FERNANDA DE LIMA VALADARES

**Produção e uso de enzimas derivadas do fungo *Pleurotus ostreatus* na hidrólise de
bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermomecânico**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de Conversão de Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Ferraz

Edição reimpressa e corrigida

Lorena - SP
Setembro de 2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
Serviço de Biblioteca EEL/USP
Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP

Valadares, Fernanda de Lima

Produção e uso de enzimas derivadas do fungo *Pleurotus ostreatus* na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermomecânico/

Fernanda de Lima Valadares; orientador André Luis Ferraz. —Lorena —ed. reimpr., corr.— 2013.

122p.: fig.

Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de concentração: Conversão de Biomassa.) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. *Pleurotus ostreatus* 2. Hidrólise enzimática 3. Bagaços 4. Cana-de-açúcar 4. Pré-tratamentos 5. Celulases. I.Título. II. Ferraz, André Luis, Orient.

CDU – 577.15

*Dedico esse trabalho aos meus pais,
Alvaro e Preta, os melhores deste mundo.*

Agradecimentos

- Agradeço primeiramente Deus, por ter proporcionado a oportunidade para seguir esse caminho e chegar até aqui, me dando força e coragem para vencer os desafios.
- Ao meu orientador Prof. Dr. André Ferraz, por sua orientação sempre presente e exímia.
- Aos meus pais, Sebastiana e Álvaro Valadares, pelo apoio incondicional, amor e confiança.
- Aos meus irmãos, Breno e Marcelo, pelos conselhos, sempre construtivos, e pelo incentivo em todos os momentos.
- Aos técnicos do laboratório “Zé Moreira” e “Zé Cobrinha” pela amizade e ajuda sempre presente.
- As amigas Luísa, Mariah e Mariana pela companhia, incentivo e bons momentos de descontração.
- Aos amigos do laboratório de Ciências da madeira da EEL/USP, Thales, Angela, Dayelle, Omar, María Fernanda, Ana Paula, Fernando e Victor pelo companheirismo e ensinamentos.
- Aos colegas e funcionários do Departamento de Biotecnologia, tendo um agradecimento especial ao Germano, sempre disposto a ajudar e a compartilhar dos seus conhecimentos, obrigado!
- Aos amigos distantes, em especial Fabiano, Paola, Boeno, Livia, e Amanda, que sempre conseguiram se mostrar presentes em todos os meus momentos em Lorena.
- Às agências CNPq, Fapesp e CAPES pelo auxílio financeiro e USP pela oportunidade.
- À EEL-USP, pela oportunidade de realizar mais essa etapa.

"A ciência não é uma ilusão, mas seria uma ilusão acreditar que poderemos encontrar noutro lugar o que ela não nos pode dar."

(Sigmund Freud)

RESUMO

VALADARES, F. L. **Produção e uso de enzimas derivadas do fungo *Pleurotus ostreatus* na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermomecânico.** 2013. 122p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2013.

Fungos de decomposição branca atuam eficientemente na biodegradação de substratos altamente lignificados, como a madeira. Tal característica permite supor que esses organismos apresentem um sistema celulolítico com atividade diferenciada em substratos ricos em lignina. O presente trabalho avaliou o efeito da adição de enzimas derivadas do fungo de decomposição branca *Pleurotus ostreatus* em preparações de celulases comerciais durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana previamente submetido a tratamento quimiotermomecânico com sulfito alcalino. Duas cargas de sulfito alcalino foram empregadas nos pré-tratamentos: uma mais elevada de 10 g de Na₂SO₃ e 5 g de NaOH para cada 100g de bagaço, que gerou um substrato de baixa recalcitrância; e uma carga diminuída à metade da anterior, que originou um substrato de elevada recalcitrância. Primeiramente, a produção de endoglucanases (EG) em cultivos submersos de *P. ostreatus* foi avaliada em diferentes fontes de carbono, sendo a maior produção de EG (342 UI L⁻¹) verificada após 20 dias de cultivo em meio contendo bagaço de cana moído e carboximetilcelulose (CMC). Contudo, devido a CMC ser considerada um interferente nos ensaios de hidrólise do bagaço, optou-se por utilizar enzimas derivadas dos cultivos que empregaram somente bagaço de cana como fonte de carbono. Os experimentos de hidrólise empregaram cargas de enzimas correspondentes a 10FPU (carga alta) e 5FPU (carga média) de celulases derivadas de *Trichoderma reesei* ATCC 26921, misturadas com uma carga de 15 UI.g⁻¹ de β -glicosidase (BGL) derivadas de *Aspergillus niger*, para cada grama de bagaço. Para os experimentos de hidrólise que empregaram enzimas derivadas de *P. ostreatus* ajustou-se a carga de endoglucanase para que 50% da atividade fosse derivada de *T. reesei*, e 50% proveniente de *P. ostreatus*. A suplementação com enzimas de *P. ostreatus* causou uma alteração no teor das demais enzimas hidrolíticas, verificando-se valores de atividades de xilanases e celulases, com exceção das celobiohidrolases, superiores aos observados com o emprego da carga alta de enzimas comerciais. A conversão da celulose obtida durante a hidrólise dos bagaços pré-tratados mostraram que as enzimas de *P. ostreatus* proporcionaram valores de velocidade inicial de hidrólise equivalentes aos obtidos nos ensaios com carga alta de enzimas comerciais. Esse resultado foi atingido mesmo com uma carga de celobiohidrolases duas vezes inferior a existente nos ensaios com alta carga de enzimas comerciais, o que levou a considerar que as enzimas derivadas de *P. ostreatus* possam apresentar atividade celulolítica diferenciada. Além disso, o maior teor de enzimas xilanolíticas nos extratos de *P. ostreatus* resultou em maiores valores de conversão da xilana. A maior remoção de xilana também pode ter favorecido a maior conversão de celulose obtida mesmo com baixa carga de celobiohidrolases nas misturas reacionais, visto que a remoção da xilana associada à celulose aumentaria a disponibilidade do substrato às celulases. Contudo, a conversão de celulose a partir de 8-24h de hidrólise suplementada com enzimas de *P. ostreatus* foi ligeiramente inferior ao obtido na hidrólise com carga alta de celulases de *T. reesei*.

Palavras chaves: *Pleurotus ostreatus*. Hidrólise enzimática. Bagaço. Cana de açúcar. Pré-tratamento. Celulases.

ABSTRACT

VALADARES, F. L. **Production and use of enzymes derived from the fungus *Pleurotus ostreatus* in the hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated by chemithermomechanical process.** 2013. 122p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2013

White-rot fungi are able to degrade highly lignified substrates, such as wood. This characteristic allows us to assume that these organisms possess a cellulolytic system with differentiated activity on lignin-rich substrates. This study evaluates how cellulolytic enzymes produced by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* perform in the hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse. The sugar cane bagasse was initially pretreated with two chemical loadings of alkaline sulphite: 10 g of Na₂SO₃ and 5 g of NaOH per 100g of pulp (high chemical load), generating a substrate with low recalcitrance; and a load decreased to half of the previous one, which gave a more recalcitrant substrate. The production of endoglucanases (EG) in submerged cultures of *P.ostreatus* was evaluated using different carbon sources in the culture media. The highest EG production (342 IU L⁻¹) was observed after fungal growth for 20 days in the culture medium that contained sugarcane bagasse and carboxymethylcellulose (CMC) as carbon sources. However, residual CMC present in the culture extracts was considered to interfere in subsequent hydrolysis assays and we decided to use enzymes derived from the cultures that used only sugarcane bagasse as carbon source. The reference hydrolysis experiments were performed with enzyme loadings of 10 FPU (high loading) and 5 FPU (medium loading) from cellulases derived from *Trichoderma reesei* ATCC 26921 mixed with 15 UI of β-glucosidase (BGL) from *Aspergillus niger* (enzyme loadings expressed in units per gram of pretreated bagasse). For the hydrolysis experiments that used enzymes from *P. ostreatus*, the enzyme loading was adjusted in order to have 50% of original endoglucanase activity from *T. reesei* enzymes replaced by enzymes from *P. ostreatus* enzymes. The addition of *P. ostreatus* enzymes caused a change in the overall levels of hydrolytic enzymes present in the reaction medium. Xylanase and beta-glucosidase activities were higher than those observed in the commercial enzymes mixture. However, the cellobiohydrolase levels were the half of the original values from the commercial enzymes. The cellulose conversion during the hydrolysis of pretreated bagasses showed that the enzymes from *P. ostreatus* provided initial hydrolysis rate values similar to those obtained in tests with the high loading of commercial enzymes. This result was achieved even with a cellobiohydrolase loading twice lower than in the assays with high loading of commercial enzymes, which led to the conclusion that the enzymes derived from *P. ostreatus* can show differentiated cellulolytic activity. In addition, the higher content of xylanolytic enzymes in *P. ostreatus* extracts resulted in higher xylan conversion. The higher removal of xylan may have also resulted in the higher conversion of cellulose, even with low cellobiohydrolases in the reaction mixtures, since removal of xylan increases the accessibility of the cellulases to the substrate. However, the cellulose conversion after 8-24h hydrolysis supplemented with enzymes from *P. ostreatus* was slightly lower than that obtained in the hydrolysis with high loading of cellulases from *T. reesei*.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*. Enzymatic hydrolysis. Sugarcane bagasse. Pretreatment. Cellulases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de degradação enzimática da celulose por fungos. -----	26
Figura 2: Estrutura química da carboximetilcelulose -----	32
Figura 3: Produção de açúcares redutores e de glicose na sacarificação de bagaço de cana pré-tratado com ácido e com álcali usando extratos de <i>P.sanguineus</i> e enzima comercial Multifect CL. -----	54
Figura 4: Curva de produção de endoglucanases durante o cultivo de <i>P.ostreatus</i> em diferentes fontes de carbono. -----	70
Figura 5: Conversão de celulose e de xilana do bagaço de cana pré-tratado com carga alta e baixa de sulfito alcalino, durante a hidrólise com carga alta e carga média de misturas de enzimas comerciais. -----	82
Figura 6: Conversão de celulose e de xilana do bagaço de cana pré-tratado com carga alta e baixa de sulfito alcalino, durante a hidrólise com carga alta e carga média de celulases de <i>T.reesei</i> , e carga média de celulases de <i>T.reesei</i> suplementadas com extrato de <i>P.ostreatus</i> . -----	85
Figura 7: Conversão de celulose e de xilana do bagaço de cana pré-tratado com carga alta e baixa de sulfito alcalino, durante a hidrólise com reposição de β -glicosidases e xilanases em ensaios com carga média de celulases de <i>T. reesei</i> . -----	90
Figura 8: Conversão de celulose e de xilana do bagaço de cana pré-tratado com carga alta e baixa de sulfito alcalino, durante a hidrólise com reposição de proteína em ensaios com carga média de celulases de <i>T. reesei</i> . -----	91
Figura 9: Quantificação de açúcares redutores liberados nos ensaios de CMCase em diferentes diluições do extrato enzimático liofilizado de <i>P.ostreatus</i> . -----	109
Figura 10: Cinética de reação para atividade de β -glicosidases presente em extrato enzimático de <i>P.ostreatus</i> . -----	110
Figura 11: Cinética de reação para atividade de xilanases presente em extrato enzimático de <i>P.ostreatus</i> . -----	111
Figura 12: Cinética de reação para atividade de β -xilosidases presente em extrato enzimático de <i>P.ostreatus</i> . -----	112
Figura 13: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de FPAse para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de <i>T.reesei</i> . -----	113
Figura 14: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de CMCase para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de <i>T.reesei</i> . -----	114
Figura 15: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de β -glicosidases se para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de <i>T.reesei</i> . -----	115
Figura 16: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de celobiohidrolase se para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de <i>T.reesei</i> . -----	116
Figura 17: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de xilanase para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de <i>T.reesei</i> . -----	117
Figura 18: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de β -xilanase para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de <i>T.reesei</i> . -----	118
Figura 19: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de β -glicosidase para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de <i>A. niger</i> . -----	119
Figura 20: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de xilanase para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de <i>A.niger</i> . -----	120
Figura 21: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de β -xilosidase para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de <i>A.niger</i> . -----	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção de celulases por fungos ascomicetos em diferentes condições de cultivo. ----	38
Tabela 2: Atividades de endoglucanases e celulases totais presentes em cultivos submersos de fungos de decomposição branca em diferentes fontes de carbono. -----	42
Tabela 3: Genes pertencentes as famílias 5 e 61 de glicosil hidrolases em diferentes basidiomicetos.-----	48
Tabela 4: Atividades específicas de enzimas hidrolíticas presentes em preparações enzimáticas comerciais.-----	50
Tabela 5: Análise comparativa de atividades de celulases e hemicelulases presentes em extrato de <i>P.sanguineus</i> e Multifect CL.-----	53
Tabela 6: Atividade máxima de endoglucanase alcançadas durante o cultivo de <i>P.ostreatus</i> . ----	70
Tabela 7: Produção de endoglucanase em diferentes volumes de cultivo de <i>P.ostreatus</i> . -----	73
Tabela 8: Concentração, por ultrafiltração, de endoglucanase presente em extrato de cultivo de <i>P.ostreatus</i> em bagaço de cana. -----	74
Tabela 9: Atividades de endoglucanase após liofilização dos extratos enzimáticos concentrados por ultrafiltração. -----	75
Tabela 10: Concentração, por ultrafiltração, de endoglucanase por ultrafiltração em membrana de corte de 30 kDa.-----	75
Tabela 11: Atividade de celulases e hemicelulases presentes por grama de extrato liofilizado de cultivo de <i>P.ostreatus</i> em bagaço de cana. -----	78
Tabela 12: Atividade de celulases e hemicelulases presentes em preparações enzimáticas comerciais.-----	78
Tabela 13: Composição química do bagaço de cana de açúcar submetido a diferentes severidades de pré-tratamento quimiotermodinâmico com sulfito/alcalino. -----	80
Tabela 14: Atividade de enzimas hidrolíticas presentes em cada ensaio de hidrólise em pequena escala do bagaço de cana. -----	82
Tabela 15: Dados de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e de velocidade inicial de reação quando o sistema hidrolítico era uma mistura de enzimas comerciais.-----	83
Tabela 16: Atividades de enzimas hidrolíticas presentes em cada ensaio de hidrólise com diferentes cargas de celulases comerciais e com mistura de enzimas comerciais suplementadas com extrato enzimático de <i>P.ostreatus</i> . -----	85
Tabela 17: Dados de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e de velocidade inicial de reação quando o sistema hidrolítico era um mistura de enzimas comerciais, com ou sem, suplementação com enzimas produzidas por <i>P.ostreatus</i> . -----	86
Tabela 18: Atividades de enzimas hidrolíticas presentes em cada ensaio de hidrólise com carga média de celulases de <i>T. reesei</i> complementada com enzimas acessórias e proteína. -----	90
Tabela 19: Atividades de enzimas hidrolíticas presentes em cada ensaio de hidrólise com carga média de celulases de <i>T.reesei</i> complementada com proteína (BSA). -----	91
Tabela 20: Dados de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e de velocidade inicial de reação quando o sistema hidrolítico era uma mistura de celulases de <i>T.reesei</i> suplementada com β -glicosidase, xilanase ou albumina.-----	92

ABREVIATURAS

AAD - Aril-álcool desidrogenases
AAO - Aril-álcool oxidase
AR - Açúcar redutor.
ABTS - Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico
BGL - Beta-glicosidase
BSA - Bovine Serum Albumin
CAZy - Carbohydrate active enzymes
CBH - Celobiohidrolases
CDH - Celobiose desidrogenase
CBM - Carbohydrate binding modules
CMC - Carboximetilcelulose
CTM - Chemithermomechanical
CSF - Canadian Standard Freeness
DNS - Dinitrosalicylic Acid
DP - Degree of polymerization
DS - Degree of substitution
EG - Endoglucanase
FPA - Filter paper activity
FPU - Filter paper unit
GH - Glicosil hidrolases
HEC - Hidroxietilcelulose
HPLC - High Performance Liquid Chromatography
IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry
pNPG - para-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo
pNPX - para-nitrofenil- β -D-xilanopiranosídeo
pNP - para-nitrofenol
LIP - Lignina peroxidases
MnP - Manganês peroxidase
QR - Quinonas redutases
VP - Peroxidases versáteis
UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. COMPOSIÇÃO, RECALCITRÂNCIA E PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.	19
2.2. FUNGOS DEGRADADORES DE MADEIRA.	23
2.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE CELULASES.	31
2.4. PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGOS.	35
2.5. CELULASES E OUTRAS ENZIMAS PRODUZIDAS POR FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO BRANCA: <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> COMO MODELO DE ESTUDO.	41
2.6. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA POR CELULASES DE FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO BRANCA	49
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E EMBASAMENTO TEÓRICO DA DISSERTAÇÃO.....	55
4. OBJETIVOS.....	57
5. MATERIAIS E MÉTODOS	58
5.1. FUNGO E PREPARO DO INÓCULO.....	58
5.2. PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES	58
5.3. OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO E CONCENTRADO	59
5.4. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	60
5.4.1. Atividade de Endoglucanases.	60
5.4.2. Atividade de β -glicosidase.	62
5.4.3. Atividade de Celobiohidrolases.	62
5.4.4. Atividade de Celulases Totais.	63
5.4.5. Atividade de β -D-xilanase.	64
5.4.6. Atividade de β – xilosidase.	64
5.5. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	64
5.6. ENSAIOS DE HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA PRÉ- TRATADO	65
5.7. CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO	67
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
6.1. OBTENÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO DE CULTIVO DE <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i>	68

6.1.1.Crescimento e produção de endoglucanases em cultivos de <i>P.ostreatus</i> em diferentes fontes de carbono	68
6.1.2.Produção de endoglucanases em diferentes volumes de cultivo de <i>P.ostreatus</i>	72
6.2.CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS DE CULTIVO DE <i>P.OSTREATUS</i> POR ULTRAFILTRAÇÃO.	74
6.3.CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS PRESENTES NO EXTRATO ENZIMÁTICO DE <i>P.OSTREATUS</i> E EM PREPARAÇÕES COMERCIAIS DE CELULASES.	77
6.4.HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO COM SULFITO ALCALINO. ..	80
6.5.ENSAIOS DE HIDRÓLISE COM ENZIMAS COMERCIAIS SUPLEMENTADOS COM ENZIMAS DERIVADAS DE <i>P.OSTREATUS</i>	84
6.6. ENSAIOS DE HIDRÓLISE SUPLEMENTADOS COM ENZIMAS ACESSÓRIAS.	89
7. CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS	98
APÊNDICE A	109
APÊNDICE B	113

1. INTRODUÇÃO

A biomassa celulósica é um recurso renovável que inclui uma ampla variedade de materiais, tais como os resíduos e sub-produtos agroindustriais, os restos de frutas e vegetais, a madeira e os resíduos da indústria de celulose e papel. Existe grande interesse para a utilização destas fontes de celulose como material de partida para a produção de etanol. O bagaço de cana corresponde a um destes sub-produtos agroindustriais que tem se destacado entre as biomassas devido a sua abundância, disponibilidade no interior das usinas sucro-alcooleiras e ao seu grande potencial energético. Para o aproveitamento integral desse material, é necessário que se realize uma ou mais etapas de pré-tratamento, a hidrólise do material pré-tratado e a conversão final dos monossacarídeos através da fermentação alcoólica. Muitas das etapas citadas anteriormente ainda dependem de estudos experimentais que permitam encontrar processos que sejam tecnicamente e economicamente viáveis (MENON; RAO, 2012; LIMAYEM et. al., 2012).

O presente trabalho aborda a hidrólise da celulose por celulasas. A hidrólise em questão pode ser afetada pela porosidade da parede celular onde está contida a celulose, pela cristalinidade da celulose, bem como pelos conteúdos de lignina e hemicelulose presentes na parede celular. Pré-tratamentos que visem a remoção de hemicelulose e lignina são essenciais para o aumento da porosidade dos materiais (ALVIRA et al., 2010). Um processo adequado para esta finalidade corresponde ao tratamento quimiotermomecânico da biomassa empregando sulfito alcalino como agente de deslignificação e remoção parcial da hemicelulose. Este é um processo amplamente empregado na indústria de celulose e papel, não como pré-tratamento, mas sim para a obtenção de polpas de alto rendimento. O uso deste processo faz-se em condições moderadas de reação, se comparada aos processos com ácidos, e neste caso, os principais resultados são a remoção parcial de lignina e hemicelulose, além do inchamento da fibra e a sulfonação da lignina residual (MENDES et al., 2011).

A hidrólise enzimática de substratos ricos em lignina residual, como é o caso dos materiais pré-tratados por processos quimiotermomecânicos com sulfito alcalino, é dificultada pela presença de lignina (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999) e há uma hipótese de que as enzimas hidrolíticas produzidas por fungos de decomposição branca são menos susceptíveis a este problema, pois, na natureza, estes fungos degradam de forma eficiente os polissacarídeos, mesmo na presença de lignina (FERRAZ, 2004). Os

fungos de decomposição branca produzem uma variedade de enzimas hidrolíticas e oxidativas. Suas principais enzimas hidrolíticas são endo-1,4- β -D-glucanase (EC 3.2.1.4), exo-1,4- β -D-glucanase (EC 3.2.1.91), e xilanase (EC 3.2.1.8). Estes fungos também secretam, uma ou mais, das três enzimas extracelulares que são essenciais para degradação da lignina: lignina peroxidase (EC 1.11.1.14), manganês-peroxidase (EC 1.11.1.13) e lacase (EC 1.10.3.2) (FERRAZ, 2004; KIRK; CULLEN, 1998). A produção destas enzimas usando resíduos lignocelulósicos como substrato de crescimento parece interessante uma vez que alguns deles podem conter concentrações significantes de carboidratos solúveis e indutores da síntese de enzimas (ELISASHVILI et al., 2009). Alguns estudos mostram que o sistema lignolítico de fungos de decomposição branca agem em cooperação com o sistema celulolítico, como é o caso da redução de quinonas oriundas de degradação da lignina pela celobiose desidrogenase (HENRIKSSON; JOHANSSON; PETTERSSON, 2000), e isso sugere que as enzimas celulolíticas produzidas por esses organismos são capazes de manter atividade hidrolítica na presença de lignina.

Considerando que fungos de decomposição branca teoricamente produzem celulasas mais adaptadas à degradação de substratos lignocelulósicos com elevado teor de lignina, é justificável o estudo de tais enzimas com o propósito de se desenvolver novas formulações de coquetéis enzimáticos para a sacarificação da biomassa celulósica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.Composição, recalcitrância e pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

A biomassa lignocelulósica representa uma matéria prima promissora para a produção de insumos químicos com diversas aplicações. No entanto, trata-se de um material recalcitrante tanto à ação de ácidos como de enzimas hidrolíticas, o que limita as possibilidades de conversão de seus polissacarídeos em monômeros fermentescíveis (FENGEL; WEGENER, 1989).

A recalcitrância dos materiais lignocelulósicos está associada a sua composição que é essencialmente de natureza polimérica, e ao fato dos polímeros em questão constituírem parte de uma densa e compacta parede celular, cuja degradação química ou enzimática é dificultada. Estes materiais são constituídos por três principais frações: celulose, hemicelulose e lignina. Juntas essas frações representam mais de 90% da massa seca do material (FENGEL; WEGENER, 1989; MILAGRES; CARVALHO; FERRAZ, 2011).

Celulose é o principal componente da parede celular vegetal e serve como material estrutural, através do qual as plantas terrestres obtêm resistência para ficar na posição vertical. A celulose pode ser brevemente descrita como um polímero linear de alta massa molar, constituído exclusivamente de unidades de anidroglicopirranose, unidas por ligações glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 4). O grau de polimerização da celulose contida na parede celular dos vegetais é da ordem de 7000 a 15000 (FENGEL; WEGENER, 1989). A estrutura linear conferida pelas ligações glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 4) permite a formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, que leva a agregações da cadeia de celulose em fibrilas elementares contendo regiões mais ordenadas (regiões cristalinas) e menos ordenadas (regiões amorfas). Essas estruturas são insolúveis na maioria dos solventes, inclusive água, e fazem com que a celulose seja relativamente resistente à degradação microbiana. As microfibrilas formadas por cadeias de celulose, por sua vez, estão envolvidas por hemicelulose e lignina compondo uma matriz que fornece rigidez e resistência à parede celular dos vegetais lignificados (FENGEL; WEGENER, 1989; MILAGRES; CARVALHO; FERRAZ, 2011).

A hemicelulose é um polissacarídeo que difere da celulose por apresentar cadeias moleculares mais curtas, podendo conter grupos pendentes. A existência de grupos

pendentes na cadeia polissacarídica principal faz com que a hemicelulose não apresente regiões cristalinas. Alguns açúcares típicos que dão origem à cadeia principal são glicose, manose e xilose, enquanto que arabinose, galactose, ácido 4-O-metil-glucurônico e grupos acetil são comumente encontrados como grupos pendentes. Em gramíneas, como a cana de açúcar, a principal hemicelulose é a 4-O-metil-glucuranoarabinoxilana (AKIN, 2007; PANDEY et al., 2000).

A lignina é a principal porção não polissacarídica presente na parede celular vegetal em plantas lignificadas. É uma macromolécula complexa formada a partir da polimerização radicalar de alcoóis cinâmílicos (álcool p-cumárico, coniferílico e sinapílico). A baixa polaridade relativa das unidades fenil-propano torna a lignina hidrofóbica o que confere maior resistência à parede celular vegetal no que diz respeito à absorção de água e a consequente possibilidade de degradação microbiana e enzimática. Em gramíneas, a lignina pode ainda formar ligações covalentes com a hemicelulose, através de um éster dos grupos arabinosil com ácido ferúlico ou cumárico que se liga então à lignina através do oxigênio da posição 4 na forma de um éter (LAM; IYAMA; STONE, 1994; MASARIN et al., 2011).

Mesmo presente em quantidades menores do que a fração polissacarídica, a lignina confere limitação suficiente para dificultar, ou mesmo impedir completamente, a atuação microbiana sobre os materiais lignocelulósicos. O efeito protetor conferido pela lignina esta baseado em sua hidrofobicidade e na sua distribuição topoquímica no interior da parede celular, impregnando os polissacarídeos e minimizando assim a porosidade da parede. Estudos microscópicos mostram que a parede celular vegetal é subdivida em parede primária e parede secundária. A distribuição de celulose, hemicelulose e lignina varia consideravelmente entre as camadas da parede celular. A parede secundária é dividida em regiões S1, S2 e S3, sendo que a camada S2 é a mais espessa e com maior conteúdo de celulose. Essas regiões são formadas por microfibrilas arranjadas em diferentes orientações, de acordo com a característica de cada região. Entre as diversas células, há ainda uma fina junção composta essencialmente por lignina que é denominada de lamela média (FENGEL; WEGENER, 1989; MILAGRES; CARVALHO; FERRAZ, 2011).

A complexidade estrutural de materiais lignocelulósicos, mencionada anteriormente, consiste em um dos principais obstáculos econômicos e técnicos para a produção de combustíveis e outros insumos químicos baseados em lignocelulósicos. A conversão enzimática da biomassa tem sido considerada uma estratégia atraente devido à possibilidade de se alcançar rendimentos de sacarificação próximos aos teóricos.

Entretanto, processos prévios de pré-tratamento são imprescindíveis para aumentar a susceptibilidade dos lignocelulósicos à conversão enzimática e assim, permitir a obtenção de elevados rendimentos de hidrólise (MENON; RAO 2012; WYMAN et al., 2005).

Pré-tratamentos para a biomassa lignocelulósica incluem métodos químicos, mecânicos, biológicos e suas várias combinações (WYMAN et al., 2005). Cada procedimento difere em relação ao mecanismo de ação que induz modificações químicas ou físicas na estrutura vegetal com a finalidade de aumentar o acesso de enzimas hidrolíticas à celulose (MILAGRES; CARVALHO; FERRAZ, 2011).

Reagentes químicos que incluem ácidos e/ou bases são usados para aumentar a porosidade da parede celular através da remoção de lignina e/ou hemicelulose, além de reduzir o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose. Uma estratégia amplamente reportada na literatura é o pré-tratamento com ácido diluído (tipicamente H_2SO_4) em altas temperaturas, seguida ou não por rápida descompressão (explosão), para a hidrólise por catálise ácida da hemicelulose. Neste caso, a lignina é apenas redistribuída no interior da parede celular devido ao amolecimento induzido por calor e por reações de despolimerização e repolimerização. O aumento do volume dos poros e da área superficial pela remoção da hemicelulose e a redistribuição da lignina facilitam o acesso das enzimas à porção celulósica da biomassa (MENON; RAO 2012; MILAGRES; CARVALHO; FERRAZ, 2011; WYMAN et al. 2005).

Já pré-tratamentos alcalinos, usando bases como hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e amônio, apresentam como principal efeito a remoção da lignina presente na biomassa, a remoção parcial de hemicelulose, o entumescimento das microfibrilas de celulose e o consequente aumento da reatividade dos polissacarídeos remanescentes. Tratamentos alcalinos também promovem a remoção de extrativos e de grupos pendentes da hemicelulose ligados na forma de éster, tais como as acetilas e no caso das gramíneas os ácidos ferúlico e cumárico, o que causa um aumento na acessibilidade de enzimas à superfície da celulose e da hemicelulose (MENON; RAO 2012; MOSIER et al., 2005; MENDES et al., 2011; LAM; IYAMA; STONE, 1994)

Pré-tratamentos que combinam princípios físicos e químicos geralmente representam a melhor opção para o fracionamento de lignocelulósicos. Métodos mecânicos, como a moagem, causam a redução do tamanho das partículas e da cristalinidade do material a fim de aumentar a área superficial e diminuir o grau de polimerização da celulose, aumentando assim a reatividade do material pré-tratado a enzimas hidrolíticas (ALVIRA et al., 2010).

Menos considerados são pré-tratamentos biológicos, que empregam micro-organismos, principalmente fungos de decomposição branca com capacidade de degradar seletivamente lignina e/ou hemicelulose presente em lignocelulósicos. A principal desvantagem no desenvolvimento de métodos biológicos é a baixa taxa de hidrólise se comparado a outras tecnologias, além da necessidade de controle do crescimento dos micro-organismos e o longo período de pré-tratamento que é da ordem de 15 a 30 dias (MENON; RAO 2012; ALVIRA et al., 2010; SALVACHÚA et al., 2011).

Entretanto, nem todos os métodos de pré-tratamento estão suficientemente desenvolvidos para ser técnico ou economicamente viáveis para o uso em processos de larga escala destinados à produção de etanol celulósico, por exemplo. Entre muitos processos estudados, um particularmente foi empregado para gerar os substratos utilizados na presente dissertação. Trata-se do processo de pré-tratamento quimiotermomecânico que emprega sulfito alcalino para a remoção parcial de lignina e hemicelulose (MENDES et al., 2011).

Processos quimiotermomecânicos são amplamente empregados na indústria de celulose e papel para a obtenção de polpas de alto rendimento, sendo tal técnica recentemente sugerida para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (ZHU et al., 2009; MENDES et al., 2011). Quando o processo é combinado com o uso de reagentes sulfito/alcalino, a lignina sofre sulfonação, o que pode dar origem a lignosulfonados solúveis em água ou fragmentos de lignina residual com características hidrofílicas. Essa alteração na hidrofobicidade da lignina pode ocasionar o inchamento da fibra através da retenção de água. As condições alcalinas também ocasionam a remoção de hemiceluloses de baixa massa molar, permanecendo no material pré-tratado a celulose e as hemiceluloses mais resistentes, juntamente com parte da lignina (ZHU et al., 2009; MENDES et al., 2011).

O trabalho de Mendes et al. (2011) avaliou o efeito do tratamento quimiotermomecânico em condições alcalinas na deslignificação do bagaço de cana para a subsequente sacarificação enzimática. O uso de condições amenas de tratamento alcalino (NaOH) e sulfito alcalino (NaOH/Na₂SO₃) alcançou uma remoção de 33% e de 53% da lignina inicial, e de 13% e 29% da hemicelulose, respectivamente. Já o rendimento de sacarificação alcançado foi da ordem de 85% na hidrólise do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino; conversão maior do que os 50% alcançado na hidrólise do substrato pré-tratado somente em condições alcalinas. O baixo conteúdo de lignina e o aumento da

hidrofilia do material pré-tratado com sulfito alcalino foram indicados como a causa do aumento da eficiência de hidrólise enzimática (MENDES et al., 2011).

2.2.Fungos degradadores de madeira.

A biodegradação completa de um determinado material lignocelulósico é um processo lento, que pode demandar meses, anos ou mesmo décadas, dependendo da natureza estrutural e química do material, das condições ambientais e da biodiversidade microbiana existente. Em ecossistemas florestais, a decomposição da madeira é principalmente decorrente da ação de insetos (incluindo térmitas, um dos agentes mais destrutivos da madeira nos trópicos e sub-trópicos) e da colonização sucessiva por bactérias e fungos. Dentre os organismos degradadores de madeira, os fungos são responsáveis por um dos mais importantes ciclos do carbono na natureza, devido à capacidade única de decomposição da parede celular vegetal lignificada (LEVY, 1987).

Dois grupos de fungos filamentosos, pertencentes predominantemente à classe Basidiomycetes, são reconhecidos como os organismos mais efetivos na biodegradação da biomassa vegetal: fungos de decomposição branca e fungos de decomposição parda ou castanha. A classificação desses fungos foi baseada principalmente no aspecto macroscópico apresentado pelo material lignocelulósico (especialmente a madeira) quando decomposto por esses organismos (BLANCHETTE, 1991; FERRAZ, 2004).

Os fungos de decomposição branca são caracterizados por sua capacidade de degradar celulose, hemicelulose e lignina. A decomposição por esses fungos pode se dar de duas maneiras distintas. A mais típica envolve a remoção simultânea dos três principais componentes de materiais lignocelulósicos, e a menos frequente, envolve a remoção seletiva da lignina e hemicelulose, mantendo a celulose praticamente intacta. A remoção da lignina faz com que materiais decompostos por esses fungos adquiram uma cor esbranquiçada, e sejam facilmente rompidos no sentido da fibra. Os fungos de decomposição parda, por sua vez, são capazes de causar somente uma modificação parcial na lignina, e degradam principalmente a porção polissacarídica do material vegetal, deixando um substrato residual rico em lignina, de cor marrom e de aparência quebradiça (BLANCHETTE, 1991; FERRAZ, 2004).

Embora somente fungos de decomposição branca e parda possam degradar extensivamente a madeira, alguns Ascomicetos e fungos mitosporicos podem colonizar a madeira (LEVY, 1987; MARTÍNEZ et al., 2005). São normalmente classificados como fungos de decomposição branda ou mole, e são capazes de degradar lignina e polissacarídeos, porém de forma mais lenta, levando a mudanças nas propriedades mecânicas da madeira. A degradação por esses fungos geralmente se limita a superfície do material, e são comumente encontrados em condições ambientais extremas, tais como alta ou baixa umidade (KIRK; CULLEN, 1998; MARTÍNEZ et al., 2005).

Devido à elevada massa molar e insolubilidade dos componentes, o substrato lignocelulósico só pode ser degradado no meio extracelular, o que demanda a secreção de enzimas que atuam na conversão de polissacarídeos e lignina em pequenos compostos que são suscetíveis ao metabolismo intracelular do fungo. As hifas fúngicas invadem as células vegetais e se instalam ao longo do lúmen, onde podem provocar a despolimerização dos componentes da parede da célula vegetal de duas formas distintas. A primeira forma provoca a diminuição em espessura da parede celular de forma irregular, por um processo de “escamação” progressiva da parede no sentido lúmen-lamela média; a segunda envolve a remoção de lignina e polioses sem que haja a erosão da parede celular vegetal, mantendo a morfologia original (FERRAZ, 2004; KIRK; CULLEN, 1998). Os distintos mecanismos envolvidos na degradação do material vegetal ainda não estão claramente elucidados, principalmente no que diz respeito a forma não erosiva de decomposição da parede celular. Vários trabalhos propõem a existência de compostos de baixa massa molar, capazes de penetrar na parede celular e atuar nos estágios iniciais de biodegradação da madeira (FERRAZ, 2004; KEREM; JENSEN; HAMMEL, 1999; VARELA; MESTER; TIEN, 2003).

Outro aspecto fundamental a ser considerado no processo de degradação de materiais lignocelulósicos por microrganismos é o modo de ação de enzimas extracelulares do complexo hidrolítico e oxidativo. O sistema hidrolítico é composto por celulasas e hemicelulasas responsáveis pela degradação da porção polissacarídica do material vegetal. Já a degradação de lignina tem como base um sistema enzimático capaz de oxidar ligações carbono – carbono de maneira inespecífica, superando dessa forma a complexa e irregular estrutura química da lignina. A degradação da lignina é realizada por peroxidases e oxidases que atuam através da geração de radicais livres e formação de compostos de baixa estabilidade que sofrem uma variedade de reações de clivagem espontânea (FERRAZ, 2004; KIRK; CULLEN, 1998).

A eficiente degradação da celulose requer a ação sinérgica de três principais tipos de enzimas hidrolíticas, que clivam ligações glicosídicas β -1 $\rightarrow$ 4 pela adição de uma molécula de água. Os principais grupos destas enzimas estão descritos a seguir.

Endoglucanases (EG - EC 3.2.1.4): hidrolisam ligações glicosídicas, particularmente em regiões amorfas da celulose, expondo novos terminais livres que serão locais de atuação das exoglucanases;

Exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH - EC 3.3.1.91): hidrolisam ligações glicosídicas das pontas de cadeia de celulose, produzindo celobiose como principal produto. Estas enzimas podem ainda ser divididas em dois tipos, CBH I que atuam sobre terminais redutores, e CBH II que hidrolisam terminais não redutores da celulose;

β -glicosidases (BGL - EC 3.2.1.21): clivam a molécula de celobiose em duas unidades de glicose.

Em adição às enzimas celulolíticas descritas acima, uma quarta enzima, a celobiose desidrogenase (CDH - EC 1.1.99.18), atua sobre celobiose, oligômeros de glicose e celulose, oxidando o terminal redutor. O exato papel da CDH *in vivo* não é completamente conhecido, mas sabe-se que atua na remoção da celobiose, que é um inibidor da CBH, e tem capacidade de utilizar quinonas como aceptor de elétrons, interligando dessa forma, os complexos celulolítico e ligninolítico (FERRAZ, 2004; KIRK; CULLEN, 1998).

Trabalhos recentes estão sendo desenvolvidos na identificação do papel de enzimas oxidativas na degradação de polissacarídeos. Enzimas atualmente classificadas como sendo pertencentes à família 61 das glicosil hidrolases (GH61) foram caracterizadas como metaloproteínas capazes de clivar ligações glicosídicas por via oxidativa na superfície da celulose cristalina. A classificação dessas enzimas foi atualizada, pois não se tratam efetivamente de glicosil hidrolases. Atualmente este grupo de enzimas tem sido classificado como mono-oxigenases líticas de polissacarídeos dependentes de cobre (do inglês "copper dependent lytic polysaccharide monooxygenases - LPMOs). Trabalhos com as proteínas GH61 derivadas dos fungos ascomicetos *Thermoascus aurantiacus* e *Neurospora crassa* mostram que estas enzimas podem causar a quebra da cadeia de celulose pela oxidação das moléculas de anidroglicopiranosose nos carbonos C1 ou C4, formando assim novos terminais para a ação das CBHs. A oxidação do C6 em cadeias de celulose também foi descrita. O mecanismo catalítico da GH61s é um assunto de intensa pesquisa e especulações. Contudo, sabe-se que a ação dessas enzimas é dependente da presença de íons cobre, oxigênio molecular e um doador externo de elétrons. Estudos indicam que as GH61s atuem em conjunto com as CDHs, que teriam a função de doadores

de elétrons. No caso da degradação de substratos lignocelulósicos, GH61 pode obter elétrons devido à degradação da lignina, mostrando a participação da mesma em ciclos oxido redutores (HARRIS et al., 2010; HORN et al., 2012; WESTERENG et al. 2011). A Figura 1 mostra a ação sinérgica dos diferentes grupos de enzimas na degradação da cadeia de celulose.

Figura 1: Esquema de degradação enzimática da celulose por fungos (reproduzido de Horn et al., 2012).

O modelo de biodegradação de celulose foi formulado principalmente com base em estudos realizados com o complexo celulolítico do ascomiceto *Trichoderma reesei*. Tal espécie recebe grande atenção devido a sua capacidade de secretar grandes quantidades dos diferentes grupos de celulases e solubilizar eficientemente celulose cristalina. Embora dez celulases (oito endoglucanases e duas celobiohidrolases) pertencentes a diferentes famílias de glicosil hidrolases terem sido identificadas no genoma de *T. reesei*, somente quatro são usualmente secretadas em grande quantidade por esse fungo: CBH I (Cel7A) - 54 kDa, CBH II (Cel6A) - 49 kDa, EG I (Cel7B) - 48 kDa, e EG II (Cel5A) - 44kDa. Em menores quantidades são detectadas três endoglucanases (EG III - V) com menor massa molar (entre 24 a 35 kDa), e uma β -glicosidase (78 kDa) extracelular que está associada à parede celular. (VINZANT et al., 2001; GUSAKOV, 2011).

Dado a ação das celulases sobre celulose ser um processo de catálise heterogênea, um pré-requisito para que ocorrência da hidrólise é a adsorção das enzimas ao substrato. Celobiohidrolases e endoglucanases podem apresentar-se associadas a estruturas não catalíticas designadas CBMs (“carbohydrate-binding modules”), que promovem a ligação da enzima ao substrato, aumentando dessa forma a concentração da enzima na superfície da celulose (Figura 1). A remoção dessas estruturas não afeta a eficiência da hidrólise de substratos solúveis. No entanto, a ação da CBH em moléculas de celulose insolúvel é

reduzida consideravelmente na ausência de CBMs. Estudos com CBH I de *T.reesei* demonstram que o CBM tem preferência por regiões cristalinas do polímero de celulose, de caráter menos hidrofílico. Além das celobiohidrolases (CBH I - II) também estão presentes CBM em todas as EGs produzidas por *T. reesei*, exceto a EG III. Diferente dos dois grupos anteriores, as β -glicosidases não possuem CBM (ZHANG; LYND, 2004; CHUNDAWAT et al., 2011).

Já entre os fungos de degradação branca, a espécie *Phanerochaete chrysosporium* é a mais amplamente caracterizada, sendo o primeiro basidiomiceto de decomposição da madeira a ter o genoma sequenciado. Tal fato promoveu grande avanço, por meio de métodos computacionais e proteômicos, na identificação de componentes individuais do seu complexo celulolítico (MARTINEZ et al., 2004; BALDRIAN; VALÁSKOVÁ, 2008, WYMELENBERG et. al. 2010). O sistema celulolítico de *P. chrysosporium* é descrito como sendo constituído por no mínimo três EGs, três CBHs e múltiplas BGLs. Duas das endoglucanases típicas, EG38 e EG44 (o número mostrado após o símbolo EG indica a massa molar da proteína em kDa), pertencem a família 7 das glicosil hidrolases e apresentam-se associadas a CBMs. Já a terceira EG, com 28 kDa, pertence a família 12 das GH e não possui CBM, sendo que se supõe que catalisam a hidrólise de regiões amorfas da celulose que não são acessíveis às EGs de maior massa molar. As celobiohidrolases são constituídas por CBH58 e CBH62 que liberam celobiose de terminais redutores da celulose e seus CBMs estão localizadas na região carboxi terminal da proteína, enquanto que a CBH50 cliva terminais não redutores e apresenta seu CBM localizado na região amino terminal. Diferente de *T.reesei* que possui aparentemente uma única BLG, *P. chrysosporium* apresenta um arranjo de isoenzimas com atividade de BGLs, que podem ser extracelulares, intracelulares ou associadas à parede celular, e que apresentam seu tamanho variando de 45 a 182 kDa (BALDRIAN; VALÁSKOVÁ, 2008; KIRK; CULLEN, 1998).

No caso dos fungos de decomposição parda, em geral, se observa uma deficiência na produção de CBH, o que limita a degradação da celulose cristalina pela via enzimática. Contudo, estudos evidenciam a existência de endoglucanases processivas com potencial de substituir a ausência de CBH em algumas espécies de fungos, como *Fomitopsis palustris* (YOON et al., 2007) e *Gloeophyllum trabeum* (COHEN; SUZUKI; HAMMEL, 2005). Estas enzimas clivam a celulose internamente, mas também liberam oligossacarídeos solúveis antes de se separar do polissacarídeo e, assim, agem como uma combinação de endoglucanase e celobiohidrolase (BALDRIAN; VALÁSKOVÁ, 2008). O trabalho realizado por Cohen, Suzuki e Hammel (2005) demonstrou que a principal enzima

extracelular produzida por *G. trabeum* cultivado em Avicel é uma endoglucanase processiva denominada Cel5A, pertencente à família 5 das GHs, e que apresenta atividade em celulose cristalina. Além da degradação enzimática, há evidências de que fungos de decomposição parda possam produzir compostos de baixa massa molar que permitem a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} e geração de radicais hidroxilas via reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$), que irão atuar na oxidação e degradação da celulose (FERRAZ, 2004; VARELA; MESTER; TIEN, 2003).

Um estudo recente reportado por Zheng e Ding (2013) também descreve a existência de endoglucanase processiva no complexo celulolítico do fungo de decomposição branca *Volvariella volvaceis*. Apesar do sistema celulolítico desse fungo incluir CBHs, EGs e BGLs, uma isoforma da EG, denominada EG1, contém um domínio catalítico da família 5 das GHs, e apresenta capacidade de agir processivamente em substratos insolúveis, como papel de filtro, exibindo ambas as atividades “endo” e “exo” hidrolíticas. Assim como outras celulasas, EGs processivas geralmente apresentam-se associadas a CBMs. Tais estruturas exercem um papel importante em propriedades de adsorção e desorção de endoglucanases processivas no substrato celulósico. Por exemplo, EG1 de *V. volvaceis* apresenta-se ligada a um CBM da família 1, e a avaliação da remoção da CBM1 ou inserção de CBMs adicionais à EG1 ocasiona a diminuição da processividade característica da enzima (ZHENG; DING, 2013).

As hemicelulasas também atuam de forma hidrolítica como as celulasas. Entretanto, devido a maior variedade de tipos de ligação nas polioses, a completa degradação desses polímeros aos respectivos monômeros requer um sistema com uma maior variedade de enzimas, que irão atuar na cadeia principal e nos grupos pendentes. Desta forma, as hemicelulasas são classificadas de acordo com sua ação em distintos substratos, sendo que xilanases hidrolisam ligações glicosídicas entre unidades de xilose, mananases atuam sobre ligações entre moléculas de manose, além das enzimas específicas que atuam sobre ligações dos grupos pendentes ligados ao polímero principal, tais como as glucuronidasas, acetil esterases, arabinofuranosidasas e as ferúlico/p-cumárico esterases (FERRAZ, 2004; KIRK; CULLEN, 1998).

Grande parte dos estudos relacionados às hemicelulasas é direcionada ao grupo de enzimas de degradação da xilana, devido a esse substrato ser o principal heteropolissacarídeo presente em materiais vegetais. A estrutura da xilana pode diferir grandemente dependendo da sua origem, mas apresenta sempre uma estrutura com unidade de D - anidro-xiloses unidas por ligações β (1 - 4). Dessa forma, um complexo enzimático é

responsável pela completa hidrólise da xilana, mas as principais enzimas envolvidas são a endo-1,4- β -xilanasas (EC 3.2.1.8) e as β - xilosidases (EC 3.2.1.37). Embora exo-xilanasas (exo-1,4- β -xylanases; EC 3.2.1.37) sejam referidas em alguns estudos, o seu modo de ação e métodos de purificação ainda não se encontram descritos na literatura. Endo-xilanasas são bem caracterizadas e mostram preferência pela clivagem de ligações internas da xilana. β - xilosidases possuem ação semelhante às BGLs, e causam a hidrólise de ligações β (1 - 4) em xilo-oligosacarídeos e aril-xilopiranosídeos (BISARIA, GHOSE, 1981). Xilanasas pertencem usualmente às famílias 10 e 11 das glicosil hidrolases, tendo as xilanasas da família GH10 massa molar de aproximadamente 35 kDa e as da família GH11 massa molar em torno de 22 kDa (SERPA; POLIKARPOV, 2011).

Fungos filamentosos apresentam capacidade de secreção de uma ampla variedade de xilanasas, e aqueles pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Trichoderma* são os organismos mais estudados em relação a produção dessas enzimas (SERPA; POLIKARPOV, 2011). Por outro lado, menor atenção tem sido dada às hemicelulases produzidas por basidiomicetos sendo, contudo, evidente que devido à capacidade de degradação completa dos componentes da madeira e de crescimento em substratos hemicelulósicos, fungos de decomposição da madeira possuem sistemas enzimáticos eficazes, capazes de degradar a hemicelulose (KIRK; CULLEN, 1998).

Um requisito para ganhar acesso à celulose e hemicelulose presentes na biomassa vegetal é a superação da barreira representada pela lignina. Os fungos de decomposição branca são os organismos mais eficientes na degradação da lignina e, por isso, seus sistemas ligninolíticos têm sido amplamente estudados. A lignina pode ser degradada por diferentes combinações de enzimas oxidativas extracelulares. Entre elas se destaca o estudo e caracterização das lignina peroxidases (LiP - EC 1.11.1.14) que pertencem a família das oxidoredutases que utilizam peróxido de hidrogênio como aceptor de elétrons. Este grupo de enzimas possui uma elevada capacidade oxidativa o que lhes confere capacidade de reagir com unidades não fenólicas na lignina. Um segundo grupo de peroxidases compreende as manganês peroxidases (MnP - EC 1.11.1.13) que são similares às LiPs, porém são dependentes de Mn^{2+} . Este grupo de enzimas apresenta uma menor capacidade oxidativa se comparado à LiP, sendo capazes de oxidar diretamente somente estruturas fenólicas. Um terceiro grupo de oxidoredutases envolvido na degradação de lignina compreende as lacases (EC 1.10.3.2). Neste caso, são cuproproteínas não dependentes de peróxido que podem oxidar estruturas fenólicas formando radicais fenoxila. Na presença de ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico)

ou outros mediadores sintéticos, as lacases são capazes de oxidar compostos não fenólicos (FERRAZ, 2004). Um tipo particular de enzima ligninolítica foi descrito em espécies do gênero *Pleurotus* e alguns outros fungos de decomposição branca. Trata-se de um grupo de peroxidases, denominado como peroxidases versáteis (VPs). As VPs são enzimas capazes de oxidar tanto Mn^{2+} e substratos fenólicos quanto substratos não fenólicos, combinando assim, propriedades catalíticas da MnP e LiP, respectivamente (MARTINEZ et al., 1996; MARTÍNEZ et al. 2005).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) necessário para a atuação das peroxidases pode ser gerado, *in situ*, pela ação de enzimas intracelulares como a glicose oxidase e a metanol oxidase, que utilizam glicose e metanol (provenientes da biodegradação da lignina) como substratos, bem como por enzimas extracelulares como a aril-álcool oxidase (AAO) descrita em *Pleurotus eryngii*, e a glioxal oxidase. Além das enzimas geradoras de peróxido, outras enzimas como aril-álcool desidrogenases (AAD) e quinonas redutases (QR), são desidrogenases que atuam na redução de compostos derivados da lignina. Nos estágios finais de decomposição da lignina são geradas moléculas simples passíveis de serem assimiladas pelas hifas fúngicas e incorporadas a rotas catabólicas intracelulares (MARTÍNEZ et al. 2005).

Fungos de decomposição parda são capazes de alterar minimamente a lignina via reações de hidroxilação e desmetilação junto com uma rápida perda de celulose e hemicelulose (KIRK, 1983). Apesar de recentes avanços na compreensão da química do processo oxidativo, as enzimas envolvidas no processo de degradação por fungos de decomposição parda ainda não foram completamente caracterizadas (VARELA et al., 2003).

Como mencionado anteriormente, a maioria dos estudos realizados a respeito do modo de ação das celulasas e das hemicelulasas foi realizada com enzimas produzidas por Ascomycetos. Acredita-se que as enzimas hidrolíticas de Basidiomicetos tenham comportamento análogo ao descrito para *T. reesei*, uma vez que a habilidade de clivagem de ligações glicosídicas no material lignocelulósico seja necessariamente a mesma. Contudo, a grande diferença entre os fungos de decomposição da madeira se baseia no substrato de atuação, sendo que, na natureza, os basidiomicetos atuam em estágios iniciais de decomposição, ou seja, sobre um material altamente lignificado, e os ascomycetos celulolíticos são encontrados em estágios avançados de decomposição, atuando sobre uma matriz celulósica mais acessível (LEVY, 1987; FERRAZ, 2004; KIRK; CULLEN, 1998).

2.3.Determinação da atividade de celulasas.

A atividade das celulasas é geralmente determinada pela quantificação de açúcares redutores liberados durante a hidrólise da celulose pura ou de derivados de celulose. Os açúcares redutores geralmente são estimados por métodos colorimétricos como aquele que emprega o reagente de DNS (ácido dinitro-salicílico) seguindo a descrição de Miller, feita em 1959 (DASHTBAN et. al., 2010; ZHANG et. al., 2009).

Até o momento, a maneira mais usada na comparação da produção e na capacidade de hidrólise de enzimas celulolíticas está baseada na determinação de celulasas totais usando papel de filtro como substrato (em inglês se denomina esta atividade como "filter paper activity" ou FPA, e também "filter paper unit" ou FPU). Este método padrão (recomendado pela IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada) determina a concentração de açúcar redutor liberado como produto da atividade de um complexo celulolítico sobre papel de filtro (GHOSE, 1987). Uma unidade internacional (UI) de atividade em papel de filtro (FPase) é definida como um μmol de açúcar redutor liberado em solução por minuto. O ensaio enzimático é realizado sob condições adequadas de temperatura e pH. Este ensaio é baseado em um grau de conversão fixo, isto é, uma quantidade fixa de açúcar redutor (2 mg) liberada a partir de 50 mg de papel de filtro com um tempo fixo de reação de 60 min. Ou seja, o ensaio prevê uma conversão de 4% do substrato insolúvel em açúcares redutores solúveis. Pela metodologia de Ghose (1987), pelo menos duas diluições da amostra enzimática devem ser feitas para possibilitar a interpolação de dados que permita calcular a atividade para um nível exato de conversão da celulose correspondente a 4% (uma das diluições deve liberar pouco mais do que 2 mg de açúcar redutor e a outra diluição deve liberar pouco menos do que 2 mg de açúcar redutor (GHOSE, 1987; ZHANG et. al., 2009). Coquetéis enzimáticos com valores elevados de atividade FPA são desejáveis para a bioconversão da biomassa vegetal, uma vez que a degradação completa da celulose até glicose depende da combinação das atividades de EG, CBH e BGL.

As endoglucanases hidrolisam randomicamente ligações glicosídicas internas na cadeia de celulose. Devido à insolubilidade da celulose e o consequente baixo acesso das enzimas às suas cadeias, derivados solúveis da celulose com elevado grau de polimerização (DP), tais como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC), são utilizados como substrato em ensaios de atividade de EG (GHOSE, 1987;

DASHTBAN et. al., 2010). A solubilidade em água desses derivados é devido a substituições químicas existentes na cadeia de celulose. Por exemplo, a carboximetilcelulose apresenta os grupos hidroxilas livre substituídos por grupos carboximetil (Figura 2). Tal composto é o mais utilizado em ensaios de determinação das endoglucanases, sendo a atividade denominada como CMCase. Dois parâmetros relacionados à CMC são importantes para a medida da atividade: o grau de substituição (DS) e o grau de polimerização (DP), que afetam a solubilidade e a viscosidade, respectivamente. A diminuição do DS faz com que o substrato seja menos solúvel, apesar de torná-lo mais acessível ao ataque por EGs devido a presença de menor número de grupos pendentes na celulose. Já a viscosidade da CMC está diretamente relacionada com o DP, sendo que a atividade das EGs causa a diminuição do DP e a consequente perda de viscosidade.

Figura 2: Estrutura química da carboximetilcelulose (CMC)

A taxa de hidrólise da CMC pode ser determinada pela análise da concentração de açúcar redutor liberado ou por mudanças na viscosidade do substrato. No método descrito por Ghose (1987) e aprovado pela IUPAC, a atividade CMCase é medida pela quantificação de açúcares redutores libertados após 30 minutos de hidrólise enzimática de CMC em uma concentração de 2%, em pH de 4,8 e a 50°C. Uma unidade de atividade é definida como um μmol de açúcares redutores liberados por minuto (GHOSE, 1987). O ensaio de CMCase é baseado em um grau de conversão no qual se libere em torno de 0,5 mg de açúcares redutores nas condições de reação (GHOSE, 1987). O DS é de grande relevância para o ensaio de determinação de açúcares redutores, visto que a hidrólise da CMC pelas EGs requer no mínimo 2 ou 3 resíduos glicosídicos contínuos que não estejam substituídos (ZHANG et. al., 2009). O DS para a CMC, definido na metodologia descrita por Ghose (1987), é de 0,7. Por outro lado, o DP da CMC apresenta pouca influência no

ensaio de açúcares redutores, apesar de ser de grande importância para o método de determinação da atividade de EGs através da redução da viscosidade. No caso das medidas de viscosidade da solução com o derivado de celulose, o cálculo de uma unidade de atividade enzimática é feito a partir de uma relação linear entre a concentração da enzima e a taxa de aumento do recíproco da viscosidade da solução (ZHANG et. al., 2006)

Em misturas enzimáticas, tanto EG como CBH podem liberar novas extremidades de açúcares redutores a partir de substratos solúveis. Porém, dentro de um grau limitado de hidrólise, as EGs são capazes de diminuir rapidamente a viscosidade específica do substrato e gerar muitos novos terminais redutores, enquanto que as CBHs diminuem esta viscosidade de forma mais lenta e geram menos terminais (ZHANG et. al., 2009). Alguns autores sugerem que, devido a essa interferência da CBH, ambos os métodos de viscosidade e açúcares redutores sejam utilizados para a determinação da atividade de EGs (ZHANG et. al., 2006).

As CBHs são celulasas que clivam ligações glicosídicas nos terminais das cadeias de celulose podendo liberar moléculas de celobiose e eventualmente de glicose. Celulose microcristalina, comercialmente conhecida como Avicel, é geralmente usada como substrato de reação da CBH devido ao seu baixo grau de polimerização, e consequentemente, maior presença de terminais livres para a ação enzimática. A atividade de CBH medida com este substrato tipicamente é denominada como avicelase, que é considerada sinônimo de exoglucanases ou celobiohidrolases. Avicel é constituída predominantemente de celulose cristalina, apresentando poucas regiões de celulose amorfa acessíveis ao ataque de EGs. No entanto, não há uma grande especificidade das celulasas por um ou outro tipo dos substratos mencionados, o que torna os métodos de determinação da atividade, principalmente de CBH, susceptíveis a interferências de reações de outras celulasas quando se avalia a atividade de misturas enzimáticas. Por isso, preparados enzimáticos que mostram relativamente alta atividade em Avicel e baixa atividade em CMC são identificadas como CBH. Uma unidade de atividade CBH é definida como um μmol de açúcares redutores liberado em solução por minuto a partir do Avicel (DASHTBAN et. al., 2010; ZHANG et. al., 2006).

As BGLs podem clivar ligações glicosídicas em substratos solúveis, incluindo celobiose, celodextrinas mais longas com um DP de 3 a 6, e uma variedade de substratos cromogênicos que produzem cor ao serem hidrolisados, sendo o p-nitrofenol- β -glucosídeo (pNPG) o mais comumente utilizado. O método usando pNPG como substrato tem como base a determinação de p-nitrofenol liberado pelo tempo de reação com BGL, em

temperatura e pH específicos da enzima (ZHANG et. al., 2009). Dessa forma, uma unidade de BGL é definida como um μmol de p-nitrofenol liberado por minuto. No caso de substratos não cromogênicos, diferentes métodos podem ser usados dependendo do substrato. Por exemplo, a atividade de BGL pode ser medida utilizando celobiose, que é um substrato específico da enzima, não sendo hidrolisado por outras celulasas tais como endoglucanases e exoglucanases (GHOSE, 1987; ZHANG et. al., 2009).

Uma das metodologias descrita por Ghose (1987) para determinar a atividade de BGLs emprega celobiose como substrato. Neste caso, se denomina a atividade como celobiase. A atividade celobiase é medida pela quantificação de glicose liberada após 30 minutos de hidrólise enzimática de solução com concentração de 15,0 mM de celobiose, em pH de 4,8 e a 50°C. A quantificação da glicose liberada é realizada de acordo com o método de GOD (utilizando um kit comercial que tem por base a reação de glicose oxidase) (GHOSE, 1987). Da mesma forma como é definido para CMCse, o ensaio de celobiase é baseado em um grau de conversão no qual se libere em torno de 0,5 mg de glicose nas condições de reação (GHOSE, 1987).

A medida da atividade de BGL usando substratos cromogênicos como pNPG é a técnica mais comumente usada em diferentes estudos. Entretanto, não existe uma correlação linear entre a atividade de BGL em um substrato análogo (como pNPG) e um substrato natural, como a celobiose (DASHTBAN et. al., 2010).

Conforme descrito anteriormente, vários métodos de determinação da atividade de celulasas são descritos na literatura. Foram mencionados nesta revisão apenas aqueles mais empregados. No entanto, é relevante notar que as condições ótimas dos ensaios de atividade podem variar entre as celulasas produzidas por diferentes microrganismos. Frequentemente se faz necessário a adaptação nas metodologias dos ensaios no que diz respeito ao tempo de reação, tipo de substrato e concentração da enzima, além de características do meio reacional, como pH e temperatura.

Considerando que há uma grande diversidade de métodos e condições de reação empregadas nas determinações de atividades do complexo celulolítico, é difícil realizar a comparação dos níveis de produção destas enzimas quando se levanta dados na literatura obtidos por grupos de pesquisa variados (tratado no próximo tópico). Muitos dos extratos enzimáticos brutos produzidos por micro-organismos apresentam baixa concentração de enzima e é frequente se observar que os níveis mínimos de conversão exigidos em alguns métodos não são atingidos nos tempos de reação recomendados na metodologia. Estes problemas de ordem metodológica podem muitas vezes levar a interpretações equivocadas

das atividades enzimáticas existentes em um dado extrato. Isto está sendo levantado na presente revisão, pois, como veremos no tópico seguinte, há uma enorme divergência de dados reportados para a produção de celulasas na literatura.

2.4. Produção de celulasas por fungos.

Uma etapa fundamental no processo produtivo de etanol de segunda geração é a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica pré-tratada, que converte celulose em açúcares fermentescíveis. Nessa etapa são tipicamente utilizadas enzimas derivadas de espécies dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*. Além dessas espécies, fungos pertencentes aos gêneros *Humicola* e *Penicillium* também apresentam elevado potencial de secreção de enzimas hidrolíticas, e são usadas na produção de preparações comerciais de celulasas e hemicelulasas (GUSAKOV, 2011).

Fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* são considerados os maiores produtores de enzimas com elevada eficiência de degradação da celulose cristalina. A maioria das preparações de celulasas comerciais são produzidas por cepas mutantes derivadas da linhagem selvagem QM6a de *Trichoderma viride* (posteriormente denominada *Trichoderma reesei*), identificada a mais de 50 anos. A partir dessa cepa, extensivos estudos de mutagênese foram conduzidos, resultando na seleção de diversas linhagens mutantes com hiper produção de celulase, como a linhagem QM9414 que apresenta uma produção de celulase de 2 - 4 vezes maior do que a linhagem selvagem. Outro exemplo de linhagem mutante utilizada a mais de 30 anos na produção de enzimas celulolíticas, proteínas recombinantes e pesquisas acadêmicas é a cepa RUT C30 de *T. reesei*. Por meio de técnicas de mutação aleatória (incluindo o uso luz UV e tratamentos químicos) essa linhagem teve o seu potencial celulolítico incrementado devido à mutação do gene *cre1*, que ocasionou em um menor efeito da repressão catabólica da glicose durante a expressão das enzimas, além de um aumento na taxa de produção enzimática. Deste modo, décadas de estudos foram investidos na pesquisa e desenvolvimento de cepas de *T. reesei* altamente produtivas (GUSAKOV, 2011; PETERSON; NEVALAINEN, 2012).

Embora várias espécies de ascomicetos apresentem alta secreção de celulasas, os níveis de produção das três classes de enzimas do complexo celulolítico (EG, CBH e BGL)

frequentemente não são satisfatórios para a hidrólise eficiente de um determinado material celulósico. Por exemplo, cepas de *T. reesei* geralmente apresentam um complexo hidrolítico com elevados níveis de secreção de endoglucanases e celobiohidrolases e baixos níveis de secreção de β -glicosidase. Tal característica pode levar ao acúmulo de celobiose e consequente inibição de outras enzimas do complexo celulolítico, como EG e CBH. Logo, a eficiência de hidrólise depende tanto das propriedades de enzimas individuais quanto da razão em que se encontram no complexo multienzimático. Assim, preparações comerciais de celulases de *T. reesei*, por exemplo, normalmente necessitam ser suplementadas com a adição de BGL para promover a completa sacarificação de substratos celulósicos (SINGHANIA et al., 2010; GUSAKOV, 2011).

A espécie *Aspergillus niger* está entre os organismos mais utilizados e estudados na produção industrial de enzimas. Contudo, seu potencial de produção de celulases não é elevado o suficiente para ser considerada uma alternativa à substituição de linhagens de *T. reesei*. Assim, tal espécie é usualmente empregada como fonte de β -glicosidases e xilanases e outras enzimas acessórias, tais como xilosidases, arabinofuranosidases, ferulil e p-cumaril esterases (VRIES; VISSER, 2001).

As celulases produzidas por espécies de *Penicillium* têm sido avaliadas como uma alternativa de substituição de celulases de *T. reesei* em processos de sacarificação da biomassa. Diferente de espécies de *Trichoderma*, fungos do gênero *Penicillium* apresentam um complexo celulolítico mais balanceado, com elevados níveis de secreção de BGL extracelular. Alguns trabalhos reportam uma maior eficiência de sacarificação de substratos celulósicos com celulases de *Penicillium* do que com o uso de preparações comerciais de celulases de *T. reesei* (MARTINS et al., 2008; SINGH et al., 2009). Contudo, a produção em larga escala de celulases por espécies de *Penicillium* ainda se mostra inviável devido aos baixos níveis de secreção enzimática (0.3 – 2.2 g/L), inferiores aos valores obtido com cepas de *T. reesei* (40 - 100 g/L) (GUSAKOV, 2011).

Uma parte significativa das pesquisas relacionadas à produção de enzimas hidrolíticas por micro-organismos abordam estratégias de melhoramento de bioprocessos para aumentar o rendimento de produção, bem como as atividades específicas de celulases. Culturas microbianas são grandemente influenciadas por vários parâmetros incluindo a natureza do substrato celulósico, pH do meio, disponibilidade de nutrientes, suplementação por indutores e temperatura de incubação. O ajuste destas variáveis é dependente de cada cepa e espécie de fungo cultivado (SINGHANIA et al., 2010).

De forma geral, na maior parte dos trabalhos reportados na literatura, os materiais utilizados para a produção de celulasas são de origem lignocelulósica ou celulósica pura. A maioria das celulasas de *T. reesei* são enzimas adaptativas, ou seja, não são sintetizadas durante o seu crescimento em meio contendo monossacarídeos e sua completa expressão requer a presença de um indutor. Desde que a celulose, considerada um indutor natural do sistema celolítico é insolúvel e, portanto, incapaz de atravessar a membrana celular e iniciar a produção de celulasas, alguns autores consideram haver uma síntese em nível basal, principalmente de CBH I e CBH II, para iniciar a degradação da celulose e a formação de pequenas quantidades de oligossacarídeos capazes de induzir a produção de celulasas (KUBICEK et al., 2009; RYU; MANDELS, 1980). A lactose, apesar de não ser uma fonte de carbono naturalmente utilizada por espécies de *Trichoderma* é conhecida como um forte indutor da síntese de celulasas e, por se tratar de um substrato relativamente barato, seu uso é considerado viável para produção industrial. No entanto, informações sobre indutores, substratos e outros componentes do meio nutricional para produção de celulasas comerciais não são divulgados pelas empresas. Sabe-se, contudo, que os parâmetros acima mencionados são de grande influência no custo das enzimas (SINGHANIA et. al., 2010).

As principais estratégias para a produção de celulasas por micro-organismos são a fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS), que se diferenciam basicamente pelo teor de água presente no meio de cultivo. A FES é definida por Krishna (2005) como um processo de fermentação que ocorre na ausência ou próximo a ausência de água livre, sendo a umidade necessária para o crescimento do micro-organismo presente em um estado absorvido ou complexado com a matriz sólida. A FES é uma estratégia que tende a mimetizar condições naturais de crescimento de micro-organismos que metabolizam celulose. No entanto, processos envolvendo limitações no teor de água livre no sistema são evitados quando se objetiva maior produção de celulasas, especialmente em larga escala, onde são requeridos biorreatores de grande volume. A maioria dos estudos de produção de celulase, principalmente com *T. reesei*, é conduzida em meio líquido (FS) (SINGHANIA et. al., 2010; CASTRO et. al. 2010).

A Tabela 1, adaptada do artigo de Castro e Pereira (2010), lista alguns dados de produção de celulasas por diferentes ascomicetos em diferentes condições de cultivo. Vale mencionar que a comparação direta das atividades de celulase apresentadas em vários trabalhos nem sempre é possível devido às diferenças nos métodos de ensaio e na forma

como as atividades estão expressas. Além disso, não há uma maneira direta que permita comparar os níveis de produção de celulasas nas diferentes estratégias de cultivo.

Tabela 1: Produção de celulasas por fungos ascomicetos em diferentes condições de cultivo (adaptado de Castro e Pereira 2010).

Micro-organismo	Fonte de carbono	Forma de cultivo; temperatura (°C); pH	Máximas atividades (tempo de processo)
<i>T. reesei</i> Rut C30	Carvalho pré-tratado a vapor	FS; 30; 5,0	4250 FPU.L ⁻¹ ; 45000 UI EG.L ⁻¹ ; 140 UI BGL.L ⁻¹ (9 d)
	Solka Floc	FS; 28; 4,8	4250 FPU.L ⁻¹ (7 d)
	Solka Floc	FS;28;5,8	1200 FPU.L ⁻¹ (6 d); 1350 UI BGL.L ⁻¹ (7 d)
	Solka Floc	FS;30;5,0	1300 FPU.L ⁻¹ (50 h)
	Salgueiro pré-tratado a vapor	FS; 30; 5,5-6,0	1390 FPU. L ⁻¹ ; 1450 UI BG. L ⁻¹ (4d)
<i>T. reesei</i> QM9414	Avicel	FS; 30; 4,8	163 FPU.L ⁻¹ (68 h)
	Bagaço de cana de açúcar	FS; 30; 4,8	85 FPU.L ⁻¹ (68 h)
<i>T. reesei</i> ZU-02	Sabugo de milho e farelo de trigo	FES; 30; 4,5	130 FPU.g ⁻¹ (6 d)
	Sabugo de milho	FS;30;4,8	5000 FPU.L ⁻¹ ; 240 UI BGL.L ⁻¹ (4d)
<i>Penicillium pinophilum</i> IBT4186	Solka Floc	FS;30;5,0	280 FPU.L ⁻¹ (221 h);
<i>Penicillium persicinum</i> IBT 13226	Solka Floc	FS;25;5,0	800 FPU.L ⁻¹ (236 h);
<i>Penicillium brasilianum</i> IBT 20888	Solka Floc	FS;30;5,0	750 FPU.L ⁻¹ (229 h)
<i>Penicillium decumbens</i> 1	Palha e farelo de trigo	FES;30;NR*	15,2 FPU.g ⁻¹ (4 d); 50,6 UI BGL.g ⁻¹ (4 d)
<i>Aspergillus terreus</i>	Bagaço de cana	FS;35;4,0	110 FPU.L ⁻¹ (7 d); 1200 UI EG.L ⁻¹ (7d)
Cultura mista <i>T. reesei</i> QM9414 e <i>A. terreus</i> SUK ⁻¹	Bagaço de cana	FES;30;5,5	600 FPU.L ⁻¹ (7 d); 40 UI BG.L ⁻¹ (6d)
Cultura mista <i>T. reesei</i> LM-UC4 e <i>Aspergillus phoenicis</i> QM 329	Bagaço de cana	FES;30;NR	14 FPU.g ⁻¹ ; 80 UI EG.g ⁻¹ ; 17 UI BGL.g ⁻¹ (120 h)

FES - Fermentação em estado sólido; FS - Fermentação submersa.

*NR: valores não reportados.

A maioria das pesquisas visando o aumento da eficiência hidrolítica de complexos enzimáticos direciona sua atenção ao sistema celulolítico, devido a celulose ser a porção

polissacarídica em maior quantidade na biomassa. Contudo, a eficiência hidrolítica de celulasas sobre lignocelulósicos está associada ao conteúdo de hemicelulose e lignina presentes no material pré-tratado que limita o acesso à celulose. Por exemplo, preparações enzimáticas com atividades celulolíticas similares, mas distintos conteúdos de hemicelulasas mostram diferentes rendimentos de sacarificação de substratos lignocelulósicos. Entretanto, essas deficiências podem ser compensadas com suplementação de misturas de celulasas com as enzimas acessórias adequadas ao substrato a ser hidrolisado (BERLIN et al., 2007).

Outro fator limitante da hidrólise dos polissacarídeos corresponde a ligações improdutivas e inativação de enzimas devido a presença da lignina residual em substratos lignocelulósicos pré-tratados. A adsorção de celulasas à lignina tem sido demonstrada tanto para misturas enzimáticas comerciais de *T. reesei*, quanto para grupos específicos de celulasas purificadas de *T. reesei* e de outros organismos. Interações hidrofóbicas provavelmente desempenham um papel importante na adsorção de celulasas à lignina. Enzimas contendo CBMs apresentam maior afinidade à lignina do que as enzimas em que tais estruturas estão ausentes, o que indica um papel importante das CBMs tanto na adsorção à celulose quando em interações enzima - lignina. Contudo, mesmo em celulasas que não apresentam CBMs ocorre elevada afinidade pela lignina, o que indica a presença de sítios de ligação à lignina nas outras porções da cadeia protéica. Em um estudo realizado por Berlin et al. (2005) foi verificado que celulasas de *Penicillium* sp. apresentam menor afinidade pela lignina isolada de madeira, assim como são menos susceptíveis à inibição por compostos derivados da lignina, quando comparadas às celulasas de *Humicola* sp e de *T. reesei*. A ocorrência natural de celulasas com atividades similares, mas diferentes propriedades de ligação à lignina fornece suporte para o conceito de que enzimas podem ser engenheiradas para redução da ligação à lignina sem o comprometimento da atividade catalítica (RAHIKAINEN et al., 2011; BERLIN et al., 2005).

A identificação e caracterização de celulasas produzidas por microrganismos isolados a partir do ambiente, juntamente com programas para melhorar a produção de enzimas, proporcionaram grande parte das preparações de celulase atualmente disponíveis. Estratégias de engenharia de proteínas podem alterar as propriedades catalíticas de enzimas para melhorar as funções existentes, ou mesmo introduzir novas propriedades. Diversas pesquisas são realizadas no que concerne ao desenvolvimento de melhores produtores de celulasas utilizando diferentes técnicas de engenharia genética, principalmente em

linhagens de *T. reesei*. Dentre as técnicas, as mais comuns são a mutação clássica, que objetiva melhorar aleatoriamente alguma característica genética do sistema celulolítico do fungo; e a expressão gênica, que visa à criação de organismos recombinantes geralmente visando uma maior expressão da enzima de interesse (KUBICEK et al., 2009; SINGHANIA et. al., 2010).

Atualmente, empresas como a Novozymes, Iogen e Genencor desenvolvem programas de pesquisa de grande relevância para o desenvolvimento de coquetéis multienzimáticos mais eficientes e de menor custo destinadas aos processos de hidrólise de biomassa (GUSAKOV, 2011; SINGHANIA et. al., 2010). Recentemente foi descoberto que proteínas da família 61 de glicosil hidrolase (GH61) (reclassificadas como LPMOs, como descrito anteriormente) melhoram o desempenho global na sacarificação do complexo lignocelulósico. A co-expressão do gene da proteína GH61 da espécie de ascomiceto *Thielavia terrestris*, em uma cepa comercial de *T. reesei*, proporcionou um aumento da atividade específica das celulasas produzidas da ordem de duas vezes, e uma consequente redução da carga de proteínas (e, portanto, uma redução no custo) requerida na hidrólise da biomassa lignocelulósica. A inclusão de GH61, mesmo em pequenas porcentagens no coquetel celulolítico resulta num aumento da eficiência total do sistema enzimático (HARRIS et al., 2010). Empresas líderes na produção de enzimas, tal como a Novozymes, já apresentam proteínas GH61 incorporadas a preparações de celulasas específicas para a hidrólise da biomassa lignocelulósica. No entanto, um trabalho recente abordando a sacarificação, a 30% de consistência, de palha de trigo pré-tratada pelo preparado comercial Cellic CTec 2 (oriundo da empresa Novozymes) mostrou que a existência das proteínas GH61 no preparado enzimático resultou no acúmulo significativo (4 g/L) de ácido glucônico no produto de hidrólise. O dado é relevante, pois o ácido glucônico não é fermentescível e também atua como inibidor das celulasas (CANNELLA et al., 2012). Apesar de informações detalhadas da composição de preparações enzimáticas comerciais de *T. reesei* geralmente não serem reportadas, supõem-se que esse organismo apresente expressão heteróloga de β -glicosidases, assim como a adição de outras enzimas e proteínas de diferentes organismos que agem em sinergismo (GUSAKOV, 2011; HARRIS et al., 2010).

2.5.Celulases e outras enzimas produzidas por fungos de decomposição branca: *Pleurotus ostreatus* como modelo de estudo.

Um aspecto importante ligado à produção de enzimas de melhor eficiência para a hidrólise enzimática da biomassa pode estar relacionado com as enzimas secretadas por fungos de decomposição branca. Devido ao fato de serem os únicos organismos que degradam eficientemente a lignina, a maior parte dos trabalhos referentes a esses fungos dizem respeito ao estudo e aplicações de suas enzimas ligninolíticas em processos de polpação, branqueamento e degradação de compostos xenobióticos, sendo menor a atenção direcionada às enzimas de degradação de polissacarídeos. Conforme mencionado anteriormente, esses fungos degradam celulose e lignina simultaneamente e suas celulases poderiam, hipoteticamente, apresentar uma eficiência diferenciada em substratos ricos em lignina.

A Tabela 2 compila informação sobre uma série de artigos que estudaram a secreção de celulases por fungos de decomposição branca. Uma parte expressiva dos trabalhos publicados tem origem em um mesmo grupo de pesquisa e aponta para um efeito marcante da fonte de carbono empregada nos cultivos sobre os níveis de celulases secretadas.

Dentre as diversas espécies de fungos causadores da decomposição branca descritas na literatura, *Pleurotus ostreatus* foi escolhido, entre as que apresentavam potencial de secreção de altos níveis de celulases, para ser utilizada no desenvolvimento do presente trabalho. Portanto, nessa dissertação será dado maior enfoque ao estudo de espécies do gênero *Pleurotus*.

P. ostreatus, também denominado “cogumelo ostra” devido ao corpo de frutificação ser semelhante ao formato de uma ostra, é um dos principais fungos comestíveis comercializados mundialmente, sendo considerado um produto de alto valor nutricional e com propriedades terapêuticas. Trata-se de um gênero de fungo diferenciado pela capacidade de degradação seletiva da lignina presente na biomassa vegetal. Neste gênero já foram caracterizadas as enzimas ligninolíticas MnP, Lacases e VPs, sendo que nenhum trabalho descreveu a secreção de LiPs (COHEN; PERSKY; HADAR, 2002; COHEN; HADAR; YARDEN, 2001) Assim, vários trabalhos abordam o potencial uso desses basidiomicetos em processos de deslignificação de resíduos agrícolas para uso na alimentação animal e biorremediação de solos, além de aplicações biotecnológicas em

setores industriais, tais como o de celulose e papel, têxtil, farmacêutico e de corantes (COHEN; PERSKY; HADAR, 2002; KURT; BUYUKALACA, 2010).

Tabela 2: Atividades de endoglucanases (CMCase) e celulasas totais (FPase) presentes em cultivos submersos de fungos de decomposição branca em diferentes fontes de carbono.

Fungo	Fonte de carbono	CMCase (U.mL ⁻¹)	FPase (U.mL ⁻¹)	Referências
<i>Cerrena unicolor</i> IBB62	Avicel	13,4	NR*	Elisashvili et al. (2002)
	CMC	3,7	NR	
	Lactose	0,7	NR	
	Cascas de mexerica	12,0	NR	
<i>Pleurotus dryinus</i> IBB903	Cascas de mexerica	45,8	4,1	Elisashvili et al. (2006)
	Folhas de árvore	47,0	4,2	
	Avicel	7,4	1,6	
	CMC	2,2	1,2	
<i>Pleurotus ostreatus</i> 2191	Cascas de Bananas	62,3	5,9	Elisashvili et al. (2008)
	Cascas de mexerica	13,3	3,3	
	Folhas de árvore	5,4	3,0	
<i>Pseudotremella gibbosa</i> IBB22	Cascas de mexerica	122,0	NR	Elisashvili et al. (2009)
<i>Trametes pubescens</i> IBB11	Cascas de mexerica	74,0	NR	
<i>Fomes fomentarius</i> IBB38	Cascas de mexerica	45,0	NR	
<i>Fomes fomentarius</i>	Palha de trigo	0,34	NR	Rodrigues et al. (2008)
<i>Trametes hirsuta</i>	Polpa kraft de madeira dura	0,28	NR	Nakagame et al. (2007)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	CMC	0,42	NR	Goyal & Soni (2011)
<i>Pleurotus sajar-caju</i>	CMC	0,45	NR	
<i>Pleurotus florida</i>	CMC	0,48	NR	
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm. (tipo NRRL-0366)	Avicel	3,13	NR	Daba et al. (2011)
<i>Pycnoporus sanguineus</i> PF-2	Sabugo de milho	8,43	0,25	Falkoski et al. (2012)

* NR: Não reportado

A habilidade de degradação eficiente da biomassa vegetal permite aos fungos do gênero *Pleurotus* a utilização de uma variedade de resíduos lignocelulósicos como substrato de crescimento (COHEN; PERSKY; HADAR, 2002). Palha de trigo é um substrato lignocelulósico usualmente utilizado para cultivo em estado sólido, sendo também utilizado como veículo para o estabelecimento e introdução do fungo no solo, em experimentos de bioremediação de ambientes contaminados (VALÁŠKOVÁ, BALDRIAN, 2006). Um modelo de colonização da palha de trigo por *P.ostreatus* foi descrito por Schiesser (1989) a partir de análises por microscopia eletrônica. De acordo com esse autor, a palha de trigo é colonizada em duas etapas: primeiro, a produção inicial de biomassa do micélio é suportada pela presença de açúcares solúveis contidos no

substrato ou suplementada no meio de cultura; em um segundo estágio ocorre a degradação da matriz lignocelulósica propriamente dita, quando a fonte de carbono solúvel já tenha sido utilizada.

O perfil de atividades de enzimas hidrolíticas e oxidativas detectados ao longo do ciclo de crescimento de algumas espécies de *Pleurotus* tem sido reportado em diversos trabalhos. De forma geral, estes trabalhos sugerem que em um primeiro estágio de desenvolvimento do fungo observa-se uma degradação mais rápida da lignina e uma diminuição lenta do conteúdo de celulose e hemicelulose no substrato. Esta etapa está correlacionada com a maior secreção de enzimas oxidativas que diminuem no estágio de frutificação do fungo, para posteriormente aumentar de novo após a frutificação. De forma inversa, a produção de celulasas e hemicelulase é baixa durante o período de crescimento micelial, aumentando durante a produção de corpos de frutificação, e declinando posteriormente. O aumento da produção de enzimas hidrolíticas no período de frutificação pode estar associado com o maior requerimento em energia necessário para a formação dessas estruturas (MATA; CORTÉS; SALMONES, 2007; KURT; BUYUKALACA, 2010; PANDEY et al., 2012).

Igualmente ao demonstrado por espécies do gênero *Trichoderma*, fungos de decomposição branca são capazes de degradar celulose microcristalina e possuem um sistema celulolítico extracelular induzido por substratos celulósicos e inibido pela presença de açúcares simples, tais como glicose e celobiose (HIGHLEY, 1973). Um exemplo de indução por substrato celulósico é descrito no trabalho de Garzillo et al. (1994), em que a produção de celulasas somente foi verificada em cultivos submersos de *P. ostreatus* utilizando palha de trigo como fonte de carbono, não sendo detectada quando o substrato foi substituído por glicose ou extratos hidrosolúveis de materiais vegetais, como tabaco e palha de trigo. Neste mesmo trabalho, o extrato enzimático do cultivo submerso em palha de trigo foi parcialmente purificado por cromatografia de troca iônica, sendo identificadas pelo menos cinco enzimas pertencentes ao seu complexo celulolítico: uma β -glicosidase (EC 3.2.1.21), duas endoglucanases (EC 3.2.1.4), uma celobiohidrolase (EC 3.2.1.91), e duas exo-glucohidrolases (EC 3.2.1.74).

Em um estudo mais recente, reportado por Daba et al. (2011), a presença de celulasas foi verificada no sobrenadante de cultivo de *P. ostreatus* em meio líquido contendo celulose microcristalina (Avicel) como fonte de carbono. As análises das atividades de endoglucanases e celobiohidrolases, além de ensaios de eletroforese em gel

de poliacrilamida (SDS-PAGE), indicaram a presença de pelo menos cinco proteínas (com massa molar ≤ 45 kDa) compondo um complexo multienzimático extracelular.

As atividades de enzimas extracelulares são rotineiramente quantificadas através de amostras do sobrenadante de culturas líquidas. Contudo, é possível obter apenas uma estimativa do conteúdo enzimático, já que parte das enzimas produzidas permanece associada ao micélio fúngico ou à frações insolúveis do meio, tal como substratos lignocelulósicos sólidos. Um estudo realizado por Valášková e Baldrian (2006) quantificou as atividades de enzimas lignocelulolíticas livres e de frações enzimáticas associadas à porção sólida, produzidas em cultivos submersos (com celulose microcristalina) e em estado sólido (com palha de trigo) de fungos de decomposição branca. De forma geral para as duas condições de cultivo, foram detectadas endo-hidrolases (endoglicanases, endo-xilanases, endo-mananases) quase que exclusivamente na fração solúvel, enquanto que quantidades significantes de β -glicosidases, β -xilosidases e celobiohidrolases foram detectadas na porção sólida de cultivo. Como já mencionado, β -glicosidases podem ser extracelulares, associados à parede celular ou intracelulares. A fração de β -glicosidases associada ao micélio em *P. ostreatus* representa em torno de 65% das enzimas por ele produzidas em cultivo líquido em celulose cristalina, e 73% para cultivo sólido com palha de trigo. A associação CBHs, BGLs e BXLs às hifas fúngicas, contidas na porção sólida, parece lógica visto que as mesmas fornecem mono e dissacarídeos usados diretamente pelo fungo (VALASKOVA; BALDRIAN, 2006).

Vários estudos demonstram que a natureza do substrato lignocelulósico, as condições de cultivo, bem como a cepa e espécie de fungo são de grande importância na produção de enzimas hidrolíticas (GOYAL; SONI, 2011; KURT; BUYUKALACA, 2010; ELISASHVILI et al., 2008). Em um trabalho realizado por Goyal e Soni (2011) foram avaliados parâmetros nutricionais que levassem ao aumento da produção de celulasas em cultivos submersos da espécie *Pleurotus florida*. Foram realizados cultivos com 1% de carboximetilcelulose (CMC), celulose comercial ou palha de trigo como fonte de carbono, na presença ou na ausência de extrato de malte. De todas as fontes de carbono avaliadas, o cultivo em CMC suplementado com 0,5% de extrato de malte mostrou a maior produção de celulasas (EG: 460 UI.L^{-1} , CBH: 105 UI.L^{-1} e BGL: 1040 UI.L^{-1}) com 12 dias de cultivo. Já nos cultivos realizados com celulose ou palha de trigo, as maiores atividades de celulasas foram obtidas com a suplementação com 1% de extrato de malte, sendo verificada uma variação dos picos de produção dos diferentes grupos de celulasas entre o período de 7 a 12 dias de crescimento. Os valores máximos encontrados nos cultivos em

celulose foram EG: 213 UI.L⁻¹, CBH: 46 UI.L⁻¹ e BGL: 854 UI.L⁻¹, enquanto que para o cultivo em palha de trigo foram EG: 235 UI.L⁻¹, CBH: 152 UI.L⁻¹ e BGL: 1025 UI.L⁻¹. Uma vantagem do cultivo em substratos celulósicos purificados, tais como CMC e celulose comercial, é quando se objetiva uma posterior purificação das enzimas, visto que, diferente dos cultivos em materiais lignocelulósicos, o meio enzimático não irá apresentar pigmentos, o que torna o processo de recuperação e purificação mais simples.

No trabalho de Goyal e Soni (2011) também foram avaliados os efeitos que a concentração da fonte de carbono, temperatura de incubação e pH do meio causam na secreção dos três grupos de celulasas. Um aumento da secreção de celulasas, principalmente de β -glicosidases, foi verificado com o aumento da concentração em até 3% de CMC. Já a temperatura ótima de cultivo para produção de EGs e CBHs foi verificada em torno de 35 a 40°C, enquanto que a máxima produção de BGLs foi alcançada com 30°C. Quanto ao pH, a máxima produção de EGs e CBHs foi obtida em cultivo com pH 5,0, e BGLs em pH 4,5. Os diferentes parâmetros para a obtenção da condição ótima de produção de EGs, CBHs e BGLs podem indicar distintos mecanismos de regulação da síntese dessas enzimas.

Diversas fontes de carbono têm sido avaliadas como estimuladores da síntese de celulasas sem a necessidade de suplementação do meio com compostos indutores específicos. No trabalho de Elisashvili et al. (2008), assim como em vários outros trabalhos do mesmo grupo de pesquisa (ELISASHVILI et al., 2006; ELISASHVILI et al., 2009), foram empregados diversos resíduos vegetais em cultivos submersos e em estado sólido, objetivando a investigação do efeito do substrato e da estratégia de crescimento na produção de enzimas hidrolíticas de várias espécies de fungos de decomposição branca isoladas de ecossistemas florestais. Valores excepcionalmente altos de CMCase foram informados para FS realizada com a cepa IBB903 de *Pleurotus dryinus* em cascas de mexericas (45,3 UI.mL⁻¹) e em folhas de árvores (48,7 UI.mL⁻¹) e para a cepa 2129 de *P. ostreatus* em cultivo com cascas de bananas (62,3 UI.mL⁻¹). Já no cultivo das mesmas cepas em FES, em geral, foram reportados valores menores de CMCase, sendo as maiores atividades alcançadas em cultivos com folhas de árvores com *P. dryinus* (23 UI.mL⁻¹) ou *P. ostreatus* (26 UI.mL⁻¹). Novamente, os níveis de produção de celulasas são dependentes tanto de características do fungo, como da estratégia de cultivo e do substrato de cultivo utilizado.

Nos trabalhos mencionados anteriormente observa-se que os resíduos de fruta proporcionam atividades de celulase superiores em comparação com substratos celulósicos

com baixo teor de lignina, como palha de trigo e folhas de árvores. Apesar de compostos indutores ainda não terem sido descritos, supõem-se que a elevada produção de celulasas esteja relacionada ao fato da composição dos resíduos de frutas apresentarem altas concentrações de açúcares solúveis e fácil disponibilidade de seus polissacarídeos, os quais promovem um abundante crescimento em biomassa do fungo, e conseqüentemente maior produção de enzimas (ELISASHVILI et. al., 2008).

Está claro que não somente as peculiaridades dos fungos, mas também a natureza do material e a metodologia de cultivo são fatores que determinam o potencial de expressão de enzimas desses organismos. Entretanto, uma observação importante obtida a partir do estudo de diversos artigos que descrevem a produção de celulasas é que existe grande variação nos valores de atividade detectada, algumas vezes em cultivos de uma mesma espécie em condições similares de crescimento. Por exemplo, a atividade de endoglucanase, obtida de cultivos de *P. ostreatus* em meio líquido contendo Avicel como fonte de carbono, foi reportado por Valášková & Baldrian (2006) ser de $1,75 \text{ UI.L}^{-1}$, enquanto que Daba et. al. (2011) informam um valor de $1,45 \text{ UI.mL}^{-1}$. Os dois estudos se diferenciam, no entanto, em alguns parâmetros de cultivos, tais como concentração do substrato, fontes de nitrogênio e agitação do meio, além de serem linhagens distintas de *P. ostreatus*. Contudo, apesar das diferenças nas metodologias de cultivos, os valores de CMCase reportados por esses trabalhos variam na ordem de mil vezes.

Alguns trabalhos, principalmente aqueles publicados por Elisashvili e colaboradores (ELISASHVILI et al., 2002; ELISASHVILI et al., 2006; ELISASHVILI et al., 2008; ELISASHVILI et al., 2009), também informam valores de atividade de celulasas totais (FPase) similares ou mesmo superiores aos reportados para espécies de ascomicetos, como cepas mutantes de *Trichoderma reesei* (ver Tabela 1), que são, até o momento, reconhecidos como os principais organismos produtores de celulasas. Desse modo, supõe-se que a grande discrepância nos dados encontrados na literatura possa estar relacionada com o uso de diferentes métodos de determinação das atividades de celulasas, diferentes substratos de reação enzimática, além de variações das condições dos ensaios de atividade, como temperatura e tempo de incubação. Diversos trabalhos, no entanto, não detalham características do substrato de ação enzimática, ou mesmo reportam modificações nas metodologias por eles seguidas. Isso torna complexo ou até mesmo impossível a comparação dos dados de atividade enzimática entre os diferentes estudos.

Como anteriormente mencionado, recentes avanços no aumento da produção e da atividade de enzimas sintetizadas por fungos, principalmente Ascomicetos, foram obtidos

com o uso de técnicas de modificação genética. Dentre essas técnicas, a expressão de genes por sistemas heterólogos tem sido considerada uma alternativa promissora para promover elevados níveis de enzimas requeridas em aplicações biotecnológicas. Essa abordagem foi aplicada por Daba et. al. (2011) para produção de celulasas recombinantes da cepa NRRL-0366 de *P. ostreatus* no sistema de expressão da levedura *Pichia pastoris* (PichiaPink™ - Invitrogen). A produção de celulasas foi verificada no organismo recombinante como sendo um sistema induzido pela presença de Avicel no meio fermentativo. Contudo, os níveis de secreção de celulasas não foram reportados.

A maior parte dos trabalhos reportados a respeito do uso de genes de espécies de fungos de decomposição branca na construção de organismos recombinantes visa a expressão de enzimas ligninolíticas (COHEN; PERSKY; HADAR, 2002; VARELA et al., 2001). O sequenciamento do genoma de *P.ostreatus*, pelo Joint Genome Institute, possibilitou a compreensão de características biológicas relacionadas à síntese de enzimas lignocelulolíticas. O genoma completo contém 35 Mbp, organizado em 11 cromossomos. O estudo comparativo do genoma e do transcriptoma por meio de técnicas computacionais é utilizado na identificação de enzimas específicas e a obtenção de informações sobre mecanismos de degradação de substratos lignocelulósicos (RAMÍREZ et al. 2011).

Um estudo realizado por Ramírez et al. 2011 caracterizou o genoma e o transcriptoma de genes expressos por *P. ostreatus* cultivado em palha de trigo após o estágio de frutificação. A análise funcional dos genes expressos após a frutificação identificou um grande número de possíveis genes codificadores de enzimas com atividade em carboidratos (CAZy, do inglês “carbohydrate active enzymes”) incluindo quatro diferentes famílias de glicosil hidrolases (GH15, GH3, GH31 e GH47), um módulo de ligação a carboidrato (CBM13) e duas enzimas envolvidas no metabolismo de glicose. A avaliação conjunta dos dados de genômica e transcriptômica revelaram um metabolismo ativo de proteínas e carboidratos do fungo mesmo após sete dias de estocagem a 4°C do corpo de frutificação.

Um estudo mais detalhado de caracterização dos genes codificadores de enzimas relacionadas à degradação de carboidratos no genoma de *P.ostreatus* ainda não se encontra disponível. Contudo, diversos trabalhos de genômica e transcriptômica comparativa sugerem uma ampla variedade de genes envolvidos no metabolismo de polissacarídeos em basidiomicetos de decomposição branca (BAO et al., 2013; WYMELENBERG, et al., 2010). Um exemplo é o estudo realizado por Bao et al. (2013), que fez uma análise de genômica comparativa do fungo *Volvariella volvacea* com diversas espécies de

basidiomicetos. As análises dos possíveis genes CAZy envolvidos na degradação de carboidratos identificaram, em sua maioria, diversas famílias de GHs, entre elas genes da família 5 e 61. Como anteriormente mencionado (item 2.2), endoglucanases processivas da família GH5 foram descritas para a espécie de degradação parda *Gloeophyllum trabeum* (COHEN; SUZUKI; HAMMEL, 2005) e para o fungo de decomposição branca *V. volvacea* (ZHENG; DING, 2013), e apresentam um papel importante na degradação da celulose cristalina por esses organismos. Já o estudo de proteínas GH61 tem gerado grande interesse devido a capacidade demonstrada por enzimas dessa família de aumentar a atividade de celulases durante a degradação de lignocelulósicos. A Tabela 3 mostra o número de possíveis genes codificadores de glicosil hidrolases, e o número de genes incluídos nas famílias 5 e 61.

Tabela 3: Genes pertencentes às famílias 5 e 61 de glicosil hidrolases em diferentes basidiomicetos (adaptado de Bao et al., 2013).

	<i>V. volvacea</i>	<i>C. cinerea</i>	<i>A. bisporus</i>	<i>S. commune</i>	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. placenta</i>	<i>S. lacrymans</i>
GH5	17	36	18	16	15	20	15
GH61	30	34	12	22	14	4	5
GH total	224	217	172	225	192	157	163

É interessante notar que um número relativamente elevado de possíveis genes codificadores de proteínas GH61 está presente no genoma de basidiomicetos, como das espécies de decomposição branca *V. volvacea*, *Schizophyllum commune* e *Phanerochete chrysosporium*, enquanto que a cepa comercialmente utilizada para produção de celulases, *Trichoderma reesei*, apresenta somente três genes com características dessa família de GH (MARTINEZ et al, 2008). Outro dado relevante é o conteúdo de vários genes relativos a enzimas GH5 nos genomas de fungos de decomposição branca, o que leva a considerar a possibilidade de expressão de endoglucanases com características processivas, tal como a apresentada para EG1 de *V. volvacea*.

Assim, a diversidade de genes relacionados à degradação da celulose presente no genoma de fungos de decomposição branca dá suporte a hipótese de que esses organismos possam sintetizar celulases com atividade diferenciada em substratos lignocelulósicos.

2.6.Hidrólise enzimática de biomassa por celulasas de fungos de decomposição branca

A eficiência da sacarificação da biomassa está inversamente relacionada com a recalcitrância do material lignocelulósico. Mesmo na biomassa pré-tratada, o conteúdo de hemicelulose e lignina residual exerce limitação significativa na hidrólise da celulose. Em gramíneas, parte da recalcitrância também está associada à presença de ácidos hidroxinâmicos ligados primariamente as hemiceluloses (MASSARIN et. al., 2011). Alguns estudos demonstram que a remoção da hemicelulose, por processos ácidos ou enzimáticos, resulta em uma acentuada redução da carga de celulasas requerida para conversão da celulose em celobiose ou glicose (YANG; WYMAN, 2003; BERLIN et. al., 2005; MUSSATTO et. al., 2007). Adicionalmente, vários trabalhos reportam a correlação inversa entre o conteúdo de lignina e a eficiência de hidrólise da celulose (RAHIKAINEN et al., 2011; YANG; WYMAN, 2003; BERLIN et. al., 2005; MENDES et al., 2011; MASARIN et al., 2011; MUSSATTO et. al., 2007; SIQUEIRA et al., 2011; 2013).

Devido à insolubilidade do lignocelulósico em água, as reações heterogêneas envolvidas no processo de sacarificação requerem um contato físico direto entre enzimas e substrato (isto é, celulose e/ou hemicelulose) (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000). Assim, pode-se dividir a hidrólise enzimática em três etapas: adsorção das enzimas na superfície da celulose, clivagem das ligações glicosídicas e finalmente a desorção das enzimas (CHUNDAWAT et. al, 2011). A adsorção é uma das etapas mais importantes na hidrólise de substratos insolúveis e é significativamente influenciada pela distribuição da lignina. Ligações improdutivas das celulasas à lignina limitam o acesso das mesmas ao substrato polissacarídico, impedindo assim sua ação sobre a celulose (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999; RAHIKAINEN et al., 2011). Alguns trabalhos indicam ainda que interações com compostos derivados da degradação da lignina possam causar a inibição das celulasas. Contudo, os mecanismos da inibição por derivados da lignina não estão completamente elucidados (BERLIN et. al., 2005; NAKAGAME et al., 2010)

Neste contexto, a identificação de celulasas que apresentem menor adsorção improdutiva em biomassas com elevado teor de lignina ou menor inibição por derivados de lignina poderia proporcionar melhoria na eficiência de hidrólise, ou hidrólises eficientes empregando-se menores cargas de enzima (BERLIN et. al., 2005). A adsorção improdutiva das celulasas à lignina também impede a reciclagem de enzimas, estratégia que pode

melhorar a viabilidade econômica do processo (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999). Alguns métodos já descritos visam superar este efeito negativo da lignina, a partir da adição de coadjuvantes no meio reacional que incluem outras proteínas (albumina, por exemplo), surfactantes não iônicos (Tween 20, por exemplo) e polímeros (polietileno glicol, por exemplo), com o intuito de bloquear sítios hidrofóbicos da lignina e minimizar a adsorção improdutiva (SUN; CHENG, 2002; MILAGRES et al., 2011; RAHIKAINEN et al., 2011).

O desempenho geral da hidrólise da biomassa pode ser atribuído à ação sinérgica dos diversos tipos de enzimas complementares, incluindo uma variedade de celulases, hemicelulases, e enzimas acessórias. Os extratos celulolíticos comerciais, comumente empregados nos processos de hidrólise enzimática, apresentam uma mistura complexa de enzimas hidrolíticas. Um exemplo das enzimas hidrolíticas encontradas nas preparações comerciais denominadas Celluclast 1.5L e Novozym 188 está indicado na Tabela 4 (BERLIN et. al., 2007). Pode-se notar que a mistura denominada Celluclast, derivada de uma cepa de *Trichoderma reesei*, contém atividades elevadas de endoglucanases e celobiohidrolases, porém baixa atividade de β -glicosidases. Por outro lado, a preparação comercial Novozym 188, derivada de *Aspergillus niger*, é basicamente composta de atividade β -glicosidase. A mistura dos dois preparados comerciais é comumente empregada nos estudos de hidrólise enzimática (SUN; CHENG, 2002).

Tabela 4: Atividades específicas ($\text{UI} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína) de enzimas hidrolíticas presentes em preparações enzimáticas comerciais (reproduzido de BERLIN et. al., 2007).

Enzimas	FPA*	CMCase	β -glicosidase	Avicelase	Mananase	Xilanase
Celluclast 1.5L	0,9	14,0	0,2	2,2	0,1	3,5
Novozym 188	0,1	0,3	1,1	0,0	0,2	0,4

(*) FPA – Atividade em Papel de Filtro ($\text{FPU} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína)

A grande maioria dos trabalhos relacionados à sacarificação da biomassa lignocelulósica visa a conversão da celulose em monossacarídeos com o propósito de uso em processos fermentativos como aquele empregado na produção de etanol. Existe uma grande variação nos valores das cargas de enzimas utilizadas e das concentrações máximas de produto obtidas durante a hidrólise. Tal variação se justifica, principalmente, devido a diferentes metodologias de quantificação das enzimas utilizadas e diferentes técnicas

analíticas de determinação de açúcares liberados. Além disso, as condições de hidrólise, como concentração do substrato e carga enzimática utilizada, influenciam grandemente nos rendimentos obtidos (CASTRO; PEREIRA, 2010).

Algumas espécies de fungos de decomposição branca têm sido avaliadas com relação a sua habilidade de produzir enzimas celulolíticas em diferentes condições de crescimento conforme descrito no item 2.5. Entretanto, poucos trabalhos estão disponíveis acerca do uso destes extratos enzimáticos em processos de sacarificação da biomassa. De fato, encontramos dois trabalhos que descrevem esta abordagem e que estão sumarizados a seguir.

No trabalho realizado por Jeya et al. (2009) foi realizada a sacarificação da palha de arroz pré-tratada com álcali (NaOH) com o uso somente de celulasas produzidas por uma cepa de *Trametes hirsuta*. A composição química do material pré-tratado foi informado ser de 52,2% de celulose, 18% hemicelulose e 9,8% de lignina. A produção de celulasas por *T. hirsuta* foi feita em cultivo submerso em meio contendo palha de arroz como fonte de carbono, e os valores máximos de atividade de celulasas obtidos foram de 55 U de EG e 5,1 U de BGL por mg^{-1} de proteína; e 3,2 FPU. mL^{-1} de celulasas totais. Um estudo inicial da hidrólise foi realizado com uma concentração de 20 FPU de celulasas por grama de palha de arroz pré-tratada, com uma consistência de 2% de substrato, a uma temperatura de 37°C e em pH 5,0. Nessas condições foi alcançado um rendimento de açúcares redutores de 70%, em 48 horas. O ensaio de sacarificação da palha de arroz pré-tratada foi novamente realizado, porém, mudando os parâmetros de hidrólise. O ensaio utilizando uma carga de enzimas de 30 FPU por grama de palha de arroz pré-tratada, com 2,5% de consistência, à temperatura de 35°C e pH de 5,2, resultou em rendimento de açúcares redutores de 88% em 48 horas. Observa-se que a otimização dos parâmetros de hidrólise resultou em um aumento de 18% da conversão de polissacarídeos, sendo a carga de enzimas um fator determinante de melhoria da sacarificação. Os rendimentos de sacarificação obtidos neste trabalho foram comparáveis com os apresentados por enzimas comerciais (JEYA et al., 2009). Contudo, apesar dos altos rendimentos de hidrólise evidenciados com uso de celulasas produzidas por *T. hirsuta*, elevada carga de enzimas foi necessária na sacarificação de um substrato com relativamente baixo teor de lignina. Assim, uma comparação dos rendimentos de hidrólise obtidos com celulasas de *T. hirsuta* e com celulasas comerciais (por exemplo, de *Trichoderma reesei*) só pode ser realizada em experimentos de hidrólises com parâmetros similares de reação.

Um trabalho mais detalhado sobre a utilização de extrato enzimático da espécie de fungo de decomposição branca *Pycnoporus sanguineus* em experimentos de sacarificação de bagaço de cana de açúcar foi apresentado por Falkoski et al. (2012). A produção de enzimas foi realizada em cultivo submerso de *P. sanguineus* usando sabugo de milho moído como única fonte de carbono. As atividades das enzimas hidrolíticas foram determinadas a partir do sobrenadante de cultivo. Dentre as atividades de celulasas reportadas EG foi a mais proeminente, de $8,43 \text{ U.mL}^{-1}$, enquanto o conteúdo de BGL foi de $0,25 \text{ U.mL}^{-1}$. Já a atividade em papel de filtro foi de $0,25 \text{ FPU.mL}^{-1}$ e pode ser considerada elevada para extratos de fungos de decomposição branca, visto ser similar a alguns valores reportados para cultivos de espécies de ascomicetos (Tabela 1 - tópico 2.4). Um alto potencial de produção de enzimas hemicelulolíticas foi verificado, sendo informado uma atividade de 10 U.mL^{-1} de xilanase, e $4,25 \text{ U.mL}^{-1}$ de mananase.

Os experimentos de sacarificação descritos por Falkoski et al. (2012) foram conduzidos em bagaço de cana moído submetido a diferentes condições de pré-tratamento, com ácido (H_2SO_4) e álcali (NaOH), para a avaliação do efeito dos diferentes procedimentos na sacarificação enzimática. O tratamento com ácido solubilizou 82% da hemicelulose presente no bagaço, enquanto que uma menor remoção de lignina, de 45,5%, foi verificada. De maneira diferente, o tratamento alcalino removeu 82,5% da lignina e 39,7% de hemicelulose.

O material pré-tratado foi submetido à sacarificação usando uma carga de 10 FPU por grama de bagaço de celulasas de *P. sanguineus*, sendo realizado em paralelo, um ensaio de hidrólise nas mesmas condições com uma mistura comercial (Multifect CL) de celulasas de *T. reesei*. Para isso, o extrato enzimático de *P. sanguineus* foi produzido em fermentadores de bancada e posteriormente concentrado cinco vezes por ultrafiltração em membrana de corte de 10 kDa. Uma análise prévia do conteúdo de celulasas e hemicelulasas presentes nos extratos de *P. sanguineus* e Multifect CL foram realizadas, sendo apresentados na Tabela 5. Para estabelecer um parâmetro de comparação, todos os valores de atividade enzimática estudados foram expressos como uma razão em relação à atividade de celulasas totais (FPase) do extrato enzimático.

Tabela 5: Análise comparativa de atividades de celulases e hemicelulases presentes em extrato de *P.sanguineus* e Multifect CL (reproduzido de Falkoski et al., 2012).

Enzyme activity	Enzymatic activity (U)/FPase activity(U)	
	<i>P. sanguineus</i> extract	Multifect® CL
FPase	1.00	1.00
Endoglucanase	33.45	54.10
β -Glucosidase	1.01	0.85
Cellobiase	0.25	0.51
Xylanase	39.68	32.81
β -Xylosidase	0.06	n.d.
β -Mannosidase	0.03	n.d.
Mannanase	17.93	2.01
Pectinase	73.49	1.00
α -Galactosidase	3.75	n.d.
α -Arabinofuranosidase	2.48	n.d.

Os ensaios de hidrólise foram avaliados de acordo com a quantificação de açúcares redutores, pela metodologia de DNS (MILLER et. al., 1959), e pela determinação da concentração de glicose, por um kit comercial baseado em glicose oxidases e peroxidases. De modo geral, a sacarificação do bagaço de cana submetido ao pré-tratamento ácido mostrou rendimentos de açúcares redutores e de glicose, inferiores ao apresentado na sacarificação com bagaço tratado com álcali, tanto nos ensaios realizados com extrato enzimático de *P.sanguineus* como para aqueles em que foi utilizando a preparação comercial Multifect CL (Figura 3). Dessa forma, a maior remoção da lignina pelo tratamento alcalino se mostrou mais vantajosa para obtenção de melhores rendimentos de sacarificação do bagaço de cana do que a remoção da hemicelulose por tratamentos ácidos.

Os resultados obtidos com 72 horas de sacarificação do bagaço pré-tratado com álcali mostraram um rendimento de açúcar redutor de 60,4%, comparável com o obtido em ensaio com celulase comercial de 64,0%. No entanto, em relação à quantidade de glicose liberada, o extrato enzimático de *P. sanguineus* apresentou um rendimento de conversão de 22,6%, contra 36,6% observado com a enzima comercial. A diferença encontrada no rendimento de glicose liberada (de 13,9%) entre a sacarificação com enzima comercial e com extrato de *P. sanguineus* não foi refletida na diferença na produção de açúcares redutores (de 3,6%). Isso foi atribuído a maior razão de celobiase/FPase presente na

preparação enzimática comercial do que a apresentada por extrato de *P. sanguineus*, que ocasiona em maior conversão de celobiose em glicose. Além disso, o maior conteúdo de hemicelulases apresentadas no extrato de *P.sanguineus* podem ter resultado em maior hidrólise da porção hemicelulósica presente no bagaço pré-tratado, o que justificaria os valores similares de rendimentos em açúcares redutores apresentados para ambas as preparações comerciais utilizadas na sacarificação do bagaço pré-tratado com álcali (FALKOSKI et al., 2012).

Figura 3: Produção de açúcares redutores (a) e de glicose (b) na sacarificação de bagaço de cana pré-tratado com ácido (círculos e triângulos cheios) e com álcali (círculos e triângulos vazios) usando extratos de *P.sanguineus* (círculos) e enzima comercial Multifect CL (triângulos) (reproduzido de Falkoski et al., 2012).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E EMBASAMENTO TEÓRICO DA DISSERTAÇÃO

Vários trabalhos abordam a importância do conteúdo de lignina na taxa de hidrólise de materiais lignocelulósicos pré-tratados (BERLIN et. al., 2005; MUSSATO et al., 2008; RAHIKAINEN et al., 2011; MENDES et. al. 2011). Como evidenciado por Mendes et. al. (2011), a biomassa lignocelulósica submetida a distintas severidades de tratamentos apresentam diferentes rendimentos de hidrólise enzimática. Isso está relacionado ao teor de lignina e hemicelulose residual presentes nesses materiais, já que esses componentes lignocelulósicos apresentam-se como uma barreira limitante ao acesso das celulasas à celulose, reduzindo dessa forma, a eficiência da sacarificação. Além disso, adsorções improdutivas de celulasas sobre a lignina podem restringir a disponibilidade das enzimas, o que é crucial para degradação da porção polissacarídica do lignocelulósico (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999; RAHIKAINEN et al., 2011).

Para superar tais limitações no processo de hidrólise enzimática, empresas envolvidas na produção de celulasas focam suas pesquisas no desenvolvimento de coquetéis enzimáticos específicos para sacarificação da biomassa lignocelulósica (HARRIS ET. AL., 2010; GUSAKOV, 2011; SINGHANIA et. al. 2010). Neste contexto, considerando que fungos de decomposição branca teoricamente produzem celulasas mais adaptadas à degradação de substratos lignocelulósicos com elevado teor de lignina, é justificável o estudo de tais enzimas com o propósito de se desenvolver novas formulações enzimáticas para uso em processos de sacarificação da biomassa lignocelulósica.

Entre as espécies de fungos causadores de decomposição branca, fungos do gênero *Pleurotus* são descritos como organismos de fácil adaptação ao crescimento em resíduos lignocelulósicos devido à capacidade de produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas que atuam na degradação dos principais constituintes da biomassa vegetal. Contudo, poucos trabalhos são encontrados abordando o estudo do sistema celulolítico produzido por esses organismos (GARZILLO et al, 1994, DABA et al., 2011). A secreção dessas enzimas é influenciada principalmente pela fonte de carbono utilizada para o crescimento do fungo, e alguns estudos avaliam o uso de substratos lignocelulósicos como indutores da produção de celulasas por espécies de *Pleurotus* (GOYAL; SONI, 2011; KURT, BUYUKALACA, 2010; ELISASHVILI et al., 2008).

Trabalhos relacionados com a utilização de celulasas de fungos de decomposição branca em processos de sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos também são escassos. Dentre os dois trabalhos previamente apresentados e discutidos, o estudo realizado por Falkoski et al. (2012) mostrou uma abordagem similar à pretendida na execução da presente dissertação. Como anteriormente apresentado, Falkoski et al. (2012) avaliaram o efeito da sacarificação do bagaço de cana submetido a diferentes tipos de pré-tratamento com celulasas produzidas por *Pycnoporus sanguineus*. Contudo, a sacarificação do bagaço de cana utilizando somente extrato enzimático de *P. sanguineus* não se mostrou suficiente para alcançar o rendimento de hidrólise obtido com enzimas comerciais. Todavia, o uso de mistura de enzimas derivadas de *P. sanguineus* e enzimas comerciais na hidrólise do bagaço não foi avaliado.

Nesse sentido, o estudo de extrato enzimático de *Pleurotus ostreatus* em conjunto com preparações comerciais usadas na hidrólise da biomassa lignocelulósica parece ser uma abordagem mais viável, tendo como objetivo a avaliação do efeito sinérgico dessa mistura na hidrólise de bagaço de cana submetido a diferentes severidades de pré-tratamento.

4. OBJETIVOS

O objetivo principal desta dissertação foi a obtenção de extratos enzimáticos do fungo de decomposição branca *Pleurotus ostreatus* para sua utilização, em combinação com enzimas comerciais, no processo de hidrólise do bagaço de cana pré-tratado quimiotermomecanicamente.

Para atingir o objetivo foram executadas as etapas descritas a seguir:

- Obtenção de extrato enzimático de cultivo de *P. ostreatus* em meio líquido contendo bagaço de cana moída como única fonte de carbono.
- Concentração do extrato enzimático bruto por procedimentos de ultrafiltração em membrana.
- Determinação das atividades de celulasas e xilanases no extrato enzimático concentrado obtido.
- Determinação das atividades de enzimas hidrolíticas das preparações enzimáticas comerciais utilizadas.
- Realização de ensaios de hidrólise do bagaço de cana pré-tratado empregando celulasas comerciais suplementadas com o extrato concentrado de enzimas de *P. ostreatus*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Fungo e preparo do inóculo.

O fungo em estudo é o basidiomiceto causador de decomposição branca *Pleurotus ostreatus* CCIBT - 2347, mantido na coleção de cultura existente no Laboratório de Ciência da Madeira (LCM), na EEL – USP. O fungo foi repicado em placa de petri sobre meio composto por extrato de malte (2%), extrato de levedura (0,2%) e ágar (2%), e cultivado por 6 a 7 dias a 27°C até a completa colonização do meio. Vinte discos de 8mm de diâmetro foram utilizados como inóculo para cultivo em frascos Erlenmeyer de 2 L contendo 200 ml de meio líquido composto por 2,4% de extrato de batata/dextrose (DIFCO) e 0,7% de extrato de levedura (OXOID). Após 12 dias de incubação estática a 27°C, o micélio crescido em meio líquido foi filtrado, lavado com água esterilizada e macerado em liquidificador de aço inox com 200 mL de água. Da suspensão obtida foi retirada uma alíquota de 20 mL que foi filtrada sobre papel de filtro previamente seco e pesado para a determinação da quantidade de micélio presente no inóculo. O micélio retido mais o papel de filtro foram então secos até massa constante para a determinação da quantidade de micélio (base seca) contido na suspensão recém-preparada. Com base nessa determinação foi então definido o volume de suspensão necessário para adicionar uma concentração de 500 mg de micélio por litro de meio em cada frasco Erlenmeyer.

5.2. Preparo dos meios de cultura para a produção de celulasas.

A suspensão contendo micélio fúngico foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 40 mL de meio de cultura previamente autoclavados a 121°C por 15 minutos. Foram realizadas quatro condições de cultivo variando as fontes de carbono no meio sintético:

- 20 g.L⁻¹ de carboximetilcelulose - CMC (SIGMA C5013)
- 20 g.L⁻¹ de celulose microcristalina - Avicel (Fluka Biochemika 11365)
- 40 g.L⁻¹ de bagaço de cana (moído em moinho com malha de 20 Mesh)

- 40 g.L⁻¹ de bagaço de cana e 20 g.L⁻¹ de CMC.

A composição restante do meio líquido de cultura (por litro) foi: 1,0 g de NH₄NO₃, 0,8 g de KH₂PO₄, 0,2 g Na₂HPO₄, 0,5 g MgSO₄ · 7H₂O, 4,0 g de extrato de levedura. O meio foi ajustado para pH 6.0–6.2 com NaOH 2 mol/L (ELISASHVILI et al., 2006). Os cultivos foram incubados a 27 °C sem agitação por um período de até 42 dias, com a retirada de um frasco de cultivo de cada condição em tempos variáveis para obtenção de extrato enzimático para a análise da atividade de endoglucanase durante o crescimento do fungo.

Adicionalmente foram preparados meios de cultivos em frascos Erlenmeyer maiores, de 2 litros, contendo 200 mL de meio de cultura nas mesmas concentrações e condições descritas anteriormente. O cultivo em maior escala teve por finalidade a obtenção de maior volume de extrato bruto enzimático para ser usado em etapa posterior de concentração e recuperação para estudos de sacarificação de biomassa.

5.3.Obtenção do extrato enzimático bruto e concentrado.

A obtenção de extrato bruto enzimático dos cultivos de *P.ostreatus* foi realizada através de filtração a vácuo sobre filtro de vidro sinterizado n° 4 (SCHOTT). Para a remoção de eventual turbidez do filtrado, o meio foi ainda filtrado em membrana de ésteres de celulose (nitrato 75-80% e acetato) com 0,45 µm de poro (MILLIPORE).

A etapa de concentração foi realizada pela centrifugação (Centrífuga refrigerada Jouan CR4i) do extrato bruto obtido, em dispositivo de ultrafiltração (Amicon Ultra-15, MILLIPORE) contendo membranas de celulose regenerada com corte nominal de 10 kDa ou 30 kDa, a 3400g por 15 minutos a 4°C. O extrato enzimático concentrado retido pela membrana foi coletado e congelado em Ultrafreezer (QUIMIS) a -45°C e submetido à liofilização (Edward Supemodulolyo RK Freezer Dryer). O pó obtido do procedimento de liofilização foi então estocado em freezer a -18°C para posteriores experimentos de hidrólise enzimática.

5.4.Determinação das atividades enzimáticas.

As atividades de CMCase foram medidas nos extratos enzimáticos brutos para determinação da produção de endoglucanase durante todo o período de cultivo de *P.ostreatus*, e nos extratos concentrados após o procedimento de ultrafiltração. As demais atividades hidrolíticas descritas foram caracterizadas a partir dos extratos enzimáticos liofilizados e estocados. A determinação das atividades foi realizada a partir de estudos cinéticos da ação das enzimas sobre os substratos tipicamente utilizados, a fim de verificar se as atividades presentes, efetivamente proporcionam os níveis de conversão mínimos estipulados nos métodos de atividade descritos a seguir. Todas as preparações comerciais utilizadas nesse trabalho foram caracterizadas quanto ao conteúdo de enzimas hidrolíticas. Para as enzimas em que não foi possível a obtenção da cinética de reação (como a xilanase comercial usada em experimentos de hidrólise, que por estar purificada é suposto que sofra inibição pelo produto da hidrólise do substrato), a atividade foi determinada no tempo fixo especificado em cada metodologia.

Uma Unidade Internacional (UI) de atividade enzimática considera a definição tradicional de um μmol de produto produzido por minuto de reação. Para a determinação das atividades enzimáticas utilizou-se um espectrofotômetro GBC Cintra 20.

5.4.1. Atividade de endoglucanases.

Os extratos enzimáticos foram caracterizados segundo a atividade de endo-1,4- β -glucanase a partir da conversão de carboximetilcelulose (CMC) em oligossacarídeos com maior número de extremidades redutoras. A carboximetilcelulose empregada foi de média viscosidade e grau de substituição 0,7 (SIGMA C5013). Os açúcares redutores foram determinados pelo método do ácido dinitrossalicílico – DNS (MILLER, 1959).

Para a determinação do pico de produção de endoglucanase durante o período de cultivo de *P.ostreatus*, um volume de extrato enzimático entre 0,1 e 0,3 mL foi misturado a uma alíquota de solução de carboximetilcelulose 0,44% (p/v) até um volume final de 1,0 mL. A mistura foi incubada a 50°C por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS e os tubos foram fervidos por 5 minutos. Após resfriamento, as soluções tiveram a absorbância em 540 nm medidas em espectrofotômetro. O controle de reação foi feito adicionando DNS antes do extrato enzimático.

Uma curva de calibração foi construída a partir de uma série de diluições de uma solução de $30 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de glicose (previamente seca em dessecador com P_2O_5 e vácuo). Os valores de absorbância foram relacionados com as concentrações de glicose e a curva de calibração foi obtida.

Devido aos baixos valores de CMCase apresentado nos extratos brutos de cultivo de *P. ostreatus*, não foi possível o uso da metodologia proposta por Ghose (1987), que emprega uma conversão fixa de 2% do substrato em 30 minutos de reação. Contudo, essa metodologia foi utilizada para determinação da atividade de endoglucanase em extratos enzimáticos concentrados de *P. ostreatus* e em misturas enzimáticas comerciais.

No caso do emprego do método descrito por Ghose (1987), diluições seriadas foram preparadas a partir da amostra enzimática a ser analisada, sendo que no mínimo duas dessas diluições apresentaram uma liberação de açúcares redutores (AR) acima e abaixo de 0,5 mg. As reações foram conduzidas em tubos de ensaio de 30 mL, contendo 0,5 mL de solução de carboximetilcelulose 2% (p/v), pH 4,8, e 0,5 mL de extrato enzimático. Os tubos de ensaios foram aquecidos em banho a 50°C por 30 minutos. Após esse tempo, a reação foi interrompida com a adição de 3,0 mL de DNS, seguindo-se de fervura da mistura por 5 minutos. Foram adicionados então 20 mL de água destilada em cada tubo que foi posteriormente agitado para obtenção de uma solução homogênea. Foram feitos controles para cada amostra, adicionando o reagente de DNS antes do extrato enzimático. A leitura da absorbância foi feita a 540 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em massa de açúcares redutores através da curva de calibração baseada em glicose e os dados obtidos usados para construir um gráfico relacionando as diluições da enzima com a quantidade de glicose liberada. A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que proporcionaria a formação de 0,5 mg de açúcares redutores. O valor de 0,185 foi dividido por esse valor de diluição e o resultado obtido foi definido como atividade de CMCase em UI.mL^{-1} .

$$\text{CMCase} = \frac{0,185}{\text{concentração de enzima para liberação de 0,5 mg de AR}} (\text{UI.ml}^{-1})$$

Uma curva de calibração foi preparada a partir de uma solução de glicose de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, que foi utilizada para o preparo de uma série de diluições (1:1,5; 1:2; e 1:3) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8. A curva de calibração de glicose foi construída com 0,5 mL de solução de glicose, 0,5 mL de tampão e 3,0 mL de DNS. A mistura foi

fervida e posteriormente diluída com 20 mL de água destilada, e os valores de absorbância lidos a 540 nm.

5.4.2. Atividade de β -glicosidase.

A atividade de β -glicosidase foi determinada com base na metodologia de Tan, Mayers e Saddler (1987), empregando p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) (SIGMA) com substrato. As reações foram conduzidas a 50°C, adicionando-se uma alíquota de 0,8 mL de solução 0,1% pNPG, pH 4,8, a 0,2 mL do extrato enzimático. Uma alíquota de 2,0 mL de solução aquosa de bicarbonato de sódio 10% foi adicionada para a parada da reação em diferentes tempos (com um tempo máximo de 30 minutos) e a absorbância foi medida a 410 nm. O controle de reação foi preparado da mesma forma, adicionando-se, no entanto, a solução de bicarbonato antes do extrato enzimático. Uma curva de calibração com p-nitrofenol foi feita para converter as absorbâncias medidas em teor de p-nitrofenol presente em solução. Um gráfico da cinética da reação foi construído e utilizado para o cálculo a atividade.

5.4.3. Atividade de celobiohidrolases.

A atividade de exo-1,4- β -glucanase foi determinada com base na técnica descrita por Wood & Bhat (1988) que consiste em conduzir a hidrólise de uma suspensão de celulose microcristalina (Avicel) com o extrato enzimático. A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959).

Um volume de extrato enzimático entre 0,1 e 0,5 mL foi misturado com uma alíquota de suspensão de Avicel 1,0% (Fluka Biochemika 11365), pH 5,5, até um volume final de 1,0 mL. A reação foi incubada a 50°C durante os tempos de 30, 45, 60 e 120 minutos, sendo interrompida com a adição de 1,5 mL de DNS. O controle de reação foi feito adicionando DNS antes do extrato enzimático. A mistura reacional foi fervida e posteriormente centrifugada por 15 minutos a 3400 g. As absorbâncias do sobrenadante foram lidas a 540 nm e um gráfico com a cinética de reação foi construído. Uma curva de calibração com glicose, previamente seca em dessecador com P_2O_5 e vácuo, foi empregada para converter as absorbâncias medidas em teor de açúcares redutores.

5.4.4. Atividade de celulases totais.

A atividade total das celulases consiste na ação dos três grupos de enzimas: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, sobre um substrato celulósico insolúvel, como papel de filtro Whatman N°1, sendo a atividade sobre esse substrato também denominada FPA (do inglês “filter paper activity”) ou FPase.

A atividade de FPase foi determinada segundo a metodologia descrita por Ghose (1987). Essa metodologia determina a preparação de diluições da amostra enzimática a ser analisada, sendo necessário que no mínimo duas dessas diluições apresentem uma liberação acima e abaixo de 2,0 mg de açúcares redutores (AR).

A reação enzimática foi conduzida em tubos de ensaio de 30 mL contendo 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8, uma tira de papel de Whatman N° 1 com tamanho de 1 x 5 cm (aproximadamente 50 mg) e 0,5 mL de extrato enzimático. As misturas foram aquecidas em banho a 50°C por 60 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 3,0 mL de DNS, sendo a mistura posteriormente fervida por 5 minutos (MILLER, 1959). Posteriormente, foram adicionados 20 mL de água destilada a cada tubo, seguido de agitação. Os controles para cada amostra foram feitos adicionando-se o reagente de DNS antes do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram lidos a 540 nm e convertidos a glicose através de uma curva de calibração.

Um gráfico foi feito relacionando as diluições da enzima com a quantidade de glicose liberada. A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que corresponde a 2,0 mg de glicose. O valor de 0,37 foi dividido por esse valor de diluição e o resultado obtido foi definido como atividade de celulases totais do extrato FPU.mL⁻¹.

$$FPU = \frac{0,37}{\text{concentração de enzima para liberação de 2,0 mg de AR}} \text{ (UI.mL}^{-1}\text{)}$$

A curva de calibração foi preparada a partir de uma solução de glicose de 10 mg.mL⁻¹, que foi utilizada para o preparo de uma série de diluições (1:1,5; 1:2; 1:3 e 1:5) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8. A curva de calibração de glicose foi construída com 0,5 mL de solução de glicose, 1,0 mL de tampão e 3,0 mL de DNS. A mistura foi fervida e posteriormente diluída com 20 mL de água destilada, e os valores de absorbância lidos a 540 nm.

5.4.5. Atividade de β -D-xilanase.

A atividade de xilanase foi determinada com base na metodologia descrita por Bailey, Biely e Poutanen (1992). Um volume de 0,9 mL de uma solução de xilana de birchwood 1,0% (p/v), pH 5,3, foi adicionado a 0,1 mL de extrato enzimático, sendo a mistura incubada a 50°C durante diferentes tempos para obtenção da cinética de reação. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS e os tubos foram fervidos por 5 minutos. O controle foi feito adicionando o DNS antes do extrato enzimático. A leitura das absorbâncias das misturas reacional foi realizada a 540 nm, e os valores obtidos convertidos em concentração de xilose através da curva de calibração de xilose.

A curva de calibração foi construída a partir de uma série de diluições de uma solução de 30 μ mol/ml de xilose (previamente seca em dessecador com P_2O_5 e vácuo).

5.4.6. Atividade de β – xilosidase.

A metodologia para determinação da atividade de β - xilosidase descrita por Tan, Mayers e Saddler (1987) é similar ao modo de determinação mencionando para β – glicosidase (item 5.4.2.), mudando apenas o substrato de ação enzimática, que passa a ser 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX) (SIGMA). Um gráfico de cinética de reação foi construído para determinação da atividade. A curva de calibração com p-nitrofenol foi utilizada para converter os valores de absorbância com o conteúdo de p-nitrofenol liberado.

5.5.Determinação de proteínas.

O teor de proteínas foi determinado pelo Método de Lowry (GHOSE, 1987). Foram preparados 4 reagentes para determinação de proteínas:

- Reagente A: 20 g de Na_2CO_3 e 4 g de NaOH, dissolvidos em água destilada até atingir o volume final de 1000 mL;
- Reagente B1: 1 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ dissolvido em água destilada, volume final 100 mL;
- Reagente B2: 2 g de tartarato de sódio e potássio dissolvido em água destilada, volume final 100 mL;

- Reagente C: misturaram-se 1 mL do reagente B1, 1 mL do reagente B2 e 100 mL do reagente A, nessa ordem.
- Reagente Fenol (1 N) foi preparado a partir da diluição (1:2) do reagente Folin Ciocalteou (SIGMA).

Primeiramente, foram misturados 1,0 mL de extrato enzimático a 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para precipitação das proteínas. A mistura foi mantida a 4°C por 60 minutos. Após esse tempo, a mistura foi centrifugada por 30 minutos a 3.400 g e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspendido em 1 mL de Reagente A. Um volume de 0,5 mL dessa solução foi misturado à 5 mL do Reagente C. Depois de 10 minutos, adicionou-se 0,5 mL do Reagente de Fenol, seguida de agitação vigorosa. Após 30 minutos, a leitura foi feita em espectrofotômetro a 750 nm. Uma curva de calibração foi construída a partir de soluções com concentrações conhecidas de Albumina de Soro Bovino (valores entre 0,05 – 1,0 mg.mL⁻¹ de BSA) que foram submetidas ao mesmo procedimento descrito acima, sendo que os valores de absorbância obtidos foram correlacionados com a concentração de proteínas presente nas amostras.

5.6.Ensaio de hidrólise do bagaço de cana pré- tratado

Como substrato para a sacarificação enzimática foi utilizado bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino, obtido previamente em um trabalho que foi desenvolvido paralelamente a esta dissertação. Trata-se do trabalho de tese do estudante Omar Uyarte (EEL-USP). Para o pré-tratamento foram utilizados 600 g de material em base seca que foi submetido ao vácuo por 30 minutos mais uma impregnação ao vácuo por 15 minutos com Na₂SO₃ e NaOH. A digestão da biomassa foi feita a 120°C por 2 h, seguido de lavagem com água e centrifugação até atingir uma consistência de 30% (p/p). A água liberada durante a centrifugação foi coletada e usada para diluir a biomassa na próxima etapa de refinamento de disco. O material lavado foi suspenso em água até um volume final de 25 litros (2 % consistência) e refinado em um refinador de discos REGMED MD-300 com um espaço de disco de 0,1 mm (REGMED Brasil) e um consumo de energia de 250 Wh.

Dois níveis de deslignificação foram obtidos no pré-tratamento. O bagaço pré-tratado com carga alta de sulfito alcalino (10,0 e 5,0 de g Na₂SO₃ e NaOH por cada 100 gramas de bagaço) é considerado ótimo e permite a hidrólise eficiente da celulose usando

uma mistura de enzimas comerciais. O outro substrato foi obtido em condições sub-ótimas de pré-tratamento (5,0 e 2,5 de g Na₂SO₃ e NaOH por cada 100 gramas de bagaço) e contém maior teor de lignina residual. Os bagaços tratados com alta e com baixa carga de sulfito alcalino foram utilizados nas hidrólises seguintes.

Em um primeiro experimento, foram realizadas hidrólises destes bagaços pré-tratados com duas diferentes cargas enzimáticas de celulases comerciais (celulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (Sigma C2730 - Lote: SLBB4803V) e β -glicosidase de *Aspergillus niger* (Sigma C6105 - Lote: 02141799V):

- Carga alta: 10 FPU de celulase Sigma C2730 e 15 UI de β -glicosidase Sigma C6105, por grama de bagaço.
- Carga média: 5 FPU de celulase Sigma C2730 e 7,5 UI de β -glicosidase Sigma C6105, por grama de bagaço.

Em um segundo experimento, a hidrólise com celulase comercial foi suplementada com extrato enzimático obtido do cultivo de *P. ostreatus* em bagaço de cana. A intenção foi ajustar as condições de hidrólise para que a atividade endoglucanase permanecesse a mesma a encontrada na hidrólise com carga alta de enzimas comerciais sendo, contudo, proveniente de misturas das enzimas comerciais com o extrato enzimático de *P. ostreatus*. Dessa forma, a preparação enzimática utilizada continha: 5 FPU de celulase Sigma C2730 e 15 UI de β -glicosidase Sigma C6105 por grama de bagaço pré-tratado, mais extrato enzimático de *P. ostreatus*.

Em um terceiro experimento, foram feitas preparações enzimáticas suplementadas com um determinado tipo de enzima comercial. As duas enzimas utilizadas para a suplementação foram β -glicosidase de *Aspergillus niger* (Sigma C6105) e endo-1,4- β -D-Xilanase, GH 11, proveniente de *Neocallimastix patriciarum* (MEGAZYME - Lote 91001b). O intuito desses experimentos foi avaliar a eficiência de hidrólise mantendo metade da carga de endoglucanase (5 FPU Sigma C2730) e aumentando as demais cargas de β -glicosidase e xilanase.

Os ensaios de hidrólise foram realizados em pequena escala, devido aos baixos níveis de produção de celulases observados usualmente nos cultivos do fungo de decomposição branca. As reações foram conduzidas em tubos Eppendorff de 2 mL com consistência de 2% de substrato. Uma massa de 20 mg em base seca de bagaço de cana moído foi suspensa num volume final de reação de 1,0 mL de solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e 0,01 % de azida sódica, contendo a mistura de enzimas. Os experimentos foram realizados sob agitação de 120 rpm e a 45 °C por 72 h. Durante o

processo de sacarificação, as reações foram amostradas em intervalos de 4, 8, 24, 48 e 72 h. Para isso, os tubos foram retirados do agitador, imersos em banho de gelo/água e centrifugados a 3400 g a 10°C por 15 min. Após a centrifugação, 20 µL de sobrenadante foi retirado e diluído com 180 µL de água e guardado, congelado, para análise posterior de glicose e xilose por HPLC.

Para a análise em HPLC foi utilizada uma coluna BIORAD AMINEX HPX – 87H, com H₂SO₄ 5 mM como fase móvel e fluxo de 0,6 mL por minuto. Um detector de índice de refração foi utilizado a uma temperatura controlada de 35°C (Waters, modelo 2414). A concentração de carboidratos foi determinada através da calibração com padrões, de grau analítico, secos sob pentóxido de fósforo e vácuo.

5.7.Caracterização da composição química do bagaço pré-tratado.

Cerca de 3 g (massa seca) das amostras de bagaço moído a 20 Mesh foram extraídas com etanol 95% durante 6 h em extrator de Soxhlet. O teor de extrativos foi determinado para o material extraído. As amostras sem extrativos foram secas ao ar, tiveram nova umidade quantificada e então foram hidrolisadas com ácido para caracterização química (FERRAZ et al., 2000). As amostras foram hidrolisadas com ácido sulfúrico 72% (p / p) a 30°C por 60 minutos (300 mg de amostra e 3 mL de ácido sulfúrico). Posteriormente foram adicionados 79 mL de água e a mistura foi autoclavada a 121°C / 1 atm por 60 minutos. A mistura autoclavada foi filtrada em filtros de vidro sinterizado de porosidade número 3, (previamente secos em estufa a 105°C por 1 hora e meia e pesados). O material retido foi lavado, com 2 porções de 5 mL de água, e seco em estufa a 100°C até que atingisse massa constante para determinação gravimétrica de lignina insolúvel. Para determinação de lignina solúvel, o filtrado foi analisado em espectrofotômetro UV-visível a 205 nm considerando a absortividade da lignina solúvel igual a 105 L.g⁻¹.cm⁻¹. A fração solúvel foi ainda filtrada em SepPack C18 e a determinação do teor de açúcares monoméricos e ácido acético foi realizada em HPLC, utilizando-se uma coluna BIORAD AMINEX HPX – 87H, com H₂SO₄ 5 mM a 0,6 ml/min como eluente e detecção por índice de refração (Waters, modelo 2414) a uma temperatura controlada de 35°C.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1.Obtenção de extrato enzimático de cultivo de *Pleurotus ostreatus*

Entre os fungos de decomposição branca descritos com elevado potencial de produção de celulasas (item 2.5), a espécie *Pleurotus ostreatus* foi escolhida para o cultivo e obtenção de enzimas para utilização em ensaios de sacarificação desenvolvidos nesse trabalho de mestrado. Essa espécie apresenta capacidade de crescimento em vários materiais celulósicos e lignocelulósicos, sendo a secreção de suas enzimas degradativas amplamente influenciada pelo tipo de substrato utilizado (HIGHLEY, 1973; MATA; CORTÉS; SALMONES, 2007; KURT; BUYUKALACA, 2010; GOYAL; SONI, 2011; ELISASHVILI et. al. 2008). Como mencionado, substratos celulósicos são capazes de estimular a expressão de celulasas em fungos de decomposição branca (HIGHLEY, 1973; GARZILLO et al,1994). Cultivos em substratos celulósicos purificados, como CMC e Avicel, são convenientes para estudos que visam à purificação enzimática, pois possibilitam a obtenção de um extrato enzimático livre de pigmentos. Outros trabalhos reportam que o uso de resíduos lignocelulósicos como substrato de cultivo de basidiomicetos é capaz de estimular significativamente a secreção de enzimas, sem a necessidade de suplementação do meio com indutores (ELISASHVILI et. al. 2008).

Neste contexto, cultivos de *P. ostreatus* foram realizados, variando somente a fonte de carbono, para avaliação do melhor meio nutriente para produção de celulasas. Como substratos de cultivo foram empregados os derivados de celulose, CMC e Avicel, assim como bagaço de cana.

6.1.1. Crescimento e produção de endoglucanases em cultivos de *P.ostreatus* em diferentes fontes de carbono

Os cultivos submersos, sem agitação, foram realizados distinguindo-se somente em relação à fonte de carbono, sendo avaliados quatro diferentes tipos de substrato: bagaço de cana moído, CMC, Avicel e meio combinado com bagaço mais CMC. Dos substratos testados, apenas os que continham bagaço de cana apresentaram um crescimento abundante do fungo, verificado pela cobertura da superfície do meio líquido por micélio

que demandou cerca de 6 – 7 dias de crescimento. Tal fato pode ser justificado devido à presença de nutrientes de mais fácil assimilação, como polissacarídeos e açúcares solúveis, que propiciaram o crescimento em biomassa do fungo durante a primeira semana de cultivo (SCHIESSER, 1989). Com o mesmo período de crescimento, os cultivos em CMC como fonte única de carbono também apresentaram completa colonização do meio; contudo, o crescimento do fungo se limitou a formação de uma fina camada de micélio na superfície do meio de cultivo. Já nos cultivos contendo Avicel, a formação de micélio ocorreu em apenas algumas regiões da superfície do meio líquido, e se manteve assim durante os 42 dias de cultivo analisados.

Em 13 dias de cultivo foi observado o início da formação de corpos de frutificação em culturas que continham CMC como uma das fontes de carbono, sendo que, em meio contendo bagaço e CMC, a formação de pequenos cogumelos foi mais evidente. Não foi verificado formação de corpos de frutificação nos cultivos contendo somente Avicel ou bagaço de cana. Estruturas de reprodução são formadas quando os basidiomicetos são crescidos em meios ricos em nutrientes, sendo a frutificação tipicamente induzida pela redução da temperatura até um mínimo de 5°C (KÜES; LIU, 2000). Dessa forma, supõe-se que a presença de CMC em meio contendo bagaço de cana forneça melhor condição nutricional para possibilitar o surgimento de cogumelos. Isso pode ser devido ao fato da CMC ser uma fonte celulósica de mais rápida utilização, já que não apresenta regiões de celulose cristalina e, diferente da celulose presente no bagaço, sua estrutura não se encontra associada à hemicelulose e à lignina. Além disso, suspeita-se que uma variação térmica no ambiente possa ter ocorrido durante o período da noite e que tenha induzido a formação de corpos de frutificação.

O crescimento de fungos do gênero *Pleurotus* está associado a um perfil de produção de enzimas oxidativas e hidrolíticas. Neste trabalho, não foram determinadas as atividades de enzimas oxidativas sintetizadas durante o período de cultivo de *P.ostreatus*; contudo, a produção de endoglucanases (EG) foi avaliada durante 42 dias de crescimento. A atividade de CMCase foi determinada em diferentes tempos de cultivo e um gráfico foi construído para análise da tendência de produção de EG para as diferentes fontes de carbono estudadas (Figura 4 e Tabela 6). Cada ponto no gráfico representa a atividade obtida do sobrenadante de um cultivo em 40 mL de meio, numa determinada fonte de carbono. As medidas de atividade foram feitas em triplicata a partir de um único frasco de cultivo e os desvios mostrados representam a variação experimental na determinação da atividade enzimática de um mesmo extrato.

Figura 4: Curva de produção de endoglucanases durante o cultivo de *P.ostreatus* em diferentes fontes de carbono. Curva em azul: 2% de Avicel; curva em verde: 2% de CMC; curva em roxo: 4% de bagaço de cana; curva em vermelho: 4% de bagaço de cana e 2% de CMC.

Tabela 6: Atividade máxima de endoglucanase alcançadas durante o cultivo de *P.ostreatus*.

Fonte de Carbono	Atividade de Endoglucanase*	Tempo de cultivo (dias)
Avicel	0,72	42
CMC	2,33	13
Bagaço de Cana	1,72	38
Bagaço de Cana + CMC	3,43	20

* Atividade medida como μMol de açúcar redutor após 10 min de reação por mL de extrato.

Dentre todas as fontes de carbono avaliadas, o cultivo em Avicel foi o que apresentou o menor nível de produção de EGs. Baixos valores de atividade de EG foram mantidos durante todo período de cultivo, sugerindo que o pequeno crescimento em micélio observado na superfície do meio de cultura com Avicel tenha sido devido a uma produção de celulasas em nível basal, para degradação lenta do substrato celulósico cristalino (HIGHLEY, 1973). De modo contrário, o cultivo em CMC estimulou a produção de EGs por *P.ostreatus*, sendo atingido um máximo de produção em apenas 13 dias de cultivo, seguido de um declínio da produção de EG, provavelmente causado pela degradação ou inativação dessas enzimas (MANDELS; STENBERG, 1976). Já no cultivo em bagaço de cana como única fonte de carbono, dois períodos de acúmulo de EGs, com 14 e 38 dias, foram evidenciados durante os 42 dias de cultivos avaliados. Como já mencionado, supõe-se que o primeiro período tenha sido o reflexo de um consumo inicial de substrato de fácil acesso e metabolização, e o segundo período seja resultado de uma

ação mais intensa do fungo sobre a fração mais recalcitrante contida no bagaço (SCHIESSER, 1989).

A avaliação das fontes de carbono individuais utilizadas nos estudo de produção de EGs revela que o cultivo em CMC apresentou maiores níveis de atividade de EGs do que os obtidos nos cultivos em meio com Avicel ou bagaço de cana. Tal resultado é semelhante ao reportado no trabalho de Goyal e Soni (2011), em que cultivos submersos, não suplementados, da espécie *Pleurotus florida* apresentaram maiores níveis de produção de celulases em meio contendo CMC (CMCase: 166 UI.L⁻¹), do que em meio com celulose comercial (CMCase: 3 UI.L⁻¹) ou palha de trigo (CMCase 4 UI.L⁻¹) como fontes de carbono.

Os maiores níveis de produção de EG foram atingidos no cultivo em que se empregou a combinação de bagaço de cana e CMC como fontes de carbono. Como apresentado no cultivo em bagaço de cana, dois períodos de acúmulo de EG foram identificados. Contudo, a adição de CMC ao meio antecipou os períodos de acúmulo de EGs, assim como proporcionou um aumento dos níveis de secreção enzimática pelo fungo. Além disso, a presença de CMC em meio contendo bagaço de cana estimulou a formação de corpos de frutificação por *P.ostreatus* a partir do 13º dia de cultivo. Como reportado por diversos trabalhos, um aumento na produção de enzimas hidrolíticas é descrito ocorrer durante o período de frutificação devido a maior necessidade de energia requerida para formação de estruturas de reprodução (MATA; CORTÉS; SALMONES, 2007; KURT; BUYUKALACA, 2010; PANDEY ET AL., 2012). Da mesma forma, pode se verificar um aumento da produção de EG logo após o início do estágio de frutificação de *P.ostreatus*, seguido de um declínio depois do 20º dia de cultivo.

Alguns trabalhos, principalmente do grupo de pesquisa coordenado por Elisashvili e colaboradores, reportam elevados valores de EGs obtidos em cultivos de espécies de *Pleurotus* em diversas fontes de carbono. Um exemplo é apresentado pelo trabalho de Elisashvili et. al., (2008) para cultivos submersos utilizando cascas de banana como fonte de carbono. Neste caso, a atividade de CMCase reportada em um cultivo de *P.ostreatus* foi de 62 UI.mL⁻¹. Esse valor de produção de EG é comparável a valores obtidos em cultivos de espécies do gênero *Trichoderma* (CASTRO et al. , 2010).

Está claro que diferenças em relação à espécie e cepa do fungo estudado, natureza do substrato de crescimento, forma de cultivo, tipo de fonte de nitrogênio, métodos de separação e obtenção dos extratos enzimáticos estão entre os fatores que influenciam no nível de atividade de EGs detectado em cada estudo. Isso torna difícil a comparação de

resultados entre experimentos distintos. Contudo, é provável que um dos maiores motivos para a discrepância dos resultados reportados na literatura corrente esteja correlacionado com o emprego de diferentes metodologias de determinação da atividade de endoglucanase. Por exemplo, uma comparação da metodologia utilizada no presente trabalho que se baseia no artigo de Ghose (1987) e aquela usada por Elisashvili et al. (2008) mostra que há diferenças na concentração e a na viscosidade do CMC utilizado como substrato para a determinação das atividades de CMCase (respectivamente, 0,44% p/v de CMC de viscosidade média contra 1% p/v de CMC de baixa viscosidade). A temperatura de incubação das EGs testadas também varia de acordo com o método empregado (40°C no trabalho de Elisashvili et al. 2008 contra 50°C no método padrão reportado por Ghose, 1987). Tais diferenças na metodologia de detecção podem ser responsáveis por parte da discrepância entre os valores de atividades reportados.

6.1.2. Produção de endoglucanases em diferentes volumes de cultivo de *P.ostreatus*.

Os cultivos nas diferentes fontes de carbono foram realizados em dois volumes: em Erlenmeyers de 125 mL contendo 40 mL de meio de cultura, utilizado para o monitoramento da atividade de CMCase durante o crescimento do fungo; e em Erlenmeyers de 2 litros contendo 200 mL de meio inoculados com as mesmas concentrações de micélio fúngico e mantendo iguais os demais parâmetros de cultivo como pH, temperatura e substrato nutriente. O cultivo em maior escala teve por finalidade a obtenção de maior volume de extrato enzimático no período em que fosse atingida uma alta produção de EGs.

Apesar de condições similares terem sido utilizadas nos cultivos em menor e maior escala, as atividades de EG determinadas em um mesmo período de crescimento não foram equivalentes. A Tabela 7 mostra os valores de atividade de EGs obtidos dos sobrenadantes de cultivo em CMC, bagaço de cana, e meio combinado com bagaço de cana mais CMC, nos dois volumes de meio líquido utilizado. Os cultivos foram monitorados em função do tempo e, as atividades obtidas em um mesmo período e em uma mesma fonte de carbono, podem ser comparadas. Para todas as fontes de carbono avaliadas foram verificadas maior produção de EGs em cultivos com menor volume de meio.

Tabela 7: Produção de endoglucanase em diferentes volumes de cultivo de *P.ostreatus*.

Fonte de carbono	Período de cultivo (dias)	Atividade de Endoglucanase*	
		40 mL	200 mL
CMC	20 – 21	1,60	1,10
Bagaço + CMC	25 – 26	2,36	0,81
Bagaço	30 – 31	1,12	0,56

* Atividade medida como μMol de açúcar redutor após 10 min de reação por mL de extrato.

A menor produção de EG apresentada nos cultivos em maior escala pode estar relacionada com a disponibilidade de oxigênio no ambiente de crescimento. Nos cultivos de menor volume (40 mL), foi observada a formação de uma camada de meio líquido mais estreita em comparação com a camada formada nos cultivos de maior volume (200 mL). Supõe-se que a camada mais fina de meio possa ter facilitado a troca de oxigênio com o ambiente, e que isso tenha possibilitado um maior metabolismo e produção de enzimas nesses cultivos. Em um estudo realizado por Burla et. al., (1992), o aumento do nível de oxigênio e da eficiência de troca gasosa em cultivos de *P.ostreatus* causou um efeito positivo no crescimento em biomassa do fungo. Dessa forma, supõe-se que a maior eficiência de troca gasosa nos cultivos de menor volume tenha permitido um crescimento em biomassa de micélio proporcionalmente superior ao observado em cultivos de maior escala, e que isso tenha consequentemente levado a maiores níveis de secreção de enzimas.

Uma avaliação da influência da disponibilidade de oxigênio na produção de enzimas hidrolíticas em culturas estáticas de *P.ostreatus* pode ajudar a compreender os diferentes níveis de expressão mostrados nos cultivos em maior e menor escala. Uma tentativa de se igualar as condições de cultura em maior e menor escala, seria o uso de recipientes com maior área superficial para armazenar volumes maiores de meio líquido de cultura usado para produção de enzimas. Contudo, a otimização das condições de cultivo para obtenção de maiores níveis de produção de celulasas não era a finalidade do presente trabalho, mas sim a obtenção de uma quantidade apropriada de enzima para a realização de ensaios de hidrólise enzimática.

6.2. Concentração dos extratos enzimáticos de cultivo de *P.ostreatus* por ultrafiltração.

Um primeiro experimento foi realizado para se estimar a eficiência do uso da ultrafiltração como procedimento de concentração de endoglucanases. Extratos brutos enzimáticos obtidos com 25 dias de cultivo de *P.ostreatus*, em 40 mL de meio contendo bagaço de cana como única fonte de carbono, foram concentrados em dispositivos de ultrafiltração, usando membrana de corte de 10 e 30 kDa. Os valores de atividade de EG dos extratos bruto e concentrados estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8: Concentração, por ultrafiltração, de endoglucanase presente em extrato de cultivo de *P. ostreatus* em bagaço de cana.

Corte da membrana de Ultrafiltração	Extrato enzimático	Volume (mL)	Atividade de EG por mL	Atividade de EG total	Rendimento (%)
10KDa	Bruto	40	0,67	26,80	100
	Concentrado	2	9,81	19,62	73
30KDa	Bruto	40	0,67	26,80	100
	Concentrado	2	7,98	15,96	60

* Atividade medida como μMol de açúcar redutor após 10 min de reação por mL de extrato.

A redução de volume do extrato de cultivo em bagaço de cana foi da ordem de 20 vezes, sendo observada uma concentração da atividade de endoglucanase de 14,7 a 12 vezes com a ultrafiltração em membranas de 10 e 30 kDa, respectivamente. A ultrafiltração em membrana de 10 kDa mostrou um bom rendimento para a purificação parcial de EGs, além de ser um método simples e rápido de obtenção de extratos concentrados.

Os extratos concentrados obtidos da ultrafiltração foram congelados em ultrafreezer e depois liofilizados até a formação de um pó, que foi posteriormente ressuscitado em água destilada para nova avaliação da atividade de endoglucanase. As atividades de EGs dos extratos ressuscitados estão mostradas na Tabela 9. Pode-se verificar que uma média de 82% da atividade foi mantida após a liofilização dos extratos concentrados por ultrafiltração contra membranas de 10 e 30 kDa, o que nos levou a considerar que a liofilização é um procedimento viável para a estocagem de enzimas para uso futuro.

Tabela 9: Atividades de endoglucanase após liofilização dos extratos enzimáticos concentrados por ultrafiltração.

Procedimento de concentração	Extratos enzimáticos	Volume (mL)	Atividade (UI.mL ⁻¹)	Atividade total (U)	Rendimento (%)
Ultrafiltração 10KDa	Concentrado	1,5	0,981	1,471	100
	Liofilizado	1,0	1,108	1,108	75
Ultrafiltração 30KDa	Concentrado	1,6	0,798	1,280	100
	Liofilizado	1,0	1,141	1,141	89

Os extratos de enzimas produzidos por *P.ostreatus* nos cultivos em maior escala dos meios com bagaço de cana, e meio combinado de bagaço de cana e CMC, foram concentrados por procedimento de ultrafiltração em membrana de 30 kDa semelhantes aos descritos anteriormente. Para isso, um volume de 440 mL de extrato enzimático bruto foi obtido a partir de três frascos de cultivo submerso com bagaço de cana como fonte de carbono, após 42 dias de crescimento. Para os cultivos realizados em meio combinado com bagaço de cana mais CMC foram utilizados cinco frascos para obtenção de 730 mL de extrato bruto, após 25 dias de crescimento. Volumes menores de sobrenadante de cultivo foram obtidos devido à absorção de água pelo bagaço, e pela perda de água por evaporação.

A ultrafiltração do extrato de cultivo em bagaço causou uma redução de volume de aproximadamente 15 vezes, enquanto que para o extrato de cultivo em bagaço mais CMC, apenas uma redução de 5 vezes foi obtida (Tabela 10). Essa menor diminuição no volume pode ser explicada pela saturação das membranas dos dispositivos de ultrafiltração pela CMC presente no extrato bruto de cultivo, limitando dessa forma, a eficiência de filtração do meio líquido através da membrana.

Tabela 10: Concentração, de endoglucanase por ultrafiltração em membrana de corte de 30 kDa.

Fonte de carbono	Procedimento	Volume (mL)	Atividade de EG por mL	Atividade de EG total	Rendimento (%)
Bagaço de cana	Extrato bruto	440	1,41	620,4	100
	Concentrado	30	8,35	250,5	40
Bagaço de Cana + CMC	Extrato bruto	730	1,12	819,8	100
	Concentrado	148	4,76	704,5	86

* Atividade medida como μMol de açúcar redutor após 10 min de reação por mL de extrato.

O rendimento de purificação de EGs obtido com a ultrafiltração do extrato de cultivo em bagaço foi de 40%, porcentagem inferior à apresentada no primeiro experimento de ultrafiltração em membrana de 30 kDa de extrato de mesmo cultivo (Tabela 8). Uma explicação para o menor rendimento de concentração enzimática pode estar no fato de algumas membranas dos dispositivos de ultrafiltração terem se rompido devido ao uso extensivo e a alta força de centrifugação. Com isso, é suposto que tenha ocorrido algum vazamento de parte do meio enzimático concentrado para a fração filtrada pela membrana, que foi posteriormente descartada.

Já a ultrafiltração do extrato de cultivo em bagaço de cana e CMC exibiu um rendimento maior do que o obtido anteriormente (59%), pois se obteve rendimento de 86%. A maior porcentagem de purificação apresentada é supostamente devido à saturação da membrana de ultrafiltração com o CMC presente no extrato bruto, que pode ter limitado a passagem de enzimas para a porção filtrada do extrato. Dessa forma, apesar de um maior volume de extrato concentrado, rico em CMC, houve uma menor perda de enzimas no processo de ultrafiltração.

Os meios enzimáticos concentrados obtidos no processo de ultrafiltração foram congelados em ultrafreezer e liofilizados para estocagem e uso posterior em ensaios de hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado. Uma desvantagem apresentada no uso das enzimas produzidas nos cultivos com CMC, para utilização em ensaios de hidrólise, é o alto teor de CMC residual nos extratos concentrados obtidos. A presença de CMC na amostra liofilizada foi confirmada pela quantificação do teor de açúcares totais pelo método do fenol-ácido sulfúrico, que consistiu na adição de 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado e 25 µL de fenol 80% a 1,0 ml da amostra. A mudança da cor da solução, medida por espectrometria na região do visível, é proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra. A CMC constituiria como um interferente nos ensaios de sacarificação de bagaço de cana devido ao fato de ser substrato de ação de celulasas, sendo que, a presença desse composto no meio reacional poderia mascarar a real hidrólise do bagaço de cana. Assim, somente o extrato enzimático do cultivo em bagaço foi utilizado no desenvolvimento de ensaios de hidrólise posteriormente descritos nessa dissertação. Uma massa de 524 mg de material desidratado foi obtida após a liofilização de 40 mL de extrato enzimático concentrado de cultivo em bagaço de cana.

6.3.Caracterização das atividades de enzimas hidrolíticas presentes no extrato enzimático de *P.ostreatus* e em preparações comerciais de celulasas.

A caracterização nos níveis de atividade de celulasas e xilanases presentes nas preparações enzimáticas comerciais e no extrato enzimático derivado de *P. ostreatus* foram realizadas para uma melhor avaliação do efeito da composição de enzimas nos experimentos de hidrólise do bagaço de cana.

As atividades enzimáticas do extrato liofilizado de cultivo em bagaço estão descritas na Tabela 11. A atividade de CMCase foi determinada pela metodologia descrita por Ghose (1987), enquanto que para os demais grupos de enzimas as determinações das atividades foram feitas a partir do estudo cinético da reação com os substratos específicos de cada caso. Os dados complementares das determinações de atividades de enzimas hidrolíticas estão apresentados no Apêndice A. Apesar de muitos trabalhos reportarem a produção, mesmo que baixa, de celobiohidrolase em diversos cultivos de *P. ostreatus* (VALÁŠKOVÁ; BALDRIAN, 2006; MATA; CORTÉS; SALMONES, 2007; GOYAL; SONI, 2011), o extrato enzimático obtido do cultivo desse fungo realizado no presente trabalho não apresentou uma atividade de CBH detectável pela metodologia de quantificação utilizada. Além disso, de acordo com o estudo de Valášková e Baldrian (2006), cerca de 87% das CBHs produzidas por *P. ostreatus* em cultivos submersos com celulose microcristalina são encontradas associadas à porção sólida do substrato de cultivo. Da mesma forma, é possível supor que grande parte das CBHs produzidas nos cultivos submersos com bagaço tenha permanecido aderida à fração sólida do substrato, o que explicaria a ausência de detecção da atividade dessa enzima no sobrenadante de cultivo. A quantificação da atividade em papel de filtro também não foi possível, visto que não se atingiu 4% de conversão de substrato nos 60 minutos estabelecidos na metodologia de Ghose (1987). A baixa atividade de celulasas totais pode ser atribuída a ausência de atividade de CBHs, o que ocasiona baixa conversão da celulose a mono ou dissacarídeos.

A maior atividade hidrolítica medida a partir do extrato liofilizado foi atribuída a ação de xilanases (0,366 UI por mg de proteína), sendo duas vezes superior a atividade observada para EG e BGL, enquanto que a atividade de β -xilosidase foi verificada ser nove vezes menor ao exibido pela xilanase.

Tabela 11: Teor de proteínas e atividade de celulases e hemicelulases presentes por grama de extrato liofilizado de cultivo de *P. ostreatus* em bagaço de cana.

Proteína (mg.g ⁻¹)	FPase (FPU.g ⁻¹)	CMCase (UI.g ⁻¹)	β-glicosidase (UI.g ⁻¹)	CBH (UI.g ⁻¹)	Xilanase (UI.g ⁻¹)	β-Xilosidase (UI.g ⁻¹)
215 ±9	Nd	40 ± 1	40,1±0,6	Nd	78,7±0,1	8,6±0,2

Nd: não detectado.

A caracterização das atividades de enzimas hidrolíticas das preparações enzimáticas comerciais foram realizadas seguindo a mesma metodologia de quantificação utilizada para o extrato de *P. ostreatus*, e estão descritas na Tabela 12.

Duas preparações de celulases comerciais foram empregadas nos ensaios de hidrólise do bagaço de cana: uma mistura enzimática derivada da cepa ATCC 26921 de *Trichoderma reesei*, comercializada pela SIGMA sob número de catálogo C2730, e comumente denominada de Celluclast 1.5L; e outra proveniente de *Aspergillus niger*, comercializada pela SIGMA sob número de catálogo C6105, também conhecida como Novozym 188.

Uma preparação comercial de endo-xilanase purificada, pertencente a família GH 11, proveniente de *Neocallimastix patriciarum* (MEGAZYME), também foi utilizada na tentativa de se avaliar o efeito de suplementação com xilanases na eficiência de hidrólise do bagaço de cana.

Tabela 12: Atividade de celulases e hemicelulases presentes em preparações enzimáticas comerciais.

Enzimas comerciais	Proteína (mg.mL ⁻¹)	FPase (FPU.mL ⁻¹)	CMCase (UI.mL ⁻¹)	β-glicosidase (UI.mL ⁻¹)	CBH (UI.mL ⁻¹)	Xilanase (UI.mL ⁻¹)	β-Xilosidase (UI.mL ⁻¹)
<i>T.reesei</i> ATCC 26921 (SIGMA C2730)	107±5	45±2	549±54	77±2	101±11	485±10	29,0±0,4
<i>Aspergillus niger</i> (SIGMA C6105)	62±3	Nd	Nd	752±2	Nd	2517±25	8±1
Xilanase de <i>N.patriciarum</i> (MEGAZYME)	9*	Nd	Nd	Nd	Nd	5697±1	Nd

(*) Valor informado no produto comercializado.

Nd: Não detectado.

Com base nos dados apresentados na Tabela 12 foi possível calcular a razão entre os níveis de endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidase para cada unidade de atividade celulásica total (FPase) presente na preparação enzimática de *T. reesei*, sendo verificada uma relação de 12,1 EG: 2,2 CBH: 1,7 BGL. Assim, observa-se que o complexo celulolítico produzido por *T. reesei* apresenta uma maior proporção de EGs, seguido por CBHs, e um menor conteúdo de BGLs. Já as enzimas produzidas por *A. niger* apresentam um elevado conteúdo de BGL, apresentando baixo teor de EGs (não detectado pela metodologia descrita por Ghose, 1987) e ausência de atividade de CBHs. Em relação ao teor de xilanases, o extrato de *A. niger* apresenta um conteúdo cinco vezes superior a quantidade verificada no extrato enzimático de *T. reesei*. Assim, a suplementação de preparações de *T. reesei* com enzimas de *A. niger* tem por finalidade elevar o teor de BGLs, possibilitando uma degradação completa do substrato celulósico e diminuindo reações de inibição enzimática, além de elevar o conteúdo de xilanases.

A mistura dessas duas preparações é comumente utilizada em estudos de hidrólise de materiais lignocelulósicos, sendo o conteúdo de enzimas hidrolíticas presentes nesses extratos enzimáticos descrito em diversos trabalhos (BERLIN et. al., 2007; MENDES et.al., 2011). Contudo, ampla variação da composição de enzimas é observada pela comparação de diferentes trabalhos que reportam a caracterização de prepações comerciais supostamente iguais. Por exemplo, a atividade de FPase da prepação comercial Celluclast 1.5L foi reportada no trabalho de Berlin et. al. (2007) (item 2.6, Tabela 4) ser de 0,9 FPU.mg⁻¹ de proteína; enquanto que a razão das atividades de endoglucanase/FPase e de β -glicosidase/FPase, foram informadas ser de 15,5 e 0,2, respectivamente. Já no estudo de Mendes et. al. (2011), a atividade específica de FPase foi reportada como 0,52 FPU.mg⁻¹ de proteína e maiores razões para EG/FPase: 56,7 e BGL/FPase: 0,5 foram obtidas na caracterização da formulação comercial também intitulada Celluclast 1.5L. Como anteriormente discutido, considera-se que diferenças nas metodologias de quantificação enzimática utilizadas em diferentes trabalhos possam acarretar em ampla variação dos valores de atividade reportados. Entretanto, também se supõe que diferenças nas proporções e no conteúdo de enzimas comerciais sejam devido à variações da composição do extrato enzimático produzido pelo fungo, sendo assim, característico para os diferentes lotes do produto comercializado.

A determinação das atividades enzimáticas do extrato de *P.ostreatus* e das preparações comerciais de *T.reesei* e *A.niger* foram necessárias para se estabelecer um parâmetro fixo de controle para a realização dos ensaios de hidrólise do bagaço

empregando mistura de enzimas. A opção do presente trabalho foi a de utilizar uma carga de atividade ajustada para o teor de endoglucanases. Entretanto, apesar do controle do conteúdo de EG nos ensaios de hidrólise, o efeito das demais enzimas celulolíticas e xilanolíticas presentes no extrato de *P.ostreatus* também foram considerados.

Os dados completos do ensaio de determinação da atividade de enzimas hidrolíticas nas preparações comerciais estão descritos no Apêndice B.

6.4.Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino.

Como anteriormente referido (item 5.6), o bagaço de cana utilizado nos ensaios de hidrólise foi previamente submetido a tratamentos quimiotermodinâmicos (CTM - do inglês “chemithermomechanical”) com sulfito alcalino. Este trabalho foi realizado paralelamente a esta dissertação e foi desenvolvido pelo estudante de doutorado Omar Uyarte, orientado do professor André Ferraz. O pré-tratamento visou diminuir o teor de lignina do material e assim aumentar a acessibilidade de enzimas hidrolíticas através da parede celular. Diferentes níveis de deslignificação foram obtidos em duas condições de pré-tratamento, empregando diferentes cargas de sulfito alcalino. A composição química do bagaço pré-tratado e algumas características do processo estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13: Composição química do bagaço de cana de açúcar submetido a diferentes severidades de pré-tratamento quimiotermodinâmico com sulfito/alcalino.

Amostras	Na ₂ SO ₃ *	NaOH*	CSF (mL) **	Rendimento (g/100g de bagaço)	Composição do Bagaço					
					(g/100 g em base polpa)			(g/100g de bagaço original)		
					Lignina	Xilana	Glucana	Lignina	Xilana	Glucana
Não tratada	0	0	Nd	100	24,0	26,0	42,0	24,0	26,0	42,0
Carga baixa	5	2,5	330	83	21,2	20,1	47,5	17,7	16,7	39,5
Carga alta	10	5	120	75	14,7	20,3	54,7	11,6	16,0	40,7

*Os valores de Na₂SO₃ e NaOH estão descritos como grama / 100 gramas de bagaço.

** Canadian standard freeness: método empregado para expressar a capacidade de retenção de água do material, sendo que quanto menor o valor em mL, maior é a capacidade de reter água do material (MENDES et al., 2011).

Nd: não detectado.

No tratamento realizado com maior carga de sulfito alcalino (10,0 g de Na_2SO_3 e 5,0 g de NaOH por 100 gramas de bagaço) foi verificado a remoção de 52% do conteúdo de lignina original; enquanto que no tratamento com menor carga (5,0 g de Na_2SO_3 e 2,5 g de NaOH por 100 gramas de bagaço) a remoção foi de aproximadamente 26%. Já em relação ao conteúdo de hemicelulose, uma remoção equivalente de xilana (de aproximadamente 36%) foi observada após o pré-tratamento CTM realizado com as duas cargas de sulfito alcalino utilizadas. As condições de pré-tratamento e o resultado em composição obtido são similares ao que foi reportado no trabalho de Mendes et al., 2011, desenvolvido em nosso próprio grupo de pesquisas, e previamente discutido no item 2.1.

Para um estudo inicial de hidrólise dos bagaços pré-tratados foram utilizadas diferentes cargas da mistura de enzimas comerciais derivadas de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (SIGMA C2730) e de *Aspergillus niger* (SIGMA C6105). O conteúdo de enzimas no ensaio com carga alta foi de 10 FPU de celulasas de *T.reesei* e 15 UI de β -glicosidase de *A. niger*, por grama de bagaço; enquanto que nos ensaios com carga média foi utilizada a metade do teor de enzimas informada para carga alta (5 FPU de celulase e 7,5 UI de β -glicosidase, por grama de bagaço). Para facilitar a interpretação de dados, os níveis de atividades hidrolíticas presentes nos respectivos ensaios de sacarificação estão apresentados na Tabela 14, enquanto que as conversões de celulose e xilana obtidos estão mostrados na Figura 5.

Figura 5: Conversão de celulose e de xilana do bagaço de cana pré-tratado com carga alta (números I e II, respectivamente) e baixa de sulfito alcalino (números III e IV, respectivamente), durante a hidrólise com carga alta (curva em azul) e carga média (curva em vermelho) de misturas de enzimas comerciais (SIGMA C2730 e SIGMA C6105).

Tabela 14: Atividade de enzimas hidrolíticas presentes em cada ensaio (Eppendorf) de hidrólise em pequena escala do bagaço de cana.

Carga enzimática	Proteína (mg.mL ⁻¹)	FPase (FPU.mL ⁻¹)	CMCase (UI.mL ⁻¹)	β-glicosidase (UI.mL ⁻¹)	CBH (UI.mL ⁻¹)	Xilanase (UI.mL ⁻¹)	β-Xilosidase (UI.mL ⁻¹)
Alta	0,50	0,2	2,4	0,64	0,44	3,2	0,13
Média	0,25	0,1	1,2	0,32	0,22	1,6	0,07

Carga alta de enzimas: 10 FPU de celulases de *T.reesei* e 15 UI de BGL de *A.niger* por grama de bagaço.

Carga média de enzimas: 5 FPU de celulases de *T.reesei* e 7,5 UI de BGL de *A.niger* por grama de bagaço.

A comparação dos níveis de sacarificação apresentados para os bagaços pré-tratados com maior ou menor carga de sulfito alcalino indica que o material com menor teor de lignina apresentou uma conversão máxima de celulose e de xilana de 81 e 85 %, respectivamente. Este nível de sacarificação foi obtido com a maior carga de enzimas no meio reacional. Quando este mesmo material foi tratado com uma carga de enzimas diminuída à metade, não houve uma diminuição proporcional de eficiência de hidrólise, visto que os níveis máximos de conversão de celulose e xilose obtidos foram de 75% e 74%, respectivamente. No caso do substrato tratado com menor carga de sulfito alcalino, o maior conteúdo de lignina residual proporcionou um substrato mais recalcitrante, visto que a conversão máxima de celulose e xilana obtidas com este material foram de 48% e 45%, respectivamente (Tabela 15).

Tabela 15: Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino: Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação quando o sistema hidrolítico era uma mistura de enzimas comerciais (SIGMA C2730 e SIGMA C6105).

Carga enzimática	Conversão de celulose		Conversão de xilana	
	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)
<i>Bagaço pré-tratado com 10 g de Na₂SO₃ e 5 g de NaOH / g de bagaço pré-tratado</i>				
10 FPU/g	11,1 ± 0,4	81 ± 2	9,9 ± 0,4	85 ± 4
5 FPU/g	7,3 ± 0,2	75 ± 1	6,6 ± 0,2	74 ± 1
<i>Bagaço pré-tratado com 5 g de Na₂SO₃ e 2,5 g de NaOH / g de bagaço pré-tratado</i>				
10 FPU/g	7,6 ± 0,4	48 ± 2	5,4 ± 0,3	45 ± 1
5 FPU/g	6,0 ± 0,4	45 ± 4	4,0 ± 0,2	40 ± 3

Outro fator importante estudado é a velocidade inicial de hidrólise, calculada pelo valor de conversão exibido nas primeiras quatro horas de reação enzimática. A análise da velocidade inicial indica uma condição de hidrólise em que ainda não há inibição pelos produtos e também há uma disponibilidade plena de enzimas hidrolíticas no meio reacional. De forma geral, a maior concentração de enzimas no meio reacional nas hidrólises com carga alta, acarretou em valores de velocidade inicial superiores aos exibidos com o emprego de carga média de enzimas (Tabela 15). Contudo, a presença de duas vezes mais enzimas nos ensaios de hidrólise com carga alta não proporcionou uma velocidade inicial duas vezes superior à exibida nos ensaios com carga média. Tal resultado pode estar relacionado a um baixo conteúdo de sítios livres de ligação de enzimas

presentes no substrato, o que limita o potencial de hidrólise apresentado com o uso de carga enzimática alta. Além disso, é possível supor também que o maior teor de lignina apresentado no bagaço pré-tratado com menor carga de sulfito alcalino contribua para a redução dos sítios de celulose disponíveis para a ligação das enzimas. Esse fato é admitido visto que, para uma mesma carga de enzimas, maiores valores de velocidade inicial são apresentados na hidrólise do bagaço mais deslignificado. Dessa maneira, pode-se afirmar que não somente o conteúdo de enzimas, mas também a recalcitrância do material hidrolisado são fatores determinantes das taxas de sacarificação apresentadas.

6.5. Ensaio de hidrólise com enzimas comerciais suplementados com enzimas derivadas de *P. ostreatus*.

O estudo do efeito da mistura de enzimas comerciais com enzimas produzidas por *P. ostreatus* foi feito tomando como base a carga de atividade de endoglucanase nos meios reacionais avaliados. A atividade de endoglucanase foi definida como parâmetro, pois o complexo celulolítico recuperado dos cultivos de *P. ostreatus* não é adequadamente balanceado com os grupos de endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidases (Tabela 11). Assim, as misturas reacionais estudadas continham 50% da atividade de EG provenientes de *T. reesei* e 50% da carga de EG derivada de *P. ostreatus*. A complementação do meio reacional com 15 UI de BGL por grama de bagaço foi mantida nos ensaios de hidrólise.

A Figura 6 apresenta a conversão de celulose e de xilana durante a hidrólise enzimática dos bagaços com baixo (I e II) e alto (III e IV) teor de lignina, empregando três tipos de preparações enzimáticas: preparação A ou carga alta de endoglucanases de *T. reesei* (2,43 UI.mL⁻¹ de EG); preparação B ou carga média de endoglucanases de *T. reesei* (1,21 UI.mL⁻¹ de EG); e preparação C contendo carga média de endoglucanases de *T. reesei* suplementadas com extrato enzimático de *P. ostreatus* (2,43 UI.mL⁻¹ de EG) (Tabela 16).

A Tabela 16 apresenta as atividades de celulases e xilanases presentes em cada ensaio de hidrólise para as três misturas de enzimas utilizadas. Nota-se que as atividades totais das enzimas hidrolíticas provenientes de *T. reesei* são diferentes das atividades obtidas com as enzimas de *P. ostreatus*, sendo que verifica-se valores de atividades de celulases (exceto das CBHs) e xilanases superiores aos observados na preparação A.

Figura 6: Conversão de celulose e de xilana do bagaço de cana pré-tratado com carga alta (números I e II, respectivamente) e baixa de sulfito alcalino (números III e IV, respectivamente), durante a hidrólise com carga alta (curva em verde) e carga média (curva em azul) de celulases de *T.reesei* (SIGMA C2730), e carga média de celulases de *T.reesei* suplementadas com extrato de *P.ostreatus* (curva em vermelho).

Tabela 16: Atividades de enzimas hidrolíticas presentes em cada ensaio (Eppendorf) de hidrólise com diferentes cargas de celulases comerciais e com mistura de enzimas comerciais suplementadas com extrato enzimático de *P.ostreatus*.

Preparações enzimáticas	Proteína (mg.mL ⁻¹)	FPAse (FPU.mL ⁻¹)	CMCase (UI.mL ⁻¹)	β-glicosidase (UI.mL ⁻¹)	CBH (UI.mL ⁻¹)	Xilanase (UI.mL ⁻¹)	β-Xilosidase (UI.mL ⁻¹)
A	0,50	0,20	2,43	0,64	0,44	3,15	0,13
B	0,26	0,10	1,21	0,47	0,22	2,08	0,07
C	6,72	Nd*	2,42	1,67	0,22	4,42	0,33

* Nd: não determinado.

Preparação A: 10 FPU de celulases de *T.reesei* e 15 UI de BGL de *A.niger* por grama de bagaço.

Preparação B: 5 FPU de celulases de *T.reesei* e 15 UI de BGL de *A.niger* por grama de bagaço.

Preparação C: 5 FPU de celulases de *T.reesei* e 15 UI de BGL de *A.niger* por grama de bagaço, suplementado com enzimas derivadas de *P.ostreatus*.

Os valores de eficiência de conversão da celulose e da xilana, e as velocidades iniciais de hidrólise verificadas para as três preparações enzimáticas estão compiladas na Tabela 17.

Tabela 17: Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino: Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação quando o sistema hidrolítico era um mistura de enzimas comerciais (SIGMA C2730 e SIGMA C6105), com ou sem, suplementação com enzimas produzidas por *P.ostreatus*.

Carga enzimática	Conversão de celulose		Conversão de xilana	
	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)
<i>Bagaço pré-tratado com 10 g de Na₂SO₃ e 5 g de NaOH / g de bagaço pré-tratado</i>				
A	11,1 ± 0,4	81 ± 2	9,9 ± 0,4	85 ± 4
B	7,2 ± 0,1	73 ± 1	6,1 ± 0,1	77 ± 2
C	11,8±0,4	75±2	12,1±0,3	90±3
<i>Bagaço pré-tratado com 5 g de Na₂SO₃ e 2,5 g de NaOH / g de bagaço pré-tratado</i>				
A	7,6 ± 0,4	48 ± 2	5,4 ± 0,3	45 ± 1
B	6,4 ± 0,1	47 ± 1	4,3 ± 0,1	42 ± 2
C	7,2±0,4	41±2	5,9±0,3	43±2

Preparação A: 10 FPU de celulasas de *T.reesei* e 15 UI de BGL de *A.niger* por grama de bagaço.

Preparação B: 5 FPU de celulasas de *T.reesei* e 15 UI de BGL de *A.niger* por grama de bagaço.

Preparação C: 5 FPU de celulasas de *T.reesei* e 15 UI de BGL de *A.niger* por grama de bagaço, suplementado com enzimas derivadas de *P.ostreatus*.

A análise dos valores de conversão da celulose, durante a hidrólise do bagaço pré-tratado com alta e baixa carga de sulfito alcalino mostram que para a preparação C, onde houve a suplementação com enzimas de *P. ostreatus*, os valores de velocidade inicial foram equivalentes aos obtidos no ensaio com carga alta de enzima comercial. Todavia, vale lembrar que a atividade de CBHs da preparação C é proveniente somente da carga média de enzimas derivadas de *T. reesei*, sendo assim, metade do conteúdo apresentado na preparação A. Logo, observa-se que, mesmo com a baixa atividade de CBHs presente na preparação C, foi possível atingir valores de conversão da celulose similares ao obtido com o dobro de atividade de CBHs. Supõe-se que a fração de enzimas derivadas de *P. ostreatus* possua uma atividade celulolítica diferenciada, que permita a hidrólise da celulose até celobiose, que em seguida é convertida em glicose pela ação de BLGs.

Deve-se considerar que o extrato enzimático de cultivo de *P. ostreatus* é constituído por uma gama de enzimas com atividade celulolítica não caracterizadas neste trabalho, e

que podem, portanto, ter influência nas taxas de conversão apresentadas. Como exemplo, o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, considerado como espécie modelo de decomposição branca, abriga em seu genoma informação genética para codificar 240 possíveis enzimas com atividade em carboidrato, incluindo 166 glicosil hidrolases, 14 carboidrato esterases, e 57 glicosiltransferases, compreendidas em 69 famílias distintas de GH. (MARTINEZ et. al., 2004; WYMELENBERG et. al. 2010).

Uma hipótese considerada é a presença de endoglucanases processivas no extrato enzimático de *P. ostreatus*, que apresentam atividades combinada de endoglucanases e celobiohidrolases. A síntese de endoglucanase com características processivas já foi descrita em um estudo realizado por Zheng e Ding (2013) para o fungo de decomposição branca *Volvariella volvacea*. Diferente da atividade clássica descrita para EG, de clivagem aleatória em porções amorfas da cadeia de celulose, a EG1 de *V. volvacea* parece liberar celobiose como principal produto de degradação de substratos insolúveis, como papel de filtro. EG processivas são descritas pertencer a família 5 das GHs em basidiomicetos de decomposição parda, como *Gloeophyllum trabeum*, e branca, como *V. volvacea*. A presença de uma variedade de genes pertencente a GH5 em fungos de decomposição branca (Tabela 3, item 2.5) reforça a hipótese da existência de expressão desse tipo de enzima por *P.ostreatus*.

Outra suposição é a presença de proteínas da família GH61 no extrato enzimático de *P.ostreatus*. Como mencionado (item 2.4), a presença de GH61, mesmo em pequenas porcentagens no coquetel celulolítico, resulta num aumento da eficiência total do sistema enzimático (HARRIS et al., 2010). Um grande número de possíveis genes da família 61 das GHs já foram descritos nos genomas de fungos de decomposição branca, como *P. chrysosporium* e *V. volvacea*. Contudo, análises da presença de genes GH61 ainda não foram reportadas para a espécie *P.ostreatus*.

Dessa forma, não é possível prever, corretamente, quais os fatores responsáveis pelas velocidades similares de conversão inicial apresentada para os ensaios com celulases comerciais (Preparação A) e com mistura contendo enzimas de *P. ostreatus*. Para uma melhor avaliação da eficiência de sacarificação de coquetéis celulolíticos, seria necessário a mistura de quantidades específicas de enzimas purificadas, possibilitando assim, a análise individual do efeito de um determinado tipo de enzima.

Outro fator a ser avaliado é a presença de elevada carga de β -glicosidases na preparação C (1,67 UI.mL⁻¹), 2,6 vezes maior ao apresentando para a preparação A (0,64 UI.mL⁻¹). Inicialmente foi considerado que a maior concentração de BGLs no meio

reacional poderia minimizar reações de inibição das CBHs presentes por celobiose, possibilitando assim, maiores velocidades iniciais de hidrólise, mesmo com baixos níveis de atividade de CBHs na mistura reacional. Entretanto, valores equivalentes de conversão inicial da celulose foram verificados no ensaio em que foi empregado a preparação B, com maior atividade de BGLs ($0,47 \text{ UI.mL}^{-1}$), e no ensaio com a mesma carga de celulasas de *T.reesei*, porém, com menor atividade de BGL ($0,32 \text{ UI.mL}^{-1}$), previamente reportado no item 6.4 (Tabela 14). Assim, supõe-se que o excesso de BGL nesses ensaios não causaria a melhoria nas taxas de sacarificação, sendo que essa enzima provavelmente já se encontra em excesso no ensaio com carga alta de celulasas de *T. reesei* (Preparação A).

A conversão da xilana também foi afetada na mistura reacional C. A mistura de enzimas suplementada com extrato de *P.ostreatus* proporcionou valores de velocidade inicial e eficiência de conversão da xilana superiores aos obtidos nos ensaios com carga alta de enzimas de *T. reesei* (Preparação A) durante todo o período de sacarificação analisado. Esse resultado pode ser atribuído às maiores atividades de xilanases e β -xilosidases no meio reacional C (Tabela 16). A maior degradação da xilana pode também ter influenciado na eficiência de conversão da celulose verificada no mesmo ensaio. Isso por que, a remoção da xilana associada à celulose acarretaria em diminuição da recalcitrância do material hidrolisado, tornando o substrato mais acessível à ação das celulasas.

Os dados de conversão da celulose a partir de 24 h de reação (tanto para bagaço pré-tratado com alta carga como para carga baixa de sulfito alcalino) nos ensaios contendo celulasas de *P. ostreatus* mostraram porcentagens de conversão ligeiramente inferiores aos obtidas com o emprego de carga alta de celulasas comerciais derivadas de *T. reesei*. Essa queda na eficiência de sacarificação pode ser explicada devido ao material digerido se tornar enriquecido em lignina e progressivamente mais recalcitrante. Esses dados são semelhantes aos obtidos durante a hidrólise do bagaço pré-tratado com alta carga sulfito alcalino com a mistura enzimática contendo celulasas de *P.ostreatus*, sendo verificados neste caso, valores de conversão inferiores aos obtidos com o uso de carga média de celulasas de *T.reesei*. A princípio, esses resultados sugerem que as celulasas produzidas por *P. ostreatus* sofram maior efeito de adsorções improdutivas à lignina residual presente no bagaço hidrolisado do que as celulasas de *T. reesei*. Contudo, também devem ser consideradas características mais relevantes do que a própria adsorção improdutiva, como baixa porosidade da parede celular, presente em substratos de elevada recalcitrância (DING, et. al., 2013). Portanto, os resultados de hidrólise analisados contradizem a

hipótese inicialmente considerada nesse trabalho de que celulasas produzidas por fungos de decomposição branca seriam mais adaptadas a hidrólise de substratos com elevado teor de lignina, visto que tais enzimas atuam naturalmente em materiais altamente lignificados, como a madeira.

6.6. Ensaio de hidrólise suplementados com enzimas acessórias.

Como anteriormente discutido, pode-se observar que a substituição de 50% da atividade de endoglucanase com enzimas derivadas de *P. ostreatus* ocasionou um aumento do conteúdo de β -glicosidase e das demais enzimas do complexo xilanolítico e manteve pela metade o conteúdo de celobiohidrolases (Tabela 16). Dessa forma, com o intuito de avaliar o efeito da atividade de um determinado tipo de enzima hidrolítica na sacarificação do bagaço, foram realizados ensaios com carga média de celulasas de *T. reesei* (SIGMA C2730) (5 FPU/g de bagaço) com a suplementação de duas enzimas acessórias: β -glicosidase (Preparação D) e xilanase (Preparação E). A adição de BGL de *Aspergillus niger* (SIGMA C6105) e de xilanase purificada de *Neocallimastix patriciarum* (família GH11 - MEGAZYME) foi realizada de modo a igualar o teor dessas enzimas ao conteúdo apresentado no ensaio com carga alta de enzimas comerciais (Preparação A) e no ensaio contendo enzimas de *P. ostreatus* (preparação C), respectivamente (Tabela 18). Os dados de conversão de celulose nos ensaios com reposição de BGL e xilanase estão apresentados na Figura 7.

Um elevado teor de proteínas também foi observado no ensaio contendo extrato enzimático de *P. ostreatus* (6,72 mg.mL⁻¹). O conteúdo de proteínas deve ser levado em consideração visto que a adição de proteínas sem ação hidrolítica, como albuminas, no meio reacional de hidrólise é reportado por alguns estudos como forma de superar o efeito negativo da adsorção improdutiva em lignina. Tal fato está relacionado à capacidade de adsorção de proteínas (no caso, albumina) à lignina, evitando dessa forma a adsorção improdutiva de celulasas à lignina (YANG; WYMAN, 2006). Assim, o elevado conteúdo de proteínas no ensaio de sacarificação com enzimas de *P. ostreatus* pode ter influenciado nos valores de eficiência hidrolítica obtidos. Logo, ensaios com carga média de celulasas (Preparação B) foram realizados com adição de albumina (BSA) (Preparação G), tendo como objetivo a reposição do teor de proteínas apresentado na preparação C (Tabela 19).

Figura 7: Conversão de celulose e de xilana do bagaço de cana pré-tratado com carga alta (números I e II, respectivamente) e baixa (números III e IV, respectivamente) de sulfito alcalino, durante a hidrólise com reposição de β-glicosidases (curva em vermelho) e xilanases (curva em verde) em ensaios com carga média de celulases de *T. reesei* (SIGMA C2730) (curva em azul).

Tabela 18: Atividades de enzimas hidrolíticas presentes em cada ensaio (Eppendorf) de hidrólise com carga média de celulases de *T. reesei* (SIGMA C2730) complementada com enzimas acessórias e proteína.

Preparações enzimáticas	Proteína (mg.mL ⁻¹)	FPAse (FPU.mL ⁻¹)	CMCase (UI.mL ⁻¹)	β-glicosidase (UI.mL ⁻¹)	CBH (UI.mL ⁻¹)	Xilanase (UI.mL ⁻¹)	β-Xilosidase (UI.mL ⁻¹)
B	0,26	0,1	1,21	0,47	0,22	2,08	0,07
D	0,28	0,1	1,21	0,64	0,22	2,65	0,07
E	0,27	0,1	1,21	0,47	0,22	3,15	0,07

* Nd: não determinado.

Preparação B: 5 FPU de celulases de *T.reesei* e 15 UI de BGL de *A.niger* por grama de bagaço.

Preparação D: 5 FPU de celulases de *T.reesei* e 15 UI de BGL de *A.niger* por grama de bagaço, suplementado com BGL derivadas de *A.niger*.

Preparação E: 5 FPU de celulases de *T.reesei* e 15 UI de BGL de *A.niger* por grama de bagaço, suplementado com xilanase derivadas de *Neocallimastix patriciarum*.

Os dados de conversão de celulose nos ensaios com reposição de proteínas estão apresentados na Figura 8.

Figura 8: Conversão de celulose e de xilana do bagaço de cana pré-tratado com carga alta (números I e II, respectivamente) e baixa (números III e IV, respectivamente) de sulfito alcalino, durante a hidrólise com reposição de proteína (curva em laranja) em ensaios com carga média de celulasas de *T. reesei*.

Tabela 19: Atividades de enzimas hidrolíticas presentes em cada ensaio (Eppendorf) de hidrólise com carga média de celulasas de *T.reesei* (SIGMA C2730) complementada com proteína (BSA).

Preparações enzimáticas	Proteína (mg.mL ⁻¹)	FPAse (FPU.mL ⁻¹)	CMCase (UI.mL ⁻¹)	β-glicosidase (UI.mL ⁻¹)	CBH (UI.mL ⁻¹)	Xilanase (UI.mL ⁻¹)	β-Xilosidase (UI.mL ⁻¹)
B	0,26	0,1	1,21	0,47	0,22	2,08	0,07
G	6,72	0,1	1,21	0,47	0,22	2,08	0,07

* Nd: não determinado.

Preparação B: 5 FPU de celulasas de *T.reesei* e 15 UI de BGL de *A.niger* por grama de bagaço.

Preparação G: 5 FPU de celulasas de *T.reesei* e 15 UI de BGL de *A.niger* por grama de bagaço, suplementado com soro albumina bovina.

A Tabela 20 mostra os valores de velocidade inicial e eficiência de hidrólise obtida durante a sacarificação do bagaço pré-tratado com alta e baixa carga de sulfito alcalino com preparação enzimática B suplementada com β -glicosidase (D), xilanase (E) ou albumina (G).

Tabela 20: Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino: Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação quando o sistema hidrolítico era uma mistura de celulases de *T.reesei* (SIGMA C2730) suplementada com β -glicosidase, xilanase ou albumina.

Carga enzimática	Conversão de celulose		Conversão de xilana	
	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)
<i>Bagaço pré-tratado com 10 g de Na₂SO₃ e 5 g de NaOH / g de bagaço pré-tratado</i>				
B	7,2 ± 0,1	73 ± 1	6,1 ± 0,1	77 ± 2
D	5,3±0,2	67±42	4,4±0,2	70±4
E	5,7±0,1	67±1	4,6±0,1	69±1
G	6,0±0,3	70±4	5,4±0,2	75±5
<i>Bagaço pré-tratado com 5 g de Na₂SO₃ e 2,5 g de NaOH / g de bagaço pré-tratado</i>				
B	6,4 ± 0,1	47 ± 1	4,3 ± 0,1	42 ± 2
D	5,4±0,2	41±0,6	3,7±0,2	37±2
E	5,1±0,3	40±0,2	3,4±0,2	35±0,1
G	4,6±0,9	40±1	3,6±0,6	40±1

Preparação B: 5 FPU de celulases de *T.reesei* e 15 UI de BGL de *A.niger* por grama de bagaço.

Preparação D: 5 FPU de celulases de *T.reesei* e 15 UI de BGL de *A.niger* por grama de bagaço, suplementado com BGL derivadas de *A.niger*.

Preparação E: 5 FPU de celulases de *T.reesei* e 15 UI de BGL de *A.niger* por grama de bagaço, suplementado com xilanase derivadas de *Neocallimastix patriciarum*.

Preparação G: 5 FPU de celulases de *T.reesei* e 15 UI de BGL de *A.niger* por grama de bagaço, suplementado com soro albumina bovina.

Como anteriormente mencionado, eficiência equivalentes de sacarificação da celulose foram evidenciadas para os ensaios com carga média da mistura de enzimas comerciais provenientes de *T. reesei* e *A. niger* (0,32 UI.mL⁻¹ de BGLs, Tabela 14) e para os ensaios contendo maior atividade de BGL (0,47 UI.mL⁻¹ de BGLs - Preparação B). Contudo, velocidades de conversão da celulose levemente inferiores foram observadas quando maior carga de BGL (0,64 UI.mL⁻¹) foi empregada para a mesma mistura de enzimas comerciais (Preparação D). Supõe-se que a diminuição da eficiência hidrolítica nesse ensaio possa estar relacionada com interações proteína - proteína (entre β -glicosidases e as demais celulases), ou proteína - substrato (entre β -glicosidases e a

celulose), que são mais evidenciadas quanto maior a concentração de BGLs, sendo dessa forma, um empecilho para ligação de celulasas ao substrato a ser hidrolisado.

Da mesma forma, os valores de conversão de xilana apresentados no ensaio suplementado com xilanases comerciais purificadas foram ligeiramente inferiores aos valores exibidos na hidrólise sem suplementação. Tal resultado pode estar associado ao acréscimo de xilanase, sem haver, contudo, um aumento no conteúdo de β -xilosidase, que se apresenta em baixas concentrações ($0,07 \text{ UI.mL}^{-1}$) no ensaio. Essa condição pode ter levado a hidrólise incompleta da xilana e, possivelmente, a um maior efeito de inibição por xilo-oligosacarídeos presente em maiores concentrações no meio reacional, conforme já reportado por Qing e Wyman (2011). Portanto, os altos valores de eficiência hidrolítica da xilana verificados no ensaio suplementado com enzimas de *P.ostreatus* são devidos não somente a elevada atividade de xilanase ($3,15 \text{ UI.mL}^{-1}$), mas também ao maior conteúdo de β -xilosidases ($0,33 \text{ UI. mL}^{-1}$), e a ação sinérgica dessas enzimas no meio reacional. Além disso, o efeito negativo na eficiência de hidrólise da celulose evidenciado com a suplementação com xilanases pode, supostamente, estar relacionado a competições por sítios de ligações produtivas entre xilanases e celulasas. Tal fenômeno foi reportado no trabalho de Berlin et. al., 2007, em que uma queda nos valores de eficiência hidrolítica foi evidenciada na hidrólise da palha de milho com a enzima comercial Celluclast 1.5L suplementada com elevados níveis de diferentes enzimas acessórias, incluído xilanases e β -glicosidases. O mecanismo por trás desse fenômeno é até então desconhecido, mas esses resultados indicam que uma estratégia envolvendo a adição de enzimas acessórias em excesso deve ser evitada.

Em relação à suplementação com proteínas, esperava-se que a adição de albumina no ensaio enzimático levasse a uma diminuição de adsorções improdutivas das enzimas hidrolíticas, principalmente no bagaço tratado com menor carga de sulfito alcalino e, portanto, com maior teor de lignina, e aumentasse assim, a hidrólise do substrato. Contudo, os resultados encontrados mostram uma leve queda na velocidade e eficiência de conversão, principalmente da celulose, em relação ao que foi obtido no ensaio com a mesma carga de enzimas, porém sem suplementação com BSA (Preparação B). Supõe-se que a alta carga de proteínas possa ter ocasionado um efeito negativo na sacarificação do bagaço devido a ocupação de sítios de ligação de enzimas hidrolíticas à celulose, impedindo deste modo a atividade dessas enzimas. Assim, pode-se também correlacionar a elevada carga de proteínas presente no extrato de *P.ostreatus* como uma das causas dos

menores valores de conversão da celulose apresentada nos ensaios suplementados com enzimas desse fungo (Preparação C).

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou o efeito da mistura de enzimas derivadas do fungo de decomposição branca *Pleurotus ostreatus* com celulasas comerciais derivadas dos fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com diferentes cargas de sulfito alcalino.

Primeiramente, cultivos submersos do fungo *P. ostreatus* foram realizados em diferentes fontes de carbono objetivando a produção de celulasas em quantidade suficiente para a realização de ensaios de hidrólise enzimática. A atividade de endoglucanase foi escolhida como parâmetro de avaliação da produção de celulasas, tendo em vista que o conteúdo dessa enzima seria utilizado no ajuste da carga enzimática nos experimentos de hidrólise do bagaço de cana.

Das quatro fontes de carbono avaliadas, o meio de cultivo contendo fonte combinada com CMC e bagaço de cana moído proporcionaram os maiores níveis de produção de endoglucanase, alcançando um máximo de 342 UI L⁻¹ em 20 dias de cultivo. A presença de CMC no meio de cultura parece ter induzido a produção de endoglucanases, visto que o pico de atividade de CMCase no cultivo com bagaço e CMC foi duas vezes superior a máxima de atividade obtida no cultivo contendo somente bagaço de cana como fonte de carbono. Contudo, procedimentos de ultrafiltração dos extratos de cultivo contendo CMC ocasionou a retenção dessa fonte de carbono na fração concentrada de enzimas. A presença da CMC residual no extrato enzimático concentrado obtido foi considerada desvantajosa devido ao fato da CMC ser substrato de ação de celulasas, e constituir assim, como interferente nos ensaios de sacarificação, podendo mascarar a real hidrólise do bagaço de cana pré-tratado. Assim, somente o extrato enzimático do cultivo em bagaço foi utilizado no desenvolvimento de ensaios de hidrólise.

Os experimentos de hidrólise enzimática foram primeiramente avaliando o emprego de carga alta (10FPU por grama de bagaço) e média (5FPU por grama de bagaço) de celulasas derivadas de *T. reesei*, mantendo fixa a carga de BGLs derivadas de *A. niger* (15 UI por grama de bagaço). Para o estudo da hidrólise do bagaço com mistura de enzimas comerciais suplementadas com enzimas derivadas de *P. ostreatus* ajustou-se a carga de enzimas para que 50% da atividade de endoglucanases fosse proveniente de *T. reesei* e 50% da carga de EG produzidas por *P. ostreatus*. Dessa forma, a adição de enzimas

provenientes do extrato de *P.ostreatus* manteve o mesmo conteúdo de EGs apresentado no ensaio com carga alta de enzimas comerciais, e aumentou o conteúdo das demais hidrolíticas, exceto das celobiohidrolases.

A análise dos valores de conversão da celulose, durante a hidrólise do bagaço pré-tratado com alta e baixa carga de sulfito alcalino mostram que os ensaios suplementados com enzimas de *P. ostreatus* alcançaram valores de velocidade inicial equivalentes aos obtidos nos ensaios com carga alta de enzima comercial. Esse resultado foi atingido mesmo com um conteúdo de CBHs sendo a metade do existente nos ensaios com alta carga de enzimas comerciais, indicando assim que as enzimas derivadas de *P. ostreatus* apresentam uma atividade celulolítica diferenciada, que permitiu a hidrólise da celulose até celobiose, que consequentemente foi convertida em glicose pela ação de BLGs.

O maior teor de BGLs presente nos ensaios de hidrólise suplementados com enzimas de *P.ostreatus* não se mostrou vantajoso para o aumento dos rendimentos de conversão em glicose, visto que essa enzima provavelmente já se encontra em excesso nos ensaios com carga alta de celulases derivadas de *T. reesei*.

O maior teor de enzimas xilanolíticas (xilanases e β -xilosidases), presente nos ensaios suplementados com enzimas de *P.ostreatus* resultou em maiores valores de conversão da xilana quando comparado à conversão obtida na hidrólise com carga alta de enzimas comerciais. Essa maior hidrólise da xilana pode estar também relacionada aos resultados obtidos de conversão da celulose, visto que a remoção da xilana associada à celulose acarretaria em diminuição da recalcitrância do material hidrolisado, tornando o substrato mais acessível à ação das celulases.

Ensaio de hidrólise com carga média de enzimas comerciais e com adição de proteínas sem atividade hidrolítica (BSA) foram realizados visando verificar o possível efeito do elevado teor de proteínas apresentado nos ensaio com extrato enzimático de *P. ostreatus* nos valores de conversão enzimática obtidos. Verificou-se uma leve queda na velocidade e eficiência de conversão, principalmente da celulose, nos ensaios com suplementação com BSA em comparação aos valores de conversão obtidos nos ensaios sem suplementação. Assim, supõe-se que a alta carga de proteínas presente nos ensaios com extrato de *P.ostreatus* possa ter acarretado em menores níveis de sacarificação do bagaço devido a ocupação de sítios de ligação de enzimas hidrolíticas à celulose, impedindo deste modo a atividade dessas enzimas.

A conversão de celulose apresentada a partir de 24h de sacarificação, nos ensaios contendo celulases de *P. ostreatus*, foram ligeiramente inferiores aos obtidas com o

emprego de carga alta de celulasas comercial derivadas de *T. reesei*. Esse resultado pode ser justificado devido ao material digerido se tornar progressivamente mais recalcitrante e enriquecido em lignina, contradizendo assim a hipótese inicialmente considerada nesse trabalho de que celulasas produzidas por fungos de decomposição branca seriam mais adaptadas a hidrólise de substratos com elevado teor de lignina.

O presente trabalho objetivou avaliar a ação sinérgica de enzimas produzidas por *P. ostreatus* em conjunto com enzimas comerciais usualmente empregadas em estudos de hidrólise do bagaço de cana. Todavia, vale lembrar que apesar da atividade das principais enzimas celulolíticas e xilanolíticas tenham sido determinadas, a atuação de uma variedade de enzimas de degradação de materiais lignocelulósicos presentes no extrato enzimático produzido por *P. ostreatus* não foi considerada. Assim, a caracterização das enzimas secretadas por *P. ostreatus* envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos, e o estudo individual de enzimas específicas em adição a coquetéis enzimáticos comerciais facilitaria a compreensão do efeito de adição de celulasas causado na hidrólise do bagaço de cana.

REFERÊNCIAS

AKIN, D.E. Grass lignocellulose: strategies to overcome recalcitrance. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.136–140, p. 3–16, 2007.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review: **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851–4861, 2010.

BAILEY, M.J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270, 1992.

BALDRIAN, P.; VALÁSKOVÁ, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiol**, v. 32, p. 501–521, 2008.

BAO, D.; GONG, M.; ZHENG, H.; CHEN, M.; ZHANG, L.; WANG, H.; JIANG, J.; WU, L.; ZHU, Y.; ZHU, G.; ZHOU, Y.; LI, C.; WANG, S.; ZHAO, Y.; ZHAO, G.; TAN, Q. Sequencing and comparative analysis of the straw mushroom (*Volvariella volvacea*) genome. **PLOS ONE**, v. 8, p. 1-12, 2013.

BERLIN, A.; GILKES, N.; KURABI, A.; BURA, R.; TU, M.; KILBURN, D.; SADDLER, J. Weak lignin-binding: a novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121–124, p. 163-170, 2005.

BERLIN, A.; MAXIMENKO, V.; GILKES, N.; SADDLER, J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 97, p. 287–296, 2007.

BISARIA, V.S.; GHOSE, T.K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 3, p. 90–104, 1981.

BLANCHETTE, R.A: Delignification, by wood-decay fungi. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 29, p. 381–403, 1991.

BOUWS, H.; WATTENBERG, A.; ZORN, H. Fungal secretomes - nature's toolbox for white biotechnology. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 80, p. 381–388, 2008.

BURLA, G.; GARZILLO, A.M.; LUNA, M.; CARDELLI, L.E.; SCHIESSER, A. Effects of different growth conditions on enzyme production by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. **Bioresource Technology**, v. 42, p. 89-94, 1992.

CANNELLA, D.; HSIEH, C.C.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5/n.26, p. 1-10, 2012.

CASTRO, A.M.; PEREIRA, N.J. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quim. Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 58, p. 582–594, 2002.

COHEN, R.; HADAR, Y.; YARDEN, O. Transcript and activity levels of different *Pleurotus ostreatus* peroxidases are differentially affected by Mn^{2+} . **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 312 - 322, 2001.

CHUNDAWAT, S.P.S.; BECKHAM, G.T.; HIMMEL, M.E.; DALE, B.E. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. **Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.**, v. 2, p. 121–145, 2011.

DABA, A.S.; YOUSSEF, G.A.; KABEIL, S.S.; HAFEZ, E.E. Production of recombinant cellulase enzyme from *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (type NRRL-0366). **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 1197-1202, 2011.

DASHTBAN, M.; MAKI, M.; LEUNG, K.T.; MAO, C.; QIN, W. Cellulase activities in biomass conversion: Measurement methods and comparison. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 302-309, 2010.

DING, S-Y.; LIU, Y-S.; ZENG, Y.; HIMMEL, M.E.; BAKER, J.O.; BAYER, E.A. How does plant cell wall nano scale architecture correlate with enzymatic digestibility?. **Science**, v. 338, p. 1055-1060, 2012.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; BAKRADZE, M. Dependence of Activities of Polysaccharide Hydrolases and Oxidases from *Cerrena unicolor* on the Source of Carbon and Aromatic Acids in Culture Medium. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 38, p. 210–213, 2002.

ELISASHVILI, V.; PENNINCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; ASATIANI, M.; KVESITADZE, G. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 38, p. 998–1004, 2006.

ELISASHVILI, V.; PENNINCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; KVESITADZE, G. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 457–462, 2008.

ELISASHVILI, V.; PENNINCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; AGATHOS, S.N. Lignocellulose degrading enzyme production by white-rot *Basidiomycetes* isolated from the forests of Georgia. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 25, p. 331–339, 2009.

ERIKSSON, K.E.; PETTERSSON, B. Extracellular enzyme system utilized by the fungus *sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. 1. Separation, purification and physico-chemical characterization of five endo-1,4-p-glucanases. **Eur. J. Biochem**, v. 51, p. 193-206, 1975.

FALKOSKI, D.L.; GUIMARÃES, V.M.; ALMEIDA, M.N.; ALFENAS, A.C.; COLODETTE, J.L.; REZENDE, S.T. Characterization of Cellulolytic Extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and Its Application in Biomass Saccharification. **Appl Biochem. Biotechnol.**, v. 166, p. 1586–1603, 2012.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood**: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERRAZ, A.; BAEZA, J.; RODRIGUEZ, J.; FREER, J. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 3, p. 201-212, 2000.

FERRAZ, A. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J.L. **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. cap. 6, p. 215-242.

GARZILLO, A.M.V.; DI PAOLO, S.; RUZZI, M.; BUONOCORE, V. Hydrolytic properties of extracellular cellulases from *Pleurotus ostreatus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 42, p. 476-481, 1994.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Appl. Chem.**, v. 59, p. 257—268, 1987.

GOYAL, M.; SONI, G. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Pleurotus florida*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 1131-1136, 2011.

GUSAKOV, A.V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 419-425, 2011.

HARRIS, P.V.; WELNER, D.; MCFARLAND, K.C.; RE, E.; POULSEN, J.C.N.; BROWN, K.; SALBO, R.; DING, H.; VLASENKO, E.; MERINO, S.; XU, F.; CHERRY, J.; LARSEN, S.; LEGGIO, L.L. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, v. 49, p. 3305–3316, 2010.

HIGHLEY T.L. Influence of carbon source on cellulase activity of white-rot and brown-rot fungi. **Spring**, v. 5, p. 50-58, 1973.

HORN, S.J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V.G.H. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, v. 5-45. p. 2-12, 2012.

JEYA, M.; ZHANG, Y.M.; KIM, I.W.; LEE, J.K. Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5155-5161, 2009.

KEREM, Z.; JENSEN, K.A.; HAMMEL, K.E. Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete. *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven fenton reaction. **FEBS Letters**, v. 446, p. 49-54, 1999.

KEILICH, G.; BAILEY, P.; LIESE, W. Enzymatic degradation of cellulose, cellulose derivatives and hemicelluloses in relation to the fungal decay of wood. **Wood Science and Technology**, v. 4, p. 273-283, 1970.

KIRK, T.K. Degradation and conversion of lignocelluloses. In: Smith J.E., Berry, D.R. and Kristiansen, B. **The filamentous fungi. Fungal technology**. New York: Edward Arnold, 1983. p. 266-295.

KIRK, T.K.; CULLEN, D. Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: YOUNG, R; AKHTAR, M. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley, 1998, p. 273-308.

KRISHNA C. Solid-State Fermentation Systems - An Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 1-30, 2005.

KURT, S.; BUYUKALACA, S. Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3164-3169, 2010.

KUBICEK C.P.; MIKUS, M.; SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M.; SEIBOTH, B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2-19, p. 1-14, 2009.

KÜES, U.; LIU, Y. Fruiting body production in basidiomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 141-152, 2000.

LAM, T.B.T; IYAMA, K.; STONE, B.A. Determination of etherified hydroxycinnamic acids in cell walls of grasses. **Phytochem**, v. 36, p. 773-775, 1994.

LEVY, J.F. The natural history of the degradation of wood. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. A**, v. 321, p. 423 - 433, 1987.

MANDELS, M.; STENBERG, D. Recent Advances in cellulose technology. **J. Ferment. Technol**, v. 54, p. 267-286, 1976.

MANSFIELD, S.D.; MOONEY, C.; SADDLER, J.N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnol. Prog.**, v. 15, p. 804-816, 1999.

MATA, G.; CORTÉS, E.G.; SALMONES, D. Mycelial growth of three *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. species on sugarcane bagasse: production of hydrolytic and oxidative enzymes. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 9, p. 385–394, 2007.

MARTINS, L.F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P.; RAMOS, L.P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1417–1424, 2008.

MARTINEZ, D.; LARRONDO, L.F.; PUTNAM, N.; GELPKE, M.D.S.; HUANG, K.; CHAPMAN, J.; HELFENBEIN, K.G.; RAMAIYA, P.; DETTER, J.C.; LARIMER, F.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B.; BERKA, R.; CULLEN, D.; ROKHSAR, D. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nature Biotechnology**, v. 22, p. 695-700, 2004.

MASARIN, F.; GURPILHARES, D.B.; BAFFA, D.C.F.; BARBOSA, M.H.P.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin contents. **Biotechnol Biofuels**, v. 4, p.55, 2011.

MARTINEZ, D.; BERKA, R.M.; HENRISSAT, B.; SALOHEIMO, M.; ARVAS, M.; BAKER, S.E.; CHAPMAN, J.; CHERTKOV, O.; COUTINHO, P.M.; CULLEN, D.; DANCHIN, E.G.J.; GRIGORIEV, I.V.; HARRIS, P.; JACKSON, M.; KUBICEK, C.P.; HAN, C.S.; HO, I.; LARRONDO, L.F.; LEON, A.L.; MAGNUSON, J.K.; MERINO, S.; MISRA, M.; NELSON, B.; PUTNAM, N.; ROBBERTSE, B.; SALAMOV, A.A.; SCHMOLL, M.; TERRY, A.; THAYER, N.; WESTERHOLM-PARVINEN, A.; SCHOCH, C.L.; YAO, J.; BARABOTE, R.; NELSON, M.A.; DETTER, C.; BRUCE, D.; KUSKE, C.R.; XIE, G.; RICHARDSON, P.; ROKHSAR, D.S.; LUCAS, S.M.; RUBIN, E.M.; DUNN-COLEMAN, N.; WARD, M.; BRETTIN, T.S. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 553-560, 2008.

MENDES, F.M.; SIQUEIRA, G.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and two experimental samples with reduced initial lignin content. **Biotechnol Progr**, v. 27, p. 395-401, 2011.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 522-550, 2012.

MILAGRES AMF CARVALHO W, FERRAZ A: Sugarcane breeding and selection for more efficient biomass conversion in cellulosic ethanol. In: BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. eds., **Routes to cellulosic ethanol**. New York: Springer, 2011. p. 53-72, 2011.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673–686, 2005.

MUSSATTO S.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A.M.F.; ROBERTO, I.C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 124-129, 2008.

NAKAGAME, S.; CHANDRA, R.P.; SADDLER, J.N. The effect of isolated lignins, obtained from a range of pretreated lignocellulosic substrates, on enzymatic hydrolysis. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 105, p. 871-879, 2010.

NOZAKI, K.; SEKI, T.; MATSUI, K.; MIZUNO, M.; KANDA, T.; AMANO, Y. Structure and characteristics of an endo-beta-1,4-glucanase, isolated from *Trametes hirsuta* with high degradation to crystalline cellulose. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 71, p. 2375-2382, 2007.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technol.**, v. 74, p. 69-80, 2000.
PANDEY, V. K.; SINGH, M.P.; SRIVASTAVA, A.K.; VISHWAKARMA, S.K.; TAKSHAK, S. Biodegradation of sugarcane bagasse by *Pleurotus citrinopileatus*. **Cell. Mol. Biol.**, v. 58, p. 8-14, 2012.

PETERSON, R.; NEVALAINEN, H. *Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years of strain improvement. **Microbiology**, v. 158, p. 58-68, 2012.

QING, Q.; WYMAN, C.E. Supplementation with xylanase and b-xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4/n.18, p. 1-12, 2011.

RAHIKAINEN, J.; MIKANDER, S.; MARJAMAA, K.; TAMMINEN, T.; LAPPAS, A.; VIKARI, L.; KRUUS, K. Inhibition of Enzymatic Hydrolysis by Residual Lignins From Softwood—Study of Enzyme Binding and Inactivation on Lignin-Rich Surface. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 108, p. 2823-2834, 2011.

RAMÍREZ, L.; OGUIZA, J.A.; PÉREZ, G.; LAVÍN, J.L.; OMARINI, A.; SANTOYO, F.; ALFARO, M.; CASTANERA, R.; PARENTI, A.; MUGUERZA, E.; PISABARRO, A.G. Genomics and transcriptomics characterization of genes expressed during postharvest at 4°C by the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **International Microbiology**, v. 14, p. 111-120, 2011.

RODRIGUES, M.A.M.; PINTO, P.; BEZERRA, R.M.F.; DIAS, A.A.; GUEDES, C.V.M.; CARDOSO, V.M.G.; CONE, J.W.; FERREIRA, L.M.M.; COLAÇO, J.; SEQUEIRA, C.A. Effect of enzyme extracts isolated from white-rot fungi on chemical composition and in vitro digestibility of wheat straw. **Animal Feed Science and Technology**, v. 141, p. 326 – 338, 2008.

RYU, D.D.Y.; MANDELS, M. Cellulases: biosynthesis and applications. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 2, p. 91-102, 1980.

SALVACHÚA, D.; PRIETO, A.; ABELAIRAS, M.L.; CHAU, T.L.; MARTÍNEZ, A.T.; MARTÍNEZ, M.J. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7500–7506, 2011.

SCHIESSER, A. Fine Structure and Mechanical Properties of Straw Filaments Invaded by *Pleurotus ostreatus*. **Biological Wastes**, v. 27, p. 87-100, 1989.

SERPA, V.I.; POLIKARPOV, I. Enzymes in Bioenergy. In: BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. eds., **Routes to cellulosic ethanol**. New York: Springer, p. 97-114, 2011.

SINGH, R.; VARMA, A.J.; LAXMAN, R.S.; RAO, M. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium cellulases*: Comparison with commercial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6679–6681, 2009.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541–549, 2010.

SIQUEIRA, G.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W.; KOCH, G.; FERRAZ, A. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 1-9, p. 2011.

SIQUEIRA, G.; VÁRNAI, A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. **Applied Energy**, v. 102, p. 399–402, 2013.

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

TAN, L.U.L.; MAYERS, P.; SADDLE, J.N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Can. J. Microbiol.**, v. 33, p. 689-692, 1987.

VALÁSKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 119–124, 2006.

VARELA, E.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, Á.T.; MARTÍNEZ, M.J. Expression of *Pleurotus eryngii* aryl-alcohol oxidase in *Aspergillus nidulans*: purification and characterization of the recombinant enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1546, p. 107-113, 2001.

VARELA, E.; MESTER, T.; TIEN, M. Culture conditions affecting biodegradation components of the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. **Arch Microbiol**, v. 180, p. 251–256, 2003.

VRIES, R.P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 497–522, 2001.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulose activities. In: WOOD, T. M.; KELLOGG, S. T.eds., **Methods in enzymology**. London: Academy Press, 1988

WYMELENBERG, A.V.; GASKELL, J.; MOZUCH, M.; SABAT, G.; RALPH, J.; SKYBA, O.; MANSFIELD, S.D.; BLANCHETTE, R.A.; MARTINEZ, D.; GRIGORIEV, I.; KERSTEN, P.J.; CULLEN, D. Comparative transcriptome and secretome analysis of wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 3599–3610, 2010.

WYMAN, C.E.; DALE, B.E.; ELANDER, R.T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M.R.; LEE, Y.Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technol.**, v. 96, p. 1959–1966, 2005.

YANG, B.; WYMAN, C.E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flow through pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, p. 88-95, 2004.

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

YOON, J.J.; CHA, C.J.; KIM, Y.S.; SON, D.W.; KIM, Y.K. The brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* has the endo-glucanases capable of degrading microcrystalline cellulose. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 17, p. 800-805, 2007.

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

ZHANG, Y-H.; HONG, J.; YE, X. Cellulase assays. **Methods in Molecular Biology**, v. 581, p. 213-231, 2009.

ZHENG, F.; DING, S. Processivity and enzymatic mode of a glycoside hydrolase family 5 endoglucanase from *Volvariella volvacea*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 989–996, 2013.

APÊNDICE A

Atividades de celulasas e xilanases medidas a partir do extrato liofilizado de cultivo de *P.ostreatus* em bagaço de cana como fonte única de carbono.

1. Endoglucanases

A atividade de CMCase foi medida segundo a metodologia descrita por Ghose (1987) utilizando as seguintes condições de ensaio:

- Temperatura de ensaio: 50°C.
- Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8.
- [S]: Solução tampão pH 4,8, com 2% de CMC (SIGMA C5013)
- Solução do extrato liofilizado de enzimas: 25mg de extrato liofilizado dissolvido em 1,0 ml de água destilada.

As atividades de CMCase foram realizadas utilizando três diluições (de 2, 4 e 8 vezes) preparadas a partir de uma solução mãe contendo o extrato enzimático liofilizado de *P.ostreatus*. Um gráfico semilog foi construído relacionando as diluições da enzima com a quantidade de glicose liberada por tubo de ensaio (Figura 18). A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que corresponde a 0,5 mg de açúcares redutores. Todos os ensaios foram feitos em triplicata, e para cada repetição foi determinada uma equação de reta:

- Repetição 1: $y = 0,62651x + 0,97071$
- Repetição 2: $y = 0,52447x + 0,88364$
- Repetição 3: $y = 0,46913x + 0,84173$

Figura 9: Quantificação de açúcares redutores liberados nos ensaios de CMCase em diferentes diluições do extrato enzimático liofilizado de *P.ostreatus*.

A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que corresponde a 0,5 mg de açúcares redutores. O valor de 0,185 foi dividido por esse valor de diluição e o resultado obtido foi definido como atividade de CMCase em $UI.mL^{-1}$.

$$CMCase = 1,01 \pm 0,03 UI.mL^{-1}$$

$$CMCase = 40,32 UI.g^{-1}$$

2. β -glicosidase

A atividade de β -glicosidases foi determinada de acordo com a cinética de conversão de p-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) em p-nitrofenolato (pNP) , seguindo a metodologia descrita por Tan, Mayers e Saddler (1987), utilizando as seguintes condições de ensaio:

- Temperatura de ensaio: 50°C.
- Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8.
- [S]: Solução tampão pH 4,8 com 0,1% de p-Nitrophenyl β -D-Glucopyranoside (Sigma N-7006)
- Solução do extrato liofilizado de enzimas: 1,45mg de extrato liofilizado dissolvido em 1,0 ml de água destilada.

A reação foi realizada nos tempos 2, 5, 10, 20 e 30 minutos, e os dados de absorbância a 410nm obtidos foram utilizados para construção do gráfico de cinética de reação (Fig 19).

- Repetição 1: $y = 0,0602764x - 0,0152529$
- Repetição 2: $y = 0,0589743x + 0,0037870$

Figura 10: Cinética de reação para atividade de β -glicosidases presente em extrato enzimático de *P.ostreatus*.

O cálculo da atividade foi realizado dividindo-se o coeficiente angular das curvas de cinética construídas pelo coeficiente de extinção molar (ξ) do pNP, determinado em laboratório como sendo de $15366 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Logo, a atividade de β -glicosidases foi determinada sendo a seguinte equação:

$$\frac{UI}{mL} = \left(\left(\left(\frac{\left(\frac{\text{coeficiente angular}}{\xi} \right) \times V}{1000} \right) \times 10^6 \right) \times \frac{1}{0,1} \right) \times \text{diluição}$$

V: volume total de solução de reação. Para a atividade de β -glicosidases do extrato de *P.ostreatus* foi utilizado um volume de 1,5 mL.

Logo, a atividade obtida foi de:

$$UI.mL^{-1} = 0,058 \pm 0,001 \text{ ou } UI.g^{-1} = 40,14$$

3. Xilanase

A atividade de xilanases foi determinada de acordo com a cinética de conversão de xilana em açúcares redutores, com base na metodologia descrita por Bailey, Biely e Poutanen (1992). As seguintes condições de ensaio foram utilizadas:

- Temperatura de ensaio: 50°C.
- Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 5,3.
- [S]: Solução tampão pH 5,3 com 1% de Xilana de Birchwood (SIGMA X0502)

Solução do extrato liofilizado de enzimas: 9,2mg de extrato liofilizado dissolvido em 1,0 ml de água destilada

A quantidade de açúcar redutor liberada (μmol) liberado em diferentes tempos de reação (2, 5, 7, 10, 20 e 30 minutos) foram utilizados para construção do gráfico de cinética de reação (Fig 20).

- Repetição 1: $y = 0,0724206x + 0,0664737$
- Repetição 2: $y = 0,0724635x + 0,0632719$

Figura 11: Cinética de reação para atividade de xilanases presente em extrato enzimático de *P.ostreatus*.

Como a enzima se manteve em velocidade linear durante todo o tempo analisado, o cálculo de atividade enzimática foi realizado utilizando-se o coeficiente angular das retas de cinética de reação, conforme Figura 11. O cálculo foi feito segundo a equação:

$$UI.mL^{-1} = \frac{\text{coeficiente angular} \times \text{diluição}}{\text{volume de extrato utilizado na reação}}$$

Logo, a atividade obtida foi de:

$$UI.mL^{-1} = 0,72 \pm 0,01 \text{ ou } UI.g^{-1} = 78,74$$

4. β -xilosidases

A atividade de β -xilosidases foi determinada de acordo com a cinética de conversão de p-nitrofenol- β -D-xilanopiranosídeo (pNPX) em p-nitrofenolato (pNP), seguindo a metodologia descrita por Tan, Mayers e Saddler (1987), utilizando as seguintes condições de ensaio:

- Temperatura de ensaio: 50°C.
- Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8.
- [S]: Solução tampão pH 4,8 com 0,1% de p-Nitrophenyl β -D-Xylanopyranoside (Sigma N-7006)
- Solução do extrato liofilizado de enzimas: 2,73mg de extrato liofilizado dissolvido em 1,0 ml de água destilada.

A reação foi realizada nos tempos 2, 5, 10, 20 e 30 minutos, e os dados de absorbância a 410nm obtidos foram utilizados para construção do gráfico de cinética de reação (Fig 21).

- Repetição 1: $y = 0,02378x - 0,01688$
- Repetição 2: $y = 0,02436x - 0,01980$

Figura 12: Cinética de reação para atividade de β -xilosidases presente em extrato enzimático de *P.ostreatus*.

O cálculo da atividade foi realizado dividindo-se o coeficiente angular das curvas de cinética construídas pelo coeficiente de extinção molar (ξ) do pNP, determinado em laboratório como sendo de $15366 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Logo, a atividade de β -glicosidases foi determinada sendo a seguinte equação:

$$\frac{UI}{mL} = \left(\left(\left(\frac{\left(\frac{\text{coeficiente angular}}{\xi} \right) \times V}{1000} \right) * 10^6 \right) * \frac{1}{0,1} \right) \times \text{diluição}$$

V: volume total de solução de reação. Para a atividade de β -glicosidases do extrato de *P.ostreatus* foi utilizado um volume de 1,5 mL.

Logo, a atividade obtida foi de: $UI.mL^{-1} = 0,024 \pm 0,001$ ou $UI.g^{-1} = 8,61$

APÊNDICE B

Caracterização das atividades de celulasas e xilanases medidas a partir de preparações enzimáticas comerciais.

1. Preparação de enzimas derivadas de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (SIGMA C2730), Lote: SLBB 4803 V.

1.1. FPAse

A atividade total das celulasas (FPAse) consiste na ação dos três grupos de enzimas: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases sobre papel de filtro, baseado em uma conversão fixa de 4% do substrato em 60 minutos de reação, seguindo a metodologia descrita por Ghose (1987). As reações foram conduzidas a 50°C, em tampão acetato de sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8, utilizando-se 50mg de papel de filtro Whatman nº1 (1.0 x 5.0 cm). Três diluições da mistura enzimática foram feitas (100, 125 e 150 vezes) e um gráfico semilog foi construído relacionando as diluições da enzima com a quantidade de glicose liberada por tubo de ensaio (Figura 9). A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que corresponde a 2,0 mg de açúcares redutores. Todos os ensaios foram feitos em triplicata, e para cada repetição foi determinada uma equação de reta:

- Repetição 1: $y = 3,76420x + 9,90677$
- Repetição 2: $y = 4,26265x + 10,92906$
- Repetição 3: $y = 4,92638x + 12,31324$

Figura 13: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de FPAse para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de *T.reesei*.

A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que corresponde a 2,0 mg de açúcares redutores. O valor de 0,37 foi dividido por esse valor de diluição e o resultado obtido foi definido como atividade de FPAse em UI.mL⁻¹.

$$FPAse = 45,23 \pm 2,43 \text{ FPU.mL}^{-1}$$

1.2. Endoglucanases

A atividade de CMCase foi medida a partir da conversão de carboximetilcelulose (CMC), viscosidade média e grau de substituição 0,7 (SIGMA C5013) em oligossacarídeos com maior número de extremidades reductoras. A metodologia empregada foi a descrita por Ghose (1987), baseada em uma conversão fixa de 2% do substrato em 30 minutos de reação. Três diluições enzimáticas (2000, 2500 e 3000 vezes) foram utilizadas em ensaios à 50°C, com tampão acetato de sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8, e uma solução de pH 4,8 de 2% de CMC utilizada com substrato de reação. Um gráfico semilog foi construído relacionando as diluições da enzima com a quantidade de glicose liberada por tubo de ensaio (Figura 10). A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que corresponde a 0,5 mg de açúcares redutores. Todos os ensaios foram feitos em triplicata, e para cada repetição foi determinada uma equação de reta:

- Repetição 1: $y = 0,95503x + 3,85645$
- Repetição 2: $y = 0,82573x + 3,36755$
- Repetição 3: $y = 0,65034x + 2,74268$

Figura 14: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de CMCase para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de *T.reesei*.

A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que corresponde a 0,5 mg de açúcares redutores. O valor de 0,185 foi dividido por esse valor de diluição e o resultado obtido foi definido como atividade de CMCase em $UI.mL^{-1}$.

$$CMCase = 549,13 \pm 54 UI.mL^{-1}$$

1.3.β-glicosidase

A atividade de β-glicosidases foi determinada de acordo com a cinética de conversão de p-nitrofenol-β-D-glicopiranosídeo (pNPG) em p-nitrofenolato (pNP) , seguindo a metodologia descrita por Tan, Mayers e Saddler (1987). Foi utilizada uma diluição da mistura de enzimática de 1000 vezes, sendo os ensaios de atividade realizados nas seguintes condições:

- Temperatura de ensaio: 50°C.
- Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8.
- [S]: Solução tampão pH 4,8 com 0,1% de p-Nitrophenyl β-D-Glucopyranoside (Sigma N-7006)

A reação foi realizada nos tempos 2, 5, 10, 15, e 20 minutos, e os dados de absorbância a 410nm obtidos foram utilizados para construção do gráfico de cinética de reação (Fig 11).

- Repetição 1: $y = 0,078609x + 0,002705$
- Repetição 2: $y = 0,081117x - 0,017946$
- Repetição 3: $y = 0,077468x + 0,012606$

Figura 15: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de β-glicosidases se para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de *T.reesei*.

O cálculo da atividade foi realizado dividindo-se o coeficiente angular das curvas de cinética construídas pelo coeficiente de extinção molar (ξ) do pNP, determinado em laboratório como sendo de $15366 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Logo, a atividade de β-glicosidases foi determinada sendo a seguinte equação:

$$\frac{UI}{mL} = \left(\left(\left(\frac{\left(\frac{\text{coeficiente angular}}{\xi} \right) \times V}{1000} \right) * 10^6 \right) * \frac{1}{0,1} \right) \times \text{diluição}$$

V: volume total de solução de reação. Para a atividade de β-glicosidases da mistura comercial foi utilizado um volume de 3,0 mL.

Logo, a atividade obtida foi de:

$$UI.mL^{-1} = 77,02 \pm 1,56$$

1.4.Celobiohidrolases

A atividade de exo-1,4- β -glucanase foi determinada com base na técnica descrita por Wood e Bhat (1988) que consiste em conduzir a hidrólise de uma suspensão de celulose microcristalina (Avicel) com o extrato enzimático. O ensaio foi realizado utilizando uma diluição de 2000 vezes o extrato enzimático, e a concentração de açúcares redutores (AR) liberados (μmol) foi determinada nos tempos 15, 30, 45, e 60 minutos. Um gráfico de cinética foi então construído a partir dos valores de AR em relação ao tempo de reação (Fig.12).

- Repetição 1: $y = 0,004656x - 0,000829$
- Repetição 2: $y = 0,005411x - 0,015671$

Figura 16: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de celobiohidrolase se para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de *T.reesei*.

Como a enzima se manteve em velocidade linear durante todo o tempo analisado, o cálculo de atividade enzimática foi realizado utilizando-se o coeficiente angular da reta obtida entre as absorbâncias encontradas e os tempos analisados, conforme Figura 12. O cálculo foi feito segundo a equação:

$$UI.mL^{-1} = \frac{\text{coeficiente angular} \times \text{diluição}}{\text{volume de extrato utilizado na reação}}$$

Logo, a atividade obtida foi de:

$$UI.mL^{-1} = 100,67 \pm 10,68$$

1.5.Xilanases

A atividade de xilanases foi determinada de acordo com a cinética de conversão de xilana em açúcares redutores, com base na metodologia descrita por Bailey, Biely e Poutanen (1992). Os ensaios foram realizados a partir de uma diluição de 1000 vezes da mistura de enzimas, a 50°C e em tampão acetato de sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 5,3, sendo utilizando uma solução tampão pH 5,3 com 1% de Xilana de Birchwood (SIGMA X0502) como substrato de reação.

A quantidade de açúcar redutor liberada (μmol) liberado em diferentes tempos de reação (2, 5, 10, 15 e 20 minutos) foram utilizados para construção do gráfico de cinética de reação (Fig 13).

- Repetição 1: $y = 0,0484369x - 0,0183838$
- Repetição 2: $y = 0,0495104x - 0,0128150$
- Repetição 3: $y = 0,0475451x - 0,0106546$

Figura 17: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de xilanase para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de *T.reesei*.

Como a enzima se manteve em velocidade linear durante todo o tempo analisado, o cálculo de atividade enzimática foi realizado utilizando-se o coeficiente angular das retas de cinética de reação, conforme Figura 13. O cálculo foi feito segundo a equação:

$$UI. mL^{-1} = \frac{\text{coeficiente angular} \times \text{diluição}}{\text{volume de extrato utilizado na reação}}$$

Logo, a atividade obtida foi de:

$$UI. mL^{-1} = 484,97 \pm 9,84$$

1.6.β-xilosidase

A atividade de β-xilosidases foi determinada de acordo com a cinética de conversão de p-nitrofenol-β-D-xilanopiranosídeo (pNPX) em p-nitrofenolato (pNP), seguindo a metodologia descrita por Tan, Mayers e Saddler (1987). Foi utilizada uma diluição da mistura de enzimática de 1000 vezes, e os ensaios de atividade foram realizados a 50°C, em tampão acetato de sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8, e solução tampão pH 4,8 com 0,1% de p-Nitrophenyl β-D-Xylanopyranoside (Sigma N-7006).

A reação foi realizada nos tempos 2, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos, e os dados de absorbância a 410nm obtidos foram utilizados para construção do gráfico de cinética de reação (Fig 14).

- Repetição 1: $y = 0,0299304x - 0,0093272$
- Repetição 2: $y = 0,0299948x - 0,0052254$
- Repetição 3: $y = 0,0293164x - 0,0039926$

Figura 18: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de β-xilanase para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de *T.reesei*.

O cálculo da atividade foi realizado dividindo-se o coeficiente angular das curvas de cinética construídas pelo coeficiente de extinção molar (ξ) do pNP, determinado em laboratório como sendo de $15366 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Logo, a atividade de β-glicosidases foi determinada sendo a seguinte equação:

$$\frac{UI}{mL} = \left(\left(\left(\frac{\left(\frac{\text{coeficiente angular}}{\xi} \right) \times V}{1000} \right) * 10^6 \right) * \frac{1}{0,1} \right) \times \text{diluição}$$

V: volume total de solução de reação. Para a atividade de β-glicosidases com enzima comercial, o volume utilizado foi de 3,0 mL.

Logo, a atividade obtida foi de:

$$UI.mL^{-1} = 29,04 \pm 0,37$$

2. Preparação de enzimas derivadas de *Aspergillus niger* (SIGMA C6105).

2.1. β -glicosidase

A atividade de β -glicosidases foi determinada de acordo com a cinética de conversão de p-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) em p-nitrofenolato (pNP), seguindo a metodologia descrita por Tan, Mayers e Saddler (1987). Foi utilizada uma diluição da mistura de enzimática de 15000 vezes, sendo os ensaios de atividade realizados nas seguintes condições:

- Temperatura de ensaio: 50°C.
- Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8.
- [S]: Solução tampão pH 4,8 com 0,1% de p-Nitrophenyl β -D-Glucopyranoside (Sigma N-7006)

A reação foi realizada nos tempos 2, 5, 10, 20, e 30 minutos, e os dados de absorbância a 410nm obtidos foram utilizados para construção do gráfico de cinética de reação (Fig 15).

- Repetição 1: $y = 0,0254x + 0,0133$
- Repetição 2: $y = 0,0255x + 0,0154$
- Repetição 3: $y = 0,0255x + 0,0153$

Figura 19: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de β -glicosidase para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de *A. niger*.

O cálculo da atividade foi realizado dividindo-se o coeficiente angular das curvas de cinética construídas pelo coeficiente de extinção molar (ξ) do pNP, determinado em laboratório como sendo de $15366 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Logo, a atividade de β -glicosidases foi determinada sendo a seguinte equação:

$$\frac{UI}{mL} = \left(\left(\left(\frac{\left(\frac{\text{coeficiente angular}}{\xi} \right) \times V}{1000} \right) * 10^6 \right) * \frac{1}{0,1} \right) \times \text{diluição}$$

V: volume total de solução de reação. Para a atividade de β -glicosidases da mistura comercial foi utilizado um volume de 3,0 mL.

Logo, a atividade obtida foi de: $UI.mL^{-1} = 752,4 \pm 1,5$

2.2.Xilanases

A atividade de xilanases foi determinada de acordo com a cinética de conversão de xilana em açúcares redutores, com base na metodologia descrita por Bailey, Biely e Poutanen (1992). Os ensaios foram realizados a partir de uma diluição de 2000 vezes da mistura de enzimas, a 50°C e em tampão acetato de sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 5,3, sendo utilizando uma solução tampão pH 5,3 com 1% de Xilana de Birchwood (SIGMA X0502) como substrato de reação.

A quantidade de açúcar redutor liberado (μmol) liberado em diferentes tempos de reação (2, 5, 10, 20 e 30 minutos) foi convertido em porcentagem de conversão de xilana e um gráfico de cinética de reação foi construído (Fig 16).

Figura 20: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de xilanase para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de *A.niger*.

Para o cálculo de atividade enzimática foi utilizado o tempo de 2 minutos, pois neste tempo a reação se manteve em velocidade linear. O cálculo foi feito segundo a equação:

$$UI.mL^{-1} = \frac{\text{açúcar redutor liberada por mL}(\mu\text{mol/mL})}{\text{tempo de reação}}$$

Logo, a atividade obtida foi de:

$$UI.mL^{-1} = 2517,4 \pm 24,9$$

2.3.β-xilosidase

A atividade de β-xilosidases foi determinada de acordo com a cinética de conversão de p-nitrofenol-β-D-xilanopiranosídeo (pNPX) em p-nitrofenolato (pNP), seguindo a metodologia descrita por Tan, Mayers e Saddler (1987). Foi utilizada uma diluição da mistura de enzimática de 100 vezes, e os ensaios de atividade foram realizados a 50°C, em tampão acetato de sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8, e solução tampão pH 4,8 com 0,1% de p-Nitrophenyl β-D-Xylanopyranoside (Sigma N-7006).

A reação foi realizada nos tempos 2, 5, 10, 20 e 30 minutos, e os dados de absorbância a 410nm obtidos foram utilizados para construção do gráfico de cinética de reação (Fig 17).

- Repetição 1: $y = 0,0426x + 0,0181$
- Repetição 2: $y = 0,0433x + 0,0213$
- Repetição 3: $y = 0,0428x + 0,0213$

Figura 21: Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de β-xilosidase para diferentes diluições da preparação de enzimas derivadas de *A.niger*.

O cálculo da atividade foi realizado dividindo-se o coeficiente angular das curvas de cinética construídas pelo coeficiente de extinção molar (ξ) do pNP, determinado em laboratório como sendo de $15366 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Logo, a atividade de β-glicosidases foi determinada sendo a seguinte equação:

$$\frac{UI}{mL} = \left(\left(\left(\frac{\left(\frac{\text{coeficiente angular}}{\xi} \right) \times V}{1000} \right) * 10^6 \right) * \frac{1}{0,1} \right) \times \text{diluição}$$

V: volume total de solução de reação. Para a atividade de β-glicosidases com enzima comercial, o volume utilizado foi de 3,0 mL.

Logo, a atividade obtida foi de:

$$UI.mL^{-1} = 8,4 \pm 0,1$$

3. Preparação de xilanase (GH11) derivada de *Neocallimastix patriciarum* (MEGAZYME).

A atividade de xilanases foi determinada de acordo com a cinética de conversão de xilana em açúcares redutores, com base na metodologia descrita por Bailey, Biely e Poutanen (1992). Os ensaios foram realizados a partir de uma diluição de 8000 vezes da mistura de enzimas, a 50°C e em tampão acetato de aódio/ ácido acético, 50 mM, pH 5,3, sendo utilizando uma solução tampão pH 5,3 com 1% de Xilana de Birchwood (SIGMA X0502) como substrato de reação.

O estudo de cinética de reação dessa enzima não foi possível devido à mesma não manter uma velocidade linear durante mais de cinco minutos de reação. Tal fato é provavelmente devido a reações de inibição pelo produto logo após os primeiro minutos de atividade enzimática. Dessa forma, para o cálculo de atividade de xilanase foi utilizado o tempo de 5 minutos pois neste tempo a reação se manteve em velocidade linear. O cálculo foi feito segundo a equação:

$$UI.mL^{-1} = \frac{\text{açúcar redutor liberada por mL}(\mu\text{mol/mL})}{\text{tempo de reação}}$$

Logo, a atividade obtida foi de:

$$UI.mL^{-1} = 5697,14 \pm 0,71$$