



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Ariane Priscila Movio

Aplicações de coquetéis de celulases para a sacarificação enzimática do
bagaço de cana-de-açúcar

São José do Rio Preto
2014

Ariane Priscila Movio

Aplicações de coquetéis de celulases para a sacarificação enzimática do
bagaço de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

São José do Rio Preto
2014

Movio, Ariane Priscila

Aplicações de coquetéis de celulases para a sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar / Ariane Priscila Movio - São José do Rio Preto, 2014

72 f. : il. ; tabs.

Orientador: Roberto da Silva

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Enzimas de fungos – Aplicações Industriais. 3. Inibidores enzimáticos. 4. Bagaço de cana. 5. Sacarificação. 6. Beta glicosidase I. Silva, Roberto da. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 663.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Ariane Priscila Movio

Aplicações de coquetéis de celulases para a sacarificação enzimática do
bagaço de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração – Bioquímica de macromoléculas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles
UNICAMP – Campinas

Prof. Dr. Maurício Boscolo
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
21 de fevereiro de 2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder a vida e me iluminar durante esse período.

À minha família que tanto me apoiou durante o mestrado e por todo amor e compreensão.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto da Silva, pela oportunidade, confiança e pela ajuda na realização desse trabalho.

Aos Profs. Dr. Maurício Boscolo e Dr. João Cláudio Thoméo pela ajuda e amizade.

A todos os amigos de laboratório que contribuíram na construção desse projeto, em especial, à Dra. Márcia Maria Moretti, Ms. Thiago Okubo, Ms. Rodolfo Travaini.

Ao meu namorado Thales pela atenção e carinho.

Às minhas amigas de república Daniela, Suelen, Mariana e Viviane.

Aos colegas do vôlei que me proporcionaram descontração durante esse período.

E a todos que durante esses anos de faculdade fizeram parte da minha vida.

Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer
E mesmo quando a visão se turva e o coração só chora
Mas na alma, há certeza da vitória
(Celina Borges)

RESUMO

O capítulo 1 deste trabalho descreve o Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e avalia a sua sacarificação enzimática a partir de diferentes extratos enzimáticos dos fungos *Penicillium viridicatum* RFC3, *Trichoderma reesei* QM9414, *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756 e *Thermomyces lanuginosus*, obtidos a partir da fermentação estado sólido. Dentre essas fermentações, o melhor resultado individual de eficiência de hidrólise foi obtido com o extrato enzimático do fungo *T.aurantiacus*, o qual foi então utilizado na sacarificação dos bagaços pré-tratados com espécies reativas de oxigênio. A melhor taxa de sacarificação foi obtida no bagaço pré-tratado com NaClO, que resultou em 19,8% de rendimento, contra 12,2% no bagaço *in natura*. O capítulo 2 do trabalho descreve a importância do sinergismo e da inibição enzimática, na forma da β -glicosidase, na sacarificação do bagaço. Foi verificado sinergismo entre os extratos enzimáticos dos fungos *P.viridicatum* e *T.reesei* e a melhor combinação dos dois extratos foi na proporção 1:1, resultando na liberação de 0,73 mg/mL de glicose. As atividades de β -glicosidases presentes nos extratos enzimáticos foram avaliadas quanto aos efeitos de inibição por glicose. Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} foram obtidos com a enzima do *T.aurantiacus* sem inibidor apresentou $V_{m\acute{a}x}$ 4,60 $\mu\text{mol}/\text{min}$ e K_m 0,31 mM e com glicose $V_{m\acute{a}x}$ 2,3 $\mu\text{mol}/\text{min}$ e K_m 0,37 mM. Sem glicose a enzima do *P.viridicatum* apresentou $V_{m\acute{a}x}$ 166,7 $\mu\text{mol}/\text{min}$ e K_m 0,2mM e com glicose $V_{m\acute{a}x}$ 13,8 $\mu\text{mol}/\text{min}$ e K_m 1,2 mM. A β -glicosidase do *T.aurantiacus* sofreu inibição não-competitiva, enquanto a enzima do *P.viridicatum* sofreu inibição mista. Também foram avaliados os efeitos da frutose e da glicose isomerase como supressora do efeito inibidor da glicose. A presença da frutose proporcionou um efeito positivo nas atividades de β -glicosidases desses fungos. A sacarificação do bagaço de cana com a combinação dos extratos enzimáticos e glicose isomerase apresentou um efeito interessante, entretanto este resultado não se confirmou pela quantificação de frutose por HPLC.

Palavras chave: Sacarificação enzimática. β -glicosidase. Inibição.

ABSTRACT

The first chapter of this work describes the pretreatment of sugarcane bagasse cane and evaluates its enzymatic saccharification from different enzymatic extracts of *Penicillium viridicatum* RFC3, *Trichoderma reesei* QM9414, *Thermoascus aurantiacus* and *Thermomyces lanuginosus* CBMAI756 obtained from the solid state fermentation. Among these fermentations, the best individual result of hydrolysis efficiency was obtained with the enzymatic extract of the fungus *T.aurantiacus*, which was then used in the saccharification of bagasse pretreated with reactive oxygen species. The best rate of saccharification was achieved on bagasse pretreated with NaClO resulting in 19.8 % of yield, versus 12.2% in the bagasse *in natura*. The chapter 2 of this work describes the importance of synergism and inhibition of the enzyme in the form of β - glucosidase in the saccharification of bagasse. Synergism between the enzymatic extracts of fungi *P.viridicatum* and *T.reesei* the best combination of the two extracts was observed for the ratio 1:1, resulting in the release of 0.73 mg / mL glucose. The activities of β - glucosidase enzyme present in the extracts were analyzed for the effects of inhibition by glucose. The kinetic parameters K_m and V_{max} of the β -glucosidase enzyme presented, in case of *T.aurantiacus* V_{max} of 4.60 $\mu\text{mol}/\text{min}$ and K_m 0.31 mM and with glucose V_{max} 2.3 $\mu\text{mol}/\text{min}$ and K_m 0.37 mM. For the enzyme from *P.viridicatum* values were V_{max} 166.7 $\mu\text{mol}/\text{min}$ and K_m 0.2 mM and with glucose V_{max} 13.8 $\mu\text{mol}/\text{min}$ and K_m 1.2 mM. The β -glucosidase *T.aurantiacus* suffered from non-competitive inhibition, while *P.viridicatum* suffered mixed enzyme inhibition. We also evaluated the effects of fructose and glucose isomerase as suppressing the inhibitory effect of glucose. The presence of fructose resulted in a positive effect on the β - glucosidase activity of these fungi. The saccharification of sugarcane bagasse with the combination of glucose isomerase enzyme extracts showed an interesting effect, however this result was not confirmed by the quantification of fructose by HPLC.

Keywords: Enzymatic saccharification. β - glucosidase. Inhibition.

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
1.1. <i>Resíduos lignocelulósicos</i>	13
1.1.1. Celulose.....	13
1.1.2. Hemicelulose	15
1.1.3. Lignina	15
1.2. <i>Etanol celulósico</i>	17
1.2.1. Enzimas	18
1.2.1.1. Celulases	18
1.2.1.2. Xilanases	19
1.3. <i>Mecanismo de ação das enzimas glicosídicas</i>	20
1.4. <i>Inibição</i>	21
1.5. <i>Sinergismo enzimático</i>	22
1.6. <i>Glicose isomerase</i>	24
Capítulo 1: Pré-tratamento do bagaço e avaliação da eficiência hidrolítica.....	25
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1. <i>Substratos</i>	29
2.2. <i>Fermentações para produção dos extratos enzimáticos</i>	29
2.2.1. Microrganismos	29
2.2.2. Inóculo	29
2.2.3. Fermentadores	30
2.2.4. Substrato para crescimento e produção das enzimas	30
2.2.5. Inoculação	30
2.2.6. Fermentação em estado sólido (FES).....	31

2.2.7. Extrato bruto concentrado	31
2.2.8. Determinação quantitativa de proteínas.....	31
2.3.1. Atividade de β -glicosidase.....	32
2.3.2. Atividade de Xilanase	32
2.3.3. Atividade de CMCase.....	33
2.3.4. Atividade sobre papel de filtro (FPase).....	33
2.4. Pré-tratamentos com processos oxidativos avançados associados ao micro-ondas...	33
2.5. Caracterização do bagaço de cana <i>in natura</i> e pré-tratado.....	34
2.5.1. Análise composicional	34
2.5.2. Análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR-ATR)	34
2.7. Eficiência de hidrólise.....	34
2.7.1. Hidrólise enzimática	35
3. RESULTADO E DISCUSSÃO	36
3.1. Produção dos extratos enzimáticos	36
3.2. Avaliação da eficiência de hidrólise utilizando Avicel [®] como substrato.....	37
3.3. Caracterização do bagaço de cana <i>in natura</i> e pré-tratado.....	38
3.4. Análise estrutural do bagaço pré-tratado	39
3.5. Hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados	40
4. CONCLUSÃO	43
Capítulo 2: Avaliação do sinergismo enzimático e inibição da β-glicosidase	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.1. Substratos para a FES (<i>Fermentação estado sólido</i>).....	46

2.2. Fermentações para produção dos extratos enzimáticos	47
2.2.1. Microrganismos	47
2.2.2. Inóculo	47
2.2.3. Fermentadores	47
2.2.4. Substrato para crescimento e produção das enzimas	48
2.2.5. Inoculação	48
2.2.6. Fermentação em estado sólido (FES).....	48
2.3. Atividades enzimáticas.....	49
2.3.1. Atividade de β -glicosidase.....	49
2.3.2. Atividade de Avicelase	49
2.3.3. Atividade de CMCase.....	50
2.3.4. Atividade de xilanase.....	50
2.3.5. Atividade sobre papel de filtro (FPase).....	50
2.3.6. Atividade de glicose isomerase	50
2.4. Zimograma para determinação de β -glicosidases	51
2.5. Hidrólise dos substratos	51
2.5.1. Hidrólise enzimática	51
2.5.2. Sacarificação com ação simultânea de GI	52
2.6. Determinação de parâmetros cinéticos.....	52
2.7. Determinação do efeito da concentração de glicose e frutose nas atividades das enzimas β -glicosidases	52
2.8. Análises Cromatográficas.....	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.1. Avaliação do sinérgico durante a hidrólise.....	54
3.2. Atividades enzimáticas.....	55
3.2.1. Efeito da concentração de glicose e frutose nas atividades das enzimas.....	56

3.3. <i>Determinação dos parâmetros cinéticos</i>	59
3.4. <i>Zimograma</i>	61
3.5. <i>Glicose Isomerase</i>	62
3.6. <i>Hidrólise</i>	63
4. CONCLUSÃO	66
5. REFERÊNCIAS	67

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Resíduos lignocelulósicos

Resíduos agroindustriais como palha de cereais, bagaço de cana, casca de sementes, entre outros materiais lignocelulósicos, são utilizados como recursos renováveis na produção de energia elétrica e térmica.

A biomassa lignocelulósica é altamente complexa, formada basicamente por celulose, lignina e hemicelulose, sendo que o conteúdo, a composição e a distribuição desses componentes variam em uma ampla faixa, de acordo com espécie e gênero da planta. As quantidades dos principais componentes da biomassa em relação ao peso seco são de 20-50% de celulose, 15-35% de hemicelulose e 10-30% de lignina, além de outros componentes que compõe a biomassa, como proteínas (3-10%), lipídios (1-5%), açúcares solúveis (1-10%) e minerais (5-10%). Os modelos de paredes celulares mostram microfibrilas de celulose envolvidas por hemicelulose e lignina. A hemicelulose não-ramificada forma ligações de hidrogênio com a celulose, enquanto as cadeias laterais da hemicelulose interagem com a lignina podendo formar ligações covalentes. Essas ligações covalentes também são chamadas de ligações cruzadas. Essa trama lignocelulósica torna difícil a ruptura das microfibrilas de celulose (CHUNDAWAT et al., 2011).

1.1.1. Celulose

A celulose é um dos componentes estruturais da parede celular vegetal, podendo ser classificada como um homopolímero linear constituído de moléculas de glicose ligadas por ligações β -1,4-glucosídicas. A quantidade de celulose depende da espécie de planta, do ambiente, do crescimento e da maturidade. Em geral, o teor de celulose varia de 20-50% em base peso-seco em plantas lignocelulósicas. As cadeias de celulose tendem a se agrupar devido às ligações de hidrogênio que ocorrem entre os grupos hidroxilas (-OH) das moléculas de glicose. Esse agrupamento dá origem às microfibrilas que se agregam em uma matriz de

carboidratos para promover rigidez e força à parede celular da planta. Essas ligações de hidrogênio conferem à celulose propriedades importantes na estrutura microfibrilada (Figura 1), na organização hierárquica (regiões cristalina e amorfa) e na natureza altamente coesiva (LAVOINE et al., 2012).

A celulose pode ter em sua estrutura partes cristalinas e não-cristalinas (amorfas) dependendo da sua formação e tipo de biomassa. A estrutura cristalina é mais rígida e altamente ordenada devido às ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas. Essa região é de difícil acesso para a degradação, aumentando a defesa da planta contra organismos externos. As moléculas de celulose podem ser quebradas em cadeias menores de glicose, chamadas de celodextrinas, as quais têm a propriedade de se tornar compostos altamente biodegradáveis e solúveis. São classificadas pelo grau de polimerização de forma crescente: celobiose, celotriose, celotetose e celopentose (XU, 2010).

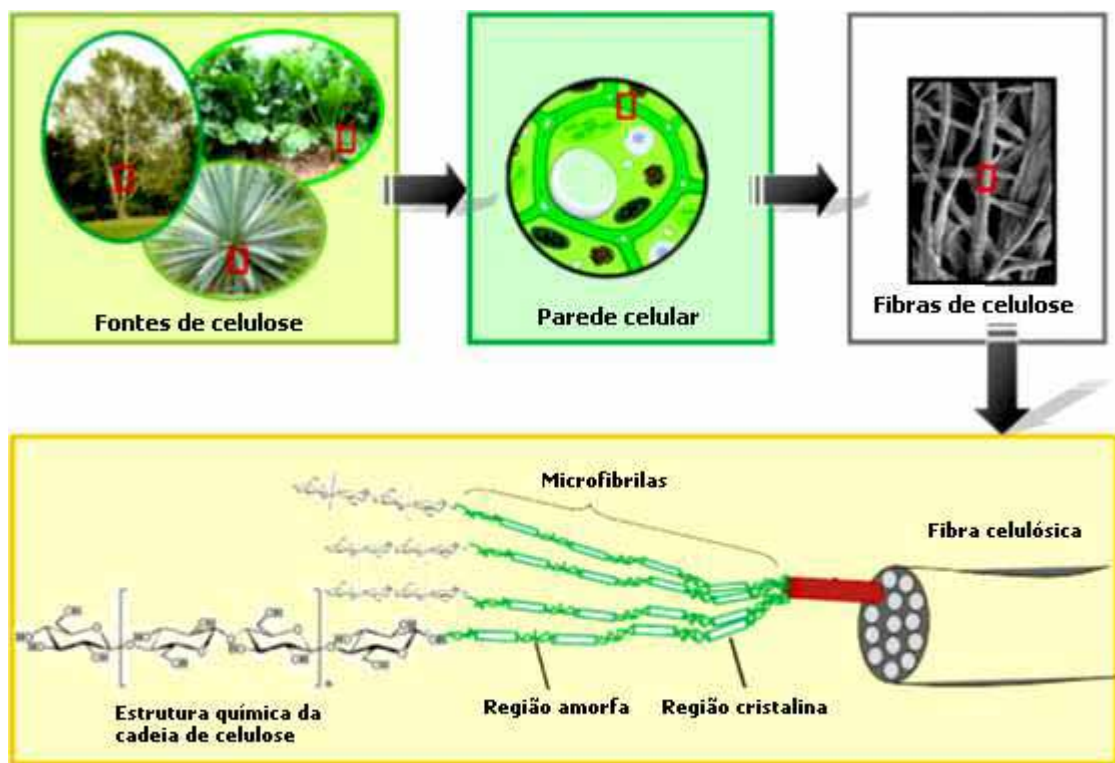


Figura 1: Diferentes fontes de celulose para a estrutura de celulose e detalhes da estrutura de fibras celulósicas (imagem extraída de LAVOINE et al., 2012).

1.1.2. Hemicelulose

A hemicelulose constitui cerca de 15 a 35% da biomassa em geral. É uma classe heterogênea de polímeros contendo pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose) e/ou ácidos urônicos (α -D-glucurônico, α -D-4-O-metilgalacturônico e α -D-ácidos galacturônicos). Outros açúcares, como α -L-ramanose e α -L-fucose, podem estar presentes em pequenas quantidades e os grupos hidroxílicos dos açúcares podem ser parcialmente substituídos por grupos acetilas (GIRIO et al., 2010).

É definido como hemicelulose o material solúvel em meio alcalino após a remoção das pectinas. Esses polímeros são extremamente complexos, devido à gama de componentes que os compõem. As hemiceluloses formam ligações de hidrogênio com a celulose, ligações covalentes com a lignina e ligações éster com unidades de acetila e os ácidos hidroxicinâmicos

As xilanas são os principais componentes das hemiceluloses formadas por unidade de xilose unidas por ligações β -1,4. As xilanas estão disponíveis em grandes quantidades como subprodutos nas florestas, na agricultura, nas agroindústrias e nas indústrias de papel e celulose. (XU,2010).

1.1.3. Lignina

A lignina é um polímero natural presente em todas as plantas terrestres e em alguns organismos aquáticos. Esse polímero é composto por uma classe de compostos fenólicos com diversidade de composições e variedade de ligações entre as unidades de construção (LU;RALPH, 2010).

A lignina é um reservatório metabólico para redução de carbono, e devido à essa propriedade é capaz de armazenar alto teor de energia. Um grama de lignina contem em média 2,27 KJ, 30% a mais do que a energia de hidratos de carbono celulósico. A superfície hidrofóbica da lignina permite que a planta transporte água com auxílio da transpiração. Além disso, a lignina apresenta resistência mecânica e protege a planta de ataques de patógenos e pragas (BONAWITZ;CHAPPLE, 2010).

A biossíntese da lignina é realizada pela via fenilpropanóide. Além da lignina, outros produtos são formados por essa via. A primeira etapa para a formação da lignina é a desaminação da fenilalanina para a formação do ácido cinâmico. Após a primeira etapa ocorre uma série de reações de hidroxilação promovendo a redução da cadeia lateral do ácido cinâmico, formando álcoois aromáticos. Os três álcoois aromáticos mais abundantes formados são p-cumaril, coniferílico e sinapílico. Após a incorporação à lignina, estes monômeros são designados por p-hidroxifenil (H), guaiacil (L), e unidades de siringil (S), respectivamente. A segunda etapa é a de ativação dos monômeros: os compostos são oxidados por intermédio das enzimas lacases e/ou peroxidases, formando espécies radicalares. O polímero se forma pela ligação entre as espécies radicalares. A proporção dos monômeros no polímero formado varia dependendo da espécie e, na mesma planta, dependendo dos estímulos ambientais.

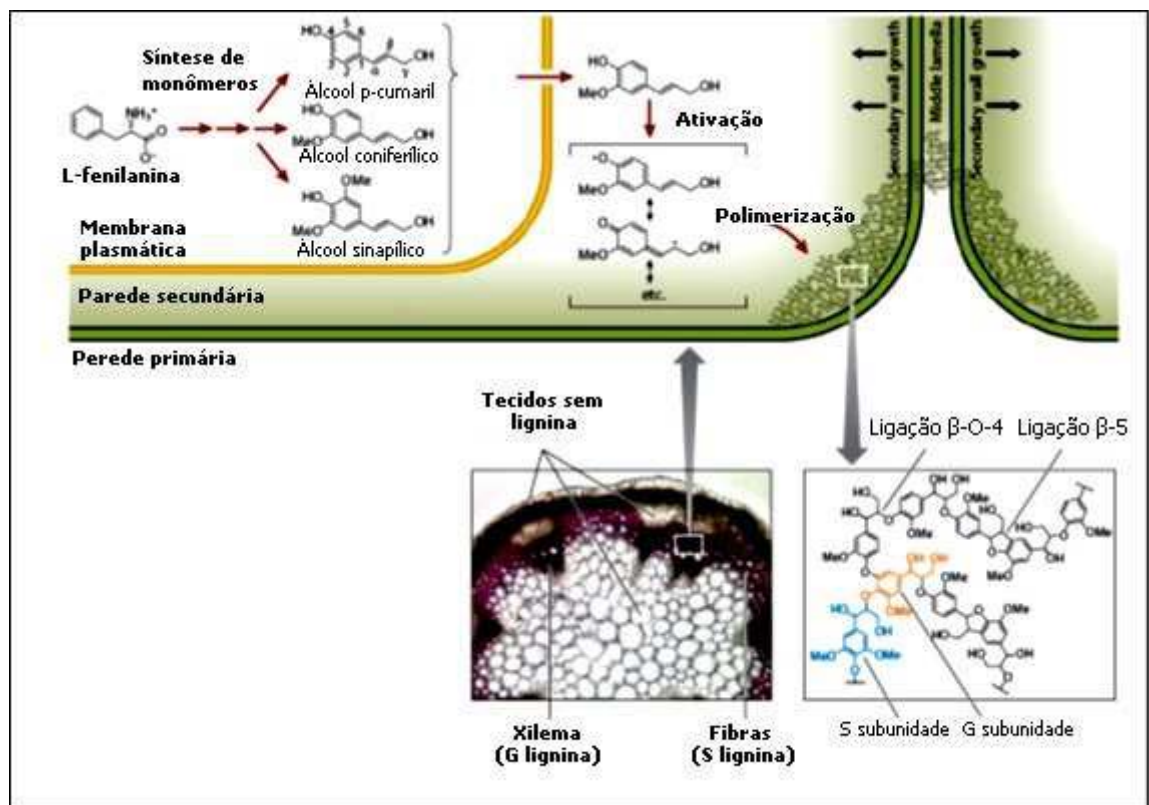


Figura 2: Distribuição e biossíntese da lignina (imagem extraída BONAWITZ, N. D.; CHAPPLE, C. 2010)

1.2. Etanol celulósico

A produção de etanol a partir da sacarificação da biomassa segue caminhos um pouco diferentes da produção de etanol de primeira geração. O processo de produção de etanol celulósico segue basicamente as seguintes etapas: pré-tratamento da biomassa, sacarificação enzimática ou química e fermentação alcoólica.

O pré-tratamento tem como objetivo remover a lignina, aumentar o tamanho dos poros e reduzir a cristalinidade da celulose, tornando-a mais acessível às enzimas hidrolíticas. Um eficiente pré-tratamento deve promover o aumento da formação de açúcares e facilitar a etapa de hidrólise enzimática, mas também deve evitar a degradação ou perda de carboidratos, assim como evitar a formação de subprodutos inibitórios para as etapas de hidrólise e fermentação e, além disso, ser viável do ponto de vista econômico (SUN;CHENG, 2002).

Pesquisas estão sendo desenvolvidas para melhorar e encontrar métodos de pré-tratamento da biomassa que sejam mais eficientes e economicamente viáveis para a produção de etanol celulósico. O pré-tratamento da biomassa pode ser do tipo químico, físico ou biológico. Os melhores resultados encontrados na literatura são por via ácida, cujo inconveniente é a produção de compostos inibidores da fermentação.

A hidrólise da biomassa é o processo de rompimento das ligações β -1,4-glicosídica presentes na celulose para a formação de glicose. Outros compostos podem ser formados decorrentes da hidrólise da hemicelulose e lignina. Métodos convencionais são utilizados para sacarificação da biomassa, como a hidrólise via química ou enzimática.

A hidrólise via química geralmente é realizada por meio de ácidos minerais como H_2SO_4 e HCl . Outros métodos, como a utilização de líquidos iônicos e bases, também são utilizados para esse fim. A hidrólise ácida promove o rompimento das ligações da biomassa lignocelulósica, produzindo monossacarídeos sem a utilização de pré-tratamentos da biomassa. Além dos açúcares, esse tipo de hidrólise promove a formação de outros compostos, como furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético, que interferem na etapa de fermentação alcoólica, promovendo a inibição da via de

fermentação dos organismos fermentadores e resultando em baixo rendimento de etanol (LENIHAN et al., 2010).

A despolimerização da celulose em glicose via enzimática ocorre pela ação de um conjunto de celulasas, envolvendo no mínimo três enzimas: endoglucanases ou endo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanase ou exo- β -1,4-glucanase (EC 3.2.1.91) e a β -glicosidase (EC 3.2.1.21). As endoglucanases hidrolisam internamente a região amorfa da celulose, atuando nas ligações glicosídicas, aleatoriamente, e reduzindo o grau de polimerização da celulose. As exoglucanases hidrolisam as extremidades redutoras e não-redutoras da celulose, aumentando ainda mais o grau de despolimerização e resultando na formação de celobiose. Finalmente, a β -glicosidase hidrolisa a celobiose em moléculas de glicose. O processo de hidrólise enzimática é afetado pela atividade enzimática que é dependente da concentração de substrato, da inibição pelo produto de reação, da temperatura e pH do meio (GUO et al., 2012).

A fermentação alcoólica é a última etapa para a produção de etanol. A hidrólise da biomassa resulta em diversos compostos, dentre os quais açúcares como glicose, xilose, manose, galactose e arabinose. Alguns microrganismos têm a capacidade para converter esses açúcares em etanol, porém a maioria prefere fermentar glicose e frutose. A fermentação alcoólica pode ser reduzida por inibição da via metabólica dos microrganismos na presença de compostos aromáticos provenientes dos pré-tratamentos da biomassa e também em quantidades consideráveis de etanol. (TAHERZADEH;KARIMI, 2010).

1.2.1. Enzimas

1.2.1.1. Celulasas

As celulasas têm grande importância industrial em diversos seguimentos, tais como, na indústria de detergentes, tecidos, papel, ração animal e sucos de frutas. Muitos estudos apontam o grande potencial das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa em glicose para a produção de etanol. As celulasas hidrolisam ligações β -1,4-D presentes na celulose, produzindo glicose, celobiose e celo-oligossacarídeos.

Um grande número de enzimas com diferentes especificidades são requeridas para degradar todos os componentes da lignocelulose. Especificamente, para a celulose, é geralmente aceito que pelo menos quatro tipos de enzimas sejam requeridas para hidrolisar a celulose em monômeros de glicose, a saber: duas exocelulases: celobiohidrolase I (final não redutor), EC 3.2.1.91 e celobiohidrolase II (final redutor), EC 3.2.1.176, uma endo-celulase: endo-1,4- β -glucanases ou endocelulase ou CMCase, EC 3.2.1.4 e uma β -glucosidases ou celobiasas, EC 3.2.1.21 (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NCIUBMB), disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/cont1bb.html>).

A β -glicosidase pode ser considerado a principal enzima no processo de sacarificação enzimática, devido à enzima participar da etapa final de conversão de celulose a glicose. Esse fato é visto em alguns extratos enzimáticos que tem grandes quantidades de endoglucanase e exoglucase e não tem uma boa sacarificação, devido à falta de β -glicosidase (SINGHANIA et al., 2013).

As β -glicosidases estão adquirindo grande valor em vários processos biotecnológicos, como a hidrólise dos glicosídicos de isoflavonas, produção de etanol a partir da biomassa de resíduos agrícolas e a liberação de compostos aromáticos precursores de sabores (ZHENG et al., 2013).

1.2.1.2. Xilanases

As xilanases são classificadas como glicosidases. Essas enzimas são produzidas por diversos organismos, como bactérias, algas, fungos, protozoários, gastrópodes e artrópodes. Em geral os fungos e bactérias excretam xilanases no meio para a atuação das enzimas sobre o material hemicelulósico na liberação de xilose, cujo açúcar serve de alimento para esses organismos (COLLINS;GERDAY;FELLER, 2005).

As endo-1-4- β -xilanases (EC 3.2.1.8) hidrolisam aleatoriamente a hemicelulose, produzindo xilo-oligossacarídeos, essas enzimas também são conhecidas como xilanases. Outras enzimas que complementam a ação das xilanases são as endo-1-4- β -xilosidases (EC 3.2.1.37) ou comumente chamadas de

β -xilosidases, agindo sobre a os xilo-oligossacarídeos e produzindo xilose. Devido ao mecanismo de reação, essas enzimas são utilizadas em diversos seguimentos tecnológicos na indústria de papel, de alimentos e na aplicação em coquetéis enzimáticos comerciais para a sacarificação da biomassa lignocelulósica (DUMON et al., 2012).

1.3. Mecanismo de ação das enzimas glicosídicas

As glicosídeos hidrolases (EC 3.2.1.-) correspondem a um grupo bastante amplo de enzimas e são responsáveis pela clivagem de ligações glicosídicas em glicosídeos, glicanos e glicoconjugados.

A hidrólise de uma ligação glicosídica pode ocorrer por dois mecanismos: por inversão ou retenção da quiralidade do carbono anomérico. Para que ocorra a reação são necessários resíduos ácidos em ambos os lados da glicose. Na clivagem por mecanismo de inversão estequiométrica, menos comum, um dos ácidos tem a função de ácido e o outro de base. Nesse mecanismo o resíduo ácido doa um próton para o carbono anomérico, enquanto ocorre o ataque nucleofílico de uma molécula de água diretamente sobre o mesmo átomo de carbono, então acontecendo o deslocamento do glicosídeo. O outro mecanismo reacional do rompimento da ligação glicosídica é o de retenção de quiralidade, pelo qual os resíduos ácidos da enzima têm duas funções: um dos ácidos age como ácido e base e o segundo como ácido e a molécula de água tem ação nucleofílica. Essa clivagem ocorre pelo mecanismo bimolecular de substituição com formação de um intermediário covalente. Na primeira etapa do mecanismo a glicosilação o próton de um dos resíduos ácidos é doado para o oxigênio da ligação entre os glicosídeos. Em contrapartida ocorre o ataque nucleofílico no carbono anomérico pelo outro resíduo ácido formando um intermediário covalente. Na segunda etapa uma molécula de água efetua um ataque nucleofílico sobre o intermediário covalente, a ligação covalente é rompida e o ácido doador de próton na primeira etapa agora atua como base conjugada retirando o próton da molécula de água e assim o glicosídeo é formado (CAINS;ESEN, 2010).

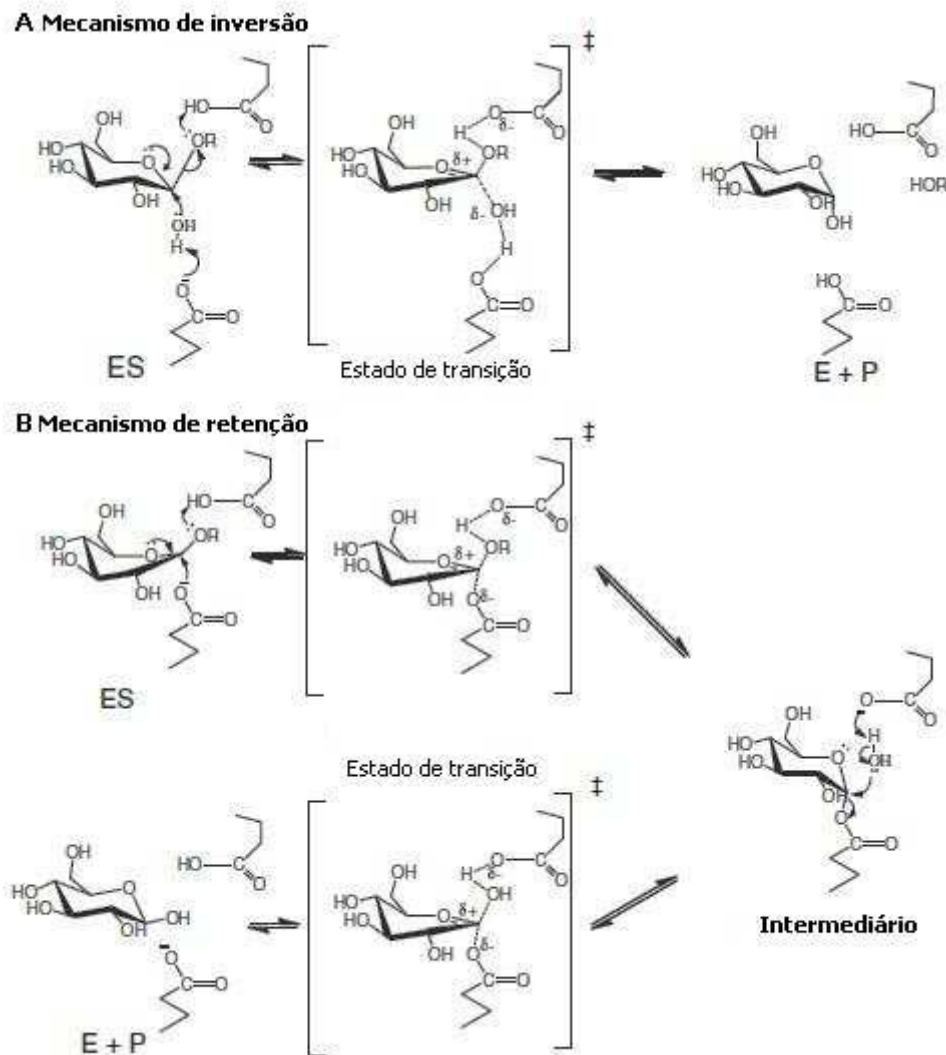


Figura 3: Mecanismos catalíticos de inversão (A) e de retenção (B) das enzimas glicosídicas (imagem extraída de CAINS;ESEN, 2010)

1.4. Inibição

Alguns inibidores de celulasas podem ser formados durante o pré-tratamento da biomassa. Os compostos fenólicos que são formados durante o pré-tratamento aparecem como os mais fortes inibidores da produção de enzimas e na atividade das enzimas. Há evidências de que a vanilina seja um dos compostos com maior nível inibitório. Além da inibição por compostos fenólicos, substâncias derivadas da xilana, como xilose e arabinose, podem causar inibição na ação de coquetéis

enzimáticos contendo celulases e β -glicosidases, portanto torna-se difícil a utilização de coquetéis mistos de celulases e hemicelulases (XIMENES et al., 2010).

A cadeia de reações da hidrólise da celulose dá origem a produtos como a celobiose e a glicose. Infelizmente, os sistemas de enzimas celulolíticas atualmente empregados, que incluem as enzimas de *Trichoderma reesei* amplamente estudadas, são significativamente inibidos pelos produtos de hidrólise, celobiose e glicose (Figura 4) (Andrić et al. 2010), de forma que é necessário o estudo de inibição para cada enzima que se proponha em estudos de sacarificação de biomassas.

Celobiose, o principal produto da ação da celobiohidrolase e produto secundário da endoglucanase, inibe diretamente ambas celobiohidrolases e endoglucanases (Grano et al., 2004). Glicose inibe diretamente a β -glicosidase, mas também inibe as celobiohidrolases e endoglucanases (Holtzapfle et al., 1990 CAMPBELL, 2000). O entendimento desses mecanismos inibitórios permite propor rotas de remoção dos inibidores, resultando em processos mais eficientes, de menor custo e o uso de menor quantidade de enzimas.

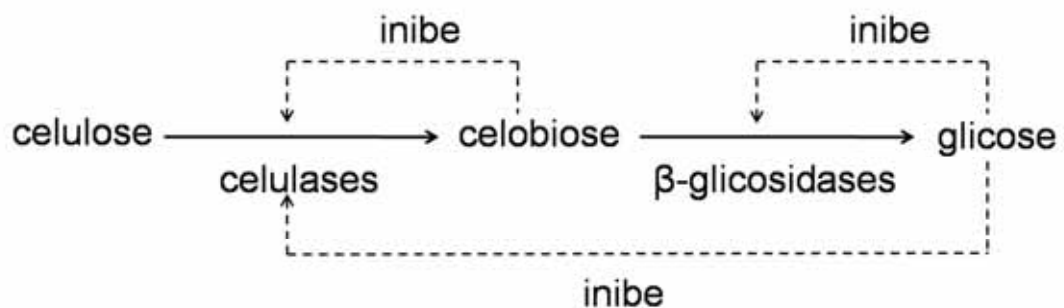


Figura 4: Inibição por feedback das celulases.

Além disso, pode ocorrer a reação inversa ou transglicosilação, na qual as moléculas da glicose se unem novamente formando di-, tri-, e oligossacarídeos (ANDRIC et al., 2010).

1.5. Sinergismo enzimático

As misturas com enzimas celulolíticas podem ter rendimento maior na conversão de substratos de celulose em glicose do que a utilização das enzimas celulolíticas separadamente. Esse efeito ocorre devido às interações sinérgicas entre as exoglucanases, endoglucanases e β -glicosidases durante a hidrólise de degradação da celulose (MEYER et al., 2009).

O sinergismo enzimático é um termo que exprime o rendimento de produto durante a ação de um conjunto de enzimas em relação ao rendimento da reação quando essas mesmas enzimas são utilizadas isoladamente nas mesmas proporções empregadas na mistura. A ação sinérgica das enzimas vai depender das características específicas das enzimas e do substrato utilizado. No caso de sacarificação de materiais lignocelulósicos há a necessidade de coquetéis enzimáticos com enzimas principais como exoglucanases, endoglucanases e β -glicosidases e enzimas chamadas de acessórias como xilanases. Essa necessidade é devido à complexidade da biomassa, pois a ação das celulasas é impedida pela presença de hemicelulose e lignina, porém a utilização de pré-tratamentos na biomassa para a retirada de lignina e hemicelulose pode aumentar ainda mais a dificuldade de uma mistura enzimática de degradação ideal, devido à presença de compostos inibidores formados durante o pré-tratamento (VAN DYK; PLETSCHE, 2012).

A técnica de hidrólise com o uso de coquetéis enzimáticos pode ser uma alternativa para diminuir o efeito inibitório. O aumento da eficiência da hidrólise poderia ser obtido buscando o sinergismo entre as celulasas produzidas por fungos diferentes. Estudos realizados por Pinto (2010) apresentaram resultados satisfatórios em relação à mistura de extratos enzimáticos, aumentando em 30% a hidrólise enzimática, porém o estudo foi realizado com os fungos *Thermoascus aurantiacus* e *Trichoderma reesei* em apenas uma concentração. A otimização e o estudo mais aprimorado do processo de hidrólise com misturas dos complexos enzimáticos produzidos por diferentes fungos poderia apresentar bons resultados.

Todavia, sabe-se que nenhum fungo produz todas as enzimas necessárias para degradar totalmente o material lignocelulósico. Alguns fungos produzem altos níveis de xilanase ativa contra a xilana linear (esqueleto de xilana) ou endocelulase ativas contra a celulose, mas são incapazes de degradar xilanas complexas ou

ligadas a celulose. Outros fungos que produzem relativamente baixos níveis de xilanases/celulases secretam muitas enzimas acessórias úteis para a hidrólise completa. A eficiente degradação do complexo lignocelulósico necessita da colaboração de muitas enzimas que degradem o complexo.

1.6. Glicose isomerase

Na indústria é muito utilizado o processo de isomerização de glicose por glicose isomerase (EC 5.3.1.5) para a produção de xaropes de frutose, esse processo tem sido desenvolvido na área de tecnologia enzimática (CAMACHO-RUBIO *et al*, 1996). Além da aplicação da glicose isomerase na produção de xaropes, essa enzima também tem grande potencial na produção de etanol a partir de hemicelulose, pois ela pode promover a isomerização da xilose em xilulose, esse açúcar pode ser fermentado em etanol, pois a xilulose apresenta uma gama metabólica maior para o processo de fermentação em relação a xilose que pode ser fermentada na via das pentoses oxidoredutases, porém o rendimento de produção de etanol é muito baixo devido a limitações da via de fermentação (BHOSALE *et al*, 1996).

Capítulo 1
Pré-tratamento do bagaço
e avaliação da eficiência hidrolítica

1.INTRODUÇÃO

Devido à grande importância que se tem dado atualmente às questões ambientais e ao aumento constante nos sistemas de produção, a problemática de resíduos, particularmente aqueles provenientes da agroindústria, tem se tornado tema de grande preocupação e de intensos estudos, no qual se busca desenvolver processos para redução, tratamento e disposição desses resíduos. No entanto, o estado da arte em questão de resíduos está em agregar valores a esses resíduos, permitindo que um processo industrial seja acoplado a outro, com subprodutos de valor comercial (SOCCOL *et al.*,2010).

Dentro destas novas tendências, a utilização de resíduos da indústria sucroalcooleira tem se destacado tanto pelas propriedades de seus resíduos quanto por sua abundância, devido a crescente substituição gradativa da utilização de combustíveis fósseis pelo etanol.

A celulose dos materiais lignocelulolíticos como o bagaço de cana-de-açúcar, pode ser hidrolisada à glicose. Esse açúcar pode ser posteriormente utilizado na produção de etanol. As técnicas mais comuns de hidrólise da celulose são por via ácida ou enzimática. Na hidrólise utilizando ácidos como catalisadores, ocorre a formação de compostos secundários que interferem, ou mesmo inviabilizam, a fermentação alcoólica (etapa subsequente à hidrólise da produção de etanol). Já na hidrólise enzimática, devido à sua alta especificidade, não há a formação dos subprodutos inibidores da fermentação, no entanto a biomassa deve passar por etapas de pré-tratamento, para desestruturação da estrutura lignocelulósica, obtendo assim maior acessibilidade das enzimas à celulose, conseqüentemente produzindo maiores quantidades de açúcares fermentescíveis. (MARTIN *et al.*, 2002).

A etapa anterior à hidrólise é o pré-tratamento que tem como objetivo remover a lignina, aumentar o tamanho dos poros e reduzir a cristalinidade da celulose, tornando-a mais acessível às enzimas hidrolíticas. Um eficiente pré-tratamento deve promover o aumento da formação de açúcares e facilitar a subsequente etapa de hidrólise enzimática, mas também deve evitar a degradação ou perda de carboidratos, assim como evitar a formação de subprodutos inibitórios para as

etapas de hidrólise e fermentação e, além disso, ser viável do ponto de vista econômico (SUN & CHENG, 2002).

Pesquisas estão sendo desenvolvidas para melhorar e encontrar métodos de pré-tratamento mais eficientes e economicamente viáveis. O pré-tratamento da biomassa pode ser do tipo químico, físico ou biológico. Os melhores resultados encontrados na literatura são por via ácida, o inconveniente da técnica é a produção de compostos inibidores da fermentação.

A adição de algumas substâncias, como peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, ozônio, entre outras, podem formar espécies reativas de oxigênio, por exemplo, oxigênio singlete, os radicais hidroxilas e superóxido. Essas espécies promovem a clivagem de ligações carbono-carbono, abertura de anéis aromáticos e a liberação de cadeias laterais. Como discutido anteriormente a lignina possui uma estrutura propícia para o ataque oxidativo. Espécies reativas de nitrogênio podem causar o mesmo efeito, pois são radicais que reagem oxidativamente com ligações entre carbono-carbono. As espécies reativas de oxigênio tende a reagir prioritariamente com a lignina devido a esta apresentar uma estrutura com alto teor de duplas ligações conjugadas e alta densidade eletrônica em relação à celulose e hemicelulose. A vantagem desse pré-tratamento, além dos altos teores de deslignificação, é a não formação de compostos inibidores da fermentação (GARCÍA-CUBERO, 2009) (LEE, 2009)

A segunda etapa do processo após o pré-tratamento, chamada de sacarificação, é a despolimerização da celulose em glicose por via enzimática e ocorre pela ação de um conjunto de celulases, sendo no mínimo três enzimas: endoglucanases ou endo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanase ou exo- β -1,4-glucanase (EC 3.2.1.91) e a β -glicosidase (EC 3.2.1.21). As endoglucanases hidrolisam internamente a região amorfa da celulose, atuando nas ligações glicosídicas, aleatoriamente, reduzindo o grau de polimerização da celulose. As exoglucanases hidrolisam as extremidades redutoras e não-redutoras da celulose, aumentando ainda mais o grau de despolimerização e resultando na formação de oligossacarídeos, principalmente celobiose. Finalmente, a β -glicosidase hidrolisa a celobiose e outros oligossacarídeos pequenos em moléculas de glicose (MARGEOT *et al*, 2009).

A cadeia de reações da hidrólise da celulose apresenta uma regulação por retro-inibição, na qual a atividade enzimática decresce em concentrações altas do seu produto. A β -glicosidase é fundamental nesse processo por remover celobiose do meio, evitando o seu efeito inibidor sobre as celulases envolvidas no processo (FLACHNER *et al*, 1999). No entanto, a glicose, que é o produto da hidrólise da celobiose, inibe a β -glicosidase, tornando o processo todo menos eficiente. Essa inibição pode ser competitiva ou não-competitiva, dependendo da forma molecular da enzima produzida pelo fungo utilizado para a sua produção (LEITE, 2007).

Alguns métodos estão sendo propostos a fim de minimizar as inibições enzimáticas durante a hidrólise da celulose como, por exemplo, o método de hidrólise simultânea à ultra-filtração na qual a glicose é removida ou o método de simultânea sacarificação e fermentação (SSF), no qual, a glicose é transformada em etanol por fermentação simultânea com a hidrólise enzimática, reduzindo o efeito inibidor (SUN; CHENG, 2002).

Outra técnica para diminuir o efeito inibidor é o uso de coquetéis enzimáticos, visto que enzimas de fontes diferentes podem responder diferentemente à ação dos inibidores. O aumento da eficiência da hidrólise poderia ser obtido buscando o sinergismo entre diferentes enzimas. Estudos de sacarificação foram feitos com coquetéis, demonstrando resultados satisfatórios na sacarificação de materiais lignocelulósicos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o emprego de coquetéis enzimáticos obtidos de diferentes culturas fúngicas em processo de sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Substratos

O farelo de trigo foi obtido do comércio local. O bagaço de cana-de-açúcar foi cedido pela Usina Vale, localizada na Estância Vale do Rio Turvo, s/n na zona rural do município de Onda Verde-SP. A palha de arroz foi concedida de beneficiadora de arroz situada em Ariranha-SP e a casca de café foi cedida pela empresa COCAM, situada em Catanduva. Todos os substratos foram lavados com água corrente e em seguida com água destilada para remoção dos resíduos de açúcares, seguido de secagem em estufa a 50 °C com ventilação até a estabilização do peso seco.

O farelo de trigo, a palha de arroz e a casca de café foram utilizados no tamanho original. O bagaço passou por processo de moagem e peneirado em peneira granulométrica para a homogeneização do tamanho das partículas (1 - 2 mm).

2.2. Fermentações para produção dos extratos enzimáticos

2.2.1. Microrganismos

Foram testados os fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Penicillium viridicatum* RFC3 e *Trichoderma reesei* QM9414, a partir das culturas que se encontram estocadas na coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José do Rio Preto, em tubos de ensaio com PDA (*Potato Dextrose Agar*) submersos em óleo mineral, em câmara fria a 5 °C.

2.2.2. Inóculo

Foram utilizados para o preparo da suspensão de inóculo dois erlenmeyers de 250 mL contendo 50,0 mL de PDA inclinado. O fungo *Penicillium viridicatum* RFC3 e

Trichoderma reesei QM9414 foram incubados a 28 °C durante 14 dias. O fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756 e *Thermomyces lanuginosus* foram incubados a 50 °C durante 2 dias. Para obtenção da suspensão de esporos/micélios foi utilizada a solução salina proposta por Toyama e Ogawa (1978): 0,35% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3% de KH_2PO_4 , 0,05% de $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,05% de CaCl_2 .

2.2.3. Fermentadores

Foram utilizados como fermentadores, sacos de polipropileno de 15 cm x 30 cm, acoplados com bocal de PVC de 3,5 cm de comprimento e 1,5” de diâmetro, tampados com tampão de algodão envolto por gaze, para garantir a troca de gases e assegurar que não ocorresse qualquer contaminação.

2.2.4. Substrato para crescimento e produção das enzimas

Foram utilizados 5,0 g de substrato por fermentador, adicionado de 5,0 mL da solução salina e esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 30 minutos.

2.2.5. Inoculação

a) *P. viridicatum* RFC3 e *T. reesei* QM9414

Após catorze dias de incubação do pré-inóculo em meio inclinado os esporos de cada erlenmeyer foram suspensos em 50,0 mL da solução salina por cuidadosa raspagem da superfície com alça de platina. A quantidade de esporos em solução foi determinada através da adição de 1,0 µL da suspensão em câmara de Neubauer, seguida de contagem em microscópio ótico. Os fermentadores contendo os substratos e já esterilizados foram inoculados com volumes de suspensão padronizados com $5,0 \times 10^7$ esporos, em seguida os meios foram completados com solução salina para um volume final de 20,0 mL (incluindo os 5,0 mL adicionados antes da autoclavagem), resultando em 65% de umidade, suficientes para umedecer o meio durante a fermentação sem a presença de água livre.

b) *T.aurantiacus* CBMAI756 e *T. lanuginosus*

A inoculação dos fungos foi realizada após dois dias de incubação do pré-inóculo no meio inclinado. As estruturas miceliares, micélio e ascósporos, foram suspensos nos erlenmeyers de pré-inocúlo em 50,0 mL da solução salina por raspagem da superfície com alça de platina. Os fermentadores com os substratos, devidamente esterilizados, foram inoculados com 5,0 mL da suspensão. Em seguida o volume foi completado com solução salina para um volume final de 20,0 mL.

2.2.6. Fermentação em estado sólido (FES)

Os fermentadores contendo o substrato inoculado com *T. aurantiacus*, *T. lanuginosus*, *P. viridicatum* e *T. reesei* foram incubados durante cinco dias, nas temperaturas de 50 e 28 °C, respectivamente para os fungos termofílicos e mesofílicos. As enzimas foram extraídas pela adição de 100 mL de água destilada, seguido de homogeneização com bastão de vidro para desaglomeração das estruturas miceliares. A suspensão foi transferida para erlenmeyers de 250 mL onde permaneceram em agitador orbital a 100 rpm por 1 hora. Após agitação as amostras foram centrifugadas a 20000 xg durante 20 minutos a 5 °C, para a remoção das células e o sobrenadante foi denominado como extrato enzimática bruto.

2.2.7. Extrato bruto concentrado

Os extratos enzimáticos dos fungos *T. aurantiacus*, *T. lanuginosus*, *P. viridicatum* e *T. reesei* obtidos por fermentação foram concentrados cinco vezes em relação ao volume inicial no concentrador QuixStand™ benchtop systems (GE Healthcare)

2.2.8. Determinação quantitativa de proteínas

O teor total de proteína foi quantificado utilizando o método de Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina como padrão.

2.3. Atividades enzimáticas

2.3.1. Atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada com 50,0 μ L do extrato enzimático bruto devidamente diluído para garantir a linearidade de V_o da reação enzimática, 250,0 μ L de tampão 0,1 M em pH 5,0 e 250,0 μ L de 4-nitrofenol-D-glicopiranosídeo (PNPG, Sigma) 4 mM, por 10 minutos em banho termostático a 60 °C para *T. aurantiacus* e *T. lanuginosus*, e a 45°C para *P. viridicatum* e *T. reesei*. A reação foi interrompida pela adição de 2,0 mL de NaCO₃ 2 M e o nitrofenol liberado foi quantificado em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de nitrofenol por minuto de reação a partir da curva padrão de nitrofenol.

2.3.2. Atividade de Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada com 0,1 mL do extrato enzimático convenientemente diluído, 0,9 mL de xilana 1,0% (Xylan Birchwood, Sigma Co.) em tampão ácido acético/NaOH 0,1 M pH 5,0, por 10 minutos em banho termostático a 60 °C *T. aurantiacus* e *T. lanuginosus* e 45°C para *P. viridicatum* e *T. reesei*. A reação foi interrompida após 10 minutos pela adição de 1,0 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico). O volume resultante foi colocado em banho de ebulição durante 10 minutos e em seguida foi acrescido de 8,0 mL de água destilada, finalmente a quantidade de glicose liberada foi medida por espectrofotometria a 540 nm (MILLER,1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto de reação, de acordo com a quantificação com a curva padrão do açúcar redutor correspondente.

2.3.3. Atividade de CMCase

A atividade de CMCase foi realizada por procedimento idêntico ao descrito no tópico 6.3.2. (Atividade de Xilanase), exceto o substrato que foi substituído pela carboximetilcelulose a 1% (Sigma).

2.3.4. Atividade sobre papel de filtro (FPase)

A atividade de FPase foi determinada com 0,5 mL do extrato enzimático bruto devidamente diluído, 1 mL de tampão 0,1 M em pH 5,0 e o substrato utilizado foi 50 mg de uma faixa de papel de filtro Whatman No. 1 (1,0 x 6,0 cm), a reação ocorreu por 1 hora em banho termostático a 50 °C para *T. aurantiacus* e *T. lanuginosus* e a 45°C para *P. viridicatum* e *T. reesei* . A reação foi interrompida pela adição 3,0 mL DNS, a solução foi colocada em banho de ebulição por 5 min. Após o banho de ebulição foi adicionado 16 mL de água em todas as amostras. A quantificação dos açúcares redutores foi feita em espectrofotômetro a 540 nm (EVELEIGH *et al.* 2009).

2.4. Pré-tratamentos com processos oxidativos avançados associados ao micro-ondas

O pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar foi realizado em reator (um balão) suspenso no interior do micro-ondas com rotação fixa. Adicionou-se no reator 5g de bagaço de cana com partículas de (2mm a 5mm) e 40 mL de solução. Os experimentos foram realizados em triplicata e com quatro soluções diferentes: 3% H₂O₂ em pH 8,0 (solução ajustada com NaOH), 3% H₂O₂ em pH 6,0 (solução ajustada com HCl), 3% KMnO₄ e água sanitária comercial START[®] que continha 3% de cloro ativo como NaClO. Os experimentos tiveram duração de 2 min no micro-ondas e mais 1h de repouso, no qual permaneceram tampados. Posteriormente o bagaço já tratado foi submetido à lavagem com 6% w/w de água destilada durante 1h a 25°C sob agitação de 300 rpm, em seguida foi filtrado e o material sólido foi seco em estufa a 37°C.

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

2.5.1. Análise composicional

A determinação de celulose, hemicelulose e lignina foi realizada pela hidrólise do bagaço de cana com ácido sulfúrico. Foi pesado 0,3 g de bagaço (moído a 20 mesh) em béquer e foi adicionado 3,0 mL de H₂SO₄ 72% v/v, em banho termostaticado a 30°C por 1h, sob agitação. Foram adicionados as amostras 84 mL de água destilada, que foram autoclavadas por 30 min a 121°C. Após esse processo, as amostras foram filtradas em papel de filtro qualitativo. A fração líquida foi utilizada para análises de carboidratos e lignina solúvel. Os carboidratos foram quantificados por HPAEC-PAD (ICS 5000, Dionex Corporation, EUA). A lignina solúvel foi determinada pela medida de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro. E a fração insolúvel foi colocada em estufa a 105°C até obter peso constante para a determinação de lignina insolúvel (Sluiter et al,2011).

2.5.2. Análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FT-IR)

Para a caracterização do bagaço por Perkin Elmer (FT-IR Spectrum Two – UATR Two) o feixe de luz foi direcionado em 10 posições no mesmo (oito espectros) devido a heterogeneidade das fibras e, a partir disso, foi determinado um espectro médio para cada amostra. Todo processo foi realizado em triplicata e o bagaço *in natura* foi usado como amostra de referência.

2.6. Hidrólise dos substratos

2.7. Eficiência de hidrólise

O volume da suspensão de reação foi ajustado para 5 mL final com 0,1 M tampão acetato de sódio (pH 5,0) e contendo os seguintes componentes dissolvidos:

1,5% de Avicel[®] PH-101 (Merck[®]) e 0,5 mg/mL de proteínas contidas na extratos enzimáticos dos *T. aurantiacus*, *T. lanuginosus*, *P. viridicatum* e *T. reesei* foi avaliado a ação das enzimas de cada fungo separadamente. A mistura foi incubada em frasco agitado a 60°C para *T.aurantiacus* e *T. lanuginosus* e 45°C para *P.viridicatum* e *T.reesei*, a 150 rpm durante 24h. O açúcar formado foi determinado por somogy-nelson.

2.7.1. Hidrólise enzimática

O volume da suspensão de reação foi ajustado para 5 mL final com 0,1 M tampão acetato de sódio (pH 5,0) e contendo os seguintes componentes dissolvidos: 2,0% de bagaço e 1 mL de extrato enzimático do *T. aurantiacus* contendo 10 FPU/g de celulose e também utilizou-se o complexo comercial NS22086 (Novozymes[®]) contendo 30 FPU/g de celulose. Foi avaliada a ação das enzimas de cada complexo separadamente. A mistura foi incubada em frasco agitado a 60°C para *T.aurantiacus* e 45°C para o complexo comercial, a 150 rpm durante 24h. O teor de açúcares redutores foi analisados pelo método DNS. Os rendimentos de hidrólise foram calculados pela quantidade de açúcar redutor total em relação à quantidade total de celulose e hemicelulose.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1. Produção dos extratos enzimáticos

Na produção de enzimas foram utilizados quatro fungos diferentes e com cada um foram feitas fermentações com quatro substratos diferentes. O intuito do experimento era avaliar se com substratos diferentes os fungos produziram mais ou menos quantidade de enzimas e também a eficiência das celulases nos extratos. O melhor substrato para a produção de celulases e xilanase, segundo o experimento, foi o farelo de trigo e subsequentemente a casca de café. Em destaque o fungo que mais produziu foi o *T. aurantiacus* com 22,6 U/mL de β -glicosidase, 73,9 U/mL de xilanase e 34,6 U/mL de CMCCase.

Tabela 1: Resumo das atividades enzimáticas dos extratos enzimáticos brutos obtidos do fungo *T.aurantiacus*.

<i>T.aurantiacus</i>	β -glicosidase (U/mL)	Xilanase (U/mL)	CMCase (U/mL)
Farelo de trigo	22,63	73,90	34,57
Palha de arroz	0,92	1,31	0,35
Bagaço de cana	0	8,70	3,5
Casca de café	3,33	9,21	4,73

Tabela 2: Resumo das atividades enzimáticas dos extratos enzimáticos brutos obtidos do fungo *T.lanuginosus*.

<i>T.lanuginosus</i>	β -glicosidase (U/mL)	Xilanase (U/mL)	CMCase (U/mL)
Farelo de trigo	0,89	0,24	0
Palha de arroz	0,92	0	0
Bagaço de cana	0	0	0
Casca de café	0,46	0,25	0

Tabela 3: Resumo das atividades enzimáticas dos extratos enzimáticos brutos obtidos do fungo *T.reesei*.

<i>T.reesei</i>	β -glicosidase (U/mL)	Xilanase (U/mL)	CMCase (U/mL)
Farelo de trigo	0,82	0,24	0,03
Palha de arroz	0	0	0
Bagaço de cana	0	0	0
Casca de café	0,75	0,27	0,04

Tabela 4: Resumo das atividades enzimáticas dos extratos enzimáticos brutos obtidos do fungo *P. viridicatum*.

<i>P. viridicatum</i>	β -glicosidase (U/mL)	Xilanase (U/mL)	CMCase (U/mL)
Farelo de trigo	7,2	6,5	0,05
Palha de arroz	0	0	0
Bagaço de cana	0	0	0
Casca de café	1,54	0,28	4,91

3.2. Avaliação da eficiência de hidrólise utilizando Avicel[®] como substrato

Para avaliar o seu potencial de sacarificação e compreensão da ação dos extratos enzimáticos sobre a fibra de celulose foi selecionada a melhor fermentação de cada fungo em relação às atividades enzimáticas de CMCase e β -glicosidase. Os testes foram realizados em sacarificação de Avicel[®], como substrato sintético. As quantidades de extrato enzimático foram determinadas pela quantidade de proteína. Também se utilizou uma enzima comercial a fim de comparar os resultados obtidos com as enzimas produzidas no presente trabalho.

O grau de conversão em relação aos açúcares redutores foi de 18% para a enzima comercial, 4% para o extrato do fungo *T. aurantiacus* e de 1% para os extratos produzidos por *P. viridicatum* e *T. reesei*. Não foi realizado o experimento com o extrato enzimático do fungo *T. lanuginosus*, por não apresentar quantidades apreciáveis de proteínas totais. O resultado entre os extratos produzidos foi o esperado, pois o *T. aurantiacus* possui a maior atividade enzimática de CMCase dentre outros extratos produzidos durante o trabalho. A atividade de β -glicosidase do *P. viridicatum* é maior que a do *T. aurantiacus*, porém não produziu quantidades suficientes de CMCase para que fosse possível uma boa conversão de celulose em glicose (Tabela 5). Isso também mostra o efeito sinérgico existente entre as celulasas e a importância da CMCase no complexo celulolítico.

Tabela 5: Eficiência de hidrólise utilizando como substrato Avicel 1,5% e 0,5mg/g de proteína 24h.

	Enzima Comercial	<i>T.aurantiacus</i>	<i>T.reesei</i>	<i>P.viridicatum</i>
Proteínas (mg/substrato)	0,5	0,5	0,5	0,5
CMCase (U/mL)	0	34,6	0,1	0
β -glicosidase (U/mL)	442	22,6	3,8	33,7
Açúcar redutor total (mg/mL)	13,3	3,1	0,6	0,5
Grau de conversão (%)	18	4	1	1

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

O bagaço *in natura* seco com tamanho entre 2 mm a 5 mm, continha 54% de celulose, 18% de hemicelulose e 27,5% de lignina. As amostras de bagaço pré-tratadas com micro-ondas combinado com soluções de espécies reativas de oxigênio após o tratamento não apresentaram aumento no teor de celulose e hemicelulose. Em relação ao teor de lignina os pré-tratamento com ClO^- e MnO^-4 foram os únicos em que ocorreram diminuição de lignina, sendo o bagaço pré-tratado com ClO^- o que apresentou maior conversão de lignina insolúvel em solúvel em relação ao bagaço *in natura*.

As espécies reativas de oxigênio podem produzir oxigênio singlete, os radicais hidroxilos e superóxidos. Essas espécies promovem a clivagem de ligações carbono-carbono, abertura de anéis aromáticos e a liberação de cadeias laterais. A lignina possui uma estrutura propícia ao ataque oxidativo dessas espécies reativas de oxigênio (LEE, 2009). A irradiação de micro-ondas sobre a fibra de cana pode ocasionar alteração na estrutura da celulose, degradar a lignina e aumentar a susceptibilidade das enzimas sobre o material lignocelulósico. Além disso, como se sabe, o aumento da temperatura acelera a velocidade da reação, o que contribui para a diminuição do tempo de processamento.

Tabela 6: Caracterização dos bagaços de cana tratados e não-tratado

Amostras	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina ácida solúvel (%)	Lignina ácida insolúvel (%)
In natura	54	18	5	22,5
H ₂ O ₂ (OH ⁻)	52	16	5	24
H ₂ O ₂ (H ⁺)	53	17	5,5	26,5
ClO ⁻	50	17	6,5	20,5
MnO ⁻⁴	50	14	5	20

3.4. Análise estrutural do bagaço pré-tratado

As análises realizadas através de FTIR das amostras de bagaço de cana são mostradas na figura 15. Os espectros de IR apresentam a biomassa sobre o aspecto da sua constituição geral de celulose, hemicelulose e lignina. Em algumas regiões no espectro é possível observar a características dos três grupos funcionais como OH (3400-3200 cm⁻¹), C=O (1765-1715 cm⁻¹), C-O-C (1270 cm⁻¹), e C-O-(H) (1050 cm⁻¹), esses grupos representam alcenos, ésteres, cetonas, álcool e hidrocarbonetos aromáticos.

Em relação à lignina que apresenta impressão digital na região de 800 a 1600 cm⁻¹ para espectros de IR. As principais modificações foram observadas nas bandas 833 cm⁻¹, 1036 cm⁻¹, 1042 cm⁻¹, 1511 cm⁻¹ e 1600 cm⁻¹. A banda de absorção em 1600 cm⁻¹ está diretamente interligada a vibrações do estiramento muito forte de anel aromático e de grupos C=O. Por ser visto que em 1511 cm⁻¹ a banda de absorção que está relacionada com vibrações do grupo fenil de macromoléculas de lignina, esta banda pode ser usada para fins de observação da degradação da lignina. As vibrações de alongamento assimétricos das ligações C-O-C em éteres ou para grupos hidroxilos fenólicos são representados pelas bandas 1242 cm⁻¹ e 1210 cm⁻¹, essas bandas permitem a detecção do grupo aromático guanacil que é característico de ligninas. A banda intensa em 1036 cm⁻¹ é referente à deformação da ligação C-H aromática no plano e do alongamento de C=O não conjugado. E a banda em 830 cm⁻¹ está relacionada com as vibrações de deformação C-H no anel aromático fora do plano (SOUZA-CORREA, 2013).

Em todos os pré-tratamentos pode-se observar a diminuição na intensidade das bandas de absorção de 1740 cm^{-1} e 1242 cm^{-1} que pode estar relacionada com a diminuição do teor de celulose e hemicelulose em relação ao bagaço *in natura*. Visto que no pré-tratamento com ClO^- houve maior diminuição das bandas de absorção que caracterizam o teor de lignina, o que mostra a degradação da lignina durante o pré-tratamento e pode ser correlacionado com a conversão de lignina insolúvel em solúvel. No pré-tratamento com MnO^-4 também se observa a diminuição nas bandas de absorção correspondentes a lignina, afirmando o resultado obtido na caracterização composicional do bagaço dessa amostra.

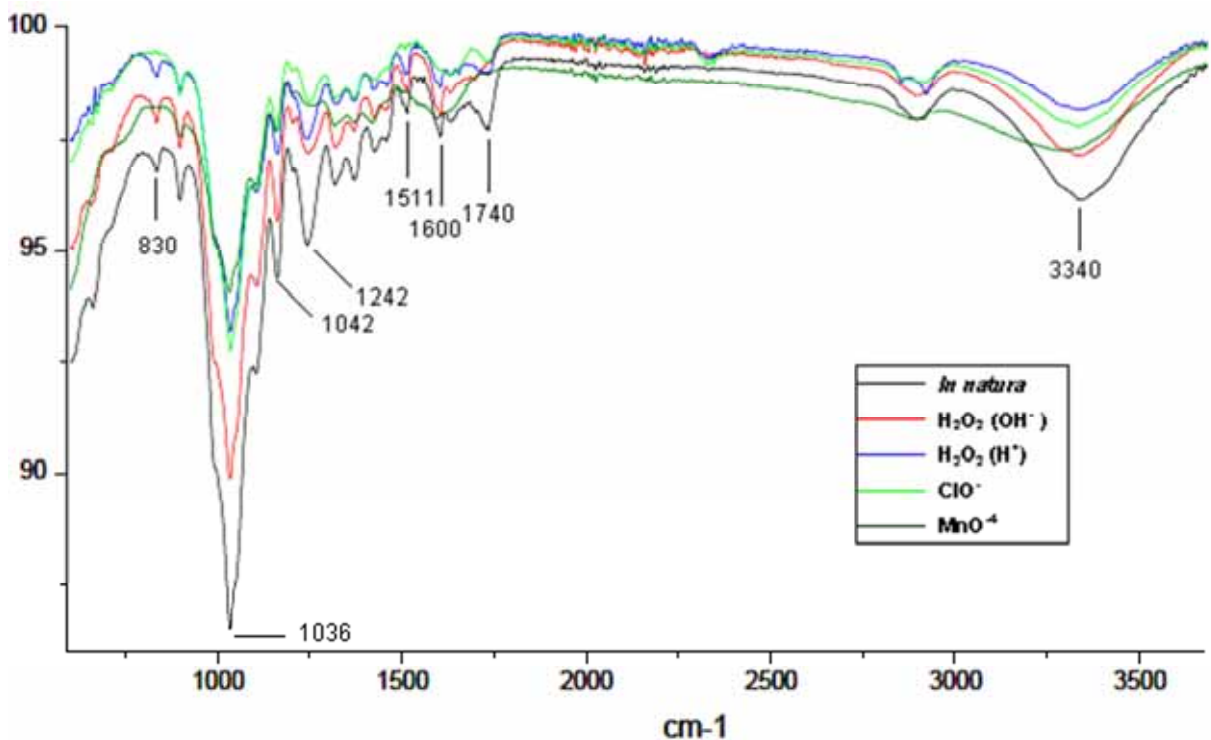


Figura 5: Espectros de FTIR dos bagaços pré-tratados e do bagaço *in natura*.

3.5. Hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados

Para a hidrólise do bagaço foi escolhido o extrato do *T.aurantiacus* e o complexo comercial NS22086, segundo o desempenho obtido no experimento de eficiência de hidrólise utilizando Avicel[®].

Os resultados de rendimento da sacarificação e concentração de açúcares redutores liberados estão apresentados nas Tabelas 7 e 8. Em todos os ensaios foi observado os melhores resultados de hidrólise utilizando bagaço pré-tratado com ClO^- , tanto para sacarificação utilizando o extrato do *T.aurantiacus* quanto para o complexo enzimático comercial. Esse fato pode ser explicado devido à modificação na estrutura da lignina nesse bagaço pré-tratado, o que foi observado através da caracterização do bagaço e no espectro de FTIR, pois ocorreu diminuição da lignina insolúvel e aumento da lignina solúvel, o que pode facilitar a ação das enzimas celulolíticas no processo de hidrólise. Apesar do pré-tratamento com MnO^{-4} ter apresentado eficiência na remoção de lignina e modificação estrutural na fibra de lignocelulósica, durante a hidrólise obteve-se o menor rendimento até mesmo em relação ao bagaço *in natura* para a hidrólise com o extrato do fungo *T.aurantiacus*.

Outros trabalhos como os descritos por Martín et al (2007), Barros et al (2013), Travaini et al (2013), Lee et al (2009) utilizam processos oxidativos avançados, a técnica mais comum atualmente é a de ozonólise que demonstra ser um bom processo para remoção de lignina e outros trabalhos estão investindo em espécies reativas de oxigênio, principalmente com peróxido de hidrogênio. Em relação aos resultados de conversão de celulose a glicose apresentados nesse trabalho estar abaixo dos níveis encontrados na literatura podem contribuir para o melhoramento da técnica que é bastante promissora.

Tabela 7: Hidrólise dos bagaços de cana tratados e não tratados com extrato concentrado de *T.aurantiacus* com 10 FPU/g de celulose durante 24h.

Amostras	Açúcares redutores (mg/mL)	% de rendimento
In natura	1,76	12,2
H₂O₂ (OH⁻)	2,27	16,7
H₂O₂ (H⁺)	1,49	10,7
ClO⁻	2,65	19,8
MnO⁻⁴	0,26	12,1

Tabela 8: Hidrólise dos bagaços de cana tratados e não-tratados com enzima comercial NS22086 com 30 FPU/g de celulose e bagaço durante 24h.

Amostras	Açúcares redutores (mg/mL)	% de rendimento
In natura	2,55	17,7
H ₂ O ₂ (OH ⁻)	3,54	26
H ₂ O ₂ (H ⁺)	3,22	23
ClO ⁻	5,32	39,7
MnO ⁻⁴	2,28	17,9

4. CONCLUSÃO

Dentre os extratos enzimáticos produzidos pelos fungos *T. Aurantiacus*, *T. lanuginosus*, *P. viridicatum* e *T. reesei*, aquele obtido do *T. aurantiacus* apresentou a maior eficiência de hidrólise do substrato avicel®. Os pré-tramentos do bagaço com espécies reativas de oxigênio promoveram alterações no teor de lignina e na estrutura lignocelulósica da biomassa o que resultou em aumento na sua sacarificação (expressa pelo teor de açúcares redutores). Este aumento foi mais acentuado no bagaço pré-tratado com NaClO tanto para o extrato enzimático do fungo *T. aurantiacus* quanto para a solução de enzima comercial.

Capítulo 2
Avaliação do sinergismo enzimático
e inibição da β -glicosidase

1.INTRODUÇÃO

A celulose dos materiais lignocelulolíticos, como o bagaço de cana-de-açúcar, pode ser hidrolisada à glicose, que pode ser posteriormente utilizada na produção de etanol. As técnicas mais comuns de hidrólise da celulose são por via ácida ou enzimática. Na hidrólise utilizando ácidos como catalisador, ocorre a formação de compostos secundários que interferem ou inviabilizam a fermentação alcoólica (etapa subsequente à hidrólise na produção de etanol). Já na hidrólise enzimática, devido à sua alta especificidade, não há a formação de subprodutos inibidores da fermentação, no entanto, neste caso a biomassa deve passar previamente por etapas de pré-tratamento para desestruturação da estrutura lignocelulósica, tornando os polissacarídeos constituintes mais acessíveis às enzimas despolimerizantes, conseqüentemente produzindo maiores quantidades de açúcar fermentescíveis. (MARTIN et al., 2002).

As celulasas hidrolisam ligações β -1,4-D presentes na celulose produzindo glicose, celobiose e celo-oligossacarídeos. Vários tipos de celulasas são produzidas pelos microrganismos, em geral, as principais são: as exoglucanase (EC3.2.1.91), endoglucanase (EC 3.2.1.4) e β -glicosidases (EC.3.2.1.21) (SINGHANIA, 2010).

A β -glicosidase pode ser considerado a principal enzima no processo de sacarificação enzimática, devido a enzima participar da etapa final de conversão de celulose a glicose, esse fato é visto em alguns extratos enzimáticos que tem grandes quantidades de endoglucanase e exoglucase e não tem uma boa sacarificação, devido a falta de β -glicosidase. Reeta Rani Singhania 2013

Infelizmente, os sistemas de enzimas celulolíticas atualmente empregados, que incluem as enzimas de *Trichoderma reesei* amplamente estudados, são significativamente inibidos pelos produtos de hidrólise, celobiose e glucose (Andrić et al. 2010), de forma que é necessário estudo de inibição para cada enzima que se proponha em estudos de sacarificação de biomassas.

Celobiose, o principal produto da ação da celobiohidrolase e produto secundário da endoglucanase, inibe diretamente ambas celobiohidrolases e endoglucanases (Gruno et al., 2004). Glicose inibe diretamente a β -glicosidase, mas também inibe as celobiohidrolases e endoglucanases (Holtzaple et al., 1990

CAMPBELL, 2000). O entendimento desses mecanismos inibitórios permite propor rotas de remoção dos inibidores, resultando em processos mais eficientes, de menor custo e o uso de menor quantidade de enzimas.

Alguns métodos como o uso de coquetéis enzimáticos estão sendo avaliados para aumentar a eficiência do processo, por meio de sinergismo entre diferentes enzimas. Estudos de sacarificação foram feitos com coquetéis, demonstrando resultados satisfatórios na sacarificação de materiais lignocelulósicos. Outra opção para reduzir efeito inibitório poderia ser a conversão da glicose em outro açúcar que não fosse inibidor. Neste sentido, a D-Glucose isomerase, EC 5.3.1.5, que catalisa a isomerização reversível de D-glicose e D-xilose em D-frutose e D-xilulose, respectivamente seria uma boa candidata, uma vez que frutose ou xilulose são açúcares fermentescíveis não conhecidos como inibidores de celulasas.

Este trabalho foi desenvolvido visando avaliar o emprego da glicose isomerase para a isomerização da glicose em frutose visando a desinibição da β -glicosidade e por consequência aumentando a eficiência do conjunto de celulasas envolvidas no processo de despolimerização da celulose.

5. MATERIAIS E METÓDOS

5.1. Substratos para a FES (Fermentação estado sólido)

O farelo de trigo foi obtido no comércio local. O bagaço de cana-de-açúcar foi cedido por usina de açúcar e álcool da região de São José do Rio Preto. Os dois substratos foram lavados com água corrente e em seguida com água destilada para remoção dos resíduos de açúcares, seguido de secagem em estufa a 50 °C com ventilação até a estabilização do peso seco.

O farelo de trigo foi utilizado no tamanho original. O bagaço passou por processo de moagem e peneirado em peneira granulométrica para a homogeneização do tamanho das partículas (1 - 2 mm).

5.2. Fermentações para produção dos extratos enzimáticos

5.2.1. Microrganismos

Foram testados os fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Penicillium viridicatum* RFC3 e *Trichoderma reesei* QM9414, a partir das culturas que se encontram estocadas na coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José do Rio Preto, em tubos de ensaio com PDA (*Potato Dextrose Agar*) submersos em óleo mineral, em câmara fria a 5 °C.

5.2.2. Inóculo

Foram utilizados para o preparo da suspensão de inóculo dois erlenmeyers de 250 mL contendo 50,0 mL de PDA inclinado. O fungo *P. viridicatum* RFC3 foi incubado a 28 °C durante 14 dias. O fungo *T. aurantiacus* CBMAI756 foi incubado a 50 °C durante 2 dias. Para obtenção da suspensão de esporos/micélios foi utilizada a solução salina proposta por Toyama e Ogawa (1978): 0,35% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3% de KH_2PO_4 , 0,05% de $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,05% de CaCl_2 .

5.2.3. Fermentadores

Foram utilizados como fermentadores, sacos de polipropileno de 15 cm x 30 cm, acoplados com bocal de PVC de 3,5 cm de comprimento e 1,5” de diâmetro, tampados com tampão de algodão envolto por gaze, para garantir a troca de gases e assegurar que não ocorra qualquer contaminação.

5.2.4. Substrato para crescimento e produção das enzimas

Foram utilizados 5,0 g de substrato por fermentador, sendo 2,5 g de bagaço de cana-de-açúcar e 2,5 g de farelo de trigo, adicionados de 5,0 mL da solução salina e esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 30 minutos.

5.2.5. Inoculação

a) *P. viridicatum* RFC3 e *T. reesei* QM9414

Após catorze dias de incubação do pré-inóculo em meio inclinado, os esporos de cada erlenmeyer foram suspensos em 50,0 mL da solução salina por cuidadosa raspagem da superfície com alça de platina. A quantidade de esporos em solução foi determinada através da adição de 1,0 µL da suspensão em câmara de Neubauer, seguida de contagem em microscópio ótico. Os fermentadores contendo os substratos e já esterilizados foram inoculados com volumes de suspensão padronizados com $5,0 \times 10^7$ esporos. Em seguida, os meios foram completados com solução salina para um volume final de 20,0 mL (incluindo os 5,0 mL adicionados antes da autoclavagem) resultando em 65% de umidade, suficientes para umedecer o meio durante a fermentação sem a presença de água livre.

b) *T. aurantiacus* CBMAI756

A inoculação do fungo foi realizada após dois dias de incubação do pré-inóculo no meio inclinado. As estruturas miceliares, micélio e ascósporos, foram suspensos nos erlenmeyers de pré-inóculo em 50,0 mL da solução salina por raspagem da superfície com alça de platina. Os fermentadores com os substratos, devidamente esterilizados, foram inoculados com 5,0 mL da suspensão. Em seguida o volume foi completado com solução salina para um volume final de 20,0 mL.

5.2.6. Fermentação em estado sólido (FES)

Os fermentadores contendo o substrato inoculado com *T. aurantiacus*, *P. viridicatum* e *T. reesei* foram incubados durante cinco dias, na temperatura de 50 °C

para *T.aurantiacus* e 28 °C para *P.viridicatum* e *T. reesei*. As enzimas foram extraídas pela adição de 100 mL de água destilada, seguido de homogeneização com vara de vidro para desaglomeração das estruturas miceliares. A suspensão foi transferida para erlenmeyers de 250 mL onde permaneceram em agitador orbital a 100 rpm por 1 hora. Após agitação as amostras foram centrifugadas a 20000 xg durante 20 minutos a 5 °C, para a remoção das células e o sobrenadante foi nomeado como solução enzimática ou extrato enzimático bruto.

5.3. Atividades enzimáticas

5.3.1. Atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada com 50,0 μ L do extrato enzimático bruto devidamente diluído para garantir a linearidade de V_0 da reação enzimática, 250,0 μ L de tampão 0,1 M em pH 5,0 e 250,0 μ L de 4-nitrofenol-D-glicopiranosídeo (PNP β G, Sigma) 4 mM, por 10 minutos em banho termostático a 60 °C para *T. aurantiacus*, e a 45°C para *P. viridicatum* e *T. reesei*. A reação foi interrompida pela adição 2,0 mL de NaCO₃ 2 M e o nitrofenol liberado foi quantificado em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de nitrofenol por minuto de reação a partir da curva padrão de nitrofenol.

5.3.2. Atividade de Avicelase

A atividade de avicelase foi determinada com 0,1 mL do extrato enzimático convenientemente diluído, 0,9 mL de avicel[®] 1,0% (Sigma) em tampão ácido acético/NaOH 0,1 M pH 5,0, por 10 minutos em banho termostático a 60 °C *T. aurantiacus* e 45°C para *P. viridicatum* e *T. reesei*. A reação foi interrompida após 10 minutos pela adição de 1,0 mL de DNS (ácido 3,5- dinitrossalicílico). O volume resultante foi colocado em banho de ebulição durante 10 minutos e em seguida foi acrescido de 8,0 mL de água destilada, finalmente a quantidade de glicose liberada foi medida por espectrofotometria a 540 nm (MILLER,1959). Uma unidade de

atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto de reação, de acordo com a quantificação com a curva padrão do açúcar redutor correspondente.

5.3.3. Atividade de CMCase

A atividade de CMCase foi realizada por procedimento idêntico ao descrito no tópico 4.3.2 (Atividade de Avicelase), exceto o substrato que foi substituído pela carboximetilcelulose a 1% (Sigma).

5.3.4. Atividade de xilanase

A atividade de xilanase foi realizada por procedimento idêntico ao descrito no tópico 4.3.2 β -glicosidase, exceto o substrato que foi substituído pela xilana (Xylan Birchwood, Sigma Co.).

5.3.5. Atividade sobre papel de filtro (FPase)

A atividade de FPase foi determinada com 0,5 mL do extrato enzimático bruto devidamente diluído, 1 mL de tampão 0,1 M em pH 5,0 e o substrato foi 50 mg de uma faixa de papel de filtro Whatman No. 1 (1,0 x 6,0 cm), a reação ocorreu por 1 hora em banho termostático a 50 °C para *T. aurantiacus* e a 45°C para *P. viridicatum* e *T. reesei*. A reação foi interrompida pela adição 3,0 mL DNS, a solução foi colocada em banho de ebulição por 5 min. Após o banho de ebulição foi adicionado 16 mL de água em todas as amostras. A quantificação dos açúcares redutores foi feita em espectrofotômetro a 540 nm (EVELEIGH *et al.* 2009).

5.3.6. Atividade de glicose isomerase

Atividade de glicose isomerase (GI) foi determinada pela reação composta de 2,0 mL de solução de glicose (variando a concentração de 0 a 1 M) , 2 mL de tampão McIlvaine 0,1 M (pH 7,0) com concentrações de NaSO_3 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

ajustadas para uma concentração no volume final de reação de 1 g/L de NaSO₃ e 1g/L de MgSO₄ .7H₂O, e 0,0166 g/mL de GI imobilizada. A reação ocorreu a 60 °C com agitação de 150 rpm durante 30 minutos (CONVERTI; DEL BORGHI, 1997). A determinação de frutose liberada foi feita através do método de Seliwanoff quantificado em espectrofotômetro a 540 nm (ROE, 1934). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a produção de 1,0 μmol de D-frutose por minuto. A enzima imobilizada utilizada foi glicose isomerase comercial, Sweetzyme IT, fornecida pela empresa Novozymes®.

5.4. Zimograma para determinação de β-glicosidases

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida não desnaturante 10% pH 8,3. Após a corrida o gel foi colocado em uma solução tampão acetado de sódio 0,2M (pH 5) por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, o gel foi incubado em uma solução corante (pH 5) contendo 0,1% (peso/vol) de esculina e 0,03% (peso/vol) de cloreto férrico, para o gel com amostras do *P.viridicatum* a incubação foi feita a 45°C e para o *T.aurantiacus* a 60°C.

5.5. Hidrólise dos substratos

5.5.1. Hidrólise enzimática

O volume da suspensão de reação foi ajustado para 5 mL final com 0,1 M tampão acetato de sódio (pH 5,0), contendo os seguintes componentes dissolvidos: 0,1 g de bagaço de cana e 1 mL de extrato enzimático dos *T.aurantiacus* e *P.viridicatum*. Foram avaliadas as atividades das enzimas produzidas por cada fungo separadamente. A mistura foi incubada em frasco agitado a 60°C para *T.aurantiacus* e 45°C para *P.viridicatum* e *T.reesei*, a 150 rpm durante 6h. A glicose formada foi quantificada por HPAEC-PAD (ICS 5000, Dionex Corporation, EUA) e pelo método de Somogy-Nelson (açúcares redutores).

5.5.2. Sacarificação com ação simultânea de GI

A hidrólise enzimática foi feita em pequenos tubos com rolha de látex, cada tubo foi composto por 0,1 g de bagaço de cana, 1 mL do extrato enzimático bruto, 0,0166 g/mL de GI e 4,0 mL de tampão Mc Ilvaine 0,1 M com concentração de 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ajustada o volume final de reação, variando o pH entre 5,0 a 7,0. A hidrólise foi realizada em banho termostático a 60 °C para o fungo *T. aurantiacus* e a 45 °C para o fungo *P. viridicatum*, ambas sob agitação de 150 rpm. As amostras do hidrolisado foram retiradas após 1, 2, 4 e 6 horas, e posteriormente foi realizada a quantificação de açúcares redutores por Somogy-Nelson e HPAEC-PAD (ICS 5000, Dionex Corporation, EUA).

5.6. Determinação de parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram calculados através da atividade enzimática de β -glicosidase utilizando 4-nitrofenol-D-glicopiranosídeo (PNPG) em pH 5,0 em solução de acetato de sódio e condições de temperatura para o *T. aurantiacus* de 60 °C e para o *P. viridicatum* 45 °C. As atividades foram realizadas com a ausência e presença de glicose. Diferentes concentrações de glicose, de acordo com o volume final, foram aplicadas no ensaio da atividade. Os valores de K_m e V_{max} foram obtidos graficamente pelos gráficos de Lineweaver-Burk (Karnchanatat et al, 2008).

5.7. Determinação do efeito da concentração de glicose e frutose nas atividades das enzimas β -glicosidases

O efeito da glicose na atividade enzimática foi determinada utilizando PNP β G (4 mM), como substrato, em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 e os extratos enzimáticos bruto. As reações foram realizadas a 45°C para *P. viridicatum* e a 60°C para *T. aurantiacus*. A glicose foi adicionada à mistura de reação em diferentes concentrações (0 a 100 mM) de acordo com o volume final do ensaio. Posteriormente a atividade enzimática foi quantificada pela atividade de β -glicosidase. Em outro ensaio foi utilizada uma mistura de glicose e frutose de forma

que a concentração de frutose varie crescentemente de 0 a 100 mM e a glicose varie decrescentemente de 100 a 0 mM . E também foi feita a reação utilizando apenas frutose em diferentes concentrações (0 a 100 mM). Posteriormente a atividade enzimática foi quantificada em cada ensaio

5.8. Análises Cromatográficas

As análises dos carboidratos foram feitas usando HPAEC-PAD (ICS 5000, Dionex Corporation, EUA), equipado coluna de troca aniônica CarboPac PA-1. Os diluentes foram preparados com água deionizada ultra pura (18M Ω) e desgaseificada com N₂. O fluxo foi de 1,0 mL/min usando 6% de solvente A (500 mM de NaOH) e 94% de solvente B (água ultra pura), com eluição isocrática.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Avaliação do sinérgismo durante a hidrólise

No estudo sinérgico foram escolhidos os extratos enzimáticos produzidos pelos fungos *T.reesei* e *P.viridicatum*, pois possuem a mesma temperatura e pH ótimo de hidrólise em torno de 45°C e pH 5,0. Além disso, foi possível aumentar a atividade enzimática, enquanto para o fungo *T.lanuginosus* não foi obtido o mesmo êxito, por isso não foi realizado esse experimento com o consórcio enzimático entre os extratos dos fungos *T. lanuginosus* e *T.aurantiacus*, que atuam na mesma temperatura e pH ótimos.

Tabela 9: Resumo das atividades enzimáticas dos extratos enzimáticos brutos obtidos dos fungos *T.reesei* e *P.viridicatum*.

	β -glicosidase (U/mL)	CMCase (U/mL)	Xilanase (U/mL)
<i>T.reesei</i>	0,2	2,8	6,8
<i>P.viridicatum</i>	3,2	0,5	30,3

A utilização dos extratos enzimáticos consorciados aumentou a capacidade de sacarificação do bagaço de cana. Isso pode ser explicado pela atuação sinérgica das enzimas produzidas pelos dois fungos, pois se por um lado o fungo *P.viridicatum* é um bom produtor de β -glicosidase, mas não produz quantidades apreciáveis de CMCase, o que é o oposto do extrato enzimático do *T. reesei*, que produz CMCase sem quase nenhuma produção de β -glicosidase.

Quando utilizados sozinhos os extratos do *P.viridicatum* e do *T. reesei* as quantidade de glicose foram de 0,55 mg/mL e 0,58 mg/mL respectivamente. Nas misturas de 25%/75% houve um aumento em relação a ambos, para 0,70 mg/mL, em 75%/25% para 0,65 mg/mL e finalmente, a maior liberação de glicose encontrada foi utilizando-se os dois extratos em proporção 50%/50%, com 0,73 mg/mL.

Tabela 10: Resultados da análise cromatográfica da hidrólise enzimática do bagaço de cana expresso em termos de miligramas de glicose por grama de bagaço hidrolisado, com diferentes extratos enzimáticos (v/v): 100% *P. viridicatum*, 100% *T. reesei*, 25% *P. viridicatum* + 75% *T. reesei*, 50% *P. viridicatum* + 50% *T. reesei* e 75% *P. viridicatum* + 25% *T. reesei*.

Extratos enzimáticos	Glicose (mg/mL)
100% <i>P.viridicatum</i>	0,55
100% <i>T.reesei</i>	0,58
25% <i>P.viridicatum</i> + 75% <i>T.reesei</i>	0,70
50% <i>P.viridicatum</i> + 50% <i>T.reesei</i>	0,73
75% <i>P.viridicatum</i> + 25% <i>T.reesei</i>	0,65

6.2. Atividades enzimáticas

O fungo *T.aurantiacus* tem a capacidade de produzir diversas enzimas como celulasas, amilases e xilanases em quantidade apreciáveis, e além disso essas enzimas podem apresentar termoestabilidade. Essa propriedade é interessante para vários processos industriais (LEITE;GOMES;SILVA, 2007).

Para o fungo *P.viridicatum*, não existem muitos trabalhos relatando a produção de celulasas e xilanases.

Os resultados das atividades enzimáticas estão demonstrados na Tabela 11. Observa-se grande atividade de β -glicosidase produzida pelo fungo *P. viridicatum*, porém as outras enzimas não foram produzidas em quantidades apreciáveis em relação as atividades enzimáticas apresentada para o fungo *T.aurantiacus*.

Leite *et al* (2008), reportou atividade de 70 U/g para o fungo *T.aurantiacus*, utilizando apenas farelo de trigo como substrato para a fermentação em estado sólido. Estes resultados mostram que a produção enzimática depende muito dos substratos e do tipo de fermentação empregada. Nessa parte do trabalho, mesmo com menor produção enzimática que o farelo de trigo, optou-se por usar o bagaço de cana-de-açúcar, por ser este substrato da cadeia de produção do etanol de cana-de-açúcar.

Tabela 11: Resumo das atividades enzimáticas dos extratos enzimáticos brutos obtidos dos fungos *T.aurantiacus* e *P. viridicatum*.

	β -glicosidase(U/mL)	CMCase (U/mL)	Xilanase (U/mL)
<i>T.aurantiacus</i>	1	14,3	22,7
<i>P.viridicatum</i>	2,5	0,5	9,2

Não foi possível detectar atividade de FPase e Avicelase para os extratos enzimáticos dos fungos dentro da metodologia proposta.

6.2.1. Efeito da concentração de glicose e frutose nas atividades das enzimas

Para a determinação do efeito da glicose e da frutose sobre as β -glicosidases dos extratos enzimáticos de *T. aurantiacus* e *P. viridicatum* foi utilizado extrato bruto. As concentrações de glicose variaram de 0 a 100 mM. Como observado na Figura 6, a glicose inibe fortemente as β -glicosidases produzidas pelo fungo *T.aurantiacus* provocando queda acentuada da atividade enzimática de 1,0 U/mL para 0,07 U/mL. As β -glicosidases produzidas pelo fungo *P.viridicatum* também são fortemente inibidas por glicose apresentando diminuição de 2,57 U/mL para 0,19 U/mL (Figuras 7). PARR (1985) também apresentou um estudo de inibição por glicose sobre as β -glicosidases comerciais produzidas pelo fungo *Penicillium funiculosum*. Observando os resultados percebe-se que a glicose apresenta forte inibição mesmo em pequenas concentrações, tais como 10 mM, para ambos os fungos.

LEITE *et al* (2008), em estudos sobre inibição de β -glicosidases purificadas produzidas pelo fungo *T. aurantiacus* em meio reacional com glicose, demonstram que em concentrações acima de 5% de glicose não é possível quantificar a atividade enzimática das β -glicosidases, pois os rendimentos destas são baixos.

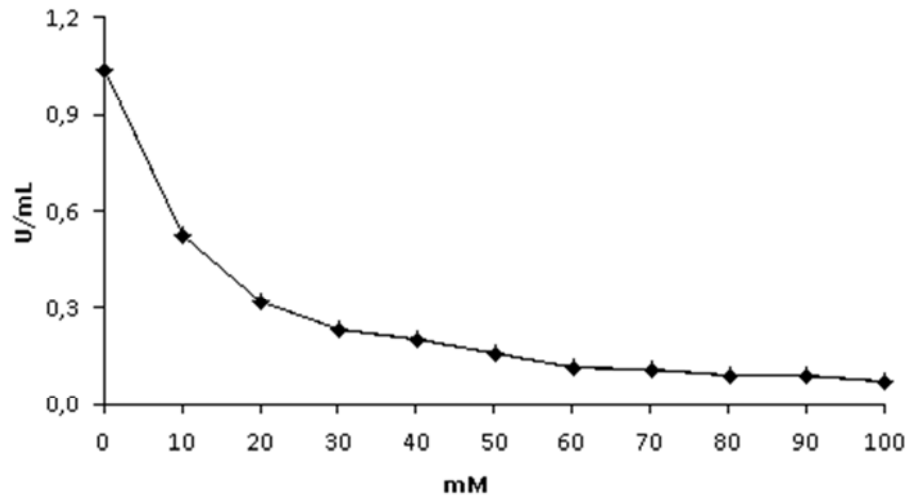


Figura 6: Efeito da concentração de glicose sobre atividade de β -glicosidase do extrato enzimático bruto de *T. aurantiacus*.

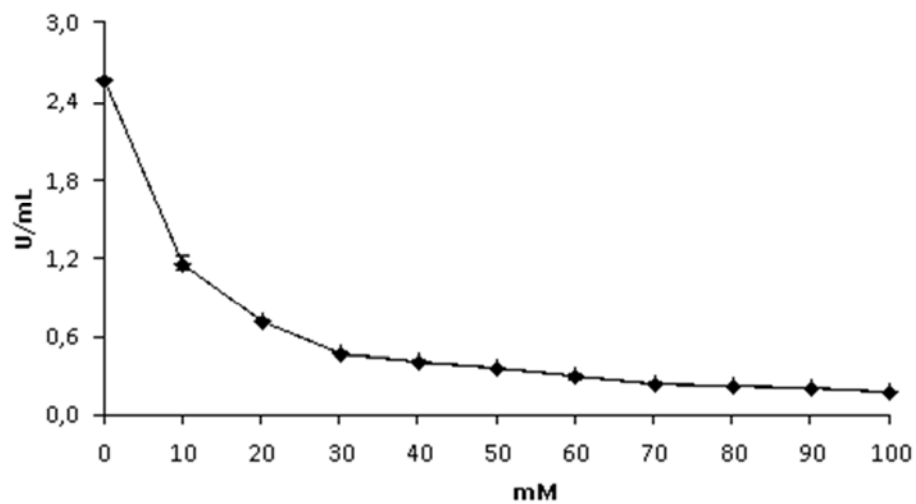


Figura 7: Efeito da concentração de glicose sobre atividade de β -glicosidase do extrato enzimático bruto de *P. viridicatum*.

Diferentemente do que foi observado com a glicose, a presença de frutose exerceu um efeito estimulante nas atividades das β -glicosidase produzidas pelos dois fungos *T.aurantiacus* e *P.viridicatum* (Figura 8 e 9).

As β -glicosidases comerciais produzidas pelo fungo *Aspergillus niger* apresentaram inibição na presença de glicose e frutose, segundo relato de Barbegallo *et al* (2004). Tais resultados mostram que as enzimas tais β -glicosidases são proteínas diferentes, com respostas diferentes a seus estimuladores e inibidores de atividade enzimática.

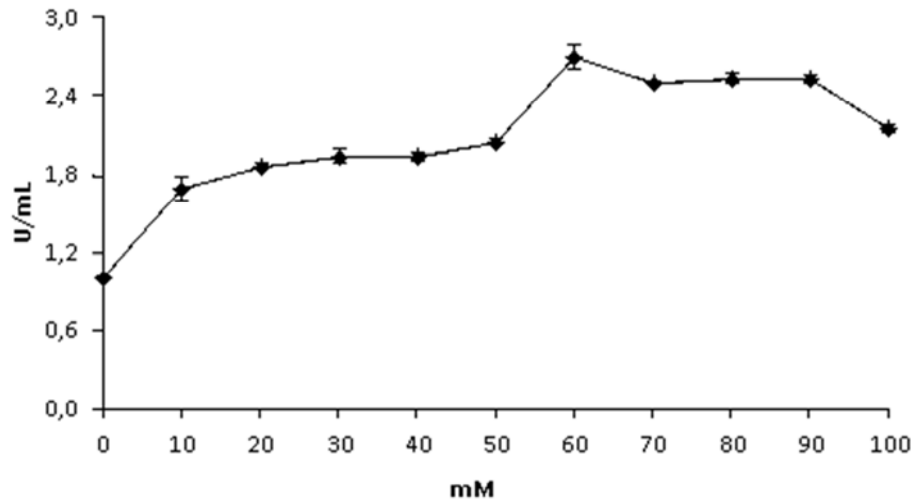


Figura 8: Efeito da concentração de frutose sobre atividade de β -glicosidase do extrato enzimático bruto de *T. aurantiacus*.

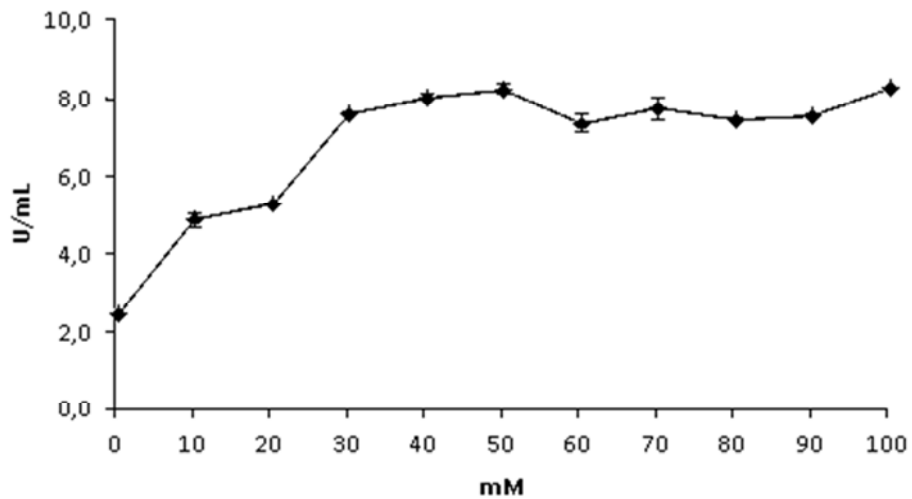


Figura 9: Efeito da concentração de frutose sobre atividade de β -glicosidase do extrato enzimático bruto de *P. viridicatum*.

As Figuras 10 e 11 mostram os resultados das atividades enzimáticas das β -glicosidases dos fungos *T. aurantiacus* e *P. viridicatum* na presença da mistura entre glicose e frutose com concentrações de glicose decrescentes (100 a 0 mM) concomitantemente com concentrações crescentes de frutose (0 a 100 mM). Os resultados mostram que o efeito inibidor da glicose prevalece sobre o efeito estimulante da frutose sobre a atividade β -glicosidase, promovendo a queda na atividade enzimática.

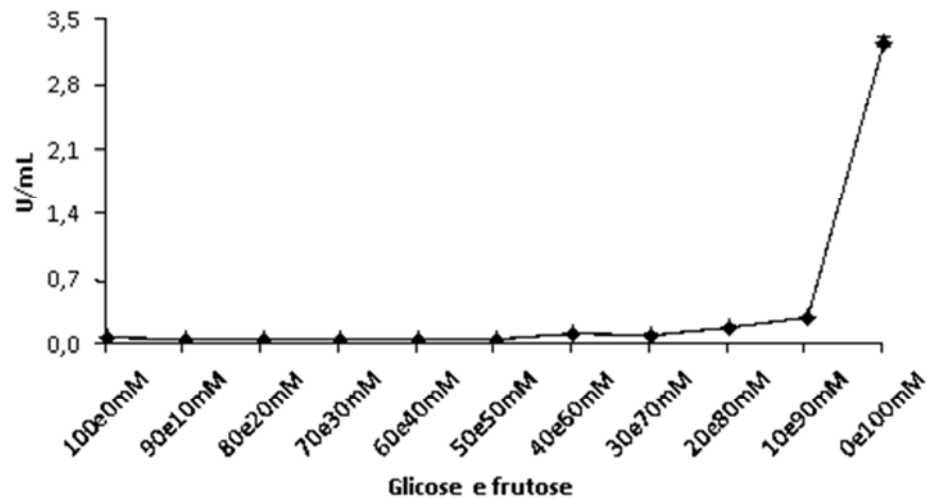


Figura 10: Efeito da concentração decrescente de glicose e crescente de frutose sobre atividade de β -glicosidase para o *T.aurantiacus*.

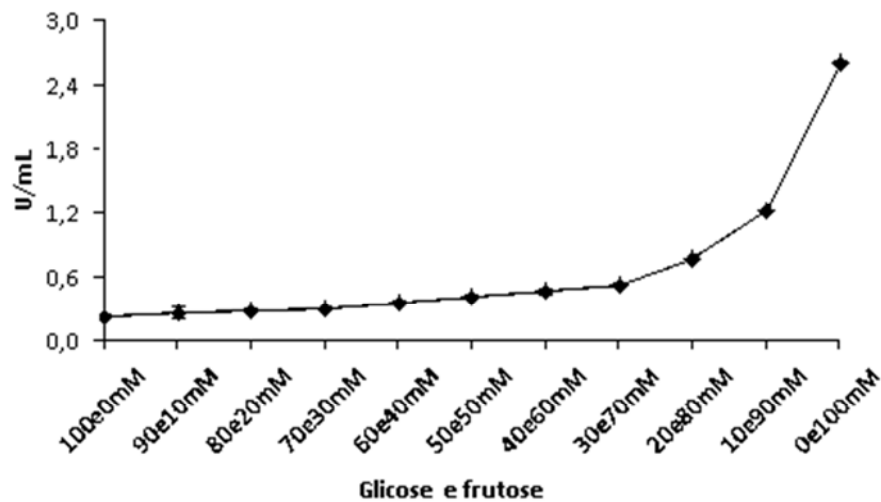


Figura 11: Efeito da concentração decrescente de glicose e crescente de frutose sobre atividade de β -glicosidase para o *P.viridicatum*.

6.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ e K_m para as β -glicosidasas produzidas pelos fungos *T.aurantiacus* e *P.viridicatum* foram obtidos pela equação da reta fornecida pelo método do duplo recíproco ($1/\text{Velocidade} \times 1/\text{Substrato}$).

Os valores cinéticos obtidos nos extratos enzimáticos bruto para *T.aurantiacus* foram $V_{m\acute{a}x}$ de $4,60 \mu\text{mol}/\text{min}$ e K_m $0,31 \text{ mM}$ e para *P.viridicatum* apresentou $V_{m\acute{a}x}$ de $166,7 \mu\text{mol}/\text{min}$ e K_m $0,2 \text{ mM}$. Pelas Figuras 10 e 11 observa-se que o K_m aumentou com a adição da glicose no meio, indicando que ocorreu

diminuição da afinidade enzima-substrato devido à inibição da enzima promovida pela glicose.

Através dos valores cinéticos obtidos com e sem inibidor é possível determinar o tipo de inibição. Os valores cinéticos das β -glicosidases do fungo *T.aurantiacus* apresentam valores de K_m muito próximos e de $V_{m\acute{a}x}$ diferentes caracterizando inibição não-competitiva. Para o fungo *P.viridicatum* os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, com e sem inibidor, são muito diferentes, porém não é possível observar um perfil michaeliano.

Tabela 12: Valores dos parâmetros cinéticos ($V_{m\acute{a}x}$ e K_m) com ou sem inibidor obtidos graficamente pelo plots de Lineweaver-Burk.

	Sem inibidor		Com inibidor	
	$V_{m\acute{a}x}$	K_m	$V_{m\acute{a}x}$	K_m
<i>T.aurantiacus</i>	4,60	0,31	2,3	0,37
<i>P.viridicatum</i>	166,7	0,2	13,8	1,2

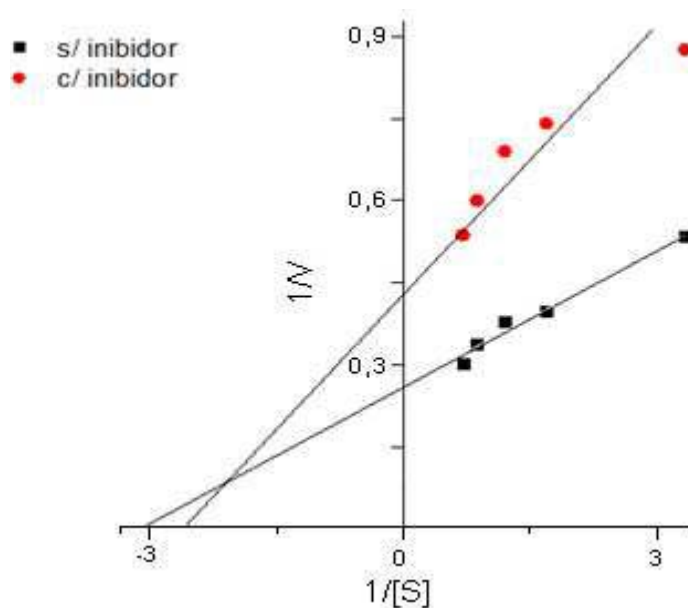


Figura 12: Curvas de Lineweaver-Burk para extrato enzimático do fungo *T.aurantiacus* apresentando a inibição mista.

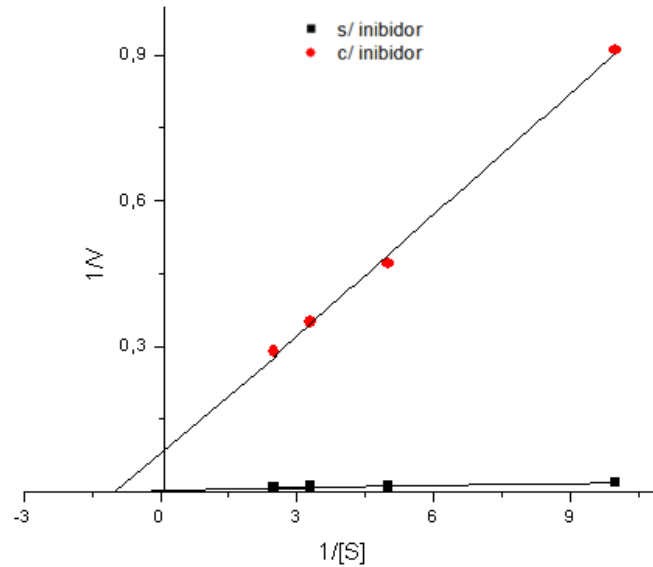


Figura 13: Curvas de Lineweaver-Burk para extrato enzimático do fungo *P.viridicatum* apresentando a inibição não competitiva.

6.4. Zimograma

Os zimogramas representados pela Figura 14 mostram as β -glicosidases presentes no extrato bruto dos fungos *T.aurantiacus* e *P.viridicatum*. No zimograma do *T.aurantiacus* (Figura 14B) observou-se que aparentemente existe uma β -glicosidade. O outro zimograma (Figura 14A) apresenta as β -glicosidases produzidas pelo *P.viridicatum*, esse zimograma aponta a existência de duas β -glicosidases. Todas as β -glicosidases analisadas diminuíram sua atividade após tratamento com corante contendo 5M de glicose, o que reafirma a inibição dessas enzimas por glicose. Porém, quando a glicose (5M) foi colocada juntamente com a enzima no gel de eletroforese, aparentemente não ocorreu diferença, pois a intensidade das bandas não mudou.

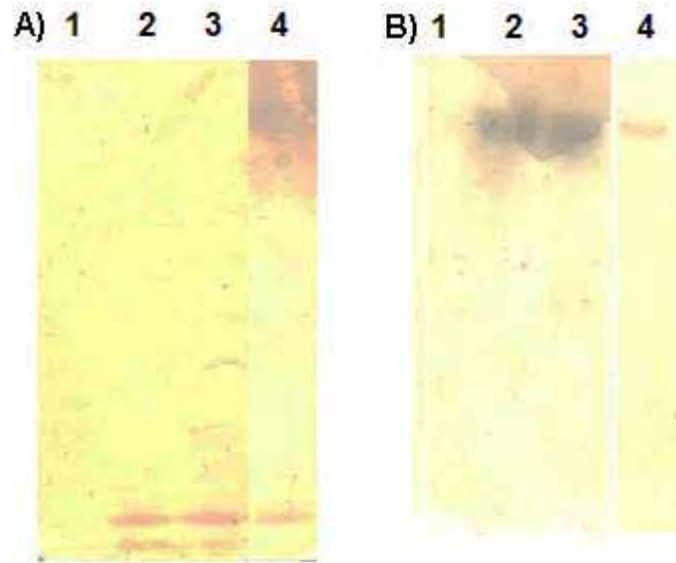


Figura 14: Zimogramas de β -glicosidasases dos extratos enzimáticos brutos dos fungos *P. viridicatum* (A) e *T. aurantiacus* (B). 1) Enzima desnaturada por 10 min a 100°C; 2) O extrato bruto adicionou 0,5M de glicose na aplicação da amostra no gel; 3) Extrato bruto; 4) Após corrida o gel foi corado com a solução corante que continha 0,5M de glicose.

6.5. Glicose Isomerase

Foi realizado um experimento visando determinar o efeito da concentração de glicose e as condições ótimas de pH e temperatura na glicose isomerase comercial Sweetzyme[®]IT (Novozymes[®]) para posterior aplicação na sacarificação enzimática. Conforme mostra a Figura 15 a atividade enzimática foi crescente com o aumento da concentração de glicose até 0,9 M, a qual proporcionou maior atividade de glicose isomerase 144 U/mL.

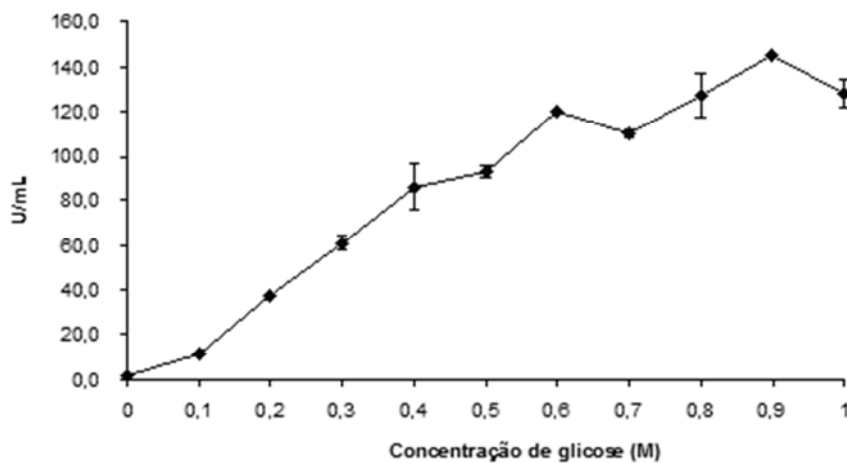


Figura 15: Concentração crescente de glicose sobre a atividade de Glicose Isomerase

Também foi feita a caracterização da glicose isomerase para a verificação do pH e temperatura ótimos. A Figura 16 representa a curva de pH ótimo, obtendo 55 U/g no maior pico que corresponde ao valor de pH 10,8. Para a temperatura foi obtida máxima atividade em 60°C, correspondente a 56U/g, como pode ser observado na Figura 17.

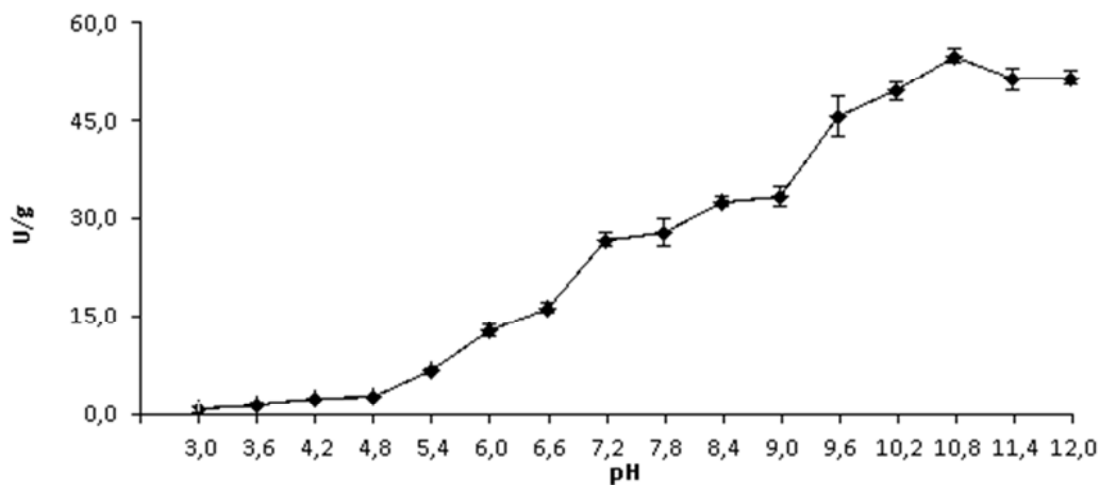


Figura 16: Atividade de glicose isomerase em relação ao pH, com 1M de glicose a 60°C

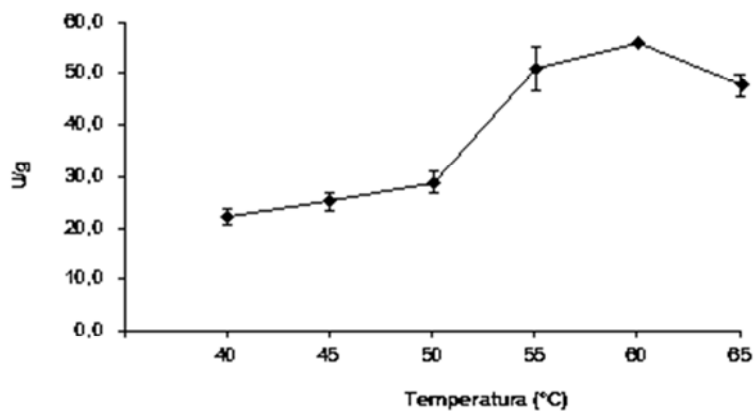


Figura 17: Atividade de Glicose Isomerase em relação a temperatura, com 1M de glicose em pH 7,00

6.6. Hidrólise

A hidrólise enzimática foi realizada com bagaço de cana de açúcar *in natura*, isto é, sem pré-tratamento. A adição da glicose isomerase durante o processo de

sacarificação teve como objetivo diminuir a quantidade de glicose no meio transformando glicose em frutose, para que ocasionasse a diminuição da inibição por glicose sobre as β -glicosidases.

Na hidrólise do bagaço *in natura* pelos extratos enzimáticos dos fungos *P.viridicatum* e *T. aurantiacus*, obteve-se 0,28 e 0,62 mg/mL de açúcares. A sacarificação na presença da glicose isomerase comercial, nas mesmas condições, apresentou resultados negativos, tendo o controle valores iguais ou superiores aos da reação. Isso aconteceu devido à glicose ser um dos estabilizantes usados para a conservação da glicose isomerase. Para a determinação dessa quantidade de glicose foi feito um experimento no qual se colocou 0,0166 g/mL para um volume final de 5 mL de água destilada, o tubo com água e glicose isomerase ficou sob agitação de 150rpm durante 1h, após o término de 1h o sobrenadante foi utilizado para quantificação de açúcar por somogy-nelson, no qual obteve-se 2,16 mg/mL. Essa quantidade é muito superior a encontrada na hidrólise sem glicose isomerase, devido à quantidade tão pequena o efeito de desinibitório proposto torna-se nulo.

Para a minimização do problema com a glicose e frutose no suporte da glicose isomerase foi realizado o procedimento de diálise para retirada da glicose do suporte, o que propiciou a hidrólise com ação simultânea da glicose isomerase sem os interferentes do suporte da enzima. Após a diálise foi feita a quantificação da atividade de glicose isomerase para avaliar se houve perda de atividade durante o processo de diálise. Observou-se a diminuição brusca na atividade de glicose isomerase dialisada. Isso se deve ao fato da retirada do íon Mg^{+2} durante a diálise, esse íon está presente no sítio catalítico da enzima. Então foi adicionado o íon Mg^{+2} no meio reacional, o que proporcionou o aumento da atividade enzimática de 2,12U para 14,12U.

A sacarificação com e sem glicose isomerase dialisada foi realizada com extrato concentrado contendo 1FPU/mL do *T.aurantiacus*, diferentemente da concentração descrita na metodologia do item 4.5. Hidrólise dos substratos. Porém o resultado obtido foi maior para a hidrólise sem glicose isomerase obtendo 18 mg/mL e com glicose isomerase dialisada obteve-se 15 mg/mL de açúcar redutor.

Tabela 13: Resultados da quantificação de açúcares das hidrólises enzimática com e sem glicose isomerase (GI) para os fungos *T.aurantiacus* e *P.viridicatum*.

	Glicose (mg/mL)	Xilose (mg/mL)	Frutose (mg/mL)
<i>T.aurantiacus</i>	0,62	0,37	0
<i>T.aurantiacus</i> c/ GI	0	0	0
<i>P.viridicatum</i>	0,28	0,06	0
<i>P.viridicatum</i> c/ GI	0	0	0

7. CONCLUSÃO

As β -glicosidases produzidas pelos fungos *T.aurantiacus* e *P.viridicatum* por fermentação em estado sólido são inibidas pela presença de glicose. Em contra partida a frutose exerce um efeito positivo sobre a β -glicosidases, aumentando a atividade enzimática. Os dados cinéticos K_m e V_{max} analisados graficamente conforme Lineweaver-Burk, apontam que a β -glicosidase do *T.aurantiacus* sofreu inibição não-competitiva, enquanto a enzima do *P.viridicatum* sofreu inibição mista. Na sacarificação do bagaço pela ação do extrato enzimático do fungo *T.aurantiacus* e *P.viridicatum* foi visto que o extrato enzimático produzido pelo *T.aurantiacus* obteve maior sacarificação, porém não é possível afirmar se esse complexo enzimático é mais eficiente do que pelo *P.viridicatum*. A hidrólise com ação simultânea com a glicose isomerase não gerou o resultado esperado, porém as descobertas apresentadas podem ajudar em futuros experimentos. A sacarificação do bagaço de cana com a combinação dos extratos enzimáticos e glicose isomerase apresentou um efeito interessante, entretanto este resultado não se confirmou pela quantificação de frutose pelo HPLC.

8. REFERÊNCIAS

ANDRIC, P.; MEYER, A.S.; JENSEN, P.A.; DAM-JOHANSEN, K. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 308-324, 2010.

BHOSALE, S.H.; RAO, M. B.; DESHPANDE, V. V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. **Microbiological Reviews**, v.60, 280-300, 1996.

BOHLIN, C.; PRAESTGAARD, E.; BAUMANN, M. J.; BORCH, K.; PRAESTGAARD, J.; MONRAD, R. N.; WESTH, P. A comparative study of hydrolysis and transglycosylation activities of fungal β -glucosidases. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.97, p.159-169, 2013..

BONAWITZ, N. D.; CHAPPLE, C. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. **Annual Review of Genetics**, v. 44, p. 337-363, 2010.

CAINS, J.R.K.; ESEN, A. β -glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.67, p.3389-3405, 2010.

CAMACHO-RUBIO, F.; JURADO-ALAMEDA, E.; GONZÁLEZ-TELLO, P.; GONZÁLEZ, G. L. A comparative study of the activity of free and immobilized enzymes and its application to glucose isomerase. **Chemical Engineering Science**, v.51, p.4159-4165, 1996.

CAMPBELL, M.K. Bioquímica. Porto Alegre, Artmed, cap. 5, p. 156-186, 2000.

CHUNDAWAT, S. P. S.; BECKHAM, G. T.; HIMMEL, M.E.; DALE, B. E. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, v.2, p 121-145, 2011.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005

CONVERTI, A.; BORGHI, M. D. Simultaneous effects of immobilization and substrate protection on the thermodynamics of glucose isomerase activity and inactivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.21, p.511-517, 1997.

DUMON, C.; SONG, L.; BOZONNET, S.; FAURE, R.; O'DONOHUE, M. J. Progress and future prospects for pentose-specific biocatalysts in biorefining. **Process Biochemistry**, v.47, p. 346-357, 2012.

EVELEIGH, D. E.; MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, p. 21-29, 2009.

GARCÍA-CUBERO, M. T.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; INDACOECHEA, I.; COCA, M.; BOLADO, S. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. **Bioresource Technology**, v.100, p.1608-1613, 2009.

GIRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4775-4800, 2010.

GRUNO, M.; VALIAMAE, P.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v.86, p.503-511, 2004.

GUO, F.; FANG, Z.; XU, C. C.; SMITH JR, R.L. Solid acid mediated hydrolysis of biomass for producing biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.38, p.672-690, 2012.

HOLTZAPPLE, M. T., RIPLAHEY, E. P., NIKOLAOU, M. Saccharification, fermentation, and protein recovery from low-temperature AFEX-treated coastal Bermuda grass. **Biotechnology Bioengineering**, v.44, p.1122–1131, 1994.

KARNCHANATAT, A.; PETSOM, A.; SANGVANICH, P.; PIAPUKIEW, J.; WHALLEY, A. J. S.; REYNOLDS, C. D.; GADD, G. M.; SIHANONTH, P. A novel thermostable endoglucanase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 404-413, 2008.

LAVOINE, N.; DESLOGES, I.; DUFRESNE, A.; BRAS, J. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 735-764, 2012.

LEE, Y.; CHUNG, C.; DAY, D. F. Sugarcane bagasse oxidation using a combination of hypochlorite and peroxide. **Bioresource Technology**, v.100, p. 935-941, 2009.

LEITE, R.S.L.;GOMES, E.; SILVA, R. Characterization and comparison of thermostability of purified β -glucosidases from a mesophilic *Aureibasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 42, p.1101-1106, 2007.

LEITE, R.S.L.;ALVES-PRADO, H.F.; CABRAL, H. PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E.;DA-SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganismos *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.43, p. 391-395, 2008.

LENIHAN, P.; OROZCO, A.; O'NEILL, E.; AHMAD,M.N.M.; ROONEY, D.W.; WALKER, G.M. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass.**Chemical Engineering Journal**, v.156, p. 395-403, 2010.

LU, F.; RALPH, J. Lignin. **Cereal Straw as a Source for Sustainable Biomaterials and Biofuels: Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicellulose and Cellulose**, cap. 6, p. 169-207, 2010.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, v.20, p.372-380, 2009.

MARTÍN, C; GALBE, M; NILVEBRANT, N-O.; JÖNSSON, L.J.; Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98-100, p.1236, 2002.

MEYER, A. S.; ROSGAARD, L.; SORENSEN, H. R.; The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. **Journal of Cereal Science**, v.50, p. 337-344, 2009.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-434, 1959.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCOOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, p. 69-80, 2000.

PARR, S. R. Some kinetic properties of the β -o-glucosidase (cellobiase) in a commercial cellulase product from *Penicillium funiculosum* and its relevance in the hydrolysis of cellulose. **Enzyme Microbial Technology**, v.5, p.457-462, 1983

PINTO, T. O. P. Produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 e aplicação na sacarificação do bagaço de cana de açúcar com diferentes pré-tratamentos. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

ROE, J. H. A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. **Biological Chemistry**, v. 107, p. 15-22, 1934.

SINGHANIA, R.R. Production of cellulolytic enzymes for the hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes Fermentation**, cap.8, p.177-199, 2010.

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

SOCCOL, C. R.; VANDNBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BOM, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820-4825, 2010

SOMOGYI-NELSON, N. A. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 135, p. 136-175, 1944.

SOUZA-CORRÊA, J. A.; RIDENTI, M. A.; OLIVEIRA, C.; ARAÚJO, S.R.;AMORIM. Decomposition of lignina from sugar cane bagasse during ozonation process monitored by optical and mass espectrometries. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, p. 3110-3119, 2013.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v.83, p.1-11, 2002.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Inhibitors in ethanol processes and different strategies to reduce their effects. **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes Fermentation**, cap. 12, p. 287-311, 2010.

TOYAMA, N. e OGAWA, K. Cellulase production by *Trichoderma viride* in solid and submerged culture methods. In: **Ghose, T.K. (Ed.), Bioconversions of Cellulosic Substances into Energy, Chemicals and Microbial protein**. Symp. Proc. 1977, Indian Institute of Technology, New Delhi, p. 305-327, 1978.

TRAVAINI, R.; OTERO, M. D. M.; COCA, M.; DA-SILVA, R.; BOLADO, S. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. **Bioresource Technology**, v.133, p.332-339, 2013.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, 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, p.1458-1480, 2012.

XIMENES, E.; KIMA, Y.; MOSIERA, N.; DIEND, B.; LADISCH, M. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p. 170-176, 2010.

XU, F. Structure, ultrastructure, and chemical composition. **Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels: Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicellulose and Cellulose**, cap. 2, p. 9-47, 2010.

ZHENG, P.; WANG, J.; LU, C.; XU, Y.; SUN, Z. Immobilized β -glucosidase on magnetic chitosan microspheres for hydrolysis of straw cellulose. **Process Biochemistry**, v.48, p. 683-687, 2013.

