

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

VANESSA MOLINA DE VASCONCELLOS

**Influência dos íons metálicos na atividade e estabilidade de (hemi)celulases e no processo
de sacarificação da biomassa**

São Carlos/SP – Fevereiro de 2015

**INFLUÊNCIA DOS ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DE
(HEMI)CELULASES E NO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO DA BIOMASSA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**INFLUÊNCIA DOS ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DE
(HEMI)CELULASES E NO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO DA BIOMASSA**

Vanessa Molina de Vasconcellos

Aluna de pós-graduação

Cristiane Sanchez Farinas

Orientadora EMBRAPA Instrumentação, PPG-EQ/UFSCar

Raquel de Lima Camargo Giordano

Co-orientadora PPG-EQ/UFSCar

Dissertação de mestrado apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração em **Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos**.

São Carlos/SP – Fevereiro de 2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

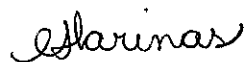
V331i Vasconcellos, Vanessa Molina de
Influência dos íons metálicos na atividade e
estabilidade de (hemi)celulases e no processo de
sacarificação da biomassa / Vanessa Molina de
Vasconcellos. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
79 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2015.

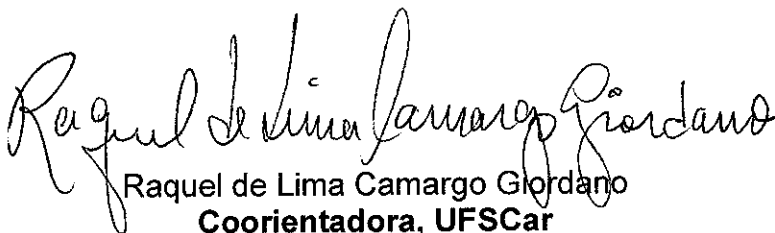
1. *Aspergillus niger*. 2. (Hemi)celulases. 3. Íons
metálicos. 4. Compostos fenólicos. I. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE VANESSA MOLINA DE VASCONCELLOS APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 26 DE FEVEREIRO DE 2015.

BANCA EXAMINADORA:



Cristiane Sanchez Farinas
Orientadora, EMBRAPA/UFSCar



Raquel de Lima Camargo Giordano
Coorientadora, UFSCar



Paulo Waldir Tardioli
UFSCar



Adilson José da Silva
UFSCar



Ursula Fábola Rodríguez Zúñiga
EMBRAPA

*“Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos e Neide, e ao meu irmão, Hugo,
pelo apoio e paciência incondicional”*

*“A ciência nunca
resolve um problema sem
criar pelo menos outros dez”*

George Bernard Shaw

AGRADECIMENTO

A Deus por trilhar meus passos até aqui, colocando em meu caminho pessoas maravilhosas;

Aos meus pais e aos meus irmãos por todo amor, carinho e compreensão ao longo dos anos;

Aos meus familiares pelo apoio e incentivo em todos os momentos;

Aos meus orientadores Cristiane Sanchez Farinas e Raquel de Lima Camargo Giordano pela orientação, ensinamentos e disponibilidade ao longo de todo o período da minha formação;

Ao Prof. Paulo W. Tardioli pela colaboração no desenvolvimento do projeto;

Ao Prof. Alberto que me acolheu como estagiária e a todas as oportunidades que vieram a partir de então;

As analistas da Embrapa Instrumentação e aos técnicos de laboratório do DEQ pelas dicas e ajuda ao longo do projeto;

Aos colegas de laboratório pela ajuda e apoio em todos os momentos;

A Daniela B. Hirata por todo carinho, amizade e conselhos;

Às amigas Fernanda e Letícia por tudo;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Mestrado;

Ao PPG-EQ e à CAPES pelo apoio institucional e financeiro;

À Embrapa Instrumentação pelo apoio institucional e infraestrutura ao projeto;

E finalmente agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

As enzimas envolvidas no processo de degradação da biomassa lignocelulósica para a produção do etanol de segunda geração (2G) agregam um alto custo ao processo. Estudos já reportados na literatura indicam que alguns íons metálicos, facilmente encontrados na natureza, ao serem adicionados ao coquetel enzimático atuam na melhoria da atividade e estabilidade das enzimas e no processo de sacarificação da biomassa. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a estratégia de adição de íons metálicos ao extrato enzimático bruto com o intuito de aumentar a atividade e estabilidade enzimática e a melhoria na conversão do processo de sacarificação. Para a etapa de seleção do complexo (hemi)celulásico foi utilizada uma cepa selecionada de *Aspergillus niger* cultivada em fermentação em estado sólido (FES), fermentação submersa (FSm) e fermentação sequencial (FS). A produção de enzimas e a termoestabilidade foram avaliadas considerando os efeitos do pré-tratamento (explosão a vapor e hidrotérmico) do bagaço de cana-de-açúcar utilizado como fonte de carbono e indutor. A produção de endoglucanase e xilanase foi favorecida pelo cultivo em FES a partir do bagaço explodido e hidrotérmico (submetidos ao processo de lavagem). A remoção de inibidores da biomassa pré-tratada mostrou-se necessária, pois a presença de compostos fenólicos restringiu o crescimento fúngico em FES. Os resultados revelaram que endoglucanase e β -glicosidase produzidas sob FES foram menos propensas à desativação térmica. A partir desses resultados, foi selecionado o complexo enzimático produzido por FES utilizando o bagaço hidrotérmico lavado, para avaliação da influência dos íons metálicos bivalentes Ca, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Zn em duas concentrações (2 e 10 mM) na atividade e estabilidade enzimática. A maioria dos íons metálicos utilizados influenciou, de forma distinta, a atividade e estabilidade enzimática em ambas as concentrações para as enzimas estudadas. O íon Mn^{2+} se destacou, propiciando um aumento de 57% na atividade de endoglucanase e mantendo a enzima estável por 72 horas, além disso não apresentou efeito negativo para β -glicosidase e xilanase. Assim, o íon Mn^{2+} foi selecionado para o estudo da sacarificação dos bagaços de cana submetidos a diferentes pré-tratamentos. A adição do íon Mn^{2+} (10 mM) no processo de sacarificação utilizando extratos enzimáticos produzidos “in house” mostrou-se bastante eficaz no aumento da liberação de glicose, com ganhos percentuais de até 120% para o bagaço pré-tratado em meio ácido (Bác). Para o bagaço explodido lavado (BEX_L) o aumento foi de 55 % e para o hidrotérmico (BHT) foi de 70%. Desse modo, foi possível validar que a adição de íons metálicos é capaz de influenciar positivamente tanto a atividade e estabilidade, como o processo de sacarificação enzimática da biomassa lignocelulósica.

Palavras chave: *A. niger*, (hemi)celulases, íons metálicos, compostos fenólicos.

ABSTRACT

The enzymes involved in the conversion process of lignocellulosic biomass into second generation (2G) ethanol add a high cost to the process. Studies reported in the literature indicate that some metal ions, easily found in nature, improve the activity and stability of enzymes and the biomass saccharification process when added to the enzymatic cocktail. In this context, this work aimed to evaluate the strategy of addition of metal ions in the crude enzymatic extract in order to increase the enzyme activity and stability and to improve the saccharification process. For the production of (hemi)cellulase enzymatic complex step, a selected strain of *Aspergillus niger* was cultivated under solid-state fermentation (SSF), submerged fermentation (SmF) and sequential fermentation (FS). Enzyme production and thermostability were evaluated also considering the effects of pretreatment (using steam-explosion and liquid-hot-water) of the sugarcane bagasse used as carbon source and inducer. For endoglucanase and xylanase enzymes, cultivation under SSF favored production when using steam-exploded and liquid-hot-water pretreated bagasse (both washed). Removal of inhibitors from the pretreated biomass employed in the cultivation media was necessary, because the presence of phenolic compounds restricted fungal growth. The findings revealed that endoglucanase and β -glucosidase produced under SSF were less prone to thermal deactivation. From these results, enzyme complex produced by SSF using the hydrothermal bagasse was selected to evaluate the influence of the divalent metal ions Ca, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Zn in two concentrations (2 and 10 mM) on enzymatic activity and stability. Most of the ions influenced differently the enzymatic activity and stability, at both concentrations. The most favorable influence was obtained by the Mn^{+2} ion, increasing by 57% the endoglucanase activity and maintaining the enzyme stable for 72 hours, besides it also showed no negative effects on β -glucosidase and xylanase. The Mn^{+2} ion was then selected for the saccharification of sugarcane bagasse submitted to different pretreatments. The addition of Mn^{2+} ion (10 mM) in the saccharification process using enzymatic extracts produced "in house" proved to be very effective by increasing the release of glucose up to 120% when using the acid pretreated bagasse (Bác). The increase was 55% for the washed exploded bagasse (BEX_L) and 70% for the liquid-hot-water pretreated bagasse (BHT). Therefore, it was possible to validate that the addition of metal ions is able to positively influence the activity and stability of enzymes, and also the process of enzymatic saccharification of lignocellulose biomass.

Keywords: *A. niger*, (hemi) cellulases, metal ions, phenolic compounds

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Bagaço de cana-de-açúcar "in natura".	8
Figura 2. Utilização da biomassa lignocelulósica na produção de etanol 2G.	9
Figura 3. Representação esquemática do material lignocelulósico.	10
Figura 4. A estrutura da celulose.	11
Figura 5. Estrutura dos monômeros de fenilpropanoides presentes na lignina.	12
Figura 6. Modelo clássico das celulases.	14
Figura 7. Degradação enzimática atual: monooxigenases e celulases.	15
Figura 8. Fermentação em estado sólido (FES).	18
Figura 9. Fermentação Submersa (FSm).	19
Figura 10. Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré-tratamento.	21
Figura 11. Influência do íon metálico no processo de sacarificação da biomassa.	24
Figura 12. Substratos utilizados na produção e sacarificação enzimática.	38
Figura 13. Atividade específica da endoglucanase, β -glicosidase e xilanase no complexo (hemi)celulolítico produzido por <i>A. niger</i> cultivado em FES, FSm e FS, utilizando diferentes tipos de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (BEX, BEX _L e BHT _L).	41
Figura 14. Gel de eletroforese 12% dos extratos FES, FSm e FS utilizando BHT _L (0,4 mg de proteína/mL).	42
Figura 15. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos substratos indutores. Ampliações e barras de escala são fornecidos em cada micrografia.	44
Figura 16. Termoestabilidade e atividade enzimática residual de endoglucanase a 50°C e pH 4,5 presente no complexo (hemi)celulásico produzido por <i>A. niger</i> .	49
Figura 17. Termoestabilidade e atividade enzimática residual de β -glicosidase a 50°C e pH 4,5 presente no complexo (hemi)celulásico produzido por <i>A. niger</i> .	51
Figura 18. Termoestabilidade e atividade enzimática residual de xilanase a 50°C e pH 4,5 presente no complexo (hemi)celulásico produzido por <i>A. niger</i> .	53
Figura 19. Atividade de endoglucanase (%) obtida com a adição dos íons metálicos bivalentes, EDTA e β -mercaptoetanol.	56
Figura 20. Atividade residual de β -glicosidase (%) obtida com a adição dos íons metálicos bivalentes, EDTA e β -mercaptoetanol.	57
Figura 21. Atividade residual de xilanase (%) obtida com a adição dos íons metálicos bivalentes, EDTA e β -mercaptoetanol.	58

Figura 22. Termoestabilidade e atividade enzimática residual a 50°C e pH 4,5 do extrato enzimático incubado na presença dos íons bivalentes e do agente quelante (EDTA), na concentração de 2 mM.....	62
Figura 23. Termoestabilidade e atividade enzimática residual a 50°C e pH 4,5 de endoglucanase (EG), β -glicosidase (β) e xilanase (Xil) incubadas na presença de Mn^{2+} na concentração de 10 mM.....	64
Figura 24. Ganho percentual de glicose liberada (%) com o EB_{CON} na presença do íon Mn^{2+} após 24h de processo a 50°C da hidrólise de diferentes substratos.....	66
Figura 25. Ganho percentual de glicose liberada (%) com o EB_{FT} na presença do íon Mn^{2+} após 24h de processo a 50°C da hidrólise de diferentes substratos.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Influência dos íons metálicos na atividade enzimática.....	26
Tabela 2. Meio de cultivo.....	30
Tabela 3. Carga de proteína por grama de substrato utilizada na hidrólise.....	33
Tabela 4. Composição química dos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados (relativo %, m/m).	38
Tabela 5. Atividade enzimática (UI/L) dos extratos produzidos por <i>A. niger</i> depois de 72 horas em diferentes condições de cultivo.	39
Tabela 6. Concentração dos compostos fenólicos totais nos extratos enzimáticos brutos após 72 horas de cultivo.....	45
Tabela 7. Atividade residual (AR) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de endoglucanase, β -glicosidase e xilanase, depois de 24 horas de incubação a 50°C em tampão acetato pH 4,5...48	48
Tabela 8. Conversão (%) da hidrólise enzimática com enzima comercial a 50°C por 72h.	65
Tabela 9. Concentração de glicose liberada (g/L) e conversão da hidrólise (%) para o EB _{CON} e EB _{FT} sem a adição de íon metálico após 24h a 50°C.	68
Tabela 10. Atividade enzimática (UI/L) dos extratos enzimáticos (EB _{CON} e EB _{FT}) utilizados na hidrólise.	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 Bagaço de Cana-de-açúcar para a Produção Enzimática	8
2.2 Estrutura da Parede Celular da Biomassa Lignocelulósica.....	10
2.3 Enzimas Celulásicas.....	12
2.3.1 Modelo clássico de degradação da celulose: Hidrolases.....	13
2.3.2 Novo modelo de degradação da celulose: Monooxigenases.....	14
2.4 Enzimas Acessórias: Xilanases	16
2.5 Microrganismos Celulolíticos	16
2.6 Tipos de Bioprocessos para a Produção de Celulases	17
2.6.1 Fermentação em estado sólido	18
2.6.2 Fermentação submersa	19
2.6.3 Fermentação sequencial	19
2.7 Sacarificação Enzimática	20
2.7.1 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica	21
2.8 Influência dos Íons Metálicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Microrganismo	28
3.2 Substratos	28
3.2.1 Substratos do cultivo	28
3.2.2 Substratos da sacarificação enzimática	29
3.2.3 Caracterização química do substrato.....	29
3.3 Condições de Pré-cultivo das Fermentações Submersa e Sequencial	29
3.3.1 Meio de cultivo.....	30
3.3.2 Procedimento do pré-cultivo submerso (FSm).....	30
3.3.3 Procedimento do pré-cultivo sequencial (FS)	30
3.4 Produção Enzimática.....	31
3.4.1 Fermentação submersa (FSm) e sequencial (FS)	31

3.4.2 Fermentação em estado sólido (FES).....	31
3.5 Avaliação da Influência dos Íons Metálicos	32
3.5.1 Influência na atividade e estabilidade térmica das enzimas.....	32
3.5.2 Influência no processo de sacarificação da biomassa	32
3.6 Métodos Analíticos.....	33
3.6.1 Atividade de endoglucanase.....	33
3.6.2 Atividade de xilanase	33
3.6.3 Atividade β -glicosidase	34
3.6.4 Análise das proteínas totais	34
3.6.5 Análise dos compostos fenólicos	34
3.6.6 Estabilidade e inativação térmica.....	35
3.7 Eletroforese.....	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Substratos Indutores.....	37
4.2 Influência das Condições de Cultivo na Produção Enzimática	39
4.3 Influência do Tipo de Cultivo na Termoestabilidade das Enzimas.....	47
4.4 Influência dos Íons Metálicos na Atividade Enzimática	54
4.5 Influência dos Íons Metálicos na Termoestabilidade das Enzimas.....	61
4.6 Influência dos Íons Metálicos na Sacarificação Enzimática	64
5 CONCLUSÃO.....	71
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	73
REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

A produção de biocombustíveis no Brasil está entre os segmentos da agroindústria que geram a maior quantidade de biomassa como subproduto. O bagaço de cana-de-açúcar é visto como matéria-prima promissora em toda a cadeia de produção de etanol celulósico (etanol de segunda geração ou etanol 2G), podendo ser utilizado como substrato indutor para a produção de celulases e hemicelulases por microrganismos e também como substrato no processo de sacarificação da celulose para posterior fermentação.

Os biocombustíveis são produzidos a partir de recursos renováveis e têm potencial para serem o maior recurso energético mundial. Entretanto a utilização dos resíduos lignocelulósicos para esse fim ainda tem como obstáculo o alto custo das celulases e hemicelulases, que são as enzimas envolvidas no processo de sacarificação da biomassa (Liu *et al.*, 2013; Prevot *et al.*, 2013).

As enzimas celulases e hemicelulases, também chamadas de (hemi)celulases, podem ser produzidas e excretadas para o meio extracelular através do cultivo de fungos e bactérias (Liu *et al.*, 2013; Yoon *et al.*, 2014). Há uma grande variedade de microrganismos capazes de produzir essas enzimas, como as bactérias aeróbias e anaeróbias, fungos anaeróbios e fungos de podridão branca ou castanha. No entanto, a maioria dos fungos é capaz de produzir coquetéis enzimáticos com maior carga proteica em comparação com as bactérias (Yoon *et al.*, 2014). O fungo filamentoso *Aspergillus niger* destaca-se pelo seu crescimento acelerado, produção de enzimas extracelulares, altos níveis de produção enzimática, maior variedade e estabilidade das enzimas presentes no coquetel enzimático (Castro, Trejoaguilar e Osorio, 1997; Sohail *et al.*, 2009; Farinas *et al.*, 2010; Kar *et al.*, 2013)

Os métodos de cultivo convencionais mais conhecidos para produção das (hemi)celulases são a fermentação em estado sólido (FES), caracterizada pelo cultivo em substrato sólido com umidade controlada, e a fermentação submersa (FSm), realizada na presença de água (Schmidell *et al.*, 2001; Prevot *et al.*, 2013). Recentemente, um processo não convencional, chamado de fermentação sequencial (FS), foi desenvolvido por Cunha *et al.*, 2012 e trata-se de uma combinação dos dois processos convencionais. Sabe-se que coquetéis enzimáticos obtidos a partir de diferentes métodos de cultivo, microrganismos e indutores são compostos por

determinados tipos de enzimas em diferentes concentrações, variedade e características, tais como especificidade e estabilidade (Farinas *et al.*, 2010).

O complexo (hemi)celulásico é composto por diferentes classes de celulases e hemicelulases altamente específicas, agindo sinergicamente na degradação da biomassa. Estudos reportados na literatura indicam que os íons metálicos são capazes de interferir nesse coquetel enzimático ligando-se nas enzimas, podendo modificar a sua conformação e alterar a atividade e/ou estabilidade (Kaur *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2010; Horn *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2013).

Os diferentes desempenhos na sacarificação da biomassa vegetal utilizando os extratos enzimáticos relacionam-se com a heterogeneidade do substrato durante o processo, pois a reação depende do contato enzima-substrato inicial e da interação entre as reações enzima-substrato, nas quais o substrato já se encontra parcialmente degradado, que ocorrem simultaneamente na hidrólise da biomassa (Andric *et al.*, 2010). A lignina é um composto presente no substrato que interfere diretamente no processo de hidrólise, tanto dificultando o contato requerido pelas enzimas, como adsorvendo de forma improdutiva e irreversível (Kim *et al.*, 2001; Liu, Zhu e Fu, 2010). Os íons metálicos podem ser novamente utilizados nessa etapa do processo, adsorvendo-se na lignina e ocupando o sítio onde poderiam ligar-se às enzimas de forma improdutiva, diminuindo, assim, a quantidade de enzimas que ficam inutilizadas (Liu, Zhu e Fu, 2010).

O estudo dos complexos íon-enzima e íon-lignina é de grande interesse no processo de sacarificação enzimática, visando o aumento da atividade e estabilidade enzimática e a redução da perda de enzimas por adsorção improdutiva na lignina, possibilitando, assim, a redução da carga enzimática e, conseqüentemente, diminuindo o custo do processo. Tendo em vista que as celulases agregam um grande custo nos processos que envolvem a produção de etanol 2G, o presente estudo visa investigar a influência dos íons metálicos na acção catalítica do extrato enzimático bruto produzido por *A. niger* durante o processo de sacarificação da biomassa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bagaço de Cana-de-açúcar para a Produção Enzimática

O etanol de segunda geração, ou etanol 2G, produzido a partir da biomassa lignocelulósica tem ganhado reconhecimento como uma alternativa promissora de energia renovável e sustentável. Existem estimativas de que o Brasil tem capacidade de aumentar em 50% a produção de etanol apenas com o uso de palha e bagaço, sem a necessidade de ampliar canaviais (Granbio). Contudo, o desenvolvimento da produção do etanol 2G enfrenta algumas dificuldades técnicas a serem superadas, como a recalcitrância da biomassa à hidrólise e o alto custo das celulases, enzimas necessárias para a conversão da biomassa (Farinas *et al.*, 2010).

Os resíduos agrícolas e agroindustriais, devido à variedade, disponibilidade e baixo custo, destacam-se como matérias-primas potenciais para a produção de etanol 2G. No Brasil, aproximadamente 350 milhões de toneladas de resíduos são produzidos anualmente, originados principalmente da cana-de-açúcar e da soja (Pereira Jr. *et al.*, 2008). O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo agroindustrial de destaque na indústria sucroalcooleira brasileira (**Figura 1**).

Figura 1. Bagaço de cana-de-açúcar "in natura".

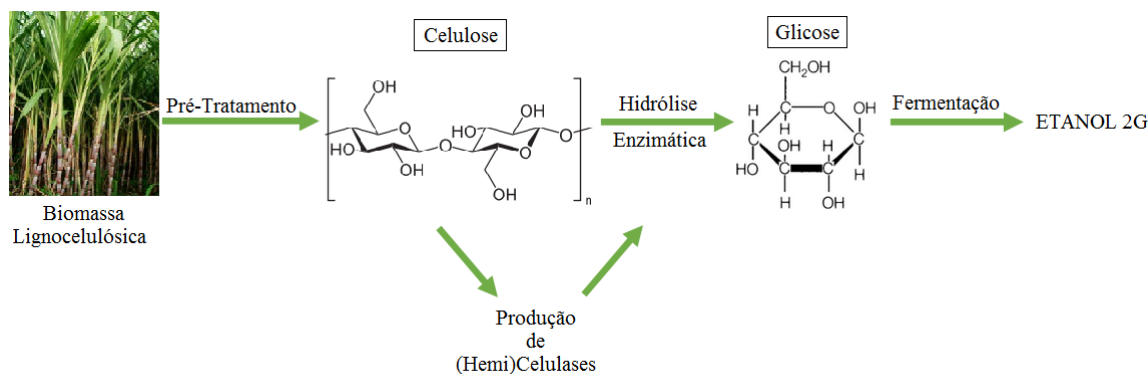


Fonte: Acervo pessoal, 2014.

Atualmente, o bagaço de cana-de-açúcar é visto como matéria-prima promissora em toda a cadeia de produção de etanol 2G. Essa biomassa lignocelulósica pode ser

utilizada na etapa de hidrólise como matéria-prima para a obtenção de monossacarídeos, e na etapa de produção enzimática, atuando como substrato indutor na produção de (hemi)celulases por microrganismos, conforme ilustrado na **Figura 2**.

Figura 2. Utilização da biomassa lignocelulósica na produção de etanol 2G.



Fonte: Acervo pessoal, 2014.

A safra de cana-de-açúcar 2013/14 apresentou um acréscimo na área cultivada de 3,8% em relação à safra anterior, sendo que tal crescimento é reflexo da expansão de novas áreas de cultivos e novas usinas em funcionamento. A área total cultivada e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2013/2014 foi de 8.811,43 mil hectares, destacando-se o estado de São Paulo como maior produtor com 51,7% da área plantada (Conab).

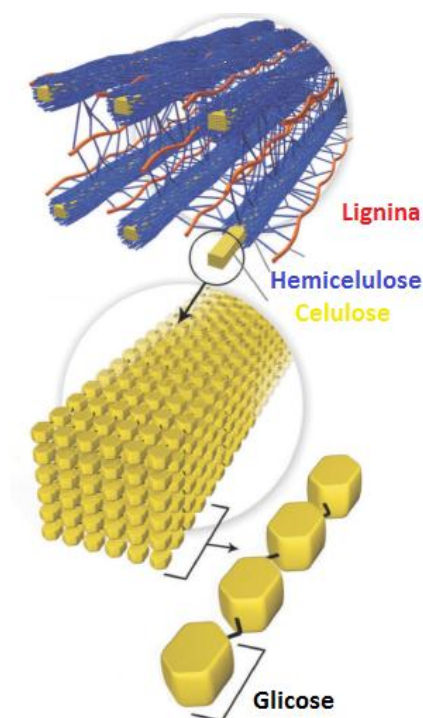
Do açúcar total recuperável da safra 2013/14 estima-se que em média 45,2% foi destinado à produção de açúcar, gerando 37,88 milhões de toneladas do produto, e 54,8% para a produção de etanol, o equivalente a 360,9 milhões de toneladas de cana-de-açúcar produzindo 27,96 bilhões de litros de álcool. Essa produção apresenta um acréscimo de 18,26% em relação à safra 2012/13 (Conab).

A produção de biocombustíveis está entre os segmentos da agroindústria que gera a maior quantidade de biomassa como rejeito (Fao), sendo que para cada tonelada de cana-de-açúcar são gerados cerca de 270 a 280 kg de bagaço (Soccol *et al.*, 2010). O bagaço de cana-de-açúcar apresenta como principais componentes a celulose (32-44%), a hemicelulose (27-32%) e a lignina (19-24%) (Soccol *et al.*, 2010). A utilização dessas biomassas como indutores na produção enzimática, em substituição à celulose sintética, destaca-se com uma abordagem potencial para a redução do custo de produção das celulases, enzimas fundamentais para a produção do etanol 2G (Sukumaran *et al.*, 2009).

2.2 Estrutura da Parede Celular da Biomassa Lignocelulósica

A estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica está ilustrada na **Figura 3**. Ela é constituída por polímeros de celulose e hemicelulose entrelaçados e ligados covalentemente à lignina e que podem ser hidrolisados em monômeros de açúcares, utilizados como substrato para a fermentação alcoólica (Pereira Jr, 2006). O teor de cada um desses componentes e a interação entre eles é o que determina a recalcitrância e a resistência dos mesmos a ataques químicos e físicos (Mosier *et al.*, 2005).

Figura 3. Representação esquemática do material lignocelulósico.



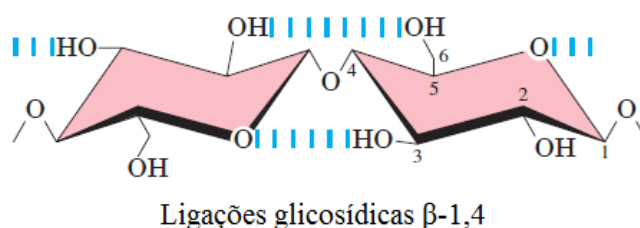
Fonte: adaptação Santos *et al.* (2012).

A celulose, substância fibrosa e resistente, é o principal componente da parede celular vegetal (**Figura 4**). Trata-se de homopolissacarídeos lineares de alta massa molecular, constituídos de 10.000 a 15.000 unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (L. Nelson e M. Cox, 2012).

A fibra de celulose apresenta domínios altamente ordenados devido ao alto número de ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals, as regiões cristalinas,

com domínios menos ordenados, regiões amorfas. Essas regiões amorfas são mais suscetíveis a ataques químicos e bioquímicos, enquanto que as microfibrilas de celulose, cristalinas e insolúveis, representam um desafio para a sacarificação enzimática. A despolimerização completa da fibra de celulose gera um único produto, a glicose (Horn *et al.*, 2012).

Figura 4. A estrutura da celulose.



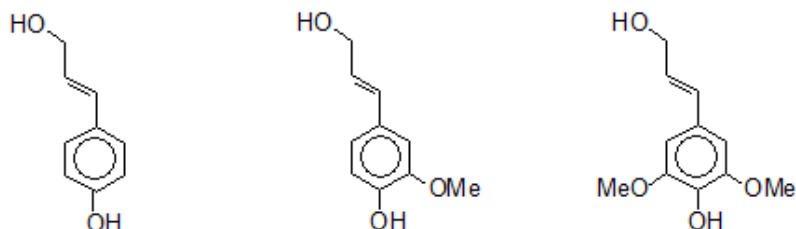
Fonte: adaptação L. Nelson e M. Cox (2012).

A lignina, o segundo componente mais abundante presente na parede celular vegetal, têm a função biológica de proteger o tecido vegetal contra a oxidação e a ação microbiana, além de participar da transferência de água, nutrientes e metabólitos, conferindo resistência mecânica (De Castro e Pereira, 2010). Essa macromolécula é formada por uma complexa rede de compostos fenólicos formando, assim, uma barreira hidrofóbica e insolúvel (Levasseur *et al.*, 2013). Tal polímero aromático é composto por três diferentes monômeros de fenilpropanóides: o álcool cumárico, coniferílico e o sinapílico (**Figura 5**). A quantidade de grupamentos alcoólicos e metoxílicos variam de acordo com a origem da lignina e são capazes de estabelecer ligações com os polissacarídeos presentes ao redor (L. Nelson e M. Cox, 2012). Os tipos fenólicos de tais compostos diferem no substituinte metoxil e são chamados de unidades hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S). Em geral, as ligninas são classificadas de acordo com as quantidades relativas das unidades hidroxifenila, guaiacila e siringila. (Saliba *et al.*, 2001).

Devido aos diversos padrões de ligações entre as unidades individuais, a lignina não deve ser considerada uma substância química única, variando de acordo com a espécie vegetal. Assim, a estrutura do polímero de lignina é complexa e não está totalmente elucidada. A limitação imposta pela lignina é suficiente para retardar e até mesmo impedir completamente a atuação microbiana e enzimática sobre a biomassa

vegetal, impedindo o acesso das enzimas à fibra de celulose (L. Nelson e M. Cox, 2012).

Figura 5. Estrutura dos monômeros de fenilpropanoides presentes na lignina.



Álcool cumárico Álcool coniferílico Álcool sinapílico

Fonte: lignoworks.ca/content/what-lignin (2014).

A hemicelulose é o componente ligante entre a celulose e a lignina. Trata-se de um heteropolímero ramificado de xilose, manose, galactose, arabinose, glicose e vários tipos de ácidos urônicos. A hemicelulose classifica-se em xilanas, mananas e galactanas, dependendo do tipo de açúcar predominante em sua estrutura. Como a hemicelulose é a ponte entre a celulose e a lignina, a sua remoção promove a acessibilidade das enzimas à celulose e a melhoria de toda a degradação da biomassa (Hou e Shaw, 2008). Diferente da celulose, a degradação da hemicelulose gera uma mistura de açúcares rica em pentoses (Horn *et al.*, 2012). Dentre os componentes menos abundantes que podem estar presentes na biomassa incluem-se as proteínas, lipídeos, pectina, açúcar solúveis e minerais (Horn *et al.*, 2012).

2.3 Enzimas Celulásicas

As enzimas lignocelulolíticas englobam uma série de enzimas relacionadas à degradação da biomassa lignocelulósica, tais como celulases, hemicelulases, pectinases, lacase, peroxidase de manganês e lignina peroxidase (Liu *et al.*, 2013).

As celulases constituem um complexo enzimático capaz de atuar sobre a celulose, promovendo a sua hidrólise. São biocatalisadores que atuam em sinergia para a liberação de glicose, um açúcar redutor de grande interesse industrial devido à sua conversão em etanol pelo processo de fermentação alcoólica (De Castro e Pereira, 2010).

As celulasas também são utilizadas em ramos industriais distintos como aditivo para rações animais, nas indústrias de alimentos e bebidas, na indústria madeireira, na indústria têxtil, na preparação de tecidos e no processamento do papel. Entretanto, a utilização de destaque é no processo de produção de etanol 2G (De Castro e Pereira, 2010; Yoon *et al.*, 2014). Obstáculo, no entanto, para a utilização de celulasas na produção do etanol 2G relaciona-se com o alto custo dessas enzimas, a baixa quantidade de celulasas produzidas por microrganismos celulolíticos e a complexidade da estrutura da biomassa lignocelulósica (Gottschalk, Oliveira e Bon, 2010).

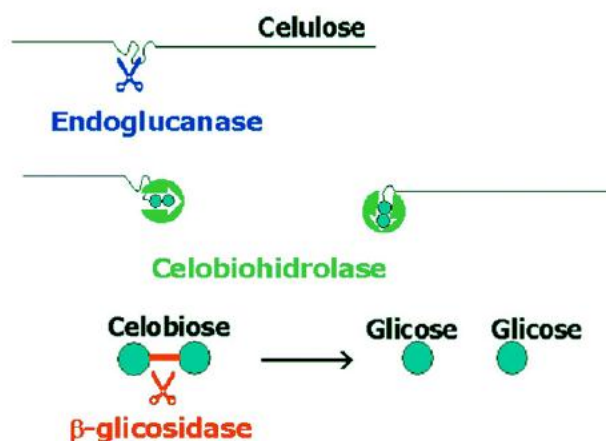
Coquetéis enzimáticos obtidos a partir de diferentes métodos de cultivo, microrganismos e indutores são compostos por determinados tipos de enzimas em diferentes concentrações, variedade e características, tais como especificidade e estabilidade, resultando assim, em desempenhos distintos de hidrólise (Farinas *et al.*, 2010).

2.3.1 Modelo clássico de degradação da celulose: Hidrolases

Tradicionalmente, as enzimas do complexo celulolítico são classificadas como hidrolases capazes de clivar ligações glicosídicas com a adição de molécula de água. Esse complexo é composto por enzimas de ação endo, que clivam aleatoriamente resíduos internos da cadeia do polissacarídeo, e ação exo, que degradam os polímeros a partir da extremidade das cadeias (Horn *et al.*, 2012). O modelo clássico de degradação da celulose envolve a ação sinérgica de três classes enzimáticas: endo-1,4- β -glucanases, exo-1,4- β -glucanases e β -glicosidases (**Figura 6**). As enzimas de ação endo geram novos terminais redutores e não redutores para as enzimas de ação exo, que liberam a celobiose, que, por sua vez, é convertida em glicose pelas β -glicosidases.

As endoglucanases (endo-1,4- β -glucanases) são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise, clivando randomicamente ligações na cadeia da celulose da região amorfa. Essas enzimas podem atuar de forma progressiva ou não progressiva, na qual a associação enzima-substrato é seguida por vários cortes consecutivos em uma única cadeia de polissacarídeo (Horn *et al.*, 2012). As endoglucanases são responsáveis pela rápida solubilização do polímero, devido à liberação de oligossacarídeos em diferentes graus de polimerização (De Castro e Pereira, 2010).

Figura 6. Modelo clássico das celulases.



Fonte: adaptação Ogeda e Petri (2010).

As exoglucanases (exo-1,4- β -glucanases) atuam sobre a celulose cristalina, atacando as extremidades redutoras e não redutoras do polímero e são divididas em celobiohidrolase e glucanohidrolase (Zhang, Himmel e Mielenz, 2006). As celobiohidrolases são as enzimas mais abundantes em misturas naturais e comerciais de celulases, tem como produto de hidrólise as celobioses, atuam em terminais redutores e não redutores e são inibidas pelo produto de hidrólise. E as glucanohidrolases, pouco reportadas, são capazes de liberar glicose diretamente do polímero (De Castro e Pereira, 2010).

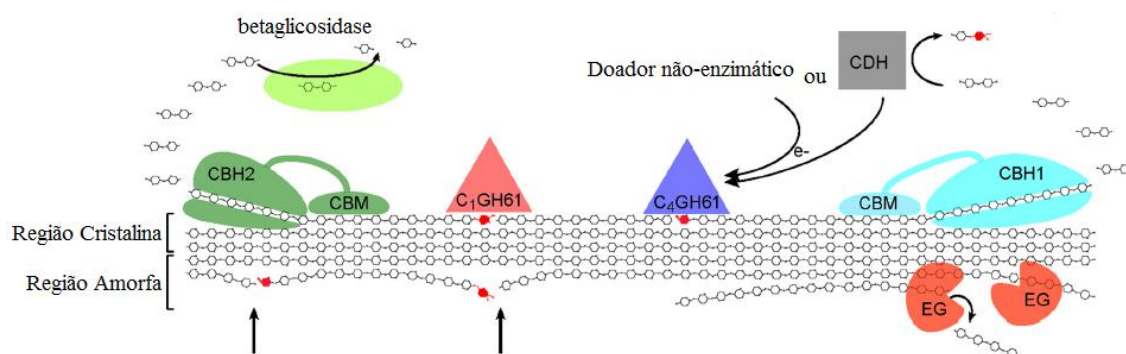
A β -glicosidase converte celobiose, o maior produto das endo e exo-glucanases, e pequenos oligossacarídeos em glicose (Horn *et al.*, 2012). A presença dessa enzima nos coquetéis enzimáticos é importante para evitar que o acúmulo de celobiose resulte na inibição das exo- e endo- glucanases. Assim como essas enzimas, a β -glicosidase é inibida pelo seu produto (De Castro e Pereira, 2010).

2.3.2 Novo modelo de degradação da celulose: Monooxigenases

Estudos recentes apontam a participação das enzimas CBM33 e GH61 (monooxigenases líticas de polissacarídeos) e a CDH (celobiose desidrogenase) atuando sinergicamente com as celulases na degradação do polímero de celulose (**Figura 7**). Essas enzimas são atualmente classificadas como “Atividades Auxiliares” (AA), sendo que essa nova categoria reúne as monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMO) e as enzimas redox envolvidas na degradação da lignina (Levasseur *et al.*, 2013).

Os genes que codificam essas proteínas são abundantes nos genomas de microrganismos que degradam a biomassa lignocelulósica, sendo mais comum a produção de CBM33 em bactérias e das GH61 em fungos, sendo que ambas possuem estruturas similares (Horn *et al.*, 2012; Levasseur *et al.*, 2013).

Figura 7. Degradação enzimática atual: monooxigenases e celulases.



Legenda: Abreviações: EG, endoglucanase; CBH, celobiohidrolases; CDH, celobioses desidrogenases; CBM, módulo de ligação ao carboidrato, GH61, monooxigenases. As setas na parte inferior ilustram uma possível consequência da ação das GH61.

Fonte: adaptação Horn *et al.* (2012).

As monooxigenases ligam-se ao substrato plano (regiões cristalinas) e clivam as cadeias poliméricas de celulose a partir de um mecanismo oxidativo, dependente de íons metálicos bivalentes, oxigênio molecular e doadores de elétrons, deixando-as mais acessíveis às celulases (Horn *et al.*, 2012).

As enzimas GH61, classificadas atualmente como AA9, são monooxigenases líticas de polissacarídeos cobre - dependentes, que contém resíduos de histidina conservados, sendo que a clivagem oxidativa por essas enzimas exige a presença de um composto doador de elétrons. Atuam como doadores o ácido gálico, ácido ascórbico, a glutathiona reduzida e celobioses desidrogenases (CDH). Na presença de material lignocelulósico, a lignina também pode atuar como doadora de elétrons. As GH 61 oxidam o C1 (carbono 1) da estrutura do anel da glicose, mas também são capazes de oxidar o C4 e C6 (Levasseur *et al.*, 2013). O coquetel enzimático Cellic CTec2, produzido pela Novozymes, contém GH61 e esse é um dos fatores que contribui na melhora da sua performance em comparação aos seus antecessores (Horn *et al.*, 2012).

As CBM33, classificadas atualmente como AA10, são monooxigenases cobre-dependentes, que utilizam oxigênio molecular e doadores de elétrons externos, clivam a

cadeia cristalina da celulose produzindo o ácido aldônico. As CBM33 possuem estrutura similar às GH61, incluindo um resíduo de histidina, componente do sítio de ligação do metal (Levasseur *et al.*, 2013).

A celobiose desidrogenase (CDH), classificada atualmente como AA3_1, participa do complexo celulolítico de alguns fungos. Possui atividade oxidativa, oxidando vários açúcares como celobiose, oligômeros de glicose e lactose. Embora não haja evidências, acredita-se que as CDH estejam envolvidas na degradação da celulose, hemicelulose e lignina, atuando também como doador de elétrons para as monooxigenases (Arantes *et al.*, 2009; Levasseur *et al.*, 2013).

Assim, a ação das celulasas hidrolíticas clássicas podem ser facilitadas pela ação sinérgica das monooxigenases, aumentando a velocidade da conversão da biomassa, reduzindo a carga enzimática e o tempo de processo (Horn *et al.*, 2012).

2.4 Enzimas Acessórias: Xilanases

As hemicelulasas são enzimas que atuam sobre a hemicelulose, desestruturando o entrelaçamento do tecido vegetal, facilitando o acesso das enzimas no interior da fibra e, dessa forma, são essenciais em misturas enzimáticas utilizadas na hidrólise do material lignocelulósico (Bailey e Poutanen, 1989; Dodd e Cann, 2009; Perpetua Buzon Pirota *et al.*, 2013). A maior fração da hemicelulose presente na biomassa é constituída por polímeros de xilana, que são convertidos principalmente em xilose e arabinose (Saha, 2003).

A xilana sofre despolimerização pela ação de endo e exo xilanases e é desramificada pela ação de enzimas como acetil-xilano esterase, α -arabinofuranosidase, acetil manana esterase, feruloil esterases, p-coumaroil esterase e α -glucuronidase (Dodd e Cann, 2009; Gottschalk, Oliveira e Bon, 2010).

2.5 Microrganismos Celulolíticos

Há uma grande variedade de microrganismos capazes de produzir e excretar para o meio extracelular (hemi)celulasas, tais como as bactérias e fungos. A maioria dos fungos é capaz de produzir coquetéis enzimáticos de maior carga proteica em comparação com as bactérias. A celulase comercial é geralmente produzida por duas

cepas de fungos filamentosos, *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* (Yoon *et al.*, 2014).

Fungos filamentosos produzem diferentes coquetéis enzimáticos capazes de hidrolisar os polissacarídeos contidos na biomassa lignocelulósica. Essas enzimas são produzidas principalmente pelos fungos do gênero *Trichoderma* (Gottschalk, Oliveira e Bon, 2010). O *T. reesei* é o fungo celulolítico melhor caracterizado e o mais utilizado industrialmente para a produção de celulases e hemicelulases (Beguin e Aubert, 1994; King *et al.*, 2009; Horn *et al.*, 2012). Entretanto, os coquetéis produzidos por *Trichoderma* são ineficientes na conversão da biomassa em moléculas de glicose devido à baixa produção de β -glicosidase (Gottschalk, Oliveira e Bon, 2010).

Diante da necessidade de uma grande variedade de enzimas, o fungo filamentoso *Aspergillus* vem sendo explorado e destaca-se com a produção de um complexo enzimático contendo celulases, xilanases e outras enzimas acessórias (Kim *et al.*, 2011). O fungo *A. niger* apresenta uma maior produção de β -glicosidases quando comparada ao *T. reesei* (Sohail *et al.*, 2009; Farinas *et al.*, 2010).

As principais características do fungo filamentoso *Aspergillus niger* são:

- Microrganismo aeróbio;
- Heterotrófico;
- Capacidade de produção de enzimas e biomoléculas (alta capacidade de produção de enzimas celulolíticas);
- Capacidade de crescer na ausência de água livre;
- Facilidade de manipulação e adaptação;
- Forma de reprodução através de esporos;
- Crescimento através de filamentos celulares – hifas.

2.6 Tipos de Bioprocessos para a Produção de Celulases

Os métodos de cultivo convencionais mais conhecidos para produção de celulases são a fermentação em estado sólido (FES), caracterizada pelo cultivo em substrato sólido e umidade controlada, e a fermentação submersa (FSm), realizada na presença de água. Recentemente, um processo não convencional chamado de fermentação combinada (FC) foi desenvolvido por (Cunha *et al.*, 2012)), e trata-se de uma combinação dos dois processos convencionais.

2.6.1 Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo no qual ocorre o cultivo de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, podendo ser um substrato ou um material inerte (**Figura 8**). O conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) presente deve assegurar o crescimento e o metabolismo das células, mas não exceder a capacidade máxima de ligação da água com a matriz sólida, ou seja, o processo é caracterizado pela ausência de água livre. A FES é um processo interessante para a obtenção de diversos produtos como enzimas, biomassa microbiana, inóculos, alimentos, medicamentos, dentre outros produtos de interesse econômico (Schmidell *et al.*, 2001).

Figura 8. Fermentação em estado sólido (FES).



Fonte: acervo pessoal, 2014.

A FES apresenta a vantagem da utilização de substratos mais baratos para a produção de enzimas, como os resíduos agroindustriais, tornando o processo economicamente atrativo (Holker, Hofer e Lenz, 2004). Os resíduos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e outros) atuam como substrato sólido e servem como fonte de carbono e energia ao microrganismo (Pirota *et al.*, 2013). As enzimas produzidas por FES são menos susceptíveis à inibição pelo substrato, mais concentradas e apresentam uma maior estabilidade a variações de temperatura e pH (Holker, Hofer e Lenz, 2004). A utilização de fungos filamentosos é vantajosa no processo de fermentação em estado sólido, pois simula o ambiente natural desses microrganismos (Holker e Lenz, 2005).

Entretanto, a FES possui determinadas limitações relacionadas ao controle das variáveis operacionais, como a umidade do substrato e a temperatura, o que dificulta a

ampliação de escala (Pirota *et al.*, 2013; Prevot *et al.*, 2013). Outras dificuldades operacionais encontradas nesse processo são o monitoramento de parâmetros operacionais como o pH e crescimento do microrganismo, e também dificuldade na amostragem representativa devido à heterogeneidade do meio (Schmidell *et al.*, 2001).

2.6.2 Fermentação submersa

O processo de produção enzimática utilizando microrganismos pode ser conduzido com o meio nutriente no estado líquido, conhecido como fermentação convencional ou fermentação submersa (FSm), conforme ilustrado na **Figura 9**. Esse processo de cultivo ocorre em fermentadores em escala industrial, fermentadores de bancadas ou em frascos agitados (Schmidell *et al.*, 2001).

Figura 9. Fermentação Submersa (FSm).



Fonte: acervo pessoal, 2014.

A fermentação submersa apresenta vantagens como a facilidade de cultivo em grandes escalas, a homogeneidade do meio e o fácil controle dos parâmetros importantes (Couto e Sanroman, 2006). Outras características positivas de destaque da FSm é o meio de cultura fluir livremente, a fácil inoculação e uma melhor absorção dos nutrientes pelo microrganismo. Contudo há gastos elevados com a aeração, a formação de espuma que atrapalha o crescimento do microrganismo e extratos enzimáticos mais diluídos, que requerem a adição de processos de concentração e/ou purificação, encarecendo a produção (Yoon *et al.*, 2014).

2.6.3 Fermentação sequencial

O processo não-convencional, chamado de fermentação sequencial (FS), desenvolvido para uma linhagem de *Aspergillus niger* é uma combinação dos processos convencionais FES e FSm. A FS é caracterizada pela realização de um pré-cultivo com etapa inicial no estado sólido e posterior transição para cultivo submerso. Esse novo método de cultivo apresentou uma maior produtividade enzimática de celulasas em relação ao processo convencional (FSm), tendo como vantagem a adaptação do microrganismo ao substrato sólido desde sua germinação, o que reduz o período do início da produção das enzimas no cultivo (Cunha *et al.*, 2012). O uso da fermentação sequencial (FS) para a produção enzimática mostrou-se superior ao método de fermentação submersa (FSm), para outras três linhagens de *Trichoderma* estudadas (Florencio *et al.*, 2015).

2.7 Sacarificação Enzimática

A produção de açúcares fermentescíveis a partir de materiais lignocelulósicos pode ocorrer por hidrólise química ou enzimática. A hidrólise ácida é uma tecnologia mais madura mas, por utilizar processos à base de ácidos fortes, torna-se desfavorável ambiental e economicamente (Lynd, 1996). A rota enzimática apresenta como vantagens em relação aos demais processos, as condições mais amenas de operação e a ausência de resíduos tóxicos, tornando-a uma melhor opção para desenvolvimento sustentável do processo. As dificuldades envolvendo o uso da hidrólise enzimática são o alto custo das celulasas comerciais e a recalcitrância da biomassa vegetal (Duff e Murray, 1996; Ogeda e Petri, 2010; Yoon *et al.*, 2014).

A velocidade de hidrólise enzimática varia com a heterogeneidade do substrato, pois a reação depende do contato enzima-substrato e da interação entre as reações enzima-substrato no decorrer das etapas intermediárias da hidrólise, as quais já vão liberando intermediários antes do produto final. Inicialmente, a região amorfa é hidrolisada. Depois a região cristalina, que caracteriza a etapa mais lenta do processo (Andric *et al.*, 2010).

A hidrólise enzimática é realizada em condições amenas, pH ao redor de 4,8 e temperaturas entre 45-50°C, faixas ótimas para a maioria das enzimas envolvidas no processo. A concentração de sólidos geralmente não ultrapassa 10% (m/v) devido a problemas reológicos. No entanto, o emprego de cargas mais altas de sólidos, de até 30% de sólidos, tem sido estudado (Cannella e Jorgensen, 2014). A carga enzimática

varia de acordo com o substrato e processo, sendo que maiores cargas são requeridas para biomassas mais recalcitrantes e processos em batelada. A agitação também é um parâmetro importante no processo, a agitação vigorosa pode causar perda de enzima devido a força de cisalhamento (Duff e Murray, 1996; Sun e Cheng, 2002).

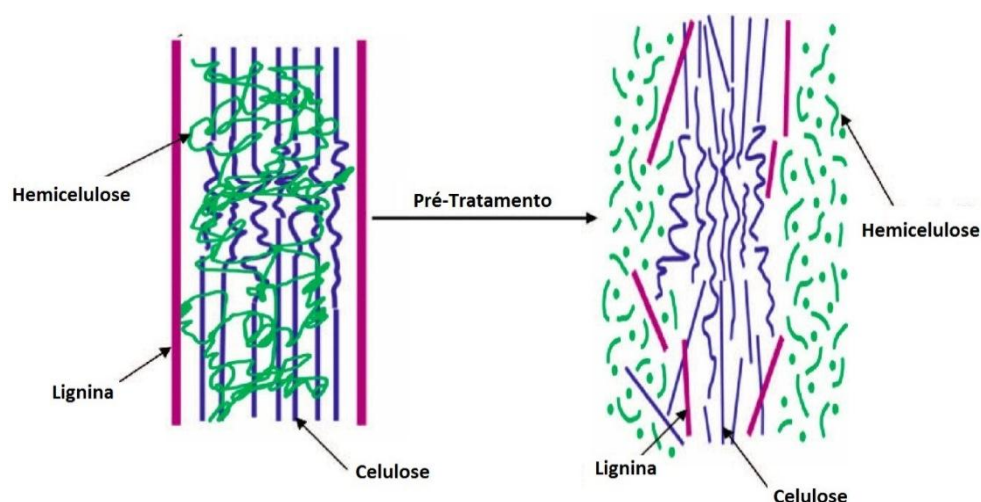
A recalcitrância do material lignocelulósico é a maior limitação no processo de hidrólise, assim, o pré-tratamento é uma etapa crucial para a sacarificação da biomassa, uma vez que a ligação entre a lignina e a hemicelulose dificulta o acesso das enzimas à celulose e, conseqüentemente, reduz a eficiência da hidrólise (Dodd e Cann, 2009).

2.7.1 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

O pré-tratamento eficiente visa o rompimento das estruturas lignina-hemicelulose-celulose, a redução do tamanho das partículas, a redução da cristalinidade da celulose, o aumento da porosidade do material, a preservação das pentoses e hexoses e a minimização da formação de inibidores, dos gastos energéticos e custos (Sun e Cheng, 2002; Mosier *et al.*, 2005).

Durante o pré tratamento, características químicas, físicas e morfológicas são alteradas, tornando a biomassa mais acessível à sacarificação enzimática (**Figura 10**). A fim de se fracionar, solubilizar, hidrolizar e separar a celulose, a hemicelulose e a lignina, vários pré-tratamentos estão disponíveis, a partir de métodos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos.

Figura 10. Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré-tratamento.



Fonte: adaptação Mosier *et al.* (2005).

O pré-tratamento por explosão a vapor, o hidrotérmico e o ácido diluído geralmente geram inibidores solúveis que influenciam negativamente a hidrólise enzimática e a fermentação alcoólica. Os componentes tóxicos e inibitórios liberados variam com o pré-tratamento e incluem açúcares solúveis, derivados de furano (hidroximetil furfural e furfural), ácidos orgânicos (acético, fórmico e levulínico) e compostos fenólicos (Kim *et al.*, 2011).

A maioria dos inibidores das enzimas são os compostos fenólicos, oriundos da degradação da lignina (Ximenes *et al.*, 2011). Os efeitos inibitórios e desativadores dos compostos fenólicos no complexo celulásico têm sido bastante estudados. Entretanto, pouco se sabe sobre a natureza das interações e os mecanismos de inibição (Ximenes *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Ximenes *et al.*, 2011).

Tem sido reportado que a lavagem do material, pré-tratado a vapor ou hidrotérmicamente, com água quente (~90 °C) remove compostos como oligossacarídeos e fenólicos, que atuam como inibidores na hidrólise enzimática e na fermentação com leveduras (Kim, Mosier e Ladisch, 2009; Kim *et al.*, 2013).

Cada técnica de pré-tratamento tem as suas vantagens e desvantagens, sendo que para o bagaço de cana-de-açúcar os pré-tratamentos hidrotérmicos vêm se destacando (Laser *et al.*, 2002; De Souza *et al.*, 2013). No processo de explosão a vapor, é adicionado vapor saturado à biomassa até uma alta pressão, seguido de uma rápida descompressão explosiva, enquanto que no pré-tratamento hidrotérmico a biomassa é exposta à água quente sob pressão (Laser *et al.*, 2002; Mosier *et al.*, 2005). Ambos os processos são capazes de extrair os polímeros mais solúveis e contribuem para a remoção da fração de hemicelulose da biomassa, entretanto, as quantidades e características das fibras resultantes e dos inibidores podem variar.

2.8 Influência dos Íons Metálicos

As enzimas celulolíticas são susceptíveis à influência de íons metálicos, seja sofrendo efeitos inibitórios, indutores ou desativadores. A sua influência varia de enzima para enzima, de acordo com a fonte e o microrganismo. Alguns estudos da influência dos íons metálicos na atividade de enzimas que degradam a biomassa lignocelulósica estão apresentados na **Tabela 1**.

Os íons metálicos são capazes de influenciar distintamente diferentes endoglucanases produzidas por um mesmo microrganismo, bem como endoglucanases produzidas por diferentes microrganismos.

Em estudo realizado por Kaur *et al.* (2007) e Franco *et al.* (2011) verificou que as endoglucanases de *Streptacidiphilus sp.* apresentaram um aumento de atividade na presença de Mn^{2+} (78,6%) e Co^{2+} (54,1%).

Segundo Moreira *et al.* (2013), foi observado que duas xilanases isoladas de *Aspergillus terreus* (Xil1 e Xil2) são inibidas pelos íons metálicos Ag^+ (10 mM) e K^+ (1 e 10 mM), mas não na mesma intensidade. O íon de Mn^{2+} na concentração de 10 mM aumentou as atividades das xilanases Xil1 e Xil2 em 36 e 61%, respectivamente. Essas xilanases também têm a sua atividade aumentada na presença de EDTA, sendo a Xil1 a mais afetada com o aumento de 23%.

Harris *et al.* (2010) demonstraram a importância da presença de íons bivalentes para as monooxigenases GH61 e como elas atuam sinergicamente com as celulases, melhorando o desempenho na hidrólise. Entretanto, a utilização de íons metálicos em extratos enzimáticos, sem a adição extra de monooxigenases, não atuam necessariamente de forma positiva na atividade enzimática das celulases totais (Andrade *et al.*, 2011).

As β -glicosidases também são influenciadas pela adição de íons metálicos. Riou *et al.* (1998) observaram que as β -glicosidases de *Aspergillus oryzae* glicose tolerantes são inibidas por uma grande variedade de cátions (Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+}) na concentração de 5 mM. Entretanto, a presença de Mn^{2+} foi capaz de aumentar em 77% a atividade enzimática.

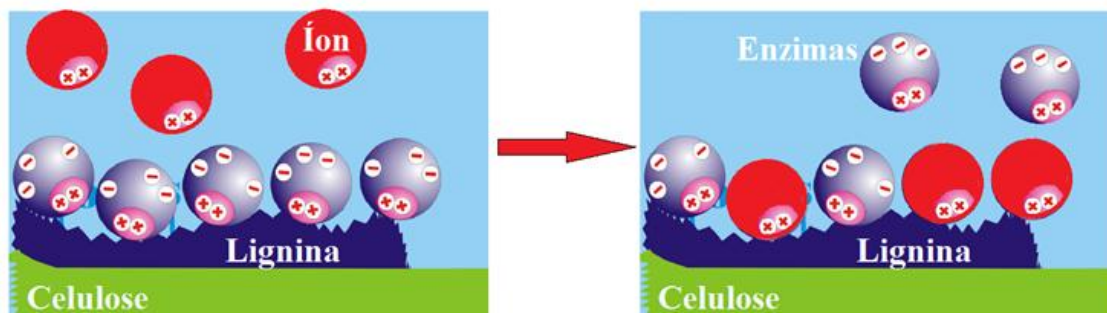
Kim *et al.* (2001) estudaram a influência dos íons metálicos de Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , e Cd^{2+} na concentração de 10 mM, no processo da hidrólise de celulose cristalina (Avicel) utilizando duas celobiohidrolases isoladas (CBH1 e CBH2) do extrato comercial de *Trichoderma reesei*. A adição dos íons Mn^{2+} , Ba^{2+} e Ca^{2+} acarretou em um aumento dos açúcares redutores de 42, 35 e 14% para a CBH1 e 77, 75 e 15% para CBH2, respectivamente. Esses dados corroboram a informação de que a influência dos íons metálicos varia de enzima para enzima, da mesma classe enzimática, produzidas pelo mesmo microrganismo. Nesse estudo, o cátion Mn^{2+} foi o que mais aumentou e o Hg^{2+} foi o que mais reduziu a atividade enzimática das celobiohidrolases. Assim, foram realizadas cinéticas de adsorção para esses dois casos e constatou-se que o processo de adsorção segue a cinética de Langmuir, e que após 60 minutos, a adsorção

se estabiliza. Constatou-se também, que a adição de Mn^{2+} aumentou a constante de afinidade de adsorção (K_{ad}), indicando que a presença desse íon metálico aumenta a afinidade de adsorção da enzima pelo substrato. A situação contrária ocorre quando é adicionado o íon Hg^{2+} no meio.

Durante o processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica ocorre a adsorção improdutivo de enzimas na lignina. A adsorção das enzimas na lignina é impulsionada pela interação hidrofóbica e eletrostática, e esses dois fatores influenciam a adsorção de forma distinta para cada classe enzimática. A interação hidrofóbica é considerada a maior força no processo de adsorção (Pareek, Gillgren e Jonsson, 2013; Ko *et al.*, 2015). Além de inibir o processo de hidrólise pela adsorção de enzimas improdutivas, a lignina contribui limitando o acesso da área de superfície da celulose restringindo-a, e através de deposição de pequenas gotículas esféricas de lignina na superfície da fibra, causando um efeito de blindagem (Pareek, Gillgren e Jonsson, 2013).

Os íons metálicos podem ser adsorvidos pela lignina diminuindo a adsorção improdutivo de enzimas (**Figura 11**) (Guo, Zhang e Shan, 2008).

Figura 11. Influência do íon metálico no processo de sacarificação da biomassa.



Fonte: adaptação Wang *et al.* (2013).

Acredita-se que mais de um mecanismo esteja envolvido na formação da ligação lignina-íon, dentre eles permuta iônica, adsorção superficial, e complexação. A adsorção é fortemente dependente do pH e da força iônica. Superfícies de lignina contem dois sítios ácidos, com radicais hidroxilas, principais nos quais ocorre a ligação do íon, grupos carboxílico e fenólicos. Os sítios fenólicos tem maior afinidade pelo íon metálico do que o carboxílico (Guo, Zhang e Shan, 2008).

A afinidade de adsorção das celulasas pela lignina pode ser alterada de acordo com o pré-tratamento utilizado. As celulasas de *Trichoderma reesei* têm maior afinidade

de adsorção pela lignina isolada da madeira do eucalipto pré-tratado por explosão a vapor do que pela lignina isolada da madeira de eucalipto bruta e provavelmente isso ocorre devido às mudanças moleculares da lignina causadas pelo pré-tratamento. O aumento da afinidade lignina-celulase prejudica a atividade enzimática (Nonaka, Kobayashi e Funaoka, 2013).

Estudos realizados com a adição de agentes tensoativos (surfactantes) na etapa de hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica mostraram um aumento da conversão da celulose em açúcares solúveis. Estudos de adsorção da celulase de *Trichoderma reesei* durante a hidrólise mostrou que tensoativos aniônicos e não-iônicos reduzem a adsorção da enzima. A melhor conversão de lignocelulose com a adição do surfactante pode ser explicada pela redução da adsorção improdutiva da enzima na lignina presente no substrato. Isto ocorre devido à interação hidrofóbica do surfactante à lignina na superfície da biomassa lignocelulolítica, que libera a enzima improdutiva ligada não especificamente (Eriksson, Borjesson e Tjerneld, 2002)

Segundo Liu, Zhu e Fu (2010), os íons metálicos também têm a capacidade de se complexar com a lignina durante o processo de hidrólise enzimática, sendo que o Cu^{2+} e Fe^{2+} reduzem consideravelmente (~50%) o efeito da degradação da biomassa na hidrólise enzimática da celulose na presença de lignina. Já o Ca^{2+} e o Mg^{2+} destacam-se, reduzindo ou eliminando a adsorção improdutiva da enzima pela formação do complexo lignina-metal. A adição desses íons em uma concentração de 10 mM eliminou quase completamente a adsorção improdutiva da enzima sobre a lignina sulfonada (SL), organosolv (OL) e kraft (KL). O íon Ca^{+2} também reduziu o efeito inibidor da lignina ligada no substrato de madeira pré-tratada, indicando a formação de complexos íon-lignina em matérias lignocelulósicos pré-tratados.

Essa complexação é de grande interesse no processo de sacarificação enzimática evitando a perda de enzimas por adsorção improdutiva na lignina, possibilitando a redução da carga enzimática e conseqüentemente, diminuindo o custo do processo. As diferenças de adsorção e complexação íons-lignina relacionam-se às diferentes estruturas químicas e grupos funcionais que participam dessa interação.

Tabela 1. Influência dos íons metálicos na atividade enzimática.

Autor/Ano	Fungo	Enzima	Origem extrato enzimático	Íon/Concentração	Conclusão
Riou <i>et al.</i> (1998)	<i>Aspergillus oryzae</i> CBS 12559	β -glicosidase glicose tolerante (HGT-BG)	FSm: quercetina	EDTA Ag^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} 5mM	- Inibição significativa: Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} ; - Não é afetada pelo EDTA; - Aumento de 77% na presença de Mn^{2+} .
Kaur <i>et al.</i> (2007)	<i>Melanocarpus sp.</i> MTCC 3922	Endoglucanase EGI e EGII	FSm: palha de arroz	EDTA Mercaptoetanol Ca^{2+} , Cu^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} 10 mM	- EDTA inibe a EGI e EG II; - Inibição EG1: Ca^{2+} e Zn^{2+} ; - Inibição EGII: Fe^{2+} e Mn^{2+} .
Harris <i>et al.</i> (2010)	<i>Trichoderma reesei</i> <i>T. aurantiacus GH61A</i>	Celulases (C) GH61	Cedido pela Novozymes	EDTA Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} 1 mM	- Hidrólise palha de milho pré-tratada com C ou C+GH61; - EDTA não interfere em nenhuma das combinações; - C + Zn^{2+} : inibição; - C + GH61 + todos os íons testados: aumento da conversão.
Andrade <i>et al.</i> (2011)	<i>Trichoderma sp.</i> Is-05	Celulases Totais	FSm: farelo de trigo	EDTA Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^{2+} , Zn^{2+} 10 mM	-Inibição gerada por todos os íons e EDTA; - Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} geraram inibição >80%.

<p>Franco <i>et al.</i> (2011)</p>	<p><i>Streptacidiphilus</i> <i>sp.</i> PESB 25</p>	<p>Endoglucanase</p>	<p>F5m: bagaço de cana-de-açúcar</p>	<p>Ba²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, K²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Na²⁺ 2 mM</p>	<p>- Nenhum íon causou inibição; - Aumento da atividade: Mn²⁺: 78,6%; Co²⁺: 54,1%.</p>
<p>Moreira <i>et al.</i> (2013)</p>	<p><i>Aspergillus</i> <i>terréus</i></p>	<p>Xilanase XII e XIII</p>	<p>F5m: bagaço de cana-de-açúcar</p>	<p>EDTA Ag²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Hg²⁺, K⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Na²⁺, Zn²⁺ 1mM e 10 mM</p>	<p>- Hg²⁺: Inibição (~100%); - Ag²⁺ e K²⁺ efeito inibitório; - Mn²⁺ (10mM): aumento de 36% XII e 61% XIII; - Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Na²⁺: não afetam a atividade</p>

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado em todos os cultivos foi uma cepa do fungo filamentosso *Aspergillus niger* 3T5B8 pertencente à coleção da Embrapa Agroindústria e Alimentos (Rio de Janeiro, Brasil) (Couri e Defarias, 1995). Os esporos mantidos sob congelamento a -18°C foram ativados em meio de batata dextrose ágar por 4 dias a 32°C . A suspensão de esporos foi preparada adicionando-se 10 mL de uma solução 0,3% v/v de Tween 80 e a concentração de esporos foi determinada utilizando uma câmara de Neubauer.

3.2 Substratos

3.2.1 Substratos do cultivo

O substrato indutor utilizado durante os cultivos foi o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão à vapor e hidrotérmico.

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX) foi doado pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC, Piracicaba, Brasil). O pré-tratamento foi conduzido a 17×10^5 Pa e 205°C durante 20 minutos. O bagaço de cana-de-açúcar explodido foi lavado com água quente ($50-60^{\circ}\text{C}$) (Rodríguez-Zúñiga *et al.*, 2015) até a água de lavagem atingir pH neutro e seco em temperatura ambiente até umidade $<10\%$, sendo denominado bagaço explodido lavado (BEX_L).

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente foi preparado em um reator de 5L (Modelo 4580, Parr Instruments), utilizando uma carga de sólidos de 10% a 195°C por 10 minutos. O bagaço hidrotérmico passou pelo mesmo procedimento de lavagem e secagem aplicado ao bagaço explodido lavado, sendo denominado bagaço hidrotérmico lavado (BHT_L).

Todas as amostras de bagaço foram moídas e peneiradas, e o tamanho de partícula selecionado foi $1,0 \leq dp \leq 2,0$ mm. A caracterização física dos materiais pré-tratados foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), usando um microscópio JEOL Model JSM-6510 equipado com um detector de elétrons secundários e operado a 15 kV. Para essas análises, as amostras foram coladas em stubs de alumínio,

usando fita carbono e recobertas com ouro (Leica Sputter Coater – SCD050)

3.2.2 Substratos da sacarificação enzimática

Os substratos utilizados durante o processo de hidrólise enzimática foram o bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes pré-tratamentos e celulose microcristalina (Avicel).

Foram utilizados os mesmos bagaços pré-tratados descritos na secção 4.2.1 o hidrotérmico (BHT), hidrotérmico lavado (BHT_L), o explodido (BEX), o explodido lavado (BEX_L) e o bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento ácido (BÁc).

O pré-tratamento ácido foi realizado de acordo com protocolo fornecido pela Embrapa Agroenergia (Brasília, Brasil). O procedimento consistiu na adição de uma solução de ácido sulfúrico 1,5% (v/v) no bagaço de cana-de-açúcar *in natura* na proporção 10% m/v. Os Erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e levados para a autoclave por 30 minutos a 121°C. Após a hidrólise ácida o material foi lavado com o dobro do volume utilizando água destilada e seco em temperatura ambiente até umidade <10%.

Todas as amostras de bagaço foram moídas e peneiradas, e o tamanho de partícula selecionado foi $0,5 \leq dp$.

3.2.3 Caracterização química do substrato

Todo os substratos passaram pelo processo de caracterização química, em triplicata. O método envolveu dois processos de hidrólise ácida do material com ácido sulfúrico, descritos por Gouveia *et al.* (2009). Os açúcares, ácidos e furfurais liberados foram quantificados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a partir deles foram calculados os teores de celulose, hemicelulose e lignina.

3.3 Condições de Pré-cultivo das Fermentações Submersa e Sequencial

Os procedimentos descritos envolvendo as condições de pré-cultivo e a produção enzimática foram realizados para os substratos BEX, BEX_L e BHT_L em triplicata.

3.3.1 Meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado foi descrito por Mandels e Sternberg (1976), adaptado por Cunha *et al.* (2012), conforme apresentado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Meio de cultivo.

Reagentes	Concentração	Unidade
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4	
KH ₂ PO ₄	2,0	
CaCl ₂	0,3	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	
Uréia	5,0	g/L
Peptona de soja	2,0	
Extrato de levedura	1,0	
Tween 80	1,0	
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0	
MnSO ₄ .H ₂ O	1,6	mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,4	
CoCl ₂	2,0	

3.3.2 Procedimento do pré-cultivo submerso (FSm)

Foram inoculados 10⁷ esporos/mL no volume final de 200 mL de meio de cultivo (**Tabela 2**) em frascos Erlenmeyer de 500 mL enriquecido com 30 g/L de glicose e pH inicial 4,5. Os frascos foram incubados em mesa orbital rotativa a 200 rpm, 32 °C por 48 h.

3.3.3 Procedimento do pré-cultivo sequencial (FS)

A primeira etapa do pré-cultivo foi realizada em estado sólido, na qual 10⁷ esporos/g de substrato sólido foram inoculados diretamente sobre 5 g o bagaço de cana pré-tratado presentes em frascos Erlenmeyer de 500 mL. Posteriormente à homogeneização, a umidade do substrato indutor foi ajustada com a adição do meio de cultivo (**Tabela 2**) sem a suplementação de glicose, na proporção de 12 mL por 5 g de substrato sólido. Os frascos permaneceram incubados em estufa a 32 °C por 24 h. Após esse período, iniciou-se a segunda etapa de transição para a fermentação submersa, através da adição de 200 mL meio líquido (**Tabela 2**) enriquecido com 30 g/L de glicose, com pH inicial 6,0. Após a homogeneização, os fracos foram mantidos em

mesa incubadora rotativa a 200 rpm e 32 °C por 48 horas (Cunha *et al.*, 2012).

3.4 Produção Enzimática

3.4.1 Fermentação submersa (FSm) e sequencial (FS)

Os cultivos para a produção enzimática por FSm e FS foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de volume final composto de meio de cultivo (**Tabela 2**) enriquecido com 10 g/L de glicose, 10 % (v/v) do caldo do pré-cultivo e 1 % (m/v) da matéria-prima lignocelulósica. Os frascos foram incubados em mesa incubadora rotativa a 200 rpm por 72h a 32°C. No final das 72 h, as amostras foram filtradas, centrifugadas a 11.000 rpm por 15 min e mantidas a -18°C para posteriores análises enzimáticas.

3.4.2 Fermentação em estado sólido (FES)

A produção enzimática por FES dispensa a etapa de pré-cultivo. Nesse tipo de cultivo, 10^7 esporos/g de substrato sólido foram inoculados diretamente sobre 5 g da matéria-prima lignocelulósica presentes em frascos erlenmeyer de 500 mL. Posteriormente, a homogeneização, a umidade do substrato indutor foi ajustada com a adição do meio de cultivo (**Tabela 2**) sem a suplementação de glicose, na proporção de 12 mL por 5 g de substrato sólido. Os frascos permaneceram incubados em estufa a 32°C por 72 h. Para a obtenção dos extratos enzimáticos foi realizada a extração com a adição de tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5, na proporção 1:10 (sólido/líquido). Os frascos foram mantidos em mesa incubadora rotativa a 120 rpm a 32°C por 40 min.

Para a produção do coquetel enzimático utilizado na hidrólise usando como substrato farelo de trigo, foram inoculados 10^7 esporos/g de substrato sólido diretamente sobre 20 g de farelo de trigo em frascos erlenmeyer de 500 mL, a umidade do substrato indutor foi ajustada com a adição de 30 mL de sulfato de amônio 0,91% em ácido clorídrico 0,1 M para cada 20 g de substrato indutor. Para a extração foi adicionado tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5, na proporção 1:5 (sólido/líquido). A suspensão foi filtrada e o extrato enzimático obtido foi centrifugado a 11.000 rpm por 15 min e mantido a -18°C para posteriores análises enzimáticas.

3.5 Avaliação da Influência dos Íons Metálicos

3.5.1 Influência na atividade e estabilidade térmica das enzimas

Para testar a influência dos íons metálicos na atividade e estabilidade térmica enzimática, foram utilizados os íons bivalentes Ca e Co na forma de cloreto e Cu, Mg, Mn, Ni, Zn na forma de sulfato. Também foi utilizado o quelante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), a fim de se testar a influência dos íons intrínsecos ao extrato bruto, e uma substância desnaturante, o mercaptoetanol.

Para os testes de atividade e estabilidade, o extrato enzimático foi analisado sem a adição dos íons ou das outras substâncias e esses dados foram utilizados como valores de referência. A concentração dos íons no volume reacional, durante os testes das atividades de endoglucanase, xilanase e β -glicosidase, e na incubação durante o teste de estabilidade foram de 2 mM e/ou 10 mM.

3.5.2 Influência no processo de sacarificação da biomassa

O processo de sacarificação da biomassa foi conduzido com 5% de carga de sólidos, em reator de hidrólise com rotação de 360° a 50°C por 24 horas em pH 4,5. A quantificação da glicose liberada após 24 horas do processo foi determinada por um kit enzimático de glicose oxidase (Doles, Brasil).

Na etapa de hidrólise utilizou-se os seis substratos descritos na seção 4.2.2. Para estudar a influência dos íons metálicos foi previamente selecionado o íon de manganês em ambas as concentrações (2 e 10 mM). Foram utilizados 4 extratos enzimáticos: o extrato enzimático bruto produzido por fermentação em estado sólido (FES) utilizando o bagaço hidrotérmico lavado (EB) como substrato, o extrato bruto concentrado utilizando a técnica de precipitação de proteínas por acetona (EB_{CON}), o extrato bruto produzido por FES utilizando como substrato farelo de trigo (EB_{FT}) e o coquetel enzimático comercial CelicCTec 2 (Comercial). A carga de proteína utilizada por grama de substrato para cada coquetel enzimático está descrita **Tabela 3**.

Tabela 3. Carga de proteína por grama de substrato utilizada na hidrólise.

Carga da hidrólise (mg de proteína / g de substrato)	Extratos Enzimáticos			
	EB	EB _{CON}	EB _{FT}	Comercial
	0,60	2,4	7,4	3,7

Os valores de conversão foram obtidos a partir da Equação 1. Na qual G_L é a glicose liberada e quantificada no final do processo, C_S é a fração de celulose presente no substrato, m é a massa de substrato utilizada.

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{G_L \cdot (g) \cdot 0,9}{C_S \cdot m \cdot (g)} * 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Para a concentração do extrato enzimático bruto foi utilizado a técnica de precipitação de proteínas utilizando acetona. No processo o extrato enzimático foi gotejado na acetona, à frio, na proporção 1:3 (extrato:acetona). Este procedimento foi realizado em banho de gelo em baixa agitação. A mistura extrato-acetona foi incubada “over night” a -18°C. Após a incubação, a suspensão foi centrifugada a 4°C durante 15 minutos a 12000 rpm. O precipitado foi ressuscitado com tampão acetato de sódio 0,2 mol/L e pH 4,5 na proporção 1:10 (tampão:acetona).

3.6 Métodos Analíticos

3.6.1 Atividade de endoglucanase

A atividade de endoglucanase foi determinada, utilizando-se como substrato uma solução de carboxi-metil-celulose 4% m/v (CMC - Sigma, USA) em tampão citrato de sódio 200 mM, pH 4,8 (Ghose, 1987). A reação foi realizada na proporção de 1:1 (enzima-substrato) durante 10 minutos, a 50°C. Quando necessário o extrato era previamente diluído. A conversão da reação foi avaliada pela quantificação dos açúcares redutores liberados, utilizando-se o método de DNS (Miller, 1959). Uma unidade de atividade enzimática (UI) corresponde a 1 μmol de grupos redutores liberados por minuto de reação.

3.6.2 Atividade de xilanase

A atividade de xilanase foi determinada, tendo como substrato uma solução de xilana beechwood 1 % (Sigma, USA) em tampão acetato de sódio 200 mM, pH 5,0 (Bailey e Poutanen, 1989). A reação foi realizada, adicionando-se 0,1 mL de extrato enzimático, diluído quando necessário, em 0,9 mL de solução de xilana, por 5 minutos a 50 °C; a conversão da reação foi avaliada pela quantificação dos açúcares redutores liberados a partir do método de DNS (Miller, 1959). Uma unidade de atividade enzimática (UI) corresponde a 1 μ mol de grupos redutores liberados por minuto de reação.

3.6.3 Atividade β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada utilizando como substrato uma solução de celobiose 150 mM (sigma, USA), preparada em tampão citrato de sódio 200 mM, pH 4,8 (Ghose, 1987). A reação desenvolveu-se incubando a solução enzima-substrato, na proporção de 1:1 (v/v) durante 30 min a 50 °C, e foi interrompida por submersão em água fervente por 5 min. A quantificação da glicose liberada foi determinada por um kit enzimático de glicose oxidase (Doles, Brasil).

3.6.4 Análise das proteínas totais

As proteínas totais presentes no extrato foram quantificadas pela metodologia de (Bradford, 1976), utilizando o micro ensaio (0 – 0,1 mg de proteína/mL). Para isso, um volume de 100 μ L de extrato enzimático foi adicionado em 1 mL de reagente e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a absorvância foi medida em espectrofotômetro à 595 nm. Os resultados foram expressos em mg de proteína/mL, com o uso de albumina do soro bovino (BSA) como padrão.

3.6.5 Análise dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos totais foram analisados pelo método Azul da Prússia proposta por (Price e Butler, 1977), seguindo o procedimento experimental descrito por (Ximenes *et al.*, 2010). Nessa reação, um volume de 3 mL do extrato foi transferido para uma cubeta na qual era adicionado 200 μ L de $K_2Fe(CN)_6$ 0,008M, seguido da adição de 200 μ L de 0,1M $FeCl_3$ preparado em HCl 0,1M. A absorvância foi medida a

700 nm, após cinco minutos de reação em temperatura ambiente, usando ácido gálico como padrão.

3.6.6 Estabilidade e inativação térmica

As estabilidades térmicas de endoglucanase, β -glicosidase e xilanase foram avaliadas, medindo a atividade enzimática residual após a incubação do extrato enzimático bruto em tampão acetato pH 4,5 a 50 °C, durante um período total de 24h para os ensaios de seleção do extrato e 72 h para os ensaios com os íons metálicos.

Para os experimentos iniciais de seleção, a amostragem foi feita em intervalos de tempo de 10 minutos e 2, 4, 6, 12, e 24 h. Para os experimentos na presença dos íons, a amostragem foi feita em 24, 48 e 72 h. No final do período de incubação, os tubos de ensaio contendo as enzimas foram imediatamente colocados no gelo para interromper a reação de inativação. A medida de atividade enzimática foi realizada sob condições padrões das análises.

O modelo proposto por Sadana e Henley (1987) foi ajustado aos dados experimentais (Equação 2).

$$\frac{A}{A_0} = (1 - \alpha) \cdot e^{-k \cdot t} + \alpha \quad (\text{Equação 2})$$

Onde A/A_0 é a atividade adimensional, α é a relação entre as atividades específicas dos estados iniciais e finais e k é a constante da taxa de primeira ordem de desativação (hora^{-1}). O parâmetro k descreve o processo de desdobramento (ou inativação) da enzima (Sadana e Henley, 1987). O tempo de meia vida da enzima, tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial, foi calculado pela Equação 3.

$$t_{1/2} = -\frac{1}{K} \ln\left(\frac{0,5-\alpha}{1-\alpha}\right) \quad (\text{Equação 3})$$

3.7 Eletroforese

O perfil eletroforético dos extratos enzimáticos produzidos por FES, FS_m e FS utilizando como substrato o bagaço de cana hidrotérmico lavado (BHT_L) foi

determinado por eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% (m/v) segundo Laemmli (1970). Amostras das soluções enzimáticas (4 μ L) com a mesma concentração proteica (0,40 mg/mL) foram aquecidas por 5 minutos em tampão de ruptura (Tris-HCl 75 mM pH 6,8, β -mercaptoetanol 5% v/v, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0,01% m/v) e posteriormente aplicadas em canaletas pré formadas em gel de eletroforese. Na primeira canaleta foram aplicados 4 μ L do marcador de massa molecular PreciseTM (AMRESCO) 15 – 115 kDa. A corrida eletroforética foi realizada durante 90 minutos (60 V para 0-30 min, e 110 V para 30-90 min) em uma cuba de eletroforese vertical contendo tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 190 mM, SDS 0,1% m/v). A revelação do gel ocorreu em duas etapas, o gel foi corado com Comassie blue R-250 por 40 min e descorado por 12 horas utilizando uma solução de ácido acético 6% e etanol 3% (v/v).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As celulasas agregam um grande custo nos processos que envolvem a produção de etanol 2G. A adição de íons metálico se apresenta como uma alternativa interessante para o aumento da atividade e estabilidade enzimática e a redução da perda de enzimas por adsorção improdutiva na lignina, possibilitando assim a redução da carga enzimática e, conseqüentemente, diminuindo o custo do processo.

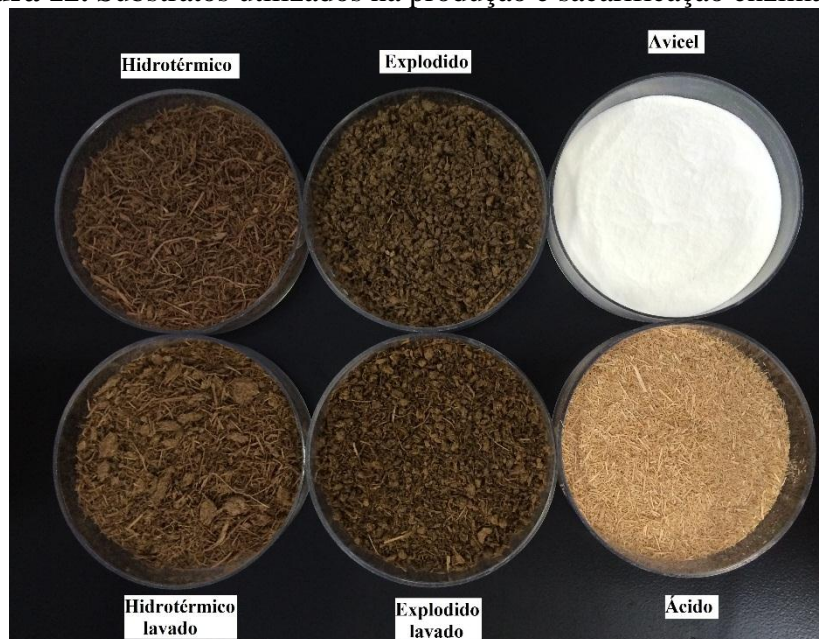
Sendo assim, no presente estudo avaliou-se a influência dos íons metálicos na atividade e estabilidade enzimática do extrato enzimático de (hemi)celulasas obtido a partir do cultivo de *Aspergillus niger* e na etapa de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

A fim de atingir o objetivo geral do trabalho, foi utilizada a seguinte estratégia experimental:

- i. Produzir extratos enzimáticos utilizando diferentes técnicas de cultivo (fermentação em estado sólido, fermentação submersa e fermentação sequencial) e substratos indutores (bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e hidrotérmico) para avaliação da influência das condições de cultivo na produção enzimática;
- ii. Avaliar a atividade e a estabilidade térmica dos extratos enzimáticos de (hemi) celulasas obtidos pelos diferentes cultivos;
- iii. Avaliar a atividade enzimática de um extrato pré-selecionado na presença dos íons metálicos bivalentes Ca, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni e Zn, em duas concentrações (2 e 10 mM);
- iv. Avaliar a estabilidade térmica de um extrato na presença dos íons metálicos pré-selecionados na etapa anterior de atividade enzimática;
- v. Avaliar a influência do íon metálico que se destacar nas etapas anteriores no processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica (bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado);

4.1 Substratos Indutores

O bagaço de cana-de-açúcar foi submetido a diferentes pré-tratamentos conforme descrito no item 3.2 (**Figura 12**).

Figura 12. Substratos utilizados na produção e sacarificação enzimática.

Fonte: acervo pessoal, 2015.

A tabela **Tabela 4** apresenta os resultados da caracterização química das biomassas utilizadas como indutor na produção das enzimas e substrato no processo de sacarificação enzimática.

Tabela 4. Composição química dos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados (relativo %, m/m).

	Celulose	Hemicelulose	Lignina
BHT	56,1 ± 0,5	6,3 ± 0,2	29,0 ± 0,9
BHT _L	65,8 ± 1,5	3,7 ± 0,6	30,1 ± 1,3
BEX	50,0 ± 1,7	13,0 ± 0,7	30,3 ± 0,1
BEX _L	61,5 ± 0,6	4,5 ± 0,8	32,0 ± 0,1
BÁc	55,4 ± 1,1	6,9 ± 0,8	32,0 ± 0,5
In natura	36,4 ± 0,7	24,2 ± 0,5	32,5 ± 2,9

Observou-se que as biomassas pré-tratadas têm um aumento no teor de celuloes e uma redução da fração hemicelulósica, o que facilita tanto o acesso do microrganismo durante a fermentação quanto das enzimas no processo de sacarificação. Estudos encontrados na literatura reportam que a utilização do bagaço de cana pré-tratado é mais eficiente na produção enzimática na FS e na FSM do que o bagaço de cana “in natura” (Cunha *et al.*, 2015). Dessa forma nesse estudo optou-se por não avaliar o bagaço “in natura”.

4.2 Influência das Condições de Cultivo na Produção Enzimática

Nesta etapa do trabalho, foram avaliadas as influências do método de cultivo (FES, FSm e FS) e do tipo de bagaço de cana pré-tratado (BEX, BEX_L e BHT_L) utilizado como fonte de carbono e indutor na produção das enzimas endoglucanases, β -glicosidases e xilanases pela cepa de *A. niger* 3T5B8 (**Tabela 5**). Foi possível verificar que o fungo pode crescer e produzir enzimas na maioria das diferentes condições de cultivo estudadas, com exceção da combinação FES com BEX, na qual nenhum crescimento fúngico foi observado.

Tabela 5. Atividade enzimática (UI/L) dos extratos produzidos por *A. niger* depois de 72 horas em diferentes condições de cultivo.

Técnica de Cultivo	Substrato	Proteínas	Endoglucanase	β -glicosidase	Xilanase
		Totais (mg/L)	(UI/L)		
FES	BEX	72,1 \pm 1,3	0	0	0
	BEX _L	48,3 \pm 1,4	3.039,4 \pm 29,4	2.159,4 \pm 442,6	2.3553,5 \pm 770,2
	BHT _L	21,1 \pm 3,4	2.431,1 \pm 122,5	1.948,5 \pm 640,5	20.350,7 \pm 1.358,6
FSm	BEX	145,9 \pm 18,2	908,7 \pm 22,8	7.438,9 \pm 89,4	4.419,4 \pm 244,5
	BEX _L	52,3 \pm 2,6	565,3 \pm 41,1	5.000,0 \pm 383,0	4.874,6 \pm 310,4
	BHT _L	94,8 \pm 15,6	630,6 \pm 31,1	6.046,3 \pm 643,3	3.517,3 \pm 1.121,5
FS	BEX	142,6 \pm 4,8	750,6 \pm 13,7	6.817,1 \pm 256,8	5.048,0 \pm 418,65
	BEX _L	53,8 \pm 5,2	531,3 \pm 11,4	5.051,4 \pm 114,7	2.880,1 \pm 227,6
	BHT _L	91,5 \pm 1,1	499,1 \pm 14,0	5.422,9 \pm 202,0	1.005,5 \pm 87,8

Para as enzimas endoglucanases, valores mais altos de atividade foram obtidos em fermentação em estado sólido (FES), sendo alcançada uma atividade de 3.039,4 UI/L quando utilizado como substrato indutor o bagaço de cana explodido lavado (BEX_L). Esse valor é maior, quando comparado à atividade obtida pelas outras técnicas de cultivo líquido, a fermentação submersa (FSm) e a sequencial (FS), utilizando-se o mesmo substrato. No entanto, o uso do bagaço explodido sem o processo de lavagem (BEX) como substrato na FES não resultou em nenhuma produção enzimática, devido à inibição do crescimento microbiano.

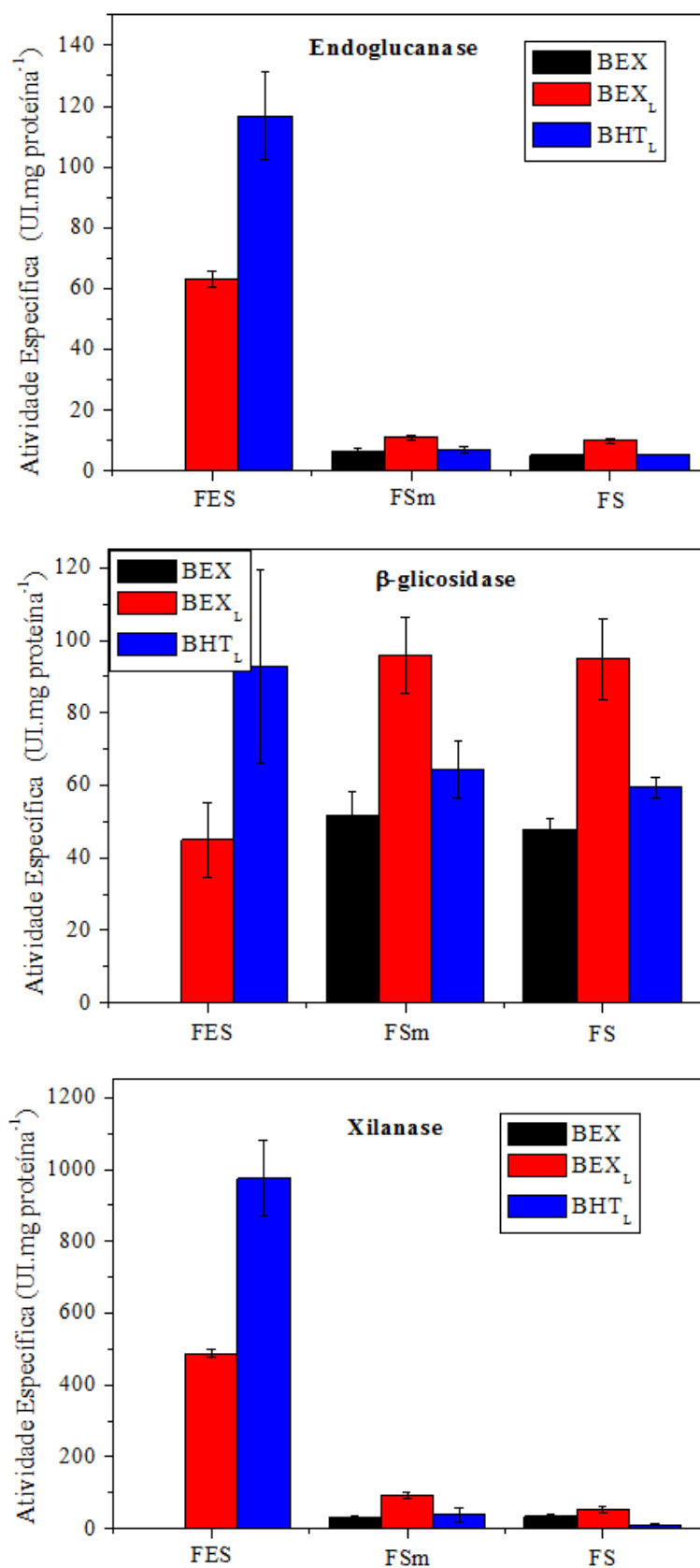
Para as β -glicosidases, a produção enzimática foi favorecida em sistemas de cultivo líquido (FSm e FS). O uso do BEX como substrato para a FSm resultou na

maior atividade encontrada para β -glicosidases (7.438,9 UI/L), seguido pela FS, utilizando o mesmo substrato (6.817,1UI/L).

A atividade de xilanase apresentou o mesmo comportamento observado para a endoglucanase, na qual os maiores valores foram obtidos para a FES. A maior atividade de xilanase obtida foi com o uso da FES com o BEX_L como substrato (23.553,1 UI/L), seguido pela combinação da FES com o BHT_L (20.350,7 UI/L). Esses valores foram maiores que os encontrados para os cultivos de FSm e FS.

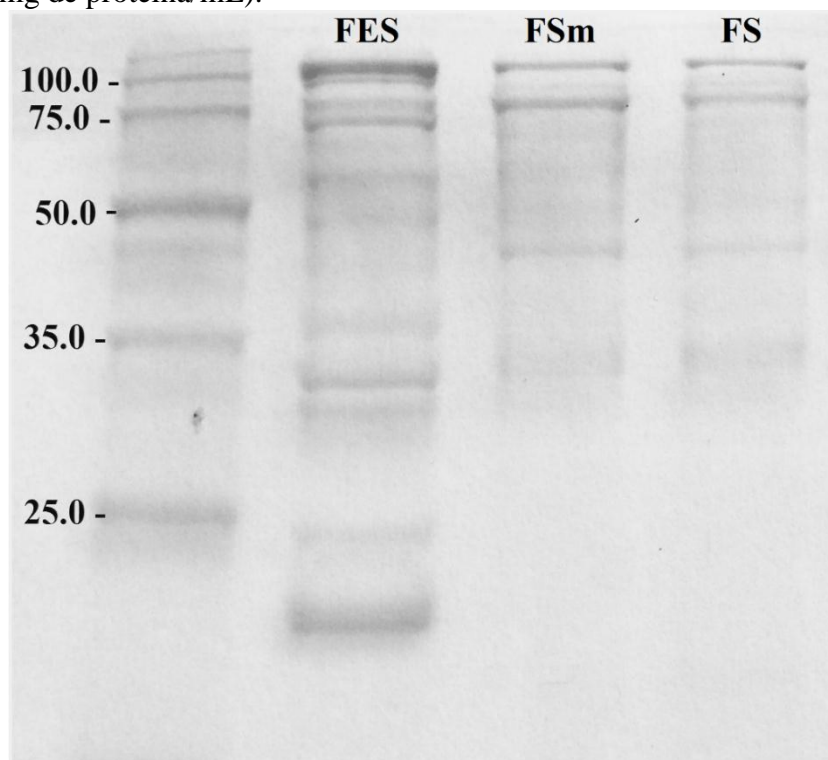
Em geral, a produção da endoglucanase e xilanase foi favorecida pela FES, usando-se como substrato indutor o BEX_L e BHT_L. Porém, a produção de β -glicosidase foi favorecida quando o cultivo foi realizado em meio líquido (os melhores resultados foram obtidos com a FSm, seguido pela FS). A mesma tendência foi observada, quando os resultados foram analisados em termos de atividade específica obtidas para cada uma das enzimas (**Figura 13**). Esse dado adicional evidencia o desempenho superior da FES para a produção de endoglucanase e xilanase e a maior produção de β -glicosidase com a utilização dos sistemas de cultivo líquido, evidencia também a diferença na pureza das enzimas de acordo com os métodos de cultivo, sendo que a FES produz menos proteínas e apresenta uma maior atividade enzimática, diferente dos cultivos líquidos (FSm e FS).

Figura 13. Atividade específica da endoglucanase, β -glicosidase e xilanase no complexo (hemi)celulolítico produzido por *A. niger* cultivado em FES, FSm e FS, utilizando diferentes tipos de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (BEX, BEX_L e BHT_L).



Diante da diferença obtida nas atividades enzimáticas variando a técnica de cultivo, os extratos enzimáticos provenientes da FES, FSm e FS utilizando BHT_L foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 12%. A eletroforese (**Figura 14**) apresenta um perfil eletroforético semelhante para os cultivos FSm e FS, entretanto o mesmo não ocorreu para a FES, que apresenta bandas adicionais das encontradas nos cultivos líquidos. Assim pôde-se observar que o mesmo fungo crescendo sobre o mesmo substrato indutor apresentou expressão proteica distinta ao variar a técnica de cultivo.

Figura 14. Gel de eletroforese 12% dos extratos FES, FSm e FS utilizando BHT_L (0,4 mg de proteína/mL).



A degradação da biomassa lignocelulósica requer a produção de muitas enzimas diferentes que são reguladas pelo tipo e complexidade do substrato disponível. O fungo filamentosso *A. niger* crescendo em substratos pré-tratados, além de expressar genes que codificam enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas tem a expressão aumentada de genes que codificam proteínas de função ainda desconhecida. Alguns destes genes podem codificar proteínas importantes para a sacarificação, tais como proteínas acessórias não hidrolítica que aumentam ou favorecem a eficiência enzimática (De Souza *et al.*, 2011).

A produção enzimática de celulases e hemicelulases ocorre em condições nas quais o fungo necessita utilizar os polímeros das plantas como fonte energética, assim a regulação dos genes que codificam essas enzimas é restrito e regulado (Gouvêa, 2013). Os fungos filamentosos são melhores produtores de celulases no processo de fermentação em estado sólido do que em cultivos líquidos. Durante a FES o material lignocelulósico imita o habitat natural do microrganismo, induzindo a expressão de genes que codificam diferentes classes de (hemi)celulases (Delabona *et al.*, 2013; Yoon *et al.*, 2014).

É relatado na literatura que há variações na massa molecular das enzimas produzidas por *A. niger* (De Vries e Visser, 2001; De Souza *et al.*, 2011). Já foram relatados, por exemplo, variações para a massa molecular de endoglucanase no intervalo de 25 a 43 kDa, para β -glicosidase 49-325 kDa e para a xilanase de 13 a 33 kDa.

Na indução da produção das enzimas hidrolíticas ocorre o processo de regulação cruzada e os mesmos compostos podem provocar a expressão distinta tanto de celulases quanto de hemicelulases. A maioria dos genes estudados são reprimidos por fontes de carbono prontamente metabolizadas, como a glicose, e induzidos por substratos poliméricos (Gouvêa, 2013). Assim os cultivos líquidos apresentam desvantagem em relação à FES, pois a FSm e FS continha altas cargas de glicose iniciais, utilizada para induzir o crescimento do fungo em meio líquido.

A regulação dos genes responsáveis pela expressão das enzimas hidrolíticas é realizada por elementos encontrados nos promotores desses genes, sendo que nessa região ocorre a ligação de fatores de transcrição regulatórios (Gouvêa, 2013). O genoma de *A. niger* contém cerca de 14 600 genes, dos quais 170 estão envolvidos na degradação de polissacarídeos e cerca de 25 deles são regulados positivamente pelo fator de transcrição XlnR. Esse fator de transcrição conhecido de *A. niger*, o XlnR, regula a transcrição de genes que codificam xilanases, endoglucanases e celobiohidrolases, mas não as β -glicosidases (Stricker, Mach e De Graaff, 2008; Gouvêa, 2013). É possível que no presente estudo o método de cultivo (FES) não tenha induzido a produção de β -glicosidase como induziu das outras duas enzimas analisadas (endoglucanase e xilanase), diante das diferenças encontradas no processo de regulação da expressão gênica.

Outra possível explicação para a divergência na produção de β -glicosidase em relação a FES e aos cultivos líquidos, relaciona-se ao fato de que em fase aquosa, a β -glicosidase cliva a celobiose em duas unidades de glicose (Duff e Murray, 1996).

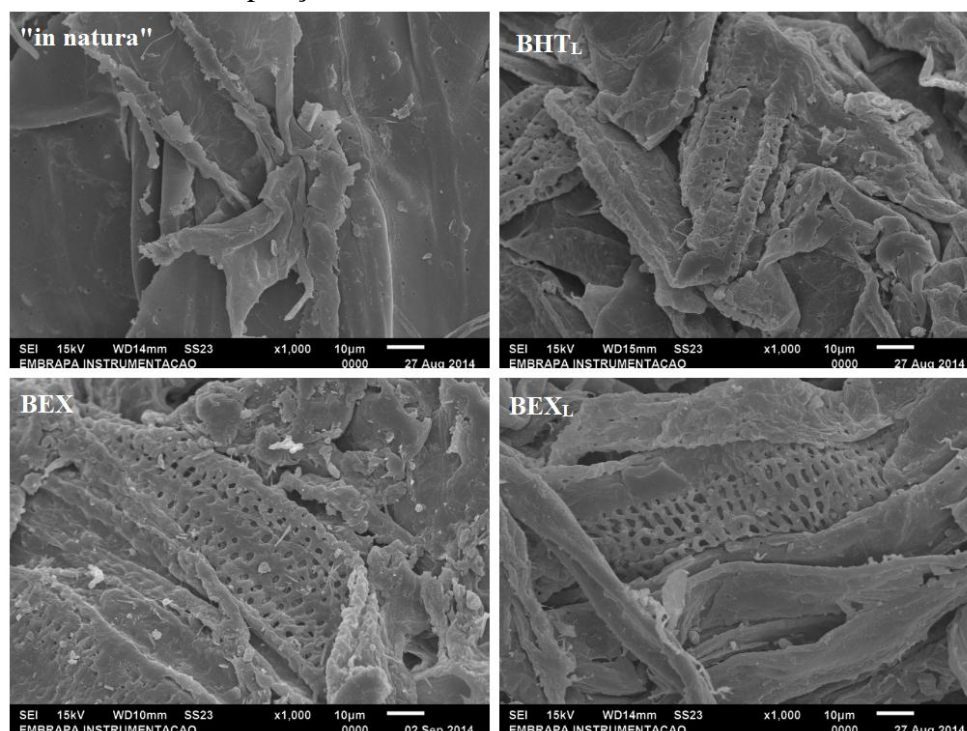
Sendo a celobiose, substrato da β -glicosidase e também seu indutor, um açúcar solúvel, o meio líquido favorece o contato para uma melhor indução.

No intuito de investigar os possíveis fatores que levaram a essa divergência na produção enzimática, quando utilizada diferentes substratos indutores, foram avaliadas as composições químicas das amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados (**Tabela 4**).

Em geral, as amostras lavadas não se diferenciaram em termos de conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina, para as diferentes formas de pré-tratamento utilizadas. Assim, outras características físicas desses materiais, tais como acessibilidade, podem ter contribuído para as diferenças observadas na produção enzimática entre os métodos de cultivo empregados.

A fim de se investigar essa possibilidade, as mudanças estruturais que ocorreram durante os pré-tratamentos foram avaliadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Micrografias foram obtidas aleatoriamente para amostras de bagaço de cana pré-tratados e “in natura” (**Figura 15**).

Figura 15. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos substratos indutores. Ampliações e barras de escala são fornecidos em cada micrografia.



Pode-se observar que o bagaço “in natura” exibe seções com superfícies predominantemente lisas, e também seções interrompidas, que podem estar relacionadas

com as operações industriais anteriores, moagem e lavagem. Após os processos de pré-tratamento, houve um aumento geral na porosidade das fibras, o que torna a área de superfície mais acessível para o desenvolvimento do fungo. No entanto, não foi possível detectar nenhuma diferença evidente em relação às características físicas das amostras pré-tratadas.

Outra possível diferença, entre as amostras de bagaço pré-tratados, avaliada neste trabalho foi em relação à quantidade de compostos fenólicos liberados durante o cultivo. A **Tabela 6** apresenta as concentrações de fenólicos nos extratos enzimáticos finais para cada condição de cultivo avaliada.

O resultado da análise dos compostos fenólicos totais presente nos extratos mostrou uma relação inversa entre a concentração de compostos fenólicos e a atividade enzimática. Ou seja, uma maior quantidade de compostos fenólicos está associada a menores quantidades de enzimas no meio de produção. Esse fato também fornece uma explicação para a observação de que não houve crescimento de *A.niger* em FES quando o BEX foi utilizado como fonte de carbono, dado que a concentração de compostos fenólicos neste meio foi mais de 20 vezes maior do que nos extratos de FES utilizando-se os substratos que haviam sido submetidos à etapa de lavagem (BEX_L e BHT_L).

Tabela 6. Concentração dos compostos fenólicos totais nos extratos enzimáticos brutos após 72 horas de cultivo.

Técnica de Cultivo	Substrato	Compostos fenólicos
		(mg/L)
FES	BEX	7,30 ± 0,18
	BEX _L	0,36 ± 0,01
	BHT _L	0,31 ± 0,01
FSm	BEX	0,05 ± 0,01
	BEX _L	0,02 ± 0,01
	BHT _L	0,11 ± 0,01
FS	BEX	0,16 ± 0,01
	BEX _L	0,01 ± 0,00
	BHT _L	0,25 ± 0,08

Para investigar se os compostos fenólicos estavam presentes desde o início do processo foi quantificado a concentração de compostos fenólicos presentes no início dos cultivos FES, FSm e FS para o substrato BHT_L. Foram obtidas concentrações semelhantes ao ponto de 72 horas, sendo 0,27±0,01, 0,09±0,00 e 0,21±0,02 para FES, FSm e FS respectivamente. Assim, os compostos fenólicos totais presentes nos extratos

estão presentes na forma solúvel no substrato e não são provenientes da degradação enzimática durante os cultivos.

Ao analisar os compostos fenólicos presentes no extrato da FES com o BEX como substrato indutor, observa-se que o procedimento de lavagem utilizado foi muito eficaz para a remoção de compostos fenólicos, pois a concentração inicial de 7,30 mg/mL foi reduzida para 0,36 mg/mL, após a lavagem, permitindo, assim, o crescimento do fungo e a produção enzimática em FES usando o BEX_L.

Os compostos fenólicos gerados a partir dos produtos de degradação da lignina durante o pré-tratamento da biomassa já foram relatados anteriormente como inibidores e desativadores das enzimas celulolíticas (Ximenes *et al.*, 2010; 2011; Kim *et al.*, 2013). No presente estudo, verificou-se que as consequências da inibição pelos compostos fenólicos liberados após o pré-tratamento da biomassa também afetam o crescimento do fungo, impedindo, assim, o seu desenvolvimento.

Os cultivos realizados em meio líquido (FSm e FS) apresentaram extratos enzimáticos com concentrações menores de compostos fenólicos, mesmo quando utilizado como substrato o bagaço explodido sem lavar (BEX) (**Tabela 6**). Isso pode ser uma consequência da menor quantidade de substratos sólidos utilizados nesses cultivos, e da diluição pela adição de uma maior quantidade de meio líquido, que é íntinseco aos bioprocessos de FSm e FS.

Nos sistemas líquidos de produção enzimática, a utilização do BEX resultou em uma maior produção de β -glicosidase em comparação a quando foi utilizado BEX_L ou BHT_L. Esse fato pode estar relacionado à liberação de açúcares solúveis do BEX durante o cultivo, o que ajudou o crescimento e desenvolvimento do fungo.

Verificou-se neste estudo que o tipo de pré-tratamento (explosão a vapor ou hidrotérmico) do bagaço de cana-de-açúcar, substrato sólido utilizado como indutor para a produção de hemi(celulases), não influenciou significativamente os valores de endoglucanase, β -glicosidase e xilanase nos extratos brutos obtidos, quando os substratos foram lavados exaustivamente antes de serem utilizados. Verificou-se, também, que o uso de bagaço de cana explodido sem lavar (BEX) não permitiu o crescimento do fungo *A. niger*, quando cultivado em fermentação em estado sólido (FES), indicando que a principal diferença entre essas biomassas pré-tratadas relaciona-se com a presença de compostos inibidores, gerados após os pré-tratamentos, sendo a produção enzimática pouco influenciada pelas características da própria fibra.

Estudos reportados por Rodriguez-Zuniga *et al.* (2014) sobre a produção de (hemi)celulases por FES a partir de *A. niger* F12 utilizando diferentes tipos de bagaço de cana pré-tratados, indicaram que o bagaço hidrotérmico produziu maiores atividades enzimáticas (750 UI/L para endoglucanases e 1,300 UI/L de xilanase). O estudo também relata que os outros métodos de pré-tratamento avaliados (ácido, alcalino e combinado) resultaram em produtividades enzimáticas menores do que o bagaço “in natura”. Os autores sugerem que a maior síntese de celulases obtida a partir do bagaço hidrotérmico foi devido à menor produção de inibidores e produtos tóxicos em comparação aos outros pré-tratamentos avaliados.

Estudos reportados na literatura sobre a hidrólise da biomassa lignocelulósica indicam que a lavagem e a filtração do material pré-tratado por explosão a vapor e hidrotérmico pode melhorar a digestibilidade enzimática da celulose pela remoção dos inibidores, maximizando a atividade das enzimas (Kim, Mosier e Ladisch, 2009; Kim *et al.*, 2013). Os resultados encontrados aqui no presente estudo mostram que com a lavagem do material pré-tratado também é possível evitar a liberação de compostos inibidores no processo de cultivo.

No entanto, além de identificar as condições de cultivo que permitam uma alta produção enzimática, também é essencial que as enzimas produzidas sejam termoestáveis, pois elas são geralmente empregadas em reações a 50°C que podem durar 24 horas ou mais, como no caso das(hemi)celulases utilizadas no processo de conversão de biomassa. Portanto, na etapa seguinte deste trabalho foi realizada uma análise comparativa da eficiência de produção *versus* a estabilidade térmica dos coquetéis enzimáticos obtidos nos diferentes sistemas de cultivo.

4.3 Influência do Tipo de Cultivo na Termoestabilidade das Enzimas

Nesta etapa do trabalho foi avaliada a influência do método de cultivo (FES, FSm e FS) e do tipo de bagaço de cana pré-tratado (BEX, BEX_L e BHT_L), utilizado como substrato indutor, na termoestabilidade da endoglucanase, β-glicosidase e xilanase. Os extratos foram incubados por um período de 24 horas a 50°C e posteriormente foram determinados a atividade residual e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) das enzimas (**Tabela 7**).

A meia vida de uma enzima é o tempo em que a atividade diminui em 50% da atividade original, em uma dada temperatura. Para a análise dos dados, foi utilizado o

modelo proposto por Sadana e Henley (1987) e o tempo de meia vida das enzimas foi determinado de acordo com Tardioli *et al.* (2003).

Tabela 7. Atividade residual (AR) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de endoglucanase, β -glicosidase e xilanase, depois de 24 horas de incubação a 50°C em tampão acetato pH 4,5.

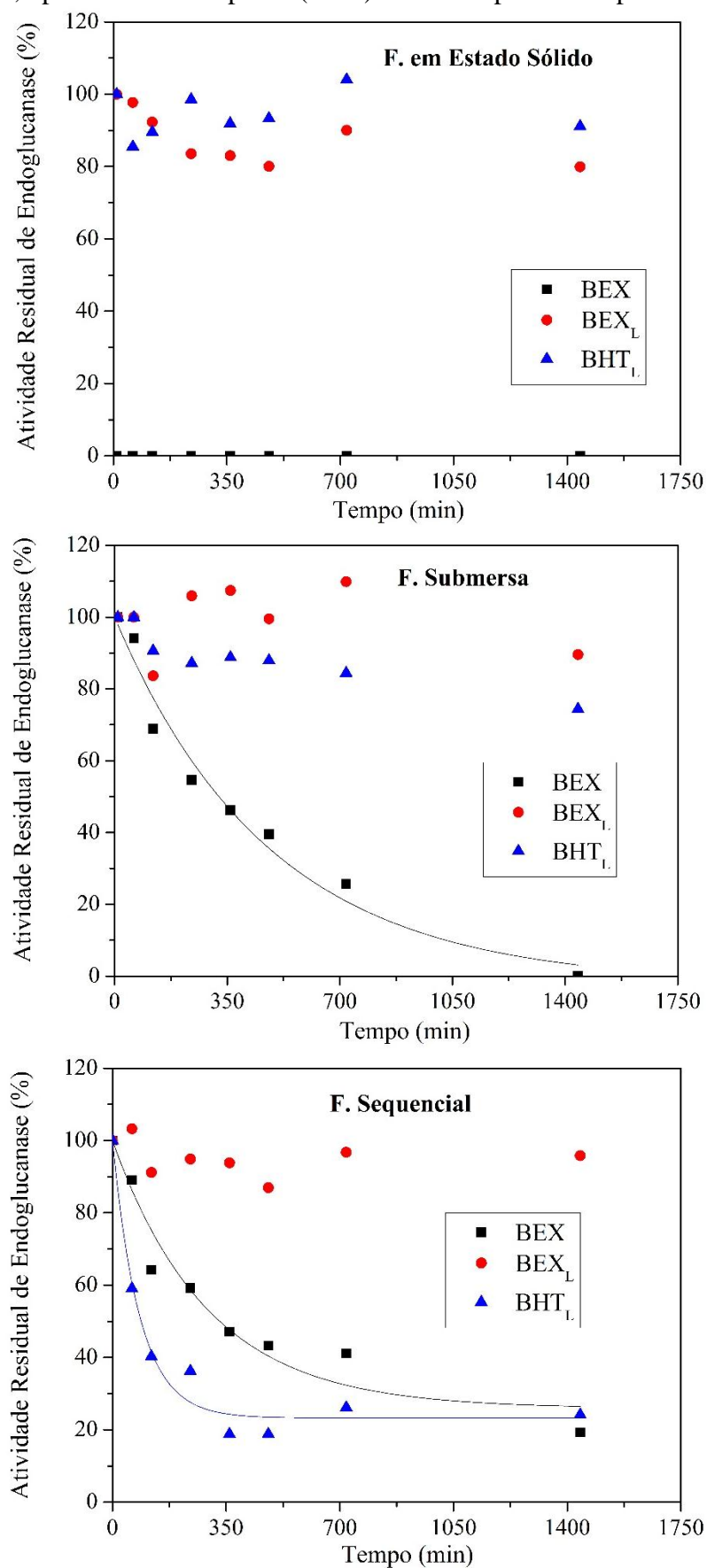
Técnica de Cultivo	Substrato	Endoglucanase		β -glicosidase		Xilanase	
		AR (%)	$t_{1/2}$ (min)	AR (%)	$t_{1/2}$ (min)	AR (%)	$t_{1/2}$ (min)
FES	BEX	-	-	-	-	-	-
	BEX _L	80	-	100	-	11	59
	BHT _L	90	-	100	-	26	76
FSm	BEX	0	156	2	249	0	57
	BEX _L	90	-	75	-	50	-
	BHT _L	75	-	8	533	34	908
FS	BEX	19	113	3	321	0	56
	BEX _L	95	-	90	-	50	-
	BHT _L	24	92	0.5	144	0	450

Nota: Não foi possível estimar o tempo de meia vida para os extratos enzimáticos que apresentaram atividade residual $\geq 50\%$.

A partir da análise dos dados da **Tabela 7** é possível observar que algumas das condições de cultivo geraram extratos altamente estáveis a 50°C durante o período de 24 horas. Para esses extratos não foi possível calcular o tempo de meia vida e, para fins comparativos, utilizou-se a atividade residual (AR) após 24 horas.

Pode-se observar que as condições de cultivo que resultaram na maior atividade enzimática de endoglucanases (FES com BEX_L, seguida de FES com BHT_L) também produziram enzimas altamente estáveis, como pode ser observado na **Figura 16**. No caso das endoglucanases produzidas pelos cultivos líquidos, foi observada uma relação inversa entre produção e estabilidade, uma vez que o sistema líquido que resultou em maior produção (FSm com BEX) também produziu uma endoglucanase menos estável. Uma tendência semelhante foi observada para a endoglucanase obtida por FS. Uma possível explicação para o comportamento da endoglucanase obtida pelos sistemas de cultivo líquido encontra-se na relação com a concentração de compostos fenólicos (**Tabela 6**), pois a maior estabilidade da endoglucanase obtida, utilizando BEX_L sob FSm e FS é associada às concentrações mais baixas de compostos fenólicos nesses meios.

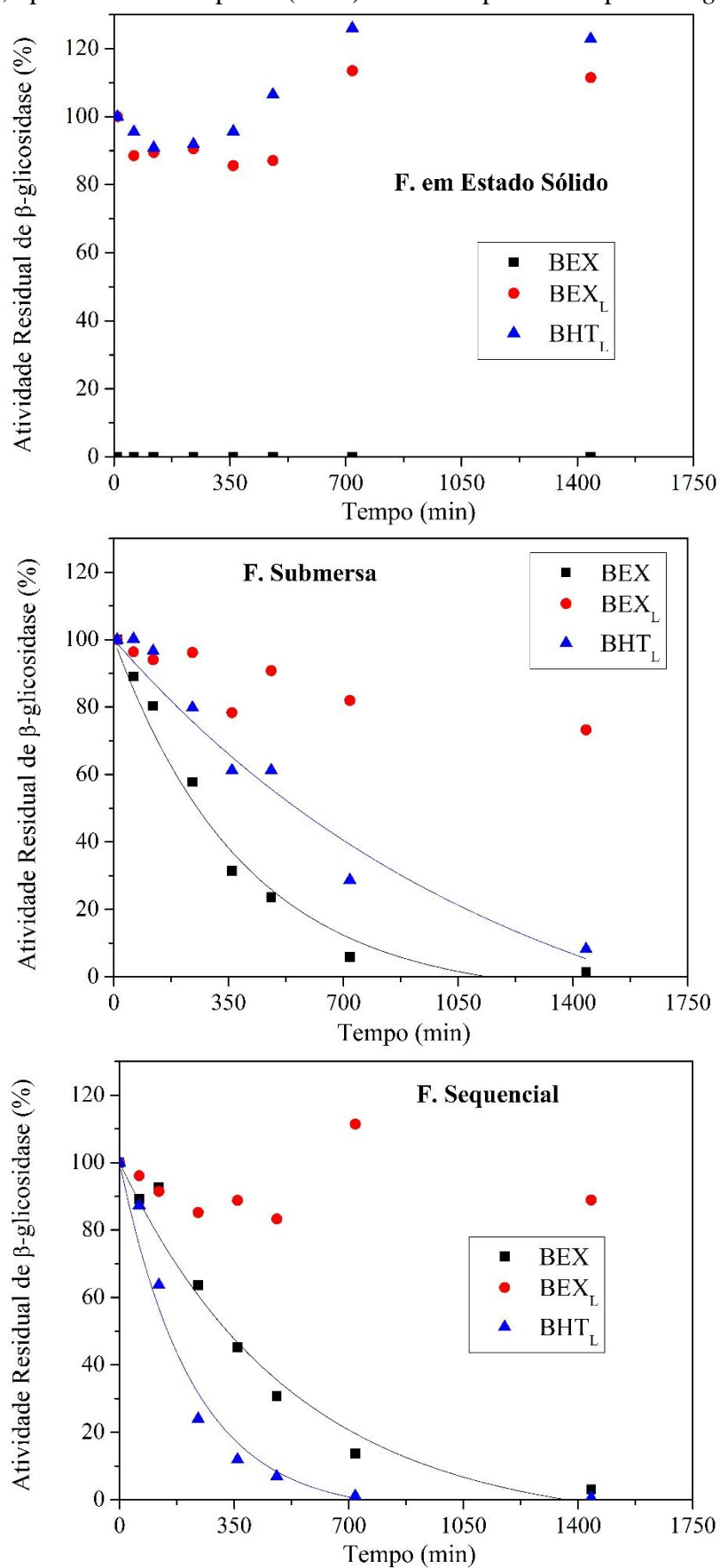
Figura 16. Termoestabilidade e atividade enzimática residual de endoglucanase a 50°C e pH 4,5 presente no complexo (hemi)celulásico produzido por *A. niger*.



Para a β -glicosidase também foi observado que a maioria dos sistemas de cultivo apresentou uma relação inversa entre a produção e a estabilidade. As condições que resultaram em menor produção (FES com BHT_L, seguido pela FES com BEX_L) também produziram as enzimas mais estáveis, como pode ser visto na **Figura 17**. Por outro lado, as condições que resultaram na produção máxima (FSm com BEX, seguida pela FS com BEX) também produziram as enzimas menos estáveis.

Uma observação interessante em relação à β -glicosidase produzida por FES pode ser obtida a partir de uma análise comparativa dos dados de estabilidade (**Tabela 7**), com os dados de produção (**Tabela 5**), e com as concentrações de compostos fenólicos (**Tabela 6**). Embora a produção de β -glicosidase seja menor em FES, em comparação com os sistemas de cultivo líquido (FSm e FS), as β -glicosidase obtidas por FES se mostraram mais estáveis, mesmo com concentrações mais elevadas de compostos fenólicos (**Figura 17**). Esses resultados indicam que as endoglucanases e β -glicosidase provenientes da FES são mais estáveis em comparação com as enzimas produzidas nos sistemas de cultivo líquido.

Figura 17. Termoestabilidade e atividade enzimática residual de β -glicosidase a 50°C e pH 4,5 presente no complexo (hemi)celulásico produzido por *A. niger*.



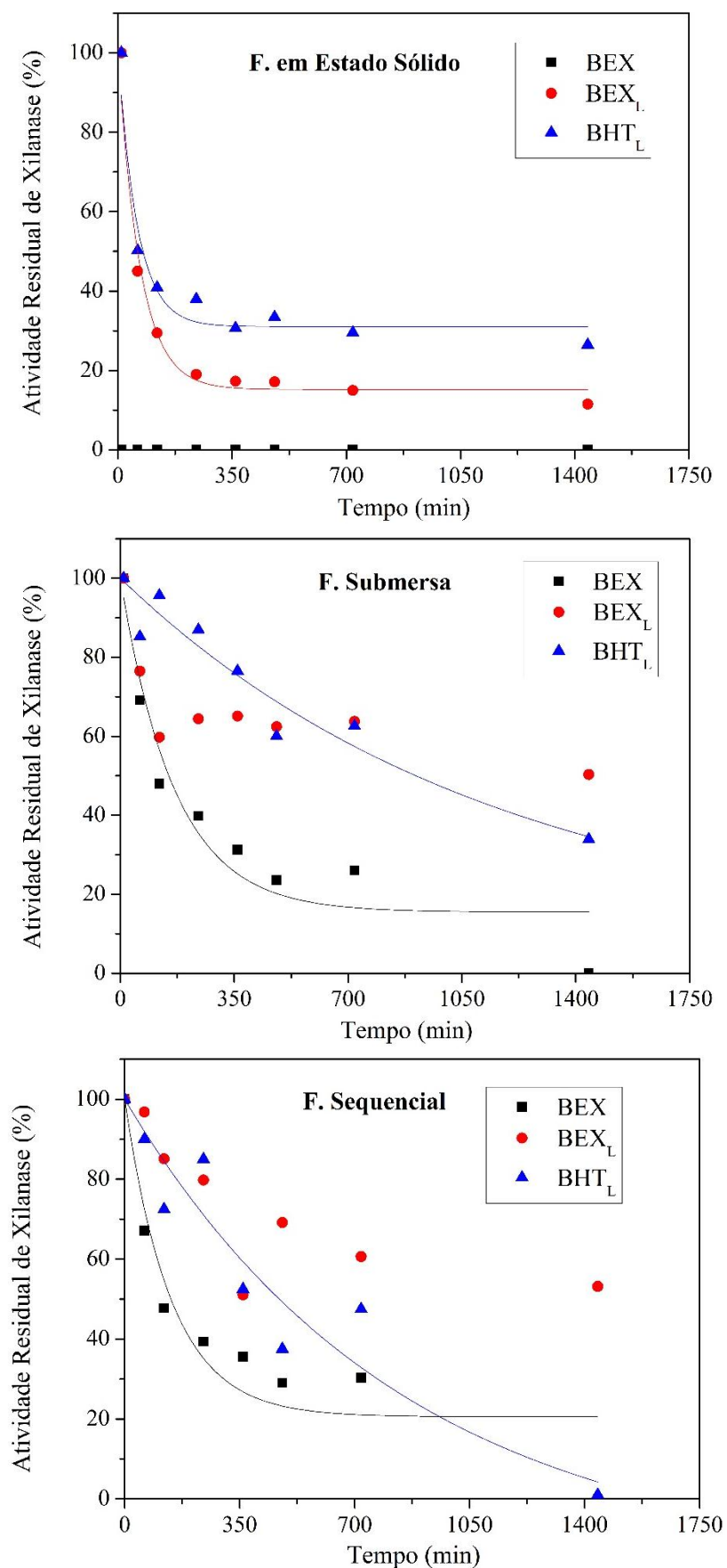
As xilanases são as enzimas que se mostraram menos termoestáveis em comparação com a endoglucanase e a β -glicosidase. Uma relação inversa entre a produção e a estabilidade também foi observada para essa enzima. A condição que proporcionou a maior produção (FES com BEX_L) resultou em uma das enzimas menos estáveis (**Figura 18**). As xilanases obtidas a partir dos cultivos líquidos FSm e FS tiveram essa mesma tendência.

Uma conclusão importante que se pode obter a partir destes resultados é que a seleção e otimização das condições de cultivo devem ser acompanhadas da caracterização da estabilidade térmica das enzimas, pois pode existir uma relação inversa entre estes dois critérios de seleção. Também pode ser concluído, a partir deste conjunto de experimentos, que enzimas celulolíticas obtidas a partir da FES foram mais termo estáveis em comparação com as enzimas produzidas em cultivos líquidos, e que a sua estabilidade térmica foi menos influenciada pelos compostos fenólicos presentes no meio.

As enzimas termoestáveis têm várias vantagens potenciais para aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos, incluindo uma maior atividade específica (diminuindo a carga de enzima necessária), uma maior estabilidade (permitindo tempos de hidrólise prolongados) e maior flexibilidade de configurações de processo (Viikari *et al.*, 2007).

Uma possível explicação para os diferentes perfis de termoestabilidade das enzimas obtidas a partir de diferentes sistemas de cultivo pode estar relacionada com os diferentes componentes do meio no qual estas enzimas estão presentes. Outra possível explicação pode estar relacionada com algumas características diferentes das enzimas. Na **Figura 14** pode ser observado claramente um perfil de proteínas diferentes para cada método de cultivo, especialmente para o extrato da FES. O fungo filamentoso *A. niger* crescendo em substratos pré-tratados tem a expressão aumentada de genes que codificam celulasas, hemicelulasas e proteínas de função ainda desconhecida, que talvez possam atuar na estabilidade enzimática (De Souza *et al.*, 2011). Este resultado indica que a diferença de estabilidade térmica conseguida aqui para as enzimas do sistema de cultivo diferente poderia também ser relacionada com diferentes propriedades físicas das enzimas.

Figura 18. Termoestabilidade e atividade enzimática residual de xilanase a 50°C e pH 4,5 presente no complexo (hemi)celulásico produzido por *A. niger*.



Uma característica adicional importante das enzimas (hemi)celulolíticas é que elas devem ser estáveis na presença de compostos fenólicos, uma vez que esses compostos podem causar inibição e desativação das enzimas (Ximenes *et al.*, 2010; 2011). Em estudos reportados da literatura já foi descrito a existência de diferenças nas características das enzimas produzidas a partir do uso da FES e FSm, em termos de pH e temperatura ótima, estabilidade térmica, parâmetros cinéticos e tamanho (Acunaarguelles *et al.*, 1995; Kar *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que as endoglucanases e β -glucosidases produzidas sob FES são menos propensas à desativação pelos compostos fenólicos presentes no meio, uma vez que uma maior estabilidade térmica foi observada na presença de concentrações mais elevadas destes compostos. Esses resultados corroboram o potencial da FES para a produção de enzimas (hemi)celulolíticas, necessárias para a conversão da biomassa.

4.4 Influência dos Íons Metálicos na Atividade Enzimática

Após a avaliação da atividade e da estabilidade térmica dos diferentes extratos enzimáticos obtidos utilizando-se o fungo *A. niger* e variando-se a técnica de cultivo (FES, FSm e FS) e o substrato indutor (BEX, BEX_L e BHT_L), foi selecionado o extrato produzido por fermentação em estado sólido (FES) para prosseguimento dos estudos sobre a influência dos íons metálicos, devido a maior atividade e estabilidade enzimática apresentada. Optou-se também pela utilização do bagaço de cana hidrotérmico lavado (BHT_L), pois não houve diferença significativa em relação ao BEX_L nas características analisadas e o extrato mostrou-se mais puro em relação ao teor de proteínas, além disso esse tipo de pré-tratamento para o bagaço de cana-de-açúcar vêm se destacando no processo de sacarificação e fermentação (Laser *et al.*, 2002; De Souza *et al.*, 2013).

A determinação da influência dos íons metálicos nas atividades de endoglucanase, β -glicosidase e xilanase foi realizada, utilizando-se como referência o extrato enzimático bruto, sem a adição de íons metálicos, onde obteve-se 2.431,1 \pm 122,5 UI/L, 1.948,5 \pm 640,5 UI/L e 20.350,7 \pm 1.358,6 UI/L respectivamente. Esses valores

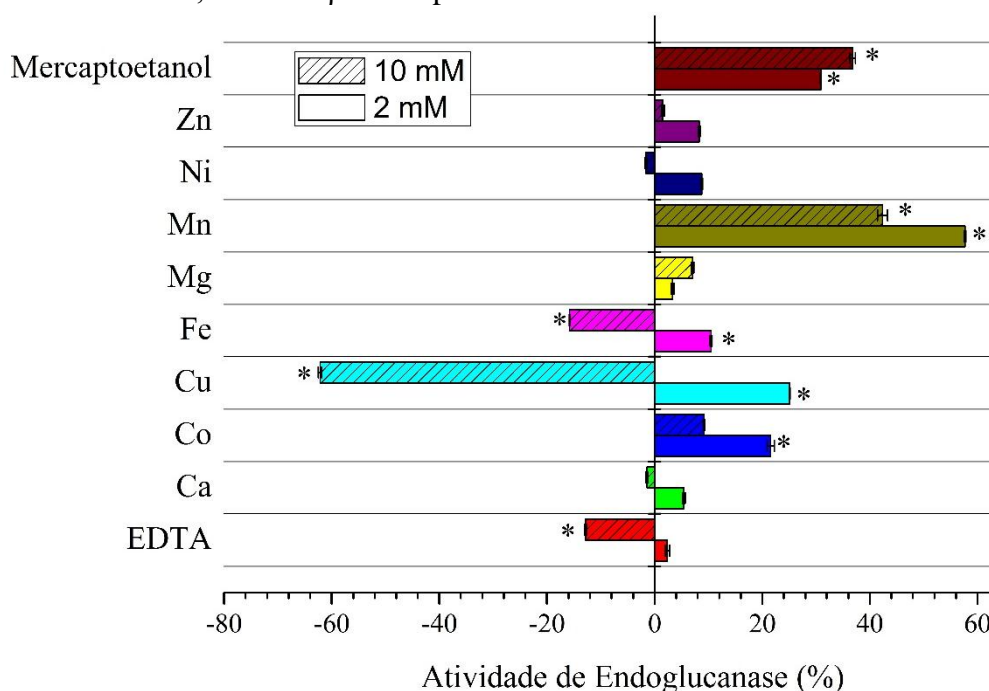
foram adotados como referência e a partir deles calculou-se o aumento ou a diminuição da atividade em termos de atividade percentual (%) para cada enzima.

Foram adicionadas soluções de íons metálicos para as concentrações finais de 2 e 10 mM nos extratos enzimáticos, sendo que todos os ensaios de atividade foram realizados em triplicata. Avaliou-se também o efeito da adição do quelante EDTA a fim de se analisar a influência dos íons presentes no extrato intrínsecos ao meio de cultivo utilizado. O efeito da adição do desnaturante β -mercaptoetanol, geralmente utilizado para reduzir pontes dissulfeto, também foi avaliado. Ao quebrar as ligações S-S, ocorre o comprometimento da estrutura terciária e quaternária de algumas proteínas, e esse agente é capaz de se ligar às cisteínas livres. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey, com 95% de confiança, para determinar se houve uma perda ou acréscimo significativo da atividade enzimática em relação aos valores de referência.

A **Figura 19** apresenta o resultado da influência na atividade enzimática de endoglucanase pela adição dos íons metálicos bivalentes, EDTA e β -mercaptoetanol, em ambas as concentrações. Pode-se observar que a utilização do EDTA na concentração de 10 mM reduz em 12% a atividade enzimática. Assim, para as endoglucanases, os íons inicialmente presentes no extrato bruto contribuem para aumentar a sua atividade. Os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} não alteraram significativamente a atividade enzimática em nenhuma das concentrações utilizadas. Os íons de Cu^{2+} e Fe^{2+} apresentaram comportamentos semelhantes, aumentando a atividade na concentração de 2 mM e reduzindo a atividade enzimática na concentração de 10 mM, principalmente para o cobre (alcançando uma redução de 60%). Os íons de Co^{2+} (2 mM) e Mn^{2+} (2 e 10 mM) aumentaram significativamente a atividade enzimática, com destaque para o manganês que aumentou a atividade em 57% e 42%, respectivamente.

O β -mercaptoetanol elevou a atividade enzimática em aproximadamente 30%, em ambas as concentrações. Portanto, para a endoglucanase avaliada, a modificação na estrutura da proteína gerada pelo rompimento das pontes dissulfeto talvez não afeta o poder catalítico da enzima e melhore o contato enzima-substrato.

Figura 19. Atividade de endoglucanase (%) obtida com a adição dos íons metálicos bivalentes, EDTA e β -mercaptoetanol.

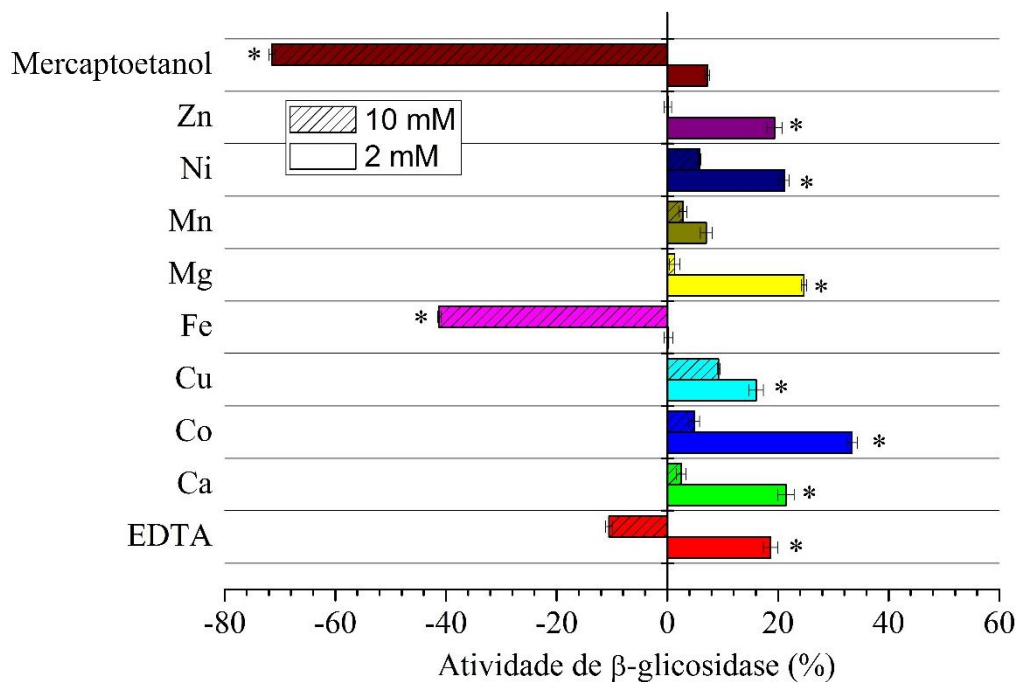


NOTA: * apresenta diferença significativa em relação ao valor de referência (Teste de Tukey, $\alpha=5\%$).

A atividade da β -glicosidase teve resposta mais positiva pela adição de diferentes íons metálicos quando comparadas as endoglucanases (**Figura 20**). Entretanto, o maior aumento de atividade foi de 33% utilizando-se os íons Co^{2+} a uma concentração de 2 mM. Observou-se também que a concentração de 10 mM não é uma boa opção, já que não aumentou a atividade da enzima e, quando comparada ao uso dos mesmos íons na concentração de 2 mM, chegou a ter uma influência negativa, como no caso do Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} .

O íon Mn^{2+} não alterou significativamente a atividade da enzima β -glicosidase para nenhuma das concentrações utilizadas. Já o íon Fe^{2+} destacou-se como inibidor para a β -glicosidase quando utilizado na concentração de 10 mM, gerando uma redução de 40% na atividade. Diante do comportamento positivo da enzima β -glicosidase na presença da maioria dos íons estudados na concentração de 2 mM, o aumento da atividade em 20% na presença do quelante EDTA é intrigante. Uma possível explicação para esse aumento de atividade pode estar relacionada com a retirada do Fe^{2+} , presente no meio de cultivo, visto que esse íon metálico atuou como um forte inibidor para as β -glicosidases. Ao contrário da endoglucanase, a β -glicosidase mostrou-se muito sensível à presença de β -mercaptoetanol, diminuindo a sua atividade enzimática em 70% na concentração de 10 mM desse composto.

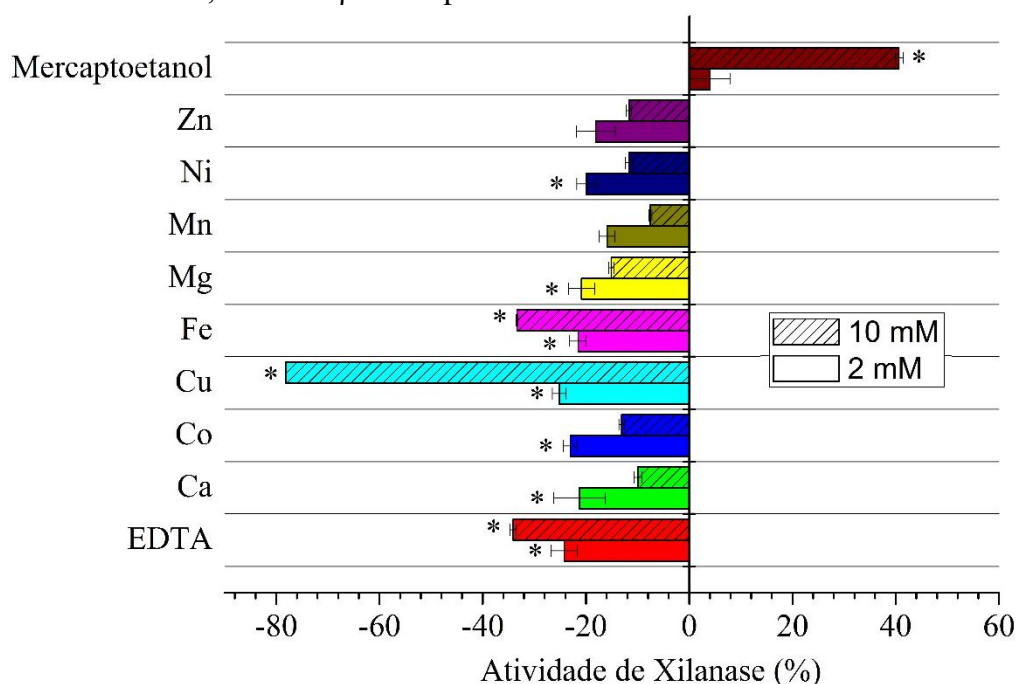
Figura 20. Atividade residual de β -glicosidase (%) obtida com a adição dos íons metálicos bivalentes, EDTA e β -mercaptoetanol.



NOTA: * apresenta diferença significativa em relação ao valor de referência (Teste de Tukey, $\alpha=5\%$).

A xilanase foi a enzima mais afetada negativamente pela adição dos íons metálicos (**Figura 21**). Com exceção dos íons Zn^{2+} e do Mn^{2+} , os demais íons causaram a redução da atividade enzimática em ambas concentrações utilizadas, destacando-se o íon Cu^{2+} , que na concentração de 10 mM, levou a uma perda de 80% da atividade enzimática. Diante da redução de atividade com a adição do EDTA, em ambas as concentrações, pode-se dizer que, semelhante ao comportamento observado para a endoglucanase, os íons metálicos intrínsecos ao meio de cultivo auxiliaram no aumento da atividade da xilanase. Comportamento positivo semelhante ao da endoglucanase foi também observado para a xilanase, em relação à adição de β -mercaptoetanol, na concentração de 10 mM, acarretando um aumento de 40% na atividade enzimática.

Figura 21. Atividade residual de xilanase (%) obtida com a adição dos íons metálicos bivalentes, EDTA e β -mercaptoetanol.



NOTA: * apresenta diferença significativa em relação ao valor de referência (Teste de Tukey, $\alpha=5\%$).

Para a maioria das enzimas, a energia necessária para formar o complexo enzima-substrato é apenas um dos contribuintes para o mecanismo catalítico global. Alguns grupos funcionais catalíticos podem auxiliar na clivagem e na formação de ligações por uma variedade de mecanismos, sendo um deles a catálise por íons metálicos. Assim, a adição dos íons metálicos pode afetar diferentemente as atividades enzimáticas (L. Nelson e M. Cox, 2012).

Os íons metálicos podem estar ligados fortemente às enzimas, ou serem retirados da solução junto com o substrato. As interações iônicas entre a enzima ligada a um metal e um substrato podem auxiliar na orientação do substrato, ou estabilizar estados de transição da reação carregados, além de poderem mediar reações de oxido-redução através de reações reversíveis nos estado de oxidação dos íons metálicos (L. Nelson e M. Cox, 2012).

Neste estudo, a endoglucanase e a β -glicosidase tiveram sua atividade aumentada na presença de Cu^{2+} em baixas concentrações (2 mM). Trabalhos da literatura relatam que as enzimas GH61 e CBM33, participantes da degradação da biomassa lignocelulósica a partir de reações de oxirredução são monooxigenases Cu-dependentes. Elas possuem estruturas similares, um arranjo conservado do grupo amino N-Terminal e duas histidinas, local no qual provavelmente ocorre a ligação do íon

metálico. Entretanto, o mecanismo catalítico envolvido ainda é alvo de muito estudo e especulação (Horn *et al.*, 2012).

A inibição de enzimas por cátions metálicos sugere a presença de cisteína nos sítios ativos. A oxidação do grupo tiol presentes nesse aminoácido pelos cátions desestabiliza o dobramento conformacional da enzima ou provoca a formação de ligações dissulfeto em posição irregular na proteína (Kaur *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2013). Assim, a inibição gerada por alguns íons ocorre devido ao ataque ao grupo tiol do sítio ativo da enzima ($-C-SH$ ou $R-SH$, onde R representa um alceno, alceno, ou outro grupo de átomos contendo carbono). Esse grupo é capaz de formar fortes complexos com íons metálicos grandes, especialmente Hg. Os íons que causam a inibição na atividade devem também ser evitados nos próprios cultivos para se obter uma alta produção de celulasas (Andrade *et al.*, 2011).

A endoglucanase A (número de acesso NCBI GEO: 289595328) pode ser encontrada em extratos produzidos por *A. niger* quando cultivados em bagaço de cana de açúcar pré-tradado (De Souza *et al.*, 2011). Sabe-se que dez aminoácidos presentes nessa proteína, (asparagina36, triptofano38, glicina68, glutamato131, metionina133, triptofano135, prolina144, glicina146, fenilalanina194 e glutamato219) são conservados em endoglucanases e que resíduos de glutamato131 podem atuar como nucleófilos (Pham *et al.*, 2011). Assim, as endoglucanases podem conter sítios nucleófilos conservados, nos quais o íon metálico pode se ligar, alterando a sua atividade e estabilidade.

Para β -glicosidases produzidas por diferentes linhagens de *A. niger* são identificados aminoácidos conservados (aspartato261), que atuam como nucleófilos. Para β -glicosidase de *A. niger* ASKU28 há sete resíduos ácidos conservados flanqueando a região do sítio ativo da enzima, (aspartato463, glutamato471, aspartato487, glutamato490, aspartato496, aspartato501 aspartato512) e desses os resíduos glutamato490 e aspartato501 são conservados nas β -glicosidases (Thongpoo *et al.*, 2013). As β -glicosidases presentes no extrato enzimático analisado também podem conter regiões com nucleófilos, nas quais os íons possam interagir.

Neste estudo, pode-se observar que os íons metálicos, inicialmente presentes no próprio extrato bruto, favoreceram a atividade enzimática da endoglucanase e xilanase. Porém, o mesmo não ocorreu com a atividade de β -glicosidase, podendo haver relação com a toxicidade que o íon de Fe^{2+} , presente no meio de cultivo, representa para essa

enzima. A modificação estrutural das proteínas gerada pelo β -mercaptoetanol propiciou uma melhor atividade para a endoglucanase e xilanase. Novamente, para esse composto, a β -glicosidase apresentou comportamento contrário às demais. De forma geral, os íons metálicos utilizados nesse estudo afetaram todas as classes enzimáticas analisadas e a sua influência dependeu da concentração utilizada.

A divergência na influência dos íons metálicos encontradas nesse trabalho corrobora com as informações apresentadas em trabalhos da literatura (**Tabela 1**). Endoglucanases de *Streptacidiphilus sp.*, também tiveram a sua atividade aumentada pela adição do íon Mn^{+2} (Franco *et al.*, 2011). Entretanto, essas enzimas não foram inibidas pelos íons bivalentes de Ca, Fe, Mn e Zn, como as endoglucanases (EGI e EGII) produzidas por *Melanocarpus sp.* descritas por Kaur *et al.* (2007) foram.

A xilanase de *A. niger* 3T5B8 avaliada neste estudo não teve a sua atividade aumentada por nenhum dos íons selecionados, ocorrendo somente a inibição. Entretanto, xilanases isoladas de *Aspergillus terreus* (Xil1 e Xil2) tiveram a sua atividade aumentada em 36% e 61%, respectivamente, na presença do íon de Mn^{+2} na concentração de 10 mM (Moreira *et al.*, 2013). Nesse mesmo estudo, os autores reportaram que as xilanases de *A. terreus* também tiveram a sua atividade aumentada na presença de EDTA 5 mM, sendo a Xil1 a mais afetada (aumento de 23%). Esses resultados diferem do observado no presente trabalho, pois a xilanase de *A. niger* 3T5B8 teve a atividade reduzida na presença desse quelante em ambas as concentrações (2 e 10 mM) testadas.

As β -glicosidases também foram influenciadas pela adição dos cátions, com um aumento de atividade com a adição dos íons bivalentes de Ca, Co, Cu, Mg, Ni e Zn. Já o íon Mn^{+2} não provocou um aumento significativo na atividade enzimática. Esses resultados diferem do observado por Riou *et al.* (1998), no qual as β -glicosidases de *Aspergillus oryzae* são inibidas por uma grande variedade de cátions (Ag^+ , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} e Fe^{+3}), enquanto que a presença de Mn^{+2} foi capaz de aumentar em 77% a atividade enzimática.

Não foi possível encontrar um padrão de aumento, ou redução da atividade enzimática pela adição dos íons metálicos. Isso sugere que diferentes enzimas produzidas por um mesmo microrganismo ou enzimas produzidas por diferentes microrganismos apresentam diferença em sua composição estrutural. Assim, para a utilização de íons metálicos, visando ao aumento da atividade, é necessária a realização de testes experimentais para cada enzima de interesse.

Além de identificar a influência dos íons metálicos que permitam um aumento da atividade enzimática, também é essencial que os mesmos não acelerem o processo de desativação térmica, pois a reação de sacarificação da biomassa geralmente ocorre a 50°C, podendo durar mais de 24 horas. Portanto, na etapa seguinte deste trabalho, foi realizada uma análise comparativa da influência dos íons metálicos na atividade *versus* estabilidade térmica do coquetel enzimático.

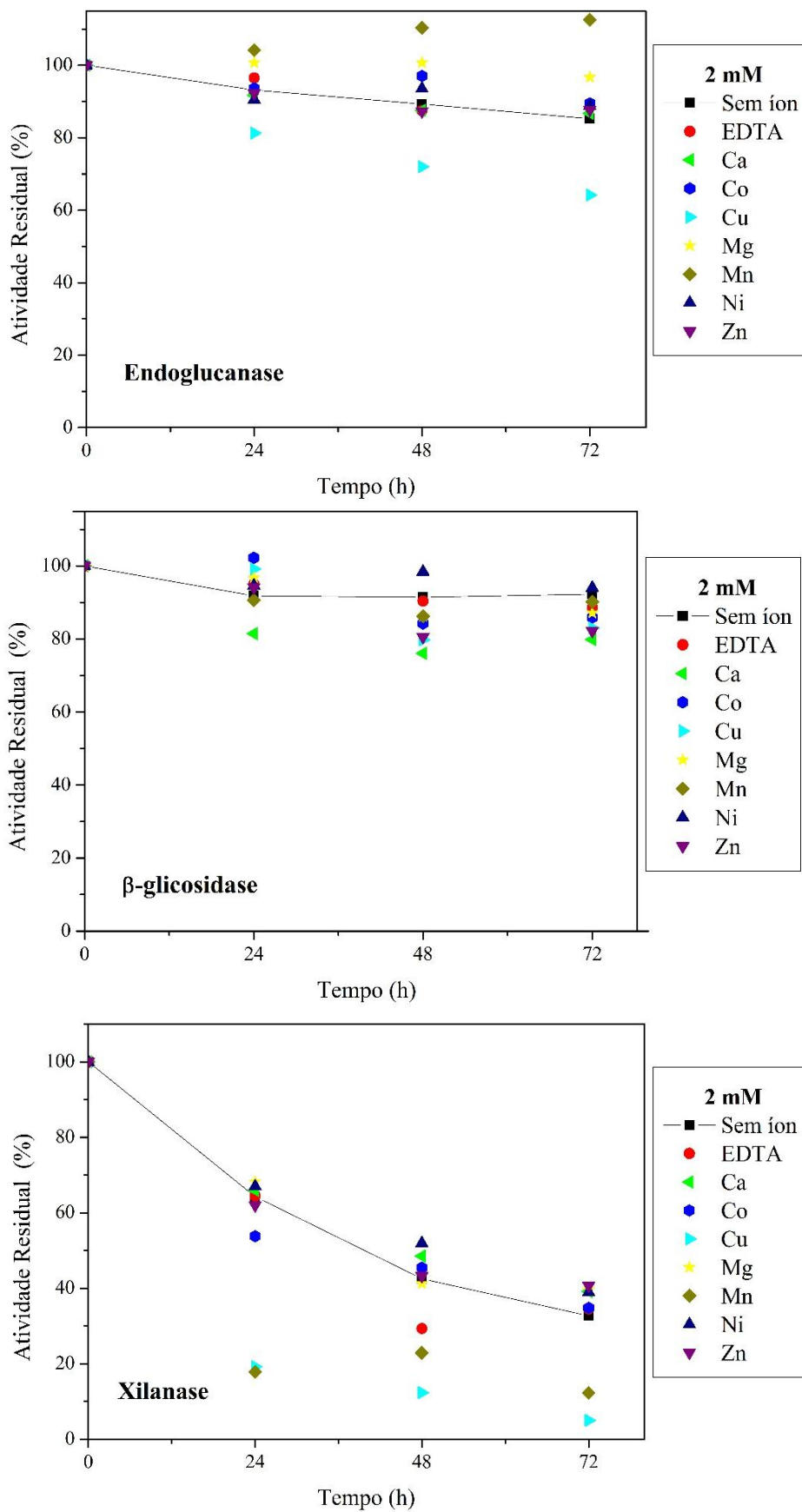
4.5 Influência dos Íons Metálicos na Termoestabilidade das Enzimas

Devido aos resultados positivos da influência dos íons metálicos bivalentes, do agente quelante (EDTA) e do agente desnaturante (β -mercaptoetanol) na concentração de 2 mM, essa concentração foi selecionada para avaliar inicialmente a termoestabilidade das enzimas endoglucanase, β -glicosidase e xilanase. Nesta etapa do estudo, os extratos foram incubados por um período total de 72 horas a 50°C em tampão acetato de sódio pH 4,5, tendo como resposta final dos ensaios a atividade residual. Foi também realizada a incubação do extrato bruto (sem a adição de íons) como controle. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

O β -mercaptoetanol zerou a atividade das três enzimas avaliadas logo nas primeiras 24 horas do ensaio. Já para o íon Fe^{+2} , não foi possível realizar o ensaio de termoestabilidade, pois ocorreu precipitação nos tubos incubados. Os resultados da influência dos demais íons e do EDTA para a concentração de 2 mM na estabilidade enzimática está ilustrado na **Figura 22**.

Para a atividade de endoglucanase, o cátion Mn^{2+} atuou, reduzindo o processo de desativação enzimática. Para essa classe de enzimas, o cátion Mn^{2+} também se destacou, aumentando a atividade em 57%. O íon Mg^{2+} também atuou positivamente, retardando o processo de desativação em relação ao extrato bruto. Os demais íons analisados, com exceção do Cu^{2+} , não interferiram significativamente na estabilidade térmica enzimática. O cátion Cu^{2+} , apesar de aumentar a atividade enzimática, acelerou o processo de desativação.

Figura 22. Termoestabilidade e atividade enzimática residual a 50°C e pH 4,5 do extrato enzimático incubado na presença dos íons bivalentes e do agente quelante (EDTA), na concentração de 2 mM.



Já para a enzima β -glicosidase, nenhum íon destacou-se na influência da estabilidade térmica. Os íons mais próximos do extrato bruto foram o Ni^{2+} e o Mn^{2+} . Os que mais se afastaram foram o Cu^{2+} , Zn^{2+} e Ca^{2+} . Contudo, essa classe enzimática demonstrou-se bastante estável ao final de 72 horas de incubação, com a menor atividade residual obtida no valor de aproximadamente 80%.

A xilanase foi a menos estável das três enzimas, sendo que a presença dos íons de Mn^{2+} e Cu^{2+} aceleraram o processo de desativação. Os outros íons e o EDTA não afetaram a estabilidade em relação ao extrato bruto usado como controle. Após 72 horas de incubação, a xilanase apresentou aproximadamente 30% de atividade residual.

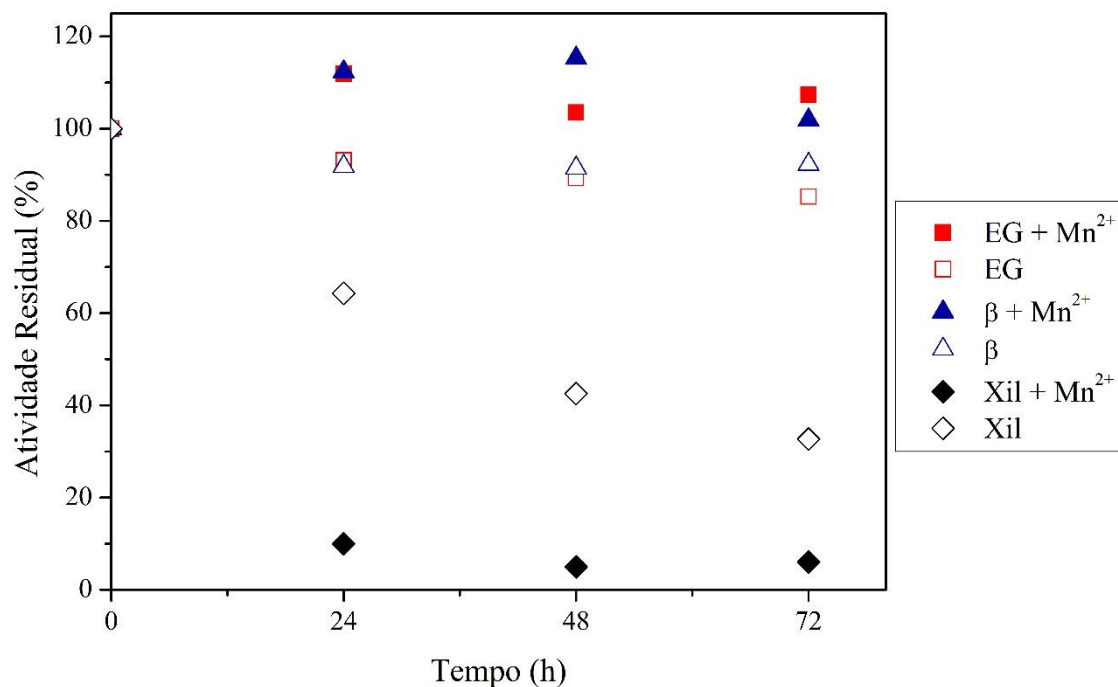
Segundo Liu, Zhu e Fu (2010), os íons metálicos têm a capacidade de se complexar com a lignina durante o processo de hidrólise enzimática. Nesse estudo, os autores observaram que os íons Ca^{2+} e o Mg^{2+} destacaram-se, reduzindo ou eliminando a adsorção improdutivo da enzima pela formação do complexo lignina-metal. A adição desses íons em uma concentração de 10 mM eliminou quase completamente a adsorção improdutivo da enzima na lignina sulfonada (SL), organosolv (OL) e kraft (KL).

Kim *et al.* (2001) estudaram a influência dos íons metálicos, na concentração de 10 mM, durante o processo da hidrólise de celulose cristalina (Avicel), utilizando duas celobiohidrolases isoladas (CBH1 e CBH2) do extrato comercial de *Trichoderma reesei*. Nesse estudo, o cátion Mn^{2+} foi o que mais aumentou, e o Hg^{2+} foi o que mais inibiu a atividade enzimática. Constatou-se, então, que a adição de Mn^{2+} aumentou a constante de afinidade de adsorção (K_{ad}), indicando que a presença desse íon metálico aumenta a afinidade de adsorção da enzima pelo substrato. A situação contrária ocorreu quando foi adicionado o íon Hg^{2+} no meio.

Analisando o efeito dos íons metálicos na atividade e na estabilidade térmica das enzimas, visando à sua utilização no processo de sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, foi selecionado o cátion Mn^{2+} para avaliação da sua influência na etapa de sacarificação. Essa escolha se justifica pelo efeito positivo desse íon na atividade e estabilidade das endoglucanases.

Tendo como uma das hipóteses, a possível adsorção do íon na lignina no lugar das enzimas e, reduzindo, assim, a perda enzimática por adsorção improdutivo, uma das variáveis do processo de sacarificação é a concentração inicial de íons. Dessa forma, foi realizado o teste de termoestabilidade para o íon selecionado Mn^{2+} também na concentração de 10 mM (**Figura 23**).

Figura 23. Termoestabilidade e atividade enzimática residual a 50°C e pH 4,5 de endoglucanase (EG), β -glicosidase (β) e xilanase (Xil) incubadas na presença de Mn^{2+} na concentração de 10 mM.



A estabilidade térmica, com o cátion Mn^{2+} na concentração de 10 mM, apresentou um comportamento similar ao obtido, utilizando-se a menor concentração de 2 mM. Portanto, esse íon se mostrou adequado para ser avaliado no processo de sacarificação.

4.6 Influência dos Íons Metálicos na Sacarificação Enzimática

Antes de verificar a influência do íon metálico no processo de sacarificação enzimática foram realizados testes em dois dispositivos rotativos distintos a fim de avaliar possíveis diferenças na conversão. Foi utilizado bagaço hidrotérmico lavado com dois diferentes diâmetros de partícula ($d_p \leq 0,5$ e $d_p \leq 1,0$ mm) com carga de sólidos de 5%, utilizando enzima comercial (CelicCTec 2) na dosagem de 10,2 mg proteína/ g substrato. Os dispositivos analisados foram a mesa incubadora rotativa (shaker) a 200 rpm, e um dispositivo com rotação de 360° a 30 rpm, ambos a 50°C por 72 horas. Os resultados estão apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Conversão (%) da hidrólise enzimática com enzima comercial a 50°C por 72h.

Dispositivo	D _p (mm)	Conversão (%)
Shaker	<1,0	23,4±1,6
Shaker	<0,5	16,6±2,8
360°	<1,0	29,8±0,7
360°	<0,5	58,6±0,5

A partir dos resultados obtidos foi possível verificar que tanto o tamanho da partícula quanto o tipo de agitação afetaram a conversão no processo. O dispositivo com rotação em 360° foi melhor para ambos os diâmetros de partícula analisados. Já em relação ao diâmetro de partícula, para os ensaios em shaker o $d_p < 0,1$ favoreceu o processo, enquanto que para o outro dispositivo estudado, o $d_p < 0,5$ chegou a dobrar a conversão, provavelmente essa diferença ocorreu devido a diferença na transferência de massa que existe entre esses dois dispositivos. Assim, foi definido para os experimentos seguintes o uso do dispositivo com rotação em 360° a 30 rpm utilizando o bagaço com $d_p < 0,5$.

Foram também realizados experimentos preliminares nas condições definidas no primeiro teste para a determinação do tempo de processo (24, 48 e 72 horas), utilizando o extrato bruto sem a adição dos íons. Nesses experimentos foi verificado que a conversão obtida não sofreu alteração significativa ao longo das 72 horas de processo, sendo selecionado o tempo de 24 horas para os demais experimentos. Verificou-se também que o extrato bruto (EB) atingiu apenas 1,5% de conversão e, diante da baixa conversão atingida, optou-se por concentrar o extrato, utilizando a técnica de precipitação de proteínas por acetona, para realizar os experimentos da influência do íon metálico.

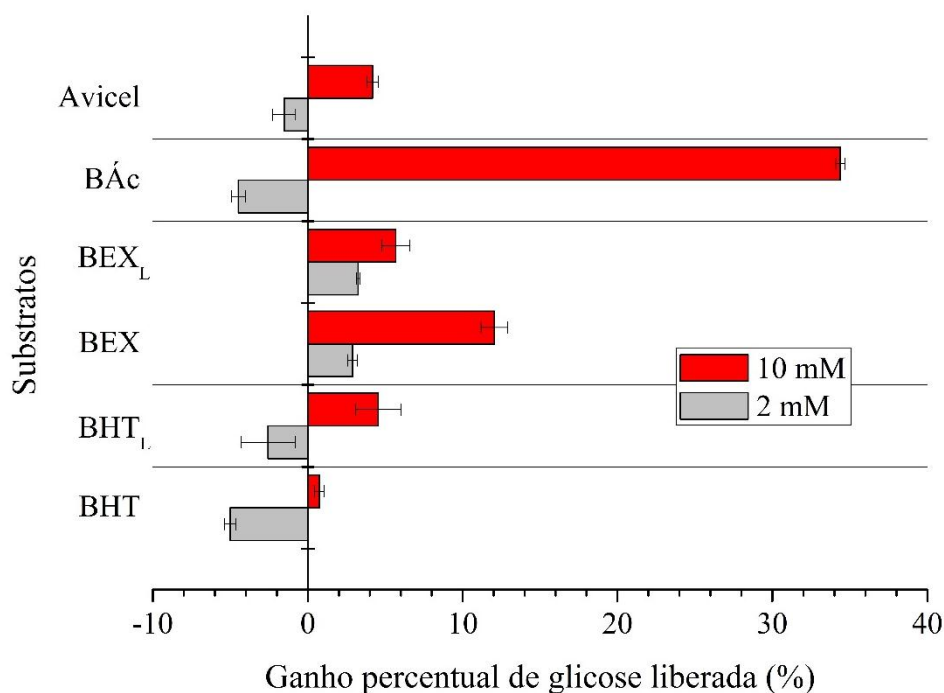
Para os experimentos da influência do íon metálico na sacarificação enzimática foi utilizado o íon de manganês, em ambas as concentrações (2 e 10 mM). As hidrólises foram conduzidas em reator rotativo a 30 rpm a 50°C com 5% de carga de sólidos por 24 h. Foram utilizados como substratos a celulose cristalina (Avicel) e o bagaço de cana-de-açúcar com $d_p < 0,5$ submetidos a diferentes pré tratamentos: hidrotérmico (BHT), hidrotérmico lavado (BHT_L), explodido (BEX), explodido lavado (BEX_L) e ácido (BÁc).

A influência dos íons metálicos na sacarificação enzimática foi determinada pela quantidade de glicose liberada após as 24 horas de hidrólise. A quantidade de glicose liberada (G_L) equivale a quantidade de glicose em 24 horas, menos a quantidade de

glicose inicial (0 horas), menos a glicose liberada pelo substrato após 24 em tampão acetato de sódio 200 mM pH 4,5 (controle na ausência de enzima). Utilizou-se como referência a quantidade de glicose liberada nos experimentos de hidrólise sem a adição do íon de manganês. Assim os valores de referência são diferentes para cada substrato testado. A partir desses resultados, calculou-se a variação da quantidade de glicose liberada, em ganho percentual (%), na hidrólise realizada com a adição de Mn^{2+} na concentração de 2 e 10 mM.

Os ganhos percentuais da quantidade de glicose liberada obtidos utilizando o extrato bruto concentrado para a hidrólise dos diferentes substratos estão apresentados na **Figura 24**. Pode-se observar que a adição do íon em ambas as concentrações apresentou diferentes respostas à degradação enzimática. No ensaio com EB_{CON} foi possível visualizar o efeito positivo da adição do íon metálico quando utilizado na concentração de 10 mM. A resposta mais expressiva à adição do íon foi para o BÁC, que teve a G_L elevada em 34%. Para o BEX e o BEX_L também constatou-se o efeito positivo na liberação da glicose. Pode-se observar também que a adição do íon é mais positiva para o substrato que não passou pelo processo de lavagem.

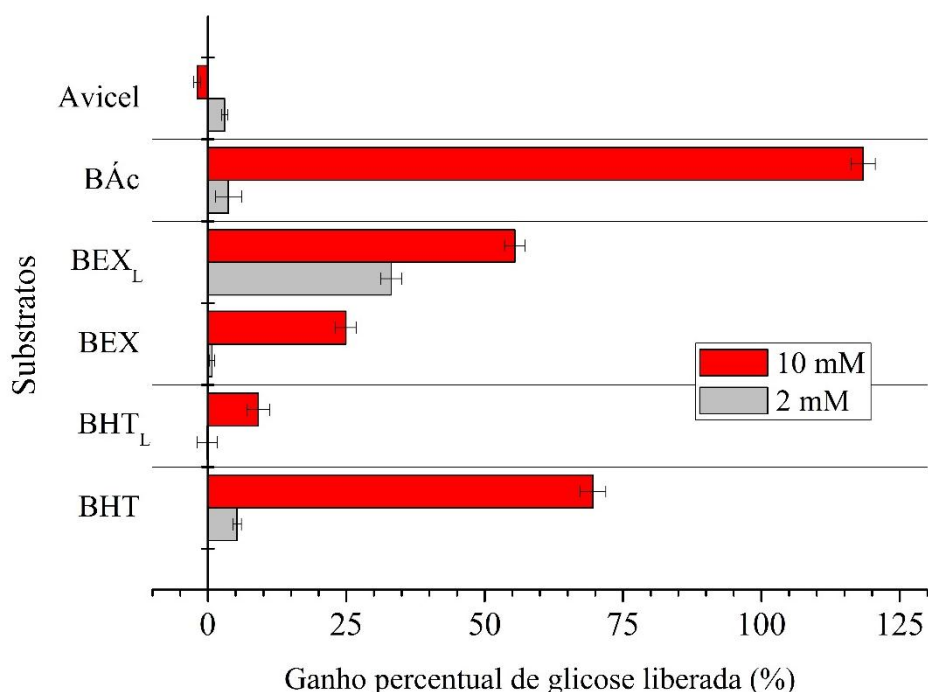
Figura 24. Ganho percentual de glicose liberada (%) com o EB_{CON} na presença do íon Mn^{2+} após 24h de processo a 50°C da hidrólise de diferentes substratos.



Apesar da etapa de concentração do extrato enzimático bruto, o EB_{CON} ainda apresentava uma baixa quantidade de proteínas totais (2,4 mg de proteínas/ g substrato). Portanto, para poder analisar em mais detalhes o efeito dos íons metálicos na etapa de sacarificação, foi realizado ensaios de fermentação em estado sólido, utilizando como substrato indutor o farelo de trigo (EB_{FT}). Obteve-se, então, um extrato enzimático com maior carga protéica (7,4 mg de proteína/ g substrato), possibilitando a exploração da influência do íon na hidrólise.

Os ganhos percentuais da quantidade de glicose liberada obtidos utilizando o EB_{FT} para a hidrólise dos diferentes substratos estão apresentados na **Figura 25**. Para esse ensaio foi possível observar melhor a influência do íon metálico, especialmente quando adicionado na concentração de 10 mM. A adição do íon aumentou a G_L (%) para todos os substratos lignocelulósicos testados. Destacando-se o BHT e o BEX_L com aumento de 70 e 55 % respectivamente, e o BÁC que teve a glicose liberada maior que o dobro.

Figura 25. Ganho percentual de glicose liberada (%) com o EB_{FT} na presença do íon Mn²⁺ após 24h de processo a 50°C da hidrólise de diferentes substratos.



Também com a utilização do EB_{FT} tornou-se ainda mais evidente o efeito positivo da adição do íon nos substratos que não passaram pelo processo de lavagem,

tanto para o BHT_L quanto para o BEX_L. A adição do íon metálico poderia ser uma alternativa para evitar a etapa de lavagem da biomassa, o que contribuiria significativamente para a redução do uso de água e, conseqüente redução dos custos do processo de hidrólise. Resultados semelhantes também foram observados por Liu e Zhu (2010), os autores demonstraram que com a adição de íons metálicos foi possível obter resultados semelhantes em termos de hidrólise enzimática para álamo pré-tratado não lavado e lavado, indicando que o procedimento de lavagem, para eliminação dos inibidores solúveis, pode ser eliminado.

Para ambos os extratos testados, EB_{CON} e EB_{FT}, a adição do íon de manganês no processo de hidrólise do Avicel não apresentou ganho percentual significativo de glicose liberada. Tal fato evidencia o papel da interação íon-lignina, pois o avicel é um substrato comercial de celulose pura.

Também foram realizados testes com a enzima comercial utilizando o íon de manganês na concentração de 10 mM. O perfil de G_L dos substratos obtidos se difere dos demais, pois a adição do íon metálico não influenciou a conversão para nenhuma condição estudada. Isso mostra que a enzima comercial CelicCTec 2 é um coquetel enzimático que já contém uma formulação otimizada de enzimas e aditivos, e que não é influenciado pela adição de Mn²⁺ (10 mM).

As concentrações de glicose liberada e as conversões obtidas na sacarificação enzimática para o EB_{CON} e EB_{FT} sem a adição de íon estão apresentados na **Tabela 9**. As biomassas apresentaram diferentes respostas à degradação enzimática, provavelmente devido a diferenças químicas e estruturais intrínsecas a cada pré-tratamento aplicado. Entretanto o perfil de conversão obtido sem a adição dos íons do EB_{CON} é semelhante ao perfil do EB_{FT}. As biomassas lavadas obtiveram conversões menores que as não lavadas, apresentando uma menor liberação de açúcar no meio, mesmo o substrato tendo uma maior quantidade de celulose.

Tabela 9. Concentração de glicose liberada (g/L) e conversão da hidrólise (%) para o EB_{CON} e EB_{FT} sem a adição de íon metálico após 24h a 50°C.

Substratos	Glicose liberada (g/L)		Conversão (%)	
	EB _{CON}	EB _{FT}	EB _{CON}	EB _{FT}
BHT	3,05±0,11	3,21±0,07	9,78±0,34	10,32±0,56
BHT _L	2,46±0,15	2,44±0,18	6,74±0,43	6,69±0,19
BEX	1,85±0,02	1,89±0,12	6,65±0,06	6,81±0,44
BEX _L	1,14±0,08	1,12±0,21	3,33±0,26	3,28±0,66
BÁc	1,12±0,05	0,83±0,21	3,64±0,16	2,69±0,67
Avicel	1,54±0,06	1,77±0,11	2,77±0,11	3,19±0,40

As propriedades de superfície da lignina são influenciadas pela biomassa e pelo pré-tratamento, sendo que a severidade do pré-tratamento utilizado modifica a complexidade da lignina que permanece no substrato, afetando sua estrutura química e física (Pareek, Gillgren e Jonsson, 2013; Ko *et al.*, 2015).

Pré-tratamentos mais severos não só aumentam a adsorção improdutiva de enzimas no processo de hidrólise enzimática, como também podem resultar na adsorção preferencial de um componente a outro. É observado que a lignina em pH 4,8 apresenta carga negativa, sendo a sua intensidade variável de acordo com o pré-tratamento aplicado (Ko *et al.*, 2015). Neste estudo, a maior liberação de glicose no processo de hidrólise com a adição do íon metálico pode estar relacionada à neutralização das cargas negativas presentes na lignina, diminuindo assim, a adsorção enzimática.

Segundo Liu, Zhu e Fu (2010), a adição de íons de Ca^{2+} e Mg^{2+} na concentração de 10 mM eliminou quase completamente a adsorção improdutiva da enzima na lignina sulfonada (SL), organosolv (OL) e kraft (KL) adicionadas em Avicel. O íon Ca^{2+} também reduziu o efeito inibidor da lignina do substrato da madeira do eucalipto pré-tratada, indicando que a lignina ligada ou não ao substrato, sendo a última solúvel ou insolúvel, podem inibir a hidrólise enzimática. Assim, no presente estudo, a diferença encontrada na influência do íon de manganês nos substratos, lavado ou não, pode estar relacionada com a retirada da lignina não ligada ao substrato.

Os autores Liu, Zhu e Fu (2010) também analisaram a madeira de eucalipto pré-tratada hidrotérmicamente, pelo ácido diluído e o com bissulfito (SPORL) em pH alto e baixo, e constataram que a influência do íon de Ca^{2+} foi diferente para cada pré-tratamento. A digestibilidade do material de eucalipto hidrotérmico não foi influenciada pela adição dos íons e o pré-tratamento com maior ganho de açúcar redutor foi o SPORL, destacando-se o realizado em pH alto. Esse resultado pode ser explicado pela diferença da estrutura e grupos funcionais presentes na lignina. Nesse caso, o alto grau de sulfonação presente nos materiais pré-tratados por bissulfito pode ter promovido a formação do complexo lignina-metal. Os diferentes valores de conversão encontrados no presente trabalho ao variar o substrato e ao adicionar o íon metálico corroboram com os estudos apresentados na literatura.

O extrato proveniente do farelo de trigo (EB_{FT}) possuía uma maior carga de proteína que o extrato concentrado (EB_{CON}). Entretanto, não foi possível avaliar uma melhora na conversão das biomassas sem a adição do íon metálico de manganês,

conforme pode ser observado na **Tabela 9**. Uma possível explicação poderia estar relacionada ao fato de que o extrato enzimático proveniente do cultivo com farelo de trigo como substrato, contenha também proteínas liberadas da própria composição do farelo. Assim, foi realizada a quantificação das enzimas presentes nesses extratos, conforme apresentado na **Tabela 10**.

Tabela 10. Atividade enzimática (UI/L) dos extratos enzimáticos (EB_{CON} e EB_{FT}) utilizados na hidrólise.

Atividade enzimática (UI/L)	EB _{CON}	EB _{FT}
Endoglucanase	8.733,0	9.671,4
β-glicosidase	6.779,9	9.830,8
Xilanase	51.484,8	60.769,9

O aumento da atividade enzimática foi diferente entre si, a atividade do EB_{FT} para endoglucanase, β-glicosidase e xilanase apresentou um aumento de 10, 44 e 18 % respectivamente, em relação ao EB_{CON}. A endoglucanase e β-glicosidase, enzimas diretamente envolvidas na degradação da celulose, não apresentaram aumentos proporcionais de atividade, mas a adição do íon metálico elevou a glicose liberada para os extratos analisados de forma distinta, indicando que a adsorção improdutiva é diferente para cada enzima.

A adsorção das enzimas na lignina é impulsionada pela interação hidrofóbica e eletrostática, e esses dois fatores influenciam a adsorção de forma distinta para cada classe enzimática. A interação hidrofóbica é considerada a maior força no processo de adsorção (Pareek, Gillgren e Jonsson, 2013; Ko *et al.*, 2015).

A adsorção improdutiva não é só afetada pelas características estruturais e físico-químicas da lignina. As propriedades enzimáticas como tamanho molecular, hidrofobicidade, PI podem afetar a adsorção (Pareek, Gillgren e Jonsson, 2013; Ko *et al.*, 2015). As enzimas envolvidas no processo de degradação da celulose apresentam diferentes perfis e, conseqüentemente, diferenças na adsorção improdutiva. Endoglucanases e celobiohidrolases são mais adsorvidas pela hidrofobicidade, enquanto as β-glicosidases pela interação eletrostática (Ko *et al.*, 2015).

5 CONCLUSÃO

O elevado custo das enzimas (hemi)celulolíticas necessárias para a conversão de biomassa ainda é uma das maiores limitações na produção em larga escala do etanol 2G. Em termos de economia do processo, além da identificação das condições de cultivo, que proporcionam altas cargas enzimáticas, também é essencial que as enzimas produzidas sejam termoestáveis.

Demonstrou-se aqui que uma melhora na produção enzimática na FES requer a adoção de estratégias de processos para a remoção de inibidores, presentes na biomassa pré-tratada utilizada no meio de cultivo como substrato indutor, devido aos efeitos inibitórios de compostos fenólicos no crescimento fúngico. Os resultados também revelaram que a estabilidade térmica da endoglucanase e da β -glicosidase produzidas por FES é menos afetada pelos compostos fenólicos presentes no meio. Em geral, conclui-se que a seleção e otimização das condições de cultivo devem ser realizadas em conjunto com a caracterização da estabilidade térmica das enzimas, pois pode haver uma relação inversa entre esses dois critérios do processo. Nesse trabalho o melhor extrato encontrado foi produzido em FES utilizando como substrato bagaço hidrotérmico lavado, que produziu enzimas mais puras (maior atividade específica) e estáveis.

Observou-se que os íons metálicos já presentes no extrato bruto favoreceram a atividade enzimática da endoglucanase e xilanase, entretanto, o mesmo não ocorreu com a β -glicosidase. A alteração na estrutura das proteínas pelo β -mercaptoetanol melhorou momentaneamente a atividade de endoglucanase e xilanase, porém a β -glicosidase também apresentou comportamento contrário. Os íons metálicos utilizados neste estudo afetaram todas as classes enzimáticas analisadas, reduzindo ou potencializando a atividade enzimática, dependendo da concentração utilizada, indicando a presença de sítios nucleófilos nas enzimas.

Para a endoglucanase, o íon Mn^{2+} , em ambas as concentrações de 2 e 10 mM, foi o íon com maior efeito positivo na atividade, atingindo um aumento de 57% e 42%, respectivamente. O cátion Mn^{2+} também se destacou em relação à termoestabilidade dessa enzima, sendo aproximadamente 25% melhor que o controle em 72 horas de incubação. Para a β -glicosidase e xilanase, a adição do íon Mn^{2+} não provocou um aumento significativo na atividade enzimática.

A adição do íon selecionado Mn^{2+} , na concentração de 10 mM, no processo de sacarificação da biomassa utilizando extratos enzimáticos produzidos “in house”, mostrou-se eficaz no aumento da liberação de glicose para a maioria os substratos lignocelulósicos testados, com ganhos percentuais de até 120% para o bagaço pré-tratado em meio ácido (Bác). Para o bagaço explodido lavado (BEX_L) o aumento foi de 55 % e para o hidrotérmico (BHT) foi de 70%.

Conclui-se que a adição de íons metálicos é capaz de influenciar positivamente tanto a atividade e estabilidade como o processo de sacarificação enzimática, despontando-se como alternativa potencial para contribuir na redução do custo do processo de produção de etanol 2G.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros seria de grande interesse aumentar a carga enzimática do extrato FES/BHT_L, tentando outra técnica de concentração como, por exemplo, a ultrafiltração. Com o extrato concentrado sugere-se realizar o levantamento de curvas de adsorção enzimática, na ausência e presença do íon metálico, utilizando os substratos analisados no estudo de sacarificação do presente trabalho. Esses dados de adsorção poderiam contribuir para elucidar o aumento de glicose liberada na presença do íon metálico durante o processo de sacarificação, relacionando-se com a diminuição da adsorção improdutiva das enzimas.

Sugere-se também a realização de testes de adsorção com Avicel adicionando diferentes concentrações de ligninas isoladas, confirmando se a lignina é responsável pela adsorção improdutiva das enzimas. E por fim, investigar a estrutura dos substratos utilizados nesse estudo utilizando a técnica de espectroscopia de infravermelho (FTIR), verificando as diferenças químicas e estruturais que podem ser encontradas na lignina devido a severidade dos diferentes pré-tratamentos utilizados, complementando o entendimento relacionado à possível adsorção improdutiva das enzimas nesse estudo.

REFERÊNCIAS

ACUNAARGUELLES, M. E. et al. PRODUCTION AND PROPERTIES OF 3 PECTINOLYTIC ACTIVITIES PRODUCED BY ASPERGILLUS-NIGER IN SUBMERGED AND SOLID-STATE FERMENTATION. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 5, p. 808-814, Oct 1995. ISSN 0175-7598.

ANDRADE, J. P. et al. Production and Partial Characterization of Cellulases from *Trichoderma sp. IS-05* Isolated from Sandy Coastal Plains of Northeast Brazil. **Enzyme Research: Creative Commons Attribution License**. 2011: 7 p. 2011.

ANDRIC, P. et al. 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, n. 3, p. 308-324, May-Jun 2010.

ARANTES, V. et al. Relevance of low molecular weight compounds produced by fungi and involved in wood biodegradation. **Quím. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1586-1595, 00/2009 2009.

BAILEY, M. J.; POUTANEN, K. Production Of Xylanolytic Enzymes By Strains Of Aspergillus. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 5-10, Jan 1989.

BEGUIN, P.; AUBERT, J. P. The Biological Degradation of Cellulose. **Fems Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 25-58, Jan 1994.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CANNELLA, D.; JORGENSEN, H. Do New Cellulolytic Enzyme Preparations Affect the Industrial Strategies for High Solids Lignocellulosic Ethanol Production? **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 1, p. 59-68, Jan 2014.

CASTRO, L. P. M.; TREJOAGUILAR, B. A.; OSORIO, G. A. Thermostable xylanases produced at 37 degrees C and 45 degrees C by a thermotolerant Aspergillus strain. **Fems Microbiology Letters**, v. 146, n. 1, p. 97-102, Jan 1997.

CONAB, C. N. D. A. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar: Quarto levantamento. www.conab.com.br, Acesso em: outubro, 2014.

COURI, S.; DEFARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista De Microbiologia**, v. 26, n. 4, p. 314-317, Oct-Dec 1995.

COUTO, S. R.; SANROMAN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, Oct 2006.

CUNHA, F. M. et al. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 270-274, May 2012.

_____. Three-phasic fermentation systems for enzyme production with sugarcane bagasse in stirred tank bioreactors: Effects of operational variables and cultivation method. **Biochemical Engineering Journal**, v. 97, p. 32-39, 15 May 2015.

DE CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial residues. **Quimica Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-U208, 2010.

DE SOUZA, A. P. et al. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 2, p. 564-579, Jun 2013.

DE SOUZA, W. R. et al. Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 16, Oct 2011.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 497-+, Dec 2001.

DELABONA, P. D. et al. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 236-242, Mar 2013.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 2-17, Feb 2009.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 1, p. 1-33, Jan 1996.

ERIKSSON, T.; BORJESSON, J.; TJERNELD, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 353-364, Aug 2002.

FAO. www.fao.org.br, Acesso em: outubro, 2014.

FARINAS, C. S. et al. Finding stable cellulase and xylanase evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 810-815, Dec 2010.

FLORENCIO, C. et al. Validation of a Novel Sequential Cultivation Method for the Production of Enzymatic Cocktails from *Trichoderma* Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 3, p. 1389-1402, Feb 2015.

FRANCO, M. N. et al. Caracterização das endoglucanases Produzidas por *Streptacidiphilus* sp. PESSB 25 em resíduos agroindustriais. **SINAFERM e SHEB**, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul 2011.

GHOSE, T. K. Measurement Of Cellulase Activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, Feb 1987.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. D. Cellulases, xylanases, beta-glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, n. 1-2, p. 72-78, Aug 2010.

GOUVEIA, E. R. et al. Validation of methodology for the chemical characterization of sugar cane bagasse. **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GOUVÊA, P. F. **Estudos genéticos e moleculares da produção de celulases e hemicelulases em *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus niger***. 2013. 206f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP.

GRANBIO. Produção Sustentável. www.granbio.com.br/conteudos/biocombustiveis, Acesso em: Setembro, 2014.

GUO, X. Y.; ZHANG, S. Z.; SHAN, X. Q. Adsorption of metal ions on lignin. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, n. 1, p. 134-142, Feb 2008.

HARRIS, P. V. et al. Stimulation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis by Proteins of Glycoside Hydrolase Family 61: Structure and Function of a Large, Enigmatic Family. **Biochemistry**, v. 49, n. 15, p. 3305-3316, Apr 2010.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, Apr 2004.

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301-306, Jun 2005.

HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 12, Jul 2012.

HOU, C. T.; SHAW, J.-F. **Biocatalysis and Bioenergy**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2008.

KAR, S. et al. Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 1, p. 57-68, Jan 2013.

KAUR, J. et al. Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp MTCC 3922. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 74-81, Jan 2007.

KIM, D. W. et al. Effect of metal ions on the degradation and adsorption of two cellobiohydrolases on microcrystalline cellulose. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 22, n. 7, p. 716-720, Jul 20 2001.

KIM, Y. et al. Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 30-38, May 2013.

KIM, Y.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. Enzymatic Digestion of Liquid Hot Water Pretreated Hybrid Poplar. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 2, p. 340-348, Mar-Apr 2009.

KIM, Y. et al. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 4-5, p. 408-415, Apr 2011.

KING, B. C. et al. An Optimized Microplate Assay System for Quantitative Evaluation of Plant Cell Wall-Degrading Enzyme Activity of Fungal Culture Extracts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 4, p. 1033-1044, Mar 2009.

- KO, J. K. et al. Adsorption of enzyme onto lignins of liquid hot water pretreated hardwoods. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 3, p. 447-456, 2015.
- L. NELSON, D.; M. COX, M. **Lehninger:Principles of Biochemistry**. 6 ed. W. H. Freeman, 2012. 1100.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970-08-15 1970.
- LASER, M. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, n. 1, p. 33-44, Jan 2002.
- LEVASSEUR, A. et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 14, Mar 2013.
- LIU, D. Y. et al. Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of different carbon sources. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 16, Oct 2013.
- LIU, H.; ZHU, J. Y. Eliminating inhibition of enzymatic hydrolysis by lignosulfonate in unwashed sulfite-pretreated aspen using metal salts. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 9120-9127, Dec 2010.
- LIU, H.; ZHU, J. Y.; FU, S. Y. Effects of Lignin-Metal Complexation on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7233-7238, Jun 2010.
- LYND, L. R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, economics, the environment, and policy. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 21, p. 403-465, 1996.
- MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent Advances In Cellulase Technology. **Journal of Fermentation Technology**, v. 54, n. 4, p. 267-286, 1976.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MOREIRA, L. R. D. et al. Two beta-xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 46-52, Nov 2013.
- MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, Apr 2005.
- NONAKA, H.; KOBAYASHI, A.; FUNAOKA, M. Lignin isolated from steam-exploded eucalyptus wood chips by phase separation and its affinity to *Trichoderma reesei* cellulase. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 431-434, Jul 2013.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Biomass enzymatic hydrolysis. **Quimica Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

PAREEK, N.; GILLGREN, T.; JONSSON, L. J. Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicelluloses. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 70-77, Nov 2013.

PEREIRA JR, N. **Biotecnologia de materiais lignocelulósicos para a produção química**. Prêmio Abiquim de Tecnologia, 11º Encontro Anual da Indústria Química, Rio de Janeiro-RJ: Universidade federal do Rio de Janeiro 2006.

PERPETUA BUZON PIROTA, R. D. et al. Enhancing xylanases production by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 465-471, Feb 2013.

PHAM, T. H. et al. Cloning, Expression, Purification, and Properties of an Endoglucanase Gene (Glycosyl Hydrolase Family 12) from *Aspergillus niger* VTCC-F021 in *Pichia pastoris*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1012-1020, Oct 2011.

PIROTA, R. et al. Enhancing xylanases production by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 465-471, Feb 2013.

PREVOT, V. et al. Comparative performance of commercial and laboratory enzymatic complexes from submerged or solid-state fermentation in lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 690-693, Feb 2013.

PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Rapid Visual Estimation And Spectrophotometric Determination Of Tannin Content Of Sorghum Grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1268-1273, 1977.

RIOU, C. et al. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant beta-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3607-3614, Oct 1998.

RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. F. et al. Use of Spectroscopic and Imaging Techniques to Evaluate Pretreated Sugarcane Bagasse as a Substrate for Cellulase Production Under Solid-State Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 5, p. 2348-2362, Mar 2014.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. et al. Lignocellulose pretreatment technologies affect the level of enzymatic cellulose oxidation by LPMO. **Green Chemistry**, p. 8, 2015.

SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-Step Unimolecular Non-1st-Order Enzyme Deactivation Kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 6, p. 717-723, Oct 1987.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SALIBA, E. D. O. S. et al. Lignins: isolation methods and chemical characterization. **Cienc. Rural**, v. 31, n. 5, p. 917-928, 10/2001 2001.

SANTOS, F. A. et al. POTENTIAL OF SUGARCANE STRAW FOR ETHANOL PRODUCTION. **Quimica Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. 1. São Paulo, Brasil: Edgard Blücher LTDA, 2001. 541.

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

SOHAIL, M. et al. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 437-441, Sep 2009.

STRICKER, A. R.; MACH, R. L.; DE GRAAFF, L. H. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 211-220, Feb 2008.

SUKUMARAN, R. K. et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, n. 2, p. 421-424, Feb 2009.

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

TARDIOLI, P. W. et al. Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized alcalase-glyoxyl agarose. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 352-360, Mar-Apr 2003.

THONGPOO, P. et al. Identification of the acid/base catalyst of a glycoside hydrolase family 3 (GH3) beta-glucosidase from *Aspergillus niger* ASKU28. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1830, n. 3, p. 2739-2749, Mar 2013.

VIIKARI, L. et al. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. In: OLSSON, L. (Ed.). **Biofuels**. Berlin: Springer-Verlag Berlin, v.108, 2007. p.121-145.

WANG, Z. J. et al. Lignosulfonate-mediated cellulase adsorption: enhanced enzymatic saccharification of lignocellulose through weakening nonproductive binding to lignin. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 10, Nov 2013.

XIMENES, E. et al. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3-4, p. 170-176, Mar 2010.

_____. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 1, p. 54-60, Jan 2011.

YOON, L. W. et al. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass & Bioenergy**, v. 67, p. 319-338, Aug 2014.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452-481, Sep-Oct 2006.