UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Ana Sílvia de Almeida Scarcella

**Hidrólise e fermentação de resíduos celulósicos visando a produção de
etanol**

Ribeirão Preto

2016

Ana Sílvia de Almeida Scarcella

**Hidrólise e fermentação de resíduos celulósicos visando a produção de
etanol**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria de Lourdes T. M. Polizeli

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Scarcella, Ana Sílvia de Almeida
Hidrólise e fermentação de resíduos celulósicos visando a
produção de etanol, Ribeirão Preto, 2016.
157 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Bioquímica.

Orientador: Polizeli, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes

1. Coquetel enzimático. 2. Bagaço de cana-de-açúcar. 3.
Lodo branco. 4. Bioetanol.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha vó Dulce, que mesmo não estando presente durante esta fase, foi a minha maior incentivadora para a realização deste sonho.

À você meu eterno amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli pela amizade, confiança, apoio, dedicação e paciência no exercício de me orientar, pelos conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais Lúcia e Luiz Carlos, à minha irmã Ana Carolina, minha tia Luiza e minha vó “Inha” por estarem sempre ao meu lado ao longo desta jornada, com um amor infinito, carinho e dedicação para a realização deste sonho.

À Rosy por toda ajuda, amizade, carinho, conselhos, puxões de orelha e paciência para me ajudar e por todo conhecimento.

À Ana Vici pelas incontáveis dicas e conversas, além da ajuda durante toda a parte de planejamento e análises dos experimentos.

Ao Jorge Betini por todo aprendizado e apoio para adaptação ao laboratório, além da obtenção e dos conhecimentos passados a respeito do lodo branco.

Ao Dr. Fernando Segato, à Dra. Liliane Ribeiro e à Paula Zaghetto de Almeida por toda ajuda e pelos fungos cedidos, que foram de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Christiane Nunes e à Dra. Eleni Gomes, da UNESP de São José do Rio Preto, por toda ajuda e disponibilidade com a obtenção e pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

À Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia, da FCFRP-USP, por toda dedicação e cuidado nas análises de HPLC.

À Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, da UFSCar, por ceder as leveduras para os testes fermentativos e ajuda na elaboração dos experimentos de fermentação

alcoólica.

Ao Prof. Dr. João Atílio por todas dicas e disponibilidade em me ajudar.

Aos amigos e companheiros de laboratório pela amizade, convivência e pela gentil ajuda para a conclusão deste trabalho, Aline, Ana Vici, Carol, Enrico, Jorge, Juliana, Luciana, Lummy, Marita, Monica, Paula, Paulo, Rosy e Vanessa.

Aos técnicos Ricardo, Mariana e Maurício pela amizade, colaboração e disponibilidade.

Às minhas amigas Letícia, Natália e Rafaella por todo apoio e paciência ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP pela bolsa concedida para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

SCARCELLA, A. S. A. Hidrólise e fermentação de resíduos celulósicos visando a produção de etanol. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2016.

Resíduos celulósicos por serem ricos em celulose e hemicelulose estão sendo apontados como promissoras fontes para a produção de etanol. Com isso, este trabalho tem como objetivo hidrolisar e fermentar resíduos celulósicos visando a produção de etanol. Para estudo da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, foram isolados 22 fungos da cidade de Araras-SP e estes testados para produção de endoglucanases (EG). Foram testadas temperatura e pH ótimos, diferentes tampões, estabilidade do coquetel e influência de sais, EDTA e β -mercaptoetanol para lacase, xilanase, endo- β -1,4-glucanase, celobiohidrolase I, β -glucosidase e glucoamilase. As condições padronizadas para aplicação do coquetel enzimático foi 55°C, tampão citrato de sódio 50 mM e pH 5,0. Para elaboração do coquetel enzimático foi realizado um Plackett-Burman seguido de um delineamento composto central rotacional, em que as condições padronizadas para aplicação foram (U/g de bagaço de cana-de-açúcar): 0,122 de lacase; 7 de xilanase; 5 de endoglucanase; 14 de celobiohidrolase e 9 de β -glucosidase. Foram liberados 4,405 μ mol de açúcares redutores por mL, após 48 horas de hidrólise do bagaço a 55°C, em tampão citrato de sódio 50 mM (7 mL), pH 5,0, agitação de 110 rpm. O hidrolisado obtido foi fermentado pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Meyerozyma guilliermondii* 311 (CCT7783), separadamente e em cultivo misto, averiguando a necessidade de suplementação do meio, para a produção de etanol. Os resultados mostraram a necessidade de suplementação para aumento da viabilidade das leveduras. Observou-se que a suplementação manteve a viabilidade acima de 90%. A fermentação com *Meyerozyma guilliermondii* 311 (CCT7783), sem a necessidade de suplementação, possibilitou a produção de 12,66% de etanol; com a *Saccharomyces cerevisiae* a produção de etanol foi de 7,03%, quando o meio foi suplementado com 3 g/L de extrato de levedura. A fermentação com cultura mista produziu 0,53% e 1,18% de etanol em 24 e 48 horas de cultivo, respectivamente. Para aplicação enzimática na hidrólise do lodo branco foram utilizadas amilase de *Aspergillus carbonarius* e celulase comercial. Os produtos de hidrólise enzimática do lodo branco detectados HPLC mostraram a formação de glicose, xilose e traços de maltose. A viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação se manteve bastante elevada, acima de 95 %. A fermentação do lodo branco, quando o meio foi suplementado com 3g/L de extrato de levedura, foi considerada satisfatória, com 2,37 g/L de etanol. Foram realizadas análise de superfície por ion-tof e microscopia eletrônica de varredura nos resíduos celulósicos. Desta maneira, com este trabalho foi possível estudar a importância da aplicação de enzimas fúngicas para degradação de biomassa lignocelulósica para produção de etanol de segunda geração.

Palavras-chaves: coquetel enzimático, bagaço de cana-de-açúcar, lodo branco, bioetanol.

ABSTRACT

SCARCELLA, A. S. A. Hydrolysis and fermentation of cellulosic residues aiming the ethanol production. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2016.

As cellulosic wastes are rich in cellulose and hemicellulose they have been pointed as promising sources for ethanol production. Thereby, this work aimed to hydrolyze and ferment cellulosic residues to produce ethanol. In order to study the hydrolyzes of sugar-cane bagasse and ferment the sugars obtained from this process, twenty-two fungi were isolated in the city of Araras-SP and tested for endoglucanase (EG) production. Aiming to optimize an enzyme cocktail, variables as temperature, optimum pH, different buffers, stability, salt influence, EDTA and β -mercaptoethanol were tested for laccase, xylanase, endo- β -1,4-glucanase, cellobiohydrolase I, β -glucosidase and glucoamylase. The standard conditions for applying the enzyme cocktail were 55°C, sodium citrate buffer 50 mM pH 5.0. For the preparation of the enzyme cocktail a Plackett-Burman was made followed by a central composite design, in which the standard conditions for application were (U/g of sugarcane bagasse): 0.122 of laccase; 7 of xylanase; 5 of endoglucanase; 14 of cellobiohydrolase and 9 of β -glucosidase per gram of sugarcane bagasse. After 48 hours of hydrolyzes in the following conditions, 55°C, sodium citrate buffer 50 mM (7 mL), pH 7.0, 110 rpm, 4.405 μ mol of reducing sugar per mL were released. The hydrolyzate obtained was separately fermented by the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, *Meyerozyma guilliermondii* 311 (CCT7783) and with both yeasts in a mixed cultivation, in order to investigate the need of medium supplementation for ethanol production. The results showed the need of supplementation to increase the viability of the yeasts. It was observed that this procedure kept the viability over 90%. The fermentation with *Meyerozyma guilliermondii* 311 (CCT7783), without supplementation, allowed the production of 12.66% of ethanol and with *Saccharomyces cerevisiae* the production was 7.03% with a supplementation of 3 g/L of yeast extract. The fermentation with mixed cultivation produced 0.53% and 1.18% in 24 and 48 hours of cultivation, respectively. Another objective of this work was the hydrolysis of paper sludge which was obtained by using amylases from *Aspergillus carbonarius* and commercial cellulases. The products of enzymatic hydrolysis of the white sludge detected in HPLC showed the formation of glucose, xylose and maltose traits. Cell viability counting of the yeast, analyzes of pH, reducing sugar and alcohol content were carried out. Cellular viability of *Saccharomyces cerevisiae* along the fermentation was kept over 95%. Paper sludge fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*, in medium supplemented with yeast extract 3 g/L, was considered satisfactory, showing 2.37 g/L of ethanol. Surface analysis was performed by Ion-tof and scanning electron microscopy in the cellulosic waste. Thus, this work made possible to study the importance of fungal enzymes application in lignocellulosic biomass degradation for the production of second generation ethanol.

Keywords: enzyme cocktail, sugarcane bagasse, paper slugde, bioethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da biomassa lignocelulósica.	4
Figura 2. Molécula da lignina, simulação da estrutura e das possíveis ligações.	10
Figura 3. Fenilpropanóides constituintes da lignina.	10
Figura 4. Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana.	12
Figura 5. Estrutura do xiloglucano.	13
Figura 6. Estrutura química da celulose.	14
Figura 7. Enzimas envolvidas na hidrólise da celulose	16
Figura 8. Estrutura química da (a) amilose e (b) amilopectina	18
Figura 9. Hidrólise do amido por diferentes amilases com diferentes especificidade	19
Figura 10. Esquema da produção de etanol 1G e 2G.	20
Figura 11. Fungos isolados de solo e casca de árvores da cidade de Araras-SP....	50
Figura 12. A. Atividade endoglucanásica dos fungos isolados testada a 40°C e pH 5,0. B. Proteína presente nos extratos brutos.	52
Figura 13. Produção de B-glucosidase por fungos.....	52
Figura 14. Efeito da temperatura nas enzimas em estudo..	55
Figura 15. Correlação das atividades enzimáticas em função das temperaturas testadas.....	56
Figura 16. Efeito do pH nas enzimas estudadas	59
Figura 17. Correlação das atividades enzimáticas em função dos pH testados.....	60
Figura 18. Tampões testados nas condições padronizadas para o coquetel enzimático.	62
Figura 19. Estabilidade enzimática nas condições padronizadas para aplicação do coquetel.....	64

Figura 20. Diagrama de Venn mostrando a correlação entre inibidores (A) e ativadores (B) das atividades em estudo.....	69
Figura 21. Indução da expressão das enzimas recombinantes por maltose e xarope de milho produzidas em função do tempo de cultivo.....	74
Figura 22. Cultivo em fermentador CelliGen 310 Benchtop BioReactor de <i>A. nidulans</i> transformado com o gene das enzimas estudadas.. ..	76
Figura 23. Expressão de xilanase (A); celobiohidrolase (B) e endoglucanase (C) em fermentador CelliGen 310 Benchtop BioReactor.....	78
Figura 24. Cromatografia de camada delgada (TLC) da liberação de AR após 6 horas de hidrólise enzimática dos diferentes bagaços de cana-de-açúcar a 55°C, pH 5,0 e sob agitação de 100 rpm.....	81
Figura 25. Espectrometria de massa com polaridade positiva para: A. bagaço in natura; B. bagaço pré-tratado.....	84
Figura 26. Espectrometria de massa com polaridade negativa para: A. bagaço in natura; B. bagaço pré-tratado.....	85
Figura 27. Microscopia com polaridade positiva para: A. bagaço <i>in natura</i> . B. bagaço pré-tratado.....	86
Figura 28. Microscopia com polaridade negativa para: A. bagaço <i>in natura</i> . B. bagaço pré-tratado.....	87
Figura 29. Superfície de resposta obtida através do modelo reduzido calculado a partir de um DCCR.	94
Figura 30. Liberação de AR em função do tempo de hidrólise.	95
Figura 31. Efeito de diferentes concentrações de glucose na ação da β -glucosidase.	96
Figura 32. Consumo de AR pelas leveduras	99

Figura 33. Efeito do tipo de cultivo sobre o pH ao longo das 96 horas de fermentação.	
.....	100
Figura 34. Análise do crescimento das leveduras durante a fermentação.	102
Figura 35. Espectrometria de massa do lodo branco: A. polaridade positiva; B. polaridade negativa.	109
Figura 36. Microscopia do lodo: A. polaridade positiva; B. polaridade negativa.	110
Figura 37. Análise de HPLC para verificar a presença de diferentes açúcares no hidrolisado proveniente do lodo branco.	112
Figura 38. Microscopia eletrônica de varredura de amostras de lodo branco.	113
Figura 39. Consumo de AR de hidrolisado de lodo branco, fermentado por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	114
Figura 40. Resultados de pH durante a fermentação do lodo branco.	115
Figura 41. Resultados de viabilidade celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-02.	116
Figura 42. Resultados de produção de etanol durante fermentação do lodo hidrolisado por 96 horas.	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise bromatológica de amostra de lodo branco.	39
Tabela 2. Valores experimentais para os ensaios do Plackett-Burman 12 para selecionar as enzimas para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.	41
Tabela 3. Valores experimentais para os ensaios de delineamento composto central rotacional para a otimização do coquetel enzimático	42
Tabela 4. Material coletado, local da coleta e fungos isolados de cada amostra.....	50
Tabela 5. Tempo de meia da vida das enzimas para aplicação do coquetel enzimático	65
Tabela 6. Efeito de sais, EDTA e β -mercaptoetanol nas atividades das enzimas. ...	68
Tabela 7. Detecção das enzimas presentes nos extratos brutos do coquetel.	71
Tabela 8. Composição da fração sólida do bagaço de cana e liberação de açúcares redutores (AR).....	80
Tabela 9. Plackett-Burman para selecionar as enzimas para elaboração do coquetel enzimático.	89
Tabela 10. Estimativa dos efeitos das variáveis por Plackett-Burman.....	90
Tabela 11. Planejamento experimental para a liberação de AR usando DCCR 2 ⁴ ...	91
Tabela 12. Anova para o Planejamento Experimental (MS residual).....	92
Tabela 13. Validação do coquetel enzimático elaborado.	95
Tabela 14. Porcentagem de polímero de alta massa molecular ao longo da fermentação.	103
Tabela 15. Análise dos açúcares e produção de etanol ao longo da fermentação.	105
Tabela 16. Liberação AR sob diferentes tratamentos enzimáticos aplicados ao lodo branco.	112

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AR: açúcar redutor

B-glu: β -glucosidase

CBH: Celobiohidrolase

CBM: Carbohydrate binding module

DMSO: Dimetilsulfóxido

EC: Enzyme commission number

EDTA: Etilenodiaminotetraacetato

EG: endoglucanase

g: Grama

GH: Glicosil hidrolases

GIA: glucoamilase

kDa: Kilodaltons

Lac: lacase

M: Molar

mL: Mililitros

rpm: Rotações por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

Temed: Tetrametiletilenodiamina

p/v: Peso por volume

V: Volts

pH: Potencial hidrogeniônico

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

μ g: Microgramas

μ L: Microlitros

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	VII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	3
1.1.1. Bagaço de cana-de-açúcar	5
1.1.2. Lodo branco	6
1.2. PAREDE CELULAR DAS PLANTAS	9
1.2.1. Lignina e o complexo lignolítico.....	9
1.2.2. Hemicelulose e o complexo xilanolítico	11
1.2.3. Celulose e complexo celulolítico	14
1.2.4. Amido e as amilases	17
1.3. PRODUÇÃO DE ETANOL	19
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. OBJETIVO GERAL	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS	26
3.2. MANUTENÇÃO DAS CEPAS	26
3.2. SCREENING DE FUNGOS CELULOLÍTICOS.....	27

3.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	28
3.4. OBTENÇÃO DO COQUETEL ENZIMÁTICO PARA APLICAÇÃO NO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	28
3.4.1. Enzimas recombinantes	28
3.4.1.1. <i>Xilanase</i>	29
3.4.1.2. <i>Endo-β-1,4-glucanase</i>	29
3.4.1.3. <i>Celobiohidrolase I</i>	29
3.4.2. Glucoamilase.....	29
3.4.3. β -glucosidase	30
3.4.4. Lacase.....	30
3.5. OBTENÇÃO DAS ENZIMAS PARA APLICAÇÃO NO LODO BRANCO	31
3.6. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	31
3.7. CARACTERIZAÇÃO DO COQUETEL ENZIMÁTICO PARA APLICAÇÃO NO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	34
3.7.1. Temperatura ótima	34
3.7.2. pH ótimo	34
3.7.3. Influência do sistema tamponante nas atividades enzimáticas	34
3.7.4. Estabilidade à temperatura e ao pH para aplicação do coquetel enzimático ..	35
3.7.5. Efeito de sais, EDTA e β -mercaptoetanol nas atividades enzimáticas.....	35
3.7.6. Detecção das enzimas extracelulares nos extratos brutos do coquetel enzimático por método semi quantitativo	36
3.8. PRODUÇÃO DAS ENZIMAS RECOMBINANTES	36
3.8.1. Produção em fermentador CelliGen 310 Benchtop BioReactor de 5 litros	36
3.8.1. Caracterização do perfil de proteínas em gel de eletroforese (SDS-PAGE) ...	37
3.9. RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	38

3.9.1. Bagaço de cana-de-açúcar	38
3.9.2. Lodo Branco	38
3.10. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	39
3.10.1. Bagaço de cana-de-açúcar	39
3.10.1.1. <i>Seleção do bagaço exposto a diferentes pré-tratamentos</i>	39
3.10.1.1.1. <i>Tratamento enzimático dos bagaços de cana-de-açúcar</i>	39
3.10.1.1.2. <i>Determinação dos açúcares do hidrolisado em TLC</i>	40
3.10.1.2. <i>Otimização do coquetel enzimático para hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H₂SO₄ 0,05M</i>	40
3.10.1.2.1. <i>Screening das enzimas do coquetel por Plackett-Burmann</i>	40
3.10.1.2.2. <i>Otimização das enzimas selecionadas por delineamento experimental e design de superfície de resposta</i>	41
3.10.2. Lodo Branco	43
3.11. TESTE DE FERMENTAÇÃO COM HIDROLISADO	43
3.11.1. Bagaço de cana-de-açúcar	43
3.11.1.1 <i>Preparo do inóculo</i>	43
3.11.1.2. <i>Teste fermentativo</i>	44
3.11.2. Lodo Branco	44
3.11.2.1. <i>Preparo do inóculo</i>	44
3.11.2.2. <i>Teste fermentativo</i>	45
3.11.3. Contagem e viabilidade celular	45
3.11.4. Plaqueamento dos testes com culturas mistas	46
3.11.5. pH	46
3.11.6. Açúcares Redutores (AR)	46
3.11.7. Teor Alcoólico	47

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO48**PARTE I: ELABORAÇÃO DE COQUETEL ENZIMÁTICO PARA HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA.....49**

4.1. ISOLAMENTO E SCREENING DE FUNGOS CELULOLÍTICOS.....50

4.2. CARACTERIZAÇÃO DO COQUETEL ENZIMÁTICO53

4.2.1. Temperatura ótima53

4.2.2. pH ótimo57

4.2.3. Influência do sistema tamponante nas atividades enzimáticas61

4.2.4. Estabilidade à temperatura e ao pH para aplicação do coquetel enzimático ..62

4.2.5. Efeito de sais, EDTA e β -mercaptoetanol nas atividades enzimáticas.....65

4.2.5. Detecção das enzimas extracelulares nos extratos brutos do coquetel enzimático por método semi quantitativo70

4.3. PRODUÇÃO DAS ENZIMAS RECOMBINANTES72

4.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA SELEÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS79

4.5. ANÁLISE DE SUPERFÍCIE POR ION-TOF DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR81

4.6. SELEÇÃO DAS ENZIMAS PARA ELABORAÇÃO DO COQUETEL POR MEIO DE PLACKETT-BURMAN88

4.7. OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS SELECIONADAS PARA O COQUETEL ENZIMÁTICO90

4.8. TESTES FERMENTATIVOS DO HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL.....97

PARTE II: HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO DO LODO BRANCO PROVENIENTE DA

INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE	107
4.9. ANÁLISE DE SUPERFÍCIE POR ION-TOF DO LODO BRANCO.....	108
4.10. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO LODO BRANCO.....	111
4.11. TESTES FERMENTATIVOS DO HIDROLISADO DE LODO BRANCO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL	113
5. CONCLUSÃO	118
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
ANEXOS	118

1. INTRODUÇÃO

A dependência de fontes de energia não renováveis e altamente poluentes tem levado a sociedade a buscar alternativas para a utilização de combustíveis renováveis, que tem como vantagem o fato de a combustão do etanol levar a uma menor emissão de CO₂, quando comparado ao uso de combustíveis fósseis. Os resíduos celulósicos por serem ricos em celulose e hemicelulose estão sendo apontados como promissoras fontes para a produção de etanol.

A produção de celulose, no Brasil, é essencialmente de espécies de eucalipto de florestas plantadas, localizadas principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Bahia, Pará e Maranhão. A indústria brasileira de celulose, em 2008, teve uma grande conquista: alcançou o posto de quarto produtor mundial de celulose, atrás apenas de Estados Unidos, Canadá e China. O recorde foi obtido em um período adverso, durante a crise financeira internacional. A posição foi mantida em 2010, quando o setor produziu 14 milhões de toneladas de celulose (BRACELPA, 2013).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, esta cultura ocupa quase todos os estados brasileiros e cerca de 9% da superfície agrícola do país, sendo o terceiro cultivo mais importante em superfície cultivada, depois da soja e do milho (BNDES; CGEE, 2008).

A produção de bioetanol pode fornecer uma maior proporção de abastecimento de combustível de forma sustentável, acessibilidade e maiores benefícios ambientais através da utilização de biomassa residual não alimentar como resíduos agrícolas, resíduos de alimentos e resíduos industriais. As matérias-primas mais comuns para produção de bioetanol, além da cana-de-açúcar, são: milho, trigo, mandioca, beterraba açucareira e sorgo sacarino (BNDES; CGEE, 2008).

1.1. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica representa uma promissora fonte de matéria-prima para a produção de etanol por meio da bioconversão, visto que a maioria desta biomassa é formada por resíduo agroindustrial (CARNEIRO, 2011), como o bagaço de cana-de-açúcar e o lodo branco proveniente de indústria de papel e celulose. Os resíduos lignocelulósicos são considerados uma das principais fontes de matéria orgânica do planeta, apresentando como vantagem a facilidade de obtenção e grande abundância na natureza (MONTE, 2009).

Os materiais lignocelulósicos consistem, principalmente, de três diferentes tipos de polímeros chamados de celulose, hemicelulose e lignina, que estão associados entre si (**Figura 1**). A celulose é um polímero linear que está presente em maior proporção na biomassa vegetal, sendo o principal constituinte da parede celular. A hemicelulose consiste em cadeias ramificadas de açúcares com baixa massa molecular. Lignina é uma macromolécula polifenólica de grande estabilidade, e que representa uma barreira de proteção contra o ataque de micro-organismos (LISPERGUER; PEREZ; URIZAR, 2009).

Figura 1. Estrutura da biomassa lignocelulósica (POTTERS; GOETHEM; SCHUTTE, 2010).

Algumas ferramentas podem ser utilizadas para análise do resíduo celulósico, como por exemplo a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a análise de superfície por Íon-Tof.

A microscopia eletrônica é uma técnica que utiliza elétrons, em vez de fótons, para a visualização de células e estruturas celulares. Na MEV, o espécime é recoberto com uma fina camada de um metal pesado. O feixe de elétrons do MEV realiza a varredura percorrendo o espécime para frente e para trás. Os elétrons dispersos pelo

metal são coletados, ativando um écran que gera uma imagem, denominada micrografia eletrônica (MADIGAN *et al.*, 2010).

O ion-tof consiste é uma técnica analítica de superfície muito sensíveis, bem estabelecida para muitas aplicações de investigação e industriais. Ele fornece informações elementar e molecular detalhada sobre superfícies, camadas finas, interfaces e análise tridimensional completo das amostras. Para a análise de ion-tof, uma superfície de amostra sólida é bombardeada com um feixe pulsado de íons primários. Em seguida, os íons atômicos e moleculares são emitidos e extraídos a partir das camadas mais externas da superfície, sendo sua massa medida por seu tempo de voo para o detector. Este ciclo repete-se em alta frequência para gerar o espectro de massa completo com alta dinâmica (TOF-SIMS 5, 2015).

1.1.1. Bagaço de cana-de-açúcar

O interesse econômico em cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) aumentou significativamente nos últimos anos devido ao aumento da demanda mundial para a produção de energia sustentável. No Brasil, o cultivo de cana de açúcar está concentrado na região sudeste, que é responsável por aproximadamente 70% da produção nacional de cana (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011). Atualmente, o Brasil é o maior produtor de cana do mundo, com uma produção de 571 milhões de tonelada na safra de 2014/2015, na região centro-sul do país (UNICA, 2015).

O objetivo do processamento industrial da cana é a obtenção altamente purificada de açúcar e etanol. Na safra de 2014/2015, a produção de açúcar foi 55,99 Kg por tonelada de cana, enquanto que a produção de etanol foi de 45,76 litros por

tonelada de cana processada (UNICA, 2015). Os subprodutos gerados pelo setor suco energético são a vinhaça, que consiste em uma suspensão de sólidos e substâncias orgânicas e minerais, e o bagaço, que é um resíduo lignocelulósico (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011).

O bagaço de cana-de-açúcar, segundo BORTOLAZZO (2011), é o resíduo agroindustrial obtido em maior quantidade no Brasil, em torno de 290 kg por tonelada moída. É constituído, aproximadamente, por 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina.

Nas usinas este subproduto do processamento da cana é queimado para a geração de energia. No entanto, o bagaço também pode ser usado como matéria-prima para a produção de etanol.

Para uma hidrólise efetiva do bagaço, é necessário um pré-tratamento que possibilita melhorar sua digestibilidade e facilitar o acesso para o ataque microbiano, já que os materiais lignocelulósicos não contêm monossacarídeos prontamente disponíveis para bioconversão. Em vez disso, eles contêm polissacarídeos, que têm de ser hidrolisados por meio de ácidos ou de enzimas, em açúcares fermentáveis, como pentoses e hexoses (CARDONA QUINTERO, PAZ, 2010). Sendo assim, seria necessário desenvolver uma tecnologia para produção econômica destas enzimas, além de melhorar a condição de hidrólise (PANDEY *et al.*, 2000).

1.1.2. Lodo branco

Na indústria de papel, mais especificamente nas áreas onde se localiza a máquina de papel, ocorre a geração de um resíduo que é constituído por restos de matérias-primas que são perdidas no processo de fabricação do mesmo. Esta perda

é acumulada no chamado efluente de máquina de papel, sendo necessário o tratamento deste para remoção de matéria orgânica e produtos químicos.

Indústrias que fabricam papel branco e que separam o efluente de máquina de papel dos demais efluentes de outras áreas a serem tratados, geralmente obtêm um lodo de coloração que varia de um tom cinza claro a um branco gelo.

Sendo assim, acredita-se que o lodo branco é uma das matérias-primas mais promissoras para aplicação comercial a curto prazo. O lodo branco é resíduo sólido decorrente da produção da pasta de madeira e operações das fábricas de papel. A disposição final do lodo é vista como um problema de eliminação substancial para a indústria de papel, já que representa um custo significativo para muitas fábricas (FAN *et al.*, 2003).

Este resíduo contém, tipicamente, em torno de 25 a 75% de carboidratos com equilíbrio de lignina, agentes de enchimento e argilas inertes. Os componentes minerais mais importantes são o CaCO_3 (usado para revestimento ou material de enchimento) e TiO_2 (usado para o branqueamento) (LYND *et al.*, 2001). A hidrólise enzimática de lodo branco tem sido ineficaz devido à ligação inativa da celulase por causa da presença de CaCO_3 , que diminui a digestibilidade enzimática do resíduo de fibra de celulose, resultando baixos rendimentos de hidrólise (CHEN *et al.*, 2012; GURRAM *et al.*, 2015).

A viabilidade de recuperação biotecnológica deste substrato, potencialmente atrativo, requer a conversão de seus componentes principais em açúcares fermentescíveis que, posteriormente, podem ser convertidos em produtos químicos e combustíveis, como o etanol (MARQUES *et al.*, 2008).

A produção de bioetanol do lodo branco pode reduzir a dependência de combustíveis fósseis e, simultaneamente, resolver os problemas ambientais

associados com a eliminação do resíduo (PRASETYO *et al.*, 2011). Sendo assim, a produção de etanol por biomassa lignocelulósica é de interesse devido a contribuição positiva na questão da sustentabilidade e segurança energética (ZHAN *et al.*, 2009).

Em contraste com praticamente todos os materiais celulósicos nativos, uma fração significativa do lodo não necessita de pré-tratamento para produção de etanol, obtendo um rendimento perto do teórico que é alcançado por meio da hidrólise enzimática (LYND *et al.*, 2001).

LARK *et al.* (1997) relatou a produção de 32 e 35 g/L de etanol através de 180 g/L e 190 g/L de lodo branco, respectivamente, em frascos com 250 mL operados em batelada. MARQUES *et al.* (2008) obteve 19,6 g/L de etanol em 179 horas pelo método de hidrólise e fermentação separadas e 18,6 g/L de etanol em 48 horas a partir de 178,6 g/L de lodo seco por sacarificação e fermentação simultâneas.

O lodo de papel apresenta certas vantagens sobre outras matérias-primas para a produção de etanol, sendo elas: i) lodo de papel é produzido em local concentrado e permanente de produção, tornando o abastecimento de lodo fácil praticamente sem qualquer custo, considerando que o custo de eliminação deste resíduo é de US\$ 20 por tonelada úmida; ii) a utilização do lodo para a produção de etanol desvia materiais depositados em aterro, evitando assim custos de transporte e investimentos no aterro; iii) este resíduo possui pouca lignina presente, sendo assim não há necessidade de pré-tratamento, que reduz significativamente o custo de produção de etanol (CHEN *et al.*, 2014; KANG; WANG; LEE, 2010).

1.2. PAREDE CELULAR DAS PLANTAS

1.2.1. Lignina e o complexo lignolítico

A lignina faz parte da constituição da parede celular, apresenta natureza polimérica e tridimensional, sendo extremamente complexa (**Figura 2**). É constituída de unidades de fenilpropano unidas por ligações C-O-C e C-C e com diferentes teores de grupos alcóolicos e metoxílicos dependendo da madeira (KLOCK *et al.*, 2005). O acoplamento das unidades de fenilpropano não ocorre de forma regular e repetitiva, o que é atribuído ao mecanismo de biossíntese pela polimerização de três diferentes monômeros (**Figura 3**): o álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (FERRAZ, 2004; BON, GÍRIO, PEREIRA JR, 2008).

A lignina é responsável por proteger os polissacarídeos da parede celular da planta da degradação microbiana, conferindo assim resistência à deterioração. Além disso, também é um dos fatores mais importantes em relação a limitação na conversão de biomassa lignocelulósica a biocombustíveis, já que a remoção da lignina é um processo dispendioso (VANHOLME *et al.*, 2010).

Figura 2. Molécula da lignina, simulação da estrutura e das possíveis ligações (KLOCK *et al.*, 2005).

Figura 3. Fenilpropanóides constituintes da lignina (Adaptado de GONÇALVES, 2010).

O processo de biodegradação da lignina é um evento oxidativo que demanda um complexo sistema enzimático de baixa especificidade (BON, GÍRIO, PEREIRA JR, 2008). Sendo assim, as principais enzimas envolvidas nesse processo são: lignina

peroxidase, manganês peroxidase e lacase.

A lignina peroxidase (EC 1.11.1.14) é considerada um dos componentes chave do sistema lignolítico, devido ao seu alto potencial redox capaz de oxidar os compostos aromáticos não fenólicos. Esta enzima requer peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para a oxidação do álcool à veratraldeído (CARVALHO, 2004).

As manganês peroxidases (EC 1.11.1.13) são heme proteínas extracelulares e glicosiladas sendo encontradas apenas entre fungos basidiomicetos. Assemelham-se à lignina peroxidase, entretanto, além de H_2O_2 , requerem íons Mn^{2+} (CARVALHO, 2004; GONÇALVES, 2010).

As lacases (EC 1.10.3.2) catalisam a oxidação de substratos fenólicos ou aminas aromáticas para formar produtos distintos através de diferentes vias. Estas enzimas são fenoloxidasas que possuem um íon Cu^{2+} em seu sítio ativo, possibilitando a remoção do fenil-propano mais externo à cadeia (NAGAI *et al.*, 2002)

1.2.2. Hemicelulose e o complexo xilanolítico

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo composto por diferentes proporções de monossacarídeos de D-xilose, D-manose, D-galactose e L-arabinose (POLIZELI *et al.*, 2005; HUMAR, SINGH, SINGH, 2008). A hemicelulose tem peso molecular menor que a celulose e ramos de cadeias laterais que consistem em diferentes açúcares (FENGEL; WEGENER, 1984).

A xilana, principal heteropolissacarídeo das hemiceluloses, é composta por resíduos de β -D-xilanopiranosil, unidos por ligações β -1,4 glicosídicas (POLIZELI *et al.*, 2011).

A hidrólise completa da hemicelulose requer a participação de enzimas

responsáveis pelas clivagens das cadeias principais e laterais (**Figura 4**). A conversão enzimática de xilana a seus componentes poliméricos necessita a participação sinérgica de várias enzimas (FERREIRA FILHO, 2004).

Figura 4. Enzimas xilanólíticas envolvidas na degradação da xilana (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

As principais enzimas xilanólíticas são as endo-β-1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) e as β-D-xilosidades (EC 3.2.1.37). As endo-β-1,4-xilanases são responsáveis por clivar ligações glicosídicas internas da cadeia principal da xilana, levando a uma diminuição do grau de polimerização do substrato, tendo como principais produtos os xilooligossacarídeos (POLIZELI *et al.*, 2011).

As β-D-xilosidades clivam substratos sintéticos, como p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo e o-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo, no entanto é também capaz de clivar a xilobiose, aumentando assim a eficiência da hidrólise da xilana (POLIZELI *et al.*, 2005; POLIZELI *et al.*, 2009).

Além destas enzimas, existem outras que participam do processo de degradação da xilana, como a: (i) α-glucuronidase (EC 3.2.1.139), que hidrolisam as ligações α-1,2 entre ácido glucurônico e resíduos de xilose na glucuronoxilana; (ii) acetilesterases (E.C. 3.1.1.6), que remove os substituintes O-acetil a partir da posição

C-2 ou C-3 dos resíduos de xilose na acetilxilana; (iii) α -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), libera monômeros terminais de arabinose a partir de oligo- e polissacarídeos e é ativa sob *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo; e (iv) feruloil esterase (EC 3.1.1.73) e ácido *p*-cumárico esterase (EC 3.1.1.) cliva ligações éster na xilana, respectivamente, entre as cadeias laterais de arabinose e do ácido ferúlico, e entre arabinose e ácido *p*-cumárico (DE LUCAS, 2013).

Além da xilana, outro importante polissacarídeo hemicelulósico é o xiloglucano, presente nas paredes celulares primárias das plantas superiores. Xiloglucano (XG) está intercalado com as microfibrilas de celulose por meio da ligação de hidrogênio, fornecendo assim a rede de suporte da parede celular, protegendo-a de entrar em colapso devido ao estresse osmótico (BENKÖ *et al.*, 2008).

Este polímero é constituído por uma cadeia principal linear de ligações β -1,4-glucano, mas distingue-se por ter até 75% de glucose ligado de forma covalente a resíduos de xilose na posição de O-6. Além disso, dependendo da fonte de xiloglucano, alguns resíduos de xilose podem ser ligados à galactose, e alguns resíduos de galactose podem ser ligados com fucose (**Figura 5**) (CARPITA; McCANN, 2000). De modo geral, 60-75% dos resíduos de glucose são ramificados com xilose (BENKÖ *et al.*, 2008).

Figura 5. Estrutura do xiloglucano (BUCKERIDGE, SOUZA, 2014).

A hidrólise de XG é catalisada por xiloglucanase específica ou endoglucanases XG-específico que representa uma nova classe de enzimas degradantes de polissacarídeos que podem hidrolisar a espinha dorsal de resíduos de glucose substituídos (MENON; PRAKASH; RAO, 2010).

1.2.3. Celulose e complexo celulolítico

A celulose, principal fonte de carbono renovável na natureza, é um polímero linear composto por subunidades de D-glucose unidos por ligações glicosídicas β -1,4, formando dímeros de celobiose (**Figura 6**). Estes dímeros de celobiose formam longas cadeias ligadas entre si por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals (SANCHÉZ, 2009).

As cadeias de celulose são orientadas em paralelo e formam domínios cristalinos altamente organizados, intercalados por regiões mais desorganizadas, as estruturas amorfas (POLIZELI *et al.*, 2011).

Figura 6. Estrutura química da celulose (ZHANG e LYND, 2004).

A degradação da celulose ocorre pelo complexo celulolítico causando a hidrólise desta molécula até glucose (**Figura 7**). A celulase é um complexo que envolve a ação sinérgica de três tipos de enzimas: (i) as endo-glucanases (EC 3.2.1.4), que clivam ligações β -1,4-glicosídicas intramoleculares, e sua atividade é frequentemente determinada sob uma cadeia de celulose com alto grau de polimerização, como carboximetilcelulose (CMC), (ii) as exo-glucanases (E.C. 3.2.1.176, CBHI; EC 3.2.1.91, CBHII), que clivam as extremidades acessíveis da molécula de celulose liberando celobiose, a celobiohidrolase I (CBHI), é responsável pela hidrólise das ligações β -1,4-glicosídicas em celobiose e celotetraose a partir da extremidade não redutora da celulose, a celobiohidrolase II (CBHII) é capaz de clivar a ligação β -1,4-glicosídicas a partir da extremidade redutora da celulose, liberando celobiose (SEGATO *et al.*, 2014), e (iii) as β -glucosidases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam celobiose e outras celodextrinas, com grau de polimerização de até 6, liberando glucose (ZHANG; LYND, 2004).

Além disso, existem enzimas acessórias como a lítica polissacarídeo monooxigenase cobre dependente (GH61), capaz de clivar a cadeia de celulose por meio de um processo oxidativo em carbono-1 (C_1 GH61) e carbono-4 (C_4 GH61), e a celobiose dehidrogenase (CDH), que oxida a celobiose à celobiolactona na presença de um receptor de elétrons (SEGATO *et al.*, 2014).

Figura 7. Enzimas envolvidas na hidrólise da celulose: endoglucanase (EG); celobiohidrolase I e II (CBH I e CBH II) ligadas a um CBM (Carbohydrate Binding Module); β -glucosidase; lítica polissacarídeo monooxigenase (C_1GH61 e C_4GH61) e celobiose dehidrogenase (CDH). (•) Molécula de glucose que sofreu um processo oxidativo para ação enzimática (HORN *et al.*, 2012).

Além do domínio catalítico (CD), muitas glicosil hidrolases incluem um domínio de ligação ao carboidrato (“Carbohydrate Binding Module” – CBM) adicional, capaz de auxiliar o reconhecimento e a ligação do polissacarídeo, aumentando a concentração da enzima na superfície do substrato e, assim, melhoram a taxa de hidrólise (FURTADO *et al.*, 2015).

Estas enzimas são produzidas por diversas bactérias e fungos, sendo

Trichoderma e *Aspergillus* os gêneros mais relatados. A celulase pode ser utilizada para a sacarificação de qualquer biomassa celulósica sem necessidade de qualquer pré-tratamento (PRASETYO; PARK, 2013).

1.2.4. Amido e as amilases

O amido é o principal carboidrato de reserva das plantas, sendo o segundo polímero mais abundante na natureza. Este carboidrato é uma mistura de dois polissacarídeos de elevada massa molecular (**Figura 8**): amilose, que é um polímero de cadeia linear constituído de unidades de D-glucose unidas por ligação $\alpha(1\rightarrow4)$; e amilopectina, que também é um polímero de D-glucose, que além de apresentar as ligações $\alpha(1\rightarrow4)$, possui ramificações com ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ a cada 17-26 resíduos de glucose (BON; GÍRIO; PEREIRA JR, 2008).

Figura 8. Estrutura química da (a) amilose e (b) amilopectina (CORRADINI *et al.*, 2005).

As enzimas capazes de degradar o amido (**Figura 9**) consistem em: (i) α -amilase (EC 3.2.1.1), age exclusivamente nas ligações α -1,4 presentes no interior da cadeia da amilose e da amilopectina liberando maltooligossacarídeos; (ii) β -amilase (EC 3.2.1.2), atua nas ligações α -1,4 das extremidades não redutoras da cadeia de amido liberando unidades de maltose; (iii) glucoamilase (EC 3.2.1.3), age tanto nas ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ quanto nas $\alpha(1\rightarrow6)$, sendo a última em menor intensidade, das extremidades não redutoras do amido liberando monômeros de glucose, além de atacar preferencialmente polissacarídeos de alta massa molecular, causando a completa conversão dos polímeros em glucose; (iv) isoamilase (EC 3.2.1.68), hidrolisa as ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ do amido em ramificações com no máximo três unidades de

glucose; e (v) pululanase (EC 3.2.1.41), amilase desramificante que age nas ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ do pululano (polissacarídeo linear composto por maltotrioses unidas por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$), liberando maltotrioses (PANDEY *et al.*, 2000).

Figura 9. Hidrólise do amido por diferentes amilases com diferentes especificidades (ANTRANIKIAN, 1992).

1.3. PRODUÇÃO DE ETANOL

A dependência de fontes de energia não renováveis e altamente poluentes tem levado a sociedade a buscar alternativas para a utilização de combustíveis renováveis, que tem como vantagem a uma menor emissão de CO₂. Desta maneira, a crescente procura por biocombustíveis tem motivado o uso de materiais lignocelulósicos como matéria-prima.

Entre os combustíveis alternativos (**Figura 10**), a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar consiste em moer a cana e, a partir do caldo extraído, fermentar os açúcares prontamente disponíveis. Este processo é chamado de etanol de primeira geração (1G). O processo de produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos é conhecido como etanol de segunda geração (2G). Quando comparada as duas formas de produção de etanol, a tecnologia 2G não é tão madura quanto a 1G, tornando-a menos viável economicamente (MACRELLI *et al.*, 2014).

Figura 10. Esquema da produção de etanol 1G e 2G.

A produção de etanol por biomassa lignocelulósica consiste, principalmente, em cinco etapas: pré-tratamento; hidrólise; fermentação; separação do produto e pós-tratamento da fração do líquido. A conversão de resíduos hemicelulósicos a açúcares monoméricos pode ser feita quimicamente por ácidos, ou enzimaticamente, pela adição de celulases (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009) e hemicelulases, sendo que o uso destas enzimas pode ser um dos principais obstáculos para a competitividade de custo do etanol (FAN; LYND, 2007).

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é crucial para assegurar bons rendimentos em açúcares a partir de polissacarídeos, já que promove a remoção parcial da lignina, quebra parcial ou total da hemicelulose e diminuição da fração da celulose cristalina (CARNEIRO, 2011). Sendo assim, o processo de pré-tratamento

tem por objetivo separar os carboidratos da matriz da lignina, minimizando a destruição química dos açúcares fermentecíveis requeridos para a produção de etanol (MIELENZ, 2001).

A hidrólise ácida normalmente é realizada por meio do uso de ácido sulfúrico, clorídrico ou nítrico, concentrados ou diluídos, por um período de 2 a 10 minutos. Com este tipo de tratamento há rendimento de 75 a 90 % em xilose. Outro método muito utilizado é o da hidrólise alcalina, que ocorre com a utilização de bases, como hidróxido de sódio ou cálcio. Neste processo o tempo de reação é de 2 minutos e apresenta menor rendimento (60 a 75 %) que a hidrólise ácida (BNDES; CGEE, 2008).

A sacarificação enzimática é vantajosa quando comparada ao método químico uma vez que é, por natureza, um processo mais específico e limpo. Desta maneira, por apresentar condições de operação mais suaves, há a redução da formação de compostos biológicos inibitórios (MARQUES *et al.*, 2008).

Para a produção de etanol de segunda geração, em que a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica é necessária a fim de produzir açúcares fermentáveis, a chave para o aumento da eficiência de hidrólise pode ser a compreensão da estrutura da parede celular das plantas. Segundo BUCKERIDGE *et al.* (2014), as paredes das plantas apresentam regiões de polímeros que interagem com outras cadeias de polímero, por exemplo, xiloglucano e celulose, de tal modo que endoglucanases não possam atacar as ligações glicosídicas. Sendo assim, há a necessidade de formulação de coquetéis enzimáticos eficientes, visto que a sinergia entre enzimas hidrolíticas leva em consideração que a estrutura dos polissacarídeos da parede celular pode desempenhar um papel importante nas propriedades cinéticas da reação de hidrólise (HORN *et al.*, 2012; MOHANRAM *et al.*, 2013; BUCKERIDGE *et al.*, 2014).

Segundo SHEN e AGBLEVOR (2011), existem dois modos de operação para

a produção de bioetanol de biomassa lignocelulósica: hidrólise e fermentação separadas; sacarificação e fermentação simultâneas. A eficiência do modo de operação para a produção de etanol pode ser avaliada usando dois indicadores: produtividade e rendimento do etanol produzido. Geralmente, a sacarificação e fermentação simultâneas apresentam maior produtividade, entretanto, para o rendimento ainda não há conclusão de qual processo é mais eficiente.

A fermentação alcoólica consiste na transformação dos açúcares do mosto ou do hidrolisado em etanol, gás carbônico e energia, devido a ação catalítica das leveduras. As pentoses são fermentadas por leveduras do gênero *Candida* e *Komagataella* (*Pichia*) enquanto que as hexoses são assimiladas por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (CARNEIRO, 2011). Sendo assim, a fermentação é um processo bioquímico decorrente da atividade das leveduras, que agem sobre diversos substratos orgânicos de forma a alterá-los e originar outras substâncias (BASSI, 2011).

Segundo MIELENZ (2001) um produtor ideal de bioetanol deveria ser capaz de fermentar todos os açúcares de biomassa, possuir uma boa resistência aos monômeros da lignina, etilo e outros subprodutos inibitórios, além de produzir uma combinação sinérgica de celulasas necessárias para a hidrólise da celulose total.

Segundo ANDRIETTA *et al.* (2007) citado por REIS (2011), as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* apresentam alta eficiência fermentativa, devido ao crescimento rápido, eficiente metabolização dos açúcares, habilidade na produção e consumo de etanol, tolerância a altas concentrações de etanol e baixos níveis de oxigênio.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um coquetel enzimático capaz de hidrolisar os componentes hemicelulósicos e celulósicos de resíduos agroindustriais visando a produção de etanol de segunda geração.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolamento de fungos filamentos e screening de potenciais produtores de enzimas celulolíticas;
2. Produção das enzimas do coquetel enzimático;
3. Determinar as condições de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar e do lodo branco;
4. Fermentação dos hidrolisados visando a produção de etanol.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

Para a bioprospecção de micro-organismos foram isolados fungos filamentosos coletados de solo de cana-de-açúcar e casca de árvores de locais da cidade de Araras-SP, no dia 30/01/2014. Os materiais coletados foram armazenados em tubos esterilizados. Todos os pontos de coleta foram georeferenciados por meio do uso do GPS - “Global Positioning Systems” etrex, Garmin, 12 canais, com as respectivas latitude, longitude, altitude e precisão do GPS anotadas, para consultas posteriores. Foi utilizado a ficha padrão para coleta e registro de micro-organismos, um material do projeto BIOTA/FAPESP (<http://www.sinbiota.cria.org.br>).

Amostras de 10 g do solo foram homogeneizadas com 90 mL de solução salina 0,85%. Seguida a homogeneização, foi realizada diluição seriada, das quais alíquotas de 100 µL foram plaqueadas em meio BDA, com adição de tetraciclina (500 mg/ 50 mL) e cloranfenicol (500 mg/ 50 mL), incubadas a 30°C por um período de 5 a 7 dias. Em seguida, foi realizado o processo de separação das diferentes cepas por observação macroscópica, quanto à coloração dos esporos, mudança de coloração do meio de cultura, morfologia, cor e textura das hifas.

3.2. MANUTENÇÃO DAS CEPAS

A manutenção rotineira das cepas em laboratório foi realizada em tubos estéreis contendo 5 mL de meio BDA. Repiques periódicos foram realizados e as cepas foram mantidas em estufa a 30°C, por aproximadamente sete dias, as quais em seguida, foram transferidas para geladeira, onde ficaram conservadas. A manutenção

de todo o acervo de fungos isolados foi realizada em sílica gel, onde uma suspensão de esporos foi preparada em 5 mL de solução de leite Molico desnatado (10g/100 mL de água destilada). Desta suspensão, aproximadamente 0,5 mL foram misturados a 6 g de silicagel branca 1-4 mm contida em tubos de ensaio (16 x 100 mm) vedados com rosca. Três tubos foram armazenados para cada cultura. Todos os passos foram conduzidos de forma asséptica.

Os fungos isolados também foram preservados em ultrafreezer. As cepas foram cultivadas em placa de Petri com meio sólido por cerca de 7 dias. Parte do micélio com meio de cultura foi recortado e colocado em criotubos, contendo glicerol 20% estéril e congelados a -80°C.

3.2. SCREENING DE FUNGOS CELULOLÍTICOS

A obtenção enzimática foi realizada em frasco Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio Segato Rizzatti (SR) (RIZZATTI *et al.*, 2001) suplementado com carboximetilcelulose (CMC) 1%. Os cultivos foram obtidos a partir dos micro-organismos isolados. Os esporos foram ressuspensos em 10 mL de água destilada estéril, em seguida foram contados em câmara de Neubauer (10^8 esporos/mL) e 1 mL desta suspensão foi inoculado nos frascos que, posteriormente, foram mantidos em incubadora sob agitação (100 rpm) ou estático a 30°C por 96 horas.

Para a seleção de fungo produtor de β -glucosidase foram obtidos cultivos a partir dos micro-organismos isolados: 2S6, 2S8 e 3S4. A obtenção enzimática foi realizada em frasco Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio Khanna (KHANNA *et al.*, 1995) suplementado com bagaço de cana-de-açúcar 1%. Os esporos foram

ressuspensos em 10 mL de água destilada estéril e 1 mL desta suspensão contendo 10^8 esporos foi inoculado nos frascos que, posteriormente, foram mantidos em incubadora sob agitação (100 rpm) a 30°C por 72 horas. A linhagem utilizada para produção de β -glucosidase (3S4 - *Aspergillus niger*) foi identificada por biologia molecular pela Luciana Ziotti, no laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da FFCLRP-USP, em parceria com o Hemocentro de Ribeirão Preto para o sequenciamento.

3.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

A análise de proteínas foi feita utilizando o reagente de Bradford (BioRad), que conforme as especificações do fabricante, 160 μ L do extrato enzimático foi incubado em temperatura ambiente com 40 μ L do reagente por 5 minutos. A absorbância foi lida em leitor de microplacas em comprimento de onda de 595 nm. A curva padrão foi realizada com soro albumina bovina nas concentrações de 0 a 0,1 mg/mL.

3.4. OBTENÇÃO DO COQUETEL ENZIMÁTICO PARA APLICAÇÃO NO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

3.4.1. Enzimas recombinantes

Os fungos transformantes, descritos abaixo, foram repicados em meio mínimo

(BARRATT *et al.*, 1965). Para a expressão das enzimas os mesmos foram cultivados em condições estáticas em meio mínimo líquido contendo maltose 5%, por 48 horas, à 37 °C.

3.4.1.1. Xilanase

O fungo utilizado foi *Aspergillus nidulans* A773 já transformado com um gene para xilanase da família GH 10 de *Malbranchea pulchella*, a cepa foi cedida por RIBEIRO (2014).

3.4.1.2. Endo- β -1,4-glucanase

O fungo utilizado foi *A. nidulans* A773 já transformado com um gene para celulase da família GH12 de *A. terreus*, cedido por SEGATO *et al.* (2014).

3.4.1.3. Celobiohidrolase I

O fungo utilizado foi *A. nidulans* A773 já transformado com um gene para celulase da família GH7 de *A. niveus*, cedido por SEGATO *et al.* (2012).

3.4.2. Glucoamilase

O fungo utilizado foi *A. brasiliensis*, mantido em meio BDA. As condições de cultivo, assim como a cepa foram cedidas por ALMEIDA (2015). A obtenção enzimática ocorreu em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio SR

(RIZZATTI *et al.*, 2001) suplementado com amido solúvel a 1%, em pH 6,5. Foram inoculados 10^5 esporos por mL de meio. Os frascos foram mantidos a 30°C, por 72 horas.

3.4.3. β -glucosidase

O fungo utilizado *A. niger* (3S4), isolado do solo da região de Araras-SP, foi mantido em meio BDA. A obtenção enzimática foi realizada em frasco Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio Khanna suplementado com bagaço de cana-de-açúcar 1%. Os esporos do isolado foram ressuspensos em 10 mL de água destilada estéril e 1 mL desta suspensão contendo 10^8 esporos foi inoculado nos frascos que, posteriormente, foram mantidos em incubadora sob agitação (100 rpm), a 30°C, por 72 horas.

3.4.4. Lacase

O fungo utilizado foi *Trametes versicolor*. A obtenção enzimática foi realizada em frasco Erlenmeyer de 1 L com 200 mL de meio MDT (ROY; ARCHIBALD, 1993) modificado. O fungo foi inoculado com 16 discos (± 1 cm diâmetro) de cultura pura obtidos através do crescimento do micélio em BDA, em placas de Petri (7 a 14 dias). Foram mantidos sob agitação (100 rpm) a 28°C, por 10 dias.

3.5. OBTENÇÃO DAS ENZIMAS PARA APLICAÇÃO NO LODO BRANCO

A obtenção da amilase foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio SR (Rizzatti *et al.*, 2001), suplementado com amido Reagen® 2%, como substrato, mantidos a 30 °C, por 96 horas. Os cultivos foram realizados com o micro-organismo *Aspergillus carbonarius* isolado na natureza por Jorge Betini deste mesmo laboratório. Após o cultivo os micélios foram filtrados em funil de Büchner e filtro de malha de aço 325 mesh e os filtrados livres de esporos e micélios foram mantidos a 5 °C para dosagens enzimáticas. A celulase utilizada neste trabalho foi comercial e, portanto, não houve cultivo para sua obtenção.

3.6. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

A determinação das atividades de: xilanase, endo- β -1,4-glucanase, celulase comercial e amilases foram realizadas pela formação e detecção de açúcares redutores (AR) a partir de seus substratos, descritos abaixo, através do método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS (MILLER, 1959). O branco foi realizado com a incubação do substrato e do tampão, sendo a enzima adicionada somente na fase de fervura do DNS. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas em comprimento de onda de 540 nm, utilizando-se para o cálculo uma curva padrão de glucose (1 mg/mL), para celulase e amilase, e de xilose (1 mg/mL) para a xilanase. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcar redutor, por minuto, nas condições de

ensaio.

Para a xilanase, a mistura de reação foi constituída de 25 μ L de xilana beechwood 0,5 %, 22,5 μ L de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 2,5 μ L de enzima diluída. Em seguida, a reação foi incubada em termociclador a 80 °C, por 10 minutos (RIBEIRO *et al.*, 2014).

Para a endo- β -1,4-glucanase, a mistura de reação foi constituída de 25 μ L de β -glucano 0,5 %, 22,5 μ L de tampão acetato de amônio 50 mM, pH 5,5 e 2,5 μ L de enzima. Em seguida, a reação foi incubada em termociclador a 50 °C, por 15 minutos (SEGATO *et al.*, 2014).

Para a celulase comercial, a mistura de reação foi constituída de 25 μ L de CMC 1%, 20 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e 5 μ L de enzima. Em seguida, a reação foi incubada em termociclador a 50 °C, por 30 minutos.

Para as amilases, a mistura de reação foi constituída de 25 μ L de amido Reagen® 1 %, 22,5 μ L de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,0 e 2,5 μ L de enzima diluída. Em seguida, a reação foi incubada em termociclador a 70°C, por 10 minutos. Em todos os ensaios enzimáticos, após a incubação foram adicionados 50 μ L de DNS e a mistura aquecida a 100 °C por 5 minutos.

As atividades da celobiohidrolase e da β -glucosidase foram determinadas pela clivagem de substrato sintético, p-nitrofenilcelobiosídeo (pNPC) e p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (pNPG), respectivamente, seguida de revelação da reação por intermédio da adição de carbonato de cálcio, como será descrito a seguir. O branco foi realizado com a incubação do substrato e do tampão, sendo a enzima adicionada somente após a adição do carbonato de sódio. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas em comprimento de onda de 410 nm, utilizando-se para o cálculo uma curva padrão p-nitrofenol. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como

a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor, por minuto, nas condições de ensaio.

Para a celobiohidrolase, a mistura de reação foi constituída de 25 μL de p-nitrofenilcelobiosídeo 18 mM, 10 μL de tampão acetato de amônio 50 mM, pH 5,0 e 15 μL de enzima. Em seguida, a reação foi incubada em termociclador a 55 $^{\circ}\text{C}$, por 5 minutos (SEGATO *et al.*, 2012). Após a incubação foram adicionados 50 μL de carbonato de sódio.

Para a β -glucosidase, a mistura de reação foi constituída de 25 μL de p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo 4 mM, 10 μL de tampão acetato de amônio 50 mM, pH 5,0 e 15 μL de enzima. Em seguida, a reação foi incubada em termociclador a 55 $^{\circ}\text{C}$, por 5 minutos. Após a incubação foram adicionados 50 μL de carbonato de sódio.

A determinação da lacase foi realizada empregando-se seringaldazina como substrato enzimático (SZKLARZ *et al.*, 1989). A mistura da reação foi composta de 0,6 mL de sobrenadante, 0,1 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0, 0,1 mL de água destilada e 0,1 mL de seringaldazina (0,1% em etanol). A oxidação da seringaldazina até quinona foi medida pelo aumento da absorbância a 525 nm, durante 5 minutos, em temperatura ambiente. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de seringaldazina por minuto, utilizando o $\epsilon_{525} = 65.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o ABTS oxidado (BOURBONNAIS; PAICE, 1988).

A atividade de lacase também foi determinada a 40 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos usando 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína) (ABTS) como substrato, em mistura contendo tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0, solução de ABTS a 0,03 % (p/v) e 0,1 mL da solução enzimática bruta para um volume final de 1 mL (BUSWELL *et al.*, 1995). A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm. Uma

unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto, utilizando o $\epsilon_{420} = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o ABTS oxidado (BOURBONNAIS; PAICE, 1988).

3.7. CARACTERIZAÇÃO DO COQUETEL ENZIMÁTICO PARA APLICAÇÃO NO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

3.7.1. Temperatura ótima

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi analisado nas condições de ensaio especificadas no item 3.6 para cada enzima, utilizando-se a faixa de temperatura de 40 - 75°C, com intervalo de 5°C entre os pontos. Para a xilanase foi usada a faixa de 40 – 95°C.

3.7.2. pH ótimo

Na determinação do pH ótimo para a atividade das enzimas, a reação foi realizada utilizando-se soluções de tampão McIlvaine (VILLELA *et al.*, 1973) na faixa de pH de 4,0 - 8,0, com intervalo de 0,5. As misturas de reação e as condições de ensaio foram idênticas ao item 3.6.

3.7.3. Influência do sistema tamponante nas atividades enzimáticas

Após determinada a melhor temperatura e pH para o coquetel enzimático,

foram testados a influência dos seguintes tampões nas atividades enzimáticas: acetato de sódio 50 mM; acetato de amônio 50 mM e citrato de sódio 50 mM. As misturas de reação e as condições de ensaio foram idênticas ao item 3.6.

3.7.4. Estabilidade à temperatura e ao pH para aplicação do coquetel enzimático

O efeito da temperatura e do pH na estabilidade das enzimas foi determinado após a pré-incubação das xilanase; endo- β -1,4-glucanase; celobiohidrolase, β -glucosidase, lacase e amilase a 55°C, tampão citrato de sódio 50mM, pH 5,0, por um período de 30 horas.

3.7.5. Efeito de sais, EDTA e β -mercaptoetanol nas atividades enzimáticas

Para o estudo do efeito de sais, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade da xilanase, utilizou-se soluções de 100 mM de NH_4F , NaH_2PO_4 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NH_4Cl , CaCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KCl , NaBr , $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , FeCl_3 , HgCl_2 , $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , KH_2PO_4 , BaCl , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, EDTA e β -mercaptoetanol de modo a se obter a concentração final de 10 mM do composto correspondente na mistura de reação. Procedeu-se com as dosagens enzimáticas conforme descrito item 3.6, no entanto, para todas as enzimas testadas a temperatura utilizada foi 55°C, em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0.

3.7.6. Detecção das enzimas extracelulares nos extratos brutos do coquetel enzimático por método semi quantitativo

A detecção das enzimas extracelulares nos extratos brutos do coquetel enzimático foi realizada utilizando-se o método semiquantitativo “Api-zym” (Api system, Biomérieux®). O meio concentrado 20 vezes foi utilizado diretamente nas reações enzimáticas do sistema “Api-zym”, segundo as instruções do fabricante. Este sistema é capaz de medir a atividade de 19 enzimas, sendo elas: fosfatase alcalina, esterase (C₄), esterase lipase (C₈), lipase (C₁₄), leucina arilamidase, valina arilamidase, cisteína arilamidase, tripsina, quimotripsina, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, *N*-acetil- β -glucosaminidase, α -manosidase e α -fucosidase.

Além das enzimas descritas acima, também foram determinadas as atividades das enzimas descritas no item 3.6.

3.8. PRODUÇÃO DAS ENZIMAS RECOMBINANTES

3.8.1. Produção em fermentador CelliGen 310 Benchtop BioReactor de 5 litros

Para o cultivo em biorreator, o pré-inóculo foi preparado em 500 mL de meio mínimo suplementado com xarope de milho 5% (Glucose líquida – Marvi), a 37 °C, sob agitação de 150 rpm durante 48 horas. Para tanto, utilizou-se 20 mL de uma solução de 10⁸ esporos/mL do fungo recombinante.

O ensaio foi realizado em biorreator do tipo tanque agitado contendo 4,5 L de

MM suplementado com xarope de milho 5%. O cultivo foi realizado a 37 °C, pH 6,5, sob agitação de 300 rpm, vazão de ar de 1 v.v.m. por litro, durante 72 horas. A cada 12 horas foram retiradas amostras de 20 mL para análise de proteínas (item 3.3), açúcar redutor (item 3.6) e atividade enzimática (item 3.6).

Para lavagem do xarope de milho, foi utilizado o concentrador QuixStand Benchotop Systems, com cartucho Hollow Fiber Cartridge (GE Healthcare) de 10 kDa.

3.8.1. Caracterização do perfil de proteínas em gel de eletroforese (SDS-PAGE)

A expressão da enzima foi acompanhada por eletroforese de proteínas, de acordo com o método descrito por LAEMMLI (1970), utilizando 20 µL de cada amostra retirada durante o processo de cultivo em biorreator. Os géis de acrilamida foram utilizados na concentração de 12 %, com gel de empilhamento na concentração de 5%, e foram polimerizados em placas de vidro (7,2x10,2 cm). As amostras foram preparadas com tampão de amostra (glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,002 % e Tris 0,12 M, pH 6,75), na proporção de 1:1 e então fervidas por 5 minutos. A eletroforese ocorreu em tampão tris-glicina com SDS 0,1% no pH 8,3 durante aproximadamente 2 horas a 120V.

Os géis foram corados em uma solução contendo 0,05 g de coomassie brilhante blue, 90,8 mL de metanol 50% e 9,2 mL de ácido acético. Para descorar e revelar as bandas, o gel foi lavado com solução constituída de água 650 mL, metanol 250 mL e ácido acético 80 mL.

3.9. RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

3.9.1. Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado utilizado foi cedido pela Profa. Dra. Eleni Gomes, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* Rio Preto. Todos os bagaços foram tratados em micro-ondas e 100% de glicerol, com exceção do controle que foi com 100% de água destilada. Os tratamentos utilizados foram os seguintes: bagaço tratado com solução de hidróxido de sódio (NaOH) na concentração 0,001M; com solução de hidróxido de sódio (NaOH) na concentração 0,1M; e com solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) na concentração 0,05M. Análise de superfície do bagaço *in natura* e o pré-tratado com H₂SO₄ (0,05M) foram feitas por ION-TOF GmbH, em Münster na Alemanha.

3.9.2. Lodo Branco

O lodo branco foi obtido na indústria de papel e celulose International Paper do Brasil, situada na rodovia SP-255, km 41.24, município de Luiz Antônio, SP. Após a coleta, realizada por Jorge Betini (deste mesmo laboratório), o material foi autoclavado e armazenado em câmara fria dentro de sacos de polietileno. A análise bromatológica do resíduo (**Tabela 1**) foi feita na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* Jaboticabal. Análise de superfície do lodo branco foi feita por ION-TOF GmbH, em Münster na Alemanha, além de microscopia eletrônica de varredura por Rodrigo Ferreira Silva, do Departamento de Química da FFCLRP-USP.

Tabela 1. Análise bromatológica de amostra de lodo branco.

Propriedades	Amostra (%)
	Lodo Branco
MS ¹	96,31
Cinzas	12,40
EE ²	0
PB ³	1,78
FDN ⁴	87,50
FDA ⁵	79,06
Hemicelulose	8,44
Celulose	75,66
Lignina	15,90
CHOt ⁶	39,99

NOTA: MS¹= Matéria Seca (%), EE²= Extrato Etéreo, PB³= Proteína Bruta, FDN⁴= Fibra em Detergente Neutro - Fibras compostas por celulose, hemicelulose e lignina, FDA⁵= Fibras em Detergente Ácido – Fibras compostas por celulose e lignina, CHOt⁶= Carboidratos Totais.

3.10. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

3.10.1. Bagaço de cana-de-açúcar

3.10.1.1. Seleção do bagaço exposto a diferentes pré-tratamentos

3.10.1.1.1. Tratamento enzimático dos bagaços de cana-de-açúcar

O tratamento enzimático foi realizado nas seguintes condições: 1U (μmol/min)

das seguintes enzimas: xilanase; endoglucanase; celobiohidrolase e glucoamilase; 1% de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (p/V), 55°C, tampão citrato de sódio 50mM, pH 5,0, por 6 horas. A determinação dos açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS (MILLER, 1959).

3.10.1.1.2. Determinação dos açúcares do hidrolisado em TLC

Os produtos formados pela hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar foram analisados em cromatografia de camada delgada (TLC –merck 25 folhas de alumínio 20x20 cm silica gel 60). Foram aplicados 5 µL de cada hidrolisado e também 5 µL de padrão contendo glucose e xilose (0,1% m/v). A placa foi então colocada em uma cuba de vidro contendo solução n-butanol, etanol e água destilada (5:3:2). A corrida foi desenvolvida duas vezes e a revelação da placa foi realizada borrifando uma solução com 18 mL de metanol, 2 mL de ácido sulfúrico e 0,04 g de orcinol, e então, revelada em estufa a 100°C por aproximadamente 5 minutos (até o aparecimento das bandas).

3.10.1.2. Otimização do coquetel enzimático para hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 0,05M

3.10.1.2.1. Screening das enzimas do coquetel por Plackett-Burmann

Para fins de seleção, as enzimas estudadas do coquetel foram avaliadas usando um planejamento experimental segundo Plackett-Burman (PLACKETT & BURMAN, 1946; RODRIGUES & IEMMA, 2009). Seis variáveis foram estudadas em

12 ensaios experimentais, incluindo lacase, xilanase, endoglucanase, celobiohidrolase, β -glucosidase e glucoamilase. O menor (-1) e o maior (+1) nível de cada um dos fatores estão listados na **Tabela 2**. Quatro repetições do ponto central foram adicionados para verificar a reprodutibilidade do ensaio. A quantidade de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0 foi fixado (3,5 mL) - o mesmo para todos os ensaios. O experimento foi conduzido em 48 horas. Os fatores com um nível de significância abaixo 5% foram considerados como tendo efeito na análise de variáveis que afetam hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 2. Valores experimentais para os ensaios do Plackett-Burman 12 para selecionar as enzimas para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

Variáveis	Níveis (em U por grama de biomassa)		
	- 1	0	+ 1
Lacase	1	3	5
Xilanase	1	3	5
Endoglucanase	1	3	5
Celobiohidrolase	1	3	5
β -glucosidase	0	2	4
Glucoamilase	0	1	2

3.10.1.2.2. Otimização das enzimas selecionadas por delineamento experimental e design de superfície de resposta

O delineamento experimental e metodologia de superfície de resposta foram utilizados para otimizar os fatores mais significativos para a hidrólise da biomassa lignocelulósica, conforme identificado pelo experimento usando o método de Plackett-Burman. Os fatores foram lacase, xilanase, endoglucanase, celobiohidrolase e β -

glucosidase. A lacase foi fixada em 0,122 U por grama de biomassa, devido aos experimentos anteriores. Os níveis das variáveis independentes foram definidos de acordo com um delineamento composto central rotacional (DCCR) e um conjunto de 28 ensaios foram realizados. Os valores dos níveis das variáveis estão listados na

Tabela 3.

Tabela 3. Valores experimentais para os ensaios de delineamento composto central rotacional para a otimização do coquetel enzimático .

Variáveis	Níveis (em U por grama de biomassa)				
	- α	- 1	0	+ 1	+ α
Xilanase	1	3	5	7	9
Endoglucanase	1	3	5	7	9
Celobiohidrolase	2	5	8	11	14
β –glucosidase	3	5	7	9	11

A resposta para as variáveis, em que AR é a quantidade de açúcar redutor relativa, pode ser aproximada pela equação polinomial

$$AR \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} \right) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 \\ + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2$$

onde β_0 é a intercepção, β_1 , β_2 , β_3 e β_4 são coeficientes do modelo de primeiro ordem, β_{12} , β_{13} , β_{14} , β_{23} e β_{24} são coeficientes entre produtos e β_{11} , β_{22} , β_{33} e β_{44} são coeficientes do modelo de segunda ordem. Um teste t de Student foi utilizado para verificar a significância estatística dos coeficientes de regressão. O software estatístico Statistica v.8.0 foi utilizado para a análise os dados experimentais.

3.10.2. Lodo Branco

O lodo branco foi autoclavado e armazenado em câmara fria dentro de sacos de polietileno. O material foi seco em estufa a 110 °C por 4 horas, moído em moinho de facas com peneira 25 mesh, submetido à sacarificação enzimática por celulasas comerciais e amilase, obtida do fungo *A. carbonarius*, em diferentes condições (30/15, 50/20 e 60/30 unidades por mL) de celulase e amilase, respectivamente, para cada grama seca de lodo branco em pH 4,0. A hidrólise enzimática foi realizada em incubadora a 40°C, 160 rpm, por 96 horas.

3.11. TESTE DE FERMENTAÇÃO COM HIDROLISADO

3.11.1. Bagaço de cana-de-açúcar

3.11.1.1 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado com levedura, separadamente, fermentadora de pentose (*Meyerozyma guilliermondii* 311 (CCT7783)) e de hexose (*Saccharomyces cerevisiae* (PE-02)) em duas etapas de cultivos sucessivos, sendo que inicialmente as linhagens foram reativadas em placas de Petri com YPD sólido e incubada a 30°C por 48 horas. Na primeira etapa, foram utilizados quatro Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL do meio YPD líquido e transferidas duas alçadas do crescimento celular da placa de Petri, mantendo-os em incubadora a 30°C, sob agitação de 160 rpm por 15 horas (overnight). A massa celular obtida foi centrifugada a 3400 rpm durante 5 minutos. Na

segunda fase, as células oriundas da centrifugação foram ressuspensas em Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL do meio de multiplicação e submetidas às mesmas condições de agitação e temperatura por um período de 24 horas. Após a centrifugação, a massa celular foi avaliada de acordo com o número de células de leveduras/mL e diluídas em hidrolisado para um volume de 40 mL, a concentração final de células nos frascos de fermentação foi de 10^8 células/mL. O inóculo com cultura mista foi preparado em proporção 1:1 com concentração final 10^8 células/mL.

3.11.1.2. Teste fermentativo

Os testes fermentativos foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL com 90 mL de hidrolisado acrescido de 10 mL do inóculo. Os ensaios foram realizados em triplicatas, mantidos em incubadora a 30°C, sob agitação de 160 rpm durante 96 horas. A cada 24 horas amostras de 15 mL foram retiradas, sendo 1 mL utilizado para contagem e viabilidade celular e o restante centrifugado a 3.400 rpm, por 5 minutos a 25°C. O sobrenadante foi acondicionado em novos tubos e analisados quanto ao pH, Brix, açúcares redutores (AR) e teor alcoólico.

3.11.2. Lodo Branco

3.11.2.1. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PE-02) em duas etapas de cultivos sucessivos. Inicialmente, a linhagem foi reativada em placas de Petri com YEPD sólido e incubada a 30°C por 48 horas. Na primeira etapa,

foram utilizados quatro Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL do meio YEPD líquido e transferidas duas alçadas do crescimento celular da placa de Petri, mantendo-os em incubadora a 30°C, sob agitação de 160 rpm, por 15 horas (overnight). A massa celular obtida foi centrifugada a 3400 rpm durante 5 minutos. Na segunda fase, as células oriundas da centrifugação foram ressuspensas em Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL do meio de multiplicação e submetidas às mesmas condições de agitação e temperatura por um período de 24 horas. Após a centrifugação, a massa celular foi avaliada de acordo com o número de células de leveduras/mL e diluídas em hidrolisado para um volume de 40 mL. A concentração final de células nos frascos de fermentação foi de 10^8 células/mL.

3.11.2.2. *Teste fermentativo*

Os testes fermentativos foram realizados em Erlenmeyer de 500 mL com 160 mL de hidrolisado acrescido de 40 mL do inóculo. Os ensaios foram realizados em triplicatas, mantidos em incubadora a 30°C, sob agitação de 80 rpm durante 96 horas. A cada 24 horas amostras de 20mL foram retiradas, sendo 1 mL utilizado para contagem e viabilidade celular e o restante centrifugado a 3.400 rpm, por 5 minutos a 25°C. O sobrenadante foi acondicionado em novos tubos e analisados quanto ao pH, Brix, açúcares redutores (AR) e teor alcoólico.

3.11.3. Contagem e viabilidade celular

A viabilidade celular foi realizada através da contagem das células em microscópio, utilizando-se câmara de Neubauer, com solução de azul de metileno - citrato de sódio como corante (LEE, ROBINSON, WANG, 1981). O cálculo da

viabilidade foi feito da seguinte maneira:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células vivas}}{\text{n}^\circ \text{ células vivas} + \text{n}^\circ \text{ células mortas}} \times 100$$

3.11.4. Plaqueamento dos testes com culturas mistas

Foram coletadas amostras de 1 mL durante os testes fermentativos com culturas mistas. As amostras foram convenientemente diluídas em tubos com solução salina 0,85%, sendo espalhados 100 µL de cada diluição em YPD (para *Saccharomyces cerevisiae*) e YPD com actidione (para *Meyerozyma guilliermondii*). As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. Em seguida, as colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC/mL.

3.11.5. pH

O pH foi determinado em pHmetro digital.

3.11.6. Açúcares Redutores (AR)

Para quantificar os açúcares redutores, inicialmente mediu-se o Brix para proceder a diluição da amostra (para valores de Brix entre 1 e 1,9 a diluição foi de 10 vezes, entre 2 e 3,9 foi de 30 vezes, entre 4 e 5,9 foi 50 vezes e entre 6 e 11 foi de 100 vezes). Feitas as diluições, transferiu-se 1 mL da solução para tubos de ensaio e neste adicionou-se 1 mL de água destilada e 1 mL de DNS, totalizando um volume de 3 mL. As amostras foram submetidas a banho maria a 100°C por 5 minutos, em

seguida os tubos foram esfriados em água corrente e adicionou-se 5 mL de água destilada. Homogeneizou-se por alguns segundos e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro digital. A quantidade de açúcares redutores, em mg/mL, foi obtida através da curva padrão de glucose e xilose.

3.11.7. Teor Alcoólico

A Identificação de carboidratos e etanol por cromatografia líquido de alta eficiência (HPLC), presentes durante a fermentação do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar, foi realizada no Laboratório da Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Aliquotas de 1 mL de cada uma das frações das fermentações, submetidas a diferentes tempos de incubação, foram filtradas em membranas de nitrato de celulose (0,45 μ m). Em seguida, 20 μ L de cada fração foram aplicados em coluna Supelcogel C.611 (7,8 x 300 mm) em cromatógrafo modelo Waters. As amostras foram eluídas com NaOH 0,1 mmol/L, a temperatura de 60°C, fluxo 0,5 mL/min e detecção por índice de refração (model R401, Waters). Os diferentes carboidratos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos diferentes picos das amostras com o uso de padrões.

Para análise do teor alcoólico a partir do lodo branco hidrolisado, procedeu-se a destilação de 10 mL das amostras centrifugadas em microdestilador e, posteriormente, determinou-se o teor alcoólico através da densidade alcoólica obtida em densímetro digital DMA-45.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE I: ELABORAÇÃO DE COQUETEL ENZIMÁTICO PARA HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA

4.1. ISOLAMENTO E SCREENING DE FUNGOS CELULOLÍTICOS

As coletas de material orgânico ocorreram na cidade de Araras-SP, no dia 30/01/2014, no período entre 18:20 e 19:15h, sendo os locais representados na **Tabela 4** e os fungos isolados na **Figura 11**.

Tabela 4. Material coletado, local da coleta e fungos isolados de cada amostra.

Material coletado	Temperatura (°C)	Altitude (m)	Latitude	Longitude	Fungos isolados
Casca de árvore	30	660	22°18.526'	47°22.832'	1A1;1A3; 1A4; 1A5;1A6; 1A7
Solo de cana-de-açúcar	30	674	22°18.649'	47°22.802'	2S1;2S2; 2S4; 2S5;2S6; 2S7; 2S8;2S9;2S10
Solo com material em decomposição	30	662	22°21.151'	47°24.243'	3S1;3S2; 3S3; 3S4
Casca de árvore em decomposição	30	664	22°21.095'	47°24.227'	4A1; 4A2; 4A3

Figura 11. Fungos isolados de solo e casca de árvores da cidade de Araras-SP.

Dentre os 22 fungos isolados, dezenove foram capazes de produzir EG, em condições agitadas, sendo que o 1A4 (*Rhizopus* sp.) foi o maior produtor (0,24 U/mL), com atividade específica de 0,025 U/mg de proteína. Destes fungos 5 foram capazes de produzir mais de 50% da atividade do 1A4, sendo eles: 1A3 (0,13 U/mL), 1A5 (0,18 U/mL), 2S6 (0,17 U/mL) e 3S4 (0,19 U/mL), os demais apesar de produzirem bastante proteína, não tiveram atividade EG significativa (**Figura 12.A**). Os resultados mostram que apesar dos fungos 2S1, 2S7 e 2S8 produzirem mais proteínas que o 1A4 (10,73 mg/mL, 10,96 mg/mL e 15,62 mg/mL (**Figura 12.B**), respectivamente, as atividades específicas destes são menores que 0,005 U/mg de proteína, que corresponde a 20% do total do maior produtor.

Em cultivo estático o fungo que mais produziu EG foi o 1A5 (*Aspergillus* sp.) com 0,20 U/mL (**Figura 12.A**), com atividade específica de 0,04 U/mg de proteína. Além do 1A5, outros 19 fungos produziram EG, sendo o 1A4 (0,174 U/mL), 2S6 (0,14 U/mL) e o 3S4 (0,18 U/mL) bons produtores também, sendo que 80% dos isolados apresentam menos que 50% da atividade EG do melhor produtor. Com exceção do 1A4 e do 3S1, os fungos produziram mais proteínas quando cultivados sob agitação, como é possível ver na **Figura 12.B**.

Apesar da capacidade dos isolados de produzir EG, para este trabalho foi utilizado o fungo *A. nidulans* transformado com o gene de uma endoglucanase da família GH 12 de *A. terreus*, pois este apresentou uma elevada atividade celulásica (4,011 U/mL).

Figura 12. A. Atividade endoglucanásica dos fungos isolados testada a 40°C e pH 5,0. B. Proteína presente nos extratos brutos.

Dentre os fungos isolados, foram selecionados para teste de produção de β -glucosidase as seguintes cepas: 2S6, 2S8 e 3S4. A **Figura 13** mostra que o melhor resultado foi o fungo 3S4, posteriormente identificado como *A. niger*, com atividade de 0,28 U/mL, enquanto que o 2S6 e o 2S8 tiveram 0,24 e 0,18 U/mL, respectivamente.

Figura 13. Produção de β -glucosidase por fungos.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DO COQUETEL ENZIMÁTICO

4.2.1. Temperatura ótima

Todas as enzimas tiveram a temperatura ótima determinada, para prosseguimento dos experimentos de hidrólise (**Figura 14**). Para a determinação da temperatura ótima de ensaio enzimático, as enzimas foram incubadas com seus substratos específicos, em diferentes temperaturas que variaram de 40° a 75°C, com variação de 5°C, com exceção da xilanase que foi até 95°C.

A **Figura 14.A** mostrou que de 70 a 80°C a xilanase apresentou elevados níveis de atividade enzimática, no entanto foi a 80°C que ocorreu a máxima atividade xilanásica. Polizeli *et al.* (2005) descreveu que, geralmente, as endoxilanases mostram um pico de atividade entre 40 e 80°C, dados que comprovam os resultados obtidos neste trabalho.

A endoglucanase apresentou elevada atividade enzimática de 45 a 55°C, sendo a melhor temperatura 50°C (**Figura 14.B**). A celobiohidrolase I, que foi transformada por SEGATO *et al.* (2012) com gene da família GH 7, teve pico de atividade exoglucanásica a 55°C, no entanto há decréscimo do nível enzimático tanto em temperaturas abaixo como acima de 55°C (**Figura 14.C**). SILVA *et al.* (2013), YUAN *et al.* (2015) e PELLEGRINI *et al.* (2015) estudaram celulases com máxima atividade na faixa de 50 a 65°C, dados que corroboram com os resultados obtidos.

A glucoamilase é uma enzima que alcançou o máximo de atividade a 70°C, no entanto em temperaturas abaixo desta há uma drástica redução, chegando a 4% a 40°C, como é possível ver na **Figura 14.D**. Estes dados estão de acordo com a literatura, já que HE *et al.* (2014) e LI *et al.* (2015), descreveram glucoamilases com

atividade na faixa de 30 a 80°C.

A β -glucosidase (**Figura 14.E**) apresentou máxima atividade a 55°C, porém se mantém elevada a 60 e 65°C, com 93% e 95% da atividade enzimática. Na literatura foram estudadas β -glucosidases de *Aspergillus* sp. que possuem pico de atividade a 50°C (TAN; LEE, 2015) e de 65 a 80°C (THONGPOO *et al.*, 2014; BABA *et al.*, 2015). No entanto, para a enzima estudada neste trabalho, a 50°C há somente 74% da atividade e a 70 e 75°C, há uma redução de 30 e 60% da atividade máxima, respectivamente.

Devido a controvérsias sobre o melhor método de dosagem para lacase, a enzima foi caracterizada com seringaldazina e ABTS (**Figura 14.F**). No entanto, para ambos os substratos o nível máximo de atividade enzimática foi na temperatura de 55°C, sendo que ocorreu uma perda significativa da atividade tanto em temperaturas abaixo como acima desta. Apesar da divergência entre as metodologias, foi possível averiguar que não houve diferença significativa nas curvas de temperatura ótima para a reação padronizada neste trabalho. Dados na literatura mostram que a lacase apresenta atividade na faixa de 50 a 60 °C (LI *et al.*, 2014; KAPOOR *et al.*, 2015).

Figura 14. Efeito da temperatura nas enzimas em estudo. A. xilanase; B. endo- β -1,4-glucanase; C. celobiohidrolase I; D. glucoamilase; E. β -glucosidase; F. lacase.

A **Figura 15** ilustra a correlação entre todas as atividades em estudo em função das temperaturas estudadas. Desta forma fica evidente que as atividades amilolítica e xilanolíticas são predominantes em temperaturas mais altas, mas o contrário pode ser atribuído para as demais formas enzimáticas estudadas. Assim para este trabalho foi padronizado a temperatura de aplicação a 55°C, já que abrange 64% da atividade da xilanase, 94% da endoglucanase, 100% da celobiohidrolase, 53% da glucoamilase e 100% da β -glucosidase e da lacase. Como a glucoamilase não é uma enzima essencial para hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, mesmo tendo uma considerada perda de atividade enzimática, optou-se por usar 55°C pois há maior abrangência da atividade das demais enzimas que são de extrema importância para a aplicação do consórcio enzimático nos resíduos celulósicos. Na literatura a temperatura mais utilizada para coquetel enzimático é a 50°C (SRINORAKUTARA, SUTTIKUL e BOONVITTHYA, 2013).

Figura 15. Correlação das atividades enzimáticas em função das temperaturas testadas. (■) lacase; (■) β -glucosidase; (■): glucoamilase; (■): endo- β -1,4-glucanase; (■): celobiohidrolase; (■): xilanase.

4.2.2. pH ótimo

O pH ótimo foi determinado por tamponamento da reação em tampão McIlvaine, composto por ácido cítrico 0,1 M e Na_2HPO_4 0,2 M, de acordo com os diferentes pH analisados, na faixa de 4,0 a 8,0, segundo VILLELA *et al.* (1973). O valor de pH escolhido para as sacarificações está na faixa de 4,0 a 5,5, uma vez que os níveis máximos de atividade foram observados nestas condições (**Figura 16**). A xilanase (**Figura 16.A**), assim como a endoglucanase (**Figura 16.B**) apresentaram elevados níveis de atividade enzimática entre pH 5,0 e 5,5, mostrando que os dados estão de acordo com a literatura encontrada (GOKHALE, PATIL, BASTAWDE, 1991; POLIZELI *et al.*, 2005).

A celobiohidrolase (**Figura 16.C**) teve pH ótimo de 5,0, mas também apresenta nível elevado de atividade a pH 4,5, mostrando que os resultados estão de acordo com os encontrados para celulases (GOKHALE; PATIL; BASTAWDE, 1991; YUAN *et al.*, 2015).

A glucoamilase (**Figura 16.D**) e a β -glucosidase (**Figura 16.E**) apresentaram elevados níveis de atividade enzimática entre 4,0 e 4,5, sofrendo uma ligeira queda em pH 5,0 (82,31% e 80,31% do nível enzimático máximo, respectivamente) e mantendo-se em decréscimo nos demais pH. LI *et al.* (2015) descreveu uma glucoamilase ativa na faixa de pH de 6,0 a 9,0. Para a β -glucosidase, os dados encontrados na literatura descrevem enzimas com níveis máximos de atividade na faixa de pH de 5,0 a 5,5 (BABA *et al.*, 2015; FENG *et al.*, 2015). TAN e LEE (2015) estudaram uma enzima com mais que 50% do máximo da atividade na faixa de pH de 4,0 a 8,0.

A lacase apresentou nível máximo de atividade em pH 3,0, quando utilizado o

método do ABTS, e em pH 5,0, para seringaldazina (**Figura 16.F**). Pelo primeiro método, com elevação do pH, há uma drástica queda da atividade da enzima, alcançando menos que 10% em pH maior que 6,0. No segundo método, a lacase é bem ativa na faixa de pH de 4,0 a 5,0. Estes resultados estão de acordo com a literatura, já que alguns estudos mostram que o pico de atividade desta ligninase ocorre em pH ácidos, na faixa de 2,0 a 5,0 (LI *et al.*, 2014; KAPOOR *et al.*, 2015; MARTÍNEZ-MORALES *et al.*, 2015).

A diferença na curva de pH ótimo entre as metodologias testadas para substratos fenólicos e não fenólicos é típica para lacase, já que reflete a diferença no mecanismo de oxidação dependendo do substrato (XU, 1997; KIISKINEN *et al.*, 2002). Segundo HARKIN e OBST (1973), a seringaldazina (composto fenólico) pode ser considerada como o substrato mais conveniente para detecção rápida e inequívoca de lacase em culturas de fungos decompositores de madeira. O uso de ABTS como substrato para a lacase foi proposto por BOURBONNAIS *et al.* (1997), que acreditavam na inclusão de um mediador de subunidades não fenólicas desta enzima. A curva para seringaldazina, tipo hipérbole, foi considerada por XU (1997) típica para substratos fenólicos, enquanto a representação gráfica onde a velocidade de reação diminui com o aumento de pH é característico para substratos não fenólicos, como o ABTS (GALHAUP *et al.*, 2002).

Figura 16. Efeito do pH nas enzimas estudadas A. xilanase; B. endo- β -1,4-glucanase; C. celobiohidrolase I; D. glucoamilase; E. β -glucosidase; F. lacase.

Como ilustrado na **Figura 16**, quando se correlaciona todas as atividades enzimáticas em função dos pH experimentais pode-se perceber que em pH ácidos (4,0 – 4,5) houve uma maior participação de endoglucanase e glucoamilase. Em pH mais alcalinos (pH 8,0) houve predominância de xilanase. Assim foi escolhido o pH 5,0 para a continuação do trabalho já que nestas condições houve equilíbrio entre as formas enzimáticas, possibilitando uma melhor performance do portfólio em estudo. Dados da literatura mostram que a aplicação de consórcio enzimática é eficaz em pH 5,0 (SRINORAKUTARA; SUTTIKUL; BOONVITTHYA, 2013), sendo assim optou-se por este mesmo pH para aplicação do coquetel em resíduos celulósicos, visto que abrange 100% da atividade para a xilanase e a celobiohidrolase, mais 98% da endoglucanase, 82% da glucoamilase, 80% da β -glucosidase e 74% da lacase, quando utilizado a seringaldazina como padrão.

Figura 17. Correlação das atividades enzimáticas em função dos pH testados. (■) lacase; (■) β -glucosidase; (■): glucoamilase; (■): endo- β -1,4-glucanase; (■): celobiohidrolase; (■): xilanase.

4.2.3. Influência do sistema tamponante nas atividades enzimáticas

A escolha do tampão também é um fator de extrema importância para a aplicação do coquetel. Dada a grande variação de tampões padronizados (item 3.6) para determinação das atividades da xilanase (acetato de sódio 50 mM); endoglucanase, celobiohidrolase (acetato de amônio 50 mM); glucoamilase, β -glucosidase e lacase (citrato de sódio 50mM), foi realizado o estudo da influência dos tampões na temperatura e pH escolhidos para aplicação do consórcio enzimático.

Na **Figura 18** é possível vislumbrar que todas as enzimas estavam tendo as atividades determinadas com tampões que prejudicavam a performance. Sendo assim, optou-se por trabalhar com o tampão citrato de sódio 50 mM que foi capaz de estimular a atividade de enzimas com maior importância para aplicação do coquetel no bagaço de cana-de-açúcar, como a xilanase, celobiohidrolase e endoglucanase. Para a β -glucosidase a perda de atividade foi somente de 10% no tampão escolhido, entretanto a lacase e a glucoamilase tiveram maior diminuição na atividade. Apesar deste pequeno inconveniente foi mantido tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0 para estudo da hidrólise do coquetel enzimático no resíduo hemicelulósico, visto que houve aumento da atividade da xilanase e de duas celulasas, mesmo perdendo 35% da lacase e 25 % da glucoamilase, no entanto esta última não possui importância comprovada para aplicação no bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 18. Tampões testados nas condições padronizadas para o coquetel enzimático. (*): Corresponde aos tampões padronizados inicialmente para cada enzima. Lacase determinada pelo método da seringaldazina.

4.2.4. Estabilidade à temperatura e ao pH para aplicação do coquetel enzimático

A xilanase (**Figura 19.A**) e a β -glucosidase (**Figura 19.E**) foram extremamente estáveis, já que em 30 horas apresentaram 79% e 57% da atividade enzimática, respectivamente. A glucoamilase (**Figura 19.D**) foi estável até 24 horas, com 58,5% do nível máximo enzimático, e após 30 horas alcançou 41%. Entretanto, a endoglucanase (**Figura 19.B**) perdeu 45 % da atividade após 2 horas e a

celobiohidrolase (**Figura 19.C**) com 6 horas de incubação teve uma perda considerável de atividade celulásica, sendo que com 12 horas a taxa enzimática chegou a 31%.

A lacase (**Figura 19.F**) foi ativa por 4 horas, com 80%, pelo método da seringaldazina e 56%, por ABTS, no nível máximo da atividade da enzima. Após este período, em ambas as metodologias de dosagem a queda da atividade foi muito brusca, chegando a menos de 20% da atividade em 12 horas de incubação.

A **Tabela 5** mostra o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) das enzimas quando testadas nas condições determinadas para aplicação do coquetel enzimático. Foi estudada a estabilidade de cada enzima a 55°C, tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0.

O tempo de meia vida consiste no tempo, em horas, que correspondeu a 50% da atividade máxima enzimática, sendo assim, a xilanase e a β -glucosidase foram estáveis por mais de 30 horas, já a glucoamilase após 24 horas perdeu 50% da atividade (41% do nível máximo em 30 horas), as celulasas assim como a lacase foram as que apresentam menor estabilidade, sendo que a endoglucanase foi estável por somente 3 horas, a celobiohidrolase por 7 horas e a lacase por 5 horas nas condições testadas para aplicação do coquetel enzimático. Apesar disto, acredita-se que as enzimas, quando colocadas juntas para a hidrolisar o bagaço, possam trabalhar em conjunto e até mesmo de maneira sinérgica, possibilitando a melhora da estabilidade no coquetel enzimático e, conseqüentemente, otimizando a degradação da parede celular do bagaço de cana. Segundo SORENSEN *et al.* (2007), quando as enzimas atuam em sinergismos há um aumento significativo da liberação de açúcares do que o obtido na soma dos rendimentos dos tratamentos de enzimas individuais. Isso muitas vezes pode ajudar na estabilização das enzimas, visto que em alguns casos existem enzimas tolerantes à presença de açúcares (VILLENA *et al.*,

2006; SINGHANIA *et al.*, 2011).

Figura 19. Estabilidade enzimática nas condições padronizadas para aplicação do coquetel. A. xilanase; B. endo- β -1,4-glucanase; C. celobiohidrolase I; D. amilase; E.

β -glucosidase; F. lacase.

Tabela 5. Tempo de meia da vida das enzimas para aplicação do coquetel enzimático.

Enzima	t $\frac{1}{2}$ (h)
Xilanase GH 10	> 30
Endo- β -1,4- glucanase GH 12	3
Celobiohidrolase I GH7	7
Glucoamilase	24
B-glucosidase	> 30
Lacase	5

4.2.5. Efeito de sais, EDTA e β -mercaptoetanol nas atividades enzimáticas

Muitas enzimas são dependentes de alguns íons metálicos, já que estes facilitam uma melhor interação entre o sítio catalítico da enzima com o substrato aumentando, assim, a formação de produto (SILVA, 2009). Desta forma, o efeito de alguns sais, EDTA e β -mercaptoetanol sobre as atividades de lacase, xilanase, endoglucanase, celobiohidrolase, β -glucosidase e glucoamilase foram investigados, determinando-se as atividades em condições padronizadas de pH e temperaturas para aplicação do coquetel.

A **Tabela 6** mostra os efeitos dos sais, EDTA e β -mercaptoetanol nas atividades enzimáticas. A xilanase e a glucoamilase foram ativadas em por todos os sais testados, sendo eles: NH_4F , NaH_2PO_4 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NH_4Cl , CaCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KCl , NaBr , $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , FeCl_3 , HgCl_2 ,

$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , KH_2PO_4 , BaCl_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, além do EDTA e β -mercaptoetanol. Para a xilanase, assim como para a glucoamilase, ocorreu uma maior ativação na presença de β -mercaptoetanol (79,83% e 71%, respectivamente), sulfato de sódio (81,60% e 106,2%), cloreto de manganês (116,97% e 119,1%), sulfato de ferro (81,09% e 96,3%).

A endoglucanase teve maior ativação na presença de cloreto de cobalto (66,65%) e de cloreto de manganês (64,68%), no entanto teve uma inibição de 76,66% quando adicionado cloreto de amônia e 47,19% na presença de sulfato de cobalto.

A celobiohidrolase somente foi inibida com mercúrio (20,2%) e a β -glucosidase com sulfato de níquel (3,23%).

A lacase foi a única enzima que teve sua atividade inibida na presença de todos os sais testados, tanto na metodologia de dosagem por ABTS quanto por seringaldazina.

As enzimas, com exceção da lacase, apresentaram resultados satisfatórios com NaBr , já que houve um aumento no nível máximo de atividade foi de 30,6% para xilanase, 33,6% para endoglucanase, 1,6% para a celobiohidrolase, 12,8% para a glucoamilase e 48,55% para a β -glucosidase.

As correlações entre os principais inativadores e ativadores das atividades enzimáticas foi mostrado na **Figura 20**. A xilanase e a glucoamilase foram as únicas enzimas que não foram afetadas negativamente pela presença dos sais, EDTA ou β -mercaptoetanol, sendo assim não estão representadas no esquema de diagrama de Venn mostrado.

Na **Figura 20.A** é possível ver a interação da lacase com as celulases na presença de sais que inibiram suas atividades. O $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ inibiu 64,69% a lacase e 3,23% a β -glucosidase. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e NH_4Cl inibiram endoglucanase e HgCl_2 inibiu

80,2% a celobiohidrolase. A **Figura 20.B** mostra influência na ativação das enzimas celulolíticas, sendo que as três enzimas tiveram efeitos positivos quando expostas a NH_4F , $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KCl , NaBr , $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , FeCl_3 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , KH_2PO_4 , BaCl_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ e β -mercaptoetanol. No entanto, somente a endoglucanase e a celobiohidrolase foram ativadas na presença de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (47,96% e 43,6%, respectivamente). Já a endoglucanase e a β -glucosidase foram ativadas 4,22% e 14,05% com HgCl_2 , respectivamente. β -glucosidase e celobiohidrolase tiveram atividade aumentadas na presença de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10,9% e 44,79%), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (28,6% e 30,16%), NH_4Cl (3,8% e 38,54%), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (46,4% e 32,29%) e EDTA (2,6% 39,91%).

Tabela 6. Efeito de sais, EDTA e β -mercaptoetanol nas atividades das enzimas.

	Lac	Xil	EG	CBH	β -glu	GIA
	%					
NH ₄ F	12,34	141,68	109,84	126,5	135,70	145,3
NaH ₂ PO ₄	37,56	146,81	99,06	100,1	141,80	131,5
MgCl ₂ .6H ₂ O	41,36	137,39	61,40	110,9	144,79	157,6
AlCl ₃ .6H ₂ O	42,85	153,36	102,97	130,0	148,45	147,9
CuSO ₄ .5H ₂ O	40,84	160,67	52,81	128,6	130,16	130,7
NH ₄ Cl	43,39	155,04	23,44	103,8	138,54	135,6
CaCl ₂	43,07	147,14	120,15	119,3	144,23	106,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	38,37	137,90	166,56	128,5	143,37	170,6
KCl	42,72	148,24	140,31	109,5	146,57	116,7
NaBr	42,24	130,59	133,59	101,6	148,55	112,8
EDTA	34,66	107,23	95,47	102,6	139,91	121,0
Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ .3H ₂ O	49,81	123,45	147,65	109,9	142,51	108,2
B-mercaptoetanol	13,36	179,83	123,59	137,0	132,49	171,0
Na ₂ SO ₄	29,41	181,60	110,78	137,3	153,23	206,2
FeCl ₃	31,59	149,50	132,81	139,3	142,00	135,0
HgCl ₂	40,70	120,25	104,22	19,8	114,05	126,3
NiSO ₄ .6H ₂ O	35,31	157,65	147,96	143,6	96,77	157,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	38,12	162,74	97,03	146,4	132,29	172,2
MnCl ₂ .4H ₂ O	30,01	216,97	164,68	129,0	143,83	219,1
FeSO ₄ .7H ₂ O	33,34	181,09	139,06	132,7	132,70	196,3
NaCl	38,20	175,46	134,68	129,7	150,57	152,1
KH ₂ PO ₄	33,56	162,18	124,22	148,3	143,17	163,2
BaCl	34,04	139,41	123,43	144,3	143,57	144,0
Zn(NO ₃) ₂	40,48	122,86	119,84	140,1	137,07	153,9

* Lac = lacase, Xil = xilanase, EG = endoglucanase, CBH = celobiohidrolase, β -glu = β -glucosidase, GIA = glucoamilase.

Figura 20. Diagrama de Venn mostrando a correlação entre inibidores (A) e ativadores (B) das atividades em estudo.

4.2.5. Detecção das enzimas extracelulares nos extratos brutos do coquetel enzimático por método semi quantitativo

Os ensaios do teste *Api-zym* e a detecção de xilanase, endoglucanase, celobiohidrolase, lacase e amilase foram analisadas nos extratos brutos do coquetel enzimático. As enzimas recombinantes (xilanase, endoglucanase e celobiohidrolase) possuem como fonte de indução a maltose (ou xarope de milho), a β -glucosidase foi induzida a partir do bagaço de cana-de-açúcar, a glucoamilase com amido solúvel e a lacase em um meio de produção próprio para a produção desta enzima por *T. versicolor*.

Na **Tabela 7** é possível ver que das enzimas de interesse para hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, somente o extrato de lacase possui atividade lignolítica.

O extrato das enzimas recombinantes apresentou o mesmo padrão enzimático, mesmo que em quantidade diferentes, sendo as enzimas: fosfatase alcalina, leucina arilamidase, fosfatase ácida, Naftol-AS-BI-fosfohidrolase e α -glucosidase.

O extrato da xilanase também possui atividade de exoglucanase e β -glucosidase. A detecção das enzimas extracelulares dos extratos foi realizada somente com o intuito de conhecer quais enzimas estão presentes, visto que para a aplicação do coquetel não foi realizada a purificação das enzimas de interesse. Sendo assim, quando o efeito do consórcio no bagaço de cana foi estudado levando em consideração somente as enzimas previamente caracterizadas. Além disso, das enzimas detectadas pelo *Api-zym*, acredita-se que além da β -glucosidase, a única que pode apresentar um efeito na degradação da parede celular é a β -galactosidase, sendo esta hipótese exposta por SOUZA *et al.* (2013).

Tabela 7. Detecção das enzimas presentes nos extratos brutos do coquetel.

Enzima detectada	Extratos enzimáticos					
	Xil	EG	CBH	β -glu	GIA	Lac
Xilanase	+++++	-	+	-	+	-
Endoglucanase	-	+++++	++	+	++	-
Celobiohidrolase	+++	-	+++++	+	+	-
Lacase	-	-	-	-	-	+++++
Glucoamilase	-	-	+	-	+++++	-
Fosfatase alcalina	++++	++	++++	+++++	-	-
Esterase	+++	++	++	+++	+	-
Esterase lipase	++	++	++	++++	+	-
Lipase	-	-	-	-	-	-
Leucina arilamidase	++	++++	+++++	+++++	-	-
Valina arilamidase	-	-	+	+	-	-
Cistina arilamidase-	-	-	-	-	-	-
Tripsina	-	-	-	-	-	-
α -quimotripsina	-	-	+	-	-	-
Fosfatase ácida	+++++	+	++++	+++++	+++++	-
Naftol-AS-BI- fosfohidrolase	++++	+	+++	+++++	+++	++
α -galactosidase	-	-	-	+++++	++++	-
β -galactosidase	+++++	-	-	+++++	+	-
β -glucuronidase	-	-	-	-	-	+
α -glucosidase	++++	-	++++	+++++	++++	-
β -glucosidase	++++	-	+	+++++	++++	+
N-acetil- β - glucosaminidase	+	-	+	++++	+++++	-
α -manosidase	-	-	-	-	-	-
α -fucosidase	-	-	-	-	-	-

4.3. PRODUÇÃO DAS ENZIMAS RECOMBINANTES

Hemicelulases, junto com celulases, apresentam um grande potencial para a aplicação industrial, em especial na bioconversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis, que podem ser usados por leveduras para a produção de etanol (VILKARI *et al.*, 1994). O alto custo estimado das enzimas é considerado como um dos principais obstáculos à comercialização econômica do etanol de segunda geração. Sendo assim, com o objetivo de diminuir os custos de produção avaliou-se a substituição da maltose por xarope de milho – que contém maltose e glucose na composição.

As enzimas de modo geral apresentam bastante interesse comercial para aplicação na produção de etanol de segunda geração, no entanto as enzimas recombinantes possuem meio de indução oneroso, por utilizar maltose com alta pureza. Os resultados demonstraram que a expressão da xilanase, assim como a produção de proteínas, utilizando xarope de milho foi semelhante à expressão em meio contendo maltose (**Figura 21**). Para ambos os casos o pico da atividade xilanolítica foi com 48 horas de cultivo, 73 U/mL com xarope de milho e 84 U/mL com maltose. Após este período, o aumento da atividade foi menor, 32 U/mL e 25 U/mL, respectivamente (**Figura 21.A**). Já a produção de proteínas mesmo no período de 48 para 72 horas praticamente dobrou, de 17% para 28% com xarope de milho e de 17% para 30% com maltose (**Figura 21.B**). Foi realizado o mesmo teste para a celobiohidrolase (**Figura 21. C e D**) e a endoglucanase (**Figura 21. E e F**), sendo que para esse teste as enzimas foram concentradas 10 vezes concentradores VivaSpin de 10 kDa. Foi possível ver que a celobiohidrolase apresentou o mesmo padrão de atividade quando induzida com maltose e também com xarope de milho, no entanto a

secreção de proteínas foi maior na presença de xarope de milho como fonte indutora da enzima de interesse. Já a endoglucanase houve uma melhora significativa na atividade quando induzida por xarope de milho ao invés de maltose. Na presença da fonte indutora alternativa ocorreu um aumento de 1,85 vezes da atividade após 72 horas de cultivo. O padrão de secreção de proteínas para a endoglucanase foi o mesmo que da celobiohidrolase, havendo uma produção de aproximadamente 97 µg de proteínas por mL com xarope de milho e 62 µg de proteínas por mL com maltose como fonte de indução das enzimas, em 72 horas de cultivo.

Figura 21. Indução da expressão das enzimas recombinantes por maltose e xarope de milho produzidas em função do tempo de cultivo. A. Atividade xilanólítica (U/mL); B. proteínas (µg/mL); C. Atividade celobiohidrolase (U/mL); D. proteínas (µg/mL); E. Atividade celobiohidrolase (U/mL); F. proteínas (µg/mL).

Para a indústria de biotecnologia, a aplicação de enzimas é utilizada em grandes quantidades, o que inviabiliza a fermentação estática em placas de Petri. Em processos fermentativos industriais comumente se utiliza biorreatores de centenas de litros, em condições de agitação. Por esse motivo avaliou-se a expressão das enzimas em biorreator em batelada com capacidade de 5 L.

Nesse processo observou-se que a maior atividade xilanolítica ocorreu com 60 horas de cultivo, enquanto a maior produção de proteínas se deu com 72 horas (**Figura 22.A**). O consumo dos açúcares presentes no xarope de milho também foi avaliado através da diminuição do açúcar redutor presente no meio de cultivo durante o processo fermentativo. Pode-se observar que o maior consumo de xarope de milho ocorreu nas primeiras 36 horas, com redução de 57,6 $\mu\text{mols/mL}$ de açúcares redutores, e após esse tempo houve menor consumo da fonte de carbono até o tempo final da fermentação (16 $\mu\text{mols/mL}$).

Para a endoglucanase o pico de atividade enzimática foi com 36 horas de cultivo (0,225 U/mL), enquanto que a maior produção de proteínas ocorreu com 72 horas (**Figura 22.B**). Nas primeiras 24 horas de cultivo o consumo de xarope de milho ocorreu de maneira bem lenta, já nas próximas 24 horas houve uma queda de 79,04 para 27,67 μmols de açúcar redutor.

Já a celobiohidrolase o pico de atividade enzimática foi com 72 horas de cultivo (0,078 U/mL), assim como a maior produção de proteínas (**Figura 22.C**). O consumo de xarope de milho pelo fungo *A. nidulans* contendo o gene desta enzima ocorreu de maneira mais lentas que as demais enzimas, tanto é que após 72 horas de cultivo foi consumido somente 52,51 μmols de açúcar redutor.

Após a lavagem do xarope de milho remanescente dos extratos brutos, por filtração tangencial em QuixStand Benchotop Systems, com cartucho Hollow Fiber

Cartridge (GE Healthcare) de 10 kDa, as enzimas foram concentradas para facilitar a aplicação das mesmas no coquetel enzimático.

Figura 22. Cultivo em fermentador CelliGen 310 Benchtop BioReactor de *A. nidulans* transformado com o gene das enzimas estudadas. A. Atividade xilanolítica (U/mL); proteína (µg/mL); e consumo do açúcar redutor (AR) em função do tempo de cultivo. B. Atividade endoglucanase (U/mL); proteína (µg/mL); e consumo do açúcar redutor (AR) em função do tempo de cultivo. C. Atividade celobiohidrolase (U/mL); proteína (µg/mL); e consumo do açúcar redutor (AR) em função do tempo de cultivo.

Para averiguar se as enzimas produzidas no fermentador com xarope de milho, como fonte de indução, foram realizados gel de eletroforese denaturante (**Figura 23**). Foi possível observar um nítido aumento da expressão das enzimas através do nítido aumento do tamanho da banda de proteína correspondente às enzimas em estudo, com as bandas correspondentes a seus respectivos tamanhos.

O cultivo de *A. nidulans* em biorreator em batelada aumentou a expressão de xilanase em 37%, pois, enquanto a atividade em placa utilizando xarope de milho foi de 104 U/mL, com 72 horas de cultivo, em biorreator foi 143 U/mL, com 60 horas de cultivo. Já para as celulasas, a expressão de manteve a mesma.

O cultivo de *A. nidulans* transformado com pEXPYR em biorreator em batelada não havia sido estudado até o presente trabalho. Entretanto, esse sistema de expressão já foi utilizado para produzir diversas outras enzimas dos sistemas xilanolítico e celulolítico, como a endoxilanase (GH11) (DAMÁSIO *et al.*, 2011), a arabinofuranosidase (DAMÁSIO *et al.*, 2012a) e a xiloglucanase (DAMÁSIO *et al.*, 2012b) com níveis de expressão muito variáveis.

Figura 23. Expressão de xilanase (A); celobiohidrolase (B) e endoglucanase (C) em fermentador CelliGen 310 Benchtop BioReactor. Eletroforese em gel denaturante de poliacrilamida (12%). M – marcador de peso molecular; C – Controle com *A. nidulans* A773 transformado com pEXPYR vazio.

4.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA SELEÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS

A conversão bioquímica da biomassa lignocelulósica, vantajosamente, preserva as estruturas originais de carboidratos na forma de açúcares monoméricos, sendo a tecnologia enzimática, geralmente, considerada a mais sustentável para sacarificação (HORN *et al.*, 2012). A complexidade dos substratos lignocelulósicos requer numerosas enzimas, trabalhando em sinergismo para sua hidrólise. A remoção da lignina, através de pré-tratamento, possibilita melhorar o acesso às enzimas (VAN DYK, PLETSCHE, 2012). A conversão da biomassa celulósica em açúcares fermentescíveis é um processo complexo e envolve a hidrólise enzimática por meio das endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidades (VERMA *et al.*, 2010).

O coquetel enzimático foi testado com 1 U das enzimas: xilanase; endoglucanase; celobiohidrolase e glucoamilase, a 55°C, pH 5,0, sob agitação de 100 rpm durante 6 horas. Após este período observou-se que ocorreu maior liberação de AR (136,98 μ mol) no bagaço pré-tratado em micro-ondas com H₂SO₄ 0,05M (**Tabela 8**). Este fato pode ter ocorrido devido ser o tratamento em que ocorreu maior remoção da lignina, possibilitando assim melhor acesso das enzimas aplicadas à parede celular do bagaço. Entretanto SRINORAKUTARA, SUTTIKUL e BOONVITTHYA (2013), que aplicaram um coquetel comercial da Novozymes, que continha celulases e hemicelulases, conseguiram melhores resultados com o pré-tratamento com NaOH 2% (p/v), obtendo liberação máxima de AR de 109,18 g/L para o bagaço lavado com água após o pré-tratamento, enquanto que para o tratamento com H₂SO₄ 2% (p/v) a quantidade de AR liberada foi de 51,58g/L.

Na **Tabela 8** é possível verificar a composição do bagaço de cana-de-açúcar

nos diferentes tratamentos expostos a micro-ondas, sendo estas análises feitas sob responsabilidade da Dra. Christiane Nunes, da UNESP. Os pré-tratamentos com utilização de base e ácido foram expostos a micro-ondas e veículo glicerol 100%, sendo assim, foram feitos dois controles, um com água e outro com glicerol. O tratamento com NaOH 0,001M mostrou uma redução de 10% da lignina quando comparado com o bagaço *in natura*, e 15% quando exposto a NaOH 0,1M. A porcentagem de celulose e hemicelulose não sofreu alterações drásticas, 3,6% e 1,0%, respectivamente, com NaOH 0,001M e 4,2% e 1,3% com NaOH 0,1M. Para melhor retirada da lignina o tratamento com ácido sulfúrico 0,05M mostrou-se o mais indicado, já que houve a perda de 23% deste componente da parede celular. A hemicelulose foi determinada em relação a quantidade de xilana presente no material, visto que esta se apresenta em maiores quantidades.

Tabela 8. Composição da fração sólida do bagaço de cana controle (água), pré-tratados em micro-ondas (veículo glicerol 100%) e liberação de açúcares redutores (AR).

Amostras	Bagaço pré-tratado (%)				AR (μmol)
	Lignina	Celulose	Hemicelulose	Cinzas	
<i>In natura</i>	44,4±1,2	43,6±0,7	8,9±0,0	4,8±0,0	-
Água	42,9±0,8	43,5±0,0	8,5±0,1	4,3±0,0	42,8
Glicerol	33,3±0,7	45,3±1,6	6,8±0,2	9,0±0,5	88,9
NaOH 0,001M	34,6±0,4	40,0±0,7	7,9±0,2	7,5±0,7	90,3
NaOH 0,1M	29,1±0,9	39,4±0,3	7,3±0,1	9,2±1,2	115,6
H ₂ SO ₄ 0,05M	21,7±1,1	36,5±1,6	3,4±0,2	8,3±0,0	137,0

Os resultados iniciais da aplicação do coquetel enzimático mostraram-se promissores, no entanto ainda se faz necessário melhor otimização da hidrólise, visto

que a **Figura 24** mostra que houve somente a liberação de glucose, demonstrando que as condições testadas para a xilanase precisam ser aprimoradas.

Figura 24. Cromatografia de camada delgada (TLC) da liberação de AR após 6 horas de hidrólise enzimática dos diferentes bagaços de cana-de-açúcar a 55°C, pH 5,0 e sob agitação de 100 rpm. X: padrão de xilose; G: padrão de glucose; 1: bagaço controle (água); 2: bagaço pré-tratado com glicerol; 3: bagaço pré-tratado com NaOH 0,001M; 4: bagaço pré-tratado com NaOH 0,1M; 5: bagaço pré-tratado com H₂SO₄ 0,05M.

4.5. ANÁLISE DE SUPERFÍCIE POR ION-TOF DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Após selecionado o melhor pré-tratamento para o bagaço de cana-de-açúcar, o bagaço selecionado e o *in natura* foram enviados para Münster, Alemanha, para

análise de superfície por Ion-tof GmbH.

A **Figura 25.A** mostra os resultados de espectrometria com polaridade positiva para o bagaço de cana *in natura*. A análise dos gráficos permite dizer que o modo positivo está adequado para sais de íons metálicos e não metálicos, além de compostos contendo grupos aminados. Mudança marcante nos picos de baixa massa molecular, indica possíveis perdas de íons. Além disso, há a presença de diversos metais, semi-metais e ametais na amostra, além de estruturas contendo enxofre, provavelmente de origem proteica.

A **Figura 25.B** apresenta os gráficos de espectrometria para o bagaço de cana pré-tratado. Nesta biomassa houve a redução de cátions de baixa massa atômica com forte redução de intensidade em direção às massas mais elevadas (com periodicidade de fragmentação entre 13-15 de massa atômica (u) até 180 u – massa de glucose não ionizada). De qualquer forma, os intervalos sem evidência de fragmentação apontam para ausência de liberação de trímeros e dímeros de polissacarídeos em modo positivo com este tratamento.

A **Figura 26.A** mostra a espectrometria com polaridade negativa para o bagaço *in natura*. Este tipo de análise é ótimo para ionização de carboidratos e estruturas contendo grupos carboxila e aldeído, ou álcoois. Vê-se claramente a periodicidade dos padrões de fragmentação. Os picos 161 a 163, referem-se à fragmentação de unidades de celobiose, xilobiose e demais blocos diméricos constituintes de fibras vegetais, além disso indica também ausência de alteração química significativa.

A **Figura 26.B** possui os dados para o bagaço pré-tratado, mostrando um padrão virtualmente idêntico ao observado para o material *in natura* em baixas massas (não há alteração de composição aniônica). Aparente presença de periodicidade de

fragmentação para as massas de dímeros e trímeros de polissacarídeos, com forte intensidade de pico a 424, indicando grande acesso a fibras internas e/ou alguma degradação ácida.

As **Figuras 27 e 28** mostram as imagens obtidas para o bagaço *in natura* e o pré-tratado. Para o *in natura*, foram visualizados sinais sobrepostos intensos de aromáticos, estruturas $(C_nH_nO_n)_n$ e sinais de cadeias alifáticas sem grupos OH, talvez remanescentes de ceras ou resultados de sobreposições de sinais de grupos aromáticos ou ligações cruzadas entre fibras, visto que há presença de grande número de íons impregnados na estrutura, como revelados nos espectros de massas. Para o bagaço pré-tratado, há sinais sobrepostos aromáticos e sinais de cadeias alifáticas sem grupos OH, talvez remanescentes de ceras ou resultados de sobreposições de sinais de grupos aromáticos ou ligações cruzadas entre fibras. Sinais menos intensos de estruturas $(C_nH_nO_n)_n$ na superfície, seguida pela existência de grupos aminados. Vale ressaltar a presença de grande número de íons impregnados na estrutura de forma quase homogênea, dentre os quais Ca, Na e K são relevantes. É interessante ressaltar que os sinais de grupos CH (alifáticos) foram mais intensos que os sinais de grupos CN e CNO (proteicos ou aromáticos), os quais foram, por sua vez, mais intensos que os sinais de grupos $C_nH_nO_n$ superficiais.

Figura 25. Espectrometria de massa com polaridade positiva para: A. bagaço in natura; B. bagaço pré-tratado.

Figura 26. Espectrometria de massa com polaridade negativa para: A. bagaço in natura; B. bagaço pré-tratado.

Figura 27. Microscopia com polaridade positiva para: A. bagaço *in natura*. B. bagaço pré-tratado.

A

B

Figura 28. Microscopia com polaridade negativa para: A. bagaço *in natura*. B. bagaço pré-tratado.

4.6. SELEÇÃO DAS ENZIMAS PARA ELABORAÇÃO DO COQUETEL POR MEIO DE PLACKETT-BURMAN

Anteriormente, um pré-coquetel foi testado em bagaços de cana-de-açúcar submetidos a diferentes pré-tratamentos (**Tabela 8**). O melhor pré-tratamento foi obtido quando a biomassa foi tratada em ácido sulfúrico 0,05M, uma vez que houve maior liberação de açúcares redutores (AR).

Plackett-Burman é um tipo de delineamento experimental muito utilizado para selecionar os componentes do meio de cultura, a fim de obter melhor rendimento do produto desejado (MALLER *et al.*, 2013). Sendo assim, este delineamento foi utilizado para selecionar as enzimas a serem adicionadas ao bagaço de cana-de-açúcar visando a hidrólise dos componentes da parede celular da biomassa e liberação de açúcares fermentescíveis. As hidrólises foram acompanhadas nos tempos de 6, 24, 48 e 72 horas, no entanto somente os dados de 48 horas foram mostrados, visto que apresentaram melhor liberação de açúcares redutores. Os resultados mostraram grandes variações na liberação de AR (**Tabela 9**). A liberação máxima de AR ocorreu no ensaio 9 (5,534 $\mu\text{mol/mL}$) e o mínimo no ensaio 12 (1,042 $\mu\text{mol/mL}$). No entanto, os experimentos 3, 5 e 8 também apresentaram bons resultados, liberando 5,225, 5,023 e 5,298 μmol de AR por mL de hidrólise, respectivamente.

Tabela 9. Plackett-Burman para selecionar as enzimas para elaboração do coquetel enzimático.

Ensaio	Variáveis*						AR (μmol/mL)
	Lac	Xil	EG	CBH	β-glu	GIA	
1	1 (5)	-1 (1)	1 (5)	-1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	1,317
2	1 (5)	1 (5)	-1 (1)	1 (5)	-1 (0)	-1 (0)	2,423
3	-1 (1)	1 (5)	1 (5)	-1 (1)	1 (4)	-1 (0)	5,225
4	1 (5)	-1 (1)	1 (5)	1 (5)	-1 (0)	1 (2)	2,688
5	1 (5)	1 (5)	-1 (1)	1 (5)	1 (4)	-1 (0)	5,023
6	1 (5)	1 (5)	1 (5)	-1 (1)	1 (4)	1 (2)	4,012
7	-1 (1)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	-1 (0)	1 (2)	3,526
8	-1 (1)	-1 (1)	1 (5)	1 (5)	1 (4)	-1 (0)	5,298
9	-1 (1)	-1 (1)	-1 (1)	1 (5)	1 (4)	1 (2)	5,540
10	1 (5)	-1 (1)	-1 (1)	-1 (1)	1 (4)	1 (2)	2,580
11	-1 (1)	1 (5)	-1 (1)	-1 (1)	-1 (0)	1 (2)	1,509
12	-1 (1)	-1 (1)	-1 (1)	-1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	1,042
13	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (2)	0 (1)	3,404
14	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (2)	0 (1)	2,937
15	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (2)	0 (1)	2,847
16	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (2)	0 (1)	3,094

* U por grama de biomassa.

A **Tabela 10** apresenta o efeito das variáveis analisadas. A tabela mostra que lacase, xilanase, endoglucanase, celobiohidrolase e β-glucosidase foram as variáveis que mostraram nível de significância menor que 5%. Apesar da lacase apresentar efeito significativo foi possível observar a necessidade de diminuir a concentração da enzima para a realização dos próximos experimentos. A variável não significativa foi

retirada da elaboração do coquetel, provando que, assim como o esperado, a glucoamilase é uma enzima que não possui efeito sobre a degradação da parede celular do bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 10. Estimativa dos efeitos das variáveis por Plackett-Burman.

	Efeito	Erro padrão	t (9)	p-valor
Média	3,2790	0,0939	34,9219	0,0000
Lac	-0,6831	0,2168	-3,1502	0,0117
Xil	0,5423	0,2168	2,5007	0,0338
EG	0,6581	0,2168	3,0347	0,0141
CBH	1,4687	0,2168	6,7730	0,0001
β -glu	2,5290	0,2168	11,6625	0,0000
GIA	-0,0790	0,2168	-0,3645	0,7239

4.7. OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS SELECIONADAS PARA O COQUETEL ENZIMÁTICO

Após selecionadas as enzimas que apresentam efeito na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, foi realizado um DCCR 2⁴, cujos resultados estão mostrados na **Tabela 11**. Neste experimento a lacase foi fixada em 0,15 U por grama de biomassa, visto que no Plackett-Burman esta enzima apresentou efeito negativo, mostrando a necessidade de diminuir sua concentração no coquetel. Com isso foram realizados testes em que foi possível averiguar a concentração de lacase necessária (dados não mostrados). Os melhores resultados corresponderam aos experimentos: 12, 16 e 22 com quantidade das enzimas no ponto central, com exceção da celobiohidrolase que

foi utilizada no ponto axial positivo.

Tabela 11. Planejamento experimental para a liberação de AR usando DCCR 2⁴.

Ensaio	Variáveis				AR (μmol/mL)		
	Xil	EG	CBH	β-glu	Valor experimental	Valor predito	Desvio médio
1	-1 (3)	-1 (3)	-1 (5)	-1 (5)	1,775	2,122	0,17
2	-1 (3)	-1 (3)	-1 (5)	1 (9)	2,258	2,726	0,23
3	-1 (3)	-1 (3)	1 (11)	-1 (5)	2,599	3,146	0,27
4	-1 (3)	-1 (3)	1 (11)	1 (9)	3,570	3,750	0,09
5	-1 (3)	1 (7)	-1 (5)	-1 (5)	2,221	2,122	0,05
6	-1 (3)	1 (7)	-1 (5)	1 (9)	2,451	2,726	0,14
7	-1 (3)	1 (7)	1 (11)	-1 (5)	3,176	3,146	0,02
8	-1 (3)	1 (7)	1 (11)	1 (9)	3,763	3,750	0,01
9	1 (7)	-1 (3)	-1 (5)	-1 (5)	2,073	2,072	0,00
10	1 (7)	-1 (3)	-1 (5)	1 (9)	2,575	2,676	0,05
11	1 (7)	-1 (3)	1 (11)	-1 (5)	3,707	3,712	0,00
12	1 (7)	-1 (3)	1 (11)	1 (9)	4,308	4,316	0,00
13	1 (7)	1 (7)	-1 (5)	-1 (5)	2,047	2,072	0,01
14	1 (7)	1 (7)	-1 (5)	1 (9)	2,420	2,676	0,13
15	1 (7)	1 (7)	1 (11)	-1 (5)	3,420	3,712	0,15
16	1 (7)	1 (7)	1 (11)	1 (9)	4,552	4,316	0,12
17	-2 (1)	0 (5)	0 (8)	0 (7)	2,815	2,492	0,16
18	2 (9)	0 (5)	0 (8)	0 (7)	2,723	3,008	0,14
19	0 (5)	-2 (1)	0 (8)	0 (7)	2,859	3,170	0,16
20	0 (5)	2 (9)	0 (8)	0 (7)	3,092	3,170	0,04
21	0 (5)	0 (5)	-2 (2)	0 (7)	1,826	1,838	0,01
22	0 (5)	0 (5)	2 (14)	0 (7)	4,176	4,502	0,16
23	0 (5)	0 (5)	0 (8)	-2 (3)	2,531	2,566	0,02
24	0 (5)	0 (5)	0 (8)	2 (11)	3,716	3,774	0,03
25	0 (5)	0 (5)	0 (8)	0 (7)	3,153	3,170	0,01
26	0 (5)	0 (5)	0 (8)	0 (7)	3,451	3,170	0,14
27	0 (5)	0 (5)	0 (8)	0 (7)	3,176	3,170	0,00
28	0 (5)	0 (5)	0 (8)	0 (7)	2,883	3,170	0,14

As equações de regressão obtidos após análise de variância (ANOVA) foi usada para calcular o nível de açúcar redutor produzido como uma função de xilanase, celobiohidrolase e β -glucosidase. Liberação de açúcar redutor pode ser previsto por um modelo reduzido:

$$AR \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} \right) = 3,17 + 0,129(X) - 0,105(X)^2 + 0,666(C) + 0,302(B) + 0,154(X)(C)$$

onde AR é açúcar redutor ($\mu\text{mol/mL}$), X é a concentração de xilanase, C é a concentração de celobiohidrolase e B é a concentração de β -glucosidase.

Tabela 12. Anova para o Planejamento Experimental (MS residual).

Fonte de variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Quadrado Médio (QM)	F_{calc}^c	F_{tab}^d
Regressão (R)	14,37978	p-1 (5) ^a	2,875956	97,99	2,66
Resíduo (r)	0,64569	n-p (22) ^b	0,02935		
Total (T)	15,02547	n-1 (27)			

Coeficiente de determinação (R^2) = 0,957.

^ap = número de parâmetros.

^bn = número de experimentos.

^c $F_{\text{calculado}} = \text{QMR}/\text{QMr}$.

^d $F_{\text{tabelado}} (F_{95\%})$.

Os valores previstos são apresentados na **Tabela 11**. O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,957 e o valor de $F_{\text{calculado}}$ 36,84 vezes maior que F_{tabelado} (**Tabela 12**). Desta maneira, este modelo pode ser considerado preditivo e estatisticamente significativo ao limite de confiança de 95%. A **Figura 29** apresenta a superfície de resposta de açúcar redutor obtido a partir do modelo reduzido de segunda ordem calculado a partir do DCCR. Os resultados revelam a importância de aumentar a celobiohidrolase e β -glucosidase para elaboração do coquetel enzimático, visto que estas enzimas mostraram ser significativas para obter as melhores condições de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar e, conseqüentemente, liberação de açúcares fermentescíveis para produção de etanol. A xilanase apresentou

resultados significativos, no entanto menos expressivos que celobiohidrolase e a β -glucosidase. A endoglucanase não apresentou efeito estatisticamente significativo para a liberação de açúcares redutores, no entanto sabe-se que esta enzima é de fundamental importância para a degradação da celulose, visto que é a responsável por clivar as ligações β -1,4-glicosídicas intramoleculares, e que atua sinergicamente com a exoglucanases e β -glucosidases (WONGWILAIWALIN *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2013; BUCKERIDGE, SOUZA, 2014), justificando assim seu uso para a elaboração de um coquetel capaz de degradar melhor a parede celular do bagaço de cana-de-açúcar. Sendo assim, optou-se por fixar a xilanase no nível +1 (7 U por grama de biomassa) e a endoglucanase no ponto central (5 U por grama de biomassa).

Desta maneira, o coquetel enzimático elaborado e otimizado neste trabalho consiste em adicionar por grama de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico 0,05M: 0,122 U de lacase; 7 U de xilanase; 5 U de endoglucanase; 14 U de celobiohidrolase e 9 U de β -glucosidase. Adicionando o consórcio de enzimas à biomassa, o mesmo é incubado a 55°C, com tampão citrato de sódio 50 mM (7 mL), pH 5,0 durante 48 horas, a 110 rpm.

Figura 29. Superfície de resposta obtida através do modelo reduzido calculado a partir de um DCCR para o efeito de: A. Endoglucanase x xilanase; B. CBH x xilanase; C. B-glucosidase x xilanase; D. CBH x endoglucanase; E. B-glucosidase x endoglucanase; F. B-glucosidase x CBH.

A **Tabela 13** apresenta os dados de validação do coquetel enzimático e otimizado. O experimento foi conduzido nas condições padronizadas e, após 48 horas de hidrólise, houve a liberação de $4,405 \pm 0,088$ μmol por mL de açúcares redutores, enquanto que o valor predito a partir do modelo reduzido foi de $5,136$ μmol por mL de açúcares redutores, apresentando um baixo desvio médio ($0,365$ $\mu\text{mol/mL}$), mostrando que o modelo obtido é válido.

Tabela 13. Validação do coquetel enzimático elaborado.

AR ($\mu\text{mol/mL}$)		
Valor experimental	Valor predito	Desvio médio
$4,405 \pm 0,088$	$5,136$	$0,365$

A **Figura 30** mostra os resultados liberação de açúcares redutores em função do tempo de hidrólise enzimática com o coquetel elaborado aplicado no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com micro-ondas e ácido sulfúrico a $0,05\text{M}$. Após 6 horas da aplicação das enzimas no bagaço houve a liberação de $2,703$ μmol por mL de AR, seguida de $3,725$ e $4,405$ μmol por mL de AR com 24 e 48 horas de hidrólise, respectivamente.

Figura 30. Liberação de AR em função do tempo de hidrólise.

Com o intuito de averiguar a inibição da β -glucosidase pelo seu produto, a glucose, foi realizado um experimento em que a enzima foi submetida a diferentes concentrações de glucose pelo tempo de 48 horas da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados da **Figura 31** mostraram que a enzima não foi inibida na concentração de açúcar liberada ao longo da degradação do material lignocelulósico. Sendo assim, a constância da liberação de AR observada na **figura 30** não foi influenciada pela inibição da β -glucosidase por glucose. Este fato está de acordo com SINGHANIA *et al.* (2011) que relataram uma β -glucosidase de *A. niger* resistente a uma concentração de até 250 mM de glucose.

Figura 31. Efeito de diferentes concentrações de glucose na ação da β -glucosidase.

4.8. TESTES FERMENTATIVOS DO HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

Os testes fermentativos com o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar foram realizados com as leveduras *Meyerozyma guilliermondii* 311 (CCT7783) e a *Saccharomyces cerevisiae* (PE-02), com o intuito de fermentar as pentoses e hexoses presentes no meio, respectivamente. Sendo assim, as fermentações ocorreram com as leveduras cultivadas separadamente e também em cultura mista, além destes testes foram realizadas fermentações sob as mesmas condições, no entanto, suplementadas com extrato de levedura 3 g/L, como fonte de nitrogênio.

As fermentações foram conduzidas durante 96 horas, sendo que a cada 24 horas foram retiradas amostras para análise de AR, contagem e viabilidade celular, pH e concentração de etanol. Os dados da **Figura 32** representam o consumo AR pelas leveduras expostas sob diferentes tratamentos.

Na **Figura 32.A** está ilustrado que o consumo de AR pela levedura PE foi maior nas 24 horas de cultivo (de 0,45 g/L para 0,25 g/L) e que, após este período a quantidade de AR se manteve a mesma, isto quando a fermentação ocorreu sem a suplementação. No entanto o mesmo não ocorreu quando o hidrolisado foi suplementado com extrato de levedura, já que o consumo foi mais lento, provavelmente devido ao fato de o micro-organismo utilizar a fonte de nitrogênio presente no meio para crescimento e, assim ter demorado para consumir os açúcares do hidrolisado. Mesmo às 96 horas de fermentação, o consumo de AR pelas leveduras no hidrolisado foi relativamente baixo, quando comparado ao teste sem suplementação.

A **Figura 32.B** mostra o consumo de AR pela levedura 311, sendo que os

resultados se assemelharam ao da levedura PE, visto que em meio sem suplementação o consumo inicial de AR foi maior que o do teste com extrato de levedura. A diferença entre as fermentações (**Figura 32.A e B**) deve-se ao maior consumo de AR por parte da levedura 311 em meio suplementado com fonte de nitrogênio.

A fermentação com cultura mista (**Figura 32.C**) apresentou o mesmo padrão de consumo de AR que o da levedura 311. O fato dos açúcares não terem sido totalmente exauridos pode ter ocorrido provavelmente devido à presença de oligossacarídeos que não foram hidrolisados durante a ação das enzimas no bagaço de cana-de-açúcar.

Os dados apresentados na **Figura 33** mostram a variação de pH do meio ao longo das 96 horas de fermentação. Para o teste com a PE o pH variou de 5,0 a 8,3 para o cultivo sem suplementação e de 5,0 a 8,7 com adição de extrato de levedura. Já para os cultivos com 311 e misto o pH variou na faixa 5,0 a 9,2. Martini (2014) também relata a alcalinização do meio de cultura para testes de fermentação com a levedura *Meyerozyma guilliermondii*, no entanto o meio de cultivo foi proveniente da hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar. No entanto ainda não se sabe o que gera essa alcalinização do meio de cultivo derivado da hidrólise do bagaço de cana.

Segundo Souza (2009), o pH é um fator importante para as fermentações industriais visto que está relacionado ao controle da contaminação bacteriana, além de seu efeito estar relacionado ao crescimento da levedura e a taxa de fermentação.

Figura 32. Consumo de AR pelas leveduras: A. *Saccharomyces cerevisiae* PE; B. *Meyerozyma guilliermondii* 311; C. cultura mista ao longo das 96 horas de fermentação.

Figura 33. Efeito do tipo de cultivo: A. *Saccharomyces cerevisiae* PE; B. *Meyerozyma guilliermondii* 311; C. cultura mista sobre o pH ao longo das 96 horas de fermentação.

A **Figura 34** apresenta os resultados da viabilidade das leveduras nos diferentes testes fermentativos, sem e com suplementação de extrato de levedura. Nas **Figuras 34.A e B** é possível ver o comportamento da *Saccharomyces cerevisiae* PE nas duas situações testadas e, portanto, foi mostrado a importância da adição de extrato de nitrogênio, já que sem a suplementação a viabilidade celular foi inferior a 6 % ao longo da fermentação, enquanto que na outra condição foi acima de 90 %. Pereira *et al.* (2010) mostraram que suplementação de meios de cultura visando a produção de etanol foram eficazes, visto que esta suplementação não inviabiliza a obtenção do produto de interesse. O mesmo comportamento pode ser observado para a *Meyerozyma guilliermondii* 311, ou seja, sem a suplementação a viabilidade celular foi inferior a 5 % e com a adição de extrato de levedura foi acima de 95 % (**Figuras 34.C e D**).

O teste fermentativo com cultura mista apresentou melhores resultados de viabilidade celular das leveduras, já que sem suplementação tanto a PE como a 311 mostraram-se viáveis com taxas entre 11 e 35%, o que não ocorreu com PE quando suplementada já que a mesma teve uma queda para 1,5% com 96 horas de fermentação. No entanto, a 311 em 72 horas de cultivo houve um aumento considerável de 132 % do inicial e aumentando nas próximas 24 horas (**Figura 34.E e F**). Este fato, provavelmente, pode ser o porquê da PE ter decaído, visto que quando as leveduras são cultivadas juntas pode ter havido competição pelos nutrientes presentes no meio e, assim inviabilizar o crescimento celular.

Figura 34. Análise do crescimento das leveduras durante a fermentação: A. células viáveis da PE; B. viabilidade celular da PE; C. células viáveis da 311; D. viabilidade celular da 311; E. células viáveis das leveduras em cultura mista; F. viabilidade celular em cultura mista.

As análises por HPLC para verificação da capacidade de produção de etanol por meio de leveduras e do consumo dos açúcares do hidrolisado ao longo da fermentação (**Tabelas 14 e 15**) foram realizadas sob responsabilidade da Profa. Carem Gledes Vargas Rechia, da FCFRP-USP. Na **Tabela 14** é possível analisar a presença de polímero de alta molecular ao longo das 96 horas de fermentação, sendo que este não está prontamente disponível para consumo pelas leveduras. A levedura PE conseguiu consumir melhor este polímero quando não houve a suplementação do meio, no entanto não ocorreu o mesmo com a 311, que apresentou melhor consumo quando suplementado. A cultura mista se comportou de maneira semelhante tanto na presença como na ausência de extrato de levedura. No entanto, estas observações em relação ao consumo do polímero, em relação a necessidade ou não de suplementação, não apresentaram o mesmo comportamento para a produção de etanol (**Tabela 15**).

Tabela 14. Porcentagem de polímero de alta massa molecular ao longo da fermentação.

Fermentação	PE	PE suplem.	311	311 suplem.	Mista	Mista suplem.
h	%					
24	74,99	84,40	65,45	59,59	52,96	63,87
48	70,11	80,81	80,51	79,14	71,07	74,84
72	62,81	81,69	62,40	55,25	73,96	76,73
96	60,16	87,74	59,69	36,28	62,96	70,22

Na **Tabela 15** é possível analisar a presença dos açúcares presentes do meio e a produção de etanol ao longo da fermentação. Os resultados mostraram que não houve produção de etanol a partir fermentação do hidrolisado com a levedura PE, provavelmente devido à concentração de açúcares presente não ser o suficiente para que o micro-organismo metabolizasse e convertesse o açúcar em etanol. Entretanto,

com a adição de extrato de levedura, houve a produção de 7,03% com 24 horas de cultivo. Estes dados mostraram a importância da suplementação, mostrando que para *S. cerevisiae* aumentou a eficiência da fermentação, assim como sugerindo por Pereira *et al.* (2010).

No entanto com a levedura 311 foi possível obter a produção de 12,66% de etanol com 24 horas de fermentação, sem suplementação. Já com a adição de extrato de levedura, apesar de produzir etanol (1,44% em 24 horas), o resultado se mostrou inferior quando comparado com o meio sem suplementação, mostrando que para *M. guilliermondi* houve prejuízo na produção de etanol quando comparada ao meio sem suplementação. Apesar da baixa quantidade inicial de açúcar presente no meio, estes resultados se mostraram promissores, pois não foi encontrado na literatura trabalhos com esta levedura a partir da hidrólise enzimática do bagaço. Martini *et al.* (2016) mostraram o crescimento e produção de etanol com a *M. guilliermondi* a partir de meio sintético contendo pentoses e meio proveniente da hidrólise ácida do bagaço.

Além das fermentações com cultura separadas da PE e da 311, foram realizados experimentos com cultura mista na ausência e na presença de extrato de levedura. Neste experimento somente houve a produção de etanol quando ocorreu a suplementação do hidrolisado. Com 24 horas de cultivo foi encontrado 0,53% de etanol e em 48 horas aumentou para 1,18% o etanol encontrado nas amostras da fermentação. Estes dados foram bastante interessantes, visto que ainda não foi encontrado na literatura trabalhos de fermentação alcoólica de hidrolisado de bagaço a partir do cultivo misto das leveduras *S. cerevisiae* e *M. guilliermondi*.

Desta maneira, estes dados se mostraram promissores, visto que foi produzido etanol a partir do hidrolisado obtido pela elaboração de um coquetel enzimático, entretanto se faz necessário um estudo visando otimizar a hidrólise para

maior liberação de açúcares e dos testes fermentativos.

Tabela 15. Análise dos açúcares e produção de etanol ao longo da fermentação.

Fermentação	Oligossac- rídeos	Celo- biose	Maltose	Xilo- biose	Glucose	Xilose	Arabi- nose	Etanol
(h)				%				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>								
24	12,76	59,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	0,00
48	6,49	84,59	0,00	0,00	0,53	0,00	5,28	0,00
72	77,60	0,00	0,00	0,00	7,65	13,15	1,60	0,00
96	67,17	0,00	0,00	0,00	32,83	0,00	0,00	0,00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> suplementado								
24	85,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,19	7,03
48	92,99	0,00	0,00	1,31	0,00	0,39	5,31	0,00
72	84,51	0,00	0,00	0,00	0,00	1,06	14,44	0,00
96	19,32	0,00	57,57	0,00	0,00	0,00	23,11	0,00
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>								
24	5,86	59,28	0,00	0,00	0,00	5,86	5,86	12,66
48	6,78	25,58	0,00	0,00	62,00	0,00	0,00	0,00
72	5,64	86,33	0,00	0,00	0,45	0,00	3,11	0,00
96	5,12	0,00	0,00	0,00	83,66	0,19	3,54	0,00
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> suplementado								
24	13,74	81,87	0,00	0,00	0,00	0,00	2,95	1,44
48	98,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,44	0,00
72	0,00	91,04	0,00	0,00	0,00	0,00	8,96	0,00
96	35,55	0,00	58,47	0,00	0,00	0,00	5,98	0,00
<i>Cultura Mista</i>								
24	16,86	80,69	0,00	0,43	0,00	0,00	2,02	0,00
48	91,60	1,07	0,00	0,00	0,00	0,00	7,33	0,00
72	12,73	80,67	0,00	0,00	0,00	0,00	6,61	0,00
96	13,94	0,00	0,00	80,55	0,00	0,00	5,50	0,00
<i>Cultura Mista</i> suplementado								
24	97,92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,54	0,53
48	94,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,80	1,18
72	10,00	0,00	49,83	0,00	0,00	0,00	2,24	0,00
96	41,07	0,00	0,00	53,92	0,00	0,00	5,01	0,00

Em relação ao consumo de açúcares, o resultado se mostrou bastante interessante, pois foi possível ver que ao longo das 96 horas de fermentação, além do consumo de açúcares prontamente disponível para as leveduras, houve a conversão

de polímeros de alta massa molecular, presentes no hidrolisado, em açúcares fermentescíveis, como glucose, xilose e arabinose (**Tabelas 14 e 15**). Além disso, foi possível analisar que dado a alta porcentagem de polímeros de alta molecular, sendo assim, seria necessário aprimorar a hidrólise com a adição de enzimas que possuam melhor degradação do bagaço de cana-de-açúcar em relação as já testadas neste trabalho. Seria o caso de testar novas celulasas, principalmente a β -glucosidase, responsável pela liberação de monômeros de glucose, e de enzimas que degradem a lignina presente, para que assim as demais enzimas possam atuar de maneira mais eficiente na celulose e hemicelulose presentes no resíduo estudado. Dadas estas informações, outros dados interessantes, estão relacionados ao fato de que durante a fermentação houve um padrão de hidrólise. No entanto, seriam necessários mais estudos a cerca deste comportamento pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Meyerozyma guilliermondii*, já que não há relatos de tal comportamento na literatura.

PARTE II: HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO DO LODO BRANCO PROVENIENTE DA INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE

4.9. ANÁLISE DE SUPERFÍCIE POR ION-TOF DO LODO BRANCO

Amostra de lodo branco triturado foi enviada para Münster, Alemanha, para análise de superfície por Ion-tof GmbH. Na **Figura 35.A**, foi possível analisar a presença de cátions e ausência de periodicidade espectral em toda a faixa de massas, indicando cancelamento de padrão de repetição de alteração química na fibra ou fragmentação por Bi. Um pico a 280u apareceu indicando, possivelmente, presença de elementos alifáticos. A **Figura 35.B**, embora apresente ânions, visto os espectros de baixa massa com alta intensidade, pode-se verificar a perda completa em padrões de ruptura de ligação por bombardeio de Bi em modo negativo. Picos de alta intensidade aparentemente randômicos, indicando ausência de padrão de repetição de ruptura.

A **Figura 36**, mostrou completa deformação da estrutura da fibra, com intenso enriquecimento em Na e K, além de exposição de estruturas alifáticas, aromáticas e $(C_nH_nO_n)_n$. Vale ressaltar a exposição de cátions K, Ca e Na na superfície da amostra, observados em modo positivo. Já em modo negativo, foi possível observar sinais de alta intensidade e exposição generalizada de H e estruturas alifáticas, aromáticas e $(C_nH_nO_n)_n$.

Figura 35. Espectrometria de massa do lodo branco: A. polaridade positiva; B. polaridade negativa.

Figura 36. Microscopia do lodo: A. polaridade positiva; B. polaridade negativa.

4.10. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO LODO BRANCO

Amostra do lodo branco foi seca em estufa à 110°C, por 4 horas, e em seguida foi triturada em moinho de facas, com peneira 25 mesh. Foram utilizados 30 gramas do lodo branco moído para ensaios de hidrólise do material por enzimas obtidas de *A. carbonarius* (amilase), e celulase comercial. Após determinação da atividade amilásica e celulásica, foram calculados os volumes necessários para hidrolisar o lodo branco em diferentes condições: 30/15, 50/20 e 60/30 U/mL de celulase e amilase, respectivamente, para cada grama seca de lodo branco, em pH 4,0. Os resultados dos diferentes tratamentos enzimáticos sob o lodo branco estão mostrados na **Tabela 16**. O melhor resultado para liberação de AR pela hidrólise enzimática do lodo branco foi o contendo 60 U/mL de celulase e 30 de amilase, onde a quantidade de AR foi de 60,35 $\mu\text{mol/mL}$. Desta maneira este tratamento foi o utilizado para os testes fermentativos visando a produção de etanol.

Para verificar a composição do hidrolisado foi realizada uma análise de HPLC junto ao laboratório da Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia, da FCFRP-USP. Nesta análise foi possível verificar todos os açúcares presentes no hidrolisado derivado de lodo branco, sendo eles: 17,79% de glucose (igual a 10,74 $\mu\text{mol/mL}$), 9,60% de xilose (5,79 $\mu\text{mol/mL}$) e 63,82% (38,52 $\mu\text{mol/mL}$) de um tipo de açúcar que não foi identificado (**Figura 37**), no entanto, não se sabe se este açúcar apresenta potencial para ser fermentado. Marques *et al.* (2008) relata que a concentração inicial de AR obtida do hidrolisado do lodo branco, proveniente de Renova-Torres Novas, Portugal, foi de 56,2 g/L de glucose e 12,9 g/L de xilose.

Tabela 16. Liberação AR sob diferentes tratamentos enzimáticos aplicados ao lodo branco.

Tratamento enzimático (Celulase/Amilase em U/mL)	AR ($\mu\text{mol/mL}$)
30/15	26,09
50/20	40,04
60/30	60,35

Figura 37. Análise de HPLC para verificar a presença de diferentes açúcares no hidrolisado proveniente do lodo branco.

Para analisar o efeito das enzimas na degradação do lodo branco foi realizada microscopia eletrônica de varredura e seus resultados apresentados na **Figura 38**. Através das micrografias foi possível verificar a redução de grande parte do material celulósico em relação à amostra do lodo branco bruto sem enzimas.

Figura 38. Microscopia eletrônica de varredura de amostras de lodo branco. A: amostra do lodo branco bruto sem hidrolisar; B: amostra de lodo branco hidrolisado.

4.11. TESTES FERMENTATIVOS DO HIDROLISADO DE LODO BRANCO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

Os testes fermentativos com o hidrolisado de lodo branco foram realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PE-02). Resultados prévios mostraram a necessidade de suplementação do hidrolisado, visto que sem adição não houve a produção de etanol. Sendo assim, os ensaios foram realizados com a adição de 3 g/L, apesar de Marques *et al.* (2008) relatar ser possível uma produção de 19,6 g/L de etanol pelo método de hidrólise e fermentação separadas do lodo branco, com a linhagem CBS 5773 (*Pichia stipitis*), levedura assimiladora de pentoses, sem necessidade de suplementação nutricional.

Foram realizadas medição do pH, determinação da viabilidade do crescimento das leveduras, quantificação de AR e produção de etanol. A **Figura 39** mostra o consumo de AR pela levedura, ao longo da fermentação houve a diminuição da taxa de açúcares presente no meio de cultivo, ao final das 96 horas ainda havia açúcar disponível para as leveduras (0,71 g/L).

Na **Figura 40** foi possível averiguar que o pH do hidrolisado durante a fermentação aumentou gradativamente de 5,5 para 7,5, como já visto anteriormente o pH do teste fermentativo é de suma importância para controle de contaminantes nas dornas de fermentação, assim como na produção de etanol (SOUZA, 2009).

Figura 39. Consumo de AR de hidrolisado de lodo branco, fermentado por *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 40. Resultados de pH durante a fermentação do lodo branco.

A viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação se manteve bastante elevada, acima de 95 % (**Figura 41**). Este fato é de grande importância já que mostra que o lodo branco, provavelmente não apresenta elementos nocivos ou tóxicos em sua composição, embora para a fabricação de papel pode ser utilizado alvejantes e corantes, cloreto de sódio e de cálcio, colas sintéticas, bactericidas, floculantes e antiespumantes.

A produção de etanol teve seu pico em 24 horas de fermentação (**Figura 42**), sendo que após este período houve decréscimo do etanol presente no meio, mostrando que provavelmente as leveduras tenham consumido este produto. Sendo assim, a fermentação de lodo hidrolisado suplementado com extrato de levedura (3 g/L) produziu 2,37 g/L de etanol em 24 horas de cultivo. Estes resultados se mostraram satisfatórios e apresentam parâmetros importantes para próximos

experimentos, visto que Marques *et al.* (2008) relataram ser possível produzir 19,6 g/L de etanol a partir do lodo branco quando fermentados com *Pichia stipitis*. Já com diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram relatados a obtenção de 9,5 g/L de etanol com a GIM-2 (PENG; CHEN, 2011), 40 g/L com a TJ14 (PRASETYO *et al.*, 2011), 31 a 42,5 g/L com CICC 1001 (LIN *et al.*, 2012) a partir de lodo branco em diferentes condições de tratamentos de hidrólise.

Figura 41. Resultados de viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-02.

Figura 42. Resultados de produção de etanol durante fermentação do lodo hidrolisado por 96 horas.

5. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos pode-se concluir que o coquetel elaborado para degradação da parede celular do bagaço de cana-de-açúcar com lacase, xilanase, endoglucanase, celobiohidrolase, β -glucosidase e glucoamilase apresentou resultados satisfatórios quando aplicado a 55°C, com tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0. Porém, estudos mais detalhados e complementares devem ser realizados com o intuito de melhorar a digestibilidade da biomassa lignocelulósica. Na fermentação foi averiguado que o hidrolisado sem suplementação na presença da levedura *Meyerozyma guilliermondii* 311 produziu 12,66% de etanol e 1,44% de etanol quando o meio foi suplementado com extrato de levedura. Já para a fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* e cultura mista foi observado a necessidade de suplementação do hidrolisado para a produção de etanol, tendo 7,03% e 1,18% de etanol, respectivamente. Tanto em cultivo com *Saccharomyces cerevisiae* quanto com *Meyerozyma guilliermondii* não houve consumo total dos açúcares presentes no meio, mostrando ser necessário a busca para obtenção de melhores resultados.

Em relação a produção e caracterização das enzimas, foi possível concluir que a expressão das enzimas recombinantes com xarope de milho é capaz de produzir a enzima tão bem quanto a utilização de maltose como fonte de indução, apresentando, assim, uma fonte de indução de baixo custo comercial.

Já para os resultados obtidos no tratamento do lodo branco com a utilização de celulase comercial e amilase de *Aspergillus carbonarius* pôde-se chegar à conclusão de que a proporção 60/30 U/mL por gramas de polpa seca apresentaram melhores resultados na hidrólise do lodo branco. A fermentação do hidrolisado foi realizada com a *Saccharomyces cerevisiae* PE-02 e suplementação de 3/L de extrato de levedura. A levedura se manteve viável durante toda fase de fermentação, com maior taxa de produção de etanol nas primeiras 24 horas, sendo possível obter 2,37 g/L de etanol.

Desta maneira, este trabalho abre caminho para novos estudos com o lodo branco, sendo este podendo ser considerado uma promissora fonte de biomassa celulósica para a produção de etanol de segunda geração.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTRANIKIAN, G. Microbial Degradation of Starch. In: WINKELMANN, G. (Ed.). **Microbial Degradation of Natural Products**. Weinheim: VCH Verlag, 1992. p. 28-56.

ALMEIDA, P. Z. **Diversidade do potencial amilolítico de fungos filamentosos: purificação e caracterização de uma glucoamilase de *Aspergillus brasiliensis***. 2015. 137 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

BABA, Y.; SUMITANI, J.; TANI, S.; KAWAGUCHI, T. Characterization of *Aspergillus aculeatus* β -glucosidases 1 accelerating cellulose hydrolysis with *Trichoderma* cellulose system. **AMB Express**, v. 5, p. 3-11, 2015.

BARRATT, R.W.; JOHNSON, G.B.; OGATA W.N. Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v.52, p. 233–246, 1965.

BASSI, A. P. G. **Tolerância ao estresse e características fermentativas de leveduras *Dekkera bruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica**. 2011. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

BENKÖ, Z.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L.; RÉCZEY, K. Evaluation of the role of xyloglucanase in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 43, p. 109-114, 2008.

BNDES; CGEE (Org.) **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. 316 p.

BOURBONNAIS, R., PAICE, M.G. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochem. J.**, v.255, p.445-450, 1988.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G.; FREIERMUTH, B.; BODIE, E.; BORNEMAN, S. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 63., p 4627-4632, 1997.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JR, N. Enzima na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. (Eds.) **Enzima em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 241-272, 2008.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 76 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

BUCKERIDGE, M. S.; SOUZA, A. P. Breaking the "Glycomic Code" of cell wall polysaccharides may improve second-generation bioenergy production from biomass. **Bioenerg. Res.**, v.-, p.1-9, 2014.

BUSWELL, J.K., CAI, Y.J., CHANG, S.T. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiol. Let.**, v. 128, p. 81-88, 1995.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresour. Technol.**, v.101, p. 4754-4766, 2010.

CARNEIRO, L. M. **Avaliação de estratégias de adaptação da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico da palha de arroz visando à produção de etanol**. 2011. 175 p. Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

CARPITA, N. C.; McCANN, M. C. The cell wall. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Eds.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists. Rockville: MD, EEUU, 2000. p. 52-108.

CARVALHO, C. C. **Produção de ligninases por basidiomicetos através de fermentação em estado sólido e aplicação de enzimas**. 2004. 111 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2004.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; DE ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; FIGUEIRA, A. V. O.; FIGUEIRAS, T. S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; GUZZO, E. C.; HOFFMANN, H. P.; LANDELL, M. G. A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F. C.; ROMANO, E.; DA SILVA, W. J.; SILVA FILHO, M. C.; ULIAN, E. C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biol.**, v. 4, p. 62-89, 2011.

CHEN, H., VENDITTI, R. A., JAMEEL, H., PARK, S. Enzymatic hydrolysis of recovered office printing paper with low enzyme dosages to produce fermentable sugars. **Appl.**

Biochem. Biotechnol., v. 166, p. 1121–1136, 2012.

CHEN, H.; VENDITTI, R. A.; GONZALEZ, R.; PHILLIPS, R.; JAMEEL, H.; PARK, S. Economic evaluation of the conversion of industrial paper sludge to ethanol. **Energ. economics**, v. 44., p. 281-290, 2014.

CORRADINI, E.; LOTTI, C.; MEDEIROS, E. S.; CARVALHO, A. J. F.; CURVELO, A. A. S.; MATTOSO, L. H. C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros: Cienc. Tecnol.**, v.15, p. 268-273, 2005.

DAMASIO, A. R. D., SILVA, T. M., ALMEIDA, F. B. D., SQUINA, F. M., RIBEIRO, D. A., LEME, A. F. P., SEGATO, F., PRADE, R. A., JORGE, J. A., TERENCE, H. F. & POLIZELI, M. L. T. M. Heterologous expression of an *Aspergillus niveus* xylanase GH11 in *Aspergillus nidulans* and its characterization and application. **Process Biochem.**, v.46, p.1236-1242, 2011.

DAMÁSIO, A. R. L.; PESSELA, B. C.; SEGATO, F.; PRADE, R. A.; GUISAN, J. M.; POLIZELI, M. L. T. M. Improvement of fungal arabinofuranosidase thermal stability by reversible immobilization. **Process Biochem.**, v. 47, p. 2411-2417, 2012a.

DAMÁSIO, A. R. L.; RIBEIRO, L. F. C.; RIBEIRO, L. F.; FURTADO, G. P.; SEGATO, F.; ALMEIDA, F. B. R.; CRIVELLARI, A. C.; BUCKERIDGE, M. S.; SOUZA, T. A. C. B.; MURAKAMI, M. T.; WARD, R. J.; PRADE, R. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Functional characterization and oligomerization of a recombinant xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase (GH12) from *Aspergillus niveus*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1824, p. 461-467, 2012b.

DE LUCAS, R. C. **Estudo da hidrólise enzimática fúngica sobre bagaços de cana-de-açúcar submetidos a diferentes tratamentos para produção de etanol de segunda geração**. 2013. 163 p. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

FAN, Z.; SOUTH, C.; LYFORD, K.; MUNSIE, J.; VAN WALSUM, P.; LYND, L. R. Conversion of paper sludge to ethanol in a simultaneous solids-fed reactor. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 26, p.93-101, 2003.

FAN, Z.; LYND, L. R. Conversion of paper sludge to ethanol. I: Impact of feeding frequency and mixing energy characterization. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 30, p. 27-34, 2007.

FENG, T.; LIU, H.; XU, Q.; SUN, J.; SHI, H. Identification and characterization of two

endogenous β -glucosidases from the termite *Coptotermes formosanus*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, DOI 10.1007/s12010-015-1699-7, 2015.

FENGEL, G.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. 1984. 613 p.

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Orgs). **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, p. 215-244, 2004.

FERREIRA FILHO, E. X. Xilanases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Ed.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p.137-148.

FURTADO, G.; SANTOS, C. R.; CORDEIRO, R. L.; RIBEIRO, L. F.; MORAES, L. A. B.; DAMÁSIO, A. R. L.; POLIZELI, M. L. T. M.; LOURENZONI, M. R.; MURAKAMI, M. T.; WARD, R. J. Enhanced xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase efficiency in an engineered CBM44-XegA chimera. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. -, p.-, 2015.

GALHAUP, C.; GOLLER, S.; PETERBAUER, C. K.; STRAUSS, J. H. D. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. **Microbiol.**, v. 148, p. 2159-2169, 2002.

GOKHALE, D. V.; PATIL, S. G.; BASTAWDE, K. B. Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Applied Biochem. Biotechnol.**, v. 30, p. 99-109, 1991.

GONÇALVES, A. Z. L. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos sólidos agroindústrias, visando potencial aplicação na produção animal**. 2010. 135 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

GURRAM, R. N.; AL-SHANNAG, M.; LECHER, N. J.; DUNCAN, S. M.; SINGSASS, E. L.; ALKASRAWI, M. Bioconversion of paper mill sludge to bioethanol in the presence of accelerants or hydrogen peroxide pretreatment. **Bioresour. Technol.**, v. 192, p. 529-539, 2015.

HARKIN, J.M. & OBST, J.R. 1973. Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. **Experientia**, v.29, p. 381-387, 1973.

HE, Z.; ZHANG, L.; MAO, Y.; GU, J.; PAN, Q. ZHOU, S.; GAO, B.; WEI, D. Cloning of a novel thermostable glucoamylase from thermophilic fungus *Rhizomucor pusillus* and high-level co-expression with α -amylase in *Pichia pastoris*. **BMC Biotechnol.**, v. 14, p. 114-123, 2014.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 10-18, 2009.

HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnol. Biofuels**, v.5, p. 45-60, 2012.

HUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 35, p. 377-391, 2008.

KANG, L.; WANG, W.; LEE, Y. Y. Bioconversion of Kraft paper mill sludges to ethanol by SSF and SSCF. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 161, p.53-66, 2010.

KAPOOR, R. K.; RAJAN, K.; CARRIER, D. J. Applications of *Trametes versicolor* crude culture filtrates in detoxification of biomass pretreatment hydrolyzates. **Bioresour. Technol.**, v. 189, p. 99-106, 2015.

KHANA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v.11, p. 242-243, 1995.

KIISKINEN, L.; VIKARI, L.; KRUUS, K. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 59, p. 198-204, 2002.

KLOCK, U.; MUÑIZ, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. S. **Química da Madeira**. 3 ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. 85 p.

LAEMMLI, Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680–685, 1970.

LARK, N.; XIA, Y.; QIN, C. G.; GONG, C. S. Production of ethanol from recycled paper sludge using cellulose and yeast, *Kluveromyces marxianus*. **Biomass Bioenerg.**, v.12, n. 2, p. 135-144, 1997.

LI, Z.; JI, K.; DONG, W.; YE, X.; WU, J.; ZHOU, J.; WANG, F.; CHEN, Q.; FU, L.; LI, S.; HUANG, Y.; CUI, Z. Cloning, heterologous expression, and enzymatic characterization of a novel glucoamylase GlucaM from *Corallococcus* sp. Strain EGB. **Protein Expr. Purif.**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2015.06.009>, 2015.

LI, Q.; PEI, J.; ZHAO, L.; XIE, J.; CAO, F.; WANG, G. Overexpression and characterization of laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris*. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 50, n. 2, p. 140-147, 2014.

LIN, Y.; WANG, D.; WANG, T. Ethanol production from pulp & paper sludge and monosodium glutamate waste liquor by simultaneous saccharification and fermentation in batch condition. **Chem. Engineer. J.**, v. 191, p. 31-37, 2012.

LISPERGUER, J.; PEREZ, P.; URIZAR, S. Structure and thermal properties of lignins: characterization by infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 54, p. 460-463. 2009.

LYND, L. R.; LYFORD, K.; SOUTH, C. R.; VAN WALSUM, P.; LEVENSON, K. Evaluation of paper sludges for amenability to enzymatic hydrolysis and conversion to ethanol. **Tappi J. Peer Rev. Paper**, p. 1-19, 2001.

MACRELLI, S.; GALBE, M.; WALLBERG, O. Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock. **Biotechnol. Biofuels**, v. 7, p. 26-41, 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MALLER, A.; VICI, A. C.; FACCHINI, F. D. A.; SILVA, T. M.; KAMIMURA, E. S.; RODRIGUES, M. I.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Increase of the phytase production by *Aspergillus japonicus* and its biocatalyst potential on chicken feed treatment. **J. Basic Microbiol.**, v. 53, p. 1-9, 2013.

MARQUES, S.; ALVES, L.; ROSEIRO, J.C.; GÍRIO, F. M. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. **Biomass Bioenerg.**, v. 32, p. 400-406, 2008.

MARTÍNEZ-MORALES, F.; BERTRAND, B.; NAVA, A. A. P.; TINOCO, R.; ACOSTA-URDAPILLETA, L.; TRAJO-HERNÁNDEZ, M. R. Production, purification and biochemical characterization of two laccase isoforms produced by *Trametes versicolor* grown on oak sawdust. **Biotechnol. Lett.**, v. 37, p. 391-396, 2015.

MARTINI, C. **Isolamento, identificação e caracterização de linhagem de levedura quanto ao crescimento e fermentação utilizando meios sintéticos com pentoses e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.** 2012. 119 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2014.

MARTINI, C.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; CODATO, C. B.; BASTOS, R. G.; CECCATO-ANTONINI, S. A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 35., n. 8, p. 80, 2016.

MENON, V.; PRAKASH, G.; RAO, M. Enzymatic hydrolysis and ethanol production using xyloglucanase and *Debaromyces hansenii* from tamarind kernel powder: Galactoxyloglucan predominant hemicellulose. **J. Biotechnol.**, v. 148, p. 233-239, 2010.

MIELENZ, J. R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. **Opinion Microbiol.**, v. 4, p. 324-329, 2001.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOHANRAM, S.; AMAT, D.; CHOUDHARY, J.; ARORA, A.; NAIN, L. Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. **Sustan. Chem. Process**, v. 1, p. 1-15, 2013.

MONTE, J. R. **Sacarificação da polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar com celulasas e xilanases de *Thermoascus aurantiacus*.** 2009. 138 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

NAGAI, M.; SATO, T.; WATANABE, H.; SAITO, K.; KAWATA, M.; ENOI, H. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 60, p. 327-335, 2002.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAN, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues II: cassava bagasse. **Bioresour. Technol.**, v. 74, p. 81-87, 2000.

PELLEGRINI, V. O. A.; SERPA, V. I.; GODOY, A. S.; CAMILO, C. M.; BERNARDES, A.; REZENDE, C. A.; PEREIRA JUNIOR, N.; CAIRO, J. P. L. F.; SQUINA, F. M.; POLIKARPOV, I. Recombinant *Trichoderma harzianum* endoglucanase I (Cel7B) is a highly acidic and promiscuous carbohydrate-active enzyme. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, DOI 10.1007/s00253-015-6772-1, 2015.

PENG, L.; CHEN, Y. Conversion of paper sludge to ethanol by separate hydrolysis and fermentation (SHF) using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass Bioen.**, v. 35, p. 1600-1606, 2011.

PEREIRA, F. B., GUIMARÃES, P. M. R., TEIXEIRA, J. A., DOMINGUES, L. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimentation designs. **Bioresour. Technol.**, Essex, v. 101, p. 856-863, 2010.

PLACKETT, R.L.; BURMAN, J.P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, p. 305–325, 1946.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, F. H.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 67, p. 577-591, 2005.

POLIZELI, M. L. T. M. Properties and commercial applications of xylanases from fungi. In: RAI, M. K. (Org.) **Advances in Fungal Biotechnology**. Nova Delhi: I.K. international Publisher, 2009. p.82-101.

POLIZELI, M. L. T. M.; CÔRREA, E. C. P.; POLIZELI, A. M.; JORGE, J. A. Hydrolases from microorganisms used for degradation of plant cell wall and bioenergy. In: BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. (Ed.). **Routes to Cellulosic Ethanol**. New York: Springer, 2011. p. 115- 134.

POTTERS, G.; VAN GOETHEM, D.; SCHUTTE, F. Promising biofuel resources: lignocellulose and algae. **Nature Education**, v. 3, n. 9, p. 14. 2010.

PRASETYO, J.; NARUSE, K.; KATO, T.; BOONCHIRD, C.; HARASHIMA, S.; PARK, E. Y. Bioconversion of paper sludge to biofuel by simultaneous saccharification and fermentation using a cellulose of paper sludge origin and thermotolerant

Saccharomyces cerevisiae TJ14. **Biotechnol. Biofuels**, v. 4, n. 35, p. 1- 13, 2011.

PRASETYO, J.; PARK, E. Y. Waste paper sludge as a potential biomass for bio-ethanol production. **Korean J. Chem. Eng.**, v. 30, n. 2, p. 253-261, 2013.

REIS, V. R. **Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol**. 2011. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

RIBEIRO, L. F. C. **Estudo de enzimas do fungo *Malbranchea pulchella* para potencial aplicação em biorrefinaria**. 2014. 184 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

RIBEIRO, L. F. C., DE LUCAS, R. C., VITCOSQUE, G. L., RIBEIRO, L. F., WARD, R. J., RUBIO, M. V., DAMASIO, A. R. L., SQUINA, F. M., GREGORY, R. C., WALTON, P. H., JORGE, J. A., PRADE, R. A., BUCKERIDGE, M. S.; POLIZELI, M. L. T. M. A novel thermostable xylanase GH10 from *Malbranchea pulchella* expressed in *Aspergillus nidulans* with potential applications in biotechnology. **Biotechnol. Biofuels**, v.7, p.115, 2014.

RIZZATTI, A.C.S.; JORGE, J. A.; TERENCE, H.F.; RECHIA, C.G.V., POLIZELI, M.L.T.M. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 26, p.156-160, 2001.

RODRIGUES, M.I., IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos** (2 ed.) Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, Campinas. 2009.

ROY, B.; ARCHIBALD, F. Effects of kraft Pulp and Lignin on *Trametes versicolor* Carbon Metabolism. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, n. 6, p.1855-1863, 1993.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol. Adv.**, v. 37, p. 185-194, 2009.

SEGATO, F., DAMASIO, A. R. L., GONCALVES, T. A., MURAKAMI, M. T., SQUINA, F. M., POLIZELI, M. D. T. M., MORT, A. J.; PRADE, R. A. Two structurally discrete GH7-cellobiohydrolases compete for the same cellulosic substrate fiber. **Biotechnol. Biofuels**, v. 5, p.21, 2012.

SEGATO, F., BERTO, G. L., DE ARAUJO, E. A., MUNIZ, J. R.; POLIKARPOV, I. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Aspergillus terreus* endo-beta-1,4-glucanase from glycoside hydrolase family 12. **Acta Crystal.**, v. 70, p. 267-270, 2014.

SEGATO, F.; DAMÁSIO, A. R. L.; DE LUCAS, R. C.; SQUINA, F. M.; PRADE, R. A. Genomics review of holocellulose deconstruction by *Aspergilli*. **Microbiol. Mol. Biol. Review**, v. 78, p. 588-613, 2014.

SHEN, J.; AGBLEVOR, F. A. Ethanol production of simultaneous saccharification and fermentation from mixture of cotton gin waste and recycled paper sludge. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 34, p. 33-43, 2011.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; RAJASREE, K. P.; MATHEW, A.; GOTTUMUKKALA, L. D.; PANDEY, A. Properties of a major beta-glucosidase-BGL1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources. **Process Biochem.**, v. 46, p. 1521–1524, 2011.

SILVA, T.M. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. 2009. 216 p. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2009.

SILVA, J. C. R.; GUIMARÃES, L. H. S.; SALGADO, J. C. S.; FURRIEL, R. P. M.; POLIZELI, M. L. T. M.; ROSA, J. C.; JORGE, J. A. Purification and biochemical characterization of glucose-cellobiose-tolerant cellulase from *Scytalidium thermophilum*. **Folia Microbiol.**, v. 58, p. 561-568, 2013.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. 2009. 155 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto Butantan, São Paulo, 2009.

SOUZA, A. P.; LEITE, D. C. C.; PATTATHIL, S.; HAHN, M. G.; BUCKERIDGE, M. S. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. **Bioener. Res.**, v. 6, p. 564-579, 2013.

SORENSEN, H. R.; PEDERSEN, S.; MEYER, A. S. Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. **Enzyme Microb. Technol.**, v 40, p. 908-918, 2007.

SRINORAKUTARA, T.; SUTTIKUL, S.; BOONVITTHYA, N. Effect of different

pretreatment methods on enzymatic saccharification and ethanol production from sugarcane shoots and leaves. **J. Food Science Eng.**, v.3, p. 309-316, 2013.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes for fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 17, n. 1, p. 39-67, 1997.

SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, v. 81, p. 234-240, 1989.

TAN, I. S.; LEE, K. T.; Immobilization of β -glucosidase from *Aspergillus niger* on κ -carrageenan hybrid matrix and its application on the production of reducing sugar from macroalgae cellulosic residue. **Bioresour. Technol.**, v. 184, p. 386-394, 2015.

THONGPOO, P.; SRISOMSAP, C.; CHOKCHAICHAMNANKIT, D.; KITPREECHAVANICH, V.; SVASTI, J.; KONGSAEREE, P. T. Purification and characterization of a three β -glycosidases exhibiting high glucose tolerance from *Aspergillus niger* ASKU28. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.78, n. 7, p. 1167-1176, 2014.

TOF-SIMS 5. Disponível em: < https://www.iontof.com/download/IONTOF_TOF-SIMS_5_Brochure.pdf >. Acesso em: dez. 2015.

UNICA. Estimativa da safra 2015/2016. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/documentos/>>. Acesso em: jul. 2015.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiol.**, v. 153, p. 895-905, 2010.

VIIKARI, L., KANTELINEN, A., BUCHERT, J.; PULS, J. Enzymatic accessibility of xylans in lignocellulosic materials. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.41, p.124-129, 1994.

VILLENA, M. A.; IRANZO, J. F. U.; GUNDLLAPALLI, S. B.; OTERO, R. R. C.; PÉREZ, I. B. Characterization of an exocellular beta-glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 39, p. 229–234, 2006.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHEKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotech. Adv.**, v.30, p. 1458-1480, 2012.

VERMA, D.; KANAGARAJ, A.; JIN, S.; SINGH, N. D.; KOLATTUKUDY, P. E.; DANIELL, H. Chloroplast-derived enzyme cocktails hydrolyse lignocellulosic biomass and release fermentable sugars. **Plant Biotechnol. J.**, v.8, p. 332-350, 2010.

VILLELA, G.G.; BACILA, M. & TASTALDI, H. **Técnica e experimentos de bioquímica**. Ed. Guanabara Koogan, p. 523, 1973.

WONGWILAIWALIN, S.; RATTANACHOMSRI, U.; LAOTHANACHAREON, T.; EURWILAICHITR, L.; IGARASHI, Y.; CHAMPREDA, V. Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 47, p. 283, -290, 2010.

YUAN, S. F.; WU, T. H.; LEE, H. L.; HSIEH, H. Y.; LIN, W. L.; YANG, B.; CHANG, C. K.; LI, Q.; GAO, J.; HUANG, C. H.; HO, M. C.; GUO, R. T.; LIANG, P. H. Biochemical characterization and structural analysis of a bi-functional cellulose/xylanase from *Clostridium thermocellum*. **JBC**, doi:10.1074/jbc.M114.604454, 2015.

XU, F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 924-928, 1997.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 88, p. 797-824, 2004.

ZHANG, J.; HEISS, C.; THORNE, P. G.; BAL, C.; AZADI, P. LYND, L. R. Formation of ethyl β -xylopyranoside during simultaneous saccharification and co-fermentation of paper sludge. **Enzyme Microbial Technol.**, v. 44, p. 196-202, 2009.

ANEXOS

MEIOS DE CULTIVO

Meio Batata Dextrose Agar (BDA)

BDA	3,9 g
Água deionizada q.sp.	100 mL
Autoclavar a 121° C por 15 minutos.	

Meio Segato Rizatti (SR)

Solução de sais [20x]	5 mL
Peptona	0,02 g
Extrato de levedura	0,45 g
Glucose	2,0 g
Água deionizada q.s.p.	100 mL
Autoclavar a 121° C por 15 minutos.	

Meio Khanna

Solução de sais de Khanna [20x]	5 mL
Extrato de levedura	0,1 g
Fonte de carbon	1,0 g
Água deionizada q.s.p.	100 mL
Autoclavar a 121° C por 15 minutos.	

Meio mínimo

Sais de nitrato (20x)	5 mL
Elementos traço (1000x)	0,1 mL
Glucose	1,0 g

Piridoxina	0,1 mL
Hepes 100 mM	2,383 g
Água destilada q.s.p	100 mL

Ajustar pH para 6,5.

Autoclavar a 121° C por 15 minutos.

Meio MDT modificado

Glucose	83 mM
Glutamato	5 mM
NaCl	5 mM
KH ₂ PO ₄	5 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 mM
CaCl ₂	0,1 mM
Succinato	10 mM
Elementos traços	1 mL
Tween 80	0,5%
Água destilada q.s.p.	1000 mL

SOLUÇÕES

Soluções utilizadas nos meios de cultura

Solução de sais [20x]

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,24 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g

Água deionizada q.sp. 100 mL

Solução de sais de Khanna [20x]

NH_4NO_3	2,0 g
KH_2PO_4	1,3 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,362 g
KCl	0,098 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,007 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0138 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0066 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0062 g
Água deionizada q.s.p.	100 mL

Sais de nitrato 20x

NaNO_3	120 g
KCl	10,4 g
MgSO_4	10,4 g
KH_2PO_4	30,4 g
Água destilada q.s.p	1 L

Adicionar algumas gotas de clorofórmio

Solução de elementos traço 1000x

ZnSO_4	2,2 g
H_3BO_3	1,0 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,5 g

FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
CoCl ₂ .5H ₂ O	0,16 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,16 g
Na ₂ MoO ₄ .4H ₂ O	0,11 g
Na ₂ EDTA	5,0 g
Água destilada q.s.p	100 mL

Ajustar pH para 6,5.

Adicionou-se algumas gotas de clorofórmio

Soluções utilizadas para SDS Gel de poliacrilamida

Corante Coomassie Blue

Coomassie Blue R 250	2,5 g
Metanol	450 mL
Ácido acético glacial	100 mL
Água Milli Q	450 mL

Solução descorante

Metanol	450 mL
Ácido acético glacial	100 mL
Água Milli Q	450 mL

Tampão de corrida SDS 10 X

Tris	25 mM
Glicina	192 mM

SDS	0.1%
-----	------

pH = 8,3

Tampão de amostra 2X

Tris/HCl pH 6,8	100 mM
-----------------	--------

SDS	4 %
-----	-----

Azul de bromofenol	0,2 %
--------------------	-------

Glicerol	20 %
----------	------

SDS Gel 12% (SDS-PAGE)

Água destilada	1,675 mL
----------------	----------

1,5 M Tris pH = 8,8	1,25 mL
---------------------	---------

SDS 10%	50 µL
---------	-------

Bis/Acrilamida 30%	2,0 mL
--------------------	--------

Persulfato de amônio 10%	25 µL
--------------------------	-------

TEMED	2,5 µL
-------	--------

Preparo Bis/Acrilamida:

Acrilamida	29,2 g
------------	--------

Bis-acrilamida	0,8 g
----------------	-------

Água milli Q q.s.p.	100 mL
---------------------	--------

Gel de Empilhamento 5 %

H ₂ O destilada	2,1 mL
----------------------------	--------

1,5 M Tris pH = 6,8	0,38 mL
---------------------	---------

SDS 10%	30 µL
---------	-------

Bis/Acrilamida 30%	0,5 mL
Persulfato de amônio 10%	30 µL
TEMED	3 µL