sistema, o ácido foi diluído para 4%. Posteriormente, o bagaço em solução ácida foi autoclavado por 1 h a 121 °C. O hidrolisado (fração líquida) foi, então, filtrado em cadinhos de vidro tipo Gooch nº 3, previamente calcinados a 550 °C e pesados. A fração líquida foi, posteriormente, processada para determinações analíticas, sendo neutralizada para pH entre 5,5 a 6,0 e avolumada para 200 mL. Já os cadinhos com resíduo seco foram submetidos a secagem em estufa por 24 h e foram pesados, calcinados em mufla a 550 °C por 12 h e após atingirem temperatura ambiente, foram pesados novamente (SLUITER et al., 2008).

Determinou-se, portanto, o teor de açúcares redutores totais, pelo método de DNS segundo Miller (1959), e o teor de glicose, pelo kit enzimático de glicose oxidase (GOD) (marca Katal®).

Desta forma, as concentrações de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas foram determinadas conforme as equações abaixo.

$$\text{Celulose (\% m/m)} = \left(\frac{0,90}{0,96} \right) \cdot C_1 \cdot (v/m) \cdot \alpha \cdot 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

0,90 = Coeficiente que resulta da relação entre a massa molecular do polímero e do monômero de glicose;

0,96 = Rendimento de sacarificação da celulose a glicose;

C_1 = Concentração de glicose no hidrolisado (g/L);

α = fator de diluição da amostra (se houver).

v = Volume total da solução (L), que, neste caso, corresponde a 0,2 L;

m = Massa da amostra seca (g), que, neste caso, corresponde a 0,3 g;

$$\text{Hemicelulose (\% m/m)} = (0,88/0,93) \cdot (C_2 - C_1) \cdot (v/m) \cdot \alpha \cdot 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

0,88 = Coeficiente que resulta da relação entre a massa molecular do polímero e do monômero de xilose;

0,93 = Rendimento de sacarificação da xilana a xilose;

C_1 = Concentração de glicose no hidrolisado (g/L);

C_2 = Concentração de açúcares redutores no hidrolisado (g/L);

v = Volume total da solução (L), que, neste caso, corresponde a 0,2 L;

m = Massa da amostra seca (g), que, neste caso, corresponde a 0,3 g;

α = fator de diluição da amostra (se houver).

$$\text{Lignina (\%m/m)} = \frac{W_1 - W_2}{m} \cdot 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

W_1 = Resíduo seco da filtragem (g);

W_2 = Resíduo após calcinação (g);

m = Massa da amostra seca (g).

$$\text{Cinzas (\% m/m)} = \frac{W_2}{m} \cdot 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

W_2 = Resíduo após calcinação (g);

m = Massa da amostra seca (g)

4.3. Microrganismo

Os microrganismos *Trichoderma harzianum* IOC 3844, *Penicillium funiculosum* ATCC 11797 e *Aspergillus niger* ATCC 1004 foram mantidos em meio ágar batata dextrose (PDA) e seus esporos conservados em criotubos com glicerol 20% a 4 °C.

Para os ensaios com as linhagens relacionados à produção de celulase, os microrganismos foram ativados também em placas contendo meio PDA e incubados em estufa a 30°C. No caso de *Trichoderma harzianum* IOC 3844, acrescentou-se 2 g/L de peptona aos meios PDA utilizados para estoque e ativação. A ativação das linhagens foi realizada a cada experimento com o propósito de garantir a padronização do inóculo e reduzir os riscos de modificação genética. Na Figura 4.2, observam-se as placas dos esporos dos três fungos avaliados neste estudo.

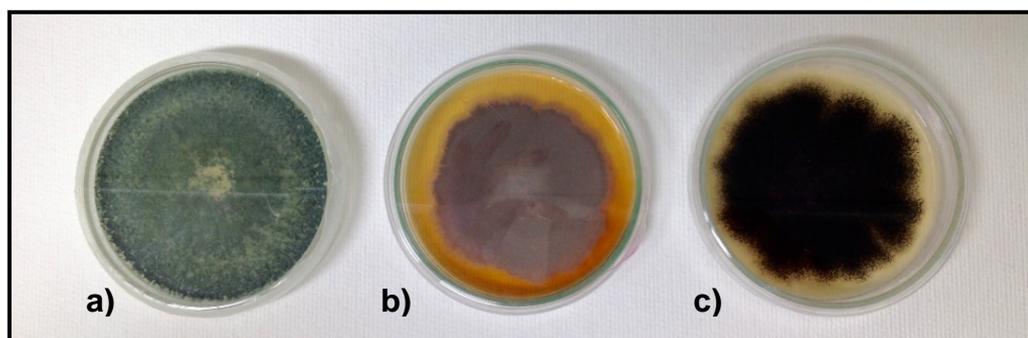


Figura 4.2. Esporos em placa dos fungos filamentosos: a) *Trichoderma harzianum* IOC 3844; b) *Penicillium funiculosum* ATCC 11797; c) *Aspergillus niger* ATCC 1004.

4.4. Produção de celulases em biorreator instrumentado

Para a produção de celulases em biorreator, inicialmente, células utilizadas como inóculo foram produzidas em menor escala, o que caracteriza 10% (v/v) do volume útil do reator. O inóculo, foi, portanto, produzido em dois frascos Erlenmeyer de 1 L com volume útil correspondente a 400 mL de meio, cuja composição está mostrada na Tabela 4.1, nos quais foram adicionados 10^6 esporos/mL do respectivo microrganismo avaliado. Os frascos foram, posteriormente, incubados com agitação de 200 rpm, durante 30 h, para *T. harzianum*, 72 h para *P. funiculosum* e 72 h para *A. niger*, todos a 30 °C, 200 rpm e pH 5.

A produção de celulasas foi, então, conduzida em biorreator estéril de 10 L (Biostat B) operado com um volume útil de 8 L, durante 42 h para *T. harzianum*, 72 h para *P. funiculosum* e 90 h para *A. niger*, todos a 30 °C, 200 rpm e pH 5. A composição dos meios utilizados para a produção em biorreator está descrita na Tabela 4.2.

Tabela 4.1. Composição do meio utilizado para produção de inóculo dos diferentes microrganismos utilizados para produção de celulasas em biorreator instrumentado.

Composto	<i>T. harzianum</i> *	<i>P. funiculosum</i> **	<i>A. niger</i> ***
Biomassa (CLPD****)	15 g/L	15 g/L	15 g/L
Glicose	3 g/L	3 g/L	-----
Extrato de levedura	1,14 g/L	0,36 g/L	0,25 g/L
Peptona	-----	-----	0,75 g/L
Ureia	2,24 g/L	1 g/L	0,3 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,42 g/L	4 g/L	1,4 g/L
KH ₂ PO ₄	2 g/L	2 g/L	2 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,4 g/L	0,4 g/L	0,4 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g/L	0,3 g/L	0,3 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	5 mg/L	5 mg/L	5 mg/L
MnSO ₄ .4H ₂ O	1,6 mg/L	1,6 mg/L	1,6 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,4 mg/L	1,4 mg/L	1,4 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,0 mg/L	2,0 mg/L	2,0 mg/L
Tampão citrato 50 mM, pH 4.	-----	-----	Solvente

As composições e condições dos inóculos foram estabelecidas por: * Rocha (2014), **Maeda (2010), ***Dias (2011).

**** CLPD: Celulignina parcialmente deslignificada

Tabela 4.2. Composição do meio utilizado para produção de celulasas pelos diferentes microrganismos em biorreator instrumentado.

Composto	<i>T. harzianum</i> *	<i>P. funiculosum</i> **	<i>A. niger</i> ***
Biomassa (CLPD****)	15 g/L	15 g/L	7,5 g/L
Extrato de levedura	1,14 g/L	0,36 g/L	10 g/L
Tween 80	-----	-----	7 mL/L
Uréia	2,24 g/L	1 g/L	-----
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,42 g/L	4 g/L	4 g/L
KH ₂ PO ₄	2 g/L	2 g/L	3 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,4 g/L	0,4 g/L	0,4 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g/L	0,3 g/L	0,3 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	5 mg/L	5 mg/L	5 mg/L
MnSO ₄ .4H ₂ O	1,6 mg/L	1,6 mg/L	1,6 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,4 mg/L	1,4 mg/L	1,4 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,0 mg/L	2,0 mg/L	2,0 mg/L

As composições e condições do reator foram estabelecidas por: * Rocha (2014), **Maeda (2010), ***Dias (2011).

**** CLPD: Celulignina parcialmente deslignificada

Na Figura 4.3, é apresentada a imagem do biorreator instrumentado em operação, o qual foi utilizado no presente estudo para controlar e monitorar a agitação, a aeração e o pH durante a produção de celulases a partir de celulignina parcialmente deslignificada.



Figura 4.3. Biorreator Biostat B utilizado para produção de celulases.

Após a etapa de produção, o meio fermentado foi filtrado a vácuo em lã de vidro para a separação, principalmente, do bagaço pre-tratado. Obteve-se, desta forma, o extrato bruto, a partir do qual foi retirada uma amostra para análise posterior das principais atividades enzimáticas. Em seguida, o mesmo foi submetido à microfiltração e à ultrafiltração em coluna *Hollow Fiber*®.

4.5. Filtração e Concentração do extrato bruto enzimático em *Hollow Fiber*®

O extrato bruto foi filtrado em uma coluna de porosidade de 0,2 μm , a uma pressão máxima de 5 psi na entrada da coluna, a fim de eliminar qualquer resíduo celular. Posteriormente, o filtrado obtido passou por uma coluna com corte de 10 kDa, a uma pressão máxima de 15 psi, de modo a reter as proteínas de interesse, permitindo concentrar o filtrado e obter como produto final o complexo enzimático de celulases concentrado. Ao concentrado foi adicionado glicerol, como estabilizante, em uma concentração final de 5% (v/v), sendo o concentrado, então, mantido a 4°C até a sua utilização. O processo foi realizado em temperatura ambiente.



Figura 4.4. Sistema de filtração tangencial Hollow Fiber® utilizado para concentração do extrato bruto de celulases.

4.6. Procedimentos analíticos

4.6.1. Quantificação de açúcares redutores totais

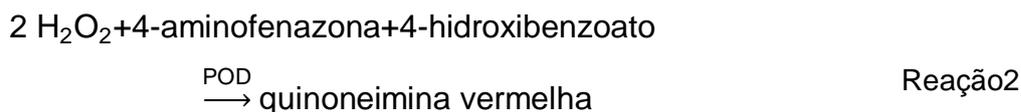
A reação foi realizada em microtubos *Eppendorf* de 2 mL, incubando-se 100 μ L de amostra (devidamente diluída) com 300 μ L de reagente de DNS a 100 °C por 5 min. Decorrido esse período, foram adicionados 1,5 mL de água. Determinou-se, então, a absorvância em espectrofotômetro a 540 nm (MILLER, 1959). A quantidade de açúcares redutores totais foi determinada através de uma curva de calibração que relaciona o valor de absorvância com a concentração (g/L) de açúcares redutores totais.

4.6.2. Quantificação de glicose

4.6.2.1. Método enzimático glicose oxidase

A quantificação de glicose foi realizada em microtubos *Eppendorf* de 2 mL, incubando-se 20 μ L de amostra com 2 mL de reagente enzimático glicose oxidase (GOD) (marca Katal®), a 37°C por 15 min. Foi determinada a absorvância em

espectrofotômetro a 505 nm. O método é fundamentado no seguinte esquema de reações enzimáticas:



No processo, para que a concentração de glicose possa ser estimada, e para haver um controle, deve-se incluir ensaios com 20 µL de solução padrão (1 g/L de glicose), nas mesmas condições previamente mencionadas. Desta forma, a determinação da quantidade de glicose foi feita segundo a seguinte equação:

$$\text{Glicose (g/L)} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{padrão}}} \right) \cdot \text{FD}$$

Equação 5

Onde

$\text{Abs}_{\text{amostra}}$ = Leitura de absorvância da amostra a 505 nm;

$\text{Abs}_{\text{padrão}}$ = Leitura de absorvância do padrão a 505 nm;

FD = Fator de diluição

4.6.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A quantificação de glicose e celobiose pelo sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE, foi realizada de acordo com as seguintes condições: detector RID (índice de refração), coluna HILPlex H (Zorbax), Shimadzu. Utilizou-se, como fase móvel, ácido sulfúrico 0,0005 M em água milli-Q com um fluxo de 0,6 mL/min a uma temperatura de forno de 60°C e de 30°C no detector. Como padrões foram utilizados glicose e celobiose.

Para a quantificação de HMF, furfural e ácido acético foi utilizada a coluna HPLex H (Zorbax), acoplada a um detector UV utilizando ácido sulfúrico 0,005 M como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/min, comprimento de onda 235 nm para HMF, furfural e 210 nm para ácido acético. As concentrações das substâncias analisadas nas amostras foram calculadas por comparação com padrões externos com concentrações conhecidas.

4.6.3. Quantificação de atividade Fpase

A quantificação de atividade Fpase foi realizada em tubos de ensaio, incubando-se 1 tira de papel de filtro Whatman nº1 de (1 x 6) cm como substrato, 500 µL do complexo enzimático (devidamente diluído) e 1 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0, a 50 °C por 60 min (adaptado de GHOSE, 1987).

Decorrido o tempo de reação, os tubos foram imediatamente incubados a 100°C por 5 min a fim de interromper a reação enzimática. Em seguida, foram determinados os açúcares redutores totais, adicionando-se 3 mL de reagente de DNS e incubando os tubos a 100 °C por 5 min. Após seu resfriamento, 20 mL de água foram adicionados. O valor de absorvância foi determinado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

Foram realizados também ensaios controles de: -enzima, incubando enzima e tampão sem substrato; e - substrato, incubando o substrato com tampão. Os valores de absorvância do controle da enzima e do controle do substrato foram subtraídos do valor da absorvância da amostra. A concentração dos açúcares totais (g/L) foi determinada, então, através de uma curva de calibração que relaciona o valor de absorvância com a quantidade de açúcares redutores.

Uma unidade de atividade enzimática FPase (FPU) foi, portanto, definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores (glicose equivalente) a partir de papel filtro Whatman nº1 ((1 x 6) cm) por minuto.

4.6.4. Quantificação de atividade CMCase, Avicelase e xilanase

A quantificação das atividades CMCase, Avicelase e xilanase foram realizadas em microtubos *Eppendorf* de 2 mL, incubando-se 50 μ L de solução de Carboximetilcelulose (CMC) de baixa viscosidade, 2% (m/v), Avicel (celulose microcristalina) 2% (m/v) ou xilana de *beechwood* 2% (m/v) e 50 μ L de enzima diluída em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0, à temperatura de reação de 50 °C por 15 min. Decorrido o tempo de reação, os tubos foram imediatamente incubados a 100 °C por 5 min para interromper a reação enzimática. Em seguida, foram determinados os açúcares redutores totais, conforme descrito em 4.6.1. Foram realizados controles da enzima e do substrato.

As atividades CMCase/Avicelase/xilanase foram expressas em unidades internacionais (UI), a qual foi definida como a quantidade de extrato enzimático necessária para liberar 1 μ mol de açúcares redutores (glicose equivalente) a partir de CMC 2%/Avicel 2%/xilana 2% por minuto.

4.6.5. Quantificação de atividade β -glucosidase

A quantificação da atividade β -glucosidase foi realizada em microtubos *Eppendorf* de 2 mL, incubando-se 50 μ L de solução de celobiose 2% (m/v) e 50 μ L de enzima, diluída em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0, a 50 °C por 15 min. Decorrido o tempo de reação, os tubos foram imediatamente incubados a 100 °C por 5 min para interromper a reação enzimática. Em seguida, foi determinada a quantidade de glicose liberada pelo método enzimático glicose oxidase (Kit GOD, marca Katal®), como descrito em 4.6.2.1. Foram realizados controle da enzima e controle do substrato.

A atividade β -glucosidásica foi expressa em unidades internacionais (UI), a qual foi definida como a quantidade de extrato enzimático necessária para liberar 1 μ Mol de glicose a partir de celobiose 2% por minuto.

A figura 4.5 exhibe o esquema da determinação de atividade enzimática, enquanto a tabela 4.3 apresenta as respectivas condições dos processos e dos substratos para cada atividade.

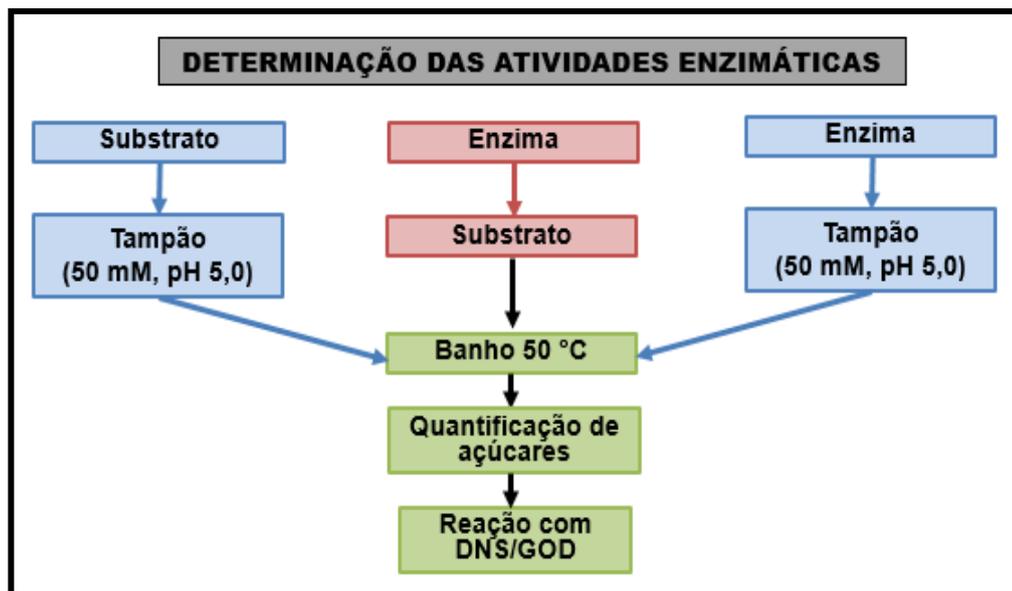


Figura 4.5. Esquema representativo do método de determinação de atividade enzimática.

Tabela 4.3. Atividades enzimáticas e seus respectivos substratos, tempo de incubação e método de quantificação de produto liberado.

Atividades	Substrato	Tempo de incubação	Método de quantificação de açúcares
FPásica	Papel filtro (Whatman 1) (6x1) cm	60 min	DNS
CMCásica	CMC 2 % (m/v)		
Xilanásica	Xilana 2% (m/v)	15 min	DNS
Avicelásica	Avicel 2 % (m/v)		
β -glucosidásica	Celobiose 2 % (m/v)	15 min	GOD

4.6.6. Quantificação de conteúdo proteico

A quantificação do teor proteico foi realizada em microtubos *Eppendorf* de 2 mL, incubando-se 200 μ L do reagente Bradford (BioRad) e 800 μ L de amostra (previamente diluída), a temperatura ambiente por 5 min. Foi determinado o valor de absorvância por espectrofotometria em comprimento de onda de 595 nm.

Para determinação do conteúdo proteico, foi construída uma curva-padrão utilizando como padrão uma solução de albumina bovina sérica (BSA) nas concentrações de 0,75 a 20 mg/L.

4.7. Otimização da mistura de extratos enzimáticos dos fungos *Trichoderma harzianum* IOC 3844, *Penicillium funiculosum* ATCC 11797 e *Aspergillus niger* ATCC 1004

Para obter a mistura dos extratos enzimáticos com maior poder hidrolítico foi utilizada a técnica estatística de *mistura simplex* com adição de pontos axiais e ponto central, considerando como variáveis independentes as proporções proteicas dos extratos enzimáticos concentrados obtidos a partir dos fungos *Trichoderma harzianum* IOC 3844, *Penicillium funiculosum* ATCC 11797 e *Aspergillus niger* ATCC 1004, e como variável de resposta a glicose liberada após 48 h de hidrólise. A Tabela 4.4 apresenta as proporções de enzimas avaliadas em cada experimento.

Tabela 4.4. Proporções dos extratos enzimáticos utilizados no planejamento de mistura.

Experimento	Extrato enzimático concentrado: proporção (mg proteína/g celulose)					
	<i>T. harzianum</i>		<i>P. funiculosum</i>		<i>A. niger</i>	
	Valores codificados	Valores reais	Valores codificados	Valores reais	Valores codificados	Valores reais
1	1,00	10	0,00	0	0,00	0
2	0,00	0	1,00	10	0,00	0
3	0,00	0	0,00	0	1,00	10
4	0,50	5	0,50	5	0,00	0
5	0,50	5	0,00	0	0,50	5
6	0,00	0	0,50	5	0,50	5
7	0,67	6,7	0,17	1,7	0,17	1,7
8	0,17	1,7	0,67	6,7	0,17	1,7
9	0,17	1,7	0,17	1,7	0,67	6,7
10	0,33	3,3	0,33	3,3	0,33	3,3

O programa *Statistica 6.0* foi utilizado para criar o desenho experimental, analisar os resultados e gerar o modelo matemático da mistura, dentro de um intervalo de confiança de 95%. Foram feitos 10 experimentos de hidrólise de bagaço de cana pré-tratado, com diferentes proporções dos extratos enzimáticos, em tubos *ependorf* de 2 mL, com volume útil de 1 mL cada, carga total de proteína de aproximadamente

10 mg/g celulose, carga de sólidos de 25 g/L e tampão citrato 50 mM a pH 5. Os tubos foram incubados a 50 °C por 48 h. Todos os experimentos do planejamento foram realizados em duplicata.

Utilizando o programa *Statistica* 6.0, buscou-se determinar as proporções ótimas, a fim de alcançar o máximo de glicose liberada nas condições estudadas. Para a validação do modelo, foram utilizadas as proporções indicadas pelo programa como a ótima combinação dos extratos enzimáticos concentrados. Este experimento de hidrólise foi conduzido em quadruplicata nas mesmas condições que as utilizadas para gerar o modelo matemático.

4.8. Influência das características do substrato e da carga enzimática na hidrólise enzimática

Nesta seção foram realizados ensaios de hidrólise enzimática empregando a mistura de coquetéis enzimáticos otimizada na etapa anterior, com uma carga proteica de 10 mg/g de celulose a 50 °C e pH 5, por 48 h. Os experimentos foram realizados em triplicata. Ao final do processo foi determinada a quantidade de glicose por CLAE. A fim de estudar a influência das características do substrato e da carga enzimática, foram conduzidos variados ensaios de hidrólise enzimática, descritos a seguir.

4.8.1. Bagaço de cana com diferentes tipos de pré-tratamento

Para estudar a influência dos diferentes tipos de pré-tratamento, foram realizados ensaios de hidrólise enzimática com bagaço de cana (25 g/L) *in natura* e com bagaço de cana submetido a diferentes pré-tratamentos (ácido, alcalino, combinação de ácido e alcalino), em tubos de 2 mL, com volume útil de 1 mL cada.

4.8.2. Diferentes cargas de sólidos

Para avaliar a influência de diferentes concentrações de CLPD (100 g/L e 150 g/L), foi realizada a hidrólise do material em frascos de 50 mL com volume útil de 10 mL cada.

4.8.3. Hidrólise com batelada alimentada de sólidos

No caso da hidrólise com carga de sólidos de 150 g/L, foi realizado um processo de batelada alimentada, com uma carga de sólidos inicial de 50 g/L e alimentações extras de 50 g/L nos tempos de 6 h e 12 h, para um tempo total de hidrólise de 48 h. A carga de proteína empregada foi de 10 mg/g de celulose total (para 150 g/L de carga sólidos) e foi adicionada totalmente no início do processo. Estes ensaios de hidrólise foram conduzidos em frascos de 50 mL com volume útil de 10 mL cada.

4.8.4. Diferentes cargas enzimáticas

Para avaliar a influência de diferentes cargas proteicas da mistura otimizada (10 mg/g celulose e 15 mg/g celulose), a hidrólise de CLPD (100 g/L), para ambas as cargas proteicas, foi realizada em frascos de 50 mL com um volume útil de 10 mL cada.

4.9. Otimização das cargas de sólidos e de proteína

Com o propósito de aumentar, na hidrólise de CLPD, a quantidade de glicose liberada, utilizando como preparado enzimático a mistura otimizada, foi realizado um planejamento experimental do tipo delineamento central composto rotacional (DCCR) a fim de encontrar a região ótima de operação. A carga de sólidos e a carga de proteína foram selecionadas como variáveis independentes, enquanto a liberação de glicose e a eficiência de hidrólise enzimática foram selecionadas como variáveis dependentes.

O software *Design Expert 7.1.6 (Stat-Ease® Software)* foi empregado para a análise estatística dos resultados e para a otimização das condições. A matriz do planejamento é apresentada da tabela 4.5.

Buscando a otimização do processo, as seguintes condições dos parâmetros foram estipuladas: aumentar a carga de sólidos, reduzir a carga de proteína e aumentar tanto a liberação de glicose como a eficiência de hidrólise.

A partir dos valores obtidos, mediante o planejamento, para a condição ótima de carga de sólidos e de carga de proteína, foi construído um perfil cinético da hidrólise até 48 h de processo. O ensaio foi realizado em frascos cônicos de 1 L com volume

reacional de 200 mL, empregando tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0. A temperatura e a velocidade de agitação foram de 50 °C e 200 rpm, respectivamente. A liberação de glicose e celobiose ao longo do tempo foi quantificada por CLAE.

Tabela 4.5. Matriz do planejamento experimental DCCR para 2 variáveis com triplicata do ponto central.

Ensaio	Carga de sólidos (g/L)	Carga de proteína (mg/g celulose)
1	-1 (52)	-1 (11,6)
2	+1 (258)	-1 (11,6)
3	-1 (52)	+1 (43,4)
4	+1 (258)	+1 (43,4)
5	-α (10)	0 (27,5)
6	+α (300)	0 (27,5)
7	0 (155)	-α (5)
8	0 (155)	+α (50)
9	0 (155)	0 (27,5)
10	0 (155)	0 (27,5)
11	0 (155)	0 (27,5)

A eficiência de hidrólise dos distintos ensaios foi calculada de acordo com a equação 6.

$$\text{Eficiência de hidrólise (\%)} = \left(\frac{\text{glicose (g/L)}}{\text{Carga de sólido (g/L)} \cdot \% \text{ celulose} \cdot 1,1} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

1,1 é um fator estequiométrico que representa a adição de uma molécula de água, para a liberação de uma molécula de glicose, após o rompimento de cada ligação durante a hidrólise da celulose.

4.10. Fermentação alcoólica do hidrolisado enzimático de CLPD

A fermentação do hidrolisado de CLPD, obtido com o emprego da mistura otimizada nas condições ótimas de carga de sólidos e de proteína, foi realizada empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (JP1). Este microrganismo foi mantido a 4 °C em meio contendo: 20 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura e 15 g/L de ágar-ágar. As células foram ativadas e propagadas em frascos agitados a

200 rpm, a 37 °C e em pH 4,5, contendo meio cuja composição é apresentada na tabela 4.6 (Pereira Jr.,1991). A ativação foi conduzida por 12 h e a propagação, por 6 h.

Tabela 4.6. Composição do meio de ativação e propagação para *Saccharomyces cerevisiae* (JP1).

Componente	Concentração (g/L)	Componente	Concentração (g/L)
Glicose	20	KH ₂ PO ₄	1,1
Ureia	1,25	Extrato de levedura	2,0
Solução mineral	40 mL/L		
Composição da solução mineral			
Componente	Concentração (g/L)	Componente	Concentração (g/L)
MgSO ₄ .7H ₂ O	12,5	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,25	CaCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Ácido Cítrico	12,5	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,035
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,90	H ₃ BO ₃	0,050
MnSO ₄	0,19	KI	0,009
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,30	Al ₂ (SO ₄) ₃	0,0125

O processo para a avaliação da fermentabilidade do hidrolisado de CLPD foi realizado em biorreator Biostat B (B. Braun Biotech International – Germany) operando em modo batelada simples, e com capacidade nominal de 1,5 L e volume reacional de 0,5 L (figura 4.6).

O hidrolisado foi esterilizado a 0,5 atm por 20 min e suplementado com: ureia, extrato de levedura, KH₂PO₄ e solução mineral, nas mesmas concentrações em que foram empregados nos meios de ativação e propagação da levedura, conforme descrito anteriormente na tabela 4.6.

Foram inoculados aproximadamente 15 g/L de células (massa seca). O pH foi controlado e mantido em 6,0 por meio da adição de NaOH 2 mol/L e/ou HCl 2 mol/L.

A temperatura e a velocidade de agitação foram mantidas a 30 °C e 200 rpm, respectivamente.

O perfil cinético do consumo de substrato e da produção de etanol foi construído com base em amostragens até o esgotamento do substrato. As amostras foram centrifugadas a 10 000 rpm por 15 min a 10 °C. O sobrenadante foi separado e diluído para determinação da quantidade de glicose e etanol por CLAE.

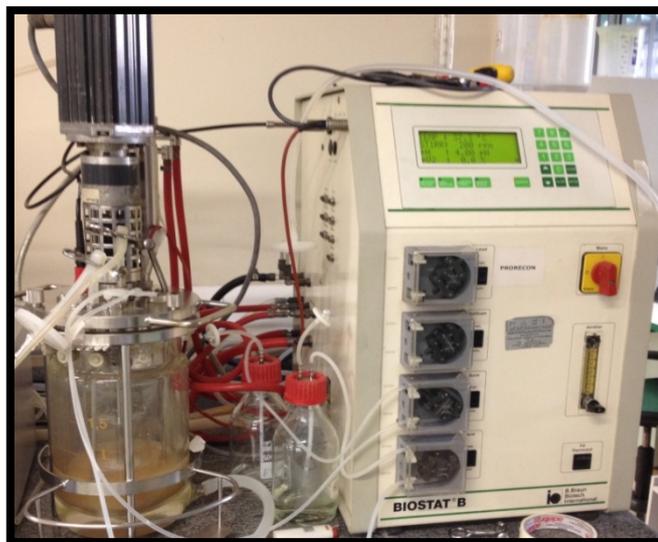


Figura 4.6. Ensaio de fermentação alcoólica a partir do hidrolisado celulósico de CLPD com a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* (JP1). Temp.: 30 °C; pH: 6,0; velocidade de agitação: 200 rpm.

4.11. Fermentação alcoólica do hidrolisado hemicelulósico

Na etapa de pré-tratamento, após o pré-tratamento ácido, foi gerado um hidrolisado rico em xilose, proveniente da solubilização da fração hemicelulósica. Este hidrolisado foi destoxificado, utilizando carvão ativo (5% v/m) em ensaio conduzido em shaker por 2 h a 200 rpm, de modo a promover a diminuição dos teores de concentração de HMF, furfural e ácido acético. Em seguida, o hidrolisado foi filtrado duas vezes utilizando papel filtro e, posteriormente, esterilizado, para, afinal, ser utilizado na produção de etanol. O hidrolisado hemicelulósico foi quantificado em relação aos teores de xilose, glicose, HMF, furfural e ácido acético, antes e depois da etapa de destoxificação.

Na etapa de fermentação foi utilizada a levedura *Scheffersomyces stipitis* CBS5774. A levedura foi mantida a 4 °C em meio descrito por Pereira Jr. (1991) contendo: 5 g/L de xilose, 2 g/L de extrato de levedura e 3 g/L de ágar-ágar. A ativação das células foi realizada no mesmo meio descrito no item anterior para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (tabela 4.6), porém, neste caso, o açúcar utilizado foi xilose, ao invés de glicose. O pH foi ajustado para 6,0 utilizando HCl 2 mol/L e/ou NaOH 2 mol/L. A temperatura foi mantida a 30 °C e a velocidade de agitação, em 200 rpm, por 22 h.

O processo de fermentação foi conduzido em biorreator Biostat B, com capacidade nominal de 1,5 L e com volume reacional de 1 L. O hidrolisado foi

suplementado com: ureia, extrato de levedura, KH_2PO_4 e solução mineral, nas mesmas concentrações em que foram empregados na etapa de fermentação do hidrolisado celulósico (tabela 4.6). Foram inoculados aproximadamente 10 g/L de células (massa seca). O pH foi controlado a 6,0 por meio da adição de NaOH 2 mol/L e/ou HCl 2 mol/L, enquanto a temperatura e a velocidade de agitação foram mantidas a 30 °C e 200 rpm, respectivamente. O perfil cinético de consumo de substrato e da produção de etanol foi construído mediante a retirada de amostras ao longo do processo as quais foram centrifugadas a 10 000 rpm por 15 min a 10 °C. O sobrenadante foi separado e diluído para determinação de xilose, glicose e etanol por CLAE.

No processo de fermentação foram determinados parâmetros do processo como, eficiência de fermentação e produtividade volumétrica, segundo as equações a seguir:

$$Y_{p/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad \text{Equação 7}$$

$$EF (\%) = \frac{Y_{p/S}}{0,511} \cdot 100 \quad \text{Equação 8}$$

$$Q_p = \frac{P - P_0}{t} \quad \text{Equação 9}$$

Onde;

$Y_{P/S}$: fator de rendimento de produção de etanol (g/g);

P : concentração final de etanol (g/L);

P_0 : concentração inicial de etanol (g/L);

S : concentração final de glicose (g/L);

S_0 : concentração inicial de glicose (g/L);

$E.F.$: eficiência de fermentação (%);

0,511: fator de conversão máximo teórico de substrato em etanol (Gay-Lussac, 1810);

Q_P : produtividade volumétrica em etanol (g/(L·h));

t : tempo de fermentação (h).

4.12. Eletroforese SDS-PAGE

Os concentrados enzimáticos previamente diluídos foram preparados com tampão de amostra, fervidas por cinco minutos e aplicados no gel. Foram utilizados dois géis, um de empilhamento e um de separação (LAEMMLI, 1970). A composição dos géis está apresentada na tabela 4.7.

Tabela 4.7. Composição do gel de separação e do gel de empilhamento para Eletroforese SDS-Page.

Gel de separação (10%)		Gel de empilhamento	
TRIS/HCl 1,5M pH 8,8	2,5 mL	TRIS/HCl 1M pH 6,8	1,25 mL
SDS 10%	100 µL	SDS 10%	100 µL
Acrilamida 30%	3,3 mL	Acrilamida 30%	1,3 mL
Persulfato de amônio 10%	100 µL	Persulfato de amônio 10%	100 µL
TEMED	5 µL	TEMED	10 µL
H ₂ O	4 mL	H ₂ O	7,35 mL

O gel SDS-poliacrilamida foi submetido a uma voltagem de 200 V, em um sistema de cuba vertical (Mini-PROTEAN Tetra system, marca Bio-Rad). Após a corrida, os géis foram corados com solução corante (metanol 40%, ácido acético 10 % e *coomassie* brilhante R-250 0,1 %) e descorados com ácido acético 10% e metanol 25%. Foram utilizados padrões de massas molares de (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20,15,10) kDa.

4.13. Zimograma

Para o zimograma de celulasas com atividade em Carboximetilcelulose (CMC), foi adicionada CMC (0,2 % m/v) à composição do gel de poliactilamida; o preparo do gel seguiu o mesmo protocolo daquele para o gel SDS/PAGE.

Os concentrados enzimáticos previamente diluídos foram preparados com tampão de amostra (glicerol 10%, SDS 2,3%, Tris-HCl pH 6,8, 1 M).

Para revelação das bandas com atividade em CMC, após eletroforese, o gel foi imerso em solução Triton x-100 1% e mantido sob agitação constante durante 20 min

para remoção do SDS. Em seguida, a solução foi substituída por tampão citrato de sódio (pH 5,0, 50 mM) e mantida sob agitação constante durante 20 minutos (2 vezes). Após lavagens, o gel foi imerso novamente no tampão citrato e incubado a 50 °C por 20 min. Posteriormente, o gel foi imerso em solução vermelho congo (0,1 % m/v), por 30 min e, afinal, lavado com solução de NaCl 1 mol/L, até o aparecimento das bandas. Ácido acético também foi adicionado para melhor visualização das bandas.

4.14. Estudos de sinergismo com concentrado enzimático de *Myceliophthora thermophila*

O concentrado enzimático de *M. thermophila* está sendo desenvolvido e otimizado no LADEBIO. No presente estudo, o extrato bruto foi produzido em reator de 10 L, com volume útil de 8 L, utilizando o meio de Mandels, com as seguintes modificações na composição: avicel, 20 g/L; ureia, 1,5 g/L; extrato de levedura, 0,5 g/L; sulfato de amônio, 0,5 g/L. A produção foi conduzida a 45 °C e 200 rpm, por 60 h. O concentrado foi obtido utilizando membranas de ultrafiltração, conforme descrito no item 4.5.

Para avaliação do sinergismo entre o concentrado de *M. thermophila* e a mistura otimizada, foi realizada a hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada, utilizando 2,5% (m/v) de carga de sólidos. A carga proteica correspondeu à soma equivalente da mistura otimizada de celulasas e do concentrado de *M. Thermophila* (7,5 mg/g celulose= 3,75 mg/g celulose da mistura otimizada + 3,75 mg/ g celulose do concentrado enzimático de *M. Thermophila*). A hidrólise também foi conduzida utilizando os concentrados individuais na mesma quantidade em que estão presentes na mistura (3,75 mg/g celulose), a fim de avaliar o sinergismo (equação 10).

$$\text{Grau de sinergismo} = \frac{\text{Glicose liberada (mistura de n componentes)}}{\sum_{i=1}^{i=n} \text{glicose liberada por cada componente}_i} \quad \text{Equação 10}$$

4.15. Estudos de sinergismo utilizando CBMs

Estudos iniciais de sinergismo foram realizados utilizando CBMs purificadas pelo grupo de biotecnologia molecular do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, dirigido pelo professor Igor Polikarpov *Ph.D*, gentilmente cedidas para a elaboração dos experimentos.

A tabela 4.8 apresenta um resumo dos CBMs utilizados considerando o gene de origem e o microrganismo utilizado para a sua expressão.

Tabela 4.8. Proteínas purificadas cedidas pelo grupo de biotecnologia molecular do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo

Proteína purificada	Origem	Expressão
CBM endoglucanase GH5	<i>T. harzianum</i>	<i>E. coli</i>
CBM GH5	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>E. coli</i>

Para os testes de sinergismo, foram realizadas hidrólises de CLPD e de resíduo da indústria de papel, utilizando a mistura otimizada em etapas anteriores. A hidrólise foi realizada em tubos de 2 mL com volume útil de 1 mL cada, com uma carga de sólidos de 25 g/L e uma carga de proteína de 7,5 mg/g celulose, a uma temperatura de 50 °C. A liberação de glicose ao longo do processo foi quantificada por CLAE para três diferentes tempos: 12 h, 24 h e 48 h. O grau de sinergismo foi determinado segundo a Equação 10.

4.16. Estudos de sinergismo utilizando swolenina

Primeiramente, foi produzida swolelina recombinante por meio da inserção do gene de *T. harzianum* em *A. niger*. A expressão heteróloga em *A. niger* foi parte de uma tese de doutorado desenvolvida no LADEBIO (Rocha, 2014). A sua aplicação constitui-se num dos resultados apresentados nesta tese.

Inicialmente, foram inoculados 1×10^6 esporos/mL (pré-inóculo) em 20 mL de meio CLS (tabela 4.9) a 30 °C e 170 rpm por 18 horas. Deste pré-inóculo, 1% (v/v) foi transferido (2 mL) para frascos erlenmeyer contendo 200 mL de meio de fermentação (tabela 4.10). O procedimento foi conduzido a 25°C e 150 rpm por 96 h.

Posteriormente, o meio foi filtrado e concentrado utilizando membranas de corte de 5 kDa. Ao final, com o objetivo de comprovar a produção da swolenina, foi realizado um gel de eletroforese, conforme descrito no item 4.12.

Tabela 4.9. Composição do meio CLS

Componente	g/L
Sólidos macerados de milho	100
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5
Glicose	10

Tabela 4.10. Composição do meio de fermentação

Componente	g/L
Maltose H ₂ O	75
Soytone (peptona)	30
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,5
MgSO ₄ 7H ₂ O	7,5
Tween 80	0,04
MES	10
L-arginina	0,5

Para determinação do sinergismo entre a swolelina e a mistura otimizada, CLPD foi hidrolisado em tubos de 2 mL com volume útil de 1 mL cada, para uma carga de sólidos de 25 g/L e uma carga de proteína de 7,5 mg/g celulose, a uma temperatura de 50 °C. A liberação de glicose ao longo do processo foi quantificada por CLAE para três diferentes tempos: 12 h, 24 h e 48 h. O grau de sinergismo foi determinado segundo a Equação 10.

4.17. Estudos de aplicação de surfactantes/aditivos

Com o propósito de avaliar o efeito de aditivos na conversão enzimática da celulose, foram feitas várias hidrólises enzimáticas de bagaço de cana (CL e CLPD) com adição de PEG 4000 e BSA, conduzidas a 50°C e pH 5 por 48h. Utilizando carga de proteína do coquetel enzimático (7,5 mg/g celulose e 20 mg/g celulose) e carga de sólidos de 25g/L e 100 g/L. A suplementação de PEG e BSA foi feita numa proporção de 1:1 em relação à carga proteica do coquetel utilizado, *T. harzianum*, *P. funiculosum* ou Mistura otimizada.

A liberação de glicose foi quantificada ao final do processo e analisada por CLAE. O sinergismo foi determinado segundo a equação 10.

4.18. Esquemas de metodologia

A seguir, são apresentados esquemas que resumem a metodologia aplicada. A figura 4.7, por sua vez, esquematiza a produção do biocatalisador (mistura otimizada) e as etapas de fermentação. Por fim, a figura 4.8 ilustra os estudos de processos de hidrólise e de sinergismo.

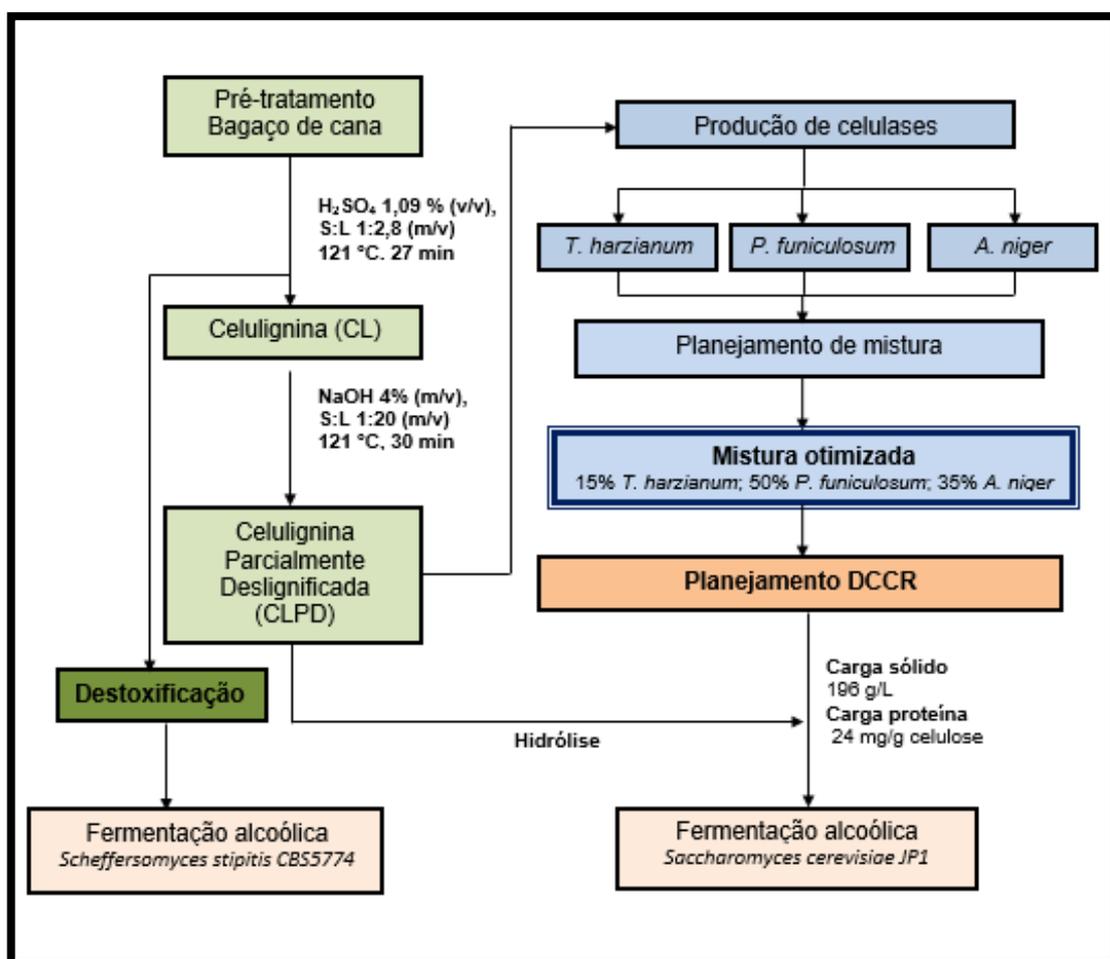


Figura 4.7. Esquema representativo da produção da mistura otimizada e das etapas de fermentação.

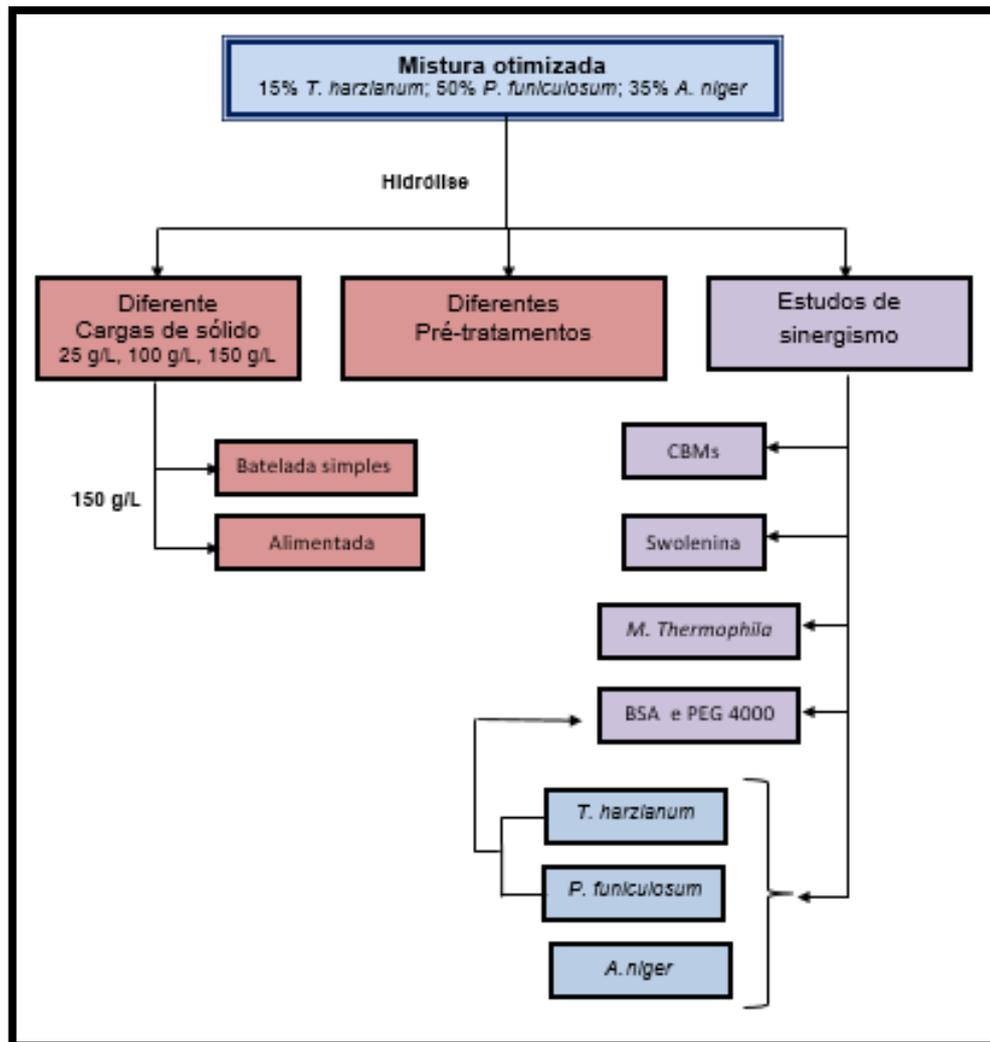


Figura 4.8. Esquema de processos de hidrólise e estudos de sinergismo.

Capítulo 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados desta tese de doutorado, que incluem a caracterização parcial da matéria-prima (bagaço de cana), antes e após os pré-tratamentos, o planejamento de mistura de preparados enzimáticos, obtidos de três diferentes plataformas fúngicas, e a influência de cada variável, acompanhada de uma análise estatística. Em seguida, é apresentada a otimização da hidrólise com o objetivo de aumentar a liberação de glicose, utilizando como variáveis independentes a carga de sólidos e a carga de proteína, e como variáveis de resposta a glicose liberada e a eficiência de hidrólise enzimática, ambas calculadas para 48h. Posteriormente, são exibidos os resultados da avaliação da fermentabilidade para produção de etanol a partir dos hidrolisados da fração celulósica e hemicelulósica empregando as linhagens *Saccharomyces cerevisiae* JP1 e *Scheffersomyces stipitis* CBS5774, respectivamente. Ao final, são contemplados estudos de sinergismo envolvendo o emprego de proteínas acessórias e de surfactantes.

5.1. Caracterização do material lignocelulósico

O bagaço de cana foi submetido a dois pré-tratamentos consecutivos, o primeiro com ácido diluído (H_2SO_4), com o propósito de retirar parte da fração hemicelulósica, e o segundo com hidróxido de sódio (NaOH), a fim de se remover parte da lignina, de forma a promover a desorganização do complexo celulósico e, assim, incrementar o acesso à celulose. Este processo tem o objetivo de aumentar

tanto a hidrólise enzimática como a produção de celulases. A composição do bagaço *in natura* e após a combinação dos pré-tratamentos ácido e básico é mostrada na tabela 5.1.

Tabela 5.1. Composição do bagaço de cana antes e após o pré-tratamento.

Frações	Bagaço de cana	
	<i>In natura</i>	Celulignina parcialmente deslignificada
Celulose (%)	34,7% ± 2,1%	67,1% ± 0,1%
Hemicelulose (%)	25,2% ± 0,8%	12,5% ± 0,6%
Lignina (%)	19,2% ± 0,2%	5,5% ± 0,8%
Cinza (%)	1,0% ± 0,1%	**

Os pré-tratamentos promoveram a redução da fração hemicelulósica de 25,2% para 12,5%, enquanto a lignina foi reduzida de 19,2% para 5,5%, obtendo-se, ao final dos pré-tratamentos combinados, um teor de celulose de 67,1%, similar aos resultados reportados por Maeda (2010), Gravina (2013) e Rocha (2014).

Cabe ressaltar que a aplicação de uma primeira etapa de pré-tratamento com ácido diluído aumenta a difusão do hidróxido de sódio na estrutura lignocelulósica, possibilitando uma dissolução mais acelerada da lignina e, conseqüentemente, um maior acesso enzimático à fração celulósica (SOLEIMAN et al., 2015; LIGUORI et al., 2015).

Este modo de condução de pré-tratamento ácido seguido do alcalino tem apresentado resultados mais satisfatórios do que os obtidos quando da utilização de somente um deles. Ao final do processo combinado, têm-se fibras ricas em celulose, mais acessíveis para a posterior conversão em açúcares fermentáveis (DAMISA et al., 2008; JEONG et al., 2010; KIM et al., 2012).

A figura 5.1 apresenta a microscopia eletrônica de varredura no bagaço de cana, antes e após o pré-tratamento combinado. Observa-se uma mudança na estrutura morfológica do bagaço de cana quando submetido aos pré-tratamentos ácido e alcalino, com uma visível desorganização das fibras.

Podem ser observadas as fibras íntegras do bagaço *in natura*, porém, uma vez submetido aos pré-tratamentos, o material apresenta um aspecto amorfo, desestruturado e um menor tamanho de partícula, resultado da remoção parcial das frações de hemicelulose e lignina.

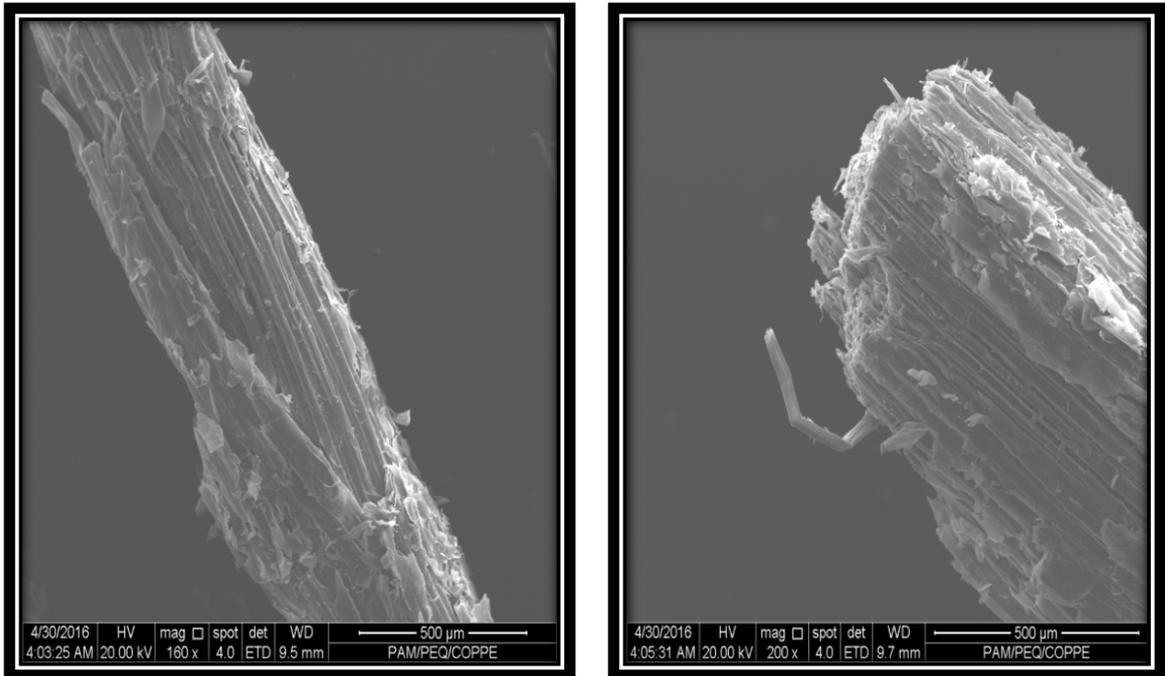
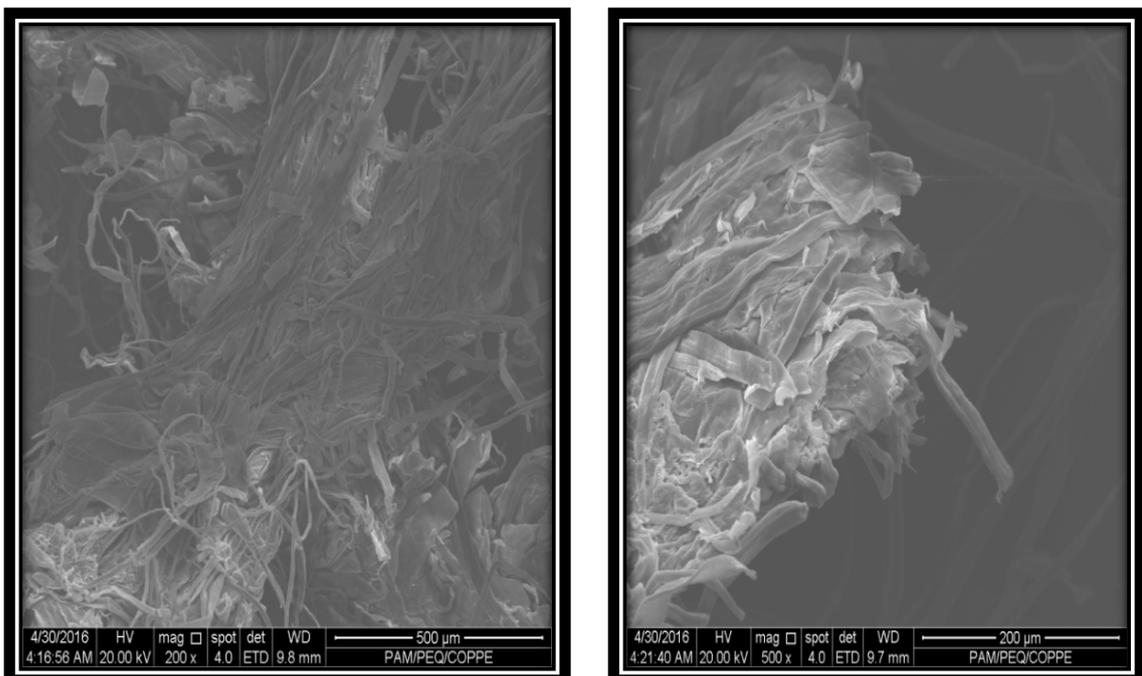
Bagaço *In natura***Celulignina parcialmente deslignificada**

Figura 5.1. Microscopia eletrônica de varredura da fibra lignocelulósica de bagaço de cana *in natura* e após pré-tratamentos ácido e alcalino.

5.2. Produção de celulases por *T. harzianum*, *P. funiculosum* e *A. niger*

A produção de celulases foi realizada utilizando três diferentes fungos filamentosos, cujas capacidades de produção haviam sido estudadas em trabalhos anteriores desenvolvidos no LADEBIO (CASTRO, 2006; DIAS, 2011; MAEDA, 2010 e ROCHA, 2014). Em todos os casos foi utilizado celulignina parcialmente deslignificada como fonte de carbono e como principal indutor para a produção de celulases (SUTO e TOMITA 2001; GUTIERREZ et al., 2015).

As atividades enzimáticas ao final dos cultivos estão apresentadas na tabela 5.2.

Tabela 5.2. Atividades enzimáticas obtidas nos extratos brutos da produção de celulases por *T. harzianum*; *P. funiculosum* e *A. niger*.

Fungo	FPase (U/mL)	CMCase (U/mL)	β -glucosidase (U/mL)
<i>T. harzianum</i>	1,9 \pm 0,04	26,9 \pm 0,8	0,7 \pm 0,08
<i>P. funiculosum</i>	0,5 \pm 0,04	8,9 \pm 0,4	1,4 \pm 0,02
<i>A. niger</i>	nd	nd	4,5 \pm 0,6

nd; não foi detectado

As atividades enzimáticas obtidas utilizando *T. harzianum* são similares às reportadas por Rocha et al. (2013): FPase 1,2 U/mL; CMCase 27,0 U/mL e β -glucosidase 0,6 U/mL. No caso da produção com *P. funiculosum*, as atividades CMCase e β -glucosidase são próximas àquelas apresentadas por Maeda (2010): CMCase 11,1 U/mL e β -glucosidase 1,9 U/mL. Já para o coquetel enzimático obtido a partir de *A. niger*, a atividade β -glucosidase é semelhante àquelas apresentadas por Dias (2011) e Gravina (2013) (4,9 U/mL e 4,5 U/mL respectivamente).

Após a etapa de produção, os preparados foram filtrados com lã de vidro para retirada principalmente da celulignina parcialmente deslignificada, CLPD, e, posteriormente, foram filtrados utilizando uma coluna de 0,2 μ m, para remoção de pequenos particulados da fermentação. Por fim, após, terem sido concentrados com o emprego de membranas de corte de 10 kDa, os preparados foram caracterizados em relação às suas atividades celulolíticas principais e à concentração de proteína. Os resultados estão exibidos na tabela 5.3.

Tabela 5.3. Principais atividades enzimáticas obtidas dos preparados enzimáticos de *T. harzianum*, *P. funiculosum*, e *A. niger* após a etapa de concentração.

Parâmetro	<i>T. harzianum</i>	<i>P. funiculosum</i>	<i>A. niger</i>
FPase(U/mL)	51,1 ± 0,5	8,7 ± 1,3	0,6 ± 0,03
CMCase (U/mL)	516,2 ± 1,0	155,4 ± 0,3	12,0 ± 0,4
β-glucosidase (U/mL)	32,6 ± 0,1	37,0 ± 0,6	258,7 ± 0,3
Avicelase (U/mL)	21,5 ± 0,2	20,7 ± 0,8	4,2 ± 0,2
Xilanase (U/mL)	587 ± 23	260 ± 26	4,0 ± 0,9
Proteína (mg/mL)	14,2 ± 1,6	9,6 ± 0,3	6,5 ± 0,5

Conforme pode ser observado na tabela 5.3, as atividades enzimáticas podem variar de acordo com o tipo de microrganismo. Destaca-se a estirpe *A. niger* por apresentar uma alta capacidade para produção de enzimas β-glucosidases, cuja capacidade para hidrolisar unidades de celobiose as torna as principais enzimas geradoras de glicose na conversão enzimática da celulose. Este mesmo microrganismo, porém, apresenta baixas atividades CMCásica e Avicelásica, as quais são limitantes para o processo de hidrólise e responsáveis pela fase de liquefação (ARANTES e SADDLER, 2010).

Por outro lado, a produção de celulases utilizando as linhagens *T. harzianum* e *P. funiculosum* foi caracterizada por uma alta produção de endoglucanases, responsáveis por iniciar a hidrólise e gerar celodextrinas e diferentes oligossacarídeos que servem como substrato para as celobiohidrolases, as quais geram oligossacarídeos de baixo grau de polimerização e unidades de celobiose. No entanto, esses fungos apresentam baixa produção de enzimas β-glucosidases. Destaca-se também o preparado de *T. harzianum* pela alta atividade xilanásica, enzimas que degradam a fração hemicelulósica e atuam em sinergismo com as celulases (ZHANG e VIIKARI, 2015; XI et al., 2015)

Os resultados evidenciam a falta de equilíbrio entres os principais grupos do complexo celulásico produzidos por três fungos filamentosos amplamente utilizados. A figura 5.2 mostra uma relação gráfica das atividades relativas apresentadas por cada fungo.

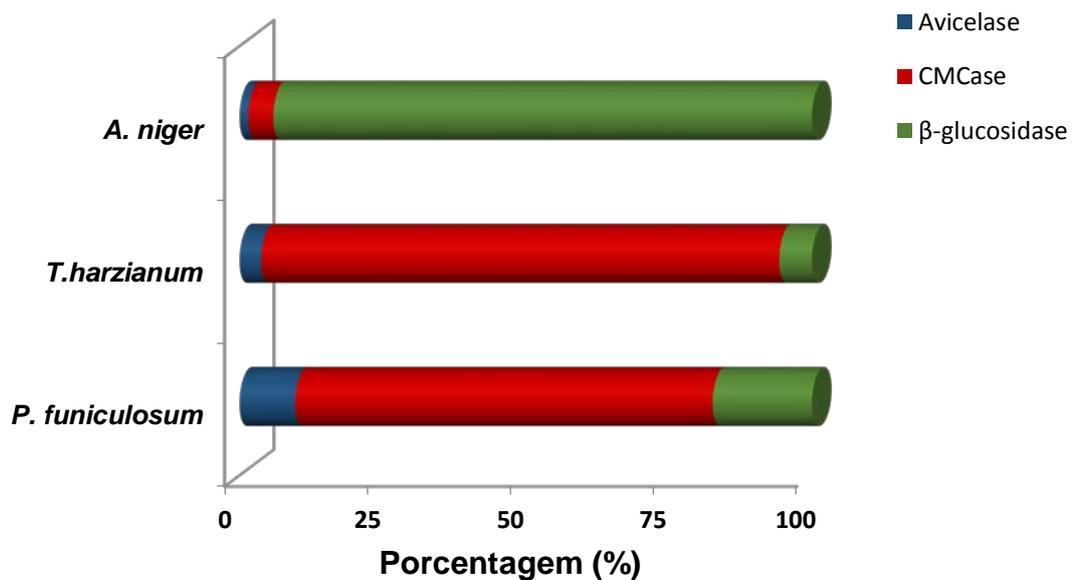


Figura 5.2. Proporções relativas das atividades aparentes Avicelásica (azul), CMCásica (vermelho) e β-glicosidásica (verde) nos preparados enzimáticos concentrados do LADEBIO.

A figura 5.3 exibe um gel de eletroforese SDS-PAGE em que são apresentadas as proteínas presentes nos preparados enzimáticos estudados, separadas segundo a massa molecular. Constata-se que existem bandas que estão presentes em um extrato enzimático e ausentes nos outros e outras mais intensas em um preparado do que nos outros.

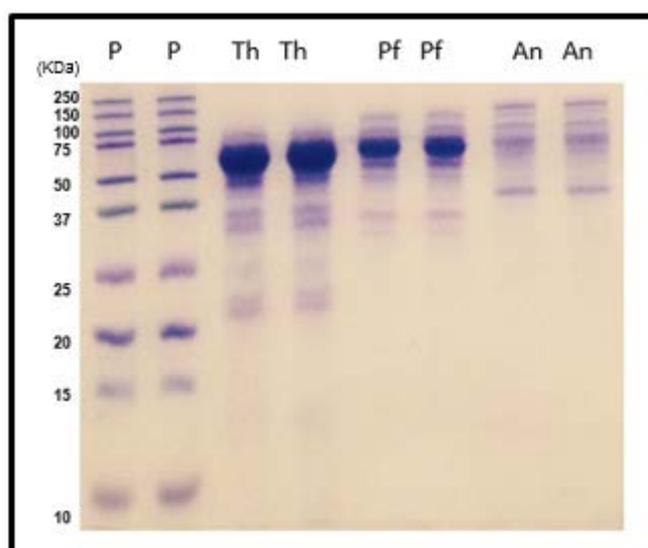


Figura 5.3. Gel de eletroforese SDS-PAGE. P (padrão de proteína); Th (concentrado de *T. harzianum*); Pf (concentrado de *P. funiculosum*) e An (concentrado de *A. niger*).

Percebe-se que no concentrado de *T. harzianum* há uma grande variedade de proteínas, representada por várias bandas com massa molecular entre 100 kDa e 20 kDa. A caracterização proteômica de *T. harzianum* utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono mostrou que as glicosil hidrolases representam 67% do proteoma desse microrganismo. Dentre as glicosil hidrolases com atividade sobre a celulose os grupos mais abundantes foram: GH 5 (11%), GH 6 (6%), GH 7 (10%), GH 3 (17 %) e GH 55 (6%). Já as hemicelulases mais abundantes no secretoma de *T. harzianum* foram, preponderantemente, os grupos de enzimas GH 10 (13%) e GH 11 (7%) (ROCHA, 2014). No gel destaca-se uma banda predominante entre 75 kDa e 50 kDa, possivelmente a endogucanase Cel 7B, de *T. harzianum*, purificada por Pelligrini (2016), uma proteína que, em sua forma íntegra, apresenta massa molar de 65 kDa.

O concentrado de *P. funiculosum* apresentou várias bandas com massa molecular entre 150 kDa e 25 kDa. Destacam-se as bandas presentes no intervalo (100-75) kDa, provavelmente uma β -glucosidase purificada e reportada por Maeda (2010), com massa molar de 77,3 kDa. Possivelmente, as bandas entre 75 kDa – 50 kDa indicam as presenças das celobiohidrolases I e II e da endoglucanase, reportadas e purificadas por Maeda (2010), com massas moleculares de 63,8 kDa, 51,1 kDa e 58,5 kDa, respectivamente. O gel apresenta ainda uma banda entre (37 e 25) kDa, a qual pode indicar a proteína 7, de massa molar de 30 kDa, identificada igualmente por Maeda (2010).

No concentrado de *A. niger* foram identificadas bandas de cerca de 150 kDa e de 100 kDa, que podem ser aquelas relatadas por Dias (2011). Tal estudo reportou bandas com atividade β -glucosidásica com massa molar de 168 kDa e 119 kDa.

Para uma caracterização mais detalhada das bandas desses fungos filamentosos seria necessária a purificação e Identificação das enzimas por espectroscopia de massas, *liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry* LC/MS/MS. No entanto, o gel permitiu constatar a variedade de proteínas secretadas pelos diferentes fungos.

Com o intuito de exemplificar as diferenças de atividades enzimáticas nas bandas apresentadas anteriormente, um zimograma para endoglucanase foi realizado (figura 5.4).

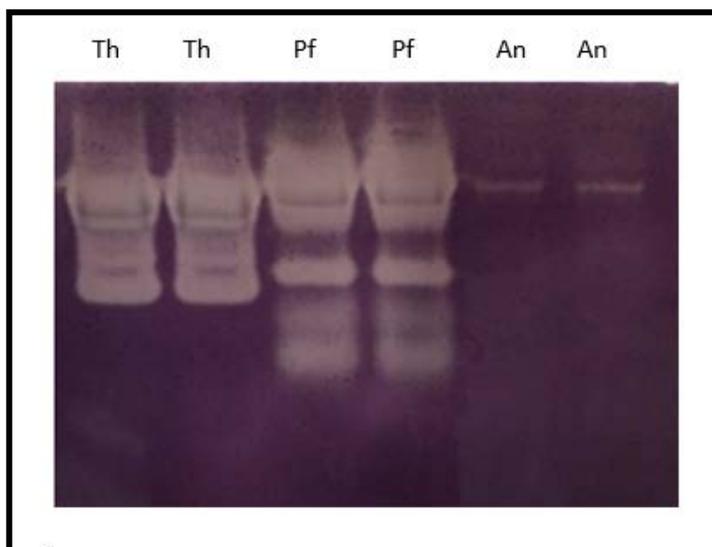


Figura 5.4. Zimograma para endoglucanase. Th (concentrado de *T. harzianum*); Pf (concentrado de *P. funiculosum*) e An (concentrado de *A. niger*).

Observa-se que os três preparados apresentaram atividade endoglucanásica, principalmente *T. harzianum* e *P. funiculosum*, os quais exibiram variadas bandas dessas celulasas com atividade em carboximetilcelulose. Já o preparado enzimático de *A. niger* apresentou raras bandas de endoglucanase, resultado coerente com os valores de atividade enzimática apresentados na tabela 5.3, na qual é evidenciada a baixa atividade CMCCase de *A. niger* e destacada a atividade endoglucanase nos preparados de *P. funiculosum* e *T. harzianum*.

5.3. Otimização da mistura enzimática por planejamento experimental

Com o propósito de aumentar a conversão enzimática da celulose e tornar atrativa a produção de bioprodutos a partir de materiais lignocelulósicos, foi utilizado a técnica de planejamento estatístico de mistura (*simplex-centroide*) para se obter uma mistura balanceada de celulasas a partir dos extratos enzimáticos concentrados de *T. harzianum*, *P. funiculosum* e *A. niger*.

A variável dependente foi a quantidade de glicose liberada após 48 h de hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada (25 g/L), enquanto as variáveis independentes foram a proporção proteica de cada concentrado.

O somatório dos valores das variáveis independentes, correspondente a 10 mg de proteína/g celulose, foi adotado como 100%.

A tabela 5.4 apresenta a matriz do planejamento acompanhada dos valores de resposta obtidos em cada experimento. A análise estatística (tabela 5.5) mostra que os modelos: linear, quadrático e cúbico especial são estatisticamente significativos. O modelo cúbico especial, porém, apresenta um coeficiente de determinação, $R^2 = 0,95$, mais próximo de 1, indicando que esse tipo de modelo matemático se ajusta melhor ao fenômeno estudado.

Tabela 5.4. Matriz do planejamento de mistura e valores de resposta obtidos em cada experimento.

Experimento	Coquetel enzimático			Glicose g/L
	Proporções			
	<i>T. harzianum</i>	<i>P. funiculosum</i>	<i>A. niger</i>	
1	1,00	0,00	0,00	7,75
2	0,00	1,00	0,00	10,10
3	0,00	0,00	1,00	0,21
4	0,50	0,50	0,00	10,46
5	0,50	0,00	0,50	8,35
6	0,00	0,50	0,50	11,95
7	0,67	0,17	0,17	12,30
8	0,17	0,67	0,17	17,23
9	0,17	0,17	0,67	11,68
10	0,33	0,33	0,33	16,79
11	1,00	0,00	0,00	6,81
12	0,00	1,00	0,00	12,84
13	0,00	0,00	1,00	0,19
14	0,50	0,50	0,00	12,49
15	0,50	0,00	0,50	7,60
16	0,00	0,50	0,50	14,27
17	0,67	0,17	0,17	16,13
18	0,17	0,67	0,17	16,16
19	0,17	0,17	0,67	11,66
20	0,33	0,33	0,33	16,91

Tabela 5.5. Modelos matemáticos segundo análise estatística. Planejamento de mistura. 20 experimentos

Modelo	Efeito Soma de quadrados	F	p	R ²
Linear	160,90	4,55	0,03	0,35
Quadrático	241,89	19,43	<<0,05	0,87
Cúbico especial	37,06	22,89	<<0,05	0,95

O modelo matemático cúbico especial, que representa a hidrólise enzimática nas condições experimentais deste estudo, está representado na equação 5.1, enquanto o diagrama de Pareto, o qual indica a influência de cada variável independente, está explícito na figura 5.5. Na análise estatística, o modelo foi significativo ($p < 0,05$) e a falta de ajuste (*lack of fit*) foi não significativa ($F_{\text{calculado}} = 0,75$; $p = 0,54$), indicando a sua adequação na descrição do processo.

$$\text{Glicose(g/L)} = 7,50 \cdot A + 11,52 \cdot B + 0,23 \cdot C + 8,94 \cdot A \cdot B + 17,39 \cdot A \cdot C + 29,21 \cdot B \cdot C + 138,55 \cdot A \cdot B \cdot C$$

Equação 5.1

Onde:

A= *T. harzianum* (%); B= *P. funiculosum* (%); C= *A. niger* (%)

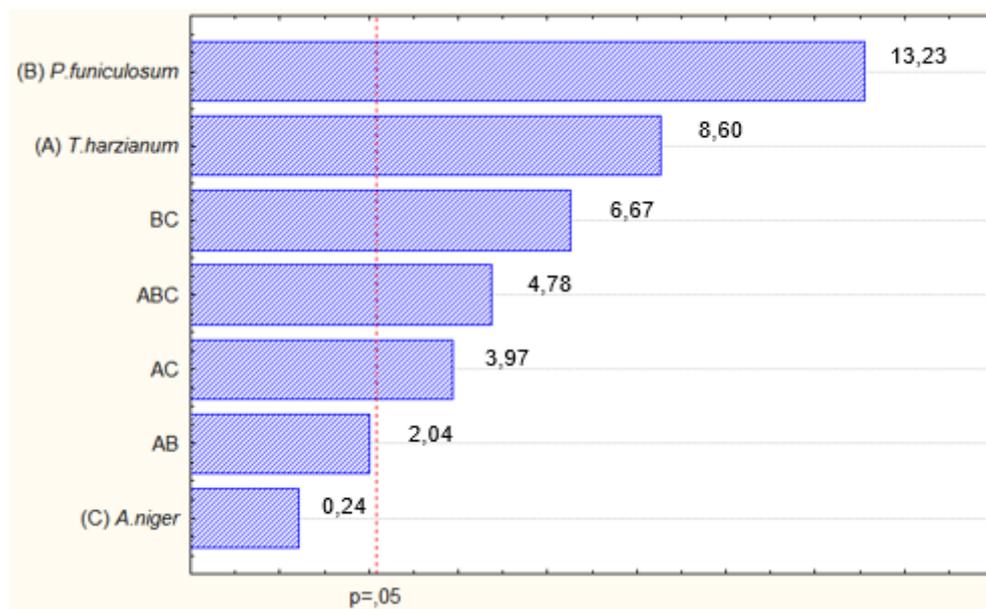


Figura 5.5. Diagrama de Pareto para modelo cúbico especial. Planejamento de mistura *simplex centroide*.

Baseado nos coeficientes do modelo matemático, observa-se que há sinergismo entre os preparados de *T. harzianum* e *A. niger*, e entre os preparados de *P. funiculosum* e *A. niger*, uma vez que os coeficientes das interações são positivos. Contudo, de acordo com o diagrama de Pareto (figura 5.5), a interação entre *T. harzianum* e *P. funiculosum* não é significativa, somente marginalmente significativa. A razão para isto talvez esteja relacionada à baixa produção de β -glucosidase (33

U/mL para *Trichoderma* e 37 U/mL para *Penicillium*), evidenciando a necessidade de suplementação dessa enzima para a liberação de glicose. Esta situação se reflete nos altos valores dos coeficientes relacionados à interação desses preparados com o preparado de *A. niger*, o qual exibe uma alta produção de β -glucosidase (259 U/mL).

Destaca-se que a interação entre os três preparados é significativa, com efeito positivo sobre a variável de resposta, apesar da combinação dos preparados de *T. harzianum* e *P. funiculosum* não o ser.

A figura 5.6 apresenta o gráfico de normalidade, em que pode ser observado um comportamento normal, o que torna válida a análise de variância para a interpretação dos resultados.

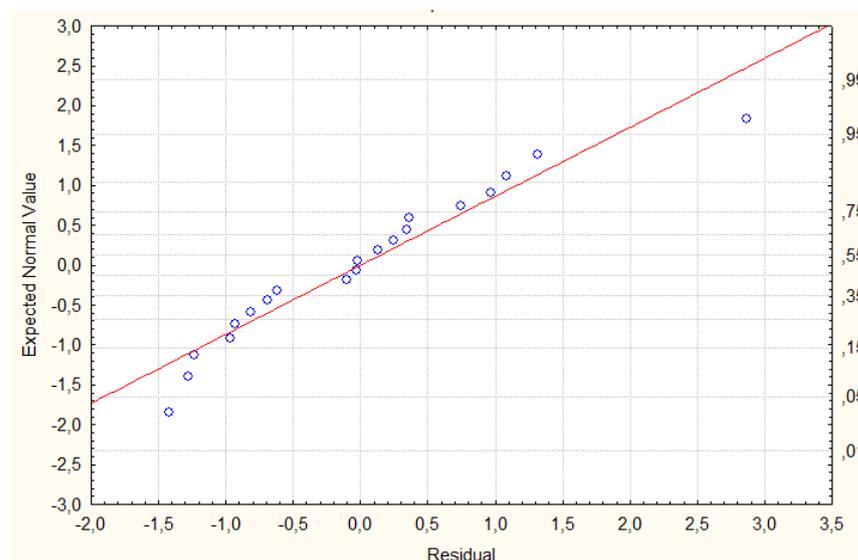


Figura 5.6. Gráfico de normalidade, modelo cúbico especial. Planejamento de mistura *simplex centroide*.

Empregando o programa *Statistica 6.0*, através da opção de otimização de parâmetros, foram determinadas as proporções ótimas de cada preparado enzimático, que permitissem maximizar a liberação de glicose dentro das faixas de valores estudados. Assim, o ponto ótimo correspondeu a: 15% de *T. harzianum*, 50% *P. funiculosum*, 35 % *A. niger* (Figura 5.7).

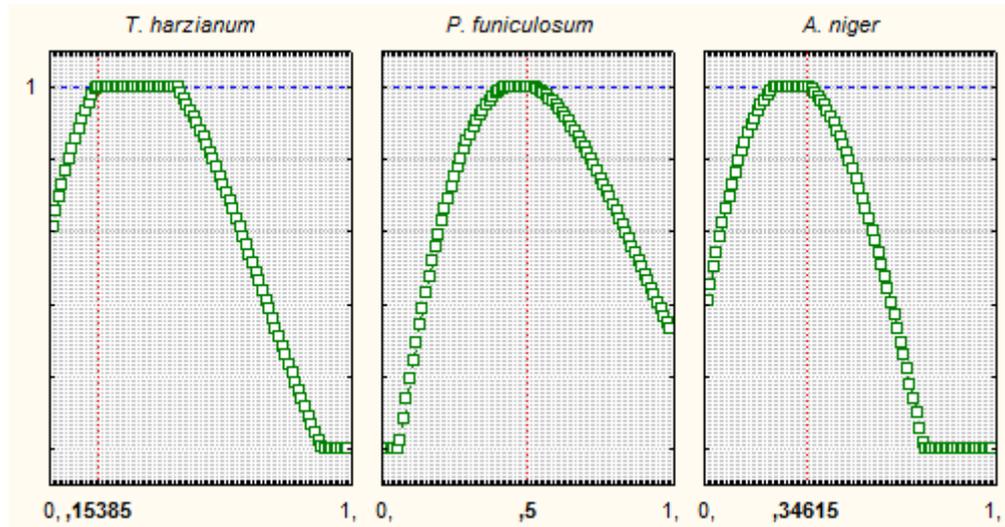


Figura 5.7. Gráfico de otimização de proporções das variáveis independentes, Planejamento de mistura *simplex centroide*.

5.4. Validação do modelo

Com o propósito de validar o modelo matemático proposto, foi conduzida a hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada com a mesma carga de sólidos (25 g/L) e carga de proteína de 10 mg/g celulose nas proporções de 15% *T. harzianum*, 50% *P. funiculosum* e 35% de *A. niger*. O experimento foi realizado em quadruplicata e os valores obtidos estão expostos na tabela 5.6. Uma vez que o resultado está dentro do intervalo para 95% de confiança, considera-se validado o modelo matemático nas condições de estudo.

Tabela 5.6. Valor predito e valor experimental para as condições otimizadas de acordo com o programa *Statistica 6.0*.

Variável resposta	Limites		Valor experimental
	-0,95 %	+0,95 %	
Glicose (g/L)	16,03	18,57	17,27 ± 0,61

5.5. Mistura otimizada e sinergismo entre os extratos enzimáticos na mistura otimizada.

A mistura obtida no estudo foi denominada de mistura otimizada (MO) e a partir desse preparado foram determinadas as principais atividades enzimáticas, cujos valores são apresentados na tabela 5.7.

Table 5.7. Atividade enzimática da mistura otimizada (*T. harzianum* 15%; *P. funiculosum* 50% and *A. niger* 35%)

Atividade enzimática	Mistura otimizada
FPase (U/mL)	12,9 ± 0,05
CMCase (U/mL)	156,5 ± 1,7
β-glucosidase (U/mL)	113,3 ± 3,0
Avicelase (U/mL)	10,6 ± 1,8
Xilanase (U/mL)	63,9 ± 1,0

A figura 5.8 apresenta um gel de eletroforese comparando as bandas da mistura otimizada e dos preparados dos coquetéis individuais.

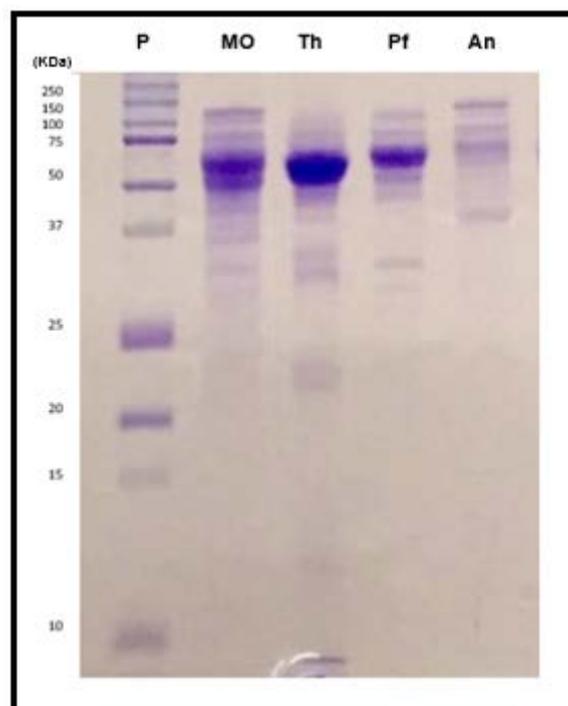


Figura 5.8. Gel de eletroforese SDS-PAGE. P (padrão de proteína); MO (mistura otimizada); Th (concentrado de *T. harzianum*); Pf (concentrado de *P. funiculosum*) e An (concentrado de *A. niger*).

Na mistura otimizada destacam-se altas proporções entre FPase:CMCase e entre FPase: β -glucosidase, evidenciando a importância dessas enzimas no processo de hidrólise de CLPD, uma vez que a endoglucanase é a responsável pelo início de hidrólise, enquanto a β -glucosidase catalisa, principalmente, a conversão, de celobiose a glicose. Além disso, ambas as enzimas atuam em sinergismo com as celobiohidrolases. A mistura otimizada apresenta também uma moderada atividade xilanásica, conforme mencionado anteriormente, relacionada à hidrólise de xilanas, permitindo a hidrólise da fração hemicelulósica, e, dessa forma, eliminando parte da barreira física para o acesso das celulasas à celulose.

Pode-se observar ainda, pela visualização do gel, que a mistura otimizada apresenta as bandas presentes nos preparados enzimáticos individuais, como seria esperado.

As eficiências de hidrólise, calculadas pela equação 6, foram comparadas com aquelas alcançadas ao se utilizar os preparados enzimáticos individualmente. A figura 5.9 apresenta a eficiência de hidrólise de cada preparado enzimático após 48 h de hidrólise de CLPD, utilizando uma carga de proteína de 10 mg/g celulose em cada experimento.

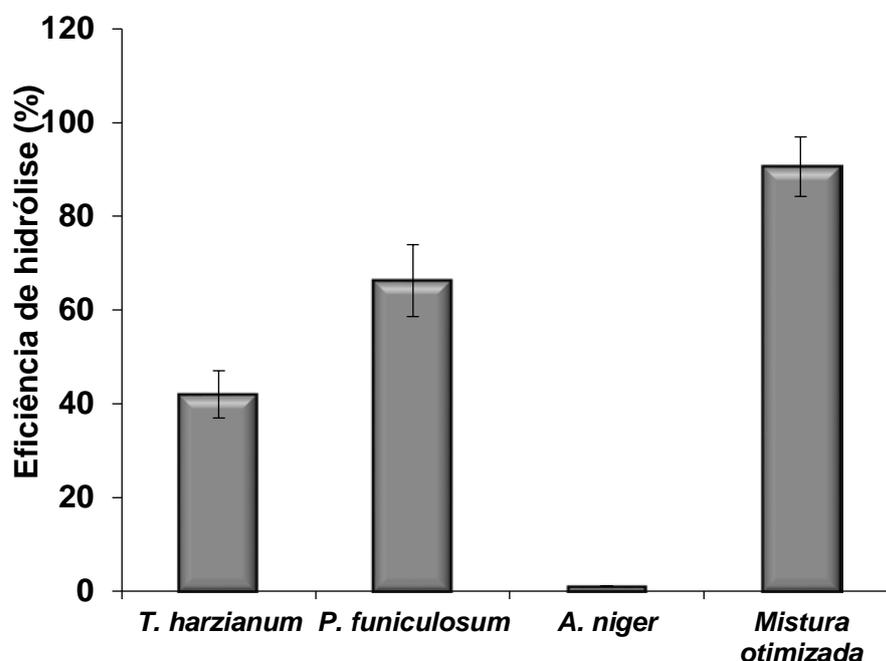


Figura 5.9. Eficiência de hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada (25 g/L) utilizando uma carga de proteína de 10 mg/g de celulose. Condições: pH 5, temperatura 50 °C e tempo de hidrólise de 48 h.

As eficiências de hidrólise para os preparados de *T. harzianum* e *P. funiculosum* isoladamente foram de 42% e 66%, respectivamente. Estes resultados foram 54% e 27% menores do que os obtidos com a mistura otimizada. Por sua vez, o preparado de *A. niger* apresentou uma eficiência de hidrólise muito baixa ($\approx 1\%$), resultado relacionado à baixa secreção de proteínas endoglucanásicas e celobiohidrolásicas. Entretanto, a alta atividade β -glucosidásica complementou os outros preparados, aumentando a liberação de glicose quando suplementada aos demais preparados enzimáticos.

A conversão de celulose alcançada no caso da utilização da mistura otimizada (91%, em 48h) foi superior à reportada pelo estudo de Gao et al. (2010) na hidrólise de palha de milho pré-tratada (0,2% m/v), o qual alcançou 80% de conversão de celulose em 24 h, a partir da utilização de uma mistura de enzimas purificadas com uma carga proteica de 30 mg/g celulose, o triplo da carga utilizada neste trabalho.

Em comparação, a eficiência de hidrólise obtida neste trabalho (91%) foi superior à apresentada por Mussatto et al. (2008), que atingiram valores de conversão a glicose de 85,6% em 96 h na hidrólise de bagaço pré-tratado da indústria cervejeira (carga de sólido 2% m/v, utilizando enzima comercial com carga de 45 FPU/g substrato, superior a utilizada neste estudo).

O resultado foi similar aos 91,75%, reportado também por Mussatto et al. (2008), em relação à conversão de celulose (contemplando glicose e celobiose). No entanto, no presente estudo, além de não ter havido acúmulo de celobiose, celobiose não foi detectada, a produtividade em relação à glicose liberada foi de 0,36 g/(L·h), superior à obtida no estudo de comparação, equivalente a 0,18 g/(L·h).

Com o propósito de determinar o sinergismo ao longo da hidrólise enzimática, foi avaliada a cinética de hidrólise tanto para a mistura otimizada como para cada fungo separadamente na mesma proporção encontrada na mistura (Figura 5.10).

Considerando a determinação do sinergismo como a relação entre a glicose liberada na mistura otimizada e o somatório da glicose liberada por cada fungo separadamente na mesma proporção que a utilizada na mistura (Figura 5.10), calculou-se o grau de sinergismo ao longo do processo (Figura 5.11).

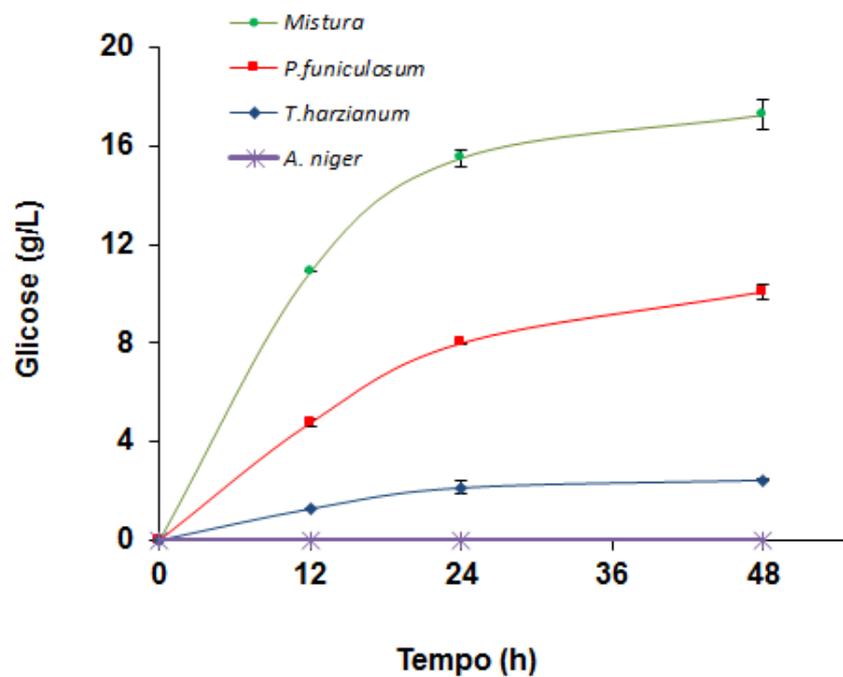


Figura 5.10. Cinética de hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada de bagaço de cana. Concentração de sólidos: 25 g/L. **Mistura** 10 mg proteína/g celulose (15% *T. harzianum*; 50% *P. funiculosus*; 35% *A. niger*); ***P. funiculosus*** (5 mg proteína/g celulose); ***T. harzianum*** (1,5 mg proteína/g celulose); ***A. niger*** (3,5 mg proteína/g celulose). Condições: pH 5, temperatura 50 °C.

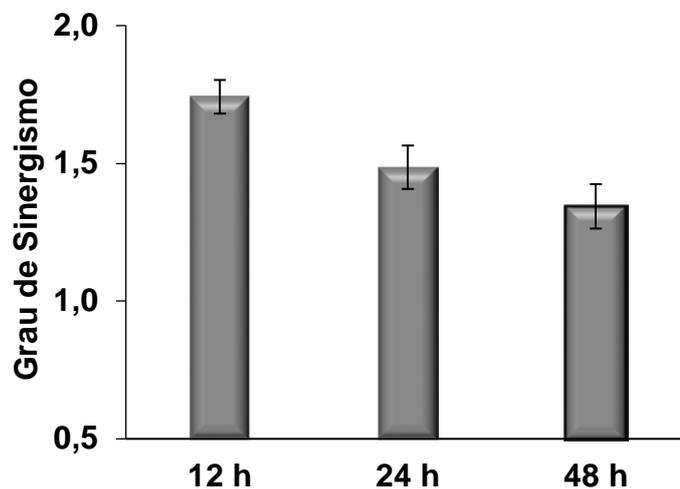


Figura 5.11. Grau de sinergismo em diferentes tempos no transcórper da hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada (25 g/L), utilizando preparado de *T. harzianum*; *P. funiculosus* e *A. niger*. Condições: pH 5, temperatura 50 °C.

Constata-se a redução do sinergismo ao longo do processo, evidenciando a colaboração das celulasas no início da hidrólise, na etapa de liquefação. Essa

diminuição pode estar relacionada ao fato da ação sinérgica entre as endoglucanases e exoglucanases decrescer ao longo do tempo com a escassez do substrato de interesse em cada caso.

Na segunda etapa da hidrólise, o sinergismo presente estaria principalmente relacionado à colaboração entre exoglucanases e β -glucosidases, ressaltando a importância do preparado de *A. niger* na mistura otimizada, o qual apresenta uma alta produção de β -glucosidases, o que permite evitar os problemas de inibição pelo produto (celobiose) sobre a ação das celulasas (DEKKER, 1986).

Além disso, como pode ser observado na figura 5.10, os ganhos na liberação de glicose entre 24 h e 48 h são mínimos (de 15,5 g/L para 17,3 g/L). No que diz respeito à produtividade volumétrica, em 24 h o valor foi de 0,65 g/(L·h), 81% superior ao obtido em 48 h (0,36 g/(L·h)), interessante dado sob um ponto de vista econômico.

Os resultados também foram comparados com os obtidos utilizando enzima comercial *Cellic Ctec2*® na hidrólise de CLPD para uma carga de sólidos de 25 g/L e uma carga de proteínas de 10 mg/g celulose. A Figura 5.12 apresenta um gráfico de comparação entre a glicose liberada por cada preparado (Mistura otimizada e *Cellic Ctec2*®) em função do tempo.

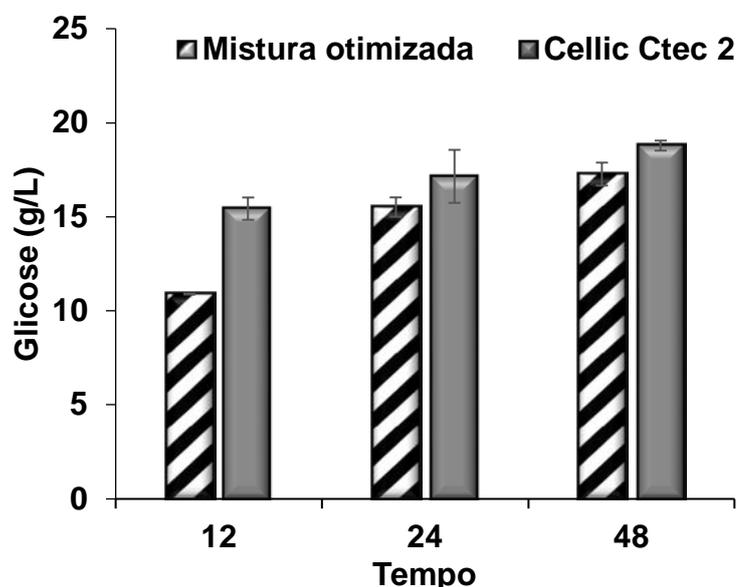


Figura 5.12. Glicose liberada na hidrólise de CLPD utilizando a mistura otimizada e a enzima comercial *Cellic Ctec2*®, em função do tempo. Carga de sólidos de 25 g/L e carga de proteínas de 10 mg/g celulose. Condições: pH 5, temperatura 50 °C.

A mistura otimizada apresentou resultados similares àqueles alcançados com o emprego de enzimas comerciais. Para 24 h de processo, as produtividades volumétricas foram de 0,65 g/(L·h) e 0,72 g/(L·h) para a mistura otimizada e o preparado comercial, respectivamente. Já para 48 de hidrólise, a produtividade no caso do emprego da mistura otimizada foi de 0,36 g/(L·h) e de 0,39 g/(L·h) no caso da utilização do coquetel comercial.

As principais diferenças com relação à produtividade volumétrica foram observadas nas 12 primeiras horas: o valor foi de 0,91 g/(L·h) no caso da mistura otimizada e de 1,29 g/(L·h) no caso do preparado comercial. A taxa inicial de hidrólise do coquetel comercial foi, portanto, mais elevada, muito provavelmente em virtude da presença de estabilizadores e enzimas acessórias no preparado, capazes de exercer influência sobre o acesso das celulasas ao substrato durante as primeiras horas de processo. Vários estudos têm indicado que o preparado de *Cellic Ctec2®*, contem LPMO, proteína que atua em sinergismo com celulasas na hidrólise da celulose mediante mecanismo oxidativo (CANNELLA et al., 2012; CANNELLA e JORGENSEN, 2014), o que talvez explique os resultados de liberação de glicose verificados. No presente trabalho, estudos da ação de proteínas acessórias serão discutidos na seção 5.10.

5.6. Influência das características do substrato na hidrólise enzimática

Com o objetivo de estudar o efeito dos componentes da parede celular na conversão da celulose, foram realizadas hidrólises enzimáticas em bagaços de cana com diferentes composições: bagaço de cana *in natura*, bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído, bagaço de cana submetido ao pré-tratamento alcalino e celulignina parcialmente deslignificada. A tabela 5.8 apresenta a composição dos diferentes materiais.

Estes processos foram conduzidos utilizando as mesmas cargas de proteína e de sólidos, e condições de temperatura, tempo e pH, empregadas no planejamento experimental.

A figura 5.13 mostra as eficiências de hidrólise obtidas em cada material. As menores eficiências foram alcançadas para a hidrólise do bagaço de cana *in natura*, (<4 %), indicando a necessidade de pré-tratamentos capazes de modificar a estrutura

recalcitrante da biomassa, a qual impede o acesso das celulases e hemicelulases, conforme explicado por Van Dyk e Pletschke, 2012.

Tabela 5.8. Composição de bagaço de cana *in natura* e após diferentes pré-tratamentos.

Frações	Bagaço de cana *			
	<i>In natura</i>	Pré-tratamento ácido	Pré-tratamento alcalino	Pré-tratamento ácido e alcalino
Celulose (%)	34,7% ± 2,1%	47,8% ± 0,1%	57,8% ± 1,2%	67,1% ± 0,1%
Hemicelulose (%)	25,2% ± 0,8%	14,6% ± 0,3%	19,3% ± 1,1%	12,5% ± 0,6%
Lignina (%)	19,2% ± 0,2%	25,7% ± 0,5%	5,3% ± 0,2%	5,5% ± 0,8%
Cinza (%)	1,0% ± 0,1%	0,1% ± 0,04%	0,5% ± 0,02%	**

* Os dados de bagaço de cana *in natura* e de bagaço após pré-tratamento ácido e alcalino também estão na tabela 5.1 e foram colocadas aqui novamente para facilitar a leitura

** não determinado

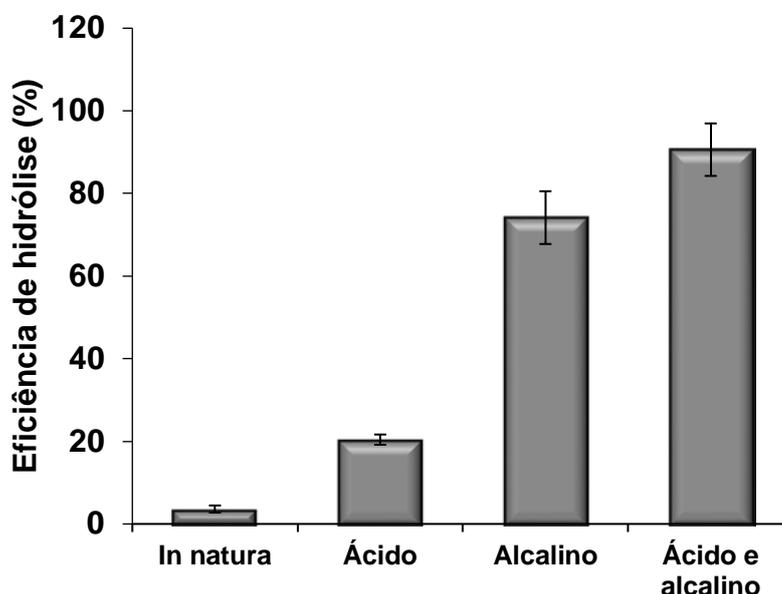


Figura 5.13. Eficiência de hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada (25 g/L), utilizando carga de proteína de 10 mg/g de celulose da mistura otimizada. Condições: pH 5, temperatura 50 °C e tempo de hidrólise de 48 h.

A hidrólise enzimática do material que passou por pré-tratamento com ácido diluído para retirada de parte da fração hemicelulósica, e consequente aumento da

porcentagem das frações celulósica, alcançou um rendimento de 20%. Tal resultado evidencia que a presença de lignina é um dos fatores a exercer influência sobre a conversão enzimática da celulose, situação que corrobora o trabalho de Pan et al. (2005), cujo estudo indica a existência de dois fatores principais mediante os quais a lignina influencia no rendimento do processo: por meio de ligações improdutivas, devido ao seu caráter hidrofóbico, e por meio de uma barreira física que impede o acesso das celulasas ao substrato. Barcelos et al. (2012) também ressaltaram a importância da deslignificação, comparando resultados de hidrólise enzimática de celulignina antes e depois da deslignificação, atingindo resultados de liberação de glicose de 36,4 g/L para o material deslignificado contra 9,75 g/L do material mais rico em lignina.

Ainda que os processos de pré-tratamento para a retirada da hemicelulose aumentem a porosidade da celulose (MUSSATO et al., 2008), esse fator não foi suficiente para impactar na conversão da celulose.

O material que passou unicamente por pré-tratamento alcalino para a remoção de parte da lignina, aumentando, assim, as frações celulósica e hemicelulósica, propiciou uma conversão de 74%, um resultado 270% superior ao obtido com celulignina (material pré-tratado com ácido diluído) e 19% inferior àquele utilizando celulignina parcialmente deslignificada (material pré-tratado com ácido e alcalino).

Estudos indicam que o pré-tratamento alcalino com NaOH permite a separação estrutural da lignina dos carboidratos e a solubilização da mesma, conseqüentemente provocando incrementos na conversão da celulose (SINGH, et al., 2015). Por outro lado, o processo de deslignificação (hidróxido diluído) não remove significativamente a fração hemicelulósica e há estudos indicativos de que xilanas inibem a ação das celulasas (ZHANG e VIKARI, 2012; ZHANG et al., 2012), sendo necessária a suplementação dos preparados enzimáticos com hemicelulasas.

A hidrólise enzimática do material com pré-tratamento alcalino promoveu uma conversão de hemicelulose para xilose, com liberação de $(3 \pm 0,2)$ g/L de xilose. Este resultado está relacionado à atividade xilanásica da mistura otimizada (tabela 5.7). Uma vez que a xilose é um produto menos inibitório para as celulasas do que os xilooligossacarídeos, conforme indicado por Qing et al. (2010), a hidrólise da fração hemicelulósica, por eliminar a barreira física causada por essa fração, aumenta o acesso das celulasas à celulose.

Nas condições estudadas, o teor de lignina no bagaço exerceu maior impacto sobre a eficiência de hidrólise enzimática da celulose do que o teor de hemicelulose, uma situação relacionada ao fato da mistura otimizada apresentar capacidade de hidrolisar parte da fração hemicelulósica, de modo a colaborar no processo de hidrólise da celulose, conforme mencionado anteriormente.

Além da eliminação de barreiras como a hemicelulose e a lignina, as mudanças promovidas no complexo celulósico pelos processos de pré-tratamento, a exemplo do aumento da porosidade e da diminuição da cristalinidade, contribuem para o aumento da conversão da celulose (apud KUMAR et al., 2009)

A eficiência da hidrólise enzimática também está sujeita a outros fatores, tal como a carga de sólidos empregada no processo. Estudos têm demonstrado que altas cargas de sólidos provocam redução na eficiência de hidrólise, o que pode ser atribuído a problemas de transferência de massa (KRISTENSEN et al., 2009).

A figura 5.14 apresenta os rendimentos de hidrólise obtidos para diferentes cargas de celulignina parcialmente deslignificada, utilizando a mistura enzimática otimizada com uma carga de proteína total de 10 mg/ g celulose.

Como pode ser observado na figura 5.14, para cargas de sólidos de 100 g/L e de 150 g/L, as eficiências de hidrólise foram, em média, de 78% e 38%, respectivamente. Estes resultados são 14% e 58% inferiores àquele obtido para uma carga de sólidos de 25 g/L. Esta situação pode estar relacionada a problemas de transferência de massa, associados a parâmetros como agitação e viscosidade aparente do material (MODENBACH e NOKES, 2013).

Diversas estratégias têm sido utilizadas para tentar contornar estas dificuldades e uma delas consiste na alimentação de sólidos ao longo da hidrólise (batelada alimentada). Portanto, com o propósito de minimizar os problemas de transferência de massa, foram avaliados dois tipos de condução de hidrólise: batelada simples e batelada alimentada, para uma carga de sólidos de 150 g/L. O resultado comparativo entre estas duas abordagens está exposto na figura 5.15.

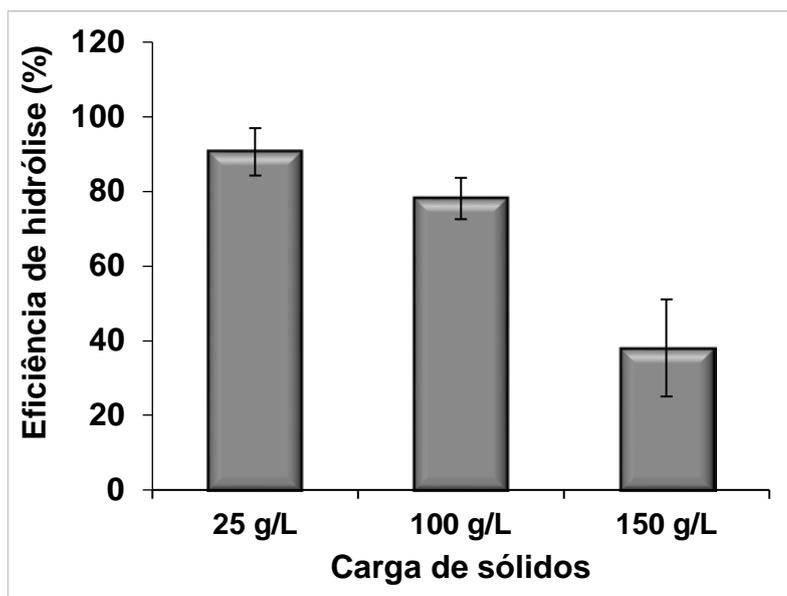


Figura 5.14. Eficiência de hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada para diferentes cargas de sólido, utilizando como carga de proteína de 10 mg/g celulose da mistura otimizada. Condições: pH 5, temperatura 50 °C e tempo de hidrólise de 48 h.

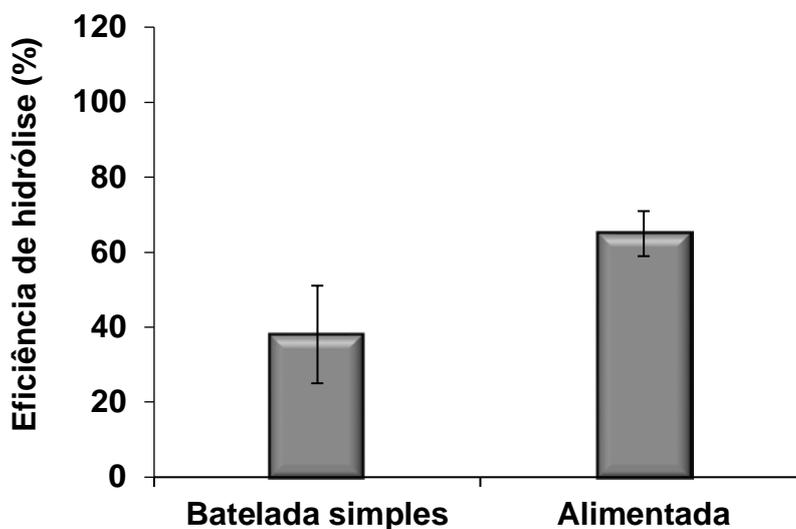


Figura 5.15. Eficiência de hidrólise de celulignina parcialmente deslignificada, utilizando carga de sólidos de 150 g/L, carga de proteína de 10 mg/g celulose da mistura otimizada. Comparação entre processos de batelada simples e batelada alimentada. Condições: pH 5, temperatura 50 °C e tempo de hidrólise de 48 h.

O processo no qual a quantidade de sólidos foi adicionada aos poucos, apresentou, em média, uma melhor eficiência de hidrólise (65%), com resultado em média 71% superior ao da batelada simples. Tal resultado reflete o fato de a batelada alimentada minimizar os problemas de transferência de massa reportados como

problemáticos nos processos de hidrólise com alta carga de sólidos. Tal situação é visível na figura 5.16, em que são exibidos os aspectos dos frascos ao final de ambos os processos de hidrólise (48 h).

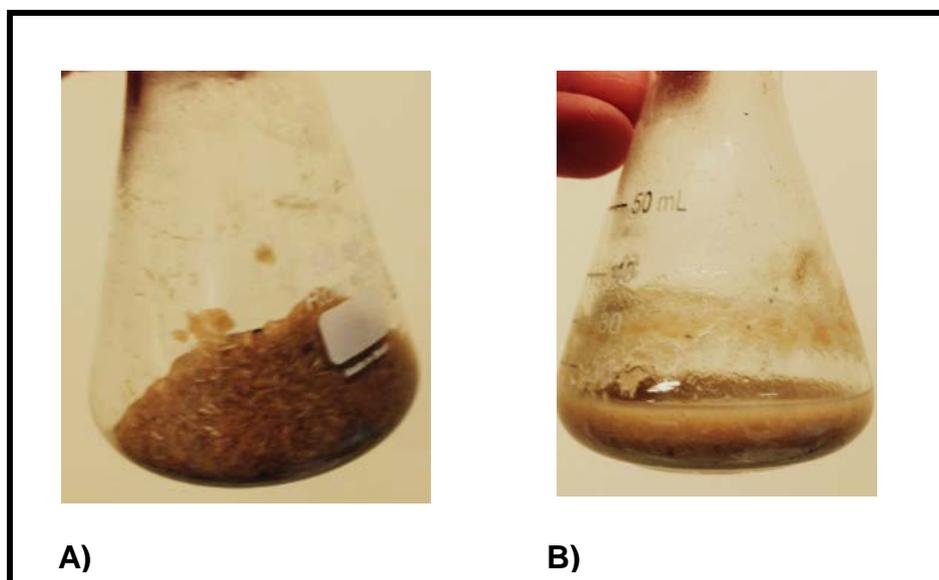


Figura 5.16. Hidrólise de bagaço de cana após 48 h, com carga de sólidos de 150 g/L e carga de proteína de 10 mg/g celulose da mistura otimizada. **A)** hidrólise batelada simples; **B)** hidrólise batelada alimentada.

No entanto, há uma série de fatores relacionados com as baixas eficiências de hidrólise em condições com alta carga de sólidos, além daqueles associados aos problemas de transferência de massa. Dentre estes fatores, destacam-se inibições pelo substrato e pelo produto, diferenças nos parâmetros de adsorção e dessorção das enzimas e inativação das enzimas (MODENBACH e NOKES, 2013).

Outro parâmetro importante a ser considerado é a carga de proteína. Estudos têm indicado que o aumento das eficiências de hidrólise para altas concentrações de sólidos requer elevadas cargas de proteínas (XIAO et al., 2004; VARNAL et al., 2013; RAMOS et al., 2015), o que ocasiona elevação dos custos associados ao aproveitamento de materiais lignocelulósicos. Em algumas situações, aumentos mínimos da carga de proteína poderiam não exercer efeito sobre a liberação de glicose. Por exemplo, na hidrólise de CLPD utilizando 100 g/L de substrato e empregando cargas de proteína de 10 mg/g celulose e de 15 mg/g celulose, foram obtidos resultados sem diferença estatisticamente significativa entre as eficiências de hidrólise enzimática, conforme mostrado na figura 5.17.

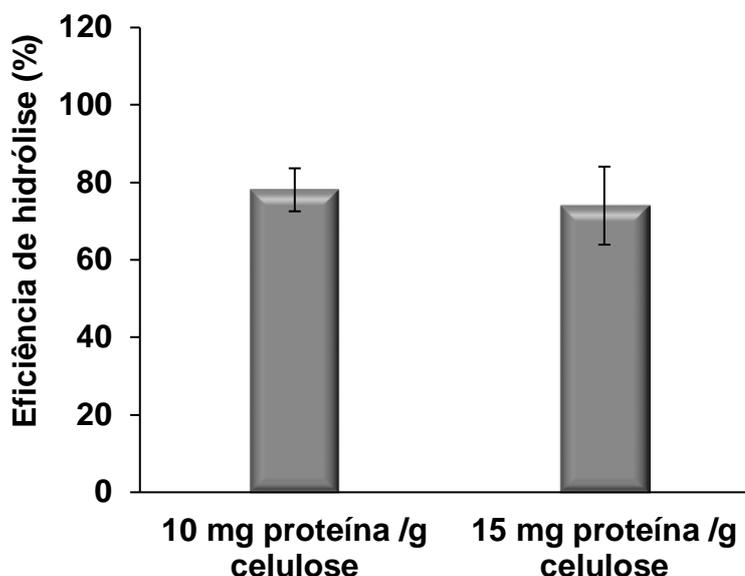


Figura 5. 17. Eficiência de hidrólise de CLPD com diferentes cargas de proteínas da mistura otimizada. (Carga de sólidos 100 g/L; tempo 48 h; temperatura 50°C.).

Um dos grandes desafios consiste no emprego de altas cargas de sólidos, a fim de se aumentar a quantidade de glicose liberada. Neste caso, há uma diminuição na quantidade de água, o que leva à redução dos custos com destilação, caso se pretenda produzir etanol (2G). Deseja-se aliar esta condição a baixas cargas de enzimas e eficientes rendimentos na etapa de sacarificação. Desta forma, busca-se uma ótima relação entre carga de sólidos e carga de proteína, almejando o aproveitamento rentável dessa biomassa.

5.7. Otimização da carga de sólidos e da carga de proteína.

Com o objetivo de empregar a mistura otimizada numa condição de alta carga de sólidos aliada a menor quantidade de enzima, foi realizado um planejamento experimental do tipo composto central rotacional (DCCR). Foram escolhidas como variáveis independentes a carga de sólidos e a carga de proteína, e como variáveis dependentes a quantidade de glicose liberada e a eficiência de hidrólise enzimática (EH) após 48 h.

A tabela 5.9 apresenta a matriz do planejamento e os valores das variáveis de resposta em cada condição.

Tabela 5.9. Matriz do planejamento DCCR e valores das variáveis de resposta obtidos em cada experimento.

Ensaio	Carga de sólidos (g/L)	Carga de proteína (mg/g celulose)	Glicose (g/L)	EH (%)
1	-1 (52)	-1 (11,6)	17,8	46
2	+1 (258)	-1 (11,6)	83,3	43
3	-1 (52)	+1 (43,4)	39,0	100
4	+1 (258)	+1 (43,4)	106,9	56
5	- α (10)	0 (27,5)	4,7	63
6	+ α (300)	0 (27,5)	104,1	47
7	0 (155)	- α (5)	57,4	50
8	0 (155)	+ α (50)	78,9	68
9	0 (155)	0 (27,5)	95,1	82
10	0 (155)	0 (27,5)	83,5	72
11	0 (155)	0 (27,5)	102,4	89

Para ambas as variáveis dependentes a análise estatística apontou o modelo quadrático como o modelo que melhor se ajusta ao fenômeno estudado. As tabelas 5.10 e 5.11 apresentam a análise ANOVA para cada variável de resposta.

Tabela 5.10. Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose.

	SQ	GL	MQ	F calculado	p-valor
Modelo	12259,61	4	3064,90	75,15	<0,0001
A-Carga sólido	9098,43	1	9098,43	223,08	<0,0001
B-Carga proteína	784,69	1	784,69	19,24	0,0044
A ²	2097,31	1	2097,31	51,42	0,0002
B ²	866,66	1	866,66	21,25	0,0024
Residual	244,72	6	40,79		
Lackoffit	62,86	4	15,72	0,17	0,9340
Erro puro	181,85	2	90,93		
Total	12504,33	10			
R ²	0.98				

Tabela 5.11. Análise de variância (ANOVA) para eficiência de hidrólise enzimática.

	SQ	GL	MQ	F calculado	p-valor
Modelo	3168,58	5	633,72	7,54	0,022
A-Carga sólidos	594,70	1	594,7	7,08	0,045
B-Carga proteína	1058,24	1	1058,24	12,59	0,016
AB	419,31	1	419,31	4,99	0,076
A ²	834,91	1	834,91	9,94	0,025
B ²	573,69	1	573,69	6,83	0,047
Residual	420,15	5	84,03		
Lack of fit	283,29	3	94,43	1,38	0,4463
Erro puro	136,86	2	68,43		
Total	3588,73	10			
R ²	0,88				

Observa-se que para ambas variáveis dependentes o modelo é significativo, e a falta de ajuste é não significativa, o que indica que o modelo é apropriado para descrever o fenômeno estudado. Para a variável glicose liberada, o coeficiente de determinação foi de 0,98 indicando que 98% dos resultados de glicose liberada podem ser explicados pelo modelo matemático. Já para a variável eficiência de hidrólise o coeficiente de determinação foi 0,88.

Como mencionado anteriormente, tem sido reportado que processos de hidrólise enzimática conduzidos com altas concentrações de sólidos requerem altas cargas de enzimas para a obtenção de altas concentrações de glicose. No entanto, altas cargas de enzimas podem levar a problemas adicionais, a exemplo de aumento na competição pelos sítios do substrato disponíveis para hidrólise e interferência de enzimas na superfície do substrato (XIAO et al., 2004; VARNAI et al., 2013; RAMOS et al., 2015).

As figuras 5.18 e 5.19 apresentam a superfície de resposta para ambas as variáveis de resposta (glicose liberada e eficiência de hidrólise enzimática).

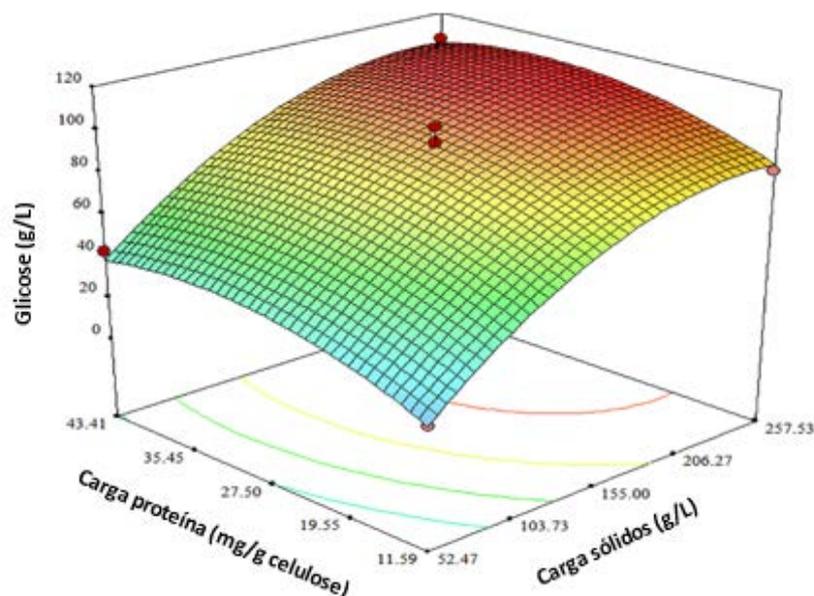


Figura 5.18. Superfície de resposta da **liberação de glicose** em função da carga de sólidos e da carga de proteína.

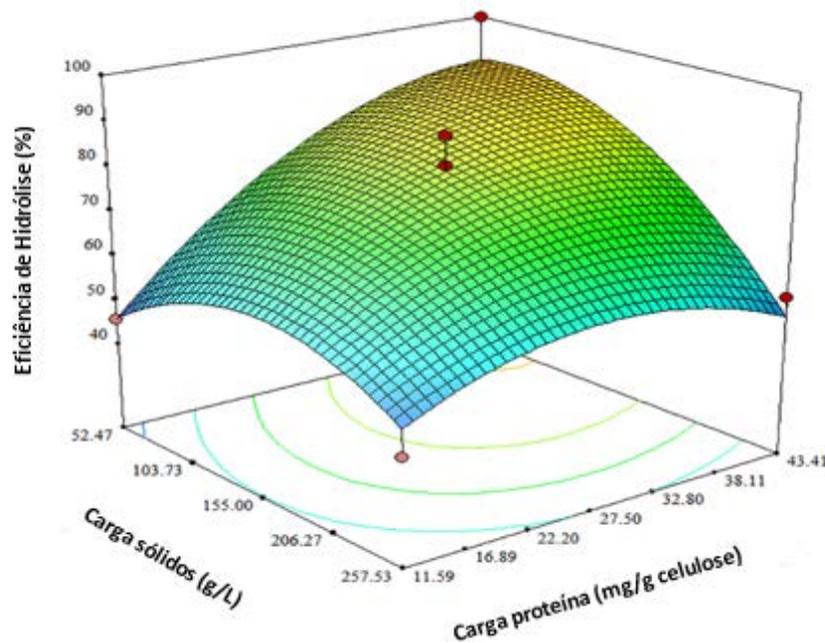


Figura 5.19. Superfície de resposta da **eficiência de hidrólise enzimática** em função da carga de sólidos e da carga de proteína.

Constata-se que uma maior liberação de glicose é alcançada com maiores cargas de sólidos e de proteínas, sendo a carga de sólidos a que mais influência exerce sobre a resposta. Com relação à eficiência de hidrólise, maiores eficiências são obtidas para menores cargas de sólidos, e maiores cargas de proteínas, sendo a carga de proteína a variável independente que mais influencia na resposta.

Baseado no planejamento DCCR, foi otimizada a condição que permitisse aumentar a carga de sólidos e diminuir a carga de proteínas simultaneamente ao aumento de ambas as variáveis de resposta, a liberação de glicose e a eficiência de hidrólise enzimática. A condição otimizada indicada correspondeu a uma carga de sólidos de 196 g/L e a uma carga de proteínas de 24 mg/g de celulose.

Com o propósito de validar o resultado foi realizado o experimento com as condições ótimas indicadas. Foi alcançada uma concentração de glicose de (94 ± 8) g/L, o que corresponde a uma eficiência de hidrólise de $(64 \pm 3)\%$. Estes valores estão dentro dos limites propostos pelo modelo, $(92 \text{ g/L} - 111 \text{ g/L}$ e $61\% - 86\%$, para liberação de glicose e eficiência de hidrólise enzimática, respectivamente) para um intervalo de confiança de 95%.

A figura 5.20 apresenta o perfil de hidrólise na condição com alta carga de sólidos e média carga de proteína, utilizando a mistura enzimática otimizada.

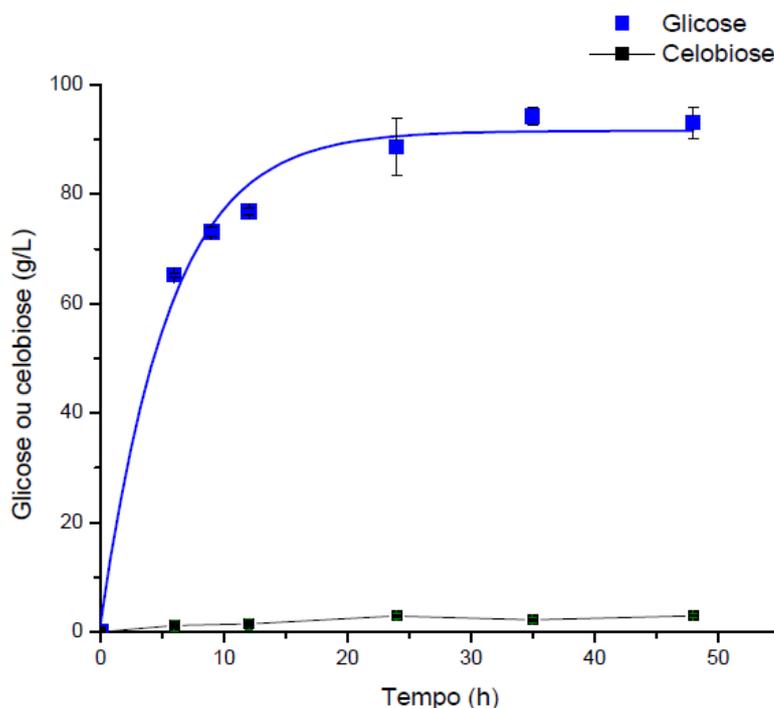


Figura 5.20. Perfil cinético da hidrólise de CLPD com a mistura otimizada. Carga de sólidos (196 g/L) e carga de proteína (24 mg/g celulose)

Percebe-se que com 24h de hidrólise já houve estabilização na liberação de glicose tendo sido alcançada nesse tempo uma liberação de glicose de (92 ± 6) g/L correspondente a uma eficiência de $(63 \pm 4)\%$, resultado sem diferença estatística significativa em relação ao obtido com 48 h. Assim, foi obtida uma produtividade volumétrica de 3,8 g/(L·h) para 24 h, contra 1,96 g/(L·h) para 48 h.

Arantes et al. (2011) estabeleceram que os processos de hidrólise enzimática apresentam três fases: uma fase de liquefação, caracterizada por ser uma fase rápida, na qual as enzimas são adsorvidas e atuam no substrato mais disponível; uma fase intermediária, caracterizada por moderada taxa de hidrólise, na qual cerca de 50%-70% do substrato já foi hidrolisado; e uma terceira fase, caracterizada por ser muito lenta, em que ocorre uma real diminuição da taxa de hidrólise, tornando-se o substrato mais inacessível ou recalcitrante.

O aumento na cristalinidade do substrato poderia afetar a ação das enzimas, uma vez que a estrutura ordenada das microfibras limita o acesso das celulasas.

Inclusive as cadeias podem estar agregadas com tamanha força que impossibilite a penetração das moléculas de água na estrutura, limitando o processo de hidrólise (ARANTES e SADLER, 2010; KASSING, 1993). Além das mudanças nas características do substrato, inatividade das enzimas, diminuição do sinergismo e ligações improdutivas das enzimas podem influenciar no decréscimo da taxa de hidrólise enzimática.

Na figura 5.20 pode ser observada uma rápida degradação do material. Ao final das primeiras 6 horas, o material estava totalmente liquefeito, possível indicativo de um bom sinergismo entre as endoglucanases e celobiohidrolases presentes no preparado enzimático otimizado. Esta hipótese é compatível com o aspecto visual dos frascos nos quais foram conduzidas as hidrólises (Figura 5.21 c).

Conforme mencionado nas seções anteriores, os coquetéis de *T. harzianum* e *P. funiculosus* apresentam diferenças quanto ao balanceamento das principais enzimas degradadoras da celulose. Essas diferenças influenciam nos rendimentos de hidrólise e possivelmente no sinergismo entre as enzimas. A fim de comparar esses preparados com a mistura otimizada, na hidrólise de CLPD utilizando altas cargas sólidos, foi realizado o processo nas mesmas condições previamente otimizadas (196 g/L de carga de sólidos e 24 mg/g celulose de carga proteica), para um tempo de hidrólise de 24 h. A figura 5.21 apresenta uma foto do aspecto dos frascos após 24 h de hidrólise.

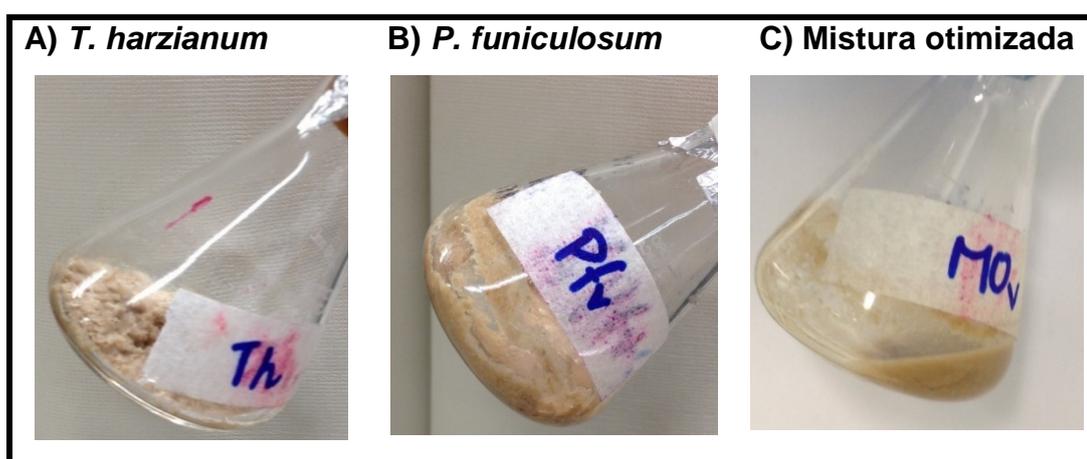


Figura 5.21. Aspecto dos frascos após a hidrólise de CLPD utilizando diferentes coquetéis enzimáticos após 24 h. Carga de sólidos: 196 g/L; Carga de proteína: 24 mg/g celulose.

As figuras permitem constatar a diferença no aspecto do bagaço após 24 h de hidrólise. No caso de *T. harzianum* pode ser observado que o material não foi liquefeito, havendo pequena quantidade de líquido disponível, enquanto no caso de *P. funiculosum* o material foi mais degradado. A completa liquefação, entretanto, só foi observada com o emprego da mistura otimizada. A figura 5.22 apresenta as eficiências de hidrólise obtidas com o coquetel de *P. funiculosum* e a mistura otimizada. No caso do coquetel de *T. harzianum*, uma vez que o bagaço não foi liquefeito, não foi quantificada a glicose liberada.

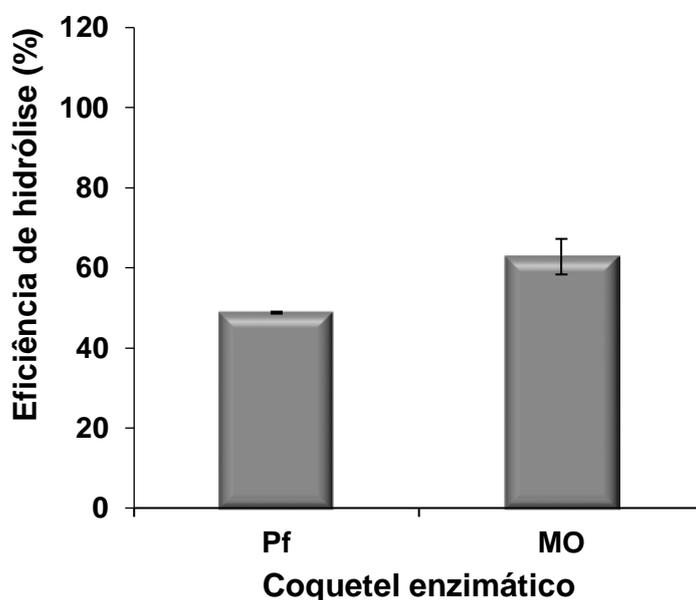


Figura 5.22. Eficiências da hidrólise enzimática de CLPD obtidas com diferentes coquetéis enzimáticos (Pf: *P. funiculosum*; MO: mistura otimizada). Condições: carga de sólidos: 196 g/L e carga proteína: 24 mg/g celulose, tempo de hidrólise de 24 h, temperatura 50°C e pH 5.

Em termos de eficiência de hidrólise a mistura otimizada alcançou, em média, um resultado 29% superior àquele obtido com coquetéis de *P. funiculosum*, demonstrando que também para altas cargas de sólidos a mistura otimizada apresenta uma melhor capacidade catalítica para uma mesma carga proteica. A tabela 5.12 apresenta um resumo dos resultados reportados na literatura para a hidrólise enzimática de diferentes resíduos lignocelulósicos utilizando coquetéis comerciais e/ou combinação deles.

Tabela 5.12. Condições e resultados de eficiências de hidrólise utilizando alta carga de sólidos para diferentes substratos lignocelulósicos

Substrato	Carga de sólidos	Carga enzimática	Enzima	Condições HE	EH (%)	Referência
Bagaço de cana	20% (m/v)	0,1 g /g celulose	<i>Cellic Ctec2</i>	72 h, 50°C, 200 rpm	69	Ramos et al., 2015
Palha de milho	20%(m/m)	12 FPU/g celulose	GC220 Genencor-Danisco	168 h, 48°C, 4 rpm	77	Knutsen e Liberatore, 2010
Biomassa de oliveira	20% (m/v)	15 FPU/g substrato + 15 IU β -glucosidase/g substrato	Celluclast 1,5 L e Novozym 188	72 h, 50°C, 150 rpm	64	Cara et al., 2007
Palha de cevada	15% (m/v)	7 FPU/g sólido + 8,4 IU β -glucosidase/g sólido + 72 U xilanase/g sólido	Celluclast 1.5L, Novozym 188 and NS50013, NS50010, NS50030 (Novozyme)	120 h, 50°C, 150 rpm	59	Garcia-Aparicio et al., 2011
Palha de trigo	20%(m/m)	7 FPU/g substrato + β -glucosidase	Celluclast 1,5 L e Novozym 188	96 h, 50°C, 6,6 rpm	60	Jorgensen et al., 2007b
Bagaço de sorgo	20% (m/v)	30 FPU/g celulose	Imperial Jade Biotechnology Co. Ltd. (China).	72 h, 50°C, 100 rpm	60	Wang et al., 2012
Bagaço de mandioca	20% (m/v)	20 FPU/ g substrato	---	72 h, 50°C	56	Ma et al., 2011
Palha de rapeseed	20% (m/v)	15 FPU/g substrato + 15 IU β -glucosidase/g substrato	<i>Cellic Ctec 3</i>	72 h, 50°C, 150 rpm	64,5	López-Linares et al., 2014
Bagaço de cana	19,6% (m/v)	24 mg/g celulose (eq 21 FPU/g celulose)	MO	24 h, 50°C, 200 rpm	63 \pm 4	Este estudo

MO:Mistura otimizada nesse estudo.

A tabela 5.12 mostra que a eficiência de hidrólise enzimática utilizando a mistura otimizada com altas carga de sólidos, compete com os valores reportados na literatura. No entanto, essas diferenças também podem estar relacionadas ao uso de diversos materiais lignocelulósicas e como previamente comentado na seção 5.6, as eficiências de hidrólise dependem do tipo de material e do pré-tratamento utilizado. Por esta razão foi empregado o coquetel comercial *Cellic Ctec2*[®] para hidrolisar CLPD nas mesmas condições ótimas obtidas no presente estudo para altas cargas de sólidos (196 g/L), 24 mg de proteína/g celulose. A figura 5.23 apresenta os resultados com ambos os coquetéis (MO e *Cellic Ctec2*[®]).

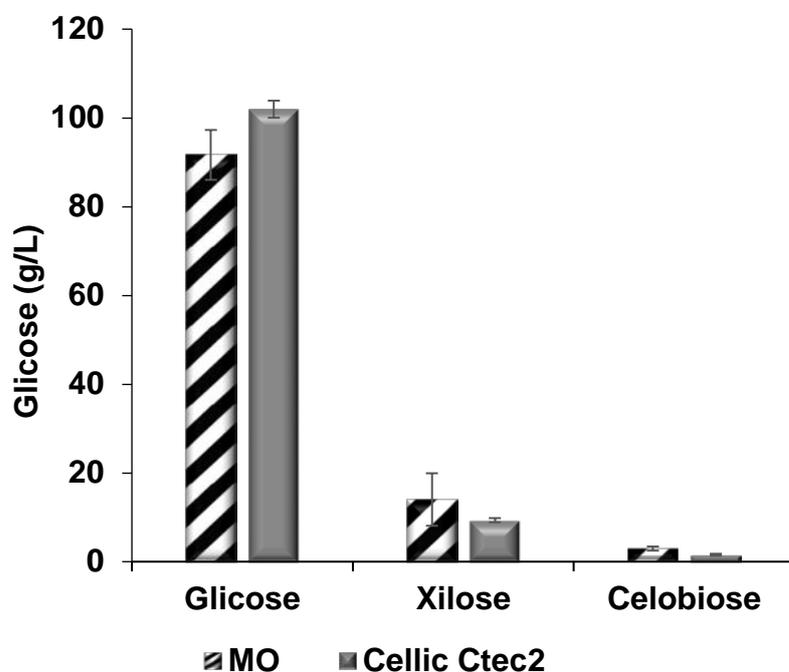


Figura 5.23. Liberação de glicose na hidrólise de CLPD utilizando os coquetéis enzimáticos MO e *Cellic Ctec2*[®], após 24 h. Carga de sólidos: 196 g/L, carga de proteína de 24 mg/g celulose.

Nas mesmas condições, a enzima comercial, obteve eficiência de hidrólise, em relação a liberação de glicose de $(70 \pm 1)\%$, valor somente 11% superior ao alcançado com a mistura otimizada. Com relação à liberação de xilose, não houve diferença estatística significativa entre os dois coquetéis, e ambos promoveram pequeno acúmulo de celobiose, demonstrando que o coquetel obtido nesse trabalho é capaz de competir com os melhores preparados comerciais.

5.8. Fermentabilidade do hidrolisado enzimático de celulose

Com o propósito de avaliar a fermentabilidade da glicose liberada na hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado, nas condições ótimas reportadas anteriormente, foi realizada uma fermentação utilizando a levedura *S. cerevisiae* JP1. O perfil de produção de etanol é apresentado na figura 5.24.

O meio reacional foi suplementado com uréia, KH_2PO_4 , extrato de levedura e solução de sais minerais e inoculado com altas concentrações de célula, em torno de 15 g/L, de forma a permitir uma alta taxa de formação de produto, como observado na figura 5.24.

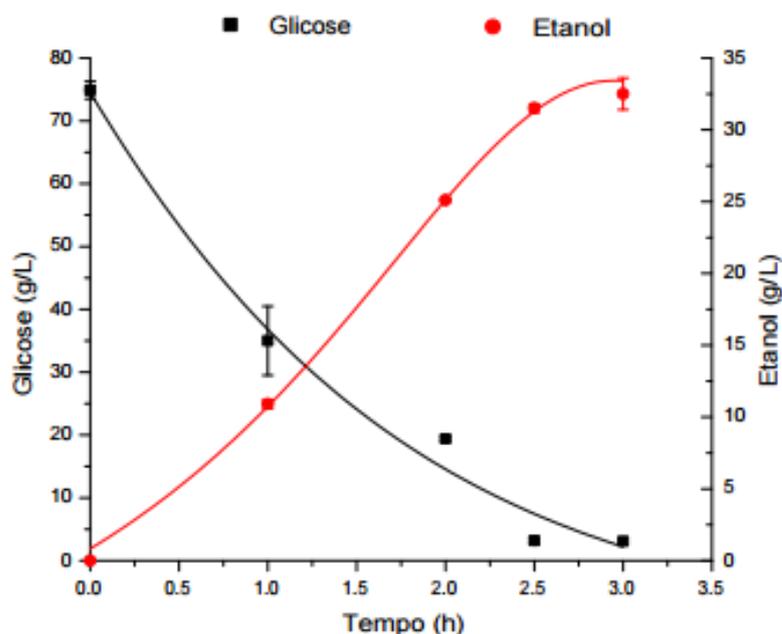


Figura 5.24. Fermentação alcoólica, empregando a levedura industrial *S. cerevisiae* JP1, a partir do hidrolisado de CLPD obtido via hidrólise enzimática utilizando a mistura otimizada.

No final do processo, foi alcançada uma concentração de etanol de 33 g/L, correspondente a uma eficiência de 88,6%, e uma produtividade volumétrica de 10,8 g/(L·h) para a etapa de fermentação. Ao se considerar a etapa de sacarificação, de

24 h, a produtividade volumétrica relativa à formação de etanol no processo SHF foi de 1,19 g/(L·h), valores elevados quando comparados àqueles reportados na literatura (tabela 5.13) para diferentes biomassas lignocelulósicas.

Tabela 5.13. Comparação dos resultados obtidos neste trabalho com a literatura, referentes ao processo de fermentação separada da hidrólise (SHF).

Substrato	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	E.F (%)	Q _P (g/(L·h))	Q _{P(SHF)} (g/(L·h))	Referência
Palha de colza	88 (72 h)	39,9 (24h)	91,6	1,66	0,42	Lopéz-Linares et al. (2014)
Madeira	38 (36 h)	18,5 (16 h)	96,1	1,16	0,36	Gupta et al. (2009)
Bagaço de cana	58 (72 h)	27,1 (12 h)	91,6	2,26	0,32	Neves et al. (2016)
Bagaço de cana	56 (24 h)	23,5 (24 h)	81,6	0,98	0,49	Mesa et al. (2011)
Bagaço de cana	76 (24 h)	33 (3 h)	88,6	11	1,19	Este estudo

Diferentes estratégias têm sido relatadas para a produção de etanol 2G. No presente trabalho optou-se pelo processo de sacarificação e fermentação separadas (SHF). Na primeira etapa, de sacarificação, com altas cargas de sólidos e média carga de proteína, foi empregado um coquetel otimizado a partir de uma mistura de preparados enzimáticos hidrolíticos produzidos *in situ* e induzidos com CLPD. Já no segundo estágio, de fermentação, foi utilizada uma alta concentração de células inicial, tendo sido alcançada uma elevada produtividade volumétrica (11 g/(L·h)).

O processo SHF apresenta vantagens, pois cada uma das etapas (hidrólise e fermentação) pode ser realizada em suas condições ótimas, além de tornar possível o reciclo de células após a fermentação, o que contribui para a redução dos custos globais do processo.

Quando comparado aos processos SSF, estudos têm estabelecido que, neste último caso, aumentos na concentração de inóculo não levam a ganhos na produção de etanol, indicando que a taxa de hidrólise é a etapa limitante, razão pela qual os processos são mais demorados, uma vez que as condições não são ótimas para atuação das enzimas (RUDOLF et al., 2005; OLOFSSON et al., 2008).

Além disso, uma das principais razões apontadas na literatura para a opção pelo processo SSF está vinculada ao fato de que as celulasas sofrem inibição pelos produtos. As β -glucosidases, inibidas pela glicose, provocariam um acúmulo de

celobiose, cujo efeito inibitório sobre as celobiohidrolases tem sido reportado, o que afetaria o sinergismo no processo de hidrólise. Por este motivo, muitos coquetéis enzimáticos são suplementados com β -glucosidase, e dessa forma a técnica de SSF tem sido apontada como estratégia para minimizar os problemas de inibição presentes nas celulases.

No entanto, no caso da etapa de hidrólise enzimática utilizando a mistura otimizada, não foi observado acúmulo de celobiose (< 0,5%) sugerindo que a atividade β -glucosidase não sofreu problemas de inibição pelo produto nessas condições e indicando um bom equilíbrio da mistura enzimática em relação a esta atividade. Conforme descrito anteriormente, a mistura otimizada contém 35% do coquetel de *A. niger*, um preparado com alta atividade β -glucosidásica, sendo a estratégia SHF a mais adequada nessas condições.

5.9. Fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico

No processo de pré-tratamento do bagaço de cana, a primeira etapa envolveu um pré-tratamento com ácido diluído, responsável por solubilizar e hidrolisar parte da fração hemicelulósica, rica em xilose, um açúcar fermentável que pode ser aproveitado para a obtenção de uma série de bioprodutos, a exemplo de ácidos orgânicos e solventes, entre outros. Neste trabalho, o hidrolisado hemicelulósico foi utilizado para produção de etanol.

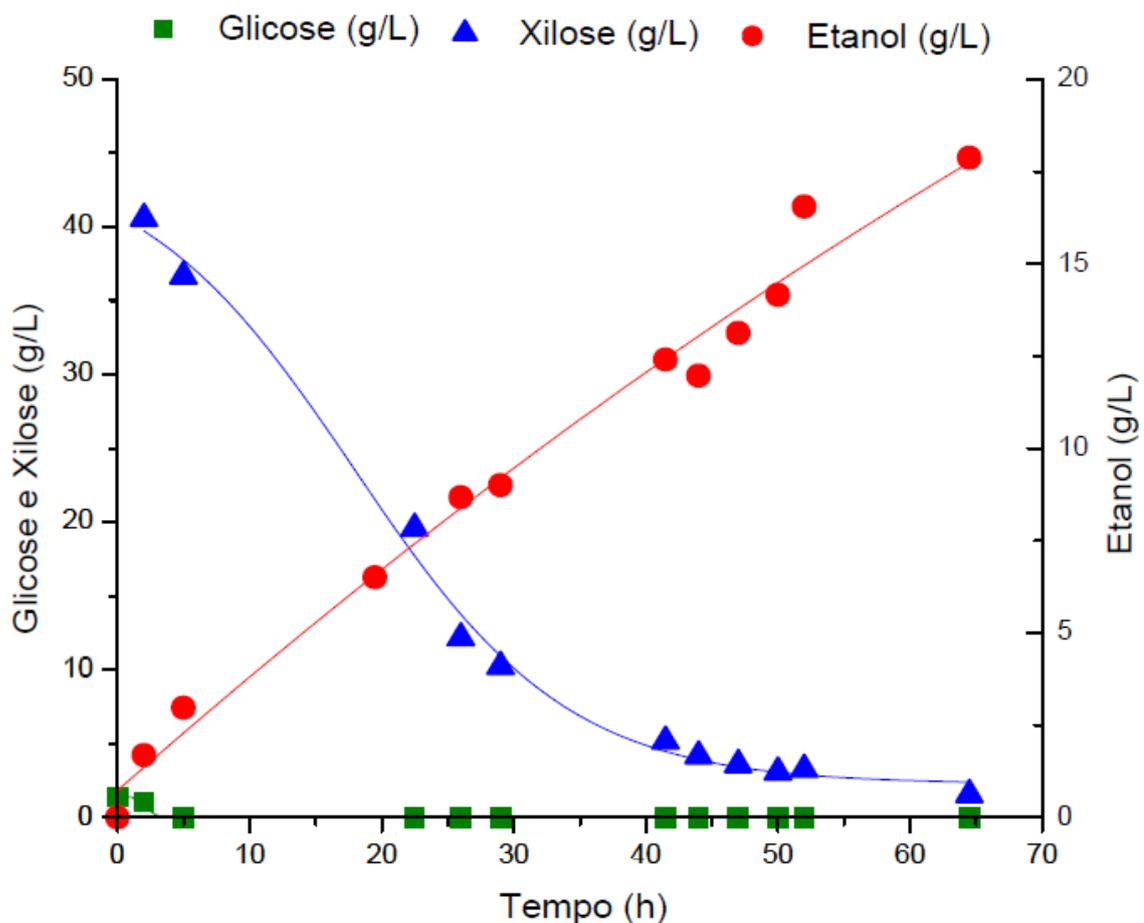
Nos processos de hidrólise ácida, mesmo em condições diluídas, é produzida uma série de componentes que exercem efeito inibitório sobre a etapa de fermentação, principalmente furfural, HMF e ácido acético. De forma a minimizar este efeito, o hidrolisado passou por uma etapa de destoxificação (Tabela 5.14).

O método com carvão ativo mostrou-se eficiente na destoxificação do hidrolisado, principalmente em relação à remoção do furfural e HMF, substâncias que, de acordo com Betancur (2010), diminuem a concentração e a produtividade volumétrica de etanol, bem como a taxa de consumo do substrato.

Tabela 5.14. Composição do hidrolisado hemicelulósico antes e depois de destoxificação com carvão ativo.

Componente	Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico		Eficiência de remoção (%)
	Antes (g/L)	Depois (g/L)	
Glicose	2,32	2,20	5
Xilose e manose	46,48	45,06	3
Ácido Acético	19,28	9,19	52
HMF	0,07	0,00	100
Furfural	0,12	0,00	100

A figura 5.25 apresenta o perfil de produção de etanol a partir do hidrolisado destoxificado, obtido após a primeira etapa de pré-tratamento, utilizando *Scheffersomyces stipitis* CBS5774.

**Figura 5.25.** Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado com carvão ativo, utilizando *Scheffersomyces stipitis* CBS5774.

Scheffersomyces stipitis CBS5774 foi capaz de consumir tanto xilose quanto glicose, sendo alcançada ao final do processo uma concentração de etanol de 18 g/L correspondente a uma eficiência de fermentação de 87% e a uma produtividade de 0,3 g/(L·h).

Os resultados obtidos foram melhores que os apresentados por Camesasca et al. (2015), que reportaram rendimento de fermentação de 66% e produtividade volumétrica de 0,12 g/(L·h) na fermentação de hidrolisado hemicelulósico destoxificado utilizando como matéria prima capim-elefante e empregando *Pichia stipitis* (atual *Scheffersomyces stipitis*) NBRC 10063 como agente fermentativo.

Entretanto, Betancur (2010), que realizou igualmente a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana, obteve 19 g/L de etanol em 40 h de processo, correspondendo a uma produtividade volumétrica de 0,47 g/(L·h). A diferença na produtividade pode estar relacionada à elevada concentração de ácido acético (9 g/L) presente no hidrolisado empregado no atual estudo, superior àquela presente (6 g/L) no hidrolisado utilizado por Betancur (2010).

Bellido et al. (2011) reportaram que rendimentos na produção de etanol decrescem com o aumento da concentração de ácido acético. Adicionalmente, Scordia et al. (2010) relataram que a fermentação do hidrolisado hemicelulósico por *P. stipitis* é inibida principalmente por ácido acético e, em menor medida, pela presença de furfural (apud NJOKU et al., 2013). Estudos apresentados por Ferrarri et al. (1992) relativos à fermentação de hidrolisado de madeira de eucalipto com *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, indicaram que ácido acético foi o principal inibidor do processo, reduzindo o rendimento e as taxas da produção.

O ácido acético é gerado a partir dos grupos acetil presentes na estrutura hemicelulósica, em pH típico de fermentação alcoólica (pH entre 5-6). O ácido acético na forma não dissociada pode difundir-se pelo citoplasma celular, onde, uma vez dissociado, provoca redução do o pH intracelular. Isto aumenta o requerimento energético da célula, assim como é capaz de prejudicar o transporte de nutrientes através da membrana e inibir a ação de várias enzimas da via glicolítica (PAMPULHA e LOUREIRO, 1989; FERRARI et al., 1992; BETANCUR, 2010).

Cabe ressaltar que no presente trabalho a concentração de etanol obtida a partir de fração hemicelulósica representou 56% da obtida a partir da fração

celulósica, indicativo de que o aproveitamento dessa fração pode aumentar os rendimentos da produção de etanol de biomassa lignocelulósica.

5.10. Estudos de sinergismo

5.10.1. Módulos de ligação ao carboidrato (CBM)

Com o propósito de estudar o sinergismo entre os CBMs e a mistura otimizada, foi realizada a hidrólise de CLPD com e sem adição de CBMs. Um destes CBMs foi purificado de uma endoglucanase de *T. harzianum*, enquanto o outro CBM foi purificado de *Bacillus licheniformes*, ambos da família GH5. CBMs foram cedidos pelo Grupo de Biotecnologia Molecular, da Universidade de São Paulo, em São Carlos, coordenado pelo professor Igor Polikarpov. A figura 5.26 exibe o gel de eletroforese dos CBMs utilizados e a figura 5.27 apresenta o grau de sinergismo para estes ensaios em função do tempo de hidrólise.

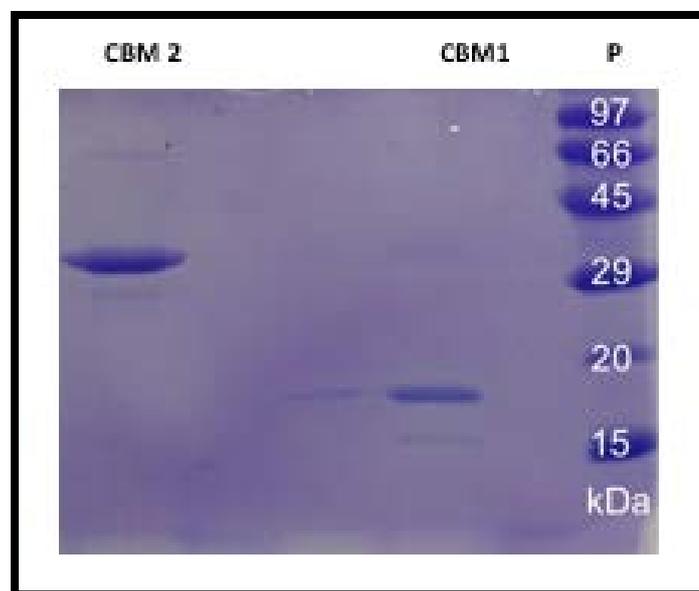


Figura 5.26. Gel de eletroforese dos CMBs+SUMO, CBM1 (endoglucanase de *T. harzianum*) CBM2 (*B. licheniformes*), P (padrão).

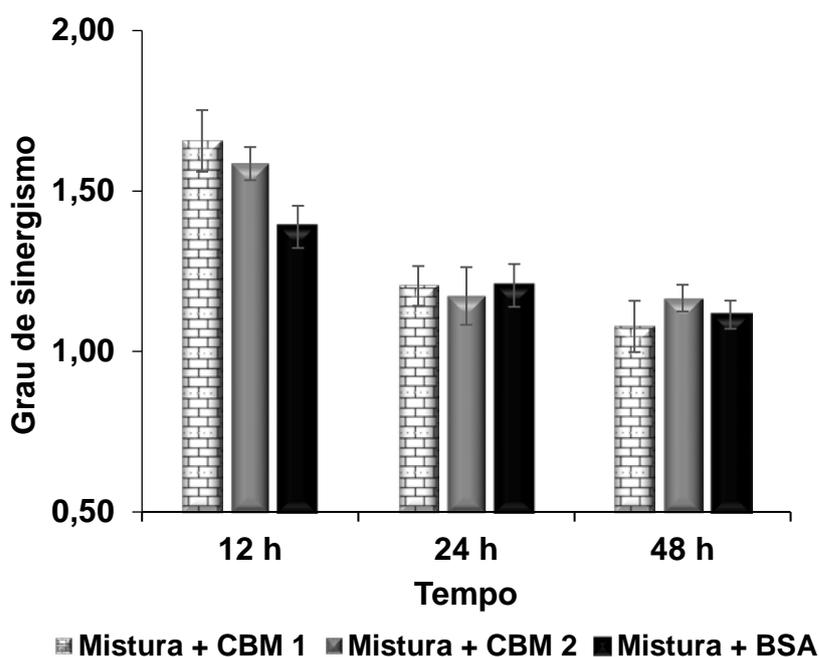


Figura 5.27. Grau de sinergismo entre a mistura otimizada e CBMs purificados (CBM1: CBM de *T. harzianum*; CBM2: CBM de *B. licheniformes*) em função do tempo. Condições: carga de sólidos: 25 g/L e carga da MO: 7,5 mg/g celulose. MO e CBMs numa relação de 1:1 (m:m)

Na figura 5.27 pode ser observado que o grau de sinergismo reduziu ao longo do tempo. Durante as primeiras horas, o grau de sinergismo com os CBMs foi maior (1,66 CBM1 e 1,59 CBM2) do que o obtido com BSA (1,39), utilizado como controle. Contudo, em 24 h e 48 h, os graus de sinergismo do coquetel enzimático tanto com os CBMs como com BSA foram similares, próximos a 1,20 para 24 h e 1,10 para 48h.

Os CBMs apresentam como uma das suas principais funções o reconhecimento e a aproximação das celulasas ao substrato, o que facilita o processo de hidrólise enzimática. Além disso, estudos têm indicado que esses módulos podem contribuir para a amorfogênese da fibra celulósica, em que a sua adsorção à celulose permite a solvatação das fibras, favorecendo a ação das celulasas (BORASTON et al., 2004; ARANTES e SANDLER, 2010; LE COSTAOUËC et al., 2013). Este processo ocorre principalmente nas primeiras horas de hidrólise, o que poderia justificar os maiores graus de sinergismo constatados nas primeiras 12 h. No decorrer da hidrólise, no entanto, esse efeito é menos significativo e, conseqüentemente, o grau de sinergismo é reduzido.

Outro fator importante a ser considerado é que os CBMs também têm sido apontados como os principais responsáveis por ligações improdutivas das celulases com a lignina. Por exemplo, CBMs do tipo A, da família 1, característicos das endoglucanases de fungos, apresentam uma estrutura planar hidrofóbica que interage com a lignina, principalmente os resíduos aromáticos tirosina e triptofano. Dependendo do pH do meio, interações eletrostáticas com a lignina também podem ocorrer (SAINI et al., 2016; RAHIKAINEN et al., 2013). Portanto, no decorrer do processo de hidrólise, com a maior parte da celulose tendo sido hidrolisada, há aumento da proporção de lignina e, possivelmente, um aumento das ligações improdutivas das enzimas. Nesse sentido, os CBMs poderiam atuar como proteínas responsáveis pela redução dessas ligações, agindo em sinergismo com o coquetel enzimático. BSA, empregado como controle, também tem sido utilizado por vários pesquisadores com o objetivo de diminuir essas ligações improdutivas das enzimas e, assim, aumentar as eficiências de hidrólise (BRETHAUER et al., 2011; KUMAR e WYMAN, 2009a; YANGA e WYMAN, 2006),

Dessa forma, estes fatores (amorfogênese e redução das ligações improdutivas) podem contribuir de forma positiva para o processo de hidrólise, influenciando no sinergismo com o coquetel enzimático.

Rahikainen et al. (2013) realizaram estudos com celulases e CBMs recombinantes, modificando os resíduos aromáticos expostos com o propósito de alterar a hidrofobicidade do módulo de ligação. Concluíram que os mesmos resíduos aromáticos que interagem com a lignina interagem também com a celulose, motivo pelo qual não necessariamente a deleção desses módulos eliminaria as ligações improdutivas e aumentaria as eficiências de hidrólise. O efeito exercido pelos CBMs é mais proeminente em condições diluídas de hidrólise (LE COSTAOUËC et al., 2013).

Os resultados também mostram que além do sinergismo entre o coquetel enzimático (MO) e o CBM de fungo, existe sinergismo com o CBM bacteriano. Conforme reportado por Din et al. (1998), cujo trabalho avaliou o efeito de CBMs bacterianos na fibra de rami, concluindo que esses CBMs ajudam no processo de afrouxamento e rompimento das fibras de celulose.

No entanto, ao se empregar resíduo da indústria de papel como substrato, a adição de CBMs não promoveu alterações na eficiência de hidrólise, conforme apresentado na figura 5.28.

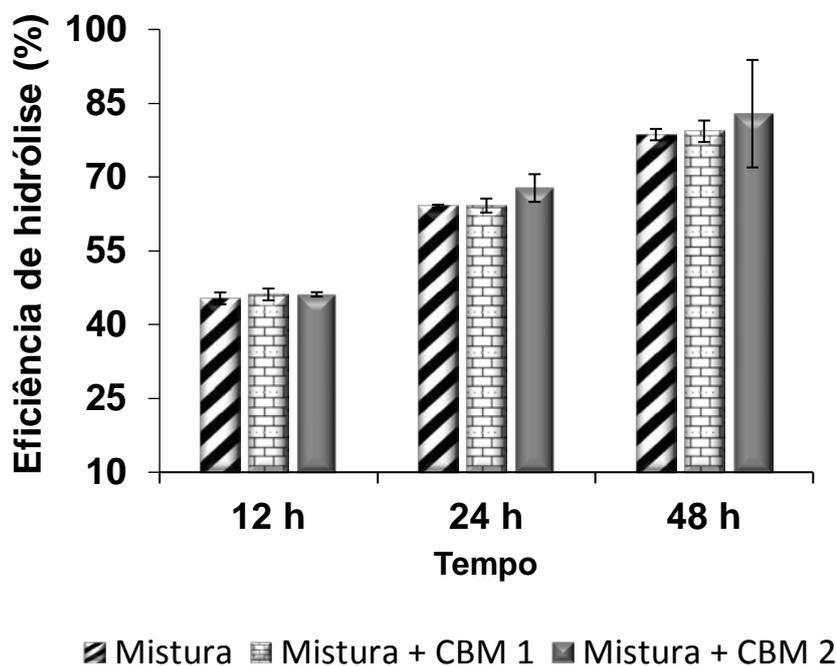


Figura 5.28. Eficiências da hidrólise enzimática de resíduo da indústria de papel com a mistura otimizada com e sem adição de CBM purificado (CBM1: CBM de *T. harzianum*; CBM2: CBM de *B. licheniformes*) em função do tempo. Condições: carga de sólidos: 25 g/L e carga da MO: 7,5 mg/g celulose. MO e CBMs numa relação de 1:1 (m:m).

Os resultados indicam que os efeitos sinérgicos da adição de CBMs podem variar em função do tipo de material, assim como em relação à carga enzimática utilizada, de acordo com o indicado por Mello e Polikarpov (2011). A não observação de sinergismo, no presente estudo, quando do emprego de resíduo da indústria de papel, pode estar relacionada ao fato de, neste caso, a celulose estar mais acessível (composição do resíduo da indústria de papel: celulose: 80,9%, hemicelulose: 16,2%, lignina: 1,7% (SILVA, 2010)), o que torna a fase inicial de hidrólise mais rápida quando comparada àquela de materiais lignocelulósicos. Além disso, é possível que o efeito de afrouxamento da celulose tenha ocorrido antes das 12 h de processo.

Os resultados indicam que os CBMs isolados podem ser utilizados numa etapa prévia, num estágio de “preparação” da biomassa, de forma a diminuir os tempos de hidrólise, facilitando o acesso das celulasas. Assim, no caso de materiais lignocelulósicos, vantagens econômicas no aproveitamento destes resíduos poderiam ser alcançadas.

A figura 5.29 mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura de bagaço de cana antes e após ser incubado com CBM.

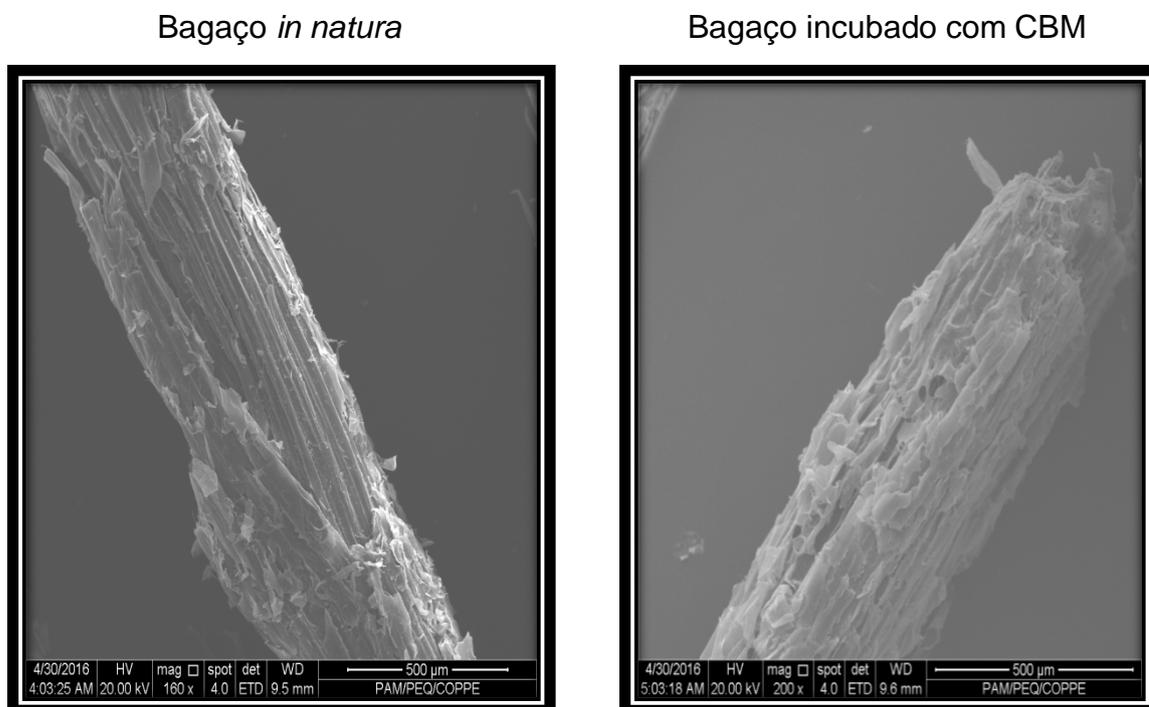


Figura 5.29. Microscopia eletrônica de varredura do efeito de CBM na fibra de bagaço de cana.

Percebe-se que o CBM promoveu uma espécie de delaminação ou desfibrilação do substrato, indicando que esses módulos podem promover mudanças da superfície do substrato, o que pode facilitar o acesso das enzimas ao substrato.

5.10.2. Swolenina

A swolenina (Sw) de *T. harzianum*, foi expressa de forma recombinante por *A. niger* como parte de uma tese de doutorado do LADEBIO (ROCHA, 2014). Para a sua aplicação (continuidade do trabalho) a produção foi realizada segundo os parâmetros estabelecidos nessa tese (ROCHA, 2014). O extrato bruto foi concentrado, sendo alcançado ao final do processo uma concentração de proteína de 2,08 mg/L. Posteriormente foi feito um gel de eletroforese (figura 5.30) a fim de comprovar que a proteína expressada apresentasse uma massa molar em conformidade com aquela reportada por Rocha (2014).

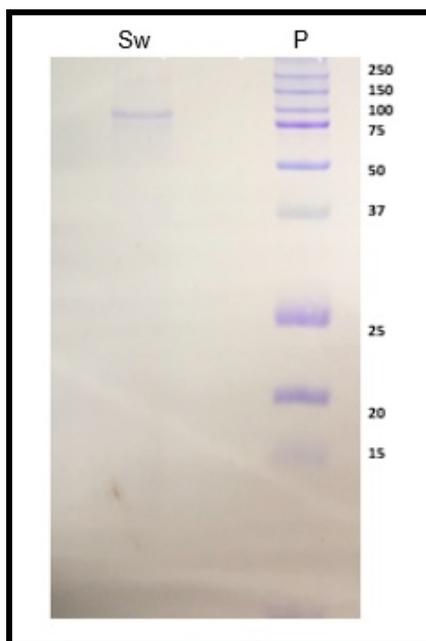


Figura 5.30. Gel de eletroforese da swolenina recombinante de *T. harzianum* expressada por *A. niger* (Sw), *P* (padrão).

A partir da visualização do gel pode ser observada uma única banda, aproximadamente em 100 KDa, valor de massa molar que concorda com o indicado por Rocha (2014).

A swolenina é uma proteína não hidrolítica, que tem sido alvo de recentes estudos envolvendo os processos de hidrólise enzimática, tendo sido apontados sua capacidade para atuar na amorfogênese da celulose e o auxílio na ação das enzimas hidrolíticas (ARANTES e SADDLER, 2010; JÄGER et al., 2011; GOURLAY et al., 2015; KANG et al., 2013).

Buscando avaliar o sinergismo entre essa proteína e a mistura otimizada, foi realizada a hidrólise de CLPD (25 g/L) com 7,5 mg/g celulose do preparado otimizado, com e sem adição de Sw numa proporção de 1:1 em relação à carga proteica do coquetel enzimático adicionada. A figura 5.31 apresenta o grau de sinergismo entre a mistura otimizada e a Sw, em função do tempo, tanto para glicose como para xilose.

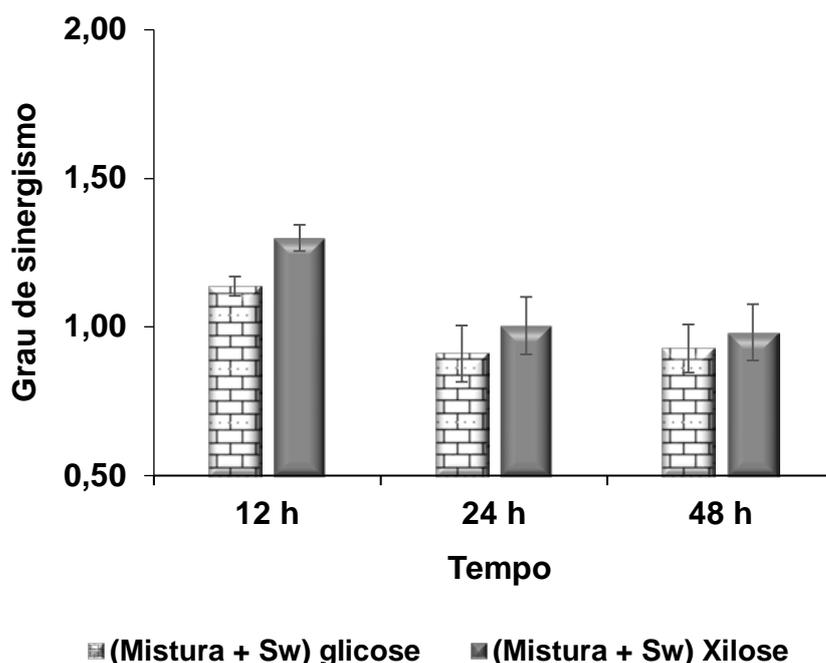


Figura 5.31. Grau de sinergismo entre a mistura otimizada e Sw (Relação de 1:1 em concentração proteica) em função do tempo. Condições: carga de sólidos: 25 g/L e carga proteína: 7,5 mg/g celulose.

Observa-se que a swolenina conferiu um grau de sinergismo de 1,14 para 12 h de hidrólise com a mistura otimizada, em relação à liberação de glicose, e de 1,30 em relação à liberação de xilose. Entretanto, para 24 h e 48 h não foi constatado sinergismo com a mistura otimizada.

Gourlay et al. (2013), avaliando a hidrólise de bagaço de milho pré-tratado com explosão a vapor, reportaram que swoleninas atuam mais em sinergismo com endoxilanasas das famílias 10 e 11 alcançando incrementos de até 3 vezes. Esses estudos têm indicado que a swolenina atua mais nas irregularidades das fibras, principalmente nas regiões mais amorfas, e também ajudam na solubilização da fração hemicelulósica, permitindo o acesso das hemicelulases. Esta situação está de acordo, tendo em vista que foram obtidos maiores graus de sinergismo com a mistura otimizada na liberação de xilose do que de glicose (GOURLAY et al., 2015).

No caso da atuação da swolenina (Sw) com a mistura otimizada, o baixo grau de sinergismo em relação à liberação de glicose (1,14) pode estar relacionado ao fato que a swolenina, conforme descrições da literatura científica, atua mais nas regiões amorfas, ajudando na etapa de liquefação. Neste caso, porém, em virtude da elevada proporção de atividade endoglucanase apresentada pela mistura otimizada, o auxílio

da swolenina pode ser imperceptível nas condições estudadas, sendo sua atuação mais pronunciada no caso da liberação de xilose, consequência da capacidade da swolenina de promover a amorfogênese da fração hemicelulósica. Embora durante as primeiras horas tenha havido um maior acesso das celulasas à fibra da celulose, o sinergismo diminuiu ao longo do tempo com o aumento da cristalinidade e da recalcitrância do material.

A figura 5.32 apresenta uma comparação entre o bagaço de cana *in natura* e o incubado com swolenina de *T. harzianum*. É possível observar o efeito da atuação da swolenina na fibra do bagaço, havendo espécie de delaminação na superfície, bem como um inchaço das fibras.

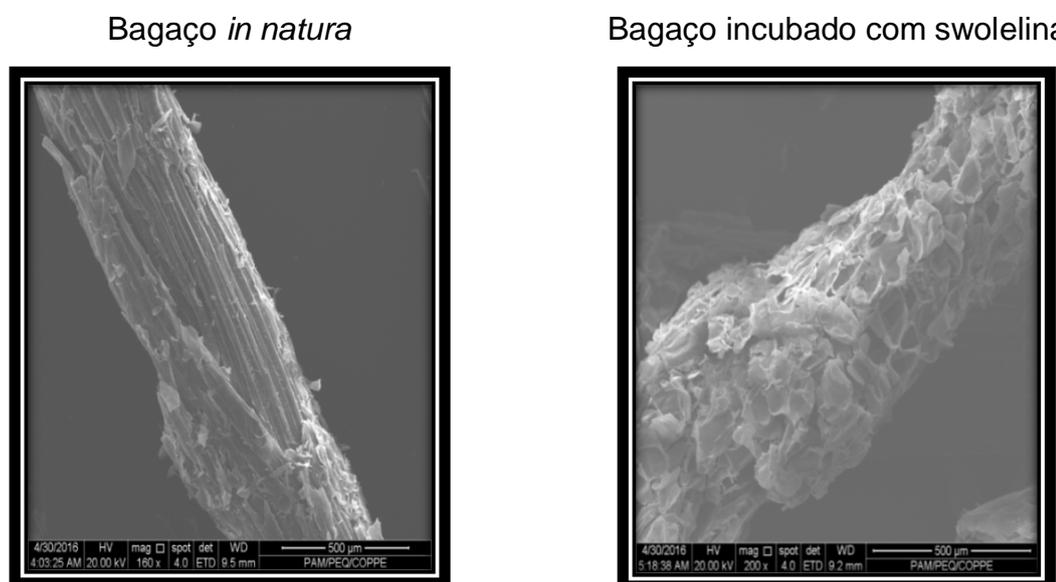


Figura 5.32. Microscopia eletrônica de varredura do efeito de adição da swolenina na fibra de bagaço de cana.

Kang et al. (2013) avaliaram o efeito da adição de swolenina de *Penicillium xalicum* na hidrólise de celulose, obtendo aumentos de 51,5%, após 48 h, na eficiência de hidrólise de Avicel, quando incubados com 3 μ g de swolenina. No entanto, ao se aumentar a carga de swolenina para 10 μ g, o incremento da eficiência foi de 47,4%, indicando não haver uma relação linear entre a quantidade de swolenina adicionada e os aumentos na eficiência de hidrólise e sugerindo que o excesso de swolenina poderia inibir a interação entre esta proteína e as celulasas.

No presente trabalho, foi utilizado 7,5 mg de swolenina/g celulose que corresponde a 0,12 mg de swolenina. A não observação de sinergismo pode estar relacionada com a proporção de swolenina empregada. Talvez menores

concentrações pudessem contribuir mais eficientemente no processo de hidrólise de materiais lignocelulósicos. Outra possibilidade seria a adição de swolenina numa etapa prévia à hidrólise, sendo, porém, necessária a retirada desta proteína antes da aplicação das celulasas, como exposto por Kang et al. (2013).

Estes estudos também estão sendo conduzidos no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos, LADEBIO, constituindo-se em assunto de uma tese de doutorado.

5.10.3. Concentrado enzimático de *Myceliophthora thermophila*

Recentemente, a análise genômica de *M. thermophila* evidenciou a capacidade hidrolítica do fungo como um promissor secretor de enzimas termoestáveis (BERKA et al., 2011). Esse fungo também possui genes para produzir monooxigenases AA9 (ŽIFČAKOVA E BALDRIAN, 2012; MONGENSTERN et al., 2014), proteínas acessórias que auxiliam na hidrólise da celulose mediante mecanismo oxidativo.

A produção de proteína utilizando *M. thermophila* está sendo desenvolvida pelo LADEBIO (atualmente são produzidos 10 g/L de proteína em 60 h). Com o propósito de avaliar o efeito da adição do concentrado de *M. thermophila* (MT), na mistura otimizada (MO), foi determinada a liberação de glicose na hidrólise de CLPD (25 g/L) utilizando 7,5 mg/g celulose de carga enzimática ((3,75 mg MO + 3,75 mg MT)/ g celulose). A concentração de glicose liberada com a mistura enzimática otimizada e o concentrado enzimático de *M. thermophila* individualmente, nas proporções utilizadas na mistura (3,75 mg/g celulose cada um), também foi quantificada com o objetivo de aferir o sinergismo entre os concentrados.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando a mistura otimizada na mesma quantidade da mistura dos concentrados MO e MT (7,5 mg/g celulose). Os resultados são apresentados na figura 5.33.

Nas condições estudadas, o preparado enzimático contendo *M. thermophila* e a mistura otimizada na proporção de 1:1 apresentou uma eficiência de hidrólise de (75 ± 5) %, resultado sem diferença estatística significativa à obtida quando do emprego apenas da mistura otimizada, cuja eficiência, para a mesma carga enzimática, foi de (82 ± 2)%. Porém, uma vez analisadas as concentrações de glicose alcançadas para este mesmo preparado, foi observado um grau de sinergismo de 1,20 ao final de 48

h. Isto pode estar relacionado à possibilidade da presença de monooxigenases no concentrado ou à estabilidade térmica das enzimas secretadas. Entretanto, devem ser estudadas mais detalhadamente as atividades enzimáticas e oxidativas presentes nesse concentrado, bem como a termo-estabilidade das enzimas produzidas por esse fungo filamentoso, com a finalidade de melhor compreender a colaboração entre os preparados.

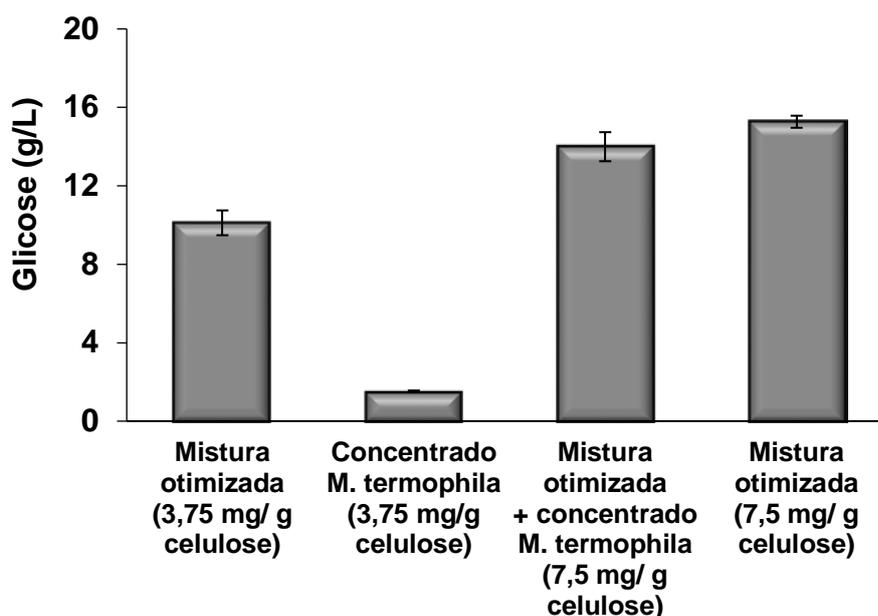


Figura 5.33. Glicose liberada na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado, utilizando mistura otimizada de *T. harzianum*, *P. funiculosum* e *A. niger* com e sem adição do concentrado enzimático de *M. termophila*. Carga de sólidos: 2,5%, temperatura: 50 °C, carga enzimática exibida no gráfico.

Estes estudos também estão sendo conduzidos no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos, LADEBIO, constituindo-se em assunto de uma tese de doutorado.

5.10.4. Aditivos/ surfactantes

Com o objetivo de estudar o efeito da adição de surfactantes na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado, foram realizadas diversas hidrólises enzimáticas de celulignina (CL) e celulignina parcialmente deslignificada (CLPD), avaliando a

influência de PEG 4000 e BSA na conversão de celulose, a 50°C e pH igual a 5 por 48h. Foi empregada uma carga enzimática de (7,5 e 20) mg/ g celulose e duas distintas cargas de sólidos, de 25 g/L e 100 g/L, com uma suplementação de PEG e BSA numa proporção de 1:1 em relação à carga enzimática.

A figura 5.34 apresenta a liberação de glicose nas hidrólises de CL e CLPD, utilizando o coquetel enzimático de *T. harzianum* e *P. funiculosus*, com e sem adição dos aditivos (PEG 4000 e BSA), numa proporção de 1:1 em relação à carga enzimática.

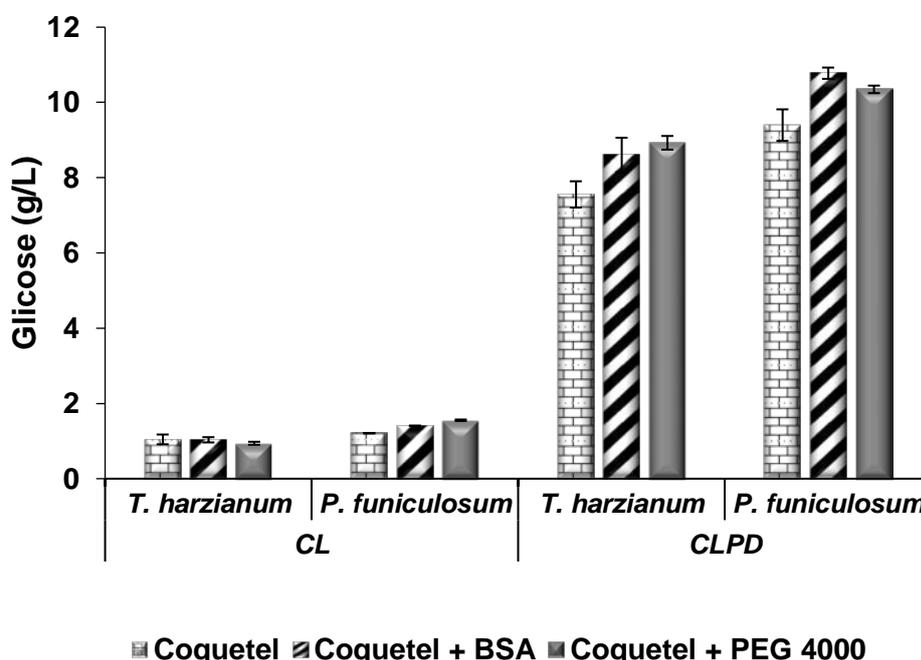


Figure 5.34. Liberação de glicose após hidrólise enzimática de bagaço de cana (celulignina e PDCL), utilizando diferentes coquetéis enzimáticos (*T. harzianum* e *P. Funiculosum*) com e sem adição de PEG 4000 e BSA. Carga de sólidos: 25 g/L; carga do coquetel enzimático: 7,5 mg/g celulose.

Na hidrólise de CL utilizando celulasas de *T. harzianum*, não foram observados aumentos na liberação de glicose quando da adição de BSA e PEG 4000, em relação ao controle (coquetel enzimático). Efeitos positivos desses aditivos somente foram verificados na hidrólise de CLPD, tendo sido promovidos incrementos de 14% e 18%, respectivamente. Porém, utilizando o coquetel de *P. funiculosus*, foi constatado um efeito positivo na hidrólise dos dois substratos (CL e CLPD) uma vez adicionados estes suplementos. Nestes casos, em relação à liberação de glicose, foram obtidos

aumentos de 16% e 28% com CL e de 15% e 10% para CLPD, utilizando BSA e PEG 4000, respectivamente.

A diferença entre estes resultados pode estar relacionada com as distintas composições dos coquetéis utilizados, e ao sinergismo entre esses componentes no processo de hidrólise. Estudos indicam que o uso desses aditivos influencia na adsorção de celobiohidrolases e endoglucanases, aumentando a quantidade de enzima livre, o que possivelmente aumentaria o sinergismo entre as enzimas e, conseqüentemente, a liberação de açúcares (BRETHAUER et al., 2011; PALONEN et al., 2004; OOSHIMA et al., 1986, SIPO et al., 2010, CHIA-WEN et al., 2015). Palonen et al. (2004), por exemplo, determinaram que na presença de BSA a quantidade de enzima celobiohidrolase CBHI livre aumentou de 21% para 47%.

Com o emprego da mistura otimizada (resultados apresentados na tabela 5.15) foram alcançados incrementos de 17% e 21% com CL, e de 12% e 8% com CLPD, adicionados BSA e PEG 4000, respectivamente. Estes incrementos são similares àqueles obtidos com o coquetel de *P. funiculosum*.

Tabela 5.15. Liberação de glicose com a mistura otimizada na hidrólise de CL e CLPD, como e sem adição de PEG 4000 e BSA. Após 48 h.

Substrato	Coquetel	Glicose (g/L)
CL	MO	1,44 ± 0,2
	MO+ BSA	1,69 ± 0,1
	MO+PEG4000	1,74 ± 0,1
CLPD	MO	14,88 ± 0,4
	MO+ BSA	16,66 ± 0,5
	MO + PEG 4000	16,15 ± 0,6

Uma vez que a mistura otimizada contém 50% de *P. funiculosum*, com atividade CMCásica e Avicelásica similares, mas apresentando diferenças principalmente na atividade β -glucosidase, o resultado sugere que o sinergismo com esses aditivos está mais relacionado à interação com endoglucanases e celobiohidrolases do que com as β -glucosidases.

Além disso, esses aditivos também têm sido apontados como responsáveis pela redução das ligações improdutivas com a lignina e pelo aumento da estabilidade térmica das enzimas (BRETHAUER et al., 2011; CHIA-WEN et al., 2015).

Börjesson et al. (2007) verificaram que a adsorção de Cel 7A (CBHI) e Cel 7B (EGI) na lignina foi reduzida em presença de PEG, com efeito mais pronunciado para endoglucanase. Martín-Sampedro et al. (2013) concluíram que EGI de *T. reesei* apresenta mais afinidade pela lignina do que CBHI, razão pela qual os efeitos de surfactantes podem ser mais proeminentes no caso das endoglucanases. Por outro lado, Saini et al. (2016) relatam que β -glucosidase de *T. reesei* é fortemente adsorvida na lignina, enquanto β -glucosidases de outras fontes microbianas, a exemplo de *A. niger*, não experimentam efeito de inibição significativo.

Considerando que a carga de proteína foi padronizada em mg de proteína/ g celulose, e que CL e CLPD apresentam diferentes porcentagens de celulose, as diferenças na liberação de glicose poderiam estar relacionadas justamente às diferenças na quantidade de enzima adicionada. Portanto, foi realizada a hidrólise de CL empregando enzimas de *T. harzianum* na mesma quantidade de proteína que foi adicionada à CLPD. A comparação entre os resultados é exibida na tabela 5.16. No caso de CL, em que anteriormente não foi verificado sinergismo com BSA e PEG, foram constatados aumentos de 15% e 17%, respectivamente, indicando que existe uma relação entre a quantidade de enzimas e os efeitos dos surfactantes. Para uma mesma quantidade de enzima utilizada, os melhores resultados de liberação de glicose foram alcançados com CLPD.

Tabela 5.16. Eficiência de hidrólise enzimática de diferentes materiais, utilizando *T. harzianum*. Carga de proteína: 7,5 mg/g celulose. Considerando teor de celulose de 47,8% para CL e de 67,1% para CLPD e CL*

Substrato	Eficiência de hidrólise enzimática % (EH)		
	Coquetel	Coquetel + BSA	Coquetel + PEG 4000
CL	7,99 ± 0,6	7,91 ± 0,3	7,20 ± 0,2
CL*	25,31 ± 0,3	29,15 ± 1,9	29,64 ± 0,3
CLPD	40,60 ± 1,1	46,20 ± 1,4	48,00 ± 0,6

CL*: Carga de proteína igual à utilizada com CLPD

Apesar dos estudos prévios terem reportado o uso de aditivos como estratégia para reduzir ligações improdutivas das enzimas e aumentar os rendimentos de hidrólise, os problemas relacionados com a presença de lignina não só estão relacionados à inativação das enzimas, mas também à barreira física, representada por este componente, para o acesso das enzimas à celulose. Por esta razão, na

hidrólise de CLPD, com a adição de BSA e de PEG, aditivos que interagem com a lignina residual, foram liberadas maiores concentrações de glicose. Estes resultados enfatizam a importância da deslignificação e dos processos de pré-tratamento, como observado também na seção 5.6.

5.10.4.1 Efeito de aditivos em relação à carga de sólidos

Com o propósito de avaliar o efeito de aditivos (PEG 4000 e BSA) em relação à carga de sólidos, foi realizada a hidrólise enzimática de CLPD com duas diferentes cargas de sólidos (25 g/l e 100 g/L), utilizando o coquetel de *T. harzianum*. A figura 5.35 apresenta a liberação de glicose e a eficiência de hidrólise após 48 h.

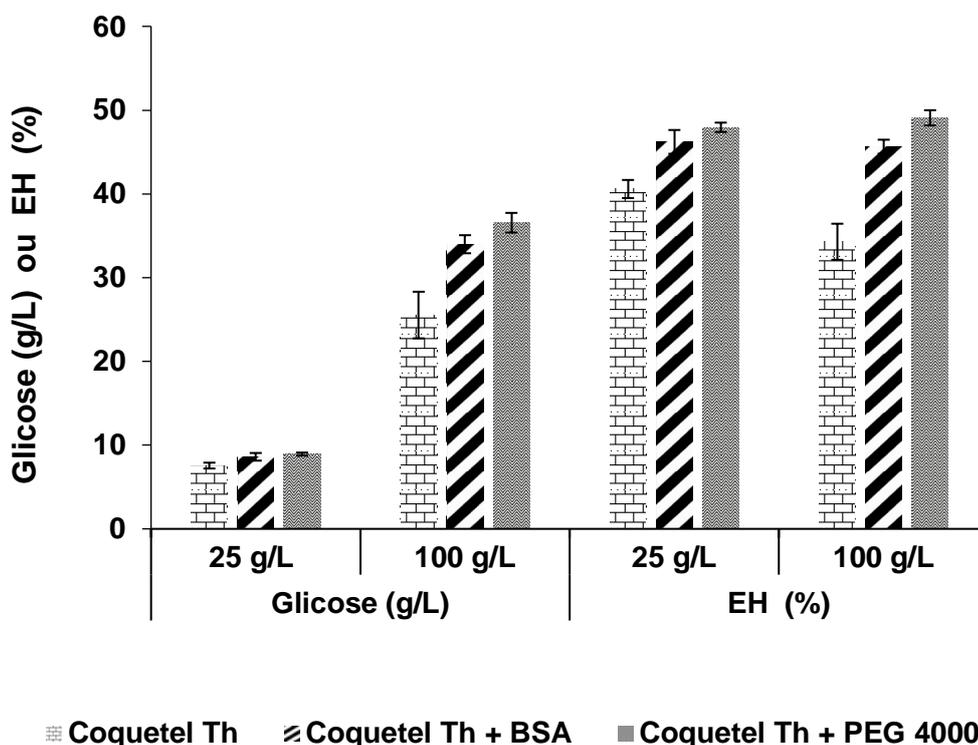


Figure 5.35. Liberação de glicose e eficiência após 48 h de hidrólise enzimática de CLPD. Cargas de sólidos: 25 g/L e 100 g/L, carga de proteína de 7,5 mg/ de celulose (*T. harzianum*), com e sem adição de PEG 4000 e BSA numa proporção de (1:1) (m:m).

Com o aumento da carga de sólidos (25 g/L para 100 g/L), foi verificado um incremento na liberação de glicose (de 7,5 g/L para 25,5 g/L), mas, por outro lado, houve redução na eficiência de hidrólise (de 40% para 34%). Tal situação é reportada

por outras pesquisas, que atribuem essa diminuição na eficiência a uma série de problemas, já mencionados, como: problemas de transferência de massa, problemas de inibição pelo produto e pelo substrato, menor quantidades de água livre, problemas de acessibilidade da enzima ao substrato, entre outros (MODENBACH e NOKES 2013).

Como mencionado anteriormente, em muitas destas ocasiões, a fim de alcançar as eficiências desejadas, maiores cargas de proteína se fazem necessárias, o que inviabiliza o processo (LOU et al., 2013; YANG et al., 2015). No entanto, uma vez adicionados BSA e PGE 4000, foi possível manter a eficiência de hidrólise para ambas as cargas de sólidos: 46,2% e 45,6% com a adição de BSA, e 47% e 49% com a adição de PGE 4000, para cargas de sólidos de 25 g/L e 100 g/L respectivamente. Portanto, os resultados indicam que a suplementação desses aditivos poderia contribuir para tornar viável o uso de materiais lignocelulósicos para a produção de produtos de maior valor agregado.

Os maiores incrementos relacionados à liberação de glicose foram atingidos com altas cargas de sólidos acompanhadas da adição de BSA e PEG. Ao se trabalhar com maiores cargas de sólidos, maiores quantidades de lignina residual estão presentes no material, o que poderia levar a aumentos de ligações improdutivoas das enzimas. Este efeito, porém, pode ser minimizado com a suplementação desses aditivos. Além disso, para altas cargas de sólidos, a viscosidade, um parâmetro reportado por influenciar as eficiências de hidrólise, é maior, podendo agravar problemas de transferência de massa. Os efeitos exercidos pela adição de BSA e PEG na redução da viscosidade e na diminuição de ligações improdutivoas possivelmente explica os aumentos na liberação de glicose observados no presente estudo.

A figura 5.36 apresenta o sinergismo, no que diz respeito à liberação de glicose entre esses aditivos e o coquetel enzimático, em função da carga de sólidos. Os maiores graus de sinergismo, em média, foram obtidos para uma carga de sólidos de 100 g/L: 1,33 e 1,43 com BSA e PEG, respectivamente, contra 1,14 e 1,18 para 25 g/L.

Pesquisas científicas têm reportado que esses aditivos anfifílicos são capazes de promover incrementos na hidrólise de xilanas presentes na fração hemicelulósica (KRISTENSEN et al., 2007). Considerando que o coquetel de *T. harzianum* apresenta alta atividade xilanásica, o aumento verificado na liberação de glicose também poderia

estar relacionado à hidrólise da fração hemicelulósica, assim aumentando o acesso das celulases ao substrato. A tabela 5.17 apresenta os valores de xilose liberada com e sem adição de BSA e PEG, para ambas as cargas de sólidos estudadas (25 g/L e 100 g/L).

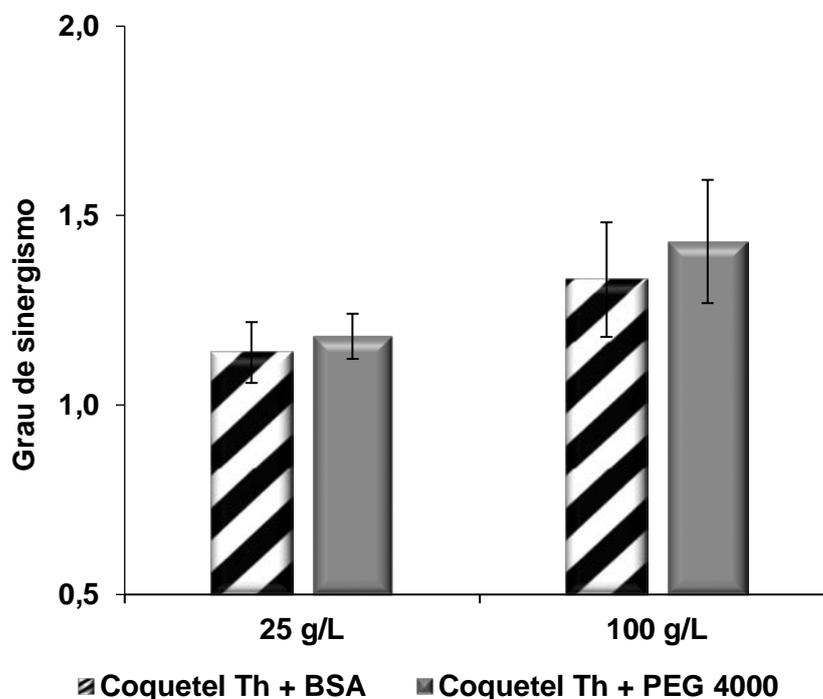


Figure 5.36. Grau de sinergismo entre aditivos (PEG 4000 e BSA) e celulases do preparado de *T. harzianum* para diferentes cargas de sólidos.

Tabela 5.17. Liberação de xilose na hidrólise de CLPD, utilizando 7,5 mg/g celulose do coquetel *T. harzianum*, com e sem BSA e PEG 4000, numa proporção 1:1 (m:m)

Carga de sólido	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i> + BSA	<i>T. harzianum</i> + PEG
	Xilose (g/L)		
25 g/L	1,78 ± 0,01	2,08 ± 0,03	2,14 ± 0,04
100 g/L	6,83 ± 0,40	8,65 ± 0,02	8,92 ± 0,20

Contudo, ao utilizar a mistura otimizada, aumentando a carga de sólidos para 100 g/L, não houve diferenças estatisticamente significativas entre a glicose liberada com e sem adição de BSA e PEG 4000, indicando que os benefícios dos surfactantes são influenciados tanto pela carga de sólidos e como pela composição do coquetel enzimático empregado.

5.10.4.2 Efeito de aditivos em relação à carga de proteína

As influências da carga de enzimas e da adição de aditivos na hidrólise de CLPD foi estudada aumentando a carga de enzima de uma carga de proteínas de 7,5 mg/g celulose para 20 mg/g celulose, para uma carga de sólidos fixa de 100 g/L. A figura 5.37 apresenta a liberação de glicose e a eficiência de hidrólise após 48h do processo.

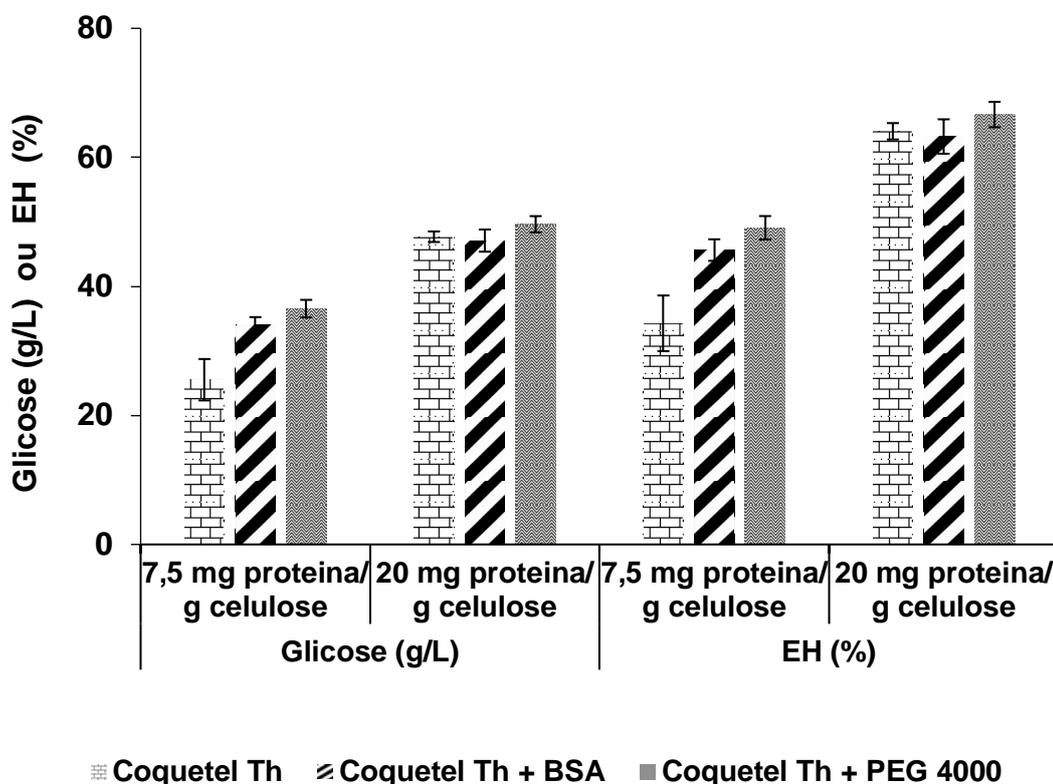


Figure 5.37. Liberação de glicose e eficiência de hidrólise enzimática (EH), após 48 h de hidrólise enzimática de CLPD. Carga de sólidos: 100 g/L, carga de proteína: 7,5 mg/ g celulose e 20 mg/ g celulose (*T. harzianum*) com e sem adição de PEG 4000 e BSA numa proporção de (1:1) (m:m).

Foi verificado um incremento da liberação de glicose de 26 g/L para 48 g/L ao aumentar 2,6 vezes a carga de proteína e, conseqüentemente, a quantidade de aditivos, já que foi utilizada uma proporção de 1:1 (m/m) em relação à quantidade de proteína do coquetel enzimático adicionada. No entanto, quando utilizada uma carga proteica de 20 mg/g celulose, não foram observados aumentos tanto na liberação de glicose como na eficiência de hidrólise com a adição de BSA e PEG 4000, indicando

que nem sempre esses aditivos promovem aumentos na eficiência de hidrólise e que, além da carga de sólidos, a composição do preparado enzimático e a quantidade de proteína empregada exercem efeito direto sobre o resultado. Portanto, a fim de alcançar um melhor aproveitamento dos benefícios conferidos pela suplementação de aditivos, estudos estatísticos, envolvendo a otimização da concentração de aditivos em função de material utilizado, da carga proteica e da carga de sólidos, se fazem necessários.

5.11. Considerações finais

Materiais lignocelulósicos têm sido alvo de estudos como uma alternativa para a produção de biocombustíveis. A viabilização dos processos de obtenção de açúcares é um dos principais objetivos de diversas pesquisas, constituindo-se a etapa de hidrólise enzimática um dos principais gargalos para o aproveitamento eficiente desses materiais.

No presente trabalho, um coquetel enzimático otimizado foi produzido a partir de diferentes preparados enzimáticos, obtidos de três diferentes plataformas fúngicas de micro-organismos naturalmente ocorrentes que se destacam por serem eficientes produtores de celulasas. Este coquetel enzimático otimizado, balanceado, foi obtido mediante um planejamento estatístico de mistura e mostrou-se capaz de hidrolisar celulignina parcialmente deslignificada com 91% de eficiência de hidrólise enzimática para uma carga de sólidos de 25 g/L e uma baixa carga enzimática, de 10 mg/g celulose.

Buscando atingir a liberação de elevadas concentrações de glicose na hidrólise, tendo em vista a posterior etapa de fermentação, foram empregadas técnicas estatísticas a fim de otimizar as cargas de sólidos e de proteínas.

Além disso, o processo de sacarificação e fermentação separadas (SHF) alcançou altas produtividades volumétricas em comparação com a literatura.

Os estudos realizados envolvendo avaliação do sinergismo dos coquetéis enzimáticos com proteínas acessórias permitiram direcionar pesquisas com o propósito de aumentar as eficiências de hidrólise e melhor compreender os processos de hidrólise enzimática, bem como o papel de proteínas não hidrolíticas e de surfactantes na desconstrução de materiais lignocelulósicos.

Capítulo 6

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos na presente tese de doutorado, pode-se concluir que:

1. Os pré-tratamentos ácido e alcalino de bagaço de cana foram eficientes. Quando utilizados sequencialmente promoveram uma desestruturação do material, aumentando a proporção de celulose de 34,1% para 67,1% e reduzindo tanto os teores da fração hemicelulósica, de 25,2% para 12,5 %, como da lignina, de 19,2% para 5,5%.
2. A produção de celulasas em biorreator utilizando *Trichoderma harzianum* IOC 3844, *Penicillium funiculosum* ATCC 11797 e *Aspergillus niger* ATCC 1004 corroboraram experimentos prévios de otimização do meio, realizados nas dependências dos Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO), por Rocha (2014), Maeda (2010) e Dias (2011), respectivamente.
3. As atividades enzimáticas de cada coquetel podem variar de acordo com a espécie de microrganismo. Destaca-se a estirpe *A. niger* por apresentar uma alta capacidade de produção de enzimas β -glucosidases, enquanto as linhagens *T. harzianum* e *P. funiculosum* apresentam elevada produção de endoglucanases. Além disso, o preparado de *T. harzianum* exibem alta atividade xilanásica em comparação com os demais. Assim, ficou evidenciado

um desbalanceamento entres os principais componentes do complexo celulásico produzidos por esses três diferentes fungos filamentosos.

4. A otimização de uma mistura proteica de coquetéis enzimáticos a partir de diferentes plataformas fúngicas, por meio do emprego da metodologia de planejamento experimental de mistura, do tipo *simplex-centroide* foi bem-sucedida. A proporção ótima entre os coquetéis, a fim de aumentar a liberação de glicose, foi a seguinte: 15% *T. harzianum*, 50% *P. funiculosum* e 35% *A. niger*. Esta mistura otimizada destacam-se altas proporções entre FPase: CMCase e entre FPase: β -glucosidase, evidenciando a importância dessas enzimas no processo de hidrólise de CLPD.
5. A mistura otimizada mostrou-se capaz de hidrolisar CLPD com eficiências de hidrólise de (91 ± 6) %, para uma carga de sólidos de 25 g/L e uma baixa carga de proteína, de 10 mg/g celulose.
6. As eficiências de hidrólise alcançadas com o emprego da mistura otimizada foram 116% e 38% superiores àquelas obtidas com os coquetéis de *T. harzianum* e *P. funiculosum*, respectivamente, para as mesmas cargas proteica (10 mg/g celulose) e de sólidos (25 g/L).
7. Foi constatada a redução do sinergismo ao longo do processo, evidenciando a importância da colaboração das celulasas no início da hidrólise, durante a etapa de liquefação.
8. A partir de planejamento experimental DCCR foram otimizadas as condições de hidrólise (carga de sólidos e carga proteica) que permitissem aumentar a glicose liberada e a eficiência de hidrólise, para uma elevada carga de sólidos e uma baixa carga de proteína. A condição ótima correspondeu a uma carga de CLPD de 196 g/L e uma carga de proteína de 24 mg/g celulose. A concentração de glicose liberada, neste caso, foi de $(94,1 \pm 8)$ g/L.

9. Comparados ao preparado enzimático comercial *Cellic Ctec2®*, os valores de produtividade volumétrica alcançados com a mistura otimizada indicaram que esta é competitiva. Para condições diluídas de sólidos (25 g/L), foram obtidos valores de 0,36 g/(L·h), contra de 0,39 g/(L·h) utilizando *Cellic Ctec2®*, enquanto, para condições com altas cargas de sólidos (196 g/L), as produtividades volumétricas foram de 3,8 g/(L·h) e de 4,2 g/(L·h), empregando a mistura otimizada e *Cellic Ctec2®*, respectivamente.
10. A fermentação do hidrolisado celulósico (fração C6) resultou em uma concentração de etanol de 33 g/L, correspondente a uma eficiência de 88,6%, e uma produtividade volumétrica de 11 g/(L·h). Ao considerar a etapa de sacarificação, de 24 h, a produtividade volumétrica relativa à formação de etanol no processo SHF foi de 1,19 g/(L·h), valores elevados quando comparados àqueles reportados na literatura.
11. Na fermentação do hidrolisado da fração hemicelulósica (fração C5), foi alcançada ao final do processo uma concentração de etanol de 18 g/L correspondente a uma eficiência de fermentação de 87%, e a uma produtividade de 0,3 g/(L·h).
12. Os módulos de ligação ao carboidrato (CBMs) aumentam a eficiência de hidrólise de CLPD, principalmente no início do processo. Foram obtidos incrementos de até 66% na liberação de glicose nas primeiras 12 h.
13. Tanto CBMs de bactérias como de fungos podem atuar em sinergismo com coquetos enzimáticos obtidos a partir de fungos filamentosos.
14. Não foi observado sinergismo entre os CBMs e a mistura otimizada na hidrólise de resíduos de papel nas condições estudadas.
15. O emprego de swolenina promoveu um aumento na eficiência de hidrólise de CLPD no início do processo (12h), com incrementos de 14% na liberação de glicose e de 30% na liberação de xilose.

16. A análise do bagaço de cana mediante microscopia eletrônica de varredura comprovou a alteração na estrutura do bagaço após a ação dos CBM e da swolenina.
17. Aditivos (PEG 4000 e BSA) atuam em sinergismo com coquetéis enzimáticos de *T. harzianum* tanto na hidrólise da celulose como na hidrólise da fração hemicelulósica.
18. PEG 4000 e BSA, apresentaram maior sinergismo em condições de alta carga de sólidos (100 g/L) e baixa carga de proteína (10 mg/g celulose) na hidrólise com coquetel de *T. harzianum*.
19. Aditivos como PEG 4000 e BSA podem aumentar a eficiência de hidrólise de materiais lignocelulósicos. Porém, seus efeitos dependem do tipo de material, da composição do coquetel enzimático e das condições do processo.

SUGESTÕES

- Realizar uma caracterização mais detalhada da mistura otimizada com o propósito de identificar as características das principais enzimas presentes no *pool* enzimático.
- Adicionar CBMs antes do processo de hidrólise de CLPD, numa etapa de pré-condicionamento, com o propósito de reduzir os tempos de hidrólise, e avaliar o tempo de incubação.
- Otimizar a aplicação prévia de swolenina, considerando concentração e tempo de incubação, com o propósito de aumentar as eficiências de hidrólise.
- Otimizar a concentração de surfactante que atue em sinergismo com a mistura otimizada na hidrólise de CLPD nas condições de hidrólise otimizadas (carga de sólidos de 196 g/L e carga de proteína de 24 mg/g celulose).

- Estudar o processo SHF com mais alimentações de sólidos após a etapa de liquefação, a fim de aumentar a concentração de glicose liberada. Parâmetros relativos à fermentação, tais como concentração final de etanol, produtividade e fatores de rendimento, seriam também avaliados.
- Analogamente ao desenvolvido nesta tese, produzir coquetéis enzimáticos específicos no caso da utilização de outros materiais lignocelulósicos, de distinta composição e submetidos a diferentes pré-tratamento, mediante a aplicação da técnica de planejamento experimental de mistura
- Avaliar a estabilidade térmica da mistura otimizada.

Referências

- ACHYUTHAN, K.E.; ACHYUTHAN, A.M.; ADAMS, P.D.; DIRK, S.M.; HARPER, J.C.; SIMMONS, B.A.; SINGH, A.K. Supramolecular Self-Assembled Chaos: Polyphenolic Lignin's Barrier to Cost-Effective Lignocellulosic Biofuels. **Molecules**, v. 15, p. 8641-8688, 2010.
- AGUIAR, A; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, 2011.
- ALVES, R. **Caracterização de fibras lignocelulósicas pré-tratadas por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas ópticas de alta resolução**. Dissertação (mestrado em ciências e engenharia de materiais e aplicação de materiais). Escola de engenharia de São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2011.
- ALVIRA, P.; NEGRO, M. J.; BALLESTEROS, M. Effect of endoxylanase and α -L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. **Bioresource technology**, v. 102, n. 6, p. 4552-4558, 2011.
- ANDERSEN, N. **Enzymatic hydrolysis of cellulose-Experimenta and modeling studies**. PhD (Chemical Engineering), Technical University of Denmark (DTU), BioCentrum, 2007.
- ARANTES, V., SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for biofuels**, 4(1), 1, 2011.
- ARANTES, V; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnol Biofuels**, v. 3, n. 4, p. 1-11, 2010.
- BAI, A., ZHAO, X., JIN, Y., YANG, G., FENG, Y. A novel thermophilic β -glucosidase from *Caldicellulosiruptor bescii*: characterization and its synergistic catalysis with other cellulases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85, p. 248-256, 2013.
- BALDRIAN, P; VALÁŠKOVÁ, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 3, p. 501-521, 2008.
- BANSAL, P., HALL, M., REALFF, M. J., LEE, J. H., BOMMARIUS, A. S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnology advances**, 27(6), 833-84, 2009.
- BARCELOS, C. A., MAEDA, R. N., BETANCUR, G. J. V., PEREIRA JR, N. The essentialness of delignification on enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse cellulignin for second generation ethanol production. **Waste and Biomass Valorization**, v. 4, n. 2, p. 341-346, 2013
- BARDANT, T. B., SUDIYARMANTO, S., ABIMANYU, H., HANUM, A. K. Effect of Non Ionic Surfactant Addition to Cellulase Performance in High-Substrate-Loading-

Hydrolysis of Palm Oil EFB and Water-Hyacinth. **Indonesian Journal of Chemistry**, 13(1), 53-58, 2013.

BAYER, E. A., LAMED, R., HIMMEL, M. E. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. **Current Opinion in Biotechnology**, 18(3), 237-245, 2007.

BELLIDO, C., BOLADO, S., COCA, M., LUCAS, S., GONZÁLEZ-BENITO, G., GARCÍA-CUBERO, M. T. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource technology**, 102(23), 10868-10874, 2011.

BERKA, R. M. et al. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 922-927, 2011.

BETANCUR, G. **Otimização do Pré-tratamento Ácido de Bagaço de Cana-de-Açúcar e Avaliação da Fermentabilidade do Hidrolisado Hemicelulósico para a Produção de Etanol de 2ª Geração**. Tese (doutorado em Tecnologia de processos Químicos e Bioquímicos)- Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

BETANCUR, G.J.; PEREIRA JR, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production: Part I: Diluted acid pretreatment optimization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 10-11, 2010.

BOLLÓK, M. RÉCZEY K. Cellulase enzyme production by various fungal strains on different carbon sources. **Acta Alimentaria**, v. 29, n. 2, p. 155-168, 2000.

BORASTON, A. B., BOLAM, D. N., GILBERT, H. J., DAVIES, G. J. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **Biochem.J**, v. 382, p. 769-781, 2004.

BÖRJESSON, J., PETERSON, R., TJERNELD, F. Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly (ethylene glycol) addition. **Enzyme and Microbial Technology**, 40(4), 754-762, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), 248-254, 1976.

BRÁS, N. F., FERNANDES, P. A., RAMOS, M. J. Docking and molecular dynamics studies on the stereoselectivity in the enzymatic synthesis of carbohydrates. **Theoretical Chemistry Accounts**, 122(5-6), 283, 2009

BRETHAUER, S., STUDER, M. H., YANG, B., WYMAN, C. E. The effect of bovine serum albumin on batch and continuous enzymatic cellulose hydrolysis mixed by stirring or shaking. **Bioresource technology**, 102(10), 6295-6298, 2011.

BROWN, R. M., SAXENA, I. M., KUDLICKA, K. Cellulose biosynthesis in higher plants. **Trends in plant science**, 1(5), 149-156, 1996.

- BUSK, P. K., LANGE, L. Classification of fungal and bacterial lytic polysaccharide monoxygenases. **BMC genomics**, 16(1), 1, 2015.
- BUSSAMRA, B; FREITAS, S; DA COSTA, A. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource technology**, v. 187, p. 173-181, 2015.
- CAMESASCA, L., RAMÍREZ, M. B., GUIGOU, M., FERRARI, M. D., LAREO, C. Evaluation of dilute acid and alkaline pretreatments, enzymatic hydrolysis and fermentation of napiergrass for fuel ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, 74, 193-201, 2015.
- CANÑAS, A. I.; CAMARERO, S. Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 6, p. 694-705, 2010.
- CANNELLA, D., CHIA-WEN, C. H., FELBY, C., JØRGENSEN, H. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. **Biotechnology for biofuels**, 5(1), 1, 2012.
- CANNELLA, D., JØRGENSEN, H. Do new cellulolytic enzyme preparations affect the industrial strategies for high solids lignocellulosic ethanol production?. **Biotechnology and bioengineering**, 111(1), 59-68, 2014.
- CARA, C., MOYA, M., BALLESTEROS, I., NEGRO, M. J., GONZÁLEZ, A., RUIZ, E. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. **Process Biochemistry**, 42(6), 1003-1009, 2007.
- CARVALHO, R. **Dilute acid and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for biogas production**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica). Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, 2009.
- CASTRO, A. M. **Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos, obtidas a partir de celulignina parcialmente deslignificada de açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2006, 212 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.
- CASTRO, A; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CHANDEL, A. K., et al. Multi-scale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process of sequential acid–base pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, 7(1), 1, 2014.
- CHANG, V. S., NAGWANI, M., HOLTZAPPLE, M. T. (1998). Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 74(3), 135-159, 1998.

- CHIA-WEN, C. H., CANNELLA, D., JØRGENSEN, H., FELBY, C., THYGESEN, L. G. Cellobiohydrolase and endoglucanase respond differently to surfactants during the hydrolysis of cellulose. **Biotechnology for biofuels**, 8(1), 1, 2015.
- COELHO, G. D. **Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybe castanella* CCB444 durante crescimento em solo**. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e meio Maiente), Institut de Botânica, São Paulo, 2007.
- CUSSLER, E. L.; WEI, J. Chemical Product Engineering. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v.49, p.1072-1075, 2003.
- DA COSTA, A. C. A., JUNIOR, N. P., ARANDA, D. A. G. The situation of biofuels in Brazil: new generation technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 14(9), 3041-3049, 2010.
- DAMISA, D., AMEH, J. B., UMOH, V. J. Effect of chemical pretreatment of some lignocellulosic wastes on the recovery of cellulase from *Aspergillus niger* AH3 mutant. **African Journal of Biotechnology**, 7(14), 2008.
- DASHTBAN, M., SCHRAFT, H., SYED, T. A., QIN, W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International journal of biochemistry and molecular biology**, v. 1, n. 1, p. 36, 2010.
- DAVIES, G., HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, 3(9), 853-859, 1995.
- DEKKER, R. F. Kinetic, inhibition, and stability properties of a commercial β -D-glucosidase (cellobiase) preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, 28(9), 1438-1442, 1986.
- DELABONA, P., et al. Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α -L-arabinofuranosidase. **Bioresource technology**, 131, 500-507, 2013.
- DIAS, D.B.S. **Produção, caracterização parcial e aplicação de β -glucosidases de *Aspergillus niger***. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.
- DIMAROGONA, M; TOPAKAS, E; CHRISTAKOPOULOS, PI. Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 19, p. 8455-8465, 2013.
- DIN, N., GILKES, N. R., TEKANT, B., MILLER, R. C., WARREN, R. A. J., KILBURN, D. G. Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase. **Nature Biotechnology**, v. 9, n. 11, p. 1096-1099, 1991.
- ECKARD, A. D., MUTHUKUMARAPPAN, K., GIBBONS, W. A review of the role of amphiphiles in biomass to ethanol conversion. **Applied Sciences**, 3(2), 396-419, 2013.

- ERIKSSON, T., BÖRJESSON, J., TJERNELD, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, 31(3), 353-364, 2002.
- EVANDELISTA, D. E. **Produção recombinante, caracterização enzimática e estudos sobre a ocorrência de pectinases no “bicudo da cana-de-açúcar” (*Sphenophorus levis*, curculionidae)**. Dissertação (Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular). Universidade Federal de São Carlos, 2012.
- FALKOSKI, D. L., GUIMARÃES, V. M., DE ALMEIDA, M. N., ALFENAS, A. C., COLODETTE, J. L., DE REZENDE, S. T. *Chrysosporthe cubensis*: a new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource technology**, v. 130, p. 296-305, 2013.
- FAN, L. T.; LEE, Y; GHARPURAY, M. M. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. In: **Microbial reactions**. Springer Berlin Heidelberg. p. 157-187, 1982
- FASANELLA, C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidad de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. Woody chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 613 p. 1989.
- FERRARI, M. D., NEIROTTI, E., ALBORNOZ, C., SAUCEDO, E. Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, 40(7), 753-759, 1992.
- FORSBERG, Z; et al. Cleavage of cellulose by a CBM33 protein. **Protein Science**, v. 20, n. 9, p. 1479-1483, 2011.
- FRY, S.C. Plant cell expansion: Unzipped by expansins. **Current Biology**, v. 4, n. 9, p. 815-817, 1994.
- GAO, D., CHUNDAWAT, S. P., KRISHNAN, C., BALAN, V., DALE, B. E. Mixture optimization of six core glycosyl hydrolases for maximizing saccharification of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreated corn stover. **Bioresource technology**, v. 101, n. 8, p. 2770-2781, 2010.
- GAO, P. J., CHEN, G. J., WANG, T. H., ZHANG, Y. S., LIU, J. Non-hydrolytic Disruption of Crystalline Structure of Cellulose by Cellulose Binding Domain and Linker Sequence of Cellobiohydrolase I from *Penicillium janthinellum*. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 33, n. 1, p. 13-18, 2001.
- GARCÍA-APARICIO, M. P., OLIVA, J. M., MANZANARES, P., BALLESTEROS, M., BALLESTEROS, I., GONZÁLEZ, A., NEGRO, M. J. Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Fuel**, 90(4), 1624-1630, 2011.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v.59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GILBERT, H. J., KNOX, J. P., BORASTON, A. B. Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules. **Current opinion in structural biology**, 23(5), 669-677, 2013.

GOURLAY, K., HU, J., ARANTES, V., ANDBERG, M., SALOHEIMO, M., PENTTILÄ, M., SADDLER, J. Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. **Bioresource technology**, v. 142, p. 498-503, 2013.

GOURLAY, K., HU, J., ARANTES, V., PENTTILÄ, M., SADDLER, J. N. The use of carbohydrate binding modules (CBMs) to monitor changes in fragmentation and cellulose fiber surface morphology during cellulase-and swollenin-induced deconstruction of lignocellulosic substrates. **Journal of Biological Chemistry**, 290 (5), 2938-2945, 2015.

GRAVINA, M. **Desenvolvimento de Produto Enzimático para a Eficiente Hidrólise de Biomassa Lignocelulósica**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

GUPTA, A; VERMA, J. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550-567, 2015.

GUPTA, R., SHARMA, K. K., KUHAD, R. C. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. **Bioresource Technology**, 100(3), 1214-1220, 2009.

GURAGAIN, Y. N., GANESH, K. M., BANSAL, S., SATHISH, R. S., RAO, N., VADLANI, P. V. Low-lignin mutant biomass resources: Effect of compositional changes on ethanol yield. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 1-8, 2014.

GUTIÉRREZ, I; MORENO, N; MONTOYA, D. Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 32, n. 1, p. 1-12, 2015.

HAN, Y., CHEN, H. Synergism between corn stover protein and cellulase. **Enzyme and microbial technology**, 41(5), 638-645, 2007.

HAN, Y., CHEN, H. Synergism between hydrophobic proteins of corn stover and cellulase in lignocellulose hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, 48(2), 218-224, 2010.

HARRIS, P. V., XU, F., KREEL, N. E., KANG, C., FUKUYAMA, S. New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. **Current opinion in chemical biology**, 19, 162-170, 2014.

HENRISSAT B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. **Biochem.J.** v. 280, p. 309-316, 1991.

HORN, S. J., VAAJE-KOLSTAD, G., WESTERENG, B., EIJSINK, V. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2012.

HU, J., ARANTES, V., PRIBOWO, A., GOURLAY, K., SADDLER, J. N. Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. **Energy & Environmental Science**, v. 7, n. 7, p. 2308-2315, 2014.

JÄGER, G., GIRFOGLIO, M., DOLLO, F., RINALDI, R., BONGARD, H., COMMANDEUR, U., BÜCHS, J. How recombinant swollenin from *Kluyveromyces lactis* affects cellulosic substrates and accelerates their hydrolysis. **Biotechnology for biofuels**, 4(1), 1, 2011.

JEFFRIES, T. W., JIN, Y. S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 63(5), 495-509, 2004.

JEOH, T; WILSON, D. B.; WALKER, L. P. Effect of cellulase mole fraction and cellulose recalcitrance on synergism in cellulose hydrolysis and binding. **Biotechnology progress**, v. 22, n. 1, p. 270-277, 2006.

JØRGENSEN, H., KRISTENSEN, J. B., FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, n. 2, p. 119-134, 2007a.

JØRGENSEN, H., VIBE-PEDERSEN, J., LARSEN, J., FELBY, C. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. **Biotechnology and Bioengineering**, 96(5), 862-870, 2007b.

KAAR, W. E., HOLTZAPPLE, M. T. Benefits from Tween during enzymic hydrolysis of corn stover. **Biotechnology and Bioengineering**, 59(4), 419-427., 1998.

KANG, K., WANG, S., LAI, G., LIU, G., XING, M. Characterization of a novel swollenin from *Penicillium oxalicum* in facilitating enzymatic saccharification of cellulose. **BMC biotechnology**, 13(1), 1, 2013.

KAPOOR, M., RAJ, T., VIJAYARAJ, M., CHOPRA, A., GUPTA, R. P., TULI, D. K., KUMAR, R. Structural features of dilute acid, steam exploded, and alkali pretreated mustard stalk and their impact on enzymatic hydrolysis. **Carbohydrate polymers**, v. 124, p. 265-273, 2015.

KITAOKA, M., HONDA, Y., FUSHINOBU, S., HIDAKA, M., KATAYAMA, T., YAMAMOTO, K. Conversion of inverting glycoside hydrolases into catalysts for synthesizing glycosides employing a glycosynthase strategy. **Trends Glycosci. Glycotechnol.**, 21, 23-39, 2009.

KIM, I. J., LEE, H. J., CHOI, I. G., KIM, K. H. Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 20, p. 8469-8480, 2014.

KIM, S., PARK, J. M., SEO, J. W., KIM, C. H. Sequential acid-/alkali-pretreatment of empty palm fruit bunch fiber. **Bioresource technology**, 109, 229-233, 2012.

- KLYOSOV, A.A. Principles of the Enzymatic Degradation of Cellulose. Disponível em <http://aklyosov.home.comcast.net/~aklyosov/>. Acessado em: 16 jun 2010. 2015.
- KNUTSEN, J. S., LIBERATORE, M. W. Rheology modification and enzyme kinetics of high solids cellulosic slurries. **Energy & Fuels**, 24(5), 3267-3274, 2010.
- KOLASA, M., AHRING, B. K., LÜBECK, P. S., & LÜBECK, M. Co-cultivation of *Trichoderma reesei* RutC30 with three black *Aspergillus* strains facilitates efficient hydrolysis of pretreated wheat straw and shows promises for on-site enzyme production. **Bioresource technology**, v. 169, p. 143-148, 2014.
- KOVÁCS, K. **Production of cellulolytic enzymes with *Trichoderma atroviride* mutants for the biomass to bioethanol process**. Doctoral Thesis, Lund University, 2009.
- KRÄSSIG, H. A. Cellulose: structure, accessibility and reactivity. **Gordon and Breach Science Publishers**, p. 167-324, 1993.
- KRISTENSEN, J. B., BÖRJESSON, J., BRUUN, M. H., TJERNELD, F., JØRGENSEN, H. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, 40(4), 888-895, 2007.
- KRISTENSEN, J.B.; FELBY, C; JØRGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 1, p. 11, 2009.
- KUMAR, P., BARRETT, D. M., DELWICHE, M. J., STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.
- KUMAR, R., WYMAN, C. E. Effect of additives on the digestibility of corn stover solids following pretreatment by leading technologies. **Biotechnology and bioengineering**, 102(6), 1544-1557, 2009.
- KUMAR, R; WYMAN, C. E. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4203-4213, 2009.
- LAEMMLI, U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LE COSTAOUËC, T., PAKARINEN, A., VÁRNAI, A., PURANEN, T., VIIKARI, L. The role of carbohydrate binding module (CBM) at high substrate consistency: comparison of *Trichoderma reesei* and *Thermoascus aurantiacus* Cel7A (CBHI) and Cel5A (EGII). **Bioresource technology**, v. 143, p. 196-203, 2013.
- LEE, H. J., KIM, I. J., KIM, J. F., CHOI, I. G., KIM, K. H. An expansin from the marine bacterium *Hahella chejuensis* acts synergistically with xylanase and enhances xylan hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 149, p. 516-519, 2013.

- LI, X. L.; DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; WU, Y. V.; SAHA, B. C. Profile of enzyme production by *Trichoderma reesei* grown on corn fiber fractions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 321-334, 2005.
- LIGUORI, R., SOCCOL, C. R., PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, L., WOICIECHOWSKI, A. L., FARACO, V. Second Generation Ethanol Production from Brewers' Spent Grain. **Energies**, v. 8, n. 4, p. 2575-2586, 2015.
- LÓPEZ-LINARES, J. C., ROMERO, I., CARA, C., RUIZ, E., MOYA, M., CASTRO, E. Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. **Fuel**, 122, 112-118, 2014.
- LOU, H., WANG, M., LAI, H., LIN, X., ZHOU, M., YANG, D., QIU, X. Reducing non-productive adsorption of cellulase and enhancing enzymatic hydrolysis of lignocelluloses by noncovalent modification of lignin with lignosulfonate. **Bioresour. Technol.**, 146, 478-484, 2013.
- LU, X., ZHENG, X., LI, X., ZHAO, J. Adsorption and mechanism of cellulase enzymes onto lignin isolated from corn stover pretreated with liquid hot water. **Biotechnology for Biofuels**, 9(1), 1, 2016.
- LYND, L. R., CUSHMAN, J. H., NICHOLS, R. J., WYMAN, C. E. Fuel ethanol from cellulosic biomass. **Science** (Washington), 251(4999), 1318-1323, 1991.
- MA, X., YUE, G., YU, J., ZHANG, X., TAN, T. Enzymatic hydrolysis of cassava bagasse with high solid loading. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, 5(2), 275-281, 2011.
- MAEDA, R. N. **Produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa de bagaço de cana pré-tratado e sua aplicação na produção de etanol de segunda geração**. Rio de Janeiro, 2010. 197 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.
- MAITAN-ALFENAS, G. P., VISSER, E. M., GUIMARÃES, V. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, 1, 44-49, 2015.
- MANDELS, M. WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry**, v. 95, p. 391-414, 1969.
- MANDELS, M.; REESE, E. T. Fungal cellulases and the microbial decomposition of cellulosic fibers. **Dev. Indust. Microbiol.** v. 5, p. 5-12, 1964.
- MARTÍNEZ, A. T. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 425-444, 2002.
- MARTÍN-SAMPEDRO, R., RAHIKAINEN, J. L., JOHANSSON, L. S., MARJAMAA, K., LAINE, J., KRUIUS, K., ROJAS, O. J. Preferential adsorption and activity of monocomponent cellulases on lignocellulose thin films with varying lignin content. **Biomacromolecules**, 14(4), 1231-1239, 2013.

- MATSUSHIKA, A., INOUE, H., KODAKI, T., SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 84(1), 37-53, 2009.
- MELLO, B. L., POLIKARPOV, I. Family 1 carbohydrate binding-modules enhance saccharification rates. **AMB Express**, 4(1), 1, 2014.
- MESA, L., GONZÁLEZ, E., ROMERO, I., RUIZ, E., CARA, C., CASTRO, E. (2011). Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse. **Chemical engineering journal**, 175, 185-191, 2011.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v. 68, p. 61-138, 2000.
- MODENBACH, A. A., NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings—a review. **Biomass and Bioenergy**, 56, 526-544, 2013.
- MOHANRAM, S., AMAT, D., CHOUDHARY, J., ARORA, A., NAIN, L. Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. **Sustainable Chemical Processes**, 1(1), 1, 2013.
- MORANA, A., MAURELLI, L., IONATA, E., LA CARA, F., ROSSI, M. Cellulases from fungi and bacteria and their biotechnological applications. In: Cellulase: types and action, mechanism, and uses. 2011. p. 1-79.
- MORGENSTERN, I., POWLOWSKI, J., TSANG, A. Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: from dysfunctional GH61 family to powerful lytic polysaccharide monooxygenase family. **Briefings in functional genomics**, 13(6), 471-481, 2014.
- MUSSATO, S; FERNANDES, M; MILAGRES A. M. F; ROBERTO, I. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 124-129, 2008.
- NEVES, P. V., PITARELO, A. P., RAMOS, L. P. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: Effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies. **Bioresource technology**, 208, 184-194, 2016.
- NG, I. S., TSAI, S. W., JU, Y. M., YU, S. M., & HO, T. H. D. Dynamic synergistic effect on *Trichoderma reesei* cellulases by novel β -glucosidases from Taiwanese fungi. **Bioresource technology**, v. 102, n. 10, p. 6073-6081, 2011.
- NIDETZKY, B., STEINER, W., HAYN, M., CLAEYSSSENS, M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. **Biochem.J**, v. 298, p. 705-710, 1994.

- NJOKU, S. I., IVERSEN, J. A., UELLEND AHL, H., AHRING, B. K. Production of ethanol from hemicellulose fraction of cocksfoot grass using *Pichia stipitis*. **Sustainable Chemical Processes**, 1(1), 1, 2013.
- OKEKE, B.C. Cellulolytic and Xylanolytic Potential of High β -Glucosidase-Producing *Trichoderma* from Decaying Biomass. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1581-1598, 2014.
- OLOFSSON, K., BERTILSSON, M., LIDÉN, G. A short review on SSF—an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for biofuels**, 1(1), 1, 2008.
- OOSHIMA, H., SAKATA, M., HARANO, Y. Enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose by surfactant. **Biotechnology and Bioengineering**, 28(11), 1727-1734, 1986.
- PALONEN, H., TJERNELD, F., ZACCHI, G., TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, 107(1), 65-72, 2004.
- PAMPULHA, M. E., LOUREIRO-DIAS, M. C. Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 34(3), 375-380, 1990.
- PAN, X., XIE, D., GILKES, N., GREGG, D. J., SADDLER, J. N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 121/124, 1069-1079, 2005.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 13(2), 81-84, 2003.
- PAULOVA, L., PATAKOVA, P., BRANSKA, B., RYCHTERA, M., MELZOCH, K. Lignocellulosic ethanol: technology design and its impact on process efficiency. **Biotechnology advances**, 33(6), 1091-1107, 2015.
- PELLEGRINI, V. **Clonagem molecular, expressão, purificação e caracterização estrutural da endoglucanase de *Trichoderma harzianum* visando o desenvolvimento de coquetês enzimáticos para a produção de etanol lignocelulósico**. Tese (Doutorado em Física Biomolecular) Instituto de Física de São Carlos, Universidad de São Paulo, 2016.
- PEREIRA Jr, N; COUTO, M.A.P.G., ANNA, L.M.M.S.B. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**. Biblioteca Nacional: Rio de Janeiro, v.2, p. 45, 2008.
- PEREIRA Jr., N. **Investigation of D-xylose fermenting yeast**. Ph.D. Thesis. Department of Chemistry. The University of Manchester, U.K, 1991.
- PHILLIPS, C. M., BEESON IV, W. T., CATE, J. H., MARLETTA, M. A. Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. **ACS chemical biology**, v. 6, n. 12, p. 1399-1406, 2011.

- PHITSUWAN, P; SAKKA, K; RATANAKHANOKCHAI, K. Improvement of lignocellulosic biomass in planta: a review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. **Biomass and Bioenergy**, v. 58, p. 390-405, 2013.
- PLAYNE, M. J. Increased digestibility of bagasses by pretreatment with alkalis and steam explosion. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 5, p. 426-433, 1984.
- PRYOR, S.W.; KARKI, B; NAHAR, N. Effect of hemicellulase addition during enzymatic hydrolysis of switchgrass pretreated by soaking in aqueous ammonia. **Bioresource technology**, v. 123, p. 620-626, 2012.
- QI, M; JUN, H-S; FORSBERG, C.W. Characterization and synergistic interactions of *Fibrobacter succinogenes* glycoside hydrolases. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 19, p. 6098-6105, 2007.
- QIN, Y. M., TAO, H., LIU, Y. Y., WANG, Y. D., ZHANG, J. R., TANG, A. X. A novel non-hydrolytic protein from *Pseudomonas oryzae* enhances the enzymatic hydrolysis of cellulose. **Journal of biotechnology**, 168(1), 24-31, 2013.
- QING, Q; YANG, B; WYMAN, C. E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9624-9630, 2010.
- QUINLAN, R. J; et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 37, p. 15079-15084, 2011.
- QUIROZ, R.E.; FOLCH, J.L. Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. **Biotechnol Appl**, v. 28, p. 205-15, 2011.
- RABELO, S. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2010.
- RABINOVICH, M.L.; NGUEN V.V.; KLYOSOV, A.A. Synergism under concerted action of endoglucanases with low and high affinity for cellulose. **Prikl.Biokhim.Mikrobiol.** v. 22, p. 70-79. 1986.
- RAHIKAINEN, J. L., EVANS, J. D., MIKANDER, S., KALLIOLA, A., PURANEN, T., TAMMINEN, T KRUUS, K. Cellulase–lignin interactions—The role of carbohydrate-binding module and pH in non-productive binding. **Enzyme and microbial technology**, 53(5), 315-321, 2013.
- RAMOS, L. P., DA SILVA, L., BALLEM, A. C., PITARELO, A. P., CHIARELLO, L. M., SILVEIRA, M. H. L. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource technology**, 175, 195-202, 2015.
- ROCHA, V. A. L., MAEDA, R. N., SANTA ANNA, L. M. M., PEREIRA, N. Sugarcane bagasse as feedstock for cellulase production by *Trichoderma harzianum* in optimized culture medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, 16(5), 1-1, 2013.

- ROCHA, V. **Caracterização proteômica, identificação de proteínas acessórias e avaliação do potencial hidrolítico de um preparado celulásico obtido a partir de bagaço de cana por *Trichoderma harzianum* visando à aplicação na produção de etanol 2G**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.
- ROSE, M; BABI, M; MORAN-MIRABAL, J. The Study of Cellulose Structure and Depolymerization Through Single-Molecule Methods. **Industrial Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 16-24, 2015.
- RUBINI, M. **Cloning, characterization and heterologous expression of the first *Penicillium echinulatum* cellulase gene**. Tese (Doutorado em Biologia Molecular), Instituto de ciencias biológicas, Universidade de Brasília, 2009
- RUDOLF, A., ALKASRAWI, M., ZACCHI, G., LIDÉN, G. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. **Enzyme and Microbial Technology**, 37(2), 195-204, 2005.
- SAINI, J. K., PATEL, A. K., ADSUL, M., SINGHANIA, R. R. Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass. **Renewable Energy**, 2016.
- SALOHEIMO, M, et al. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 17, p. 4202-4211, 2002.
- SANTOS, F. A., QUEIRÓZ, J. D., COLODETTE, J. L., FERNANDES, S. A., GUIMARÃES, V. M., REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.
- SCHÜLEIN, M. Protein engineering of cellulases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 2, p. 239-252, 2000.
- SCORDIA, D., COSENTINO, S. L., JEFFRIES, T. W. Second generation bioethanol production from *Saccharum spontaneum* L. ssp. *aegyptiacum* (Willd.) Hack. **Bioresource technology**, 101(14), 5358-5365, 2010.
- SHAHZADI, T; et al. Induced Production of Exoglucanase, and β -Glucosidase from Fungal Co-Culture of *T. viride* and *G. lucidum*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2014, 2014.
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v.6, p.219–228, 2003.
- SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- SINGH, J; SUHAG, Mi; DHAKA, A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. **Carbohydrate polymers**, v. 117, p. 624-631, 2015.

SINGHANIA, R. R., PATEL, A. K., SUKUMARAN, R. K., LARROCHE, C., & PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, 127, 500-507, 2013.

SISTEMA ALICEWEB. Disponível em: Acesso em 26 agosto 2016.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D., CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **NREL**, 2008.

SOCOL, C.R; et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SOLEIMANI, M; TABIL, L.G.; NIU, C. Delignification of intact biomass and cellulosic coproduct of acid-catalyzed hydrolysis. **AIChE Journal**, 2015.

SØRENSEN, A. **A new highly efficient beta-glucosidase from the novel species, *Aspergillus saccharolyticus***. Videnbasen for Aalborg UniversitetVBN, Aalborg UniversitetAalborg University, Det Teknisk-Naturvidenskabelige FakultetThe Faculty of Engineering and Science, Institut for Kemi og Biovidenskab Department of Chemistry and Bioscience, 2010.

SOTANIEMI, V. H., TIKKANEN, T., PASANEN, A., TASKILA, S., OJAMO, H. Effect of enzyme and substrate dosing strategies on mixing and hydrolysis of old corrugated cardboard. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 5, n. 2, p. 141-148, 2014.

SOUZA. G. Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em degradação em compostos poluentes. Dissertação (Mestrado em Ciência), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

SUTO, M; TOMITA, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 4, p. 305-311, 2001.

SUWANNARANGSEE, S, et al. Optimisation of synergistic biomass-degrading enzyme systems for efficient rice straw hydrolysis using an experimental mixture design. **Bioresource technology**, v. 119, p. 252-261, 2012.

TOMAZINI, A. **Caracterização estrutural da Glicosidase de *Xanthomona campestris* contendo os domínios: catalítico da família GH5 e semelhante à Expansina**. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada Biomolecular), Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

VALADARES, F. **Produção e uso de enzimas derivadas do fungo *Pleurotus ostreatus* na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermodinâmico**. Dissertação (Mestrado em ciências), Escola de engenharia de Lorena, São Paulo, 2013.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 2012.

VÁRNAI, A., SIIKA-AHO, M., VIIKARI, L. Carbohydrate-binding modules (CBMs) revisited: reduced amount of water counterbalances the need for CBMs. **Biotechnology for biofuels**, 6(1), 1, 2013.

VASQUEZ, M.P. **Desenvolvimento de bioprocesso de hidrólise enzimática e fermentação simultânea para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal. 2007

VERMAAS, J. V., PETRIDIS, L., QI, X., SCHULZ, R., LINDNER, B., SMITH, J. C. Mechanism of lignin inhibition of enzymatic biomass deconstruction. **Biotechnology for biofuels**, 8(1), 1, 2015.

WANG, W., ZHUANG, X., YUAN, Z., YU, Q., QI, W., WANG, Q., TAN, X. High consistency enzymatic saccharification of sweet sorghum bagasse pretreated with liquid hot water. **Bioresource technology**, 108, 252-257, 2012.

WELKER, C. M., BALASUBRAMANIAN, V. K., PETTI, C., RAI, K. M., DEBOLT, S., MENDU, V. Engineering plant biomass lignin content and composition for biofuels and bioproducts. **Energies**, 8(8), 7654-7676, 2015.

WHITNEY, SEC; BRIGHAM, JE; DARKE, AH; REID, JSG; GIDLEY, MJ. In vitro assembly of cellulose/xyloglucan networks: ultrastructural and molecular aspects. **Plant J**.v. 8, p.491–504, 1995.

WINGREN, A., GALBE, M., ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnology progress**, 19(4), 1109-1117, 2003.

XIAO, Z., ZHANG, X., GREGG, D. J., SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. In Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on **Biotechnology for Fuels and Chemicals** Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO (pp. 1115-1126). Humana Press, 2004.

XIN, D., SUN, Z., VIIKARI, L., ZHANG, J. Role of hemicellulases in production of fermentable sugars from corn stover. **Industrial Crops and Products**, 74, 209-217, 2015.

XU, F. et al. Partition of enzymes between the solvent and insoluble substrate during the hydrolysis of lignocellulose by cellulases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 1, p. 42-48, 2008.

YANG, B., WYMAN, C. E. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, 94(4), 611-617, 2006.

YANG, M., ZHANG, J., KUITTINEN, S., VEPSÄLÄINEN, J., SOININEN, P., KEINÄNEN, M., PAPPINEN, A. Enhanced sugar production from pretreated barley straw by additive xylanase and surfactants in enzymatic hydrolysis for acetone–butanol–ethanol fermentation. **Bioresource technology**, 189, 131-137, 2015.

YOON, S.Y.; HAN, S.H.; SHIN, S.J. The effect of hemicelluloses and lignin on acid hydrolysis of cellulose. **Energy**, v. 77, p. 19-24, 2014.

YOUN, H. D; HAH, Y. C; KANG, S.O. Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 132, n. 3, p. 183-188, 1995.

ZHANG, J; TANG, M; VIKARI, L. Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases. **Bioresource technology**, v. 121, p. 8-12, 2012.

ZHANG, J; VIKARI, L. Impact of xylan on synergistic effects of xylanases and cellulases in enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1393-1402, 2014.

ZHANG, J; VIKARI, L. Xylo-oligosaccharides are competitive inhibitors of cellobiohydrolase I from *Thermoascus aurantiacus*. **Bioresource technology**, v. 117, p. 286-291, 2012.

ZHANG, X. Z., ZHANG, Y. H. P. Cellulases: characteristics, sources, production, and applications. *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*, 1, 131-146, 2013.

ZHENG, Y; PAN, Z; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International journal of agricultural and biological engineering**, v. 2, n. 3, p. 51-68, 2009.

ZHUANG, J., MARCHANT, M. A., NOKES, S. E., STROBEL, H. J. Economic analysis of cellulase production methods for bio-ethanol. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 23, n. 5, p. 679-687, 2007.

ŽIFČÁKOVÁ, L; BALDRIAN, P. Fungal polysaccharide monooxygenases: new players in the decomposition of cellulose. **Fungal ecology**, v. 5, n. 5, p. 481-489, 2012.

ZIMBARDI, A. **Produção e caracterização bioquímica de enzimas lignocelulolíticas fúngicas e sua aplicação na sacarificação de biomassa lignocelulósica**. Tese (Doutorem ciências, Área: Química). Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2014.

Página: https://www.cazypedia.org/index.php/Carbohydrate-binding_modules. Acesso agosto 2015.

Página: https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases. Acesso agosto 2015.