UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

FELIPE ANDRÉS MONTOYA REINOSO

**Aplicação de uma mistura de enzimas para hidrolisar bagaço de cana-de-
açúcar pré-tratado com sulfito alcalino.**

Lorena – SP

2013

FELIPE ANDRÉS MONTOYA REINOSO

Aplicação de uma mistura de enzimas para hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino.

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriane Ferreira Milagres

Edição reimpressa e corrigida

Lorena – SP

Outubro, 2013

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

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Reinoso, Felipe Andrés Montoya

Aplicação de uma mistura de enzimas para hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino. / Felipe Andrés Montoya Reinoso. –ed. reimpr., corr.– 2013.

99 p.: il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2013.

Orientador: Adriane Ferreira Milagres

Versão original

1. Xilanases 2. Celulases 3. Xilosidase 4. Hidrólise enzimática 5. Lignina. I. Título. II. Milagres, Adriane Ferreira, orient.

664.113 - CDU

*Dedico este trabajo a mis padres, Waleska y
Richard, gracias por el amor, apoyo y enseñanzas*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e iluminação para chegar até aqui.

A minha família, especialmente a meus pais, Waleska e Richard, e a minhas irmãs, Amparo, Conny e Mariella, pelo amor, carinho, compreensão e amizade nos momentos de alegria e de dificuldades.

A meus padrinhos, Graciela e Rómulo, e a meus primos, Gonzalo e Rómulo, por me permitir ser parte da sua família.

Às minhas avós “Hol” e “Lolo”, pelos anos de amor e dedicação.

Aos meus avôs, Ricardo e Santos Rómulo, “*in memoriam*”, pelo amor e ensinamentos. SAUDADES.

Ao “Consulado do Chile”, pelo apoio, amizade, e os muitos momentos de descontração. Muito obrigado M. Fernanda e Omar, a vida sem vocês no Brasil não seria tão legal.

A quem sempre esteve comigo, torcendo e acreditando em mim muitas vezes mais do que eu, como uma luz iluminando meu caminho.

À minha orientadora, Prof^a. Adriane, pela orientação, paciência, apoio, dedicação e confiança. Muito obrigado!

Aos meus grandes amigos, Alejandro, Angélica, Carlos, Carolina, Claudio, Denisse, Jaime, Maripa, Paulo, Roberto, Obrigado, amigos!

Aos amigos de laboratório, Cecéu, Débora, Fernanda, Germano, Guilherme, Joseana, Jéssica, Luciane, Mariana, Paula, Victor, por ajudar a conduzir as atividades de pesquisa, pela ajuda com o Português e também pelos momentos de diversão e alegria durante o trabalho.

Aos demais companheiros do Departamento, pelos momentos de descontração.

Ao Zé Moreira, Zé Cobrinha e Djalma, pela constante ajuda e disposição.

Aos professores do Departamento de Biotecnologia, pelos ensinamentos.

À CAPES e CNPq, pela bolsa de mestrado.

À EEL-USP, pela oportunidade de realizar meu mestrado.

À todo o povo brasileiro, pelo maior benefício que uma nação pode ofertar : EDUCAÇÃO, muito obrigado mesmo!

"Hay hombres que luchan un día y son buenos.
Hay otros que luchan un año y son mejores.
Hay quienes luchan muchos años, y son muy
buenos. Pero hay los que luchan toda la vida,
esos son los imprescindibles."

(Bertolt Brecht)

RESUMO

MONTOYA, F. A. R. **Aplicação de uma mistura de enzimas para hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino**. 2013. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

O cultivo da cana-de-açúcar é uma das atividades agrícolas mais importantes no Brasil, produzindo após a moagem o caldo, utilizado para a produção de açúcar e etanol, e o bagaço, resíduo lignocelulósico. O bagaço é recalcitrante à hidrólise enzimática, em parte pela baixa porosidade, resultante do recobrimento das fibrilas de celulose com lignina e hemicelulose. Neste estudo, o bagaço foi pré-tratado com sulfito alcalino nas concentrações de 2,5% de NaOH e 5% de Na₂SO₃ versus 5% de NaOH e 10% de Na₂SO₃ para produzir substratos para hidrólise enzimática. Ambos pré-tratamentos produziram substratos com teor de hemicelulose, grupos ácidos, grau de retenção de água e área superficial semelhantes. O conteúdo de lignina foi bem diferente nos bagaços pré-tratados com 5% de sulfito (21% de lignina) e 10% de sulfito (13% de lignina). A hidrólise da celulose e hemicelulose do bagaço com alto teor de lignina, utilizando a carga enzimática de 40 FPU/g e 80 U/g de β -glicosidase foram próximas a 50% em 48 horas e, mesmo no bagaço com pouca lignina a conversão dos polissacarídeos não foi completa (90%). Considerando a importância do tipo de enzimas para a conversão dos polissacarídeos dos bagaços pré-tratados, realizou-se um planejamento experimental 2⁴ com 6 pontos centrais ampliado em estrela, para avaliar uma mistura de enzimas partindo de 5 FPU/g do extrato comercial de *Trichoderma reesei* (celluclast) combinado com enzimas purificadas comerciais: xilanase de *Neocallimastix patriciarum* (família 10), xilanase de *Thermotoga maritima* (família 11), β -xilosidase de *Selelomonas ruminantium* e β -glicosidase de *Aspergillus niger*. A aplicação da mistura de enzimas otimizada no bagaço pré-tratado com alta carga de sulfito aumentou a conversão de celulose e hemicelulose em 6,6% e 15% respectivamente, comparado com a mistura de referência (5FPU de celluclast e 10UI de Novozyme 188 por grama de bagaço). A suplementação da celluclast com β -xilosidase e β -glicosidase foi estatisticamente significativa em 24 horas de hidrólise a um nível de 95% de confiança e a interação da xilanase 10 e 11 foi significativa com um nível de confiança de 90%. Quando foram realizados os mesmos ensaios do planejamento com o substrato com alto teor de lignina, as hidrólises da celulose e hemicelulose com a mistura de enzimas foram inferiores à obtida com a referência. A suplementação com xilanases e β -xilosidase aumentou a conversão enzimática da hemicelulose apenas do substrato com pouca lignina, entretanto nos hidrolisados de ambos os substratos foi detectada a presença de xilo-oligossacarídeos, indicando a necessidade de adição de mais β -xilosidase à mistura enzimática. As velocidades iniciais de hidrólise da celulose e hemicelulose foram pouco alteradas quando a lignina do bagaço reduziu de 21% para 13%, porém a conversão em 48 h de reação foi o dobro. Este estudo mostrou que o acesso das enzimas à hemicelulose foi limitado pelo alto teor de lignina do substrato, e que o benefício do uso de xilanases para a conversão de celulose foi obtido no substrato pré-tratado com alta carga de sulfito.

Palavras Chave: Xilanases. Celulases. Xilosidase. Hidrólise enzimática. Lignina.

ABSTRACT

MONTOYA, F. A. R. **Application of enzyme mixture to hydrolyze sugarcane bagasse pretreated with alkali sulfite**. 2013. 99p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

The cultivation of sugarcane is one of the most important agricultural activities in Brazil. The juice obtained from the crushed stalks of sugarcane is used to produce sugar and ethanol and the dry, fibrous residue remaining is the bagasse. Bagasse is recalcitrant to enzymatic hydrolysis, in part by low porosity due to the partial filling of space between the cellulose microfibrils by lignin and hemicelluloses. In this study, bagasses were pretreated with alkaline sulfite at concentrations of 2.5% NaOH and 5% Na₂SO₃ NaOH versus 5% and 10% Na₂SO₃ to produce substrates for enzymatic hydrolysis. Both substrates presented similar hemicellulose content, acid groups, water retention and specific surface area. Lignin content differed between pretreated bagasse with 5% sulfite (21%) and 10% sulfite (13%). The hydrolysis of cellulose and hemicellulose of bagasse with high lignin content, using 40 FPU/g and 80 U/g of β -glucosidase was approximately 50% in 48 hours and even on bagasse with low lignin content, the polysaccharides conversion was not complete (90%). Considering the importance of the type of enzymes for the conversion of polysaccharides of pretreated bagasses, a 2⁴ full factorial experimental design with six central points was performed to evaluate a mixture of enzymes. A load of 5 FPU/g of *Trichoderma reesei* extract (celluclast) was combined with purified commercial enzymes: *Neocallimastix patriciarum* xylanase (family 10), *Thermotoga maritima* xylanase (family 11), *Selelomonas ruminantium* β -xylosidase and β -glucosidase from *Aspergillus niger*. The optimized mixture improved the conversion of cellulose and hemicellulose of the substrate with low lignin content in 6.6% and 15% respectively, when compared to the reference mixture (5FPU of celluclast and 10 IU of novozyme 188 per gram of bagasse). Supplementation with β -xylosidase and β -glucosidase was statistically significant at 24 hours of reaction and also the interaction of xylanases 10 and 11. When the same assays were performed with the substrate with low lignin, hydrolysis of the cellulose and hemicellulose with a mixture of purified enzymes was inferior to that obtained by the reference. Supplementation with xylanase and β -xylosidase improved the enzymatic conversion only for substrate with low lignin content, however in supernatants of both substrates was detected the presence of xylo-oligosaccharides, suggesting the need for further addition of β -xylosidase to the enzyme mixture. Initial rate of cellulose and hemicellulose hydrolysis changed very little when the lignin in the bagasse was reduced from 21% to 13%, but the conversion at 48 h conversion time was twice higher. This study showed that access of enzymes to the hemicellulose was limited by the high lignin content of the substrate, and that the benefit of using xylanases for the conversion of cellulose was obtained on the substrate pretreated with high sulfite load.

Keywords: Xylanases. Celulases. Xylosidase. Enzymatic hydrolysis. Lignin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura parcial da celulose	21
Figura 2: Estrutura representativa de L-arabino-(4-O-metil-D-glucurono)-D-xilana: 1- xilopirranose; 2- L-arabinofuranose; 3- ácido 4-O-metil-glucurônico; 4- grupo acetil	22
Figura 3: Estrutura parcial de uma lignina de madeira mole	23
Figura 4: Estrutura química dos corantes Direct Blue (A) e Direct Orange (B) usados na Coloração de Simons	28
Figura 5: Estrutura da celulose e enzimas hidrolíticas necessárias para a degradação da celulose	30
Figura 6: Representação da estrutura da xilana e pontos onde as enzimas atuam	31
Figura 7: Representação esquemática do aparato de centrifugação.	46
Figura 8: Conversão de celulose (A) e (C), e de hemicelulose (B) e (D) dos bagaços pré-tratados com baixa e alta carga de sulfito alcalino, respectivamente.	58
Figura 9: Hidrólise enzimática da celulose (A) e da hemicelulose (B) do bagaço pré-tratado com alta carga de sulfito com diferentes misturas de enzimas. Os valores de carga enzimática reportados são referidos por grama de bagaço.	61
Figura 10: Proteínas presentes nos ensaios idealizados pelo planejamento experimental ampliado em estrela, utilizadas na hidrólise dos bagaços com alto e baixo conteúdo de lignina.	63
Figura 11: Relação entre proteína e lignina presentes nos ensaios de hidrólise enzimática dos bagaços com alto e baixo conteúdo de lignina	63

Figura 12: Rendimento de hidrólise da celulose do bagaço de cana-de-açúcar com baixo teor de lignina, utilizando diferentes misturas de enzimas.	65
Figura 13: Rendimento de hidrólise da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar com baixo teor de lignina, utilizando diferentes misturas de enzimas.	65
Figura 14: Gráfico de Pareto para o efeito das variáveis: xilanase 10, xilanase 11, β -glicosidase e β -xilosidase, nas respostas conversão de celulose em 24 horas de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.	68
Figura 15: Gráfico de Pareto para o efeito das variáveis: xilanase 10, xilanase 11, β -glicosidase e β -xilosidase, nas respostas conversão de celulose em 24 horas de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.	68
Figura 16: Superfície de resposta descrita pelos modelos para a conversão de celulose da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Xilanase 10 e 11 foram fixados no nível zero.	74
Figura 17: Conversão de celulose (A) e hemicelulose (B) durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino	74
Figura 18: Cromatografia em camada delgada (TLC) feita com o sobrenadante da hidrólise enzimática do substrato pré-tratado com 10% de Na_2SO_3 e 5% de NaOH , obtida nas 6 e 48 horas.	76
Figura 19: Rendimento de hidrólise da celulose do bagaço de cana-de-açúcar com alto teor de lignina, utilizando diferentes misturas de enzimas.	78
Figura 20: Rendimento de hidrólise da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar com alto teor de lignina, utilizando diferentes misturas de enzimas.	78

Figura 21: Superfície de resposta descrita pelos modelos para a conversão de celulose da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para o substrato com alto teor de lignina. Xilanase 11 e β -xilosidase foram fixados no nível zero.	82
Figura 22: Conversão de celulose (A) e hemicelulose (B) durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino.....	83
Figura 23: Cromatografia em camada delgada (TLC) feita com o sobrenadante da hidrólise enzimática do substrato pré-tratado com 5% de Na_2SO_3 e 2,5% de NaOH, obtida nas 6 e 48 horas.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das enzimas purificadas comerciais usadas no presente trabalho	37
Tabela 2: Planejamento fatorial completo 2^4 para avaliação da eficiência de uma mistura de enzimas na hidrólise do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino.	40
Tabela 3: Planejamento fatorial completo 2^4 ampliado em estrela para avaliação da eficiência de uma mistura de enzimas na hidrólise do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino.	41
Tabela 4: Composição química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo de sulfito alcalino.	50
Tabela 5: Retenção de água e grupos ácidos do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo processo sulfito alcalino.	52
Tabela 6: Medida de corantes adsorvidos no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo de sulfito alcalino.	54
Tabela 7: Atividades enzimáticas e conteúdo de proteína das enzimas comerciais.	57
Tabela 8: Rendimento de hidrólise de celulose e hemicelulose obtidos em 24 e 48 h de hidrólise com o planejamento fatorial 2^4 completo com 6 pontos centrais.	66
Tabela 9: Velocidade inicial e rendimento de hidrólise de celulose e hemicelulose com o planejamento fatorial 2^4 completo com 6 pontos centrais ampliado em estrela.	70
Tabela 10: Análise de variância com erro total para a conversão de celulose em 24 horas, usando um modelo quadrático.	71
Tabela 11: Velocidade inicial e rendimento de hidrólise de celulose e hemicelulose com o planejamento fatorial 2^4 completo com 6 pontos centrais ampliado em estrela.	79

Tabela 12: Análise de variância (ANOVA) para a superfície de resposta usando um modelo quadrático, dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a conversão de celulose nas seis horas de hidrólise enzimática.	81
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Composição da parede celular	21
2.2 Pré-tratamentos	23
2.3 Propriedades do substrato que afetam a hidrólise enzimática	26
2.3.1 Área superficial	26
2.4 Celulases e Hemicelulases	29
2.4.1 Celulases	29
2.4.2 Xilanases das famílias 10 e 11	32
2.3.2 β -Xilosidase	33
2.5 Hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos	33
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos:	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Enzimas	37
4.2 Bagaço de cana-de-açúcar e pré-tratamentos do bagaço.....	37
4.3 Hidrólises enzimáticas	38
4.3.1 Sacarificação da celulose e hemicelulose.....	38
4.3.2 Hidrólise do bagaço com diferentes concentrações do preparado enzimático	39
4.3.3 Avaliação da adição das enzimas acessórias ao preparado comercial Celluclast	39
4.3.4 Ensaio de inativação de xilanases e efeito da carga de proteínas na hidrólise enzimática.....	42
4.4. Métodos Analíticos	42
4.4.1 Caracterização do bagaço pré-tratado	42
4.4.1.1 Determinação da composição química.....	42
4.4.1.2 Determinação da área superficial da celulose	43
4.4.1.3 Determinação dos grupos ácidos.....	44
4.4.1.4 Retenção de água.....	45
4.4.2 Determinações das atividades enzimáticas e proteínas	46
4.4.2.1 Celulases Totais	46
4.4.2.2 β -Glicosidase.....	47
4.4.2.3 β - D-Xilanase	47

4.4.2.4 β -Xilosidase.....	48
4.4.2.5 Proteínas	48
4.4.3 Cromatografia em camada delgada (TLC)	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo sulfito alcalino...	50
5.2 Características físico-químicas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo sulfito alcalino.	51
5.2.1 Retenção de água e grupos ácidos dos bagaços.....	51
5.2.2 Área superficial da celulose (ASE)	54
5.3 Determinação das atividades de enzimas hidrolíticas presentes no preparado comercial de celulase	56
5.4 Análise comparativa da hidrólise enzimática do bagaço com baixo e alto teor de lignina	57
5.5 Efeito da adição de enzimas acessórias ao extrato comercial Celluclast.....	60
5.6 Carga de proteínas na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com elevado e baixo teor de lignina.	62
5.7 Efeito da mistura de enzimas na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com baixo teor de lignina.	64
5.8 Efeito da mistura de enzimas na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com alto teor de lignina	77
6. CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS	87

1. INTRODUÇÃO

O bagaço de canha-de-açúcar é um material lignocelulósico com aproximadamente 45 % de celulose, 26 % de hemicelulose, 24% de lignina e 5% de substâncias extraíveis e cinzas (MENDES et al., 2011). Considerando seu alto conteúdo de carboidratos, este material poderia ser usado para aumentar significativamente a produção de etanol. O processo de conversão do material lignocelulósico a etanol envolve três grandes etapas: pré-tratamento, para melhorar a acessibilidade das enzimas hidrolíticas ao substrato; hidrólise enzimática ou química da celulose e hemicelulose, e subsequentemente a fermentação dos monossacarídeos resultantes a etanol. Os passos de pré-tratamento e hidrólise enzimática estão muito relacionados e constituem uma barreira técnica e econômica para a comercialização de etanol obtido de biomassa lignocelulósica. Especificamente, a velocidade e a extensão da hidrólise enzimática dos polissacarídeos dependem significativamente da carga enzimática e das características estruturais dos substratos após o pré-tratamento (ARANTES; SADDLER 2010; DEL RIO; CHANDRA; SADDLER, 2011; KUMAR; CHANDRA; SADDLER, 2011; ZHANG et al., 2011).

O pré-tratamento sulfito alcalino é amplamente estudado para a obtenção de polpas de alto rendimento. Esse processo aumenta o conteúdo de grupos iônicos das fibras e promove a clivagem de algumas das ligações interpoliméricas, incluindo ligações entre a lignina e carboidratos (CHEN; LAI, 1998). A principal reação química na lignina é a sua sulfonação e da hemicelulose é a desacetilação. As frações de baixa massa molar de ambos componentes são solubilizadas aumentando a porosidade do material. No caso do bagaço de cana-de-açúcar, o pré-tratamento também promove a clivagem de ligações éster de ácidos hidroxicinâmicos ligados à lignina ou hemicelulose (MOUSAVIOUN, DOHERTY, 2010). A eficácia do pré-tratamento sulfito alcalino reside no aumento de volume da fibra celulósica, consequência da retenção de água e enfraquecimento da matriz lignocelulósica. Este pré-tratamento tem sido estudado em bagaço-de-cana para uso na hidrólise enzimática da celulose (MENDES et al, 2011; 2013).

O acesso das celulasas ao material lignocelulósico pré-tratado é um fato inexorável para aumentar a hidrólise da celulose. Geralmente, nos estágios iniciais da hidrólise as enzimas produzem grandes modificações no substrato, mas após 24 horas a velocidade de hidrólise diminui e atinge um platô mesmo sem ocorrer a conversão total dos polissacarídeos. A ineficiência das enzimas após determinado tempo de hidrólise está relacionada a características estruturais do substrato e aos mecanismos de interação das

enzimas. Entretanto, o tipo de enzimas para a hidrólise de um substrato heterogêneo como o bagaço de cana-de-açúcar que foi pré-tratado com sulfito alcalino é um campo pouco explorado.

Dentro desta perspectiva, o presente trabalho avaliou a hidrólise enzimática de bagaços de cana-de-açúcar, pré-tratados com sulfito alcalino para obter alto e baixo teor de lignina. Foi utilizado um extrato bruto de *Trichoderma reesei* contendo celulasas e hemicelulasas e avaliada a adição de diferentes hemicelulasas visando melhorar a hidrólise enzimática da celulose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Composição da parede celular

A parede celular dos materiais lignocelulósicos possui um arranjo complexo, responsável por criar uma defesa contra o ataque microbiano e animal (HIMMEL et al., 2007). Esta parede celular dos materiais lignocelulósicos está construída em uma série de camadas: a lamela média, a parede primária e a parede secundária. A lamela média é altamente lignificada e serve de união entre as células. A parede celular primária é formada por uma rede irregular de microfibrilas de celulose combinada com hemicelulose, pectinas e proteínas, embebidas na matriz de lignina. A parede celular primária é sustentada em uma grossa parede celular secundária, composta por três diferentes camadas, das quais a camada do meio (S2) constitui a maior porção. Esta camada tem microfibrilas de celulose altamente organizadas com uma orientação quase perpendicular umas às outras em camadas adjacentes. A lamela média tem maior concentração de lignina, mas a quantidade de lignina em S2 é maior devido a sua espessura. A celulose, hemicelulose e a lignina se encontram intimamente associadas, por isso que o material lignocelulósico não é de fácil acesso às enzimas hidrolíticas e, portanto, pré-tratamentos são requeridos (ZHANG et al., 2011). Este fato é um dos principais problemas para o acesso e aproveitamento de cada um dos componentes da parede celular, no entanto a literatura científica relata diversas técnicas para melhorar a acessibilidade a esta rede complexa.

A celulose é o principal constituinte da parede celular vegetal, composta de no mínimo 15000 resíduos de glicose unidos por ligações β -1,4. Ligações de hidrogênio intra e intermoleculares ocorrem na celulose, conferindo rigidez e cristalinidade à estrutura. Moléculas de celulose se organizam em feixes chamados de microfibrilas, que formam as fibrilas e dão origem às fibras celulósicas, responsáveis pela resistência à tração e insolubilidade na maioria dos solventes (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 1: Estrutura parcial da celulose (ROWELL, 2005)

Sobre a superfície das microfibrilas, aderem-se as hemiceluloses, polímeros heterogêneos que são classificados de acordo com a composição em monossacarídeos (Figura 2). As hemiceluloses impedem que as moléculas de celulose de fibras paralelas colapsem entre si, mas também permitem a interação fraca entre uma fibra e outra, formando uma rede (FENGEL; WEGENER, 1989). As hemiceluloses apresentam-se na forma de estruturas ramificadas podendo ser homopolímeros ou heteropolímeros, de menor massa molar que a celulose. A xilana é a hemicelulose presente em maior proporção no bagaço, é o segundo polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza, correspondendo a aproximadamente um terço da fonte de carbono renovável do planeta (COLLINS et al., 2005). Baseado nos grupos substituintes, a hemicelulose é caracterizada como homoxilana linear, arabinoxilana e glucuronoxilana. A cadeia da xilana do bagaço apresenta-se acetilada nas posições C-2 e C-3 (acetilxilana). As ramificações da cadeia principal determinam a solubilidade, a conformação física da molécula com os demais componentes hemicelulósicos e influenciam o modo e a extensão da hidrólise enzimática (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999).

Figura 2: Estrutura representativa de L-arabino-(4-O-metil-D-glucurono)-D-xilana: 1- xilopirranose; 2- L-arabinofuranose; 3- ácido 4-O-metil-glucurônico; 4- grupo acetil (McDOUGALL et al., 1993).

A lignina é composta basicamente de unidades de fenilpropano formando uma macromolécula amorfa (Figura 3). Mesmo após muitos estudos terem sido realizados, sua estrutura ainda não pode ser determinada, o que se deve principalmente a grande diversidade da estrutura das ligninas quando se passa de uma espécie de vegetal para outra, ou até mesmo quando são analisadas partes diferentes de uma mesma espécie. As condições do meio em que o vegetal se encontra também podem interferir na constituição da lignina, transformando assim a lignina num composto de estrutura difícil de ser caracterizada por causa da sua complexidade de formação, baseada em unidades fenilpropanóides interligadas por diferentes tipos de ligações, como também porque sofre

modificações estruturais durante seu isolamento das paredes celulares. O acoplamento das unidades fenilpropano não ocorre de forma regular e repetitiva, devido ao mecanismo de biossíntese, que se processa via radicalar a partir da reação de três álcoois cinâmicos precursores (álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico) (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 3: Estrutura parcial de uma lignina de madeira mole (ROWELL, 2005)

Os extrativos são substâncias orgânicas de baixa massa molecular. Podem ser resinas (terpenos e lignanas) ou ácidos graxos, álcoois, taninos e flavonóides. Estão ligados à matriz lignocelulósica e localizados principalmente nas células de parênquima e canais de resina (FENGEL; WEGENER, 1989).

2.2 Pré-tratamentos

Os processos de pré-tratamentos (químico, físico ou biológico) da biomassa tem como objetivos remover e/ou modificar os limitantes estruturais e composicionais da biomassa lignocelulósica para melhorar a porcentagem de hidrólise e aumentar a produção de açúcares fermentáveis a partir da celulose (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008).

Existem diferentes tipos de tecnologias de pré-tratamento, por exemplo, alcalino, ácido diluído, explosão a vapor, amônia e organonossolve (ZHU et al., 2009).

O pré-tratamento por explosão a vapor ou hidrotérmico produz substratos com maior digestibilidade sem o uso extensivo de reagentes químicos. Esses tratamentos resultam na desacetilação e parcial remoção de hemiceluloses. A extensão da remoção de hemicelulose depende da severidade do pré-tratamento (CANILHA et al., 2011). Durante o pré-tratamento a estrutura da lignina é alterada e parte dela é redepositada na superfície das fibras limitando a conversão enzimática dos polissacarídeos (RAMOS et al., 1992). Pré-tratamentos em altas temperaturas em geral liberam compostos solúveis que são inibidores enzimáticos e do crescimento microbiano (CANILHA et al., 2012). O ácido acético proveniente da hemicelulose libera compostos fenólicos da quebra parcial da lignina e também produz derivados de furano da desidratação da xilose. Esses compostos podem ser removidos por vários métodos de descodificação (VILLAREAL et al., 2006).

A lignina dos materiais lignocelulósicos é mais facilmente removida em meio alcalino ou por solventes orgânicos. O alto pH causa o intumescimento das fibras e altera a estrutura cristalina da celulose de I para III, tornando-a mais amorfa e mais fácil de ser hidrolisada enzimaticamente (FENGEL; WEGENER, 1989). O tratamento alcalino também solubiliza a hemicelulose e pode causar a sua realocização, especialmente se o pH é diminuído.

Uma forma de aumentar a acessibilidade da matriz polimérica é remover seletivamente a lignina. Esta possibilidade abre as portas para o aproveitamento dos açúcares que compõem a hemicelulose, possibilitando o aproveitamento integral do material (GÍRIO et al., 2010). A remoção da lignina pode ser feita por métodos oxidativos, como é o caso do tratamento com clorito de sódio na presença de ácido acético diluído. Esse tratamento é utilizado para obtenção de holocelulose e alcança bons resultados de remoção seletiva de lignina quando até 60% desse componente é removido. A partir desse valor, os carboidratos da parede celular começam a ser degradados (SIQUEIRA et al., 2013).

De fato, uma completa deslignificação dos materiais lignocelulósicos é cara e pode não ser necessária para um pré-tratamento efetivo. A estrutura da biomassa pré-tratada é crucial para a hidrólise subsequente. Um pré-tratamento que remove lignina, mas não aumenta a acessibilidade das celulasas à celulose, não é efetivo para conseguir altas taxas de hidrólise enzimática. O aumento da acessibilidade se traduz em um aumento na área superficial. Rollin et al. (2011), compararam pré-tratamentos e demonstram que no pré-

tratamento que se obtém uma alta acessibilidade, a remoção de lignina é um fator muito menos importante para uma efetiva liberação de açúcar dos substratos lignocelulósicos. Arantes e Saddler (2011) sugerem também que a etapa limitante durante a hidrólise não é a clivagem catalítica das cadeias de celulose “*per se*”, senão a limitada acessibilidade das enzimas às cadeias de celulose dentro da matriz do substrato.

Os pré-tratamentos necessitam ser selecionados para cada biomassa devido às variações na estrutura e recalcitrância de cada material. A maioria das tecnologias experimentais de pré-tratamento requer o desenvolvimento comercial de equipamentos para operar em larga escala (ZHU et al., 2009). Por outro lado, muitos dos equipamentos utilizados pela indústria madeireira para a fabricação de celulose podem ser adaptados para o tratamento de outros materiais lignocelulósicos, facilitando o desenvolvimento e aplicação de pesquisas para obter etanol lignocelulósico, e oferecendo a possibilidade de aplicação em larga escala. Entre eles, o processo químio-termomecânico de polpação pode vir a ser utilizado no pré-tratamento de bagaço de cana. Neste processo, o refinador de disco desintegra os feixes de fibras o que aumenta a área superficial do material. O uso de sulfito em meio ácido ou alcalino enfraquece a matriz lignocelulósica, promove a quebra das ligações beta-O-aril e solubiliza parte da lignina.

O conteúdo de espécies sulfúricas no processo sulfito está representado por íons dióxido de enxofre (SO_2^-), íons hidrogenossulfito ou bissulfito (HSO_3^-) e íons sulfito (SO_3^{2-}), em proporções dependendo do pH do licor de cozimento (ALÉN, 2000). Pelo equilíbrio químico, em condições ácidas ($\text{pH} \leq 4$), observa-se maior concentração de HSO_3^- , enquanto que em pH neutro e alcalino ($\text{pH} > 4$), há maior predominância de íons SO_3^{2-} (GELLERSTEDT, 2009).

O pré-tratamento quimiomecânico de cavacos de madeira com sulfito ácido e subsequente sacarificação enzimática foi intensamente reportado (WANG et al., 2009; ZHU, et al., 2009; ZHU et al., 2010). As amostras foram impregnadas com uma solução 4% de bissulfito de sódio a 180 °C por 30 minutos, seguida de uma etapa de refino em refinador de discos. Os autores nomearam o processo de SPORL (Sulfite Pretreatment to Overcome Recalcitrance of Lignocellulose), porque com este material pré-tratado foi obtida uma alta conversão enzimática (90%) de celulose a glicose após 10 horas de hidrólise. A diminuição da recalcitrância do material foi alcançada em razão da combinação de efeitos: parcial dissolução da hemicelulose, despolimerização da celulose, parcial deslignificação, parcial sulfonação da lignina e aumento da área superficial através da fibrilação (ZHU et al., 2009).

Comparado com o processo ácido, o pré-tratamento sulfito alcalino causa menor degradação dos açúcares e gera uma polpa rica em hemicelulose devido à dissolução principalmente da lignina. Embora os polissacarídeos sejam relativamente resistentes na presença de íons hidróxido, parte da perda de rendimento do pré-tratamento alcalino está relacionada à perda de hemicelulose, justamente porque este componente está mais exposto na estrutura da biomassa e não é cristalina (FENGEL; WEGENER, 1989).

Em meio básico as principais reações com a lignina ocorrem inicialmente devido à desprotonação do grupo OH fenólico, cuja estrutura está disponível em pequenas quantidades na macromolécula de lignina. A desprotonação do OH fenólico resulta na formação de metileno quinona, pela clivagem do carbono alfa da lignina (FENGEL; WEGENER, 1989). Nesse sentido, com a quebra das estruturas aril-éter, observa-se a fragmentação da macromolécula de lignina em compostos solúveis no meio reacional.

2.3 Propriedades do substrato que afetam a hidrólise enzimática

As características do substrato aliadas à maior eficiência de taxa de hidrólise da celulose incluem: a acessibilidade, o grau de cristalinização, o grau de polimerização e a distribuição da lignina e hemicelulose. Na produção de etanol celulósico, a lignina dificulta o acesso de enzimas hidrolíticas aos carboidratos fermentáveis, acarretando perdas no processo e aumento no custo de produção, uma vez que a enzima é consumida no decorrer do processo. Também há estudos mostrando que o ácido fórmico e as unidades precursoras de lignina inibem celulasas (CANTARELLA et al., 2004). Além disso, a hidrofobicidade da lignina pode promover a adsorção das celulasas (JORGENSEN; OLSSON, 2006; LU et al., 2002; BERLIN et al., 2005). Nesta revisão será detalhado o tópico sobre acessibilidade da celulase, através de determinação da área superficial.

2.3.1 Área superficial

A área superficial específica de celulose em substrato pré-tratado pode ser determinada pela técnica de Coloração de Simons (CS). Esta técnica tem sido reportada como sendo rápida e boa para estimar a efetividade da hidrólise enzimática em substratos lignocelulósicos pré-tratados (CHANDRA et al., 2008; 2012; WANG; HE; ZHU, 2012).

A técnica de Simons foi desenvolvida em 1950 para examinar a estrutura física de fibras de polpa ao microscópio e para avaliar o dano mecânico em fibras de polpas durante o refino (YU; MINOR; ATALLA, 1998). Chandra et al. (2008) reportaram que a coloração de Simons também pode ser usada para estimar a porosidade total de um conjunto de diferentes substratos, podendo ser usado como um indicador eficaz para a susceptibilidade enzimática.

A coloração de Simons é baseada na adsorção competitiva de dois corantes em ambiente aquoso: Direct Orange 15 (DO, uma mistura de moléculas grandes e pequenas com forte afinidade pela celulose) e Direct Blue 1 (DB, moléculas com massa molar pequena em torno de 900 Da, com baixa afinidade pela celulose), sendo uma técnica semi-quantitativa.

Na figura 4 estão apresentadas as estruturas químicas dos corantes. Esses corantes são moléculas longas e planares que se fixam à celulose via ligações de hidrogênio entre os grupos polares dos corantes e os grupos hidroxila da celulose (SHORE, 1991). Se a parede da fibra for acessível, o corante de cor laranja irá penetrar nos poros e deslocar o corante azul, por causa da sua maior afinidade com os grupos hidroxilas da celulose. Então, a proporção de corante laranja e azul adsorvida pelo substrato pode ser um indicador da distribuição de poros maiores e menores no substrato poroso (CHANDRA et al., 2008; ESTEGHLALIAN et al., 2001).

Devido a composição heterogênea em tamanho do corante laranja (DO), é necessário purificá-lo e usar só a fração com massa superior a 100 kDa, para não interferir com a adsorção do corante azul (CHANDRA et al., 2008; ESTEGHLALIAN et al., 2001; YU; MINOR; ATALLA, 1998). Portanto, quando uma mistura de ambos corantes é aplicada a amostras de celulose, pode gerar informações úteis sobre a área superficial total interna e externa acessível de um substrato poroso. As moléculas do corante azul se adsorvem nos poros menores da fibra, enquanto que as do corante laranja se adsorvem nos poros maiores e na superfície.

Estimativas da distribuição de volume de poro de celulose microcristalina em pó e de polpas utilizando medições CS são diretamente proporcionais à medição da área superficial específica usando a adsorção de nitrogênio e de saturação das fibras por técnicas de exclusão de soluto. A vantagem do método CS em comparação com a técnica de porosimetria de mercúrio é que, semelhante à técnica de exclusão por soluto, o método CS estima distribuição do poro de um substrato hidratado o que é especialmente

importante no caso de materiais lignocelulósicos que sofrem significativas mudanças na estrutura pela secagem (CHANDRA et al., 2008).

Figura 4: Estrutura química dos corantes Direct Blue (A) e Direct Orange (B) usados na Coloração de Simons (YU; MINOR; ATALLA, 1995).

Corantes aniônicos como DO e DB possuem uma grande afinidade pela celulose, não obstante corantes catiônicos e ftalocianinas catiônicas tem uma grande afinidade pela lignina e hemicelulose respectivamente (DRNOVSEKA; PERDIH, 2005). Chandra e Saddler (2012) reportam que quando foram feitos experimentos de adsorção com lignina isolada de pré-tratamento organosolve, houve uma maior adsorção dos corantes se comparado à lignina obtida de pré-tratamento com explosão vapor. Isto é explicado porque a lignina isolada da fração correspondente ao licor do pré-tratamento organosolve possui uma grande quantidade de ligações β -O-4 e α -O-4 originadas durante a reação de pré-tratamento que facilitam a solubilização da lignina no solvente etanol. Consequentemente,

a lignina fragmentada produto do pré-tratamento, resultará em um incremento no número de grupos fenólicos que poderiam mediar ligações hidrogênio com o corante DO.

O alto teor de lignina do pré-tratamento por explosão ao vapor limita a acessibilidade da celulose às celulasas (KUMAR et al., 2010). Neste sentido, experimentos de adsorção usando CS realizados por Chandra e Saddler (2012), com material pré-tratado por explosão vapor e organosolve, mostraram uma correlação entre a hidrólise enzimática e a CS. A madeira de conífera pré-tratada por explosão a vapor adsorveu 22 mg/g do corante DO comparado com 60 mg/g do corante DO adsorvido na madeira de conífera pré-tratada com organosolve. Quando foram feitos experimentos similares com polpa Kraft com teor de lignina similar ao organosolv e maior teor de hemicelulose foram obtidos rendimentos de 40% e 66%, respectivamente. Este resultado sugere que o alto teor de hemicelulose da polpa Kraft limita a hidrólise enzimática e a adsorção do corante DO (organosolve: 60 mg/g; Kraft: 50 mg/g).

A adsorção dos corantes na celulose segue a isoterma de Langmuir, portanto pode ser usada em combinação com o coeficiente de extinção de cada corante para estimar a área superficial total da celulose usando a Lei de Lambert-Beer para misturas. Isto representa uma vantagem sobre o método de exclusão de solutos, já que a técnica de exclusão de solutos não mede superfície de substrato senão o conteúdo em poros. Assim uma fração de área superficial onde podem atuar as enzimas não é considerada (CHANDRA et al., 2008).

2.4 Celulasas e Hemicelulasas

2.4.1 Celulasas

As celulasas constituem um complexo sistema de três grupos de enzimas que agem em sinergia para hidrolisar a celulose (KESHWANI; CHENG, 2009). Os três tipos principais de enzimas que fazem parte do complexo celulolítico são as endo-1,4- β -glucanases (EC 3.2.1.4), as exo-1,4- β -glucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e as 1,4- β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (WRIGHT; WYMAN; GROHMANN, 1988). As endoglucanases clivam a cadeia de celulose em regiões amorfas, diminuindo seu grau de polimerização e criando então novas extremidades de cadeia. Exoglucanases agem em sequência em tais extremidades, ou seja, são capazes de se ligar aos domínios cristalinos e

liberar celobiose ou glicoses das extremidades. A recente descoberta de mono-oxigenases líticas (GH61) contribui para a hidrólise com a clivagem oxidativa da celulose (QUINLAN et al., 2011). A hidrólise completa da celulose ocorre, então, pela ação das β -glicosidases, as quais hidrolisam a celobiose e outras celodextrinas solúveis em glicose (DRISSEN et al., 2007).

A β -glicosidase é requerida já que hidrolisa a celobiose, principal produto resultante da hidrólise da celulose e que inibe as celulases (WYMAN et al., 2011).

Figura 5: Estrutura da celulose e enzimas hidrolíticas necessárias para a degradação da celulose (MAGALHAES; MILAGRES, 2008).

2.4.2. Hemicelulases

As enzimas que hidrolisam a hemicelulose podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal e enzimas que degradam as cadeias laterais (ERIKSSON;

BLANCHETTE; ANDER, 1990; KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997). Devido à complexa estrutura das hemiceluloses, diferentes tipos de enzimas são requeridos para sua modificação e degradação enzimática. Um sistema enzimático incluindo endo e exo-xilanases, mananases, β -xilosidase, α -glucuronidase e α -arabinofuranosidase torna-se necessário para a hidrólise completa desses oligossacarídeos (BIELY, 1985) (Figura 6).

A enzima principal para a despolimerização da xilana é a endo-1-4- β -xilanase (EC 3.2.1.8). Sua ação ocorre na cadeia principal da xilana, gerando xilo-oligossacarídeos menores substituídos ou não substituídos que serão clivados pela exo-1-4- β -xilanase (BIELY, 1985).

Figura 6: Representação da estrutura da xilana e pontos onde as enzimas atuam (SHALLOM; SHOHAM, 2003).

Baseados na similaridade da sequência de aminoácidos, xilanases tem sido classificadas em duas grandes famílias: a família 10 e a família 11 de glicosídeo hidrolases. Xilanases destas duas famílias diferem em suas propriedades físico-químicas (massa molar, ponto isoeletrico) e estrutura tridimensional, assim como em sua ação sobre os polissacarídeos e xilo-oligossacarídeos (ZHANG et al., 2011).

2.4.2 Xilanases das famílias 10 e 11

Tem sido reportado que a adição de xilanases melhora significativamente o desempenho das celulasas na hidrólise de materiais lignocelulósicos (BERLIN et al., 2005; KUMAR; WYMAN, 2009a). Os resultados reportados pelos pesquisadores indicam que a solubilização da xilana em materiais lignocelulósicos pela adição de xilanases, tem um papel importante na eficiência da hidrólise enzimática, incrementando a liberação de glicose de forma linear com a liberação de xilose (KUMAR; WYMAN, 2009).

A literatura usa a terminologia “enzimas acessórias” para se referir as enzimas com as quais são suplementadas as celulasas. Uma das enzimas acessórias mais usadas nas pesquisas de degradação de materiais lignocelulósicos são as endo- β -1,4-xilanases, mas existem diferentes famílias de endo- β -1,4-xilanases com diferentes especificidades. Nos estudos propostos neste trabalho foram usadas endo- β -1,4-xilanases da família 10 e 11. Xilanases da família 11 tem um grande sítio ativo e preferem clivar cadeias principais sem substituintes, enquanto que as xilanases da família 10 tem um sítio ativo menor e são capazes de clivar cadeias principais perto de substituintes (VARDAKOU et al., 2004). Deste modo a família 10 de xilanases geralmente não requer remoção dos substituintes para agir. Algumas endo- β -1,4-Xilanases são encontradas na família 8, mas ainda não são bem caracterizadas.

O comportamento e a interação das hemicelulasas sobre substratos complexos, onde a xilana interage com a lignina ainda requer pesquisa mais aprofundada (VAN DYK; PLETSCHE, 2012), sendo claro que muitas interações acontecem entre enzimas em substratos complexos. No entanto, é reportado que as xilanases da família 10 e 11 agem em sinergia e a presença simultânea das duas famílias melhora a porcentagem de conversão de celulose em glicose (BANERJEE et al., 2010a; GAO et al., 2011).

Algumas xilanases da família 10 hidrolisam xilana e celulose, embora a atividade em xilana seja o dobro. A clivagem da glucuronoxilana ocorre adjacente à xilose ramificada e requer duas unidades não substituídas. Os produtos da hidrólise são xilobiose e xilotriose substituída na extremidade não redutora (KOLENOVÁ; VRSANSKÁ; BIELY, 2006)

2.3.2 β -Xilosidase

A enzima β -xilosidase cliva xilo-oligossacarídeos liberados pela ação das endo-xilanases nas xilanas. Qing e Wyman (2010) demonstraram que xilo-oligossacarídeos são inibidores competitivos das celulasas, mas não de β -glucosidases. Neste estudo, xilana e outros xilo-oligômeros foram adicionados a avicel durante a hidrólise enzimática com celulasas e encontraram um maior efeito inibitório se mesmas quantidades de xilose tivessem sido adicionadas, sendo maior a inibição causada pelos xilo-oligossacarídeos de maior grau de polimerização (DP). Em baixas concentrações (1,67 mg/ml), os xilo-oligossacarídeos reduziram a velocidade inicial de hidrólise e também o rendimento final de glicose. Em concentrações mais altas (12,5 mg/ml) as taxas iniciais de hidrólise de avicel foram 82% menores e o rendimento final diminuiu em 38%. Qing e Wyman (2011a, 2011b) mostraram que 10-30% de oligômeros com DP maior que 30 não foram hidrolisados por celulasas e xilanases e cerca de 5% de oligossacarídeos com DP menor que 30 (principalmente xilobiose) também foram resistentes à hidrólise, provavelmente pela baixa atividade de β -xilosidase dos extratos. Deste modo a suplementação de xilanases com β -xilosidase é sugerida para evitar a inibição por xilo-oligossacarídeos.

Evidentemente, a adição de xilanases e outras enzimas acessórias à hidrólise de xilana têm uma importância fundamental na hidrólise de materiais lignocelulósicos pré-tratados por processo alcalino, considerando que este tipo de pré-tratamento conserva parte da fração hemicelulósica (VAN DYK; PLETSCHE, 2012). Esta fração pode ser hidrolisada pela ação das enzimas acessórias deixando mais superfície disponível para a hidrólise da celulose.

2.5 Hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos

O custo das enzimas permanece como um dos maiores obstáculos para a viabilidade da indústria do etanol a partir de materiais lignocelulósicos (ARANTES; SADDLER, 2011; FALLS et al. 2011). A rápida e completa hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica com uma baixa carga de enzimas pode diminuir tais custos e possibilitar a comercialização do etanol (ARANTES; SADDLER, 2011).

A melhora do processo enzimático pode ser abordada de distintas maneiras, através da modificação da estrutura ou composição do substrato e aumento da acessibilidade,

melhora no rendimento das enzimas ou diminuição da inibição das celulasas (SUN; CHENG, 2002; SHI et al., 2011).

Vários autores têm estudado a melhora do processo enzimático por meio da adição de mistura de enzimas (BANERJEE et al., 2010a; LEVINE et al., 2011; VÁRNAI et al., 2011); outros tipos de proteínas como albumina de soro bovino (YANG; WYMAN, 2006; ZHU 2009) e proteína GH61 (ARANTES; SADDLER, 2010; CHUNDAWAT et al., 2011; HU; ARANTES; SADDLER, 2011; LANGSTON et al. 2011); surfactantes e outros agentes químicos, como polímeros (SIPOS et al., 2010). A adição de mistura de enzimas tem uma série de vantagens comparativas; sendo uma das mais importantes, desenhar uma mistura especial de acordo com a composição do substrato a hidrolisar, reduzindo a quantidade de enzima e baixando o custo da hidrólise.

Outra possibilidade de reduzir o custo da etapa de hidrólise enzimática é melhorando suas atividades específicas, incrementando a liberação de açúcares fermentáveis por unidade de proteína, fenômeno que também é possível utilizando misturas de enzimas (BANERJEE et al., 2010a).

O preparo de coquetéis de enzimas poderia permitir um controle completo sobre cada componente individual do substrato a hidrolisar e sua proporção relativa (BANERJEE et al., 2010a). As hemicelulasas têm um papel fundamental, já que a remoção da fração hemicelulósica pode melhorar a acessibilidade à celulose (KUMAR; WYMAN, 2009; ZHANG et al., 2011). Assim, é de interesse pesquisar o efeito de xilanases com diferentes características físico-químicas e cinéticas, separadamente e juntas em misturas com celulasas sobre o bagaço de cana, tendo em conta que as enzimas comerciais que hidrolisam celulose têm ação limitada na hemicelulase (HU; ARANTES; SADDLER, 2011; QINQ; WYMAN, 2011a); assim também é de interesse pesquisar o efeito da mistura de celulasas e xilanases suplementadas com β -glicosidase e β -xilosidase comerciais purificadas, já que tem sido descrito que os preparados comerciais são deficientes nestas enzimas (VAN DYK; PLETSCHE, 2012).

Arantes e Saddler (2011) mostraram que o acesso limitado às cadeias de celulose é um fator chave à sua hidrólise. Como se mencionou anteriormente tem sido proposto que a hemicelulose atua como uma barreira física que limita a acessibilidade das celulasas à celulose (HU; ARANTES; SADDLER, 2011; SELIG et al., 2008; VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIKARI, 2010) e altas quantidades de enzima são necessárias para se obter uma hidrólise efetiva da celulose (ARANTES; SADDLER, 2011). No entanto, quando as hemicelulasas são adicionadas inicialmente com as celulasas em baixas quantidades, observou-se um

efeito sinérgico (HU; ARANTES; SADDLER, 2011). Assim por exemplo, a hidrólise da celulose microcristalina (Avicel) foi aumentada em 13.9% por suplementação da preparação de enzimas, atribuído à presença de traços de xilana (VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIKARI, 2010).

Empresas que comercializam enzimas têm trabalhado intensamente na melhora da eficácia e custo das enzimas para a produção de biocombustíveis (BANERJEE; SCOTT-CRAIG; WALTON, 2010b). Os mesmos autores indicam que algumas destas misturas podem conter até 80 proteínas diferentes (Spezyme), cuja composição exata não é conhecida. Neste contexto, devido às necessidades de obter enzimas apropriadas para hidrolisar os resíduos lignocelulósicos gerados especialmente do processamento do milho, as empresas têm focado seus estudos no desenvolvimento de enzimas com maior especificidade para substratos que foram pré-tratados por processo ácido (BANERJEE; SCOTT-CRAIG; WALTON, 2010b). Diante disso, estas misturas comerciais não são otimizadas para outro tipo de biomassa e outro tipo de pré-tratamento, sendo necessária adição de outras enzimas para atingir combinações ótimas. Qing e Wyman (2011a) indicam que uma das maiores desvantagens das misturas comerciais é a carência da atividade xilanolítica. Outra justificativa do uso das hemicelulases são os resultados obtidos por Shen et al. (2011) que indicam que as hemicelulases podem ter a função de expandir as fibras de celulose ou evitar que as celulases sejam adsorvidas pela lignina e com isso facilitar a conversão de açúcares à glicose.

A fase inicial da sacarificação enzimática de celulose vem sendo objeto de estudos mais profundos, sendo descritas teorias relacionadas aos processos de amorfogênese (ARANTES; SADDLER 2010). Nesta fase inicial ocorre uma série de modificações na estrutura do substrato não envolvendo necessariamente hidrólise. Tem sido sugerido que o rompimento das regiões altamente ordenadas e empacotadas da estrutura da celulose aumentaria a exposição das cadeias inacessíveis de celulose, aumentando o acesso das enzimas, com consequência na velocidade do ataque hidrolítico das celulases. Neste contexto, algumas proteínas têm um papel ativo na solubilização da celulose, expandindo e rompendo a estrutura da celulose via liberação não-hidrolítica das cadeias individuais de celulose anteriormente inacessível para as enzimas. Embora o mecanismo de atuação destas proteínas na celulose permaneça não resolvido, a observação é que muitos destes agentes de expansão contêm uma superfície de união a carboidratos que poderia ter um papel muito importante nesta atividade amorfogênica não-hidrolítica (ARANTES; SADDLER, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a aplicação de uma mistura de enzimas comerciais no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino visando melhorar a hidrólise dos polissacarídeos.

3.2 Objetivos específicos:

- Determinar o grau máximo de hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose da polpa sulfito de bagaço com alto e baixo teor de lignina
- Avaliar a carga de proteínas na hidrólise enzimática de celulose e hemicelulose
- Determinar o efeito da adição de xilanases da família 10 e 11, β -xilosidase e β -glucosidase na mistura de enzimas comerciais (Celluclast) na hidrólise dos polissacarídeos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Enzimas.

Celulases comerciais: Celluclast (EC 3.2.1.4; Sigma-C2730); Novozym 188 (E.C. 3.2.1.21; Sigma-C6105). β -glicosidase (EC 3.2.1.21; Megazyme E-BXSR).

Xilanases: Endo-1,4-b-D-xilanase (Xyn10A – EC 3.2.1.8; Megazyme (E-XYLATM)); endo-1,4-b-D-xilanase (Xyn11A – EC 3.2.1.8; Megazyme (E-XYLNP)); β -xilosidase (exo-1,4-B-D-xylosidase – EC 3.2.1.37; Megazyme (E-BXSEBP)).

Para as xilanases, é reportado pelo fornecedor que quando foram feitas análises de SDS-PAGE para cada uma das enzimas, só foi detectada uma banda no gel. A β -glicosidase, por sua vez está estabilizada com BSA. Na tabela 1 estão apresentadas as características físico-químicas das enzimas purificadas.

Tabela 1: Características das enzimas purificadas comerciais usadas no presente trabalho

Enzima	Micro-organismo	Ponto Isoelétrico	Massa molar (kD)	Concentração Proteína (mg/ml)
Xilanase 11 (Xyn 11A)	<i>Neocallimastix patriciarum</i>	6,5	25,8	9,14
Xilanase 10 (Xyn 10A)	<i>Thermotoga maritima</i>	5,9	41,7	32,61
β -Xilosidase	<i>Selelomonas ruminantium</i>	5,4	61,9	4,23
β -Glicosidase	<i>Aspergillus niger</i>	4,0	121	0,77

4.2 Bagaço de cana-de-açúcar e pré-tratamentos do bagaço

O bagaço foi fornecido pela usina Vale do Rosário - Morro Agudo/SP. Seiscentos gramas de bagaço foram colocados em um reator de aço inox para retirada de ar, com uma bomba de vácuo acionada por 30 min. Ao bagaço foi adicionado uma solução sulfito alcalino, preparada com 5% (m/m) de NaOH e 10% (m/m) de Na₂SO₃ (m/m), numa razão sólido/líquido de 1:10 (p/v). Foi feito novamente no reator vácuo por 15 min, antes de

transferi-lo para dentro de uma autoclave. O pré-tratamento foi conduzido a 121 °C por 120 min.

Depois da etapa de cozimento, o bagaço foi lavado e centrifugado até uma consistência de 30% (p/p). A água coletada durante a centrifugação foi usada para diluir o bagaço pré-tratado para um volume de 25 L (2% de consistência) para ser refinado no refinador de discos Regmed MD-300 com um espaço de disco de 0,1 mm e um consumo de energia de 250 W.

O mesmo procedimento de pré-tratamento foi repetido, porém reduzindo a concentração de reagentes químicos pela metade (2,5% de NaOH e 5% de sulfito de sódio). Todos os bagaços foram deixados com uma umidade final de aproximadamente um 80% e guardados no freezer a -80 graus.

4.3 Hidrólises enzimáticas

4.3.1 Sacarificação da celulose e hemicelulose

A hidrólise enzimática dos substratos foi realizada a uma consistência 2% (p/v). As reações foram conduzidas em tubos de plástico tipo Falcon de 50 mL a 45 °C com agitação horizontal de 120 rpm em shaker. Os bagaços foram hidrolisados com 5 FPU/g de bagaço de celulase e 10 UI de β -glicosidase/g de bagaço e as enzimas empregadas foram Celluclast e Novozym 188, usando um tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 com azida 0,01% (m/v). Amostras foram retiradas no tempo de 2, 4, 6, 8, 24 e 48 h e em seguida fervidas por 5 min. Após o resfriamento, os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos e os carboidratos glicose, celobiose e xilose presentes nos sobrenadantes foram analisados por HPLC (WATERS) eluindo com 0,005 mol/L de ácido sulfúrico a um fluxo de 0,6 mL/min, usando detector de índice de refração a 35°C (WATERS 2414) e uma coluna Bio Rad HPX87H a 45 °C (Ferraz et al., 2000). A conversão enzimática da celulose (CEC) foi estimada utilizando-se a massa de glicose obtida após a hidrólise dividida pela massa de glucana presente no bagaço, de acordo com a Equação 1. A hidrólise enzimática de hemicelulose (CEH) foi acompanhada pela análise de xilose e a conversão de hemicelulose calculada de acordo com a equação 2.

$$CEC (\%) = \left(\frac{\text{Glicose}}{\text{Glicose potencial}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

$$\text{CEH (\%)} = \left(\frac{\text{Xilose}}{\text{Xilose potencial}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

As massas de glicose e xilose foram devidamente corrigidas pelos respectivos fatores de hidrólise que correspondem a 0,9 e 0,88, respectivamente. As condições descritas nesta seção foram utilizadas em todas as hidrólises enzimáticas realizadas neste trabalho.

4.3.2 Hidrólise do bagaço com diferentes concentrações do preparado enzimático

Foi realizada a hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado nas duas condições de pré-tratamento (alta e baixa carga de reagentes) utilizando 5, 10 ou 40 FPU de Celluclast e 10, 20 ou 80 UI de Novozyme 188 na proporção de 1:2.

4.3.3 Avaliação da adição das enzimas acessórias ao preparado comercial Celluclast

Os experimentos foram realizados segundo planejamento fatorial completo 2^4 com seis pontos centrais, nos quais as variáveis: xilanases 10, xilanase 11, β -xilosidase ou β -glicosidase (enzimas comerciais purificadas) foram estudadas em dois níveis conforme tabela 2. Essas enzimas foram adicionadas ao preparado da celulase comercial celluclast (5 FPU por grama de bagaço), e o cálculo para adição de cada enzima foi baseado nos valores de atividade de cada enzima na mistura referência, a partir dos dados de Mendes et al., (2011). As atividades de xilanases foram escolhidas levando em consideração a disponibilidade destas enzimas, de modo de incrementar as atividades de xilanases totais em 15% no nível mínimo e em 50% no máximo, referidos nas quantidades de xilanases totais presentes na mistura de 5 FPU de celluclast e 10 UI de novozym 188 por grama de bagaço (mistura de referência). Para o cálculo final foi considerada a atividade que já se encontrava presente no extrato celluclast, sendo esta observação válida para todas as enzimas acessórias testadas.

A suplementação do extrato celluclast com β -xilosidase aumentou em 95% sua atividade em relação à mistura referência no nível mínimo especificado pelo planejamento experimental (Tabela 2) e em 250% no nível máximo. As atividades de β -glicosidase na

mistura de enzimas foram menores que na mistura referência. No nível mínimo estabelecido no planejamento a β -glicosidase foi adicionada 60% abaixo do encontrado na mistura referência e no nível máximo foram 20% menor que na referência.

Tabela 2: Planejamento fatorial completo 2^4 para avaliação da eficiência de uma mistura de enzimas na hidrólise do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino.

Experimento	Variáveis							
	Níveis reais				Níveis codificados			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1	5	5	2,5	2,5	-1	-1	-1	-1
2	15	5	2,5	2,5	1	-1	-1	-1
3	5	15	2,5	2,5	-1	1	-1	-1
4	15	15	2,5	2,5	1	1	-1	-1
5	5	5	7,5	2,5	-1	-1	1	-1
6	15	5	7,5	2,5	1	-1	1	-1
7	5	15	7,5	2,5	-1	1	1	-1
8	15	15	7,5	2,5	1	1	1	-1
9	5	5	2,5	7,5	-1	-1	-1	1
10	15	5	2,5	7,5	1	-1	-1	1
11	5	15	2,5	7,5	-1	1	-1	1
12	15	15	2,5	7,5	1	1	-1	1
13	5	5	7,5	7,5	-1	-1	1	1
14	15	5	7,5	7,5	1	-1	1	1
15	5	15	7,5	7,5	-1	1	1	1
16	15	15	7,5	7,5	1	1	1	1
17	10	10	5	5	0	0	0	0
18	10	10	5	5	0	0	0	0
19	10	10	5	5	0	0	0	0
20	10	10	5	5	0	0	0	0
21	10	10	5	5	0	0	0	0
22	10	10	5	5	0	0	0	0

A- xilanase 10; B- xilanase 11; C- β - xilosidase; D- β - glicosidase. Os valores reais correspondem a UI por grama de bagaço.

Outros experimentos foram feitos no intuito de ampliar o planejamento experimental em estrela e obter mais informações a respeito da significância estatística da mistura das enzimas, segundo os níveis fornecidos pelo programa estatístico antes mencionado (Tabela 3).

Tabela 3: Planejamento fatorial completo 2^4 ampliado em estrela para avaliação da eficiência de uma mistura de enzimas na hidrólise do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino.

Experimento	Variáveis							
	Níveis reais				Níveis codificados			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1	5	5	2,5	2,5	-1	-1	-1	-1
2	15	5	2,5	2,5	1	-1	-1	-1
3	5	15	2,5	2,5	-1	1	-1	-1
4	15	15	2,5	2,5	1	1	-1	-1
5	5	5	7,5	2,5	-1	-1	1	-1
6	15	5	7,5	2,5	1	-1	1	-1
7	5	15	7,5	2,5	-1	1	1	-1
8	15	15	7,5	2,5	1	1	1	-1
9	5	5	2,5	7,5	-1	-1	-1	1
10	15	5	2,5	7,5	1	-1	-1	1
11	5	15	2,5	7,5	-1	1	-1	1
12	15	15	2,5	7,5	1	1	-1	1
13	5	5	7,5	7,5	-1	-1	1	1
14	15	5	7,5	7,5	1	-1	1	1
15	5	15	7,5	7,5	-1	1	1	1
16	15	15	7,5	7,5	1	1	1	1
17	10	10	5	5	0	0	0	0
18	10	10	5	5	0	0	0	0
19	10	10	5	5	0	0	0	0
20	10	10	5	5	0	0	0	0
21	10	10	5	5	0	0	0	0
22	10	10	5	5	0	0	0	0
23	0	10	5	5	-2	0	0	0
24	20	10	5	5	2	0	0	0
25	10	0	5	5	0	-2	0	0
26	10	20	5	5	0	2	0	0
27	10	10	0	5	0	0	-2	0
28	10	10	10	5	0	0	2	0
29	10	10	5	0	0	0	0	-2
30	10	10	5	10	0	0	0	2

A- xilanase 10; B- xilanase 11; C- β - xilosidase; D- β - glicosidase. Os valores reais correspondem a UI por grama de bagaço.

Os novos níveis mínimos testados para todas as enzimas foram sem adição de enzimas, e comparados com a mistura de referência as atividades foram 0%, -2% e -80% para as xilanases totais, β -xilosidase e β -glicosidase, respectivamente. Os níveis máximos foram os seguintes: xilanases totais 67%; β -xilosidase 337% e β -glicosidase 0%, comparados a mistura controle.

A resposta observada foi a conversão enzimática de celulose e hemicelulose dos bagaços pré-tratados. A análise dos resultados obtidos e a otimização da melhor condição de hidrólise foram realizadas com os dados de % de hidrólises da celulose através do emprego da metodologia estatística de superfície de resposta, utilizando os programas Design Expert 8® e Statística® versão 8.0.

4.3.4 Ensaio de inativação de xilanases e efeito da carga de proteínas na hidrólise enzimática.

O bagaço pré-tratado com alta carga de reagentes (baixa lignina) foi hidrolisado com 5 FPU de Celluclast, β -glicosidase e xilanases como enzimas acessórias. Um preparado continha 20 UI da xilanase 10, 10 UI da xilanase 11 e 5 UI de β -glicosidase, perfazendo um total de 1,11 mg de proteínas. O outro preparado enzimático continha 10 UI da xilanase 10, 20 UI da xilanase 11 e 5 UI de β -glicosidase, com um conteúdo total de proteínas de 0,93 mg. Foram conduzidos ensaios de hidrólise com celluclast e β -glicosidase com as enzimas acessórias ativas ou inativadas pelo calor para determinar a influência da concentração de proteínas na hidrólise da celulose.

4.4. Métodos Analíticos

4.4.1 Caracterização do bagaço pré-tratado

4.4.1.1 Determinação da composição química

Três gramas (3 g) de bagaço moído (25 mesh) foram extraídos com 95% de etanol por 6 h, em um aparelho Soxhlet. A amostra extraída foi hidrolisada com 72% de ácido sulfúrico a 30 ° C por 1 h (300 mg de amostra e 3 mL de ácido sulfúrico). À solução foram

adicionados 79 mL de água destilada para reduzir a concentração final do ácido para 3%. A mistura foi autoclavada por 1 h a 121 °C. O material resultante foi resfriado, filtrado em filtro de vidro poroso (número 3) e secado até massa constante, a 105 °C. A lignina insolúvel foi determinada por gravimetria e a solúvel por espectrofotometria a 205 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar da lignina de 105 L/g.cm. As concentrações de açúcares monoméricos na fração solúvel foram determinadas por HPLC (WATERS) para avaliar os teores de glicose, e xilose eluindo com 0,005 mol/L de ácido sulfúrico a um fluxo de 0,6 mL/min, usando detector de índice de refração a 35°C (WATERS 2414) e uma coluna Bio Rad HPX87H a 45 °C (FERRAZ et al., 2000). Foi feito o cálculo para correção da composição química do bagaço através da multiplicação do rendimento do processo com a composição química do material.

4.4.1.2 Determinação da área superficial da celulose

A coloração de Simons (CS) foi feita segundo o procedimento modificado por Chandra et al. (2008), para avaliar a área superficial nos bagaços pré-tratados com alta e baixa carga de álcali e sulfito. O corante Pontamine fast orange 6RN (direct orange; DO) e Pontamine fast sky blue 6BX (direct blue; DB) foram usados para determinação da absorção dos corantes, que possuem diferentes massas moleculares.

O corante DO foi fracionado por permeação em gel, a partir de uma solução ao 1 % p/v do corante DO, em uma coluna de exclusão por tamanho (Sephacryl S-100 - GE Healthcare, Life Sciences, USA). Deste modo, na fase de purificação do corante foi coletada a fração correspondente ao volume morto (determinado com Blue Dextran, massa molecular 2000 kD Sigma-Aldrich, USA), que contém as moléculas de corante com tamanho maior que 100 kD. A concentração do corante foi determinada por secagem de 1 mL de solução a 100 °C, seguida da medição da massa seca.

Para medir a quantidade de corante adsorvida na fibra, 100 mg de amostra foram pesados e colocados em um tubo de centrifuga de 50 mL. A amostra foi deixada por 12 h em tampão PBS (phosphate- buffered saline solution) pH 6, 0.3M PO₄, 1.4 mM NaCl. Foi adicionado 1 mL de PBS, 1 mL da solução DO (10 mg/mL) e 1 mL da solução DB (10 mg/mL), para criar uma mistura dos corantes 1:1. Finalmente se adicionou água destilada para obter um volume final de 10 mL. Os tubos foram incubados a 75 °C por 6 horas a 200 rpm. Depois do período de incubação, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos e foi feita a retirada das amostras do sobrenadante para medição da absorbância a

624 e 455 nm em espectrofotômetro. A quantidade de corante adsorvido pelas fibras foi determinada fazendo a diferença entre a concentração inicial dos corantes e a medida de absorbância no sobrenadante. Com esta técnica é possível fazer uma relação quantitativa do corante adsorvido e a área superficial usando a Equação 3. As amostras utilizadas neste ensaio foram: bagaço de cana pré-tratado com alta e baixa carga de sulfito e álcali e celulose Avicel pH 101 (SIGMA).

$$\begin{aligned} A_{\lambda 1} &= (\varepsilon_{DO})_{\lambda 1} * b * C_{DO} + (\varepsilon_{DB})_{\lambda 1} * b * C_{DB} \\ A_{\lambda 2} &= (\varepsilon_{DO})_{\lambda 2} * b * C_{DO} + (\varepsilon_{DB})_{\lambda 2} * b * C_{DB} \end{aligned} \quad \text{Eq. 3}$$

Resolvendo,

$$C_{DO} = \frac{(\varepsilon_{DB})_{\lambda 2} * A_{\lambda 1} - (\varepsilon_{DB})_{\lambda 1} * A_{\lambda 2}}{(\varepsilon_{DO})_{\lambda 1} * (\varepsilon_{DB})_{\lambda 2} - (\varepsilon_{DB})_{\lambda 1} * (\varepsilon_{DO})_{\lambda 2}}$$

$$C_{DB} = \frac{(\varepsilon_{DB})_{\lambda 1} * A_{\lambda 2} - (\varepsilon_{DB})_{\lambda 2} * A_{\lambda 1}}{(\varepsilon_{DO})_{\lambda 1} * (\varepsilon_{DB})_{\lambda 2} - (\varepsilon_{DB})_{\lambda 1} * (\varepsilon_{DO})_{\lambda 2}}$$

Onde:

C_{DO} = Concentração do corante laranja.

C_{DB} = Concentração do corante azul.

A = Absorbância obtida na longitude de onda determinada.

b = caminho ótico, neste caso 1cm.

$(\varepsilon_{DO})_{\lambda 1} = 35,62 \text{ g L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $(\varepsilon_{DO})_{\lambda 2} = 0,19 \text{ g L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $(\varepsilon_{DB})_{\lambda 1} = 2,59 \text{ g L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$(\varepsilon_{DB})_{\lambda 2} = 15,62 \text{ g L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

4.4.1.3 Determinação dos grupos ácidos

A determinação dos grupos ácidos sulfônicos foi feita de acordo com Beatson (1992). Ao bagaço pré-tratado (1,5 g m.s) foi adicionados 50 mL de ácido clorídrico 0,1 mol/L, sob agitação, por 45 min. O bagaço foi lavado com água deionizada e em seguida filtrado até condutância constante de aproximadamente 8µS/cm (condutividade da água deionizada). Ao bagaço foram adicionados 225 mL de cloreto de sódio (NaCl) 0,001 mol/L

e 4 mL de ácido clorídrico 0,1 mol/L. A mistura foi homogeneizada e a condutividade inicial medida.

A suspensão de bagaço foi titulada com hidróxido de sódio 0,1 M, com adição de volumes de 0,5 mL até que a condutividade se aproximasse do valor inicial. Com os valores da condutividade e dos respectivos volumes de hidróxido de sódio foi construído o gráfico para determinação do ponto de mínimo.

O conteúdo de grupos ácidos pode ser expresso pela equação 4:

$$\text{Grupos ácidos (mmol/ kg)} = \frac{AM_1 + VM_2}{W} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde: “A” é o primeiro ponto final da titulação de grupos ácidos (em mL); “M₁” é a molaridade do NaOH; “V” é o volume de HCl adicionado; “M₂” é a molaridade do HCl e “W” é o peso seco da polpa (em kg). O teor de grupos ácidos também pode ser expresso por massa de lignina (mg).

4.4.1.4 Retenção de água

A determinação do valor de retenção de água (WRV) foi realizada de acordo com o proposto por Guo et al. (2011). As amostras de bagaço pré-tratadas foram imersas em água destilada por 24 h, empregando cerca de 1% (m/m) de teor de sólidos. Após este período, as amostras foram transferidas para um aparato de centrifugação composto por módulo de ultrafiltração, tubo de 50 mL e malha de aço com abertura de 200 mesh (Figura 7). Durante a centrifugação a 4.505 g por 15 min a 25 °C, a água não retida pelas amostras foi removida. Finalmente, as amostras foram mantidas em estufa a 105 °C até massa constante. Utilizando o valor das massas da amostra úmida e seca em estufa, o WRV foi calculado pela equação 5:

$$WRV = \frac{m_0 - m_1}{m_1} \times 100 \quad \text{Eq. 5}$$

onde, m_0 é a massa de bagaço úmido, e m_1 a massa de bagaço seco em estufa.

Figura 7: Representação esquemática do aparato de centrifugação.

4.4.2 Determinações das atividades enzimáticas e proteínas

4.4.2.1 Celulases Totais

A atividade de celulases totais foi determinada segundo a metodologia descrita por Ghose (1987). Os açúcares redutores produzidos pela hidrólise foram determinados pelo método do DNS (MILLER, 1959). A curva padrão de glicose foi construída através da relação entre massa de glicose em 0,5 mL (1 mg, 1,65 mg, 2,5 mg e 3,35 mg) e a absorbância a 540 nm. 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 filtro 1 x 5 cm (aproximadamente 50 mg) e 0,5 mL de extrato enzimático (Celluclast 1.5 L -Novo-Nordisk) nas diluições de 1/100, 1/200, 1/300 e 1/400. Os tubos de ensaios foram mantidos em banho-maria a 50 °C por 60 minutos. Após o período de reação, foram adicionados 3 mL de reagente DNS e a mistura foi fervida a 100 °C por 5 minutos (Miller, 1959). Foram adicionados 20 mL de água destilada em todos os tubos e a leitura da absorbância foi feita a 540 nm (Espectrofotômetro U-2900 - Hitachi). Foram feitos controles para cada amostra, adicionando o reagente de DNS antes do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos em massa de glicose através da curva padrão de glicose e usados para construir um gráfico que relaciona 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, correspondente a 4% de conversão da celulose. Para o cálculo da atividade em FPU/mL dividi-se 0,37 pelo valor de diluição necessária para liberar 2 mg de glicose, estimado através da curva. O fator 0,37 corresponde à conversão de 2 mg de glicose em 1 micromol de glicose por minuto, levando em consideração o

volume de amostra e o tempo de reação. O valor que foi obtido corresponde às celulases totais (FPU/mL) do extrato enzimático.

4.4.2.2 β -Glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada segundo TAN; MAYERS e SADDLER (1987), usando *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*NPG, SIGMA). Foram adicionados 0,8 mL de solução de *p*NPG 0,1 % e 0,2 mL de solução enzimática em tubo de ensaio e incubado a 50 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 2 mL de bicarbonato de sódio 10% e feita a leitura da absorbância a 410 nm (Espectrofotômetro U-2900 - Hitachi). O controle do ensaio foi feito adicionando-se a solução de bicarbonato de sódio 10% no início da reação. O *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado foi determinado através da curva de calibração com o padrão de *p*NP (SIGMA) nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,150; 0,175 e 0,2 μ mol/mL. Uma unidade de atividade enzimática de β -glicosidase corresponde a formação de 1 μ mol de *p*NP por minuto.

4.4.2.3 β - D-Xilanase

As atividades das xilanases foram determinadas de acordo com o método de BAILEY; BIELY e POUTANEN (1992). Os açúcares redutores foram determinados pelo método do DNS (MILLER, 1959). Foram adicionados 0,9 mL de xilana 1 % e 0,1 mL de solução enzimática em tubo de ensaio que foi incubado a 50 °C por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS e o tubo de ensaio foi fervido a 100 °C em banho maria, por 5 minutos. Após o resfriamento, se realizou leitura da absorbância a 540 nm (Espectrofotômetro U-2900 - Hitachi). Foi feito um controle para cada amostra, adicionando o reagente de DNS antes da enzima. A absorbância do controle foi descontada da respectiva amostra. A curva padrão foi construída com soluções de xilose (Merck) 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 16 e 20 μ mol/mL. Uma unidade de atividade enzimática corresponde a formação de 1 μ mol de açúcar por minuto, expresso em xilose.

4.4.2.4 β -Xilosidase

A atividade de β -xilosidade foi determinada segundo a metodologia de TAN; MAYERS e SADDLER (1987). Uma alíquota de 0,8 mL de solução de p-nitro-fenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*NPX, SIGMA) 0,1 % foi adicionada a 0,2 mL de solução enzimática em um tubo que foi incubado a 50 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 2 mL de bicarbonato de sódio 10 % ao tubo de ensaio e foi feita a leitura da absorbância a 410 nm. Um controle foi feito adicionando-se a solução de bicarbonato de sódio 10 % antes da enzima. O *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado foi determinado através da curva de calibração com o padrão de *p*NP (SIGMA) nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,150; 0,175 e 0,2 μ mol/mL. Uma unidade de atividade enzimática de β -xilosidade corresponde a formação de 1 μ mol de *p*NP por minuto.

4.4.2.5 Proteínas

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada através do Método de Lowry (GHOSE, 1987). Foram preparados os reagentes A (20 g de Na_2CO_3 , 4 g de NaOH em 1000 mL de água), B-1(1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água), B-2 (2 g Tartarato Sódio Potássio), C (1 mL de Reagente B-1, 1 mL de Reagente B-2, 100 mL de reagente A) e o Reagente Fenol (1N) (preparado a partir da diluição (1:2) do reagente Folin Ciocalteou). Foram misturados 2 mL da amostra em um tubo com 2 mL de ácido tricloroacético 10%. Após ter sido homogeneizada, a amostra foi incubada por 60 minutos na geladeira e em seguida foi centrifugada a 2000 rpm por 25 minutos e o sobrenadante da amostra foi eliminado. O sedimento foi dissolvido em 2 mL do reagente A. Um volume de 1,0 mL dessa amostra foi adicionado a 5 mL do reagente C. Após 10 minutos foram adicionados 0,5 mL de Reagente fenol (1N) e depois de 30 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 750 nm. A curva padrão foi construída com soluções de albumina soro bovino (BSA) 0,067; 0,1; 0,125; 0,17; 0,25; 0,33; 0,5; 0,67 e 1,0 mg/mL. No caso das enzimas comerciais purificadas (xilanases 10, xilanase 11, β -xilosidase e β -glicosidase), foram usados os dados de concentração de proteínas fornecidas pelo fornecedor.

4.4.3 Cromatografia em camada delgada (TLC)

O sobrenadante da reação enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino no tempo de 6 e 48 horas de hidrólise foram analisados por cromatografia em camada delgada para identificar os xilo-oligossacarídeos (XOs) formados. A cromatografia ascendente foi realizada em placas de sílica gel 60 F254 (Merck) empregando como solvente uma mistura de acetato de etila:ácido acético:propanol:ácido fórmico:água (25:10:5:1:15) (PUCHART; BIELY, 2008). A solução reveladora foi preparada dissolvendo-se 1,8 g de N-(1-Nafitil)-etilenodiamina dihidroclorato (Sigma) em 200 mL de etanol e, sob agitação constante, foram adicionado lentamente 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. As amostras e padrões foram colocados a 1 cm da parte inferior da placa através de aplicações sucessivas de 1 µL (1 a 2 aplicações), a uma distância de 1 cm uma da outra, secas em estufa a aproximadamente 45 °C. Uma cuba com tampa foi utilizada para acondicionar o solvente e a placa, que foi colocada na posição vertical. Após o solvente ascender ao topo da placa, esta foi retirada e seca em estufa a aproximadamente 45 °C até que estivesse livre de solvente. A revelação das amostras foi realizada por imersão da placa na solução reveladora e seca em estufa a 110°C por aproximadamente 5 min ou até o aparecimento de manchas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo sulfito alcalino.

O bagaço utilizado neste trabalho possui 24,4% de lignina, 27,4% de hemicelulose e 43,7% de glucana, valores similares aos reportados por outros autores (GÁMEZ et al. 2006). Para incrementar a acessibilidade das enzimas hidrolíticas, o bagaço foi pré-tratado em duas condições: 5% de Na_2SO_3 e 2,5% de NaOH (baixa carga) e 10% de Na_2SO_3 e 5% de NaOH (alta carga).

Tabela 4: Composição química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo de sulfito alcalino.

	Rendimento	Composição de bagaço			Composição de bagaço		
	(g/100 g de polpa)	(g/100 g em base polpa)			(g/100 g de bagaço original)		
		Lignina	Xilana	Glucana	Lignina	Xilana	Glucana
Bagaço	100	24,0±0,1	26,0±0,1	42,0±0,1	24,0±0,1	26,0±0,1	42±2
Bagaço pré-tratado (5% Na_2SO_3 / 2,5% NaOH)	83,2	21,2±0,4	20,1±0,8	47,5±1,9	17,7±0,3	16,7±0,6	39,5±1,6
Bagaço pré-tratado (10% Na_2SO_3 /5% NaOH)	71,8	12,9±0,1	21,1±0,3	52,4±0,7	9,3±0,1	15,1±0,3	37,6±0,7

O pré-tratamento mais brando (5% Na_2SO_3 / 2,5% NaOH) diminuiu em 26% o conteúdo de lignina, e no mais forte (10% Na_2SO_3 / 5% NaOH) a remoção de lignina foi de 61%, em base da composição original do bagaço. Os pré-tratamentos removeram cerca de 40% de hemicelulose, no tratamento mais suave e nas condições mais drásticas. Tem sido proposto que as ligações de tipo éster entre lignina e as unidades de ácido 4-O-metilglucurônico em xilanas, são facilmente hidrolisáveis com álcali (KONN; PRANOVICH; HOLMBOM, 2006) o que explicaria a redução no teor de xilana durante os pré-tratamentos. Os valores semelhantes de remoção de hemicelulose pelos pré-

tratamentos sugerem que as ligações éster tenham sido rompidas já com a menor concentração de reagentes. No entanto, como mostrado na tabela 4, uma boa parte da fração hemicelulósica é mantida após o pré-tratamento alcalino, preservando nas condições usadas no presente trabalho 64% e 58% da fração hemicelulósica para o pré-tratamento com baixa e alta carga de reagentes, respectivamente.

Zhu et al. (2009) reportam o uso industrial do pré-tratamento sulfito para remoção de lignina, sem degradar grandes quantidades de celulose, fato que se observa nos resultados obtidos neste trabalho. A perda de celulose foi de 6% no pré-tratamento com baixa carga de reagentes e de 10,5% no pré-tratamento com alta carga de reagentes; sugerindo o uso industrial deste pré-tratamento para obtenção de celulose, devido à preservação desta fração. Outra característica de interessante deste pré-tratamento, é o aumento na hidrofiliabilidade da lignina que ocorre durante a fase de impregnação dos reagentes, devido principalmente à sulfonação do carbono alfa, tornado a lignina mais solúvel (REHBEIN et al., 2010; FENGEL; WEGENER, 1989, MENDES et al., 2013)

5.2 Características físico-químicas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo sulfito alcalino.

5.2.1 Retenção de água e grupos ácidos dos bagaços

A capacidade de retenção de água (WRV) é uma característica física relacionada com as hidroxilas expostas na parede celular da fibra, portanto seria esperado que as amostras contendo menores teores de lignina apresentassem maiores valores de retenção de água. Entretanto, os valores de retenção de água não foram diferentes entre si (Tabela 5). Resultados semelhantes foram obtidos por Mendes et al. (2013) para o bagaço pré-tratado com sulfito alcalino em diferentes tempos, ou seja, o grau de retenção de água foi o mesmo entre os tempos de pré-tratamentos alcançando valores da ordem de 200% depois de pré-tratado.

A correlação entre o grau de retenção de água e a remoção de lignina varia muito para diferentes pré-tratamentos. Bagaços com mesmos teores de lignina que os estudados neste trabalho apresentaram diferenças nos valores de retenção de água quando pré-tratados com clorito em meio ácido (SANTI, 2011). Tais resultados foram atribuídos à maior quantidade de hidroxilas, tanto da celulose quanto da hemicelulose acessíveis para a

adsorção de moléculas de água. A diferença entre os resultados de Santi (2011) e os reportados neste estudo pode ser devido à sulfonação da lignina, que a torna menos hidrofóbica. Nesse contexto, é importante dizer que naturalmente a lignina é o componente do material lignocelulósico que apresenta menor afinidade com a água (BERRY; RODERICK, 2005)

Tabela 5: Retenção de água e grupos ácidos do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo processo sulfito alcalino.

Pré-tratamento	Massa úmida (g)	Massa seca (g)	% WRV	Desv.±	Grupos ácidos (mmol/kg bagaço)	Desv. ±	Grupos ácidos (mmol/kg lignina)	Desv.±
5% Na ₂ SO ₃ + 2,5% NaOH	1,41	0,49	215,49 ^a	2,57	75,6 ^a	1,50	356,19 ^a	7,10
10% Na ₂ SO ₃ + 5% NaOH	1,34	0,46	225,12 ^a	6,41	56,15 ^b	1,54	381,60 ^b	10,46

Desv.: Desvio padrão.; WRV: Retenção de água (WRV). Letras diferentes nos valores de WRV ou grupos ácidos indicam diferenças estatisticamente significativas com um nível de confiança de 95%.

Estudos realizados por Mendes et al. (2011) e Konn; Holbom e Nictull (2002), mostram que o efeito positivo do pré-tratamento sulfito-alcalino é evidenciado pela sulfonação da lignina na lamela média e parede primária que resulta no aumento do grau de inchamento das fibras, o que permitiria uma maior acessibilidade das enzimas às cadeias de celulose. Bendzalova et al. (1996) mostram que cavacos de madeira expostos a uma variedade de agentes, com capacidade de promover o inchamento da fibra, exhibe uma correlação linear entre o grau de retenção de água e a hidrólise da celulose. Sjostrom (1993) reporta o aumento na hidrofiliabilidade da lignina, devido à inserção de grupos SO₃⁻ o que ajudaria a melhores valores de retenção de água comparado com o pré-tratamento com clorito.

Em todos esses trabalhos citados anteriormente, os dados de retenção de água apresentam desvios padrão importantes. Por exemplo, Mendes et al. (2013), reportam

desvios padrões de até 11,2 % sugerindo, como já foi discutido, que não é possível evidenciar diferenças estatisticamente significativas após 60 minutos de pré-tratamento. Santi (2011) reporta variações de até 8% nas amostras deslignificadas com clorito de sódio em meio ácido. Neste sentido a técnica de WRV, que é simples e rápida, exige grande cuidado na sua execução para conseguir alta reprodutibilidade, sendo influenciada pelo tipo de pré-tratamento.

Os valores dos grupos ácidos dos materiais pré-tratados estão apresentados na tabela 5. Observa-se que quando o teor de grupos ácidos é quantificado por quilograma de bagaço, o valor é maior no tratamento com menor carga de sulfito. Isto é explicado devido ao maior teor de lignina, já que o tratamento com menor carga de sulfito remove menos lignina, comparado com o pré-tratamento com 10% de sulfito e 5% de hidróxido de sódio. Quando o conteúdo de grupos ácidos é quantificado por quilograma de lignina, o pré-tratamento com alta carga de sulfito mostra um maior valor. Os resultados mostram que os valores apesar de próximos, apresentam diferenças estatísticas significativas entre os bagaços com alto e baixo teor de lignina, evidenciando que a lignina residual do bagaço pré-tratado com maior concentração de reagentes está mais sulfonada que a do pré-tratamento com baixa carga de sulfito. É reportado na literatura, que a sulfonação da lignina aumenta a hidrofiliabilidade do material (DEL RIO; CHANDRA; SADDLER, 2011; REHBEIN et al., 2010), e o inchamento das fibras (MENDES et al., 2013), o que favorece a hidrólise enzimática.

5.2.2 Área superficial da celulose (ASE)

A celulose do substrato pré-tratado que é acessível a celulases foi determinada pela técnica de Coloração de Simons (CS). Celulose microcristalina (avicel) foi usada como controle da reação (Tabela 6).

Tabela 6: Medida de corantes adsorvidos no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo de sulfito alcalino.

Pré-tratamento	DO adsorvido (mg/g bagaço)	Desv.±	DB adsorvido (mg/g bagaço)	Desv.±	Total corantes adsorvidos (mg/g bagaço)
5% Na ₂ SO ₃ + 2,5% NaOH	80,91	0,12	88,07	0,33	169
10% Na ₂ SO ₃ + 5% NaOH	81,92	0,03	88,06	0,22	170
Avicel pH 101	38,45	0,33	31,83	0,44	70,28

DO: Direct Orange; DB: Direct Blue; Desv.: Desvio padrão; Avicel pH 101: Celulose microcristalina em pó.

Os resultados mostram que Avicel adsorve mais o corante laranja, o que indicaria uma maior proporção de poros de maior tamanho, e com isto uma maior ASE. Resultados similares foram obtidos por Chandra et al. (2008), reportando valores de adsorção para o corante laranja (DO) de 40 mg/g de substrato, e de 18 mg/g para o corante Azul (DB), enquanto os dados deste trabalho correspondem a 38,5 mg/g de adsorção de DO e 31,8 mg/g de DB. As diferenças entre os dados reportados para o corante DB é comum de ser encontrado entre lotes de Avicel.

No caso do bagaço pré-tratado, não foram encontrados resultados publicados na literatura referentes aos dados de determinação de área superficial pela coloração de Simons. Chandra et al. (2008) mostraram que cavacos de conífera, submetido a um pré-tratamento termomecânico adsorvem aproximadamente 25 mg/g e 50 mg/g de corante DO e DB, respectivamente. Também foi reportado os cavacos submetidos ao pré-tratamento Kraft adsorvem aproximadamente 125 mg/g e 40 mg/g de corante DO e DB,

respectivamente. Considerando que o tratamento quimiatermomecânico com sulfito tem características tanto de um tratamento kraft como de termomecânico, pode-se explicar porque os valores da CS obtidos neste trabalho foram intermediários aos reportados por Chandra et al. (2008). O substrato com menos lignina apresentou 81,9 mg/g e 88,1 mg/g de corante DO e DB, respectivamente, valores próximos aos obtidos com o substrato com alto teor de lignina (Tabela 6).

Um pequeno aumento na adsorção do corante DO foi observado no pré-tratamento com maior teor de sulfito, que refletiu em aumento na adsorção total de corantes. Considerando que os dados deste trabalho deveriam ser intermediários àqueles reportados por Chandra et al. (2008), os resultados de adsorção do corante DO ficam perto do esperado, mas os resultados do corante DB não.

Era esperado que a adsorção do corante laranja fosse maior no substrato com menos lignina, portanto a medida da área superficial específica da celulose pode estar sofrendo interferência da presença dos grupos sulfônicos da lignina. Além disso, a falta de correlação entre a área superficial dos dois substratos e a composição química pode ser devido a fissuras nas fibras provocadas pelo processo quimiomecânico, conforme mostrado por microscopia no trabalho de Mendes et al (2011). Dessa forma, essa técnica não foi conclusiva para determinar a área superficial específica no bagaço pré-tratado com sulfito alcalino.

Arantes e Saddler (2011) reportam que quando foram hidrolisados diferentes tipos de substratos lignocelulósicos pré-tratados, a carga enzimática mínima requerida para alcançar uma hidrólise eficiente não teve relação direta só com a área superficial externa da celulose dos materiais pré-tratados; senão com a acessibilidade total das enzimas, que foi medida com CS. Esta técnica permite medir a área externa da superfície da celulose e considera também a porosidade/topologia da celulose disponível. Entretanto, no experimento realizado no presente trabalho, não foi possível diferenciar de forma notória os dois pré-tratamentos através da CS. Como a técnica de CS envolve a adsorção competitiva da fração molecular maior do corante DO (maior que 100 kD) e do corante de pequena massa molecular DB (998 Da), seu princípio é que a fração molecular maior não compete com o corante DB pela adsorção nos grandes poros do substrato devido a grande afinidade que possui DO pelos grupos hidroxila da celulose, enquanto as pequenas moléculas do corante DB ficam nos sítios do substrato que o corante DO não pode acessar (CHANDRA; SADDLER, 2012).

A adsorção e distribuição do corante DO sobre o substrato lignocelulósico tem se mostrado especialmente relevante na faixa de 4-7 nm de tamanho, diâmetro similar ao reportado para muitas celulasas (YU; MINOR; ATALLA, 1995). Trabalhos prévios mostram que substratos que adsorvem uma quantidade maior de corante DO em comparação com DB são geralmente mais acessíveis às celulasas. Entretanto, artigos recentes mostram que a técnica de CS pode apresentar variações importantes porque o corante DO não é homogêneo, motivo pelo qual um passo chave é a purificação do corante DO para usar somente a fração de alta massa molar. Se o corante fica com frações menores, pode dar uma adsorção maior que a real, além do que as frações menores têm quase a mesma afinidade que o corante DB, não competindo com ele, portanto dando interpretações falsas dos valores de adsorções.

Os teores de lignina dos substratos testados foram muito diferentes, porém esta característica não refletiu nos valores de retenção de água e na área superficial específica medida com a CS. No caso dos grupos ácidos foi possível observar diferenças estatisticamente significativas, mas era esperada uma diferença maior, já que foram usadas concentrações muito diferentes de sulfito em cada pré-tratamento. Estas pequenas diferenças observadas podem ser atribuídas ao tempo de cozimento do pré-tratamento sulfito alcalino que, além de remover lignina e uma pequena quantidade de açúcares, estaria redistribuindo os componentes do material lignocelulósico. Desta maneira, poderiam existir interações que estariam diminuindo a área superficial do substrato; como por exemplo, interações entre as fibras, entre as fibras e os reagentes químicos ou dos próprios componentes solubilizados do bagaço. Entretanto, no bagaço pré-tratado com alta carga de sulfito alcalino essas interações parecem não atrapalhar a acessibilidade das enzimas. Fenômeno similar poderia também estar ocorrendo no substrato pré-tratado com uma baixa carga de sulfito alcalino, só que a hidrólise não é favorecida devido ao impedimento físico causado pela lignina.

5.3 Determinação das atividades de enzimas hidrolíticas presentes no preparado comercial de celulase

Os extratos enzimáticos descritos na tabela 7 foram usados como sistema enzimático de referência para realizar a hidrólise dos polissacarídeos do bagaço pré-tratados com sulfito alcalino.

T. reesei possui cerca de 200 genes de polissacarídeo hidrolases (MARTINEZ et al., 2008) e seu genoma codifica 10 enzimas celulolíticas e 16 hemicelulolíticas, entre essas as xilanases da família 10 e 11 (VINZANT et al., 2001; PRIBOWO; ARANTES; SADDLER, 2012). O extrato celular do cultivo deste fungo é comercializado como Celluclast e usado na hidrólise de celulose. Como essa preparação possui baixa atividade de β -glicosidase, nesse estudo a Celluclast foi suplementada com o extrato de *A. niger* (Novozyme 188), que é bom produtor dessa enzima.

As atividades de xilanases, β -glicosidase e β -xilosidase presentes em 5 FPU de Celluclast e 10 UI de Novozym 188 foram calculadas baseados nas atividades reportadas na tabela 7. Com isso, um extrato com 5 FPU e 10 UI de β -glicosidase contém 60 UI de xilanases, 13 UI de β -glicosidase, 3 UI de β -xilosidase.

Tabela 7: Atividades enzimáticas e conteúdo de proteína das enzimas comerciais.

Enzimas	Origem	FPA (FPU/mL)	β -Glicosidase (UI/mL)	Xilanase (UI/mL)	β -xilosidase (UI/mL)	Proteína (mg/mL)
Celluclast 1.5 L	<i>T. reesei</i>	92,1	47,8	1098,6	53,2	177,2
Novozyme 188	<i>A. niger</i>	0	1133,1	34,8	7,6	63,3

FPA: Ensaio papel de filtro, FPU: Celulases totais, UI: Unidade internacional.

5.4 Análise comparativa da hidrólise enzimática do bagaço com baixo e alto teor de lignina

Os bagaços pré-tratados nas duas concentrações de sulfito e NaOH foram hidrolisados com diferentes cargas enzimáticas a fim de determinar o grau máximo de hidrólise da celulose e hemicelulose das amostras (Figura 8).

A hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado na condição mais branda foi pouco eficiente, ou seja, não foi possível superar 60% de conversão da celulose e hemicelulose mesmo utilizando alta concentração de enzimas (Figuras 8A e 8B). O aumento na severidade do pré-tratamento promoveu uma maior remoção de lignina e hemicelulose, e consequentemente houve um aumento na conversão enzimática desses polissacarídeos. Neste sentido, diferentes trabalhos disponíveis na literatura confirmam que dependendo da concentração, a lignina e hemicelulose interferem negativamente na conversão enzimática

da celulose pelo acesso limitado das enzimas (ZHU et al., 2009; GÍRIO et al., 2010; MENDES et al., 2011; VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIKARI, 2010). Embora haja muitos estudos sobre a contribuição desses fatores na hidrólise enzimática, Arantes e Saddler (2011) sugerem que as atividades de enzimas necessárias para se obter uma hidrólise efetiva da celulose estão relacionadas com a sua acessibilidade ao substrato, independentemente da composição química dos resíduos lignocelulósicos e das diferenças no pré-tratamento. Substratos com celulose mais acessível requerem menos proteína por massa de glucana para alcançar uma conversão eficiente. Seus resultados mostram que o passo limitante da hidrólise não é a clivagem catalítica das cadeias de celulose, senão a diferenças de acessibilidade devido as estruturas físicas dos materiais.

Figura 8: Conversão de celulose (A) e (C), e de hemicelulose (B) e (D) dos bagaços pré-tratados com baixa e alta carga de sulfito alcalino, respectivamente. (▲) 5 FPU Celluclast e 10 UI Novozym 188; (■) 10 FPU celluclast e 20 UI Novozym 188, (◆) 40 FPU celuclast e Novozym 80 UI. Os valores de carga enzimática reportados são referidos por grama de bagaço.

Na figura 8 pode-se observar que desde o começo da hidrólise há diferenças na conversão dos açúcares entre os bagaços pré-tratados com alta e baixa carga de sulfito e esse comportamento se mantém no decorrer da hidrólise. Em ambos os pré-tratamentos a velocidade de reação diminui após 8 h de reação, aumentando muito pouco a conversão dos polissacarídeos depois desta etapa.

No pré-tratamento com uma menor carga de sulfito, as conversões enzimáticas da celulose e hemicelulose alcançam rapidamente um patamar, reforçando a idéia do impedimento físico causado pelo maior teor de lignina. Neste sentido, Mendes et al. (2011) mostraram que a adição de mais enzima após 48 horas de reação, quando a conversão estava no patamar, não produziu um aumento na conversão de celulose ou hemicelulose, sugerindo que a diminuição na taxa de conversão é principalmente devido mudanças na composição do substrato e ao enriquecimento em lignina.

A conversão de hemicelulose segue o mesmo padrão observado para celulose referente à diminuição da velocidade de hidrólise com o tempo, porém observa-se que o rendimento de hidrólise da hemicelulose é igual ao da celulose apenas quando se aplicou a maior carga de enzimas. Quando se usou menos enzima, a hidrólise da hemicelulose foi aproximadamente 10% inferior à da celulose. Tal resultado evidencia a necessidade de suplementação do preparado enzimático com xilanases para aumentar a hidrólise de hemicelulose e consequentemente aumentar a acessibilidade das celulasas a novas cadeias de celulose que poderiam estar recobertas com hemicelulose, conforme relatado por Mendes et al. (2011).

Embora o efeito primário da lignina seja o de limitar a sacarificação da celulose pela formação de uma barreira física, há também de se levar em consideração que a interação inespecífica lignina-enzima tem uma contribuição para a redução na velocidade e eficiência de conversão durante a sacarificação de substratos lignocelulósicos (BERLIN et al., 2005). No experimento realizado com o substrato com baixa lignina e excesso de enzimas foram obtidos altos níveis de conversão (acima de 80%) em 24 horas de hidrólise, tanto para celulose como para hemicelulose, e valores de conversão próximos a 90% após 48 horas (Figuras 8C e 8D).

O aumento da hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com uma maior carga de sulfito também está relacionado ao maior grau de sulfonação da lignina e por consequência da hidrofiliabilidade do material (DEL RIO; CHANDRA; SADDLER, 2011; MENDES et al. 2013). O pré-tratamento sulfito aumenta as cargas negativas da lignina presentes no substrato, prevenindo a união não específica das celulasas através de repulsões

eletrostáticas. No ensaio de hidrólise enzimática feito em pH 4,8 a maioria dos componentes da mistura de celulasas está carregada negativamente aumentando a repulsão eletrostática (DEL RIO; CHANDRA; SADDLER, 2011; LOU et al., 2013; WANG; LAN; ZHU, 2013).

5.5 Efeito da adição de enzimas acessórias ao extrato comercial Celluclast

Hemicelulases e β -glicosidase foram adicionadas à Celluclast visando melhorar a conversão dos polissacarídeos do bagaço pré-tratado com as duas cargas de sulfito alcalino. Os experimentos foram feitos seguindo um planejamento fatorial 2^4 completo com seis pontos centrais. Todos os experimentos foram realizados com 5 FPU de celluclast por grama de bagaço e adição conjunta de xilanases 10 e 11, β -glicosidase ou β -xilosidase, dependendo da mistura de enzimas especificada nos ensaios das tabela 2 e 3 do planejamento experimental.

A suplementação de celluclast com xilanases teve por objetivo prover a hidrólise com tipos de xilanases com características físico-químicas e cinéticas diferentes das existentes no extrato de *T. reesei*. Banerjee; Scott-Craig e Walton (2010b) reportaram que uma desvantagem dos preparados comerciais é que elas foram desenvolvidas para hidrolisar palha de milho pré-tratada com ácido, podendo não ser o ideal para a hidrólise de outros substratos e/ou pré-tratamentos em especial para substratos com alto teor de hemicelulose (VAN DYK; PLETSCHKE, 2012). Os dados da tabela 7 mostram a mistura enzimática feita com Celluclast e Novozyme contém uma alta atividade de xilanase, portanto a menor eficiência de hidrólise da hemicelulose em relação à hemicelulose reportada em diversos trabalhos pode não estar baseada exclusivamente no valor da atividade enzimática (QING; WYMAN, 2011a, MENDES et al, 2011).

Os substratos estudados neste trabalho apresentam conteúdo de hemicelulose semelhante e relativamente alto. Diante disso, foi de interesse avaliar se a adição de xilanases e β -xilosidasas, de origens diferentes daquelas presentes no extrato comercial, poderia resultar em uma maior hidrólise da hemicelulose.

O complexo enzimático produzido pelo fungo *T. reesei* produz xilanases da família 10 e 11, mas as proporções de cada enzima no extrato comercial não são reportadas (VINZANT et al., 2001; PRIBOWO; ARANTES; SADDLER, 2012). Sendo assim, a suplementação com as xilanases foi feita em relação à atividade de xilanase total presente

na mistura de referência (5 FPU de celluclast e 10 UI de β -glicosidase) perfazendo um valor de 60 UI.

As atividades de xilanases 10 e 11 foram aplicadas seguindo o planejamento experimental para inferir sobre a significância de cada uma das enzimas na hidrólise da hemicelulose e celulose. O mesmo foi feito para a β -xilosidase e β -glicosidase.

A β -glicosidase purificada de *A. niger* foi usada em substituição ao extrato Novozyme visando avaliar o efeito exclusivo da adição desta enzima na Celluclast. Os níveis testados incluíram valores menores que os presentes na mistura referência, tendo por objetivo avaliar se essa enzima poderia ser reduzida, sem diminuir a conversão de celulose.

A mistura de enzimas correspondente aos ensaios do planejamento resulta em diferentes quantidades de proteínas. A fim de verificar se haveria uma melhora no rendimento de hidrólise da celulose ou hemicelulose em função da adsorção improdutiva das enzimas na lignina, foi feito um ensaio de hidrólise com a mistura de enzimas, porém empregando as xilanases inativadas pelo calor e nativas. A carga de proteínas usadas foi 15,8 % a mais nos ensaios que continham 20 UI de xilanase 10, devido a maior concentração de proteínas neste preparado em comparação com a xilanase 11. Na figura 9 são mostrados os resultados obtidos.

Figura 9: Hidrólise enzimática da celulose (A) e da hemicelulose (B) do bagaço pré-tratado com alta carga de sulfito com diferentes misturas de enzimas. Os valores de carga enzimática reportados são referidos por grama de bagaço.

(—◆—) 5 FPU, 20 UI de xilanase 10, 10 UI de xilanase 11 e 5 UI de β -glicosidase.

(—■—) 5 FPU, 10 UI de xilanase 10, 20 UI de xilanase 11 e 5 UI de β -glicosidase.

(—▲—) 5 FPU, 20 UI de xilanase 10 inativada por calor, 10 UI de xilanase 11 e 5 UI de β -glicosidase.

(—×—) 5 FPU, 10 UI de xilanase 10, 20 UI de xilanase 11 inativada por calor e 5 UI de β -glicosidase.

A figura 9A mostra que apesar da diferença na carga de proteínas a hidrólise foi a mesma, mas quando as xilanases 10 ou 11 foram inativadas a hidrólise diminui em 10%, mostrando que o efeito catalítico das enzimas é mais importante que a concentração de proteínas usada na hidrólise. Esse resultado foi mais evidente na hidrólise da hemicelulose (Figura 9B), em que se observa a diminuição da conversão apenas quando a xilanase 11 foi inativada, demonstrando que as conversões observadas são produto das atividades catalíticas das enzimas testadas e não da diferença na concentração de proteínas.

5.6 Carga de proteínas na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com elevado e baixo teor de lignina.

Cronologicamente, a hidrólise enzimática do bagaço com alto teor de lignina foi feito depois da hidrólise do bagaço com menor teor de lignina. Como as enzimas estavam armazenadas, nesse período ocorreu uma diminuição da atividade enzimática. Para ajustar os níveis de atividade enzimática dos experimentos foi adicionada uma maior quantidade de proteínas no ensaio de hidrólise do substrato com maior teor de lignina.

Na figura 10 está mostrada a massa de proteínas de cada experimento. Observa-se que a massa de proteínas na mistura de referência foi maior que nos outros ensaios de hidrólise do bagaço com baixo teor de lignina. As diferenças observadas nas massas de proteína entre os ensaios referem-se principalmente à xilanase 10, pois conforme já relatado esse preparado tem baixa atividade específica e sua adição aumenta muito a concentração final de proteína no ensaio.

A relação entre a massa de proteína por grama de lignina foi quase o dobro para o substrato pré-tratado com maior teor de sulfito e álcali (Figura 11). Considerando que parte das proteínas adsorvem improdutivamente à lignina, nesse substrato haverá provavelmente menos proteínas para a hidrólise da celulose. Mesmo assim, o experimento de hidrólise com a mistura de enzimas foi realizado seguindo as mesmas proporções de enzimas idealizadas para a hidrólise do substrato com pouca lignina, tendo em vista que ambos os substratos apresentaram o mesmo valor de área superficial específica da celulose, pela técnica de Simons (Tabela 6).

Figura 10: Proteínas presentes nos ensaios idealizados pelo planejamento experimental ampliado em estrela, utilizadas na hidrólise dos bagaços com alto e baixo conteúdo de lignina.

Figura 11: Relação entre proteína e lignina presentes nos ensaios de hidrólise enzimática dos bagaços com alto e baixo conteúdo de lignina

5.7 Efeito da mistura de enzimas na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com baixo teor de lignina.

As figuras 12 e 13 mostram os resultados de conversão de celulose e hemicelulose do bagaço pré-tratado com alta carga de sulfito. No começo da reação não há grandes diferenças entre os experimentos, sendo observado um comportamento similar até 24 horas de hidrólise, tempo no qual alguns ensaios chegam a um patamar e outros continuaram com uma alta inclinação (ensaio 1 a 6); este comportamento é mais evidente para a hemicelulose. Em 48 horas de hidrólise se observa que os experimentos 4, 5 e 6 apresentaram a maior conversão de celulose e hemicelulose (Figuras 12, 13 e Tabela 8). Nestes ensaios as hidrólises da hemicelulose e celulose foram superiores à mistura de referência, sendo sempre proporcional à quantidade de xilanases totais contidas na mistura.

No ensaio 4 foi adicionado uma alta quantidade de xilanases 10 e 11 (15 UI), enquanto que no ensaio 5 as xilanases 10 e 11 estavam nos níveis mais baixos (5 UI), mas a β -xilosidase estava em maior quantidade. O ensaio 6 apresenta uma alta atividade de xilanase 10 (15 UI), baixa atividade de xilanase 11 (5 UI) e uma alta atividade de β -xilosidase (7,5 UI), sugerindo que a melhora na hidrólise é favorecida pela suplementação de xilanase 10 e β -xilosidase.

Os ensaios 8, 12 e 16 também continham altas atividades das duas xilanases, porém não alcançaram bons rendimentos como nos ensaios 4, 5 e 6 (Tabela 8), estando a diferença principalmente na menor atividade de β -glicosidase e β -xilosidase.

O ensaio 16 contém todas as enzimas nos níveis máximos, no entanto não conseguiu atingir a melhor conversão de celulose e hemicelulose; sugerindo que os efeitos observados podem ter ocorrido pelas diferentes proporções das enzimas, descartando a possibilidade de obter um melhor resultado pela adição de mais atividade enzimática e carga de proteínas.

Figura 12: Rendimento de hidrólise da celulose do bagaço de cana-de-açúcar com baixo teor de lignina, utilizando diferentes misturas de enzimas. Cada ensaio representa uma mistura de enzimas de acordo com a tabela 2.

Figura 13: Rendimento de hidrólise da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar com baixo teor de lignina, utilizando diferentes misturas de enzimas. Cada ensaio representa uma mistura de enzimas de acordo com a tabela 2.

Tabela 8: Rendimento de hidrólise de celulose e hemicelulose obtidos em 24 e 48 h de hidrólise com o planejamento fatorial 2^4 completo com 6 pontos centrais.

Experimento	Variáveis (UI)				Resultado 24 horas		Resultado 48 horas	
	A	B	C	D	% Hidrólise celulose	% Hidrólise hemicelulose	% Hidrólise celulose	% Hidrólise hemicelulose
1	5	5	2,5	2,5	46,41	48,84	71,77	67,55
2	15	5	2,5	2,5	45,82	50,28	74,71	72,92
3	5	15	2,5	2,5	49,02	53,15	72,28	69,44
4	15	15	2,5	2,5	50,58	56,26	83,73	82,64
5	5	5	7,5	2,5	52,21	55,23	82,32	78,26
6	15	5	7,5	2,5	49,75	53,74	83,13	79,97
7	5	15	7,5	2,5	51,86	55,27	63,16	60,50
8	15	15	7,5	2,5	57,37	51,10	62,51	54,22
9	5	5	2,5	7,5	57,63	51,33	62,79	54,46
10	15	5	2,5	7,5	57,95	53,44	69,26	61,41
11	5	15	2,5	7,5	62,69	57,74	70,79	61,80
12	15	15	2,5	7,5	60,35	56,00	71,77	63,03
13	5	5	7,5	7,5	65,26	60,95	71,10	62,09
14	15	5	7,5	7,5	56,76	52,86	66,02	58,07
15	5	15	7,5	7,5	59,78	53,99	64,15	56,23
16	15	15	7,5	7,5	64,52	59,98	73,11	64,42
17	10	10	5	5	56,71	54,15	65,99	59,50
18	10	10	5	5	61,60	59,77	69,47	62,39
19	10	10	5	5	60,68	60,34	68,93	62,39
20	10	10	5	5	56,01	53,47	63,80	58,28
21	10	10	5	5	55,02	52,74	66,87	61,08
22	10	10	5	5	60,33	58,14	66,38	59,55

A: xilanase 10 B: xilanase 11 C: β -xilosidase D: β -glicosidase.

Os ensaios 8, 12 e 16 contêm as mesmas atividades de xilanases do ensaio 4, porém eles tem o dobro da β -xilosidase e/ou β -glicosidase (Tabela 8). Neste sentido, pode ser que as combinações de enzimas dos ensaios 8, 12 e 16 levem à geração de altas quantidades de

xilose, glicose e xilo-oligômeros nas primeiras horas de hidrólise, os quais podem ter causado a diminuição da velocidade de hidrólise da celulose (QING; WYMAN, 2011a). Este efeito pode ser notado pela maior conversão da celulose nos ensaios 8, 12 e 16 nas 24 horas de hidrólise, mas a velocidade de reação diminui em seguida e não supera os rendimentos de hidrólise obtidos nos ensaios 4, 5 e 6.

Outra explicação para o baixo rendimento de hidrólise no ensaio suplementado com os níveis mais altos das enzimas (ensaio 16) pode ser devido a competição das xilanases pelos sítios de união à celulose (BERLIN et al. 2007; BURA; CHANDRA; SADDLER, 2009). Os autores observaram efeitos negativos na conversão enzimática da celulose da palha de milho pré-tratado com ácido diluído quando suplementada com altos níveis de enzimas.

Nota-se na tabela 8 que rendimentos de hidrólise da celulose e hemicelulose variaram entre os ensaios. Uma análise da estimativa dos efeitos foi então realizada para identificar as variáveis que tem influência no processo de hidrólise. No gráfico de Pareto apresentado na figura 14 estão apresentados os efeitos estimados de cada variável estudada, bem como a interação entre elas, analisado com um intervalo de confiança de 95%. Observa-se através destes gráficos que a atividade de β -xilosidase e β -glicosidase são significativas para a conversão de celulose nas 24 horas de hidrólise.

Os gráficos também mostram que a xilanase 11 e a curvatura estão muito perto de serem estatisticamente significativas, portanto foi feita uma nova análise estatística com um nível de confiança de 90%, já que se estes efeitos não fossem considerados pode-se-ia descartar componentes importantes da mistura. Na figura 15 estão representados os gráficos de Pareto para as hidrólises da celulose nas 24 horas com um nível de confiança de 90%.

A β -glicosidase foi a variável de maior influência (+7,34) na liberação de glicose, seguida pela β -xilosidase (+2,42) e xilanase 11 (+2,18). A interação entre a xilanase 10 e xilanase 11 também foi estatisticamente significativa para esta resposta, com um efeito de sinal positivo (+1,85) sugerindo que todos os componentes são importantes nas 24 horas de hidrólise da celulose. Como a curvatura foi significativa com um intervalo de confiança de 90% há indicação de que um modelo quadrático poderia explicar melhor os resultados obtidos, ainda mais considerando que quando foi feita uma análise com um nível de confiança de 95% a curvatura ficou muito perto de ser significativa.

Figura 14: Gráfico de Pareto para o efeito das variáveis: xilanase 10, xilanase 11, β -glicosidase e β -xilosidase, nas respostas conversão de celulose em 24 horas de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. Efeitos acima da linha $p=0,05$ são significativos ao nível de 95% de confiança. $R^2=0,88256$.

Figura 15: Gráfico de Pareto para o efeito das variáveis: xilanase 10, xilanase 11, β -glicosidase e β -xilosidase, nas respostas conversão de celulose em 24 horas de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. Efeitos acima da linha $p=0,1$ são significativos ao nível de 90% de confiança. $R^2=0,88256$.

Na tabela 9 estão mostrados os resultados obtidos para a conversão de celulose e hemicelulose respectivamente, com o planejamento ampliado em estrela. Não foi possível observar diferenças nos resultados de rendimento de glicose comparado com o planejamento anterior, sugerindo que os níveis máximos e mínimos das enzimas acrescentados com os pontos axiais do planejamento em estrela (ensaios 23 a 30) não tiveram um efeito positivo na mistura de enzimas; à exceção do ensaio 29 em que não foi colocada a enzima β -glicosidase e se observou a diminuição drástica na conversão de celulose (Tabela 9). Este comportamento não foi observado na conversão de hemicelulose, chegando a 60,2% nas 48 horas, valor similar ao observado nos pontos centrais (Tabela 9).

As velocidades iniciais de reação foram calculadas nas primeiras 6 horas de hidrólises, e mostram-se diferentes em todos os ensaios. A velocidade inicial da conversão da xilana foi superior em todos os ensaios testados, comparado com os valores obtidos para celulose. No caso da conversão da celulose, o menor valor de velocidade inicial foi para o ensaio 29 ($2,11 \% \cdot h^{-1}$), que não tem β -glicosidase. Quando foram adicionadas 20 UI de β -glicosidase por grama de bagaço (ensaio 30) a velocidade inicial aumentou para $5,19 \% \cdot h^{-1}$; sendo superado somente pelo ensaio 16 que possui todas as enzimas no nível +1. De forma interessante, os ensaios que apresentaram os maiores rendimentos de hidrólise (4, 5 e 6) nas 48 horas de reação, não foram os que apresentaram maiores velocidades iniciais, sendo as maiores velocidades encontradas nos ensaios que continham altas quantidades de β -glicosidase (ensaio 30), β -xilosidase (ensaio 28), ou combinações delas nos níveis +1 (ensaios 13, 14, 15 e 16).

Quando foi feita a análise estatística usando a metodologia de superfície de resposta, observou-se que a β -xilosidase e β -glicosidase foram significativas nas 24 horas com um nível de confiança de 95%. A interação entre a xilanase 10 e 11 (termo AB) foi significativa a um nível de confiança de 90%. Na tabela 10 estão apresentadas a significância estatística dos efeitos principais e de suas interações sobre a hidrólise de celulose nas 24 horas de reação, através da análise de variância realizada para um modelo quadrático. Os valores mostrados correspondem ao modelo já simplificado.

Tabela 9: Velocidade inicial e rendimento de hidrólise de celulose e hemicelulose com o planejamento fatorial 2^4 completo com 6 pontos centrais ampliado em estrela.

Bagaço pré-tratado com 10% Na_2SO_3 e 5% NaOH								
Glicose					Xilose			
Misturas	Velocidade inicial (%*h ⁻¹)	R ²	Conversão em 24 h	Conversão em 48 h	Velocidade inicial (%*h ⁻¹)	R ²	Conversão em 24 h	Conversão em 48 h
Ensaio 1	3,61	0,99	46,41	71,77	4,94	1,00	48,84	67,55
Ensaio 2	3,35	0,99	45,82	74,71	4,91	0,94	50,28	72,92
Ensaio 3	3,42	0,99	49,02	72,27	5,05	0,97	53,15	69,44
Ensaio 4	3,45	0,98	50,57	83,73	5,27	0,94	56,26	82,64
Ensaio 5	3,54	0,96	52,21	82,32	5,20	0,90	55,23	78,26
Ensaio 6	3,55	1,00	49,75	83,13	5,48	0,98	53,74	79,97
Ensaio 7	3,38	0,99	51,85	63,16	5,07	0,94	55,27	60,49
Ensaio 8	3,44	0,98	57,37	62,51	5,10	0,90	51,10	54,22
Ensaio 9	4,51	0,97	57,62	62,78	4,93	0,92	51,33	54,46
Ensaio 10	4,76	0,96	57,95	69,26	5,38	0,90	53,4	61,41
Ensaio 11	4,75	0,99	62,69	70,79	5,42	0,98	57,74	61,80
Ensaio 12	4,75	0,98	60,35	71,77	5,65	0,96	55,99	63,03
Ensaio 13	5,21	0,98	65,26	71,10	5,85	0,96	60,95	62,09
Ensaio 14	4,71	0,96	56,75	66,02	5,27	0,92	52,86	58,07
Ensaio 15	4,86	0,95	59,78	64,14	5,25	0,89	53,99	56,23
Ensaio 16	5,27	0,98	64,52	73,11	6,14	0,94	59,99	64,42
Ensaio 17	4,14	0,97	56,71	65,99	5,08	0,92	54,15	59,49
Ensaio 18	4,39	0,97	61,60	69,46	5,52	0,91	59,77	62,39
Ensaio 19	4,53	0,98	60,68	68,92	5,77	0,94	60,34	62,39
Ensaio 20	4,44	0,98	56,01	63,80	5,45	0,93	53,47	58,28
Ensaio 21	4,42	0,96	55,02	66,87	5,47	0,91	52,75	61,08
Ensaio 22	4,60	0,97	60,33	66,38	5,76	0,94	58,14	59,55
Ensaio 23	4,06	0,97	58,27	67,31	4,71	0,93	54,51	58,69
Ensaio 24	4,46	0,97	60,62	67,07	5,57	0,92	58,93	60,71
Ensaio 25	4,66	0,99	59,87	67,08	5,46	0,94	57,54	60,21
Ensaio 26	4,32	0,96	57,36	66,93	5,30	0,89	55,56	60,69
Ensaio 27	4,24	0,96	52,52	61,27	5,09	0,90	48,90	54,47
Ensaio 28	4,82	0,97	54,28	61,11	5,89	0,95	50,90	53,94
Ensaio 29	2,11	0,73	33,89	47,05	4,90	0,91	52,01	60,23
Ensaio 30	5,19	0,96	60,67	68,25	5,46	0,92	54,90	59,92

Tabela 10: Análise de variância com erro total para a conversão de celulose em 24 horas, usando um modelo quadrático.

Fatores	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p	Contribuição (%)
Modelo	1078,88	7	154,13	22,22	< 0.0001*	
A-Xilanase 10	0,36	1	0,36	0,05	0.8220	0,03
B-Xilanase 11	15,60	1	15,60	2,25	0.1479	1,27
C- β -Xilosidase	38,92	1	38,92	5,61	0.0270*	3,16
D- β -Glicosidase	764,82	1	764,82	110,27	< 0.0001*	62,11
AB	26,75	1	26,75	3,86	0.0623**	2,17
C ²	39,96	1	39,96	5,76	0.0253*	3,24
D ²	209,95	1	209,95	30,27	< 0.0001*	17,05
Resíduos	152,59	22	6,94			
Falta de ajuste	113,38	17	6,67	0,85	0.6388	
Erro	39,21	5	7,84			
Total	1231,47	29				

Coeficiente de variação: 4,71%; R²: 0,876; R² ajustado: 0,836; R² predito: 0,746; *: significativo com um nível de confiança de 95%; **: significativo com um nível de confiança de 90%.

A análise de variância para a superfície de resposta mostrou que o modelo quadrático é significativo e não apresenta falta de ajuste, explicando a resposta obtida em 87%. Tanto a xilanase 10 como a xilanase 11 não foram significativas nas condições em que foram feitas as análises, no entanto a interação delas (termo AB, Tabela 10) foi significativa com um intervalo de confiança de 90%, sugerindo que a ação conjunta delas é importante para o rendimento de hidrólise da celulose nas 24 horas.

O comportamento e a interação das hemicelulases em substratos complexos, onde a xilana interage com a lignina, ainda precisa de uma pesquisa mais aprofundada (VAN DYK; PLETSCHE, 2012), mas já foi reportado que as xilanases da família 10 e 11 agem em sinergia e a presença simultânea das xilanases das duas famílias melhora a porcentagem de conversão de celulose em glicose (BANERJEE; SCOTT-CRAIG; WALTON, 2010b; GAO et al., 2011). Esta última informação poderia explicar a importância da interação entre as xilanases 10 e 11, obtida quando foram analisados estatisticamente os resultados dos ensaios com o substrato com menor teor de lignina. Neste sentido as xilanases estariam aumentando a hidrólise da celulose por agir removendo

polissacarídeos não celulósicos que poderiam estar cobrindo as fibras de celulose, melhorando a acessibilidade (BERLIN et al., 2007). As altas porcentagens de conversão de celulose alcançadas em alguns ensaios em tempos curtos pode ser devido a presença de celulose mais disponível para serem hidrolisadas.

Pribowo; Arantes e Saddler (2012) mostraram em palha de milho pré-tratado pela técnica de “explosão ao vapor”, que a xilanase 10 de *T. reesei* permanece inicialmente no sobrenadante para depois se adsorver no substrato, entretanto ao longo de 72 horas de reação a atividade diminui presumivelmente por inativação por calor ou destruição da enzima pela agitação. Os mesmos autores mostram que a xilanase 11 de *T. reesei* desaparece gradualmente do sobrenadante durante as primeiras 5 horas de hidrólise. Medidas de adsorção de proteínas indicaram que a xilanase 11 não adsorve no substrato e que o desaparecimento da atividade ocorre por desnaturação. Este comportamento da xilanase 11 nos substratos poderia explicar porque no experimento feito com o substrato com baixo teor de lignina a xilanase 11 não foi importante após 24 horas de hidrólise. É bem provável que a xilanase 11 tenha hidrolisado a hemicelulose disponível nas primeiras horas de reação e após 24 horas já não funcione mais, similar ao reportado por Pribowo; Arantes e Saddler (2012). O desaparecimento da atividade de xilanase 11 dentro das 6 primeiras horas de hidrólise também foi observado por Varnai et al. (2011). É reportado que a xilanase 11 é termicamente instável, e que forma agregados de proteínas quando sofre desnaturação térmica (JANIS et al., 2008); sugerindo que poderia ter acontecido o mesmo nas condições de ensaio deste trabalho.

Pode-se observar que a β -glicosidase contribui na explicação da conversão enzimática em 79,16%, sendo o componente mais importante da mistura. A β -xilosidase explica 6,4% da variação da resposta, sendo muito menos importante na mistura para a conversão de celulose nas 24 horas de hidrólise. A interação da xilanase 10 com a xilanase 11 explica 2,17% a variação da resposta. As xilanasas 10 e 11 apresentam uma contribuição de 0,03% e 1,27% respectivamente (Tabela 10).

Quando foi analisada a conversão de celulose nas 4 horas de hidrólise, a xilanase 10 foi estatisticamente significativa e as outras enzimas da mistura não. É muito provável que a ação das xilanasas ocorra nas primeiras horas de hidrólise, e em 24 horas a importância delas diminui, quando se pensa em remoção da hemicelulose. Isto estaria de acordo com o reportado na literatura, já que a função inicial da xilanase seria remover parte da hemicelulose facilitando a hidrólise da celulose (ZHANG et al., 2011; HU; ARANTES; SADDLER, 2011; GAO et al. 2011; LIN et al., 2011). No entanto, nas 24 horas, a interação

da xilanase 10 e 11 foi estatisticamente significativa com um nível de confiança de 90%. Quando o termo AB foi excluído das análises, se observou uma queda no valor de R^2 , sugerindo a sua importância para o modelo. Resultados da literatura evidenciam a importância do uso de xilanases para a hidrólise enzimática. É reportado que a hidrólise enzimática requer sinergismo entre as endo-xilanases e a β -xilosidase para as xilanas não substituídas (KUMAR; WYMAN, 2009) e entre as xilanases e enzimas acessórias para xilanas substituídas (DE VRIES et al., 2000).

A equação obtida para a mistura de enzimas nas 24 horas de hidrólise usando a metodologia de superfície de resposta foi a seguinte:

$$\% \text{ Conversão Celulose} = 58.98137 + 0.12241 \text{ Xilanase 10} + 0.80627 \text{ Xilanase 11} + 1.27351 \beta\text{-Xilosidase} + 5.64512 \beta\text{-Glicosidase} + 1.29302 (\text{Xilanase 10} * \text{Xilanase 11}) - 1.18524 (\beta\text{-Xilosidase})^2 - 2.71681 (\beta\text{-Glicosidase})^2.$$

Através da equação obtida do modelo foi possível construir uma superfície de resposta para a conversão de celulose na região estudada (Figura 16). Os valores para xilanase 10 e 11 foram deixados fixos em nível codificado zero e variou-se os valores de β -xilosidase e β -glicosidase.

A figura 16 mostra que a resposta está bem ajustada à superfície e que os maiores valores de conversão de celulose podem ser obtidos usando 17 UI de xilanase 10; 19 UI de xilanase 11; 5 UI de β -xilosidase e 7 UI β -glicosidase, por grama de bagaço.

Na figura 17 estão representadas as hidrólises enzimáticas para celulose e hemicelulose respectivamente, feita até 72 horas para a mistura controle e a solução otimizada obtida com a análise de superfície de resposta. Observa-se que para a hidrólise da celulose, a cinética da reação foi muito similar até 24 horas para a mistura controle e para a mistura otimizada fornecida pelo programa estatístico. Conforme avança a reação, após 24 horas, começa a se evidenciar uma maior conversão de celulose na mistura otimizada comparada com o controle, apresentando nas 48 h 6,6% a mais de conversão de celulose.

Na cinética de hidrólise da hemicelulose se evidenciam maiores diferenças entre as misturas testadas, sendo observáveis desde os tempos iniciais de hidrólise. Por exemplo, nas 4 horas de reação, a diferença entre as 2 misturas é de 8,0% e nas 48 horas 15% a favor

da mistura otimizada. Similar ao mostrado na conversão de glicose, nas 72 horas a diferença caiu para 6,5% (Figura 17).

Figura 16: Superfície de resposta descrita pelos modelos para a conversão de celulose da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Xilanase 10 e 11 foram fixados no nível zero.

Figura 17: Conversão de celulose (A) e hemicelulose (B) durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino (10% Na_2SO_3 e 5% NaOH). (●) mistura de enzimas otimizada pelo planejamento experimental; (▲) mistura de referência.

Foram realizadas as análises de variância em todos os tempos testados comparando a mistura otimizada com a mistura de referência. No caso da hemicelulose, foram obtidas diferenças estatisticamente significativas em todos os tempos. Para celulose não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas 2, 24 e 72 horas de hidrólise com um nível de confiança de 95%.

Os valores de conversão preditos pelo programa estatístico foram superiores aos obtidos experimentalmente para a mistura escolhida para a otimização. Nas 24 horas de hidrólise o programa previu 66,84% de conversão para celulose, e experimentalmente foi obtido um valor de 54,63%. Estas diferenças podem ser atribuídas ao modelo estatístico já que explica a conversão de celulose em 87,6%; por tanto, a diferença obtida pode ser produto dos 12,4% que o modelo não consegue explicar. Isto também pode justificar porque a mistura otimizada não conseguiu superar aos melhores resultados dos ensaios do planejamento.

A diferença observada entre os resultados obtidos com os dois preparados enzimáticos nas 48 horas de hidrólise pode ser explicada pela maior conversão de hemicelulose da mistura otimizada. Como discutido anteriormente, a literatura reporta que a função inicial das hemicelulases é a remoção de parte da hemicelulose facilitando a hidrólise da celulose (HU; ARANTES; SADDLER, 2011; GAO et al. 201; LIN et al., 2011; ZHANG et al., 2011). A mistura de referência possui uma menor quantidade de xilanases que a mistura otimizada (60 UI versus 104,15 UI por grama de bagaço), assim como também de β -xilosidase (3 UI versus 5 UI por grama de bagaço), enquanto que a β -glicosidase foi menor (13UI versus 7 UI por grama de bagaço).

Os resultados da cromatografia em camada delgada (TLC) nas 6 e 48 horas de hidrólise enzimática mostram em todos os ensaios a presença de xilo-oligômeros, incrementando-se conforme avança a hidrólise enzimática (Figura 18). Foram escolhidos os ensaios 16, 24, 26 e 28 porque o ensaio 16 foi feito com todas as enzimas nos níveis +1, o ensaio 24 foi escolhido porque não tem xilanase 10, o ensaio 26 não tem xilanase 11 e o 28 não tem a β -xilosidase. Considerando que os resultados são apenas qualitativos, não foi possível afirmar qual ensaio apresenta maior concentração de xilo-oligômeros, mas foi detectada a presença de xilose, xilobiose e xilotriose.

Figura 18: Cromatografia em camada delgada (TLC) feita com o sobrenadante da hidrólise enzimática do substrato pré-tratado com 10% de Na_2SO_3 e 5% de NaOH , obtida nas 6 e 48 horas. As composições enzimáticas dos ensaios estão indicadas na tabela 3.

A presença de xilo-oligómeros detectada em todos os ensaios pode sugerir a inibição de parte das enzimas durante a hidrólise.

Qing; Yang e Wyman (2010) sugerem a remoção da hemicelulose dos materiais lignocelulósicos antes de aplicar as celulases. Este procedimento não só poderia incrementar a acessibilidade das enzimas, mas também reduzir a inibição das celulases por xilo-oligossacarídeos liberados durante a hidrólise enzimática. Esta possibilidade é consistente com os trabalhos que mostram que a remoção da hemicelulase antes da hidrólise enzimática foi mais favorável para os rendimentos de hidrólises do que adicionar altas quantidades de enzima.

As melhores conversões de celulose observadas nos ensaios que tinham uma menor quantidade de proteína (4, 5, 6) comparados com outros que possuíam maiores quantidades (8, 12, 16), podem ser explicadas pelos trabalhos que mostram que um excesso de

xilanases poderia competir com as celulases pelos sítios de união à celulose (BERLIN et al., 2007; QING; YANG; WYMAN, 2010; QING; WYMAN 2011b). QING; WYMAN (2011a) mostram também que com altas quantidades de xilanases não foi possível hidrolisar todos os xilo-oligossacarídeos, sustentando que altas cargas de enzimas não necessariamente vão favorecer a hidrólise enzimática.

5.8 Efeito da mistura de enzimas na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com alto teor de lignina

O substrato com mais lignina foi hidrolisado com as misturas de enzimas definidas pelo planejamento fatorial 2^4 ampliado em estrela. As cinéticas de conversão de celulose e hemicelulose obtidas em cada condição experimental estão apresentadas nas Figuras 19 e 20. As curvas de hidrólise apresentaram perfis e níveis de hidrólise muito semelhantes. Observa-se este mesmo efeito no ensaio 29 que não tem β -glicosidase. A diferença do ensaio com a maior conversão de celulose em 48 horas de hidrólise (ensaio 8) para o de menor conversão (ensaio 14) é de apenas 5,4 pontos percentuais (Tabela 11), sugerindo que a recalcitrância do material causada pelo alto conteúdo de lignina não é diminuída pela adição de mais enzimas.

O rendimento de hidrólise do bagaço tratado com a mistura enzimática controle (5 FPU e 10 UI de B-glicosidase) foi de 50,7% em 48 h, valor superior aos obtidos com as diferentes misturas enzimáticas (Figura 19, Tabela 11). O mesmo comportamento foi observado para a hidrólise da hemicelulose (Figura 20).

Figura 19: Rendimento de hidrólise da celulose do bagaço de cana-de-açúcar com alto teor de lignina, utilizando diferentes misturas de enzimas. Cada ensaio representa uma mistura de enzimas de acordo com a tabela 3.

Figura 20: Rendimento de hidrólise da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar com alto teor de lignina, utilizando diferentes misturas de enzimas. Cada ensaio representa uma mistura de enzimas de acordo com a tabela 3.

Tabela 11: Velocidade inicial e rendimento de hidrólise de celulose e hemicelulose com o planejamento fatorial 2^4 completo com 6 pontos centrais ampliado em estrela.

Bagaço pré-tratado com 5% Na_2SO_3 e 2,5% NaOH								
Glicose					Xilose			
Misturas	Velocidade inicial (%*h ⁻¹)	R ²	Conversão (6 h)	Conversão (48 h)	Velocidade inicial (%*h ⁻¹)	R ²	Conversão (6 h)	Conversão (48 h)
Ensaio 1	3,19	0,96	19,47	40,04	2,21	0,96	13,46	30,05
Ensaio 2	3,46	0,95	21,01	40,89	2,48	0,93	15,04	31,54
Ensaio 3	3,13	0,96	19,30	40,58	2,13	0,96	13,13	30,60
Ensaio 4	3,49	0,94	21,39	40,29	2,46	0,92	15,19	30,99
Ensaio 5	3,30	0,96	20,51	39,96	2,35	0,95	14,64	31,18
Ensaio 6	3,36	0,95	20,57	40,38	2,45	0,92	15,09	31,75
Ensaio 7	3,02	0,93	18,91	39,36	2,38	0,95	15,07	30,13
Ensaio 8	3,59	0,94	22,08	44,06	2,66	0,91	16,26	34,60
Ensaio 9	3,89	0,91	24,16	41,47	2,49	0,92	15,39	31,61
Ensaio 10	4,04	0,92	25,10	42,72	2,63	0,93	16,28	33,22
Ensaio 11	3,92	0,92	24,25	42,26	2,49	0,93	15,33	32,10
Ensaio 12	3,47	0,92	21,63	38,18	2,29	0,92	14,23	29,31
Ensaio 13	3,66	0,91	22,78	40,73	2,38	0,92	14,75	30,71
Ensaio 14	3,67	0,91	23,03	38,05	2,42	0,91	15,15	29,39
Ensaio 15	3,75	0,90	23,16	41,43	2,43	0,92	14,93	31,70
Ensaio 16	3,91	0,94	24,55	40,02	2,57	0,94	16,07	30,89
Ensaio 17	3,56	0,93	21,81	41,39	2,34	0,93	14,26	31,39
Ensaio 18	3,77	0,93	23,05	41,08	2,52	0,91	15,37	31,84
Ensaio 19	3,84	0,95	23,71	42,62	2,59	0,94	15,97	32,53
Ensaio 20	3,47	0,93	21,37	38,57	2,09	0,93	12,76	28,54
Ensaio 21	3,64	0,95	22,12	39,79	2,45	0,95	14,52	30,70
Ensaio 22	3,67	0,92	22,90	42,09	2,44	0,92	15,21	32,63
Ensaio 23	3,47	0,93	21,37	38,57	2,09	0,93	12,76	28,54
Ensaio 24	3,64	0,95	22,12	39,79	2,41	0,95	14,57	30,70
Ensaio 25	3,67	0,92	22,90	42,09	2,44	0,92	15,21	32,63
Ensaio 26	3,79	0,95	22,84	41,40	2,55	0,96	15,31	32,07
Ensaio 27	3,72	0,94	22,94	40,83	2,46	0,95	15,08	31,45
Ensaio 28	3,69	0,93	22,64	40,60	2,50	0,92	15,27	31,08
Ensaio 29	2,50	0,96	15,12	38,72	2,34	0,91	14,14	31,29
Ensaio 30	3,55	0,91	21,79	41,88	2,29	0,92	13,97	31,41

Mesmo com este resultado de hidrólise pouco significativo em termos de rendimento, foi de interesse analisar se alguma das enzimas apresentava efeito na hidrólise da celulose ou hemicelulose.

As velocidades iniciais foram medidas nas primeiras 6 horas de reação (Tabela 11). Observa-se que as velocidades iniciais são muito parecidas entre todos os ensaios e que a velocidade inicial de conversão da xilana é menor que a velocidade inicial de conversão de celulose, fato que é completamente oposto ao comportamento mostrado pelo substrato com baixo teor de lignina.

O ensaio 29 que não contém β -glicosidase foi o que apresentou menor velocidade inicial na conversão da celulose, resultado que também foi observado no substrato com baixo teor de lignina. O ensaio que apresentou a maior conversão nas 48 horas não foi o ensaio que obteve a maior velocidade inicial. Semelhante ao ocorrido no ensaio feito com o substrato com baixo teor de lignina, o ensaio que apresentou maior conversão de celulose mostrou também a maior conversão de hemicelulose.

Na tabela 12 estão apresentados os resultados estatísticos obtidos com a metodologia de superfície de resposta para o planejamento com o substrato pré-tratado com baixa carga de sulfito nas seis horas de hidrólise enzimática, devido a que em tempos superiores a 6 horas o modelo apresentou falta de ajuste.

Os resultados mostram que nas seis horas de hidrólise o modelo consegue explicar 75,22% da variação dos resultados, sendo significativas a ação da xilanase 10 e da β -glicosidase. A contribuição das enzimas da mistura na hidrólise de celulose nas 6 horas foram as seguintes: 5,91% da xilanase 10, 0,35% da xilanase 11, 0,39% da β -xilosidase e 68,55% da β -glicosidase. A otimização foi feita incluindo os fatores xilanase 11 e β -xilosidase, porque a análise estatística feita em 6 e 8 horas de hidrólise mostrou que a xilanase e β -xilosidase foram significativas para a conversão de celulose. Assim, a equação obtida foi a seguinte:

$$\% \text{ Conversão Celulose} = 22,76075 + 0,54083 \text{ Xilanase 10} + 0,13210 \text{ Xilanase 11} + 0,13943 \beta\text{-Xilosidase} + 1,42052 \beta\text{-Glicosidase} - 1,06965 (\beta\text{-Glicosidase})^2.$$

Tabela 12: Análise de variância (ANOVA) para a superfície de resposta usando um modelo quadrático, dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a conversão de celulose nas seis horas de hidrólise enzimática.

Fatores	Soma quadrática	Graus de liberdade	Media quadrática	F	<i>p</i>	Contribuição (%)
Modelo	89,29	5	17,86	14,57	< 0.0001*	
A-Xilanase 10	7,02	1	7,02	5,73	0.0249*	5,91%
B-Xilanase 11	0,42	1	0,42	0,34	0.5643	0,35%
C- β -Xilosidase	0,47	1	0,47	0,38	0.5430	0,39%
D- β -Glicosidase	48,43	1	48,43	39,52	< 0.0001*	40,79%
D ²	32,95	1	32,95	26,89	< 0.0001*	27,76%
Resíduos	29,41	24	1,23			
Falta de ajuste	26,72	19	1,41	2,61	0.1458	
Erro	2,69	5	0,54			
Total	118,70	29				

Coefficiente de variação: 5,05%; R^2 : 0,752; R^2 ajustado: 0,700; R^2 predito: 0,606; *: significativo a um nível de confiança de 95%.

A figura 21 representa o gráfico da superfície de resposta obtida, quando foram fixados os valores para xilanase 11 e β -xilosidase em nível zero, variando os valores para xilanase 10 e β -glicosidase.

O gráfico de superfície de resposta mostra que foi possível atingir um ponto máximo para a hidrólise da celulose; pelo que foi feita a otimização e validação do modelo obtido. Obtendo os seguintes valores para cada enzima: 18,15 UI de xilanase 10; 19,95 UI de xilanase 11; 10 UI de β -xilosidase e 6,55 UI de β -glicosidase. Apesar de que a ação das enzimas xilanase 11 e β -xilosidase não forem significativas, não foram excluídos da mistura otimizada devido a que nos resultados obtidos com o substrato com baixo teor de lignina mostraram ser significativas para a hidrólise da celulose.

Figura 21: Superfície de resposta descrita pelos modelos para a conversão de celulose da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para o substrato com alto teor de lignina. Xilanase 11 e β -xilosidase foram fixados no nível zero.

As figuras 22A e 22B mostram a hidrólise enzimática para celulose e hemicelulose respectivamente, feita até 48 horas para a mistura referência e a solução otimizada obtida com a análise de superfície de resposta. Observa-se que para a hidrólise da celulose e hemicelulose a cinética da reação foi similar até 8 horas de reação para a mistura controle e para a mistura otimizada fornecida pelo programa estatístico. Isto difere muito do planejamento anterior, que foi similar até 24 horas de hidrólise. Desde as 2 horas de reação, a mistura referência promoveu uma maior conversão de celulose e hemicelulose que a mistura otimizada, e conforme avança a reação, a diferença aumenta a favor da mistura referência, apresentando nas 48 horas 6,9% e 9,8% a mais de conversão de celulose e hemicelulose respectivamente .

Figura 22: Conversão de celulose (A) e hemicelulose (B) durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino (5% Na_2SO_3 e 2,5% NaOH). (—●—) mistura de enzimas otimizada pelo planejamento experimental; (—▲—) mistura de referência.

Foram realizadas as análises de variância (ANOVA) em todos os tempos testados comparando a mistura otimizada com o controle. Na hidrólise de celulose houve diferenças estatisticamente significativas nas 6, 24 e 48 horas e no caso da hemicelulose houve diferenças estatísticas significativas a partir de 6 h de reação.

A mistura referência foi mais adequada para a hidrólise do bagaço com maior teor de lignina, sugerindo que o preparado enzimático da Novozym contém proteínas com maior especificidade para esse substrato. Tal resultado poderia ser atribuído às xilanases e β -xilosidases do extrato novozym, que podem ser mais resistentes à desnaturação ou mesmo apresentar um ponto isoelétrico inferior às enzimas utilizadas nos ensaios de hidrólise enzimática. Este fator diminuiria a adsorção eletrostática das enzimas na lignina sulfonada e carregada negativamente e poderia explicar a maior conversão obtida com a mistura controle em comparação com a mistura otimizada.

É importante lembrar que com o pré-tratamento usado neste trabalho, a lignina sofre modificações estruturais devido à inserção de grupos sulfito principalmente no carbono α e em menor grau no carbono β , ficando nestes lugares carregada negativamente (REHBEIN et al., 2010; FENGEL; WEGENER, 1989). A primeira dissociação do ácido sulfuroso tem um valor de pK_a de 1,77 e o segundo possui um valor de 7,22; portanto no pH 4,8 (valor no qual é feita a hidrólise), os grupos sulfitos unidos à lignina estão carregados negativamente. As xilanases 10 e 11 possuem um ponto isoelétrico de 5,9 e 6,5, respectivamente, portanto no pH usado na hidrólise (4,8) as enzimas ficam carregadas

positivamente, podendo interagir mais facilmente com a lignina em termos de interações eletrostáticas. Isto poderia explicar em parte a pouca melhora obtida com a adição das enzimas purificadas, sendo necessário realizar experimentos com um valor de pH maior para sustentar de forma mais sólida esta idéia. Os pontos isoelétricos da β -xilosidase e da β -glicosidase são 5,4 e 4,0, respectivamente. A maioria das celulasas de *Trichoderma reesei* apresenta valores de ponto isoelétrico entre 4,5 e 5,0 (www.brenda-enzymes.org); desta forma as enzimas presentes no preparado de celluclast estariam sendo menos afetadas por este tipo de efeito.

Os sobrenadantes de algumas reações de hidrólise enzimática foram cromatografados em TLC na tentativa de avaliar se poderiam existir efeitos inibitórios por xilo-oligossacarídeos (Figura 23).

Foram aplicadas na placa de TLC os sobrenadantes das amostras 16, 24, 26 e 28 pelas mesmas razões descritas anteriormente. Este resultado mostra a presença de xilo-oligossacarídeos na mistura otimizada e nos ensaios feitos com o planejamento experimental. Observa-se nas 6 horas de reação a presença de xilotriose, que parece ter sido degradada em 48 horas de hidrólise. A maior concentração dos produtos de hidrólise no sobrenadantes refere-se a oligossacarídeos de baixa massa molar, que também inibem xilanases e celulasas. Esse resultado mostra que durante toda a reação há produção de xilooligossacarídeos que não são totalmente convertidos a xilose.

Figura 23: Cromatografia em camada delgada (TLC) feita com o sobrenadante da hidrólise enzimática do substrato pré-tratado com 5% de Na_2SO_3 e 2,5% de NaOH , obtida nas 6 e 48 horas. As composições enzimáticas dos ensaios estão indicadas na tabela 3.

Os menores rendimentos de hidrólise da celulose obtidas nos substratos com alto teor de lignina podem estar associados não somente pela presença dos xilo-oligosacarídeos (Figura 23), mas também à xilana residual nesta amostra. No ensaio de hidrólise deste substrato apenas 40% da xilana foi solubilizada (Figura 22). O possível mecanismo de ação de inibição seria pela união da xilana ao sítio ativo das celulases (inibição competitiva) e pela distribuição e interação da xilana com a superfície das cadeias de celulose (ZHANG; TANG; VIIKARI, 2012). Esses dois fatos explicariam as menores porcentagem de conversão obtidas na hidrólise da celulose e hemicelulose.

6. CONCLUSÕES

- O teor de lignina dos substratos usados no trabalho foram diferentes, porém esta característica não refletiu em diferenças nos valores de retenção de água e na área superficial específica da celulose.
- A lignina foi a principal responsável pela recalcitrância nos substratos testados, devido principalmente à barreira física estabelecida por ela nos materiais lignocelulósicos.
- A composição enzimática necessária para obter uma eficiente hidrólise depende mais do tipo de enzimas do que dos níveis usados.
- Foi possível desenhar e otimizar uma mistura de enzimas mais eficiente que a mistura de referência, usando a metodologia de superfície de resposta e um substrato pré-tratado com alta carga de sulfito e álcali, sugerindo que a hidrólise enzimática pode ser melhorada a través do desenho de misturas de enzimas.
- Uma suplementação com xilanases das família 10 e 11, β -xilosidase e β -glicosidase melhoram a hidrólise enzimática num substrato pré-tratado com alta carga de sulfito e álcali, mas os resultados indicam que um excesso destas enzimas não necessariamente favorece a conversão a monossacarídeos.
- Os experimentos realizados nos maiores níveis enzimáticos do planejamento resultaram em maior velocidade inicial de hidrólise, porém os oligossacarídeos produzidos podem ter sido a causa da diminuição no rendimento de hidrólise com o tempo.
- Os níveis de β -xilosidase que se encontram tanto nos preparados enzimáticos de referência como nas misturas otimizadas estão abaixo do desejado para hidrolisar todos os xilo-oligossacarídeos produzidos.
- A mistura otimizada foi mais eficiente na hidrólise da celulose e hemicelulose do que a mistura de referência, mesmo contendo 20% menos de atividade de β -glicosidase. A maior atividade de hemicelulases na mistura otimizada parece ter indiretamente melhorado a hidrólise dos polissacarídeos do bagaço.

REFERÊNCIAS

- ALÉN, R. Structure and chemical composition of wood. In STENIUS, P. (Editor). **Forest Products Chemistry**. Finlândia: Gummerus Printing, 2000a. p. 12.
- 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**, n. 101, v. 13, p. 4851 – 4861. 2010.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4, p. 1-11, 2010.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, n. 4, v. 3, p. 1-17, 2011.
- BAILEY, M.J.; BIELY, O.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v.23, p.257-270, 1992.
- BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J. S.; BORRUSCH, M. S.; WALTON, J. D. Rapid optimization of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, n. 1, p. 22, 2010a.
- BANERJEE, G.; SCOTT-CRAIG, J.S.; WALTON, JD. Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. **Bioenergy Research**, v. 3, p. 82–92. 2010b.
- BEATSON R. P. **Methods in lignin chemistry**. Berlin Heidelberg: Springer series in Wood Science. Springer-Verlag 1992. p. 473-483.
- BENDZALOVA, M.; PEKAROVICOVA, A.; KOKTA, B. V.; CHEN, R. Accessibility of swollen cellulosic fibers. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 30, p. 19-32, 1996.

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

BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBURN, D.; BURA, R.; MARKOV, A.; SKOMAROVSKY, A.; OKUNEV, O.; GUSAKOV, A.; MAXIMENKO, V.; GREGG, D.; SINITSYN, A.; SADDLER, J. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates-evidence for the role of accessory enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.175-184, 2005.

BERRY, S. L.; RODERICK, M. L. Plant-water relations and the fibre saturation point. **New Phytologist**, v. 168, p. 25-37, 2005.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 11, p. 286-290, 1985.

BURA, R.; CHANDRA, R.; SADDLER, J. Influence of Xylan on the Enzymatic Hydrolysis of Steam-Pretreated Corn Stover and Hybrid Poplar. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 2, p. 315-22, 2009.

CANILHA, L.; SANTOS, V.T.O.; ROCHA, G. J. M.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; GIULIETTI, M.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 1467-1475, 2011.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; SUZANE DOS SANTOS MILESSI, T.; ANTUNES, F. A. F.; LUIZ DA COSTA FREITAS, W.; DAS GRAÇAS ALMEIDA FELIPE, M.; DA SILVA, S. S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

CANTARELLA, M.; CANTARELLA, L.; GALLIFUOCO, A.; SPERA, A.; ALFANI, F. Effect of inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 200-206, 2004.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries : a review on biomass pretreatments. **Industrial Research**, v. 67, 849-864, 2008.

CHANDRA, R.; EWANICK, S.; HSIEH, C.; SADDLER, J. N. The characterization of pretreated lignocellulosic substrates prior to enzymatic hydrolysis, part 1: A modified Simons' staining technique. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 1178-1185, 2008.

CHANDRA, R.; SADDLER J. N. Use of the Simons' Staining Technique to Assess Cellulose Accessibility in Pretreated Substrates. **Industrial Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 230-237, 2012.

CHEN H-T, FM; LAI, Y-Z. Characteristics of bagasse lignin *in Situ* and in alkaline delignification. **Holzforschung**, v. 52, p. 635–639, 1998.

CHUNDAWAT, S. P. S.; BECKHAM, G. T.; HIMMEL, M. E.; DALE, B. E. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, n. 2, v. 1, p. 121-145, 2011.

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

DE VRIES RP, KESTER HCM, POULSEN CH, BENEN JAE, VISSER J. Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 327, n. 4, p. 401-10. 2000.

DEL RIO, L. F.; CHANDRA, R.P.; SADDLER, JN. The Effects of Increasing Swelling and Anionic Charges on the Enzymatic Hydrolysis of Organosolv-Pretreated Softwoods at Low Enzyme Loadings. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 7, p. 1549-58, 2011.

DRISSEN, R. E. T.; MAAS, R. H. W.; VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; KABEL, M. A.; SCHOLS, H. A.; TRAMPER, J.; BEEFTINK H. H. A generic model for glucose production from various cellulose sources by a commercial cellulase complex. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, n. 6, p. 419-429, 2007.

DRNOVSEKA, T.; PERDIH, A. Selective staining as a tool for wood fibre characterization. **Dyes Pigments**, v. 67, n. 3, p. 197–206. 2005.

ERIKSSON, K. E.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Berlin: Springer – Verlag, 1990. 560p.

ESTEGHLALIAN, A. R.; BILODEAU, M.; MANSFIELD, S. D.; SADDLER, J. N. Do enzymatic hydrolyzability and Simons' stain reflect the changes in the accessibility of lignocellulosic substrates to cellulose enzymes? **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 1049-1054, 2001.

FALLS, M.; SHI, J.; EBRIK, M. A.; REDMOND, T.; YANG, B.; WYMANB, C.; GARLOCK, R.; BALAN, V.; DALE, B. E.; PALLAPOLU, V. R.; LEE, Y.Y.; KIM, Y.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R.; HAMES, M. R.; THOMAS, S.; DONOHOE, B. S.; VINZANT, T. B.; ELANDER, R. T.; WARNER, R. E.; SIERRA-RAMIREZ, R.; HOLTZAPPLE, M. T. Investigation of enzyme formulation on pretreated switchgrass. **Bioresource Technology**, v.102, p. 11072–11079, 2011.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure reactions**. New York: W. De Gruyter, 1989. p. 613.

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, p. 201-212, 2000.

GÁMEZ, S; GONZALEZ-CABRIALES, J. J.;RAMIREZ, J.,A.; GARROTE, G., VAZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal Food Engineering**, v.74, p.78-88, 2006.

GAO, D.; UPPUGUNDLA, N.; CHUNDAWAT, PS. S.; YU, X.; HERMANSON, S.; GOWDA, K.; BRUMM, P.; MEAD, D.; VENKATESH, B.; E DALE, B. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. **Biotechnology for Biofuels**, n. 4, p. 5-16, 2011.

GELLERSTEDT, G. Chemistry of Chemical Pulping. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. (Editores). **Pulp and Paper Chemistry and Technology: Wood Chemistry and Wood Biotechnology**. Göttingen, Alemanha: Hubert & Co. GmbH & Co. KG., 2009. Vol. 2 p.91.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257–268, 1987.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-800, 2010.

GUO, W-J.; WANG, Y.; WAN, J-Q.; MA, Y-W. Effects of slushing process on the pore structure and crystallinity in old corrugated container cellulose fibre. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1-7, 2011.

HIMMEL, M.E.; DING, S.; JOHNSON, D.K.; ADNEY, W.S.; NIMLOS, M.R.; BRADY, J.W.; FOUST, T.D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, p. 804-807, 2007.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 36, 2011.

JANIS, J.; ROUVINEN, J.; VAINIOTALO, P.; TURUNEN, O.; SHNYROV, V.L. Irreversible thermal denaturation of *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase II and its three disulfide mutants characterized by differential scanning calorimetry. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 1, p. 75-80, 2008.

JORGENSEN H, OLSSON L Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 381-390, 2006.

KESHWANI, D.R.; CHENG, J.J. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p.1515–1523, 2009.

KOLENOVÁ, K.; VRSANSKÁ, M.; BIELY, P. Mode of action of endo- β -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. **Journal of Biotechnology**, v. 121, p. 338 -345, 2006.

KONN J.; PRANOVICH A.; HOLMBOM, B. Dissolution of fibre material in alkaline pretreatment and refining of spruce CTMP. **Holzforschung**, v. 60, p. 32–39, 2006.

KONN, J.; HOLBOM, B.; NICTULL, O. Chemical reactions chemimechanical pulping: material balances of wood components in a CTMP process. **Journal of Pulp and Paper Science**, v. 28, p. 395-399, 2002.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. **Adv Biochem Eng Biotechnol.**, v. 57, p. 45-126, 1997.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, A. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 411-456, 1999.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4203-13, 2009.

KUMAR, L.; CHANDRA, R.; CHUNG P. A. Can the same steam pretreatment conditions be used for most softwoods to achieve good, enzymatic hydrolysis and sugar yields? **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7827–7833, 2010.

KUMAR, L.; CHANDRA, R.; SADDLER, J. Influence of steam pretreatment severity on post-treatments used to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwoods at low Enzyme loadings. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 108, p. 2300-2311, 2011.

LANGSTON, JA.; SHAGHASI, T.; ABBATE, E.; XU, F; VLASENKO, E.; SWEENEY, M. D. Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. **Applied and environmental microbiology**, n. 77, v. 19, p. 7007-15, 2011.

LEVINE, S. E.; FOX, J. M.; CLARK, D. S.; BLANCH, H. W. A mechanistic model for rational design of optimal cellulase mixtures. **Biotechnology and Bioengineering**, n. 108, v. 11, p. 2561-2570, 2011.

LIN, Z-X.; ZHANG, H-M.; JI, X-J.; CHEN, J-W.; HUANG, H. Hydrolytic enzyme of cellulose for complex formulation applied research. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, p. 23–33, 2011.

LOU, H.; ZHU, JY.; LAN, TQ.; LAI, H.; QIU, X. pH-Induced lignin surface modification to reduce nonspecific cellulase binding and enhance enzymatic saccharification of lignocelluloses. **ChemSusChem**, n.6, v. 5, p. 919-27, 2013.

LU, YP.; YANG, B.; GREGG, D.; SADDLER, JN.; MANSFIELD, SD. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 641-654, 2002.

MAGALHAES, P.O.; MILAGRES, A. M. F. Importancia das celulasas produzidas por basidiomicetos causadores de podridão branca na biodegradação de lignocelulosicos. **Microbiologia in foco**, p. 04 - 12, 2008.

MARTINEZ, D.; BERKA, RM.; HENRISSAT, B.; SALOHEIMO, M.; ARVAS, M.; BAKER, SE.; CHAPMAN, J.; CHERTKOV, O.; COUTINHO, PM.; CULLEN, D.; DANCHIN, EG.; GRIGORIEV, IV.; HARRIS, P.; JACKSON, M.; KUBICEK, CP.; HAN, CS.; HO, I.; LARRONDO, LF.; DE LEON, AL.; MAGNUSON, JK.; MERINO, S.; MISRA, M.; NELSON, B.; PUTNAM, N.; ROBBERTSE, B.; SALAMOV, AA.;

SCHMOLL, M.; TERRY, A.; THAYER, N.; WESTERHOLM-PARVINEN, A.; SCHOCH, CL.; YAO, J.; BARBOTE, R.; NELSON, MA.; DETTER, C.; BRUCE, D.; KUSKE, CR.; XIE, G.; RICHARDSON, P.; ROKHSAR, DS.; LUCAS, SM.; RUBIN, EM.; DUNN-COLEMAN, N.; WARD, M.; BRETTIN, TS. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei*. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 553-560, 2008.

McDOUGALL, G. J.; MORRISON, I. M.; STEWART, D.; WEYERS, J.D.B.E.; HILLMAN, J.R. Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. **Journal Science Food Agriculture**, v. 62, p. 1-20, 1993.

MENDES, F. M.; SIQUEIRA, G.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A. AND MILAGRES, A. M. F. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology Progress**, v. 27, p. 395–401, 2011.

MENDES, F. M.; LAURITO, D. F.; BAZZEGGIO, M.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Enzymatic digestion of alkaline-sulfite pretreated sugar cane bagasse and its correlation with the chemical and structural changes occurring during the pretreatment step. **Biotechnology Progress**, 2013. DOI: 10.1002/btpr.1746.

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

MOUSAVIOUN, P.; DOHERTY, W.O.S. Chemical and thermal properties of fractionated bagasse soda lignin. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 1, p. 52-58, 2010.

PRIBOWO, A.; ARANTES, V.; SADDLER, J.N. The adsorption and enzyme activity profiles of specific *Trichoderma reesei* cellulase/xylanase components when hydrolyzing steam pretreated corn stover. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, n. 3, p. 195-203, 2012.

PUCHART, V.; BIELY, P. Simultaneous production of endo- β -1,4-xylanase and branched xylooligosaccharides by *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Biotechnology**, v. 137, n. 1, p. 34-43. 2008.

QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, CE. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9624-9630. 2010.

QING, Q; WYMAN, CE. Hydrolysis of different chain length xylooligomers by cellulase and hemicellulase. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1359-66, 2011a.

QING, Q; WYMAN, CE. 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**, n. 4, p. 18. doi:10.1186/1754-6834-4-18. 2011b.

QUINLAN, R.J.; SWEENEY, M.D.; LO LEGGIO L. ; OTTEN, H.; POULSEN, J.-C.N.; JOHANSEN, K.S.; KROGH, K.B.R.M.; JØRGENSEN, C.I.; TOVBORG, M.; ANTHONSEN, A.; TRYFONA, T.; WALTER, C.P.; DUPREE, P.; XU, F.; DAVIES, G.J.; WALTON, P.H. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 37, p. 15079–15084, 2011.

RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; KUSHNER, D. J.; SADDLER, J. N. Steam pretreatment conditions for effective enzymatic hydrolysis and recovery yields of *Eucalyptus viminalis* wood chips. **Holzforschung**, v. 46, p. 149-154, 1992.

REHBEIN, M.; PEREIRA, M.; KOCH, G.; KORSACHIA, O. Topochemical investigation into the delignification of *Eucalyptus globulus* chips during semi-chemical sulfite pulping. **Wood Science and Technology**, v. 44, p. 435-449, 2010.

ROLLIN, J. A.; ZHU, Z.; SATHITSUKSANO, N.; ZHANG, Y. H. P. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: A comparison of cellulose solvent-based lignocelluloses fractionation and soaking in aqueous ammonia. **Biotechnology and Bioengineering**, n. 1, v. 108, p. 22-30, 2011.

ROWELL, M. **Handbook of wood chemistry and wood composites**. CRC Press, 2005.

SANTI, C. **Distribuição do tamanho de poros e sacarificação enzimática de amostras de bagaço de cana-de-açúcar submetidas à deslignificação e secagem**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena, Lorena-SP, 2011.

SELIG, M.J.; KNOSHAUG, E.P.; ADNEY, W.S.; HIMMEL, M.E.; DECKER S.R. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4997-5005, 2008.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 219-228, 2003.

SHEN, F.; KUMAR, L.; HU, J.; SADDLER, J. N. Evaluation of hemicellulose removal by xylanase and delignification on SHF and SSF for bioethanol production with steam-pretreated substrates. **Bioresource technology**, v. 102, n. 19, p. 8945-51, 2011.

SHI, J.; EBRIK, M. A.; YANG, B.; GARLOCK, R. J.; BALAN, V.; DALE, B. E.; PALLAPOLU, V. R.; LEE, Y.Y.; KIM, Y.; MOSIER, N.; LADISCH, M.; HOLTZAPPLE, M.; FALLS, M.; SIERRA-RAMIREZ, R.; DONOHOE, B.; VINZANT, T.; ELANDER, R.; HAMESI, B.; THOMASI, S.; WARNER, R.; WYMAN, C. Application of cellulase and hemicellulase to pure xylan , pure cellulose , and switchgrass solids from leading pretreatments. **Bioresource Technology**, n. 102, v. 104, p. 11080-11088, 2011.

SHORE, J. Developments in direct dyes for cellulosic materials. **Review of Progress in Coloration and Related Topics**, n. 21, v. 1, p. 23-42, 1991.

SIPOS, B.; DIENES, D.; SCHLEICHER, Á.; PERAZZINI, R.; CRESTINI, C.; SIIKA-AHO, M.; RÉCZEY, K. Hydrolysis efficiency and enzyme adsorption on steam-pretreated spruce in the presence of poly (ethylene glycol). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47; n. 3, p. 84-90, 2010.

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.

SJOSTROM, E. **Wood chemistry fundamentals and applications**. San Diego: Academic press, 1993. p.130.

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

TAN, L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 689–692, 1987.

TANAKA, M.; TANIGUCHI, M.; MATSUNO, R.; KAMIKUBO, T. Purification and properties of cellulases from *Eupenicillium javanicum*: Studies on the re-utilization of cellulosic resources(VII). **Journal of Fermentation Technology**, v. 59, p. 177-183, 1981.

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

VARDAKOU, M.; KATAPODIS, P.; TOPAKAS, E., KEKOS, D.; MACRIS BJ.; CHRISTAKOPOULOS P. Synergy between enzymes involved in the degradation of insoluble wheat flour arabinoxylan. **Innovative Food Sci. Emerg. Technol.**, n. 5, p. 107–12. 2004.

VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 185-193, 2010.

VÁRNAI, A.; HUIKKO, L.; PERE, J.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. **Bioresource technology**, n. 102, v. 19. P, 2011.

VILLARREAL, M. L. M; PRATA, A. M. R.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A. Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 17-24, 2006.

VINZANT, T.B.; ADNEY, W.S.; DECKER, S.R.; BAKER, J.O.; KINTER, M.T.; SHERMAN, N.E.; FOX, J.W.; HIMMEL, M.E. Fingerprinting *Trichoderma reesei* hydrolases in a commercial cellulase preparation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91, p. 99-107, 2001.

WANG, G.S, PAN, X.J, ZHU, J.Y, GLEISNER, R, ROCKWOOD, D. Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose (SPORL) for robust enzymatic saccharification of hardwoods. **Biotechnol Progress**, v. 25, p. 1086-1093, 2009.

WANG, Q.Q.; HE, Z.; ZHU Z. Evaluations of cellulose accessibilities of lignocelluloses by solute exclusion and protein adsorption techniques. **Biotechnol Bioeng.**, n.109, p. 381–389. 2012.

WANG, Z.J.; LAN, T.Q.; ZHU J.Y. Lignosulfonate and elevated pH can enhance enzymatic saccharification of lignocelluloses. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 9, 2013.

WRIGHT, J.D.; WYMAN, C.E.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose – process evaluation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 18, p.75–90,1988.

WYMAN, C.E.; BALAN, V; DALE, B.E.; ELANDER, R.T.; FALLS, M.; HAMES, B.; HOLTZAPPLEE, M.; LADISCHG, M.; LEEH, Y.Y.; MOSIERG, N.; PALLAPOLUH, V.; SHIB, J .; THOMASF, S.; WARNERI, R. Comparative data of effects of leading pretreatments and enzyme loadings and formulations on sugar yields from different switchgrass sources. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 11052–62, 2011.

YANG, B.; WYMAN, C. E. BSA Treatment to Enhance Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Lignin Containing Substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 4, p. 611-617, 2006.

YU, X.; MINOR, J. L.; ATALLA, R. H. A staining technique for evaluating the pore structure variations of microcrystalline cellulose powders. **Powder Technology**, v. 98, p. 135-138, 1998.

YU, X.; MINOR, J. L.; ATALLA, R. H. Mechanism of action of Simons' stain. **Tappi Journal**, v. 6, p. 175-180, 1995.

ZHANG, J.; TUOMAINEN, P.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Comparison of the synergistic action of two thermostable xylanases from GH families 10 and 11 with thermostable cellulases in lignocellulose hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 102, n. 19, p. 9090-9095, 2011.

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

ZHU, J.Y., PAN, X.J., WANG, G.S., GLEISNER, R. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2411–2418, 2009.

ZHU W, ZHU JY, GLEISNER R, PAN XJ. On energy consumption for sized reduction and yields from subsequent enzymatic saccharification of pretreated lodgepole pine. **Bioresource Technology**, v.101, p. 2782–2792, 2010.