UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena

JOSEANA ROCHA DO MONTE

Sacarificação da polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar
com celulasas e xilanases de *Thermoascus aurantiacus*

Lorena – SP – Brasil

2009

JOSEANA ROCHA DO MONTE

Sacarificação da polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar
com celulasas e xilanases de *Thermoascus aurantiacus*

Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia Industrial.

Área de Concentração: Microbiologia Aplicada
Orientador: Prof^a Dr^a Adriane Maria Ferreira Milagres

Lorena – SP

2009

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 Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Monte, Joseana Rocha do

Sacarificação da polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar com celulasas e xilanases de *Thermoascus aurantiacus* / Joseana Rocha do Monte ; orientadora Adriane Maria Ferreira Milagres. – Lorena: 2009.

138 p. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

1. Enzimas hidrolíticas 2. Sacarificação 3. *Thermoascus aurantiacus* 4. Purificação de enzimas. I. Título.

577.152.3 - CDU

Dedico este trabalho à minha amada e
saudosa mãe, Maria José, que seja de onde for,
estará sempre olhando e zelando por mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À professora Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres, pela orientação, amizade, confiança e disponibilidade.

Ao meu pai, Marcelo Monte, pelo exemplo de sabedoria, força e persistência.

Ao meu namorado Marcio Glielmo, pela paciência, amor e incentivo constante.

Aos meus irmãos Marcelo, Regina, Isabel e Elisa que mesmo à distância sempre me incentivaram, apoiaram e confiaram em mim.

Aos meus primos Eleonora e Valmir, pela atenção, confiança, incentivo e amor.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica, Djalma, Sérgio, Fernanda, Germano, Vitor, Paula, Robson, Jéssica, Débora, Marcio André, Thaianne e Andressa, pela amizade, carinho e pelos cafés.

Aos amigos e professores do Departamento de Biotecnologia, pelo aprendizado, carinho e respeito.

Ao amigo Michel Brienzo, por me ouvir sempre e tirar todas as minhas dúvidas, além da amizade de tantos anos.

À amiga Daniela Gurpilhares, que chegou por último ao nosso grupo, mas que já entrou no meu coração.

À amiga Luciana Chaud, por ser simplesmente a Lú.

A todos os amigos que, de alguma forma participam, da minha vida.

À banca examinadora, pela disponibilidade e atenção.

À Capes, pelo apoio financeiro.

“Para aqueles que acreditaram em mim quando eu não mais acreditava em mim mesmo.
Para aqueles que com seu sorriso removeram a sombra do meu rosto.
Para aqueles que trocaram, sem regatear, sua alegria sincera pelos meus pesares.
Para aqueles cujo amor e cujo riso me deram asas e um céu azul para voar.
Para aqueles por quem minha gratidão será sempre pequena, nesta vida ou na próxima.
Para meus amigos”.

Bradley Trevor Greive

RESUMO

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

A proposta desse trabalho foi estudar o perfil de produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus* ATCC 204492 quando cultivado em resíduos agroindustriais e utilizá-las nas formas bruta ou purificada na hidrólise da polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar. Para tanto, estudou-se a cinética de produção de xilanases e celulases em fermentação sólida, utilizando quatro diferentes tipos de resíduos agrícolas: bagaço e palha de cana-de-açúcar, palha de trigo e sabugo de milho. Os extratos obtidos foram investigados quanto ao teor de xilanase, endoglucanase, exoglucanase, β -glicosidase e β -xilosidase. A palha de cana-de-açúcar induziu as maiores atividades de xilanase em 9 dias (1679,8 UI/g) e de β -glicosidase em 6 dias (29,9 UI/g). Em sabugo de milho, o fungo produziu 46,0 UI/g de exoglucanase e 5,2 UI/g de β -xilosidase, em 17 dias. A maior produção de endoglucanase ocorreu em bagaço de cana-de-açúcar em 9 dias (108,9 UI/g). A carga inicial de inóculo foi avaliada para o meio preparado com bagaço e verificou-se que o aumento de 10^4 vezes no número de ascósporos influenciou somente a produção de exoglucanase, que teve sua atividade aumentada em 10 vezes. Após a determinação das atividades enzimáticas, o extrato de sabugo de milho foi aplicado em uma coluna trocadora de ânions, DEAE Sepharose CL6B, equilibrada em pH 3,5 e 6,0; a fim de se obter as enzimas em sua forma purificada. Pôde-se isolar uma xilanase, uma endoglucanase e uma β -glicosidase de massas molares 31,5 kDa, 32,4 kDa e 76,6 kDa, respectivamente. Os extratos enzimáticos do *T. aurantiacus* foram aplicados no bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e na polpa celulósica do bagaço, obtendo 15 % de conversão enzimática da celulose (CEC), para ambos os substratos. Sendo assim, a polpa do bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratada com (1) proteases isoladas do abacaxi; (2) xilanase purificada de *T. aurantiacus* ou (3) ácido sulfúrico diluído. Em seguida foi feita a hidrólise do material pré-tratado com o extrato bruto de *T. aurantiacus*. O pré-tratamento com protease não teve efeito hidrolítico na polpa de bagaço, porém aumentou a CEC com as enzimas de *T. aurantiacus* de 9,4 % para 20,7 %. O pré-tratamento com a xilanase pura também não liberou açúcares redutores, contudo foi capaz de aumentar a CEC da polpa de bagaço para 30,0 %. O pré-tratamento com ácido diluído foi capaz de remover até 50 % da hemicelulose presente na polpa do bagaço, porém a remoção deste polissacarídeo não aumentou a CEC do bagaço com as enzimas de *T. aurantiacus*, mantendo o mesmo valor de CEC (15 %).

Palavras chaves: Enzimas hidrolíticas. Sacarificação. *Thermoascus aurantiacus*. Purificação de enzimas.

ABSTRACT

MONTE, J. R. **Saccharification of sugarcane bagasse cellulosic pulp by cellulases and xylanases of *Thermoascus aurantiacus***. 2009. 138p. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

The purpose of this work was to study the production profile of hydrolytic enzymes of the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* ATCC 204492 when cultivated in agroindustrial residues and to use them in the forms crude or purified for the hydrolysis of the cellulosic pulp of the sugarcane bagasse. For so much, it was studied the kinetics of xylanases and cellulases production on solid fermentation, using four different types of agricultural residues: sugarcane bagasse, sugarcane straw, wheat straw and corn cob. The extracts obtained were investigated for xylanase, endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase and β -xylosidase activities. Sugarcane straw induced the highest level of xylanase at 9 days (1679.8 UI/g) and β -glucosidase (29.9 UI/g) at 6 days. With corn cob, the fungus produced 46.0 UI/g of exoglucanase and 5.2 UI/g of β -xylosidase at 17 days. The highest endoglucanase production occurred on sugarcane pulp (108.9 UI/g) at 9 days. The initial load of inoculum was evaluated for sugarcane bagasse medium and it was verified that the 10000 times increase of ascospores had influence only in the exoglucanase production, showing a 10 fold increase of its activity. The corn cob extracts were applied in an ion exchange column, DEAE Sepharose CL6B, in order to purify cellulases and hemicellulases presents in the extracts. It could be isolated a xylanase, an endoglucanase and a β -glucosidase of 31.5 kDa, 32.4 kDa and 76.3 kDa, respectively. The enzymatic extracts of *T. aurantiacus* were tested on sugarcane bagasse *in natura* and on sugarcane bagasse pulp and 15 % of enzymatic conversion of the cellulose (CEC) was obtained from both substrates. A pretreatment of sugarcane bagasse pulp with (1) proteases isolated from pineapple; (2) xylanase purified of *T. aurantiacus* and (3) diluted sulfuric acid was performed. The pretreatment with protease did not present any hydrolytic effect on the sugarcane bagasse pulp, however it increased the final CEC with the enzymes of *T. aurantiacus* from 9.4 % to 20.7 %. The pretreatment with pure xylanase did not release sugars from pulp bagasse, however it was capable to increase the yield of the enzymatic hydrolysis of the pulp to 30.0 %. The pretreatment with diluted acid was capable to remove up to 50 % of the hemicellulose from the pulp, but CEC was maintained on 15 %.

Keywords: Hydrolytic enzymes. Saccharification. *Thermoascus aurantiacus*. Enzyme purification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação da ligação glicosídica entre duas unidades de β -D-glicose, produzindo a celobiose (SOLOMONS, 1996).	28
Figura 2. Representação da cadeia linear da celulose, formada por unidades consecutivas de celobiose (MARTINS, 2005).	28
Figura 3. Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses. D-glicose (1), D-galactose (2), L-arabinose (3), D-xilose (4), D-manose (5), 4-O-metil-D-glucurônico (6), L-ramnose (7) (MARTINS, 2005).	30
Figura 4. Representação esquemática de uma xilana de gramínea. (1) 1,4-D-xilopirranose; (2) L-arabinose; (3) ácido 4-O-D-metil- α -D-glucurônico; (4) grupo acetil (PITARELO, 2007).....	30
Figura 5. Estrutura da lignina de <i>Fagus</i> sp. (FENGEL; WEGENER, 1989).	31
Figura 6. Estrutura dos alcoóis precursores da lignina.	31
Figura 7. Modo de ação de celulasas sobre a celulose (MARTINS, 2005).	34
Figura 8. Representação do sítio ativo (SA) em forma de chave das endoglucanases.	35
Figura 9. Representação do modo de ação da celobioidrolase I (CBH I) e da celobioidrolase II (CBH II) de <i>T. reesei</i>	37
Figura 10. Representação do sítio ativo (SA) e do domínio de ligação ao substrato (CBD) da CBH I de <i>T. reesei</i>	37
Figura 11. Mecanismo de ação da swollenina sobre a cadeia de celulose.	40
Figura 12. Representação esquemática da estrutura da xilana vegetal e pontos de atuação das enzimas. Ac: grupo acetil; Arab: L-arabinofuranose; MeGlA: ácido 4-O-metil-glucurônico; Xil: D-xilose (BIELY, 1985).	42
Figura 13. Estrutura da xilanase da família 10 de <i>Aspergillus nidulans</i> (I) e da xilanase da família 11 de <i>Penicillium funiculosum</i> (II).	44
Figura 14. Aspecto visual do micélio de <i>Thermoascus aurantiacus</i> produzido em meio líquido.	51
Figura 15. Fluxograma de purificação das enzimas produzidas por <i>T. aurantiacus</i> em cultivo sólido de sabugo de milho, com 17 dias, em pH 3,5.	66

Figura 16. Fluxograma de purificação das enzimas produzidas por <i>T. aurantiacus</i> em cultivo sólido de sabugo de milho, com 17 dias, em pH 6,0.....	66
Figura 17. Produção de enzimas por <i>Thermoascus aurantiacus</i> em meio sólido de (□) palha de trigo; (◇) palha de cana-de-açúcar; (△) bagaço de cana-de-açúcar e (○) sabugo de milho. O eixo horizontal representa o tempo de cultivo, em dias.....	81
Figura 18. pH do extrato enzimático durante o crescimento de <i>Thermoascus aurantiacus</i> em meio sólido de (□) palha de trigo; (◇) palha de cana-de-açúcar; (△) bagaço de cana-de-açúcar e (○) sabugo de milho.	85
Figura 19. Produção de enzimas por <i>Thermoascus aurantiacus</i> em meio sólido de bagaço de cana-de-açúcar. (■, ◆, ▲, ●, ■) 10^4 ascósporos/g seca de substrato; (□, ◇, △, ○, □) 10^8 ascósporos/g seca de substrato. O eixo horizontal representa o tempo de cultivo, em dias.	87
Figura 20. pH do extrato enzimático durante o crescimento de <i>Thermoascus aurantiacus</i> em meio sólido de bagaço de cana-de-açúcar. (△) 10^4 ascósporos/g seca de substrato; (▲) 10^8 ascósporos/g seca de substrato.	88
Figura 21. SDS-PAGE com gel de Bis/Acrilamida 10 % corado com azul de Coomassie (A) e corado com nitrato de prata (B). P – Padrões (Albumina bovina, Albumina de ovo e Anidrase Carbônica); 1 e 5 – Cultivo inicial em sabugo de milho com 17 dias; 2 e 6 – Cultivo inicial em palha de cana-de-açúcar com 9 dias; 3 e 7 – Cultivo inicial em palha de trigo com 37 dias; 4 e 8 – Cultivo inicial em bagaço de cana-de-açúcar com 9 dias.	89
Figura 22. Coloração dos extratos enzimáticos de <i>Thermoascus aurantiacus</i> com 37 dias em sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo e palha de cana de açúcar, respectivamente.....	89
Figura 23. Eluição em coluna DEAE Sepharose CL6B, pH 3,5 do meio obtido do cultivo de <i>Thermoascus aurantiacus</i> em sabugo de milho por 17 dias. (◇) Absorbância 280 nm, (□) Xilanase, (▲) β-glicosidase, (○) Endoglucanase.....	91
Figura 24. Teor de proteína total do meio inicial e das frações obtidas na purificação parcial das enzimas produzidas por <i>T. aurantiacus</i> em meio de sabugo de milho, com 17 dias.....	91
Figura 25. Eluição em coluna DEAE Sepharose CL6B, pH 3,5 do meio obtido do cultivo de <i>Thermoascus aurantiacus</i> em sabugo de milho por 17 dias. (◇) Absorbância 280 nm, (□) Xilanase, (▲) β-glicosidase, (○) Endoglucanase.....	93

Figura 26. Eletroforese desnaturante com gel de Bis/Acrilamida (SDS-PAGE) 12,5 %, corado com nitrato de prata (A) e Eletroforese nativa de xilanase com gel de Bis/Acrilamida 10 %, corado com vermelho congo (B). Amostras: P – Padrões kDa (Fosforilase b, Albumina, Ovoalbumina, Anidrase Carbônica, Inibidor de tripsina e α -lactoalbumina); 1 e 3 – Pico I da cromatografia em pH 3,5; 2 e 4 – Pico I da cromatografia em pH6,0.....	95
Figura 27. Eletroforese desnaturante com gel de Bis/Acrilamida (SDS-PAGE) 12,5 % corado com nitrato de prata (A) e Eletroforese nativa de endoglucanase com gel de Bis/Acrilamida 12,5 %, corado com vermelho congo (B). Amostras: P – Padrões kDa (Fosforilase b, Albumina, Ovoalbumina, Anidrase Carbônica, Inibidor de tripsina e α -lactoalbumina); 1 e 3 – Pico III da cromatografia em pH 3,5; 2 e 4 – Pico III da cromatografia em pH6,0.	96
Figura 28. Eletroforese desnaturante com gel de Bis/Acrilamida (SDS-PAGE) 12,5 % corado com nitrato de prata (A) e Eletroforese nativa de β -glicosidade com gel de Bis/Acrilamida 10 % (B). Amostras: P – Padrões kDa (Fosforilase b, Albumina, Ovoalbumina, Anidrase Carbônica, Inibidor de tripsina e α -lactoalbumina); 1 e 4 – Pico II da cromatografia em pH 3,5; 2 e 5 – Pico III da cromatografia em pH 3,5; 3 e 6 – Pico II da cromatografia em pH 6,0.	97
Figura 29. Eletroforese desnaturante com gel de Bis/Acrilamida (SDS-PAGE) 12,5 % corado com azul de Coomassie. Amostras: P – Padrões kDa (Fosforilase b, Albumina, Ovoalbumina, Anidrase Carbônica, Inibidor de tripsina e α -lactoalbumina); 1 - Celluclast 1.5 L.....	98
Figura 30. Atividade enzimática e concentração de proteína residual detectada durante a hidrólise enzimática da polpa celulósica com enzimas de <i>T. aurantiacus</i> . (◇) Xilanase; (○) Endoglucanase; (△) proteínas.	100
Figura 31. Açúcares liberados durante a hidrólise enzimática da polpa celulósica com enzimas de <i>T. aurantiacus</i> . (■) açúcares totais; (■) glicose; (■) xilose; (■) celobiose.	101
Figura 32. Conversão enzimática da polpa celulósica obtida do bagaço de cana-de-açúcar submetido à hidrólise com o extrato de <i>T. aurantiacus</i> em sabugo de milho, com 17 dias. (△) CEH; (●) CEC.	101
Figura 33. Conversão enzimática da polpa celulósica de bagaço de cana-de-açúcar com a celulase comercial, Celluclast 1.5 L, por 24 h. (■) CEH; (●) CEC.....	103

Figura 34. Conversão enzimática da polpa celulósica obtida do bagaço de cana-de-açúcar submetido à hidrólise com o extrato de *T. aurantiacus* em sabugo de milho, com 17 dias, suplementado ou não com a β -glicosidase comercial, Novozym 188. (Δ) CEH com Novozym 188; ($\blacktriangle$) CEH sem Novozym 188; ($\circ$) CEC com Novozym 188; ($\bullet$) CEC sem Novozym 188.....104

Figura 35. Conversão enzimática da polpa obtida do bagaço de cana-de-açúcar com as enzimas de *T. aurantiacus* produzidas em: ($\square$) palha de trigo, com 8 dias; ($\diamond$) palha de cana-de-açúcar, com 9 dias; ($\triangle$) bagaço de cana-de-açúcar, com 9 dias; ($\circ$) Celluclast 1.5 L.....107

Figura 36. Conversão enzimática da hemicelulose da polpa obtida do bagaço de cana-de-açúcar com enzimas de *T. aurantiacus* produzidas em: ($\square$) palha de trigo, com 8 dias; ($\diamond$) palha de cana-de-açúcar, com 9 dias; ($\triangle$) bagaço de cana-de-açúcar, com 9 dias; ($\circ$) sabugo de milho, com 17 dias; e ($\bullet$) Celluclast 1.5 L.108

Figura 37. Conversão enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com enzimas de *T. aurantiacus* produzidas em: ($\square$) palha de trigo, com 8 dias; ($\diamond$) palha de cana-de-açúcar, com 9 dias; ($\triangle$) bagaço de cana-de-açúcar, com 9 dias; ($\circ$) sabugo de milho, com 17 dias; e ($\bullet$) Celluclast 1.5 L.109

Figura 38. Conversão enzimática da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar com enzimas de *T. aurantiacus* produzidas em: ($\square$) palha de trigo, com 8 dias; ($\diamond$) palha de cana-de-açúcar, com 9 dias; ($\triangle$) bagaço de cana-de-açúcar, com 9 dias; ($\circ$) sabugo de milho, com 17 dias; e ($\bullet$) Celluclast 1.5 L.110

Figura 39. Eletroforese desnaturante com gel de Bis/Acrilamida (SDS-PAGE) 12,5 % corado com nitrato de prata. Amostras: P – Padrões kDa (Fosforilase b, Albumina, Ovoalbumina, Anidrase Carbônica, Inibidor de tripsina e α -lactoalbumina); 1 – Proteínas do abacaxi.....112

Figura 40. Conversão enzimática da celulose da polpa do bagaço de cana-de-açúcar: (1) Celluclast 1.5 L; (2) Celluclast 1.5 L + Bromelina; (3) enzimas de *T. aurantiacus*; (4) enzimas de *T. aurantiacus* + Bromelina; (5) Endoglucanase; (6) Endoglucanase + Bromelina; (7) Endoglucanase + β -glicosidase; (8) Endoglucanase + β -glicosidase + Bromelina.....113

Figura 41. Conversão da polpa de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada com H₂SO₄ ou com xilanase purificada de *T. aurantiacus* seguida da hidrólise enzimática por 72 h a 50 °C:

A - (1) Celluclast 1.5L; (2) enzimas de *T. aurantiacus*; (3) 125 µL de H₂SO₄ + Celluclast 1.5 L; (4) 125 µL de H₂SO₄ + enzimas de *T. aurantiacus*; (5) 250 µL de H₂SO₄ + Celluclast 1.5 L; (6) 250 µL de H₂SO₄ + enzimas de *T. aurantiacus*. B - (1) Celluclast 1.5L; (2) enzimas de *T. aurantiacus*; (3) 125 µL de H₂SO₄ + Celluclast 1.5 L; (4) 250 µL de H₂SO₄ + Celluclast 1.5 L; (5) 125 µL de H₂SO₄ + enzimas de *T. aurantiacus*; (6) 250 µL de H₂SO₄ + enzimas de *T. aurantiacus*; (7) 10 UI de xilanase + Celluclast 1.5 L; (8) 20 UI de xilanase + Celluclast 1.5 L; (9) 10 UI de xilanase + enzimas de *T. aurantiacus*; (10) 20 UI de xilanase + enzimas de *T. aurantiacus*..... 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química de alguns resíduos lignocelulósicos.....	27
Tabela 2 – Reagentes utilizados na preparação do gel concentrador.	67
Tabela 3 – Reagentes utilizados na preparação do gel separador.....	68
Tabela 4 – Reagentes utilizados na preparação do tampão da amostra.....	68
Tabela 5 – Reagentes utilizados na preparação do gel separador.....	70
Tabela 6 – Marcadores de baixa massa molar.....	72
Tabela 7 – Extratos enzimáticos aplicados no bagaço de cana-de-açúcar.	74
Tabela 8 – Composição dos materiais lignocelulósicos <i>in natura</i> utilizados como substrato neste trabalho.....	80
Tabela 9 – Melhores resultados da produção enzimática (UI/g) de <i>T.aurantiacus</i>	84
Tabela 10 – Cálculo do rendimento e do fator de purificação de cada pico, em relação ao cultivo inicial, após a cromatografia em pH 3,5.....	92
Tabela 11 – Atividade das enzimas utilizadas na hidrólise da polpa de bagaço de cana-de-açúcar.....	98
Tabela 12 – Atividade das enzimas utilizadas nas hidrólises.....	106
Tabela 13 – Atividade das enzimas utilizadas na hidrólise da polpa de bagaço pré-tratada com proteases.	112

ABREVIATURAS

β -G – beta glicosidase

CBD – domínio de ligação à celulose

CBH – celobioidrolase

CEC – conversão enzimática da celulose

CEH – conversão enzimática da hemicelulose

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CMC – carboximetilcelulose

Da – Dalton

DC – domínio catalítico

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

EG – endoglucanase

FAE – feruloil esterases

HEC – hidroxietilcelulose

MES – ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico

NMMO – N-Oxido-N-metilmorfolina

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

*p*NPG – paranitrofenil glicopiranosídeo

*p*NPX – paranitrofenil xilanopiranosídeo

SA – sítio ativo

SDS – dodecil sulfato de sódio

TCA – ácido tricloroacético

TEMED – tetrametiletilenodiamina

WO – oxidação úmida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1. CELULOSE.....	27
2.2. HEMICELULOSES	29
2.3. LIGNINA	30
2.4. COMPOSTOS MENORES	32
2.5. ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA PAREDE CELULAR DOS VEGETAIS.....	33
2.5.1. Celulases.....	33
2.5.1.1. Endoglucanases	35
2.5.1.2. Exoglucanases	36
2.5.1.3. β -glicosidases	38
2.5.2. Outras proteínas relacionadas à hidrólise de celulose	39
2.5.3. Hemicelulases.....	41
2.5.4. Xilanases.....	41
2.6. FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE LIGNOCELULÓSICOS.....	45
2.7. XILANASES E CELULASES DE <i>Thermoascus aurantiacus</i>	50
3. OBJETIVO	55
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
4.1. PRODUÇÃO DAS ENZIMAS EM CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO	56
4.1.1. Substratos	56
4.1.2. Preparo do inóculo.....	56
4.1.3. Preparo do meio.....	56
4.1.4. Extração das enzimas.....	57
4.2. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	58
4.2.1. β -D-Xilanase.....	58

4.2.1.1. Preparo da solução de xilana 1,0 %	59
4.2.1.2. Preparo do reagente de DNS	59
4.2.2. β -Xilosidase	59
4.2.2.1. Preparo da solução de p-nitro-fenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX) 0,1 %	60
4.2.2.2. Preparo do bicarbonato de sódio 10 %.....	60
4.2.3. β -glicosidase	60
4.2.3.1. Preparo da solução de p-nitro-fenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) 0,1 %	61
4.2.4. α -L-arabinofuranosidase	61
4.2.4.1. Preparo da solução de p-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (pNPArif) 0,1 %	62
4.2.5. Endoglucanase	62
4.2.5.1. Preparo da solução de carboximetilcelulose 0,44 %.....	63
4.2.6. Exoglucanase	63
4.2.6.1. Preparo da solução de Avicel 1 %	64
4.2.7. Celulases Totais	64
4.3. PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS PRODUZIDAS POR <i>T. aurantiacus</i>	65
4.3.1. DEAE Sepharose CL6B.....	65
4.3.1.1. pH 3,5.....	65
4.4. ELETROFORESES	67
4.4.1. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	67
4.4.2. Preparo dos géis	67
4.4.3. Preparo das amostras.....	68
4.4.4. Preparo do tampão da amostra	68
4.4.5. Coloração com Azul de Coomassie	68
4.4.5.1. Solução fixadora	68
4.4.5.2. Solução corante	69
4.4.6. Coloração com nitrato de prata	69
4.5. ELETROFORESES NATIVAS (PAGE).....	70

4.5.1. Preparo dos géis para determinação da atividade de xilanase e endoglucanase.....	70
4.6. DOSAGEM DE PROTEÍNA	71
4.6.1. Preparo do Reagente de Bradford.....	71
4.7. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR DAS PROTEÍNAS	71
4.8. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS	72
4.9. OBTENÇÃO DA POLPA CELULÓSICA	73
4.10. HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS.....	74
4.10.1. Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	74
4.10.2. Ensaio de hidrólise da polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar	75
4.10.3. Tratamento da polpa celulósica com protease	76
4.10.3.1. Extração e recuperação de proteases	76
4.10.3.2. Determinação da atividade de protease	76
4.10.3.3. Tratamento da polpa com protease	77
4.10.4. Tratamento da polpa de bagaço com ácido	78
4.10.5. Tratamento da polpa de bagaço com xilanase	78
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.1. EFEITO DE DIFERENTES SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS NA PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES POR <i>T. aurantiacus</i>	80
5.2. PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS.....	90
5.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	97
5.3.1. Hidrólise da polpa com enzimas produzidas em diferentes substratos	106
5.3.2. Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar	108
5.3.3. Hidrólise da polpa celulósica tratada com protease.....	111
5.3.4. Hidrólise da polpa do bagaço tratada com H ₂ SO ₄ e xilanase	114
6. CONCLUSÕES	116
TRABALHOS FUTUROS	117
REFERÊNCIAS	119

1. INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos, constituídos basicamente de celulose, hemicelulose e lignina, estão sendo alvos de diversos estudos e apontados como a grande aposta para a solução do problema energético mundial. Pela composição dessa biomassa vegetal, estudos do sistema xilanolítico e celololítico de fungos termófilos são de interesse devido à ampla aplicação das suas enzimas em diversos setores industriais. Xilanases podem ser utilizadas nas indústrias de papel e celulose, farmacêutica, têxtil, de bebidas e alimentos, onde se destacam na produção de xilooligossacarídeos para enriquecimento de alimentos funcionais. Celulases são aplicadas na indústria têxtil objetivando a melhora na maciez da fibra, no tingimento e em lavagens do tipo “stonewashing”, além de serem aplicadas em resíduos celulósicos, visando à obtenção de glicose para produção do etanol.

Resíduos agroindustriais, como bagaço e palha de cana-de-açúcar, farelo e palha de trigo, sabugo de milho, sementes de frutas, efluentes da indústria de papel e de alimentos são ricos em celulose, hemicelulose e lignina. Com a industrialização, a geração e o descarte desses resíduos têm aumentado, estimulando pesquisas e despertando o interesse de diversos setores em reaproveitá-los. Esses resíduos representam uma fonte barata para o crescimento de microrganismos capazes de produzir metabólitos com alto valor agregado, como enzimas, solventes orgânicos e açúcares.

O fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus* tem mostrado habilidade de produzir uma série de enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal, quando cultivado em materiais lignocelulósicos. Foram relatadas a produção de xilanases, mananases, arabinofuranosidases, feruloil esterases, glucuronidases, celulases, pectinases, amilases e lacases. Apesar disto ainda faltam estudos mais evidentes das condições que maximizem a

produção de cada uma das enzimas e da potencialidade destas enzimas na hidrólise de polissacarídeos, tanto na forma bruta como purificada.

Dependendo do tipo de estudo que se pretende realizar e do produto final que se deseja obter, o uso do extrato bruto obtido do cultivo de fungos pode influenciar negativamente nos resultados. Assim, uma saída para aumentar a eficiência catalítica, diminuir os produtos indesejáveis e aumentar a reprodutibilidade do processo seria a utilização de enzimas puras.

Este trabalho teve seu foco na obtenção de celulasas e hemicelulasas produzidas por *T. aurantiacus* em cultivos em meio sólido, preparados com resíduos agroindustriais, e o uso dessas enzimas para a sacarificação da polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar. A conversão enzimática da celulose (CEC) foi avaliada na presença das enzimas em sua forma bruta, pura e/ou combinadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os materiais lignocelulósicos constituem uma das principais fontes de matéria orgânica do planeta, cuja facilidade de obtenção e a grande abundância na natureza são vantagens que permitem sua utilização como substrato de baixo custo, com grande interesse econômico. Os materiais lignocelulósicos são formados por celulose e hemicelulose combinados com lignina e pequenas quantidades de extrativos, proteínas, amido e materiais inorgânicos. Os polissacarídeos são alvos de estudos de conversão química, ou enzimática, em açúcares solúveis. Na tabela 1, encontra-se a análise da composição principal de alguns resíduos agroindustriais com potencial de utilização em vários processos biotecnológicos.

Tabela 1 – Composição química de alguns resíduos lignocelulósicos

Resíduos agroindustriais	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referências
Bagaço de cana-de-açúcar	40–50	25–35	15–35	Saha, 2003; Sun et al., 2004; Jacobsen; Wyman, 2002
Palha de cana-de-açúcar	35–45	25–30	12–26	Saad; Gonçalves, 2005; Rossell, 2006
Palha de trigo	30–40	25–40	5–20	Papatheofanous et al., 1998; Xu et al., 2006; Hongzhang; Liying, 2007
Sabugo de milho	34–52	30–35	15–18	Garrote; Domínguez; Parajó, 2002; Demirbas, 2004; Yang et al., 2005

2.1. CELULOSE

O principal componente das fibras vegetais é a celulose, constituinte básico da parede celular. Trata-se de um homopolissacarídeo de ocorrência natural, composto de unidades de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas do tipo $\beta(1 \rightarrow 4)$, que é encontrado tanto em vegetais primitivos, quanto em plantas evoluídas (FENGEL; WEGENER, 1989).

A celulose é sintetizada a partir da união de unidades de D-glicose. A hidroxila glicosídica do carbono 1 de uma unidade sofre reação de condensação com a hidroxila do carbono 4 de outra unidade, formando a ligação glicosídica tipo $\beta(1 \rightarrow 4)$ (Figura 1).

Durante a biossíntese, diversas cadeias de celulose são sintetizadas simultaneamente e de forma ordenada, buscando um arranjo supramolecular que confira maior estabilidade à molécula e, portanto, menor energia potencial. Este arranjo depende de uma rede de ligações de hidrogênio, intra e intermoleculares, que são favorecidas pela rotação de 180° da segunda unidade de glicose em relação à primeira, e assim por diante. Desta forma, a celobiose é definida como unidade conformacional mínima da celulose, enquanto a glicose representa a unidade fundamental das cadeias do homopolímero (MARTINS, 2005) (Figura 2).

Figura 1. Formação da ligação glicosídica entre duas unidades de β -D-glicose, produzindo a celobiose (SOLOMONS, 1996).

Figura 2. Representação da cadeia linear da celulose, formada por unidades consecutivas de celobiose (MARTINS, 2005).

Feixes de moléculas de celulose se agregam na forma de microfibrilas, nas quais regiões altamente ordenadas (cristalinas) se alternam com regiões menos ordenadas (amorfas). As microfibrilas constroem fibrilas e estas constroem as fibras celulósicas. Como consequência dessa estrutura fibrosa, a celulose possui alta resistência à tração e é insolúvel na maioria dos solventes (FENGEL; WEGENER, 1989).

Uma vez que a estrutura das fibras celulósicas naturais é bastante heterogênea, é lógico supor que existam regiões de variável acessibilidade aos reagentes químicos e/ou preparações enzimáticas. Na estrutura cristalina da celulose, todas as reações das microfibrilas

se iniciam na superfície e continuam para o interior das mesmas. O inchamento da celulose, principalmente o intra-cristalino, aumenta a acessibilidade de reagentes e, como consequência, a reatividade. Por essa razão, geralmente utilizam-se soluções cáusticas para a indução desse fenômeno. Os pré-tratamentos para inchamento das fibras são práticas usuais na indústria de derivados de celulose, pois isso aumenta sua reatividade. O inchamento, principalmente o intra-molecular, expõe as superfícies das fibrilas aos reagentes e assim cada fibrila reage ao longo de seu comprimento (KLOCK et al., 2005).

2.2. HEMICELULOSES

As hemiceluloses são formadas por uma ampla variedade de substâncias incluindo pentoses (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (ácidos 4-*O*-metil-glucurônico e galacturônico) (Figura 3). Suas estruturas apresentam cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade à molécula (RAMOS, 2003). A xilana é a hemicelulose predominante nos cereais, gramíneas e madeiras duras (POLIZELI et al., 2005). É constituída de uma cadeia principal de D-xilose unida por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ substituída com L-arabinose, D-galactose, acetil, feruloil, *p*-cumaril e ácido glucurônico, dependendo do vegetal (TABKA et al., 2006). As hemiceluloses de gramíneas, por exemplo, são geralmente caracterizadas pela presença de arabinoxilanas e xiloglucanas (Figura 4) (BEUKES et al., 2008; JEFFRIES, 1990; LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002; SASKA; OZER, 1995). As paredes celulares de gramíneas contêm grandes quantidades de ácidos hidroxicinâmico, como ferúlico e cumárico. Um trissacarídeo, feruloil arabinoxilana (F-Ara)-(1 $\rightarrow$ 3)-xil(1 $\rightarrow$ 4)-xil, foi isolado do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por Ishii (1997).

Figura 3. Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses. D-glicose (1), D-galactose (2), L-arabinose (3), D-xilose (4), D-manose (5), 4-O-metil-D-glucurônico (6), L-ramnose (7) (MARTINS, 2005).

Figura 4. Representação esquemática de uma xilana de gramínea. (1) 1,4-D-xilopiranoses; (2) L-arabinose; (3) ácido 4-O-D-metil- α -D-glucurônico; (4) grupo acetil (PITARELO, 2007).

2.3. LIGNINA

A lignina está presente nos materiais lignocelulósicos na proporção de 15 a 35 % (BURANOV; MAZZA, 2008; KLOCK et al., 2005), agindo como material adesivo, como agente de enrijecimento e como barreira contra degradação enzimática e/ou microbiana da parede celular (FENGEL; WEGENER, 1989). A concentração da lignina é alta na lamela média e baixa na parede secundária (KLOCK et al., 2005).

É uma macromolécula amorfa com estrutura tridimensional muito complexa (Figura 5) e baseada em três precursores monoméricos: os alcoóis coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico (Figura 6). A proporção destes monômeros varia entre diferentes espécies de plantas e estas diferenças podem ser utilizadas com propósitos taxonômicos. A propriedade física mais

importante desta macromolécula orgânica é sua rigidez, que não só confere estrutura ao tecido da planta, mas também previne o colapso de elementos condutores de água (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 5. Estrutura da lignina de *Fagus sp.* (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 6. Estrutura dos alcoóis precursores da lignina.

Sua composição varia entre os diversos grupos de plantas. Em gimnospermas predomina o tipo G (guaiacila), em angiospermas, G–S (guaiacila–siringila) e em gramíneas, destaca-se a lignina tipo G–S–H (guaiacila–siringila–*p*–hidroxifenila) (HIGUCHI, 2006). Em gramíneas, a lignina incorpora níveis similares de G e S e possuem mais resíduos H, que em dicotiledôneas (BAUCHER et al., 2003). Os monolignóis polimerizam-se para constituir a lignina por meio de ligações do tipo C–C ou éter.

2.4. COMPOSTOS MENORES

Segundo Iiyama (1993) existem três classes de proteínas ligadas à parede celular: glicoproteína rica em hidroxiprolina (extensinas), proteína rica em glicina e proteína rica em prolina. Neste sentido, Hatfield (1989) comentou que a extensina foi encontrada aderida aos resíduos insolúveis da parede celular, especialmente à celulose. Proteínas incluem enzimas e toxinas envolvidas na defesa da planta. No bagaço, o conteúdo de proteína é baixo e varia entre 1 e 2 % (PIRES et al., 2006; MARTINS et al., 2007) e, muitas vezes, o conteúdo de proteína é frequentemente reportado como parte da lignina.

Um número de constituintes minerais é necessário para o crescimento das plantas. Estes constituintes são retirados do solo e sua composição depende das condições ambientais sob as quais o vegetal cresce e da localização do mineral na planta. Os constituintes minerais compreendem principalmente potássio e cálcio, que constituem até 50 % dos cátions presentes nas cinzas da planta; também são encontrados magnésio, manganês, sódio, fósforo e cloro, assim como sílica. Os ânions mais comuns são carbonatos, fosfatos, silicatos e sulfatos. O conteúdo de cinzas no bagaço varia entre 1,5 e 5 % e de sílica entre 0,7 e 3,5 % (ROWELL et al., 2000).

2.5. ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA PAREDE CELULAR DOS VEGETAIS

Devido à sua constituição física e ao fato de que na natureza a celulose ocorre sempre associada à lignina e a hemicelulose, a degradação completa dos materiais lignocelulósicos requer ações coordenadas de várias enzimas (KUBICEK, 1992).

2.5.1. Celulases

As celulases são sintetizadas por uma grande diversidade de microrganismos, durante seu crescimento em materiais celulósicos (SZIJÁRTÓ et al., 2004; YU; HYUN; YOON-MO, 1998).

A degradação da celulose ocorre pela ação de três classes principais de enzimas que atuam sinergicamente causando a hidrólise da celulose até glicose (Figura 7) (KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997). Estas classes de enzimas hidrolíticas compreendem 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) (BHAT; BHAT, 1997; SINSABAUGH; LIPTAK, 1997). Têm-se assumido como verdadeiro esse modelo de biodegradação de celulose para a maioria dos fungos, porém sabe-se que existem algumas espécies deficientes na produção de exo-1,4- β -glucanases e a biodegradação completa do polímero pela via enzimática fica limitada (MAGALHÃES, 2005).

Figura 7. Modo de ação de celulasas sobre a celulose (MARTINS, 2005).

As celulasas são compostas por dois domínios distintos: o domínio de ligação à celulose (CBD) e o domínio catalítico (DC), que abriga o sítio ativo (SA). Estes domínios são ligados uns aos outros através de uma cadeia polipeptídica flexível. O sítio ativo possui como função a hidrólise das ligações glicosídicas da celulose e cada classe de celulase possui uma forma diferente de sítio ativo, permitindo a hidrólise de ligações localizadas em regiões distintas do substrato. A função do CBD está associada à adsorção, que permite o aumento da concentração das celulasas na superfície da celulose através de interações não covalentes, envolvendo ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas (PALONEN et al., 2004).

2.5.1.1. Endoglucanases

As endoglucanases clivam a cadeia de celulose aleatoriamente, criando novas extremidades de cadeia (SÁNCHEZ, 2009). Estas enzimas hidrolisam a celulose amorfa e celulosas modificadas quimicamente (solúveis), como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC). A celulose cristalina e o algodão, substratos com elevado grau de cristalinidade, são menos hidrolisados devido ao maior grau de organização molecular que apresentam (MEDVE, 1997; ZANDONÁ FILHO, 2001).

O sítio ativo das endoglucanases possui uma forma de chave, que possibilita a ação da enzima ao longo da cadeia de celulose e reduz seu grau de polimerização consideravelmente (MARTINS, 2005). As regiões amorfas, com menor organização estrutural, são mais facilmente atacadas, pois suas cadeias não possuem ligações intermoleculares de hidrogênio tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas. Assim, o ataque das endoglucanases leva a uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose (Figura 8).

Figura 8. Representação do sítio ativo (SA) em forma de chave das endoglucanases.

2.5.1.2. Exoglucanases

Exoglucanases (celobioidrolases) atuam nas extremidades da cadeia de celulose, produzindo majoritariamente celobiose, além de glicose e celotriose (ZANDONÁ FILHO, 2001). As exoglucanases principais são a CBH I e CBH II, que hidrolisam a cadeia de celulose a partir das extremidades redutora e não-redutora, respectivamente (Figura 9).

O sítio ativo das celobioidrolases possui uma forma de um túnel por onde a cadeia de celulose penetra e sofre hidrólise de suas ligações glicosídicas terminais, liberando majoritariamente celobiose (HUI; WHITE; THIBAUT, 2002). O CBD é constituído por 35 aminoácidos (aa), na CBH I, e 44 aminoácidos, na CBH II (Figura 10), possuindo a importante função de promover a adsorção da proteína ao substrato, conferindo estabilidade ao agregado e permitindo a melhor aproximação da cadeia de celulose ao sítio ativo (HUI; WHITE; THIBAUT, 2002). A adsorção ocorre através da interação de resíduos de tirosina (TYR) presentes no CBD com as unidades de glucopirranose presentes na superfície da celulose (Figura 10) (MARTINS, 2005).

As exoglucanases não atuam sobre celulosas solúveis por haver um impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes (MARTINS, 2005). As exoglucanases atuam sobre celulose cristalina (Avicel), produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização. Deste modo, ensaios de atividade sobre Avicel caracterizam as exoglucanases (MARTINS, 2005), enquanto que para a atividade de endoglucanases usa-se CMC (SÁNCHEZ, 2009), tornando possível a diferenciação entre essas enzimas.

Figura 9. Representação do modo de ação da celobioidrolase I (CBH I) e da celobioidrolase II (CBH II) de *T. reesei*.

Figura 10. Representação do sítio ativo (SA) e do domínio de ligação ao substrato (CBD) da CBH I de *T. reesei*.

2.5.1.3. β -glicosidases

As β -glicosidases, também denominadas celobiasas, possuem a função de hidrolisar a celobiose gerada pelas celobioidrolases e endoglucanases em glicose, completando a hidrólise da celulose. As β -glicosidases não são celulasas legítimas, por agirem sobre substratos solúveis, mas sua contribuição é muito importante para a eficiência da hidrólise da celulose, pela remoção da celobiose do meio reacional, que é um potente inibidor competitivo das celobioidrolases (MEDVE, 1997; MUÑOZ et al., 2001).

As celulasas têm atraído bastante interesse comercial devido às suas várias aplicações em áreas como bioconversão de materiais celulósicos em açúcares solúveis, fármacos, detergentes, tratamento de efluentes e processamento de frutas e vegetais (MAMMA et al., 2009). Na reciclagem do papel ofício, atuam eficientemente removendo tintas de impressão da superfície de fibras recicláveis (JEFFRIES et al., 1994). Na indústria têxtil vêm sendo utilizadas com muito êxito no amaciamento (“bio-stoning”) de jeans e no polimento (“bio-polishing”) de algodão e de outras fibras celulósicas (ANDREAUS; RAMOS; CAVACO-PAULO, 2000; MAGALHÃES, 2005; KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997). Nas indústrias citadas, a sacarificação extensiva da celulose não é desejada, mas sim a ação superficial suficiente para gerar o efeito desejado (MARTINS, 2005).

A maioria das celulasas comerciais é produzida por fungos mesófilos. Porém os processos industriais operam a altas temperaturas e a aplicação de enzimas produzidas por microrganismos termófilos parece mais vantajosa (MAMMA et al., 2009), uma vez que estes são capazes de produzir hidrolases com características como atividade ótima em temperaturas elevadas, termoestabilidade em uma ampla faixa de pH e altas taxas de hidrólise do substrato (GOMES et al., 2007).

2.5.2. Outras proteínas relacionadas à hidrólise de celulose

Altas conversões de celulose requerem altas cargas enzimáticas, o que torna o processo economicamente inviável. A acessibilidade é uma das principais limitações para uma eficiente hidrólise enzimática da celulose. Além de pré-tratamentos do material lignocelulósico, algumas proteínas podem aumentar a acessibilidade da celulose, por romper as pontes de hidrogênio entre os polissacarídeos presentes na parede celular (HAN; CHEN, 2007).

Mcqueen-Mason, Durachko e Cosgrove (1992) isolaram da semente de pepino, uma proteína vegetal denominada expansina, que é capaz de modificar as propriedades das paredes celulares de plantas durante o crescimento ou amadurecimento de frutos, provocando a extensão e o relaxamento das paredes celulares.

Saloheimo et al. (2002) identificaram uma proteína de 75 kDa em *Trichoderma reesei*, com características similares às das expansinas de plantas, denominadas “swoleninas”, que também parecem afetar a estrutura das paredes celulares das plantas. Estas proteínas têm a capacidade de afrouxar as fibras de celulose, sem a produção de açúcares redutores no meio. Assim como as celulasas, essas proteínas possuem uma estrutura modular com o N-terminal CBD, que tem o papel de mediar a ligação das enzimas ao substrato insolúvel. A descoberta dessa proteína em *T. reesei* fornece uma nova visão em relação ao mecanismo de degradação de lignocelulósicos por microrganismos. Primeiramente haveria a ação da swollenina, afrouxando as fibras da parede vegetal e rompendo as pontes de hidrogênio entre as cadeias de celulose, permitindo que as enzimas hidrolíticas tivessem sua ação potencializada (Figura 11).

Figura 11. Mecanismo de ação da swolenina sobre a cadeia de celulose.

Han e Chen (2007) purificaram uma proteína denominada “Zea h”, isolada de folhas e galhos de milho recém colhido. “Zea h” tem massa molar 55,78 kDa e age sinergisticamente com as celulasas. Esta proteína não possui ação catalítica, mas sua adição foi capaz de duplicar a taxa de hidrólise, quando comparada somente com a adição de celulase. Estudos sobre o sinergismo entre “Zea h” e celulase, revelaram que a primeira pode aumentar a adsorção da celulase ao substrato, enfraquecer as pontes de hidrogênio e diminuir o índice de cristalinidade do substrato, tornando a celulose mais acessível ao ataque das celulasas. A adição de “Zea h” revela-se como uma alternativa para diminuir a carga enzimática, mantendo o mesmo grau de hidrólise.

Lopez de Leon, Ding e Brown (2009) patentearam uma proteína com capacidade de amplificar a atividade celulolítica na hidrólise da biomassa vegetal. O gene responsável pela expressão dessa proteína pode ser inserido em um microrganismo, que passa a ser a fonte da proteína amplificadora em um processo de fermentação da biomassa, bem como de outras enzimas úteis na hidrólise. Pôde-se verificar que uma cepa modificada de *Thermoascus aurantiacus* foi capaz de produzir um complexo protéico que aumentou em até 99 % o

rendimento de glicose liberada na hidrólise, em comparação com o microrganismo não modificado.

2.5.3. Hemicelulases

As enzimas que hidrolisam a hemicelulose podem ser divididas em dois grupos, as que são capazes de degradar a cadeia principal e as que degradam as cadeias laterais (KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997). Portanto, a hidrólise das hemiceluloses ocorre de maneira aleatória, produzindo oligossacarídeos lineares e ramificados. Estes últimos podem apresentar cadeias laterais de arabinofuranose, ácido glucurônico ou ácido 4-*O*-metil glucurônico. Devido à complexa estrutura das hemiceluloses, diferentes tipos de enzimas são requeridos para a sua modificação e degradação. Um sistema incluindo endo e exoxilanases, mananases, β -xilosidades, α -glucuronidases e α -arabinofuranosidases torna-se necessário para a hidrólise completa desses polissacarídeos (Figura 12) (BIELY, 1985). Formas múltiplas de cada classe de enzimas podem ocorrer e estas podem cooperar na hidrólise do substrato (BIELY et al., 1997; MAGALHÃES, 2005; WONG; TAN; SADDLER, 1988).

2.5.4. Xilanases

A atividade das xilanases é altamente dependente da presença de enzimas capazes de degradar as cadeias laterais. A hidrólise de diferentes xilanas por xilanases gera vários produtos, os quais se diferem pelas quantidades de xiloses, xilobioses e xilotrioses, assim como pela natureza dos açúcares substituídos (BIELY, 1985).

Figura 12. Representação esquemática da estrutura da xilana vegetal e pontos de atuação das enzimas. Ac: grupo acetil; Arab: L-arabinofuranose; MeGIA: ácido 4-O-metil-glucurônico; Xil: D-xilose (BIELEY, 1985).

A principal enzima 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 xilooligossacarídeos menores, substituídos ou não, que serão clivados pela exo-1,4-β-xilanase (BIELEY, 1985). Os substituintes são ao mesmo tempo liberados por esterases e glicosídeos correspondentes, por exemplo: resíduos de α-L-arabinosil por α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) (FAULDS et al., 2006), resíduos de 4-O-metil-D-glucuronosil ou D-glucuronosil por α-glucuronidase (EC 3.2.1.139) (DE VRIES et al., 1998; KHANDKE; VITHAYATHIL; MURTHY, 1989a),

resíduos acetil por acetilesterases (EC 3.1.1.6). Enzimas acessórias como as feruloil esterases (FAE; EC 3.1.1.73) podem também agir com as xilanases para clivar as pontes ferúlicas e/ou diferúlicas entre as cadeias de xilana e a lignina (TABKA et al., 2006; VARDAKOU et al., 2004). Os dímeros de xilose são geralmente clivados pela β -xilosidade (EC 3.2.1.37), liberando D-xilose como único produto da hidrólise. A β -xilosidade é importante quando a hidrólise completa da xilana é requerida (BIELY, 1985; MAGALHÃES, 2005).

As ligações da hemicelulose não são todas equivalentes e igualmente acessíveis para as enzimas xilanolíticas. Além disso, a estrutura da hemicelulose também muda durante a hidrólise devido à retirada de substituintes e diminuição do tamanho da cadeia (WONG; TAN; SADDLER, 1988). A produção de múltiplas xilanases, com diferentes especificidades, atuando em sinergismo no processo de degradação eficiente das xilanas, tem sido bem documentada (GILBERT et al., 1988; GILBERT; HAZLEWOOD, 1993; YANG et al., 1989).

As xilanases são classificadas como sendo principalmente das famílias 10 e 11, porém ainda são encontradas, em menor número, xilanases que se encaixam nas famílias 5, 7, 8 e 43. Tal classificação baseia-se nas propriedades estruturais e na sequência de aminoácidos do domínio catalítico (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

As xilanases da família 10 não são muito específicas, hidrolisando além da xilana, celulose, carboximetilcelulose, *p*-nitrofenil- β -glicosídeo, celobiose e laminarina (MAGALHÃES, 2005). Além disso, estas enzimas são mais ativas em xilooligosacarídeos de cadeia curta, indicando que possuem um sítio catalítico pequeno, contendo em média quatro subsítios. Em geral apresentam uma alta massa molar (> 30 kDa) e baixo ponto isoelétrico (BIELY et al., 1997; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). Estas enzimas clivam a cadeia de xilana a partir do terminal não redutor e liberam xilose, xilooligosacarídeos

lineares e ramificados. Sua ação em glucuronoxilanas produz o ácido aldotetraurônico e em arabinoxilana, o resíduo é a arabinoxilobiose (BIELY et al., 1997).

As xilanases da família 11 são consideradas xilanases verdadeiras, pois agem exclusivamente em xilanas, tendo portanto, pouca versatilidade catalítica. São mais ativas em xilanas de cadeias longas, por causa de seus sítios ativos maiores, contendo em média sete subsítios (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). Seus produtos podem ser clivados pela ação das xilanases da família 10 (Figura 13). Geralmente apresentam massas molares menores que 30 kDa e alto ponto isoelétrico (CHRISTAKOPOULOS et al., 2003).

Figura 13. Estrutura da xilanase da família 10 de *Aspergillus nidulans* (I) e da xilanase da família 11 de *Penicillium funiculosum* (II).

Muitas aplicações biotecnológicas têm sido descritas para xilanases, sozinhas ou combinadas com outras enzimas, como biobranqueamento de polpa celulósica (BAJPAI, 1999; BUCHERT et al., 1994; HAKI; RAKSHIT, 2003), sacarificação de biomassa lignocelulósica (BEG et al., 2001), manufatura de pão (HAROS; ROSELL; BENEDITO, 2002), fabricação de ração animal (BUTT et al., 2008; CONTE et al., 2003; POLIZELI et al., 2005) e indústrias de sucos de frutas (BIELY, 1985). Estas aplicações requerem enzimas capazes de operar sobre condições específicas e freqüentemente não naturais. Para o

biobranqueamento em particular, as enzimas termoestáveis e com pH ótimo alcalino poderiam ser mais efetivas (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999). Endoxilanases da família 11 podem ser de especial interesse devido ao seu menor tamanho, o qual pode facilitar a penetração da enzima na fibra de celulose (SAPAG et al., 2002).

2.6. FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE LIGNOCELULÓSICOS

A hidrólise enzimática da celulose representa uma alternativa importante para a produção de etanol usando resíduos agroindustriais, por se tratar de um processo limpo e específico. No entanto, apesar de muitos estudos, não estão totalmente compreendidas quais as características atribuem maior eficiência à taxa de hidrólise da celulose. Entre as características mais importantes estão o grau de cristalinidade e de polimerização da celulose (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2007; RABELO; MACIEL FILHO; COSTA, 2009; ZHAO; LU; WANG, 2009). Entretanto, não se pode esquecer que o conteúdo e a distribuição da lignina e hemicelulose interferem na acessibilidade das celulasas às fibras de celulose (HAN; CHEN, 2007; KUO; LEE, 2009; KUMAR et al., 2009; LO et al., 2009; PALONEN et al., 2004; RABELO; MACIEL FILHO; COSTA, 2009; WANG et al., 2006).

Para tornar a hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos mais eficiente é necessário que os substratos sejam pré-tratados, a fim de aumentar a susceptibilidade de ataque das enzimas aos polissacarídeos (MOSIER et al., 2005; KUO; LEE, 2009; LI et al., 2009). Os métodos de pré-tratamento podem ser classificados em quatro categorias: físico, químico, biológico e combinado. Os pré-tratamentos químicos têm recebido mais atenção porque os pré-tratamentos físicos são relativamente ineficientes, os combinados raramente

melhoram a digestibilidade, quando comparado com tratamentos simples, (RABELO; MACIEL FILHO; COSTA, 2008) e a deslignificação extensiva requer condições extremas (TU; CHANDRA; SADDLER, 2007).

Um pré-tratamento ideal é aquele que produz fibras reativas, preserva a utilidade da fração hemicelulósica e não libera compostos que inibam significativamente a fermentação (LYND; ELANDER; WYMAN, 1996). O pré-tratamento é um dos passos mais caros no processo de conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis, uma vez que requer o uso de vapor e produtos químicos, além da necessidade de reatores resistentes à corrosão (LASER et al., 2002). A deslignificação enzimática é realizada naturalmente pelos fungos de podridão branca. Esses fungos, especialmente os basidiomicetos, produzem enzimas oxidativas, como as lacases e peroxidases, que geram radicais capazes de clivar ligações covalentes da lignina, relaxando sua estrutura (TABKA et al., 2006).

Nas últimas décadas, vários pré-tratamentos termoquímicos têm se mostrado promissores para uma variedade de matérias primas (MOSIER et al., 2005; YANG; WYMAN, 2008). Normalmente pré-tratamentos com ácido diluído, explosão a vapor catalisada por ácido e auto-hidrólise removem a maior parte da hemicelulose e uma pequena porção de lignina, porém podem gerar compostos como furfural e hidroximetilfurfural, que podem prejudicar a hidrólise enzimática ou a fermentação para a obtenção de etanol (PERSSON et al., 2009; RANJAN et al., 2009). Pré-tratamentos com pH próximo ao neutro, como apenas água quente, removem grande parte da hemicelulose, mas deixam a maior parte da lignina intacta (MOSIER et al., 2005; YANG; WYMAN, 2008). Em contrapartida, pré-tratamentos com pH elevado removem uma grande fração de lignina e parte das hemiceluloses (KUMAR et al., 2009), por exemplo, o tratamento com hidróxido de cálcio possui uma baixa formação de inibidores da fermentação, aumenta o pH e fornece uma

alternativa de baixo custo para solubilização da lignina (RABELO; MACIEL FILHO; COSTA, 2009).

Vários pré-tratamentos têm sido propostos para o bagaço de cana-de-açúcar visando melhorar a acessibilidade das enzimas à celulose (LAVARACK; GRIFFIN; LEE; CHUNG; DAY, 2009; RODMAN, 2002; MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2007; NEUREITER et al., 2002; RABELO; MACIEL FILHO; COSTA, 2008, 2009;). Martín, Klinke e Thomsen (2007) avaliaram o pré-tratamento com oxidação úmida (WO) para melhorar a convertibilidade e fermentabilidade do bagaço de cana-de-açúcar. Eles puderam verificar que a melhor condição de tratamento tanto para a recuperação de glicose, quanto para a retirada de lignina foi a 195 °C durante 15 min, quando puderam recuperar 92 % da celulose do bagaço.

Rabelo, Maciel Filho e Costa (2008) compararam dois tipos de pré-tratamentos alcalinos, peróxido de hidrogênio alcalino e hidróxido de cálcio, para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com celulasas de *T. reesei* e puderam observar que, quando o produto de interesse é glicose, os melhores resultados foram obtidos com o hidróxido de sódio para o bagaço moído. No entanto, para o bagaço sem moer, os resultados com os dois pré-tratamentos foram semelhantes.

O pré-tratamento do bagaço com uma carga de 0,15 g de hidróxido de cálcio/g de bagaço durante 65,6 h a 86,8 °C, produziu um resíduo com boas propriedades para hidrólise da celulose, obtendo-se nestas condições o máximo rendimento de glicose (RABELO; MACIEL FILHO; COSTA, 2009).

A deslignificação seletiva do bagaço com clorito de sódio a pH 3,8 permitiu avaliar o efeito de diferentes teores de lignina na sacarificação da celulose. A hidrólise enzimática de bagaço com diferentes quantidades de lignina, determinada pelo número Kappa, mostraram resultados de extensão da hidrólise variável dependendo da concentração de lignina no

bagaço. Nos bagaços com baixos teores de lignina (Kappa 1,2 e 0,8), a hidrólise é favorecida pela presença de lignina, fato explicado pelo aumento na concentração de enzima no material. Em bagaços com maior número kappa (16,8), a extensão da hidrólise da celulose é inversamente proporcional ao conteúdo de lignina (ADSUL et al., 2005).

Procedimentos usando líquidos iônicos também melhoram as características de hidrólise do bagaço. Recentemente um pré-tratamento foi avaliado com N-Oxido-N-metilmorfolina (NMMO) a 130 °C/1h tendo como resultado a dissolução da celulose. Em seguida a celulose foi precipitada com água e recuperada junto com os outros constituintes da parede celular, mas de forma mais porosa facilitando assim o acesso das enzimas (KUO; LEE, 2009).

Paralelamente, estudos têm sido realizados na busca de enzimas capazes de hidrolisar a celulose de maneira cada vez mais efetiva, seja pela combinação de enzimas para obtenção de complexos celulolíticos mais eficientes (ZHOU et al., 2009) ou pelo melhoramento de espécies através de métodos de engenharia genética (IMAI; IKARI; SUZUKI, 2004; JØRGENSEN et al., 2005; KANG et al., 2004). Por outro lado, há alguns trabalhos mostrando que a ação conjunta de celulasas e hemicelulasas resulta em uma maior produção de glicose quando comparada com as celulasas sozinhas, em função da retirada da hemicelulose que recobre as fibrilas de celulose melhorando o acesso das celulasas (BERLIN et al., 2005).

Tabka et al. (2006) estudaram a otimização do tratamento enzimático da palha de trigo e observaram que a utilização de enzimas acessórias, como xilanases e lacases, pode reduzir as concentrações de celulasas e melhorar a relação custo-benefício da produção de etanol pela hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos. O aumento da temperatura pode potencializar o tratamento enzimático das fibras, tornando-o mais eficaz e, desta forma a

utilização de enzimas termoestáveis tornaria o processo mais vantajoso (SUN; CHENG, 2002).

Rosgaard et al. (2006) avaliaram o efeito da combinação de celulases comerciais com os extratos enzimáticos produzidos pelos fungos termófilos *Chaetomium thermophilum*, *Thielavia terrestris*, *Thermoascus aurantiacus*, *Corynascus thermophilus* e *Myceliophthora thermophila* na hidrólise da palha de cevada pré-tratada com vapor. Os resultados mostraram que, quando se adiciona uma pequena quantidade (10 %) dos extratos enzimáticos dos fungos testados à mistura de Celluclast e β -glicosidase (Novozym 188), é possível duplicar liberação de glicose quando comparado com a hidrólise utilizando somente a mistura de celulases comerciais.

Zhang et al. (2009) investigaram a adição de enzimas acessórias, β -glicosidase, xilanase e pectinase, à celulase comercial (Spezyme CP) para aumentar a conversão da celulose e hemicelulose do sabugo de milho pré-tratado com amônia. A suplementação com xilanase ou pectinase pôde aumentar a conversão de celulose e hemicelulose, porém a adição da pectinase torna essa conversão mais efetiva. A suplementação com 0,12 mg de pectinase/g de glucana aumentou o rendimento de glicose em 7,5 % e de xilose em 29,3 %.

Na fase inicial de hidrólise, é necessário que as enzimas adsorvam na superfície do material, o que resulta na baixa concentração de enzimas livres na fase líquida. Geralmente, quando a celulose já foi hidrolisada, as enzimas retornam ao meio (SUN; CHENG, 2002). Entretanto, materiais lignocelulósicos ricos em celulose também contêm lignina, em cuja superfície também pode haver adsorção de enzimas. Essa adsorção é considerada parcialmente irreversível sendo que, somente 50 % da enzima adicionada pode ser recuperada, depois da hidrólise completa da fração celulósica (TU; CHANDRA; SADDLER, 2007). O alto teor de lignina reduz significativamente o desempenho da hidrólise enzimática

(JØRGENSEN; OLSSON, 2006; MUSSATTO et al., 2008), porém para bagaço a proporção exata de lignina que reduz a eficiência da hidrólise enzimática ainda não foi determinada. É muito provável que este valor dependa das características físicas do bagaço pré-tratado e também do tipo de enzima que está sendo avaliada. A afinidade da enzima pela celulose está relacionada com as suas características de hidrofobicidade, tamanho e carga (ERIKSSON; BÖRJESSON; TJERNELD, 2002).

2.7. XILANASES E CELULASES DE *Thermoascus aurantiacus*

Muitos microrganismos termófilos, incluindo alguns fungos, são frequentemente encontrados em pilhas de resíduos agrícolas e florestais em processo de compostagem (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000). A distribuição e a colonização da população destes microrganismos estão estritamente relacionadas com a capacidade de produzir uma variedade de enzimas capazes de degradar a parede celular desses resíduos (GHATORA et al., 2006).

Em 1907, o fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus* foi isolado por Hugo Míehe, em pilhas de feno aquecidas (COONEY; EMERSON, 1964). Este ascomiceto também foi detectado em tabaco, solo, cavacos de madeira, vagem de cacau, esterco de aves e efluentes (MACHUCA, 1991). *T. aurantiacus* apresenta uma cor laranja luminosa (Figura 14), ascósporos elípticos e não apresenta fase assexuada (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000), ainda que no passado Cooney e Emerson (1964) tenham descrito tal fase.

Figura 14. Aspecto visual do micélio de *Thermoascus aurantiacus* produzido em meio líquido.

A cepa brasileira de *T. aurantiacus* ATCC 204492 foi isolada de pilhas de cavacos de eucalipto em uma empresa de polpa e papel (AUER; KRUGNER; BARRICHELO, 1988) e os estudos mostraram que ela possui características diferentes da maioria das cepas deste mesmo fungo, no que se refere a sua capacidade degradadora de madeira (MACHUCA, 1991; MACHUCA; AOYAMA, DURÁN, 1999).

Thermoascus aurantiacus tem a capacidade de degradar uma ampla variedade de substratos celulósicos e lignocelulósicos, produzindo enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas em cultivos submerso ou sólido (SSC), sendo que este último se destaca como uma alternativa promissora para a produção de celulases (KALOGERIS et al., 2003). O cultivo em estado sólido aplica-se ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (RAIMBAULT, 1998).

Particularmente, a bioconversão dos resíduos agroindustriais está recebendo crescente atenção, uma vez que essas matérias residuais representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis. Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FSS) desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do

crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de elevados valores agregados. A FSS é muito utilizada para o enriquecimento protéico de resíduos agroindustriais de modo a serem utilizados na alimentação humana ou animal; para a destoxificação de resíduos, por meio da eliminação de substâncias recalcitrantes que impedem sua aplicação intensiva; e para a produção de compostos de alto valor agregado, como enzimas e diferentes metabólitos (PANDEY, 2003; RAIMBAULT, 1998).

Uma das maiores motivações para os estudos que visam à obtenção de enzimas por cultivos sólidos é que se obtém uma maior atividade enzimática por unidade de volume, o que favorece consideravelmente os processos de purificação com conseqüente redução do custo da enzima (PALMA, 2003).

Em diferentes cultivos de *Thermoascus aurantiacus* foi detectada a presença de enzimas como α -glucuronidase (KHANDKE; VITHAYATHIL; MURTHY, 1989a), amilase (ADAMS, 1992), arabinofuranosidase (ROCHE; DESGRANGES; DURAND, 1994), catalase (WANG et al., 1998), β -glicosidase (PALMA-FERNANDEZ; GOMES; DA SILVA, 2002), endoglucanase (PARRY et al., 2002), pectinases (MARTINS et al., 2002), exoglucanase (HONG et al., 2003), xilanase (PALMA, 2003) e β -manosidase (GOMES et al., 2007) entre outras. Machuca, Aoyama e Durán (1999) verificaram a produção de fenoloxidasas por *T. aurantiacus* ATCC 204492, que foram induzidas pela presença de diferentes substratos lignocelulósicos, principalmente farelo de trigo.

Kalogeris et al. (2003) encontraram resultados interessantes de produção de endoglucanase por *T. aurantiacus* em cultivo sólido, comparando farelo e palha de trigo, nos quais a palha mostrou-se melhor fonte indutora de endoglucanase com atividade de 1235 UI/g de substrato contra 433 UI/g, em meio de farelo de trigo. Com o sabugo de milho como fonte

de carbono, a produção de endoglucanase chegou a 18 UI/g de substrato. Em cultivo sólido (SSC), obteve-se a máxima produção de endoglucanase a 50 °C. O pH ótimo para a produção de endoglucanase encontrado foi 4,0; e acima do pH 5,0 o fungo não cresceu muito bem, tendo como consequência uma baixa taxa de produção de enzimas.

Leite, Gomes e Da Silva (2007), empregando fermentação sólida com sabugo de milho, encontraram uma β -glicosidase estável em numa faixa de pH de 4,5–6,5 e com temperatura ótima de 75 °C. Essa enzima mantinha 98 % de sua atividade inicial quando incubada a 70 °C por 1 h.

Souza, Roberto e Milagres (1999) e Santos (2001) mostraram que a produção de xilanase por *Thermoascus aurantiacus* é regulada principalmente pela natureza e concentração do substrato. O farelo de trigo e o bagaço de cana-de-açúcar foram indutores de altos níveis de atividade de xilanase em cultivo sólido, quando comparados com o meio líquido. Nas condições otimizadas, o cultivo deste fungo em farelo ou bagaço produziu cerca de 2700 UI/g de substrato de xilanase.

Santos et al. (2003) estudaram o perfil cinético da produção de xilanase por *T. aurantiacus* em meio sólido tendo como substrato bagaço de cana-de-açúcar e determinaram que a máxima produção dessa enzima ocorre após 144 h de cultivo, alcançando 500 UI/g. Milagres et al. (2004) avaliaram diferentes taxas de aeração, a fim de se identificar a melhor condição para a produção de xilanase por *T. aurantiacus* em um reator de coluna de vidro, observando que a atividade enzimática aumentou 22 vezes com uma taxa de aeração de 6 L/h.g de bagaço (1597 UI/g) em comparação com a condição estática (71 UI/g).

Kalogeris et al. (1998) verificaram o aumento na atividade de xilanase no cultivo de *T. aurantiacus* em farelo de trigo no estado sólido, ao otimizar algumas das variáveis do processo como fonte de carbono e nitrogênio, tipo de inóculo, umidade do meio e tamanho da

partícula. Os autores constataram que sob as condições otimizadas, o fungo produziu 6193 UI/g de substrato após sete dias de cultivo a 50 °C.

Tong, Cole e Shepherd (1980) purificaram três celulasas e uma β -glicosidase de massas molares 78, 48, 33 e 89 kDa, respectivamente, que foram produzidas por *T. aurantiacus* em cultivo submerso, com papel de filtro como fonte de carbono. Posteriormente, utilizando a mesma fonte de carbono, Khandke, Vithayathil e Murthy (1989b) purificaram uma β -glicosidase (98 kDa), uma exoglucanase (58 kDa) e uma endoglucanase (32,2 kDa) de massas molares bem próximas das enzimas purificadas pelo grupo de Tong.

Kalogeris et al. (1998) purificaram duas isoenzimas: xilanase I, com pI de 6,8 e massa molar de 33 kDa; e xilanase II, com pI de 5,5 e massa molar de 33 kDa da cultura de *T. aurantiacus* em farelo de trigo no estado sólido. A atividade ótima das enzimas foi a pH 4,0 - 4,5 e temperatura de 70 – 75 °C. Aproximadamente 58,0% e 35,0% da atividade máxima foi mantida a 85°C para a xilanase I e II, respectivamente. Mantendo-se as enzimas em 25 °C por 24 h, a xilanase I foi estável em pH 4,0 – 5,0 e a xilanase II em pH 8,0 - 9,0.

3. OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho foi examinar a produção de xilanases e celulasas em diferentes resíduos agrícolas e avaliar o extrato bruto e as celulasas purificadas na hidrólise de uma polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar.

METAS

- ✓ Acompanhar a produção das enzimas hidrolíticas de *T. aurantiacus* em quatro diferentes resíduos lignocelulósicos: palha e bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo e sabugo de milho e definir o melhor tempo de cultivo para celulasas e xilanases;
- ✓ Purificar as enzimas produzidas por *T. aurantiacus*;
- ✓ Comparar a eficiência de hidrólise da polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar com o extrato enzimático bruto, com as enzimas puras de *T. aurantiacus* e com enzimas comerciais;
- ✓ Avaliar o efeito do uso de uma protease no pré-tratamento da polpa de bagaço e a eficiência de hidrólise da polpa pré-tratada com o extrato enzimático bruto, com as enzimas puras de *T. aurantiacus* e com enzimas comerciais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. PRODUÇÃO DAS ENZIMAS EM CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

4.1.1. Substratos

Como substratos foram utilizados bagaço e palha de cana-de-açúcar, palha de trigo e sabugo de milho. O bagaço e a palha de cana foram gentilmente cedidos pela Companhia Açucareira Vale do Rosário, em Orlândia, SP. A palha de trigo foi doada pelo Instituto Agronômico de Campinas, em Tatuí, SP. O sabugo de milho foi coletado em fazendas da cidade de Lorena.

Os substratos foram lavados e secos em estufa a 45 °C, moídos em um moinho de facas (Manesco & Manieri) e selecionados por uma peneira de 25 mesh.

4.1.2. Preparo do inóculo

O fungo *Thermoascus aurantiacus* ATCC 204492 foi inoculado em tubos inclinados contendo ágar, extrato de malte e dextrose de batata (3:1:0,5). Os tubos foram incubados em estufa de cultura (FANEM® 502/4-R) com temperatura controlada de 45 °C, por 4 dias ou até a formação de esporos. Após esse período, uma solução de ascósporos foi obtida pela raspagem dos tubos com água destilada estéril. Uma alíquota foi utilizada para a contagem de ascósporos em câmara de Neubauer.

4.1.3. Preparo do meio

Os meios foram preparados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 15 g de sabugo de milho, palha de trigo, palha de cana-de-açúcar ou bagaço de cana-de-açúcar moídos a 25 mesh. Os substratos foram enriquecidos com 1,5 mL de solução mineral (VOGEL, 1956) previamente esterilizada e a umidade ajustada para 81 % de acordo com a equação 1.

$$V_1 = \frac{M_s}{C} - M_u - V_2 - V_3 \quad \text{Eq. (1)}$$

onde: V_1 = Volume de H₂O destilada estéril (mL); M_s = massa seca de substrato (g); C = teor de sólidos; M_u = massa úmida de substrato (g); V_2 = volume de inóculo (mL) e V_3 = volume de solução mineral (mL).

Os frascos foram tampados e autoclavados por 15 minutos, a 121 °C. Após o resfriamento, foi feita a inoculação de 10⁴ ascósporos por grama de substrato seco (SOUZA, 1998). Para o bagaço de cana-de-açúcar, também foram inoculados 10⁸ ascósporos por grama de substrato seco, a fim de se verificar a influência da quantidade de inóculo na produção de enzimas hidrolíticas (DA SILVA et al., 2005).

Os frascos tampados foram colocados dentro de sacos de polipropileno, para minimizar a perda de umidade do meio, incubados em estufa sem agitação a 45 °C por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 17, 24 e 37 dias. A amostragem foi realizada nos tempos pré-determinados por retirada de um frasco.

4.1.4. Extração das enzimas

Adicionou-se tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 aos frascos na proporção de 1:7 (1 g seca de substrato : 7 mL de tampão). Após a homogeneização, os frascos foram agitados a 100 rpm, por 1 h a temperatura ambiente. A solução foi filtrada em gaze e o extrato centrifugado a 10000 x g, durante 15 minutos, a 4 °C (DAMON/IEC DIVISION B-20A Centrifuge). O sobrenadante foi recolhido, mediu-se o pH e o volume recuperado. O extrato foi armazenado a -80 °C para análises posteriores.

4.2. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

As atividades das enzimas foram expressas em UI/mL ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) e as unidades totais dos extratos foram obtidas multiplicando-se UI/mL pelo volume extraído. Para relacionar as unidades totais produzidas com a quantidade de substrato inicial, UI foi dividida pela massa seca (g) e reportada em UI/g ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$). Para a determinação das atividades enzimáticas utilizou-se o Espectrofotômetro U-2001 (Hitachi).

4.2.1. β -D-Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada de acordo com o método descrito por Bailey, Biely e Poutanen (1992), seguido da quantificação de açúcares redutores liberados a partir da xilana, pelo método do ácido-3,5-dinitrossalicílico (MILLER, 1959).

Uma alíquota de 0,9 mL de xilana 1 % (birchwood – Sigma X0502) foi adicionada a 0,1 mL de extrato enzimático e incubados a 50 °C por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS e os tubos de ensaio foram fervidos a 100 °C em banho-maria, por 5 minutos. Após o resfriamento, realizou-se leitura da absorbância a 540 nm. Foi preparado um controle para ajuste do zero do aparelho (branco) no qual se substituiu os volumes de xilana e enzima pelo tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,4. Foram feitos controles para cada amostra, adicionando o reagente de DNS antes do extrato enzimático. A absorbância destes controles foi descontada das respectivas amostras.

A curva padrão foi construída com soluções de xilose (Merck) 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 16 e 20 $\mu\text{mol/mL}$. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μmol de açúcar por minuto, expresso em xilose.

4.2.1.1. Preparo da solução de xilana 1,0 %

A solução de xilana foi preparada dissolvendo-se 1 g de xilana (birchwood-Sigma X0502) em 80 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,4. A solução foi aquecida até ebulição em forno microondas. Após retornar à temperatura ambiente, o volume foi ajustado para 100 mL com o referido tampão. A solução permaneceu em agitação mecânica até a completa solubilização da xilana.

4.2.1.2. Preparo do reagente de DNS

O reagente de DNS foi preparado dissolvendo-se completamente 10,6 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio, em 1,4 L de água destilada. A seguir, adicionou-se 300 g de tartarato de sódio e potássio; 7,6 g de fenol (aquecido a 50 °C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio. O volume foi acertado para 1,5 L; filtrado e armazenado em frasco âmbar (MILLER, 1959).

4.2.2. β -Xilosidase

A atividade de β -xilosidade foi determinada segundo Tan, Mayers e Saddler (1987), através da estimativa do *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado durante a hidrólise do reagente de *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*NPX).

Uma alíquota de 0,8 mL de solução de *p*NPX 0,1 % foi adicionada a 0,2 mL de extrato enzimático e incubada a 50 °C por 30 minutos. As reações foram interrompidas adicionando-se 2 mL de bicarbonato de sódio 10 % em cada tubo de ensaio e a absorbância foi lida a 410 nm. Foram realizados controles para cada uma das amostras, adicionando-se a solução de bicarbonato de sódio 10 % antes do extrato enzimático. O zero do aparelho foi ajustado com uma solução preparada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 em substituição aos volumes de enzima e *p*NPX.

O *p*NP liberado foi determinado através da curva de calibração com o padrão de *p*-nitrofenol nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,150; 0,175 e 0,2 $\mu\text{mol/mL}$. Uma unidade de atividade enzimática de β -xilosidade foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μmol de *p*NP por minuto.

4.2.2.1. Preparo da solução de *p*-nitro-fenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*NPX) 0,1 %

A solução de *p*NPX foi preparada dissolvendo-se 0,1 g de *p*NPX (Sigma) em 90 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8; sob agitação e o volume foi ajustado para 100 mL com o referido tampão.

4.2.2.2. Preparo do bicarbonato de sódio 10 %

A solução de bicarbonato de sódio 10 % foi preparada dissolvendo-se 10 g de bicarbonato de sódio em 100 mL de água destilada, sob agitação e aquecimento.

4.2.3. β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada segundo Tan, Mayers e Saddler (1987), através da estimativa do *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado durante a hidrólise do reagente de *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*NPG).

Uma alíquota de 0,8 mL de solução de *p*NPG 0,1 % foi adicionada a 0,2 mL de extrato enzimático e incubada a 50 °C por 30 minutos. As reações foram interrompidas adicionando-se 2 mL de bicarbonato de sódio 10 % em cada tubo de ensaio e a absorbância foi lida a 410 nm. Foram realizados controles para cada uma das amostras, adicionando-se a solução de bicarbonato de sódio 10 % antes do extrato enzimático. Para o branco do aparelho foi realizado um controle no qual os volumes de enzima e *p*NPG foram substituídos pelo tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8.

O *p*NP liberado foi determinado através da curva de calibração com o padrão de *p*-nitrofenol nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,150; 0,175 e 0,2 $\mu\text{mol/mL}$. Uma unidade de atividade enzimática de β -glicosidade foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μmol de *p*NP por minuto.

4.2.3.1. Preparo da solução de *p*-nitro-fenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*NPG) 0,1 %

A solução de *p*NPG foi preparada dissolvendo-se 0,1 g de *p*NPG (Sigma) em 90 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8; sob agitação e o volume foi ajustado para 100 mL com o referido tampão.

4.2.4. α -L-arabinofuranosidase

A atividade de α -L-arabinofuranosidase foi determinada segundo Tan, Mayers e Saddler (1987), através da estimativa do *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado durante a hidrólise do reagente de *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (*p*NPAraf).

Uma alíquota de 0,8 mL de solução de *p*NPAraf 0,1 % foi adicionada a 0,2 mL de extrato enzimático e incubada a 50 °C por 30 minutos. As reações foram interrompidas adicionando-se 2 mL de bicarbonato de sódio 10 % em cada tubo de ensaio e a absorbância foi lida a 410 nm. Foram realizados controles para cada uma das amostras, adicionando-se a solução de bicarbonato de sódio 10 % antes do extrato enzimático. Para o branco do aparelho foi realizado um controle no qual os volumes de enzima e *p*NPAraf foram substituídos pelo tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8.

O *p*NP liberado foi determinado através da curva de calibração com o padrão de *p*-nitrofenol nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,150; 0,175 e 0,2 $\mu\text{mol/mL}$. Uma unidade de atividade enzimática de β -glicosidade foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μmol de *p*NP por minuto.

4.2.4.1. Preparo da solução de *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (*p*NPAraf) 0,1 %

A solução de *p*NPAraf foi preparada dissolvendo-se 0,1 g de *p*NPAraf (Sigma) em 90 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8; sob agitação e o volume foi ajustado para 100 mL com o referido tampão.

4.2.5. Endoglucanase

A atividade de endo-1,4- β -glucanase foi determinada segundo técnica descrita por Tanaka et al. (1981) que consiste em conduzir a hidrólise de uma solução de carboximetilcelulose 0,44 %. A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959).

Uma alíquota de 0,9 mL de carboximetilcelulose 0,44 % (Sigma C5013) foi adicionada a 0,1 mL de extrato enzimático e incubados a 50 °C por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS. Os tubos de ensaio foram fervidos a 100 °C em banho-maria, por 5 minutos. Após o resfriamento, realizou-se leitura da absorbância a 540 nm. Para o ajuste do zero do aparelho, foi preparado um controle no qual se substituiu os volumes de carboximetilcelulose e enzima pelo tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,4. Foram feitos controles para cada amostra, adicionando o reagente de DNS antes do extrato enzimático.

A curva padrão foi construída com solução de glicose (Merck), nas concentrações de 1,38; 2,77; 4,16; 5,55; 8,83 e 11,11 μ mol/mL. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μ mol de açúcar por minuto, expresso em glicose.

4.2.5.1. Preparo da solução de carboximetilcelulose 0,44 %

A solução foi preparada dissolvendo-se 0,44 g de carboximetilcelulose (Sigma C5013-média viscosidade) em 80 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,4. A solução foi submetida a um leve aquecimento e levada à agitação mecânica, até a completa dissolução. Após o resfriamento, o volume foi ajustado para 100 mL com o referido tampão.

4.2.6. Exoglucanase

A atividade de exo-1,4- β -glucanase foi determinada segundo técnica descrita por Wood e Bhat (1988) que consiste em conduzir a hidrólise de uma solução de Avicel (celulose microcristalina) 1 %. A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959).

Uma alíquota de 0,9 mL de Avicel 1 % (Fluka Biochemika 11365) foi adicionada a 0,1 mL de extrato enzimático e incubados a 50 °C por 60 minutos. A reação foi interrompida com 1,5 mL de DNS. Os tubos de ensaio foram fervidos a 100 °C em banho-maria, por 5 minutos. Após o resfriamento, a mistura foi centrifugada a 12000 x g por 15 minutos para retirada dos sólidos solúveis e então, realizou-se leitura da absorbância do sobrenadante a 540 nm. Foi feito um controle no qual se substituiu os volumes de Avicel e enzima pelo tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,4 para o ajuste do zero do aparelho. Controles para cada amostra foram preparados adicionando-se o reagente de DNS antes do extrato enzimático.

A curva padrão foi construída com solução de glicose (Merck), nas concentrações de 1,38; 2,77; 4,16; 5,55; 8,83 e 11,11 $\mu\text{mol/mL}$. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μmol de açúcar por minuto, expresso em glicose.

4.2.6.1. Preparo da solução de Avicel 1 %

A solução foi preparada misturando-se 1 g de Avicel (Fluka Biochemika 11365) em 80 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,4. Posteriormente, o volume foi ajustado para 100 mL com o referido tampão.

4.2.7. Celulases Totais

A atividade de celulases totais foi determinada segundo técnica descrita por Ghose (1987) que consiste em conduzir a hidrólise de papel de filtro Whatman nº 1. A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959).

Uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 (1 x 6 cm), equivalente a 50 mg, foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e 0,5 mL de extrato enzimático. Os tubos foram incubados a 50 °C por 60 minutos e a reação foi interrompida com 3 mL de DNS. Os tubos foram fervidos a 100 °C em banho-maria, por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 20 mL de água destilada e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm. Foi feito um controle para ajuste do aparelho substituindo o papel de filtro e o volume de enzima pelo tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8. Controles para cada amostra, adicionando o reagente de DNS antes do extrato enzimático foram usados para descontar os açúcares que não foram produzidos durante a reação enzimática.

A curva padrão foi construída com glicose (Merck) 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 4,0 mg/mL.

4.3. PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS PRODUZIDAS POR *T. aurantiacus*

A purificação das enzimas foi realizada por cromatografia de troca iônica. As frações foram analisadas quanto às atividades de xilanase, endoglucanase e β -glicosidase e agrupadas de acordo com as atividades correspondentes. O perfil protéico das amostras foi avaliado pela medição da Abs_{280nm} e por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).

4.3.1. DEAE Sepharose CL6B

4.3.1.1. pH 3,5

Um volume de 50 mL de enzimas de *T. aurantiacus* produzidas em sabugo de milho foi aplicado em uma coluna trocadora de ânions DEAE Sepharose CL6B (Amersham Bioscience) (1,0 x 10,0 cm). Após a aplicação da amostra, a coluna foi eluída com 20 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M em pH 3,5 a um fluxo de 0,5 mL/min. As proteínas adsorvidas na coluna foram eluídas com 20 mL de NaCl 0,2 M preparado no mesmo tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 3,5. Finalmente, a coluna foi equilibrada com 20 mL do tampão (Khandke, Vithayathil e Murthy, 1989b) (Figura 15).

O mesmo procedimento de purificação foi repetido, porém trocando o pH do tampão para 6,0 (Figura 16). As amostras foram eluídas a uma taxa de 0,5 mL/min e frações de 5,0 mL foram coletadas e analisadas quanto às atividades das enzimas de interesse.

Figura 15. Fluxograma de purificação das enzimas produzidas por *T. aurantiacus* em cultivo sólido de sabugo de milho, com 17 dias, em pH 3,5.

Figura 16. Fluxograma de purificação das enzimas produzidas por *T. aurantiacus* em cultivo sólido de sabugo de milho, com 17 dias, em pH 6,0.

4.4. ELETROFORESES

4.4.1. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As eletroforeses foram realizadas em gel de poliacrilamida descontínuo com SDS (ALFENAS et al., 1991). Na fase de concentração das amostras no gel a 4,5 %, o aparelho foi ajustado para 100 V e 30 mA e, na fase de separação, aplicou-se 150 V e 50 mA ao gel. Os géis foram montados em placas de vidro (10 x 10 cm) com 1 mm de espessura. O tampão da corrida foi Tris/glicina pH 8,9; acrescido de SDS (ALFENAS et al., 1991).

4.4.2. Preparo dos géis

Géis de poliacrilamida foram produzidos por copolimerização de acrilamida e bis-acrilamida (Bis) na presença de persulfato de amônio e tetrametiletenodiamina (TEMED). Os componentes acrílicos foram preparados segundo Laemmli (1970), em duas fases, que consiste em géis concentrador e separador, preparados com os componentes descritos nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Reagentes utilizados na preparação do gel concentrador.

Soluções	Concentração 4,5 %
Acrilamida: Bis-acrilamida (36,5:1)	2,785 mL
Tris-HCl 0,6173 M pH 6,8	0,375 mL
Água destilada	2,785 mL
SDS 10 % (p/v)	25 µL
Persulfato de amônio 10 % (p/v)	62,5 µL
TEMED	20 µL

Tabela 3 – Reagentes utilizados na preparação do gel separador.

Soluções	Concentração 12,5 %	Concentração 10 %
Acrilamida: Bis-acrilamida (36,5:1)	3,125 mL	2,5 mL
Tris-HCl 0,6173 M pH 6,8	0,75 mL	0,75 mL
Água destilada	3,575 mL	4,2 mL
SDS 10 % (p/v)	50 µL	50 µL
Persulfato de amônio 10 % (p/v)	125 µL	125 µL
TEMED	20 µL	20 µL

4.4.3. Preparo das amostras

As amostras para as corridas eletroforéticas foram preparadas em frascos eppendorfs de 0,5 mL, colocando 20 µL de amostra e 10 µL de tampão da amostra. Os frascos foram levados à fervura, por 5 minutos. Após o resfriamento, as amostras foram cuidadosamente injetadas em canaletas formadas no gel concentrador.

4.4.4. Preparo do tampão da amostra

O tampão da amostra foi preparado de acordo com a tabela 4.

Tabela 4 – Reagentes utilizados na preparação do tampão da amostra.

Reagentes	Quantidades
Tris-HCl 1 M pH 6,8	2,0 mL
SDS 10 % (p/v)	4,0 mL
β-Mercaptoetanol	2,0 mL
Glicerol	5,0 mL
Azul de Bromofenol	10 mg

4.4.5. Coloração com azul de Coomassie

4.4.5.1. Solução fixadora

A solução fixadora foi preparada adicionando-se 10 mL de ácido acético glacial, 45 mL de metanol e 45 mL de água destilada.

4.4.5.2. Solução corante

A solução corante foi preparada adicionando 0,1 g de azul de Coomassie a 100 mL da solução fixadora, descrita no item 4.4.5.1.

As bandas protéicas presentes no SDS-PAGE puderam ser visualizadas após a incubação do gel em solução corante, por 24 h a 37 °C. Depois do período de incubação, o gel foi lavado de 2 a 3 vezes com a solução fixadora, para a retirada do excesso corante.

4.4.6. Coloração com nitrato de prata

Após a corrida eletroforética, as bandas protéicas presentes no gel foram reveladas por impregnação com nitrato de prata. O gel foi incubado por 30 minutos em uma solução contendo 20 mL de etanol, 5 mL de ácido acético glacial e água destilada em quantidade suficiente para completar 50 mL de solução.

Em seguida, o gel foi novamente incubado por mais 30 minutos, numa solução contendo 15 mL de etanol, 0,25 mL de glutardialdeído (25 %), 2 mL de tiosulfato de sódio (5 %), 3,4 g de acetato de sódio e água destilada em quantidade suficiente para 50 mL de solução. O gel foi então lavado com água destilada por 3 vezes, com duração de 5 minutos para cada lavagem.

Após as lavagens, o gel foi mantido por 20 minutos, ao abrigo da luz, numa solução contendo 5 mL de nitrato de prata (2,5 %), 0,02 mL de formaldeído (37 %) e água destilada até o volume de 50 mL. O gel foi novamente lavado com água destilada por 2 vezes e em seguida levado a uma solução reveladora contendo 1,25 g de carbonato de sódio, 0,02 mL de formaldeído (37 %) e água destilada em quantidade suficiente para 50 mL de solução, no qual permaneceu até o aparecimento das bandas de proteínas.

A reação foi interrompida pela adição de uma solução contendo 3,65 g de EDTA em 250 mL de água destilada. Todas as soluções foram preparadas no momento do uso.

4.5. ELETROFORESES NATIVAS (PAGE)

As eletroforeses nativas foram realizadas em gel de poliacrilamida descontínuo, preparado de acordo com o item 4.4.2., porém sem a adição de SDS. Outra diferença é que as amostras não foram fervidas, antes de serem aplicadas no gel (ALFENAS et al., 1991).

4.5.1. Preparo dos géis para determinação da atividade de xilanase e endoglucanase

Foram preparados géis de poliacrilamida em condição não desnaturante, acrescido de solução de xilana “oat spelt” 1 % ou solução de carboximetilcelulose (CMC) 0,44 % (Tabela 5).

Tabela 5 – Reagentes utilizados na preparação do gel separador.

Soluções	Concentração 12,5 %
Acrilamida: Bis-acrilamida (36,5:1)	3,125 mL
Tris-HCl 0,6173 M pH 6,8	0,75 mL
Solução de xilana ou CMC	3,575 mL
Persulfato de amônio 10 % (p/v)	0,125 mL
TEMED	20 µL

Após a corrida eletroforética, o gel foi incubado em tampão MES/NaOH (100 mM, pH 5,0) por 60 minutos a temperatura ambiente, sob leve agitação, para que houvesse a troca de pH do gel. O tampão foi removido após lavagens com água deionizada. O gel foi colocado em uma solução de Vermelho Congo 0,1 % (Vetec Química Fina), por 30 minutos. Em seguida, o gel foi lavado com solução de NaCl 1 M até a visualização das bandas correspondentes, as quais se apresentaram como halos claros no gel.

A atividade de β -glicosidase no gel foi determinada incubando-o em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 5,0), contendo 0,1 % de esculina (Sigma) e 0,03 % de cloreto férrico a 50 °C, até que bandas pretas correspondentes à enzima pudessem ser identificadas no gel. A reação foi interrompida pela imersão do gel em solução de glicose 10 % (KWON et al., 1994).

4.6. DOSAGEM DE PROTEÍNA

O teor de proteínas foi determinado como descrito por Bradford (1976). A reação foi iniciada adicionando 0,1 mL da amostra a 1 mL do reagente. Após 5 minutos realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

4.6.1. Preparo do Reagente de Bradford

O reagente foi preparado pela dissolução completa de 100 mg de Azul de Coomassie G-250 (Biochemical) em 50 mL de metanol 95 %. A seguir, foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85 %. O frasco foi fechado e mantido em repouso no escuro, por 24 h. O volume da solução foi ajustado para 1 L com água deionizada e deixado em repouso por mais 24 h, no escuro. Então, a solução foi filtrada por 2 vezes, até obter uma coloração de chá, e armazenada em geladeira, em vidro âmbar envolto em papel alumínio.

Para a padronização do reagente, foi construída a curva padrão com solução de albumina de soro bovina (Merck), nas concentrações de 20; 40; 50; 100; 150; 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$.

4.7. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR DAS PROTEÍNAS

As massas molares das proteínas presentes foram estimadas por SDS-PAGE, utilizando-se do gráfico dos logaritmos das massas molares ($\log MM$) das proteínas padrões (Tabela 6) pelas suas respectivas mobilidades eletroforéticas (R_f). Os marcadores foram

dissolvidos em 100 μL de tampão da amostra (4.4.4.), fervidos por 15 minutos e armazenados no congelador. Em cada gel foram aplicados, em uma canaleta, 7 μL dessa solução padrão.

Tabela 6 – Marcadores de baixa massa molar.

Proteína	Massa Molar
Fosforilase	97 kDa
Albumina	66,0 kDa
Ovoalbumina	45,0 kDa
Anidrase Carbônica	30,0 kDa
Inibidor de tripsina	20,1 kDa
α -lactoalbumina	14,4 kDa

4.8. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

Em um tubo de ensaio, cerca de 300 mg de amostra foram hidrolisados com 1,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 72 % (p/v) por 7 minutos a 45 °C. A reação foi interrompida com a adição de 45 mL de H_2O destilada, transferindo o conteúdo do tubo para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Essa mistura foi autoclavada a 1 atm por 30 minutos (ROCHA, 2000).

O conteúdo do frasco foi filtrado em cadinhos de vidro sinterizado nº 4, previamente tarados. O resíduo sólido foi lavado com água destilada, seco em estufa a 105 °C até massa constante para a determinação gravimétrica da lignina residual insolúvel (Klason). O filtrado foi ajustado para 100 mL em um balão volumétrico e utilizado para a determinação dos teores de açúcares redutores e ácido acético por cromatografia (CLAE), utilizando uma coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H mantida a 45 °C, detector de índice de refração WATERS 2414, fase móvel de H_2SO_4 0,01 N, fluxo de 0,6 mL/min, volume de amostra injetada de 20 μL . As amostras foram previamente filtradas em filtro ‘Sep Pack’ C18 (Millipore).

A partir dessas concentrações foram calculados os teores de glucana, xilana e acetil, multiplicando as porcentagens de cada composto por 0,9; 0,88 e 0,72; respectivamente. Os fatores mencionados se referem à adição de água aos polímeros durante a hidrólise ácida (ROCHA, 2000).

O teor de lignina solúvel em H_2SO_4 foi determinado pela medida da absorbância em 205 nm de uma diluição do hidrolisado. Para o cálculo da concentração de lignina solúvel foi utilizada uma absorvidade (ϵ) de 105 L/g.cm nesse comprimento de onda (DENCE, 1992). A lignina total foi considerada como a soma das ligninas solúvel e insolúvel.

4.9. OBTENÇÃO DA POLPA CELULÓSICA

A polpa celulósica utilizada como substrato da hidrólise enzimática foi obtida do bagaço de cana-de-açúcar. Inicialmente, o bagaço foi moído em um moinho de facas (Manesco & Manieri) e selecionado por uma peneira de 25 mesh, lavado com solução de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 0,2 % (m/v) a 90 °C, por 1 h para a remoção de metais.

Posteriormente, esse bagaço livre de metais foi tratado com uma solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 4 % (m/v), em pH 11,6, o qual foi ajustado com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M, por 10 h a 40 °C, sob agitação constante (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2008). Após a filtração, a polpa foi lavada com água destilada até pH neutro, levada à estufa a 45 °C, por 24h, moída e selecionada por uma peneira de 25 mesh. A caracterização da polpa foi realizada de acordo com o item 4.8.

4.10. HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS

Os experimentos foram conduzidos em tubos de centrífuga de 50 mL a 50 °C sob agitação (120 rpm). Para aumentar a eficiência da agitação os tubos foram inclinados a 45° no banho.

4.10.1. Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*

O experimento foi conduzido com 5 % (p/v) de bagaço de cana-de-açúcar (25 mesh) e volumes de extratos (Tabela 7) suficientes para alcançar 18,6 UI/g de endoglucanase. Para completar o volume final de 10 ml adicionou-se tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0). Para prevenir a contaminação microbiológica, o referido tampão foi preparado com azida sódica (0,10 % m/v).

Tabela 7 – Extratos enzimáticos aplicados no bagaço de cana-de-açúcar.

Substrato	Tempo de cultivo
Sabugo de milho	17 dias
Bagaço de cana	9 dias
Palha de cana	9 dias
Palha de trigo	8 dias

Nos tempos correspondentes a 24, 48 e 72 h, os tubos foram retirados e fervidos por 5 minutos. Após o resfriamento, o volume foi centrifugado a 10000 x g, por 15 minutos. O sobrenadante foi separado e analisado quanto ao teor de açúcares por CLAE. Como controles foram realizados ensaios substituindo a enzima pelo tampão. Para efeito de comparação, realizou-se também a hidrólise da polpa celulósica com a celulase comercial Celluclast 1.5 L.

4.10.2. Ensaios de hidrólise da polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar

O experimento foi conduzido com 5 % (p/v) de polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar e um volume de enzima de *T. aurantiacus* correspondente a 18,6 UI/g de endoglucanase. O volume final de 10 ml foi completado com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0), acrescido de azida sódica (0,10 % m/v). Foram utilizadas enzimas de *T. aurantiacus* produzidas sabugo de milho.

Nos tempos correspondentes a 1, 3, 6, 10, 24, 48 e 72 h foram retirados 500 µL do sobrenadante para a determinação da atividade de xilanase e endoglucanase. Os tubos foram fervidos por 5 minutos, centrifugados a 10000 x g por 15 minutos e o sobrenadante coletado para análises do teor de açúcar por DNS e CLAE e de proteínas, por Bradford (ISHIHARA et al., 1997, KALOGERIS et al., 2003, BERLIN et al., 2005). Como controles foram realizados ensaios substituindo a enzima pelo tampão. Para efeito de comparação, realizou-se também a hidrólise da polpa celulósica com a celulase comercial Celluclast 1.5 L (Novozymes).

A conversão enzimática da celulose (CEC) foi estimada como a soma dos rendimentos de glicose e celobiose, calculados de acordo com a Equação 2.

$$CEC (\%) = \left(\frac{\text{Glicose} \times 0,9 + \text{Celobiose} \times 0,95}{\text{celulose}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

A conversão enzimática da hemicelulose (CEH) foi estimada como a soma dos rendimentos de xilose e arabinose, calculados de acordo com a Equação 3.

$$CEH (\%) = \left(\frac{\text{Xilose} + \text{Arabinose}}{\text{Hemicelulose}} \right) \times 0,88 \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

Os extratos enzimáticos descritos na tabela 7 também foram utilizados na hidrólise da polpa celulósica de bagaço de cana-de-açúcar, de acordo com o descrito no item 4.10.1.

4.10.3. Tratamento da polpa celulósica com protease

4.10.3.1. Extração e recuperação de proteases

Cascas e os talos de abacaxi foram triturados, em liquidificador com água destilada, e o suco obtido foi passado em uma peneira, para retirada das partículas grosseiras. O filtrado foi centrifugado a 10000 x g por 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi separado e armazenado a -80 °C

As proteínas presentes no suco foram precipitadas com etanol a 4 °C. O volume usado foi determinado pela equação 4 e o etanol foi adicionado lentamente a 100 mL do suco de abacaxi, sob leve agitação. A mistura foi centrifugada a 1500 x g por 30 minutos.

$$C_E \times V_E = C_F \times (V_A + V_E) \quad \text{Eq. 4}$$

onde C_E = Concentração de etanol; V_E = Volume de etanol; C_F = Concentração final e V_A = Volume de extrato de abacaxi.

O sobrenadante foi coletado e o volume foi medido. O precipitado foi ressuspendido em 5 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 6,0 (CESAR, 1999). Nas duas frações foram analisadas atividade de protease e teor de proteína.

4.10.3.2. Determinação da atividade de protease

Um volume de 0,5 mL de solução de caseína 1 % e 0,5 mL de extrato de abacaxi foram incubados a 50 °C, por 15 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20 %. O material foi centrifugado a 10000 x g por 15 minutos, o sobrenadante recolhido e determinada a absorbância a 280 nm. Para o branco do aparelho, foi feito um controle no qual se substituiu os volumes de caseína e extrato de abacaxi pelo tampão tris-HCl 0,1 M pH 6,0. Os controles para cada amostra foram feitos adicionando

TCA 20 % na reação antes do extrato enzimático (KEMBHAVI; KULHARNI; PANT, 1993; SELLAMI-KAMOUN et al., 2008).

4.10.3.3. Tratamento da polpa com protease

O experimento foi conduzido com 5 % (p/v) de polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar e um volume de protease correspondente a atividade final de 5 UI/g. Para completar o volume final de 10 ml adicionou-se tampão acetato de sódio 50 mM (pH 6,0) e a reação foi conduzida por 24h a 45 °C, sob agitação de 120 rpm.

Após 24 h, os tubos foram fervidos a 100 °C, por 5 minutos para a desnaturação da protease. Após o resfriamento, os tubos foram centrifugados a 10000 x g, por 15 minutos, o sobrenadante foi separado e analisado quanto ao teor de açúcares redutores por CLAE (BERLIN et al., 2005; KALOGERIS et al., 2003). Como controles foram realizados ensaios substituindo a enzima pelo tampão.

A polpa celulósica pré-tratada com protease foi posteriormente hidrolisada com o extrato de *T. aurantiacus* produzido em palha de cana. Também foram avaliadas separadamente a endoglucanase e a β -glicosidase purificadas do extrato enzimático obtido do cultivo de *T. aurantiacus* em sabugo de milho. Comparativamente realizou-se a hidrólise com a Celluclast 1.5 L. O volume foi ajustado para 10 ml com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e azida sódica (0,10 % m/v).

A reação foi incubada por 72h a 50 °C e 120 rpm e em seguida os tubos foram fervidos por 5 minutos. Após o resfriamento, o material foi centrifugado a 10000 x g, por 15 minutos. O sobrenadante foi separado e analisado quanto ao teor de açúcares redutores por CLAE (BERLIN et al., 2005; KALOGERIS et al., 2003). Como controles foram realizados ensaios substituindo a enzima pelo tampão.

4.10.4. Tratamento da polpa de bagaço com ácido

Em um Erlenmeyer de 125 mL, 5 g da polpa celulósica foi tratada com uma solução de 125 ou 250 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado em quantidade suficiente para 50 mL. Os frascos foram tampados e autoclavados a 121 °C por 45 minutos (GROHMANN; TORGET; HIMMEL, 1985). Após o resfriamento, o conteúdo dos frascos foi filtrado e analisado quanto ao teor de açúcares redutores por CLAE. A polpa foi então lavada sucessivas vezes, até que o pH se tornasse neutro. Depois de secagem em estufa a 60 °C, a polpa foi submetida à hidrólise enzimática com 18,6 UI/g de endoglucanase. Depois de 72 h, no banho a 50 °C e 120 rpm, os tubos foram fervidos a 100 °C, por 5 minutos. Após o resfriamento, os tubos foram centrifugados a 10000 x g, por 15 minutos. O sobrenadante foi separado e analisado quanto ao teor de açúcares por CLAE. Como controles foram realizados ensaios substituindo a enzima pelo tampão. Para efeito de comparação, realizou-se também a hidrólise da polpa celulósica com a celulase comercial Celluclast 1.5 L.

4.10.5. Tratamento da polpa de bagaço com xilanase

Em um Erlenmeyer de 125 mL, 5 g da polpa celulósica foi tratada com a xilanase purificada de *T. aurantiacus* (10 ou 20 UI/g) e tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) em quantidade suficiente para 50 mL. Os frascos foram tampados, incubados por 24h, a 50 °C e 120 rpm e em seguida fervidos a 100 °C, por 5 minutos. Após o resfriamento, o conteúdo dos frascos foi filtrado e analisado quanto ao teor de açúcares por CLAE. A polpa foi lavada sucessivas vezes e, após a secagem em estufa a 60 °C, foi submetida à hidrólise com celulasas.

O experimento foi conduzido com 5 % (p/v) de polpa pré-tratada com xilanase e 18,6 UI/g de endoglucanase. Depois de 72 h, a 50 °C e 120 rpm, os tubos foram fervidos a 100 °C, por 5 minutos (ISHIHARA et al., 1997). Após o resfriamento, os tubos foram

centrifugados a 10000 x g, por 15 minutos; o sobrenadante separado e analisado quanto ao teor de açúcares por CLAE. Como controles foram realizados ensaios substituindo a enzima pelo tampão. Para efeito de comparação, realizou-se também a hidrólise da polpa celulósica com a celulase comercial Celluclast 1.5 L.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. EFEITO DE DIFERENTES SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS NA PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES POR *T. aurantiacus*

Inicialmente foi feita a caracterização dos substratos *in natura* utilizados no cultivo de *T. aurantiacus*, à exceção da palha de trigo cujo material e caracterização foram fornecidos por Canilha (2006) (Tabela 8). O bagaço apresentou o maior conteúdo de celulose e a palha de trigo, o maior conteúdo de lignina. A concentração de hemicelulose foi semelhante nos materiais. A polpa do bagaço não foi usada no meio de crescimento de *T. aurantiacus* para a produção de enzimas, sua caracterização foi feita visando a utilização deste material nos ensaios de hidrólise enzimática.

Tabela 8 – Composição dos materiais lignocelulósicos *in natura* utilizados como substrato neste trabalho.

Substrato	Composição (% peso seco)			Referência
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	
Palha de trigo	31,0	26,0	24,0	Canilha, 2006.
Sabugo de milho	30,6	28,7	20,5	Este trabalho.
Palha de cana-de-açúcar	35,1	27,4	18,3	Este trabalho.
Bagaço de cana-de-açúcar	42,4	25,2	19,6	Este trabalho.
Polpa de bagaço	73,68	3,92	5,02	Este trabalho.

Nestes substratos, *T. aurantiacus* produziu xilanases e celulases em diferentes níveis e com picos de atividade em tempos variados (Figura 17).

A xilanase foi produzida em todos os meios, com atividade bem mais expressiva que as celulases, indicando que este fungo apresenta um perfil mais xilanolítico que celulolítico, independente do tipo de substrato.

Figura 17. Produção de enzimas por *Thermoascus aurantiacus* em meio sólido de (□) palha de trigo; (◇) palha de cana-de-açúcar; (△) bagaço de cana-de-açúcar e (○) sabugo de milho. O eixo horizontal representa o tempo de cultivo, em dias.

A atividade de xilanase em palha de cana foi mais alta e teve o pico de produção com 9 dias de cultivo. Na palha de trigo e em sabugo de milho, a maior produção ocorreu em 37 dias. Em geral, a xilanase é expressa em vários substratos, mas o principal indutor desta enzima é a xilana (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999). Xilose e xilobiose também induzem a síntese de xilanase (BIELY, 1993) e, em alguns casos, celulose induz baixas atividades de xilanases, porém essa indução pode ocorrer pela contaminação da celulose comercial com xilana (ESTEBAN; VILLANUEVA; VILLA, 1982). Resíduos lignocelulósicos ricos em xilana, como serragem (YU et al., 1987), sabugo de milho (BENNETT et al., 1998), farelo de trigo (YOSHIOKA et al., 1981) e bagaço de cana-de-açúcar (PRABHU; MAHESHWARI, 1999) também podem induzir a produção de xilanase. Relatos mostram que papel de filtro, além de fonte de carbono, pode agir como um excelente indutor de xilanase em cultivos submersos com *T. aurantiacus* (KHANDKE; VITHAYATHIL; MURTHY, 1989b; MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000).

A produção de xilanase por *T. aurantiacus* foi avaliada em substratos heterogêneos e, neste caso, vários fatores se combinam e afetam o nível de expressão das xilanases (Figura 17). Entre tais fatores, pode-se citar a acessibilidade ao substrato, pois nestes a hemicelulose encontra-se ligada à lignina ou entre as microfibrilas de celulose, o que pode dificultar sua utilização pelo fungo. De fato, os resultados mostram que a produção de xilanase ocorreu em tempos maiores na palha de trigo e no sabugo, cujo teor de lignina foi superior ao encontrado nos outros substratos. Nestes substratos, mesmo que as xilanases tivessem sido produzidas em concentrações elevadas e em tempos menores, elas poderiam se ligar tão forte e improdutivamente à lignina presente no substrato, que uma parte dessa enzima pode ter sido perdida e/ou descartada com o resíduo insolúvel, reduzindo a sua atividade (RYU; KIM, 1998).

Outros fatores que também influenciam a produção de xilanase são a concentração e os tipos de produtos liberados, que podem atuar como fonte de carbono ou como inibidor da síntese de xilanase. Xilobiose é relatada como um indutor específico em *Trichoderma reesei* (HRMOVÁ et al., 1986) e *Aspergillus niger* (HRMOVÁ et al., 1991) e a xilose induz a síntese de xilanase em *T. aurantiacus* (KHANDKE; VITHAYATHIL; MURTHY, 1989b).

Em geral a maior produção de xilanases, nos diferentes meios, ocorreu em tempos longos de cultivo. Em bagaço e palha de cana, observa-se uma diminuição da atividade após o décimo dia de cultivo. Tal fato pode estar associado à presença de proteases, conforme relatado quando *T. aurantiacus* foi cultivado a base de farelo de trigo, acrescido de 2% de caseína (MERHEB et al., 2007).

Os resultados mostram que o perfil de produção de endoglucanase coincide com o das xilanases, indicando que a produção de celulase e xilanase estão intimamente ligadas, principalmente quando o fungo é cultivado em resíduos agroindustriais (ROYER; NAKAS, 1990). A produção de exoglucanase foi bem inferior à de endoglucanase em todos os substratos, porém em sabugo de milho obteve-se a maior atividade. A atividade de β -glicosidase foi mais alta no meio com palha de cana e de β -xilosidase foi baixa em todos os substratos, todavia houve uma maior produção em sabugo.

Os valores referentes aos picos de produção das enzimas em cada meio de cultivo, com o respectivo tempo, estão apresentados na tabela 9. A maior produção de xilanase e endoglucanase foi obtida em 9 dias de cultivo na palha e no bagaço de cana-de-açúcar; enquanto que no sabugo de milho e palha de trigo, a maior produção de xilanase ocorreu em 37 dias. No cultivo com sabugo de milho, detectaram-se as maiores atividades de exoglucanase e β -xilosidase, com 17 dias. Nas amostras analisadas não foi detectada atividade

de papel de filtro (FPA), uma vez que a quantidade de açúcar liberada no teste de DNS foi inferior a 2 mg/mL de glicose (GHOSE, 1987).

Tabela 9 – Melhores resultados da produção enzimática (UI/g) de *T. aurantiacus*.

Enzimas	Palha de trigo	Palha de cana	Bagaço de cana	Sabugo de milho
Xilanase	1315,85	1679,80	978,13	672,60
	(37 dias)	(9 dias)	(9 dias)	(37 dias)
Endoglucanase	45,35	91,80	108,88	36,95
	(8 dias)	(9 dias)	(9 dias)	(17 dias)
Exoglucanase	1,59	26,05	11,05	46,01
	(10 dias)	(8 dias)	(10 dias)	(17 dias)
β -glicosidase	1,73	29,86	7,19	2,57
	(37 dias)	(6 dias)	(9 dias)	(17 dias)
β -xilosidase	0,35	2,16	0,81	5,18
	(37 dias)	(5 dias)	(7 dias)	(17 dias)

As atividades reportadas na tabela 9 foram menores que as obtidas por Kalogeris et al. (1998; 2003), que mostraram uma superprodução de xilanase (2800 UI/g) e endoglucanase (1235 UI/g) por *T. aurantiacus* em palha de trigo, com tempo inferior ao deste trabalho (7 dias). Entre as diferenças pode-se destacar a forma do inóculo, pois Kalogeris et al. (1998; 2003) usaram fragmentos do micélio vegetativo em lugar dos esporos; outra diferença é que o pH inicial dos meios foi ajustado para 4,0 (KALOGERIS et al., 2003), enquanto que neste experimento o pH inicial dos meios variou entre 5 e 5,5 e foi mudando ao longo do cultivo (Figura 18). Resultados de outros trabalhos com *T. aurantiacus* reforçam que pequenas mudanças nas condições de cultivo podem alterar o nível de atividade produzida (KHANDKE; VITHAYATHIL; MURTHY, 1989a; MARTINS et al., 2002; DA SILVA et al., 2005; GOMES et al., 2007). Comparando-se os resultados de atividade (Tabela 9) com os dados da literatura deste fungo, verifica-se que elas podem variar muito com o tipo de substrato, pH e tempo de cultivo, como também com a diferença no tipo e carga inicial de inóculo.

Logo nos primeiros dias de cultivo já foi possível observar a presença do micélio do *T. aurantiacus* em todos os meios e, mesmo durante o longo período de incubação à temperatura de 45 °C, a umidade se manteve constante (aproximadamente 80%) até o final do cultivo. Houve pequenas variações no pH dos extratos durante o cultivo, mas a maior alteração foi observada na palha de trigo, que revelou um aumento de pH até valores próximos a 7,0 (Figura 18). O mesmo perfil de aumento do pH foi relatado por Machuca (1991) que mostrou uma relação direta entre o aumento do pH e a produção de fenoloxidasas. A autora verificou que a produção desta enzima oxidativa promove a liberação de compostos fenólicos que tendem a aumentar o pH do meio. Xilanases também podem indiretamente liberar para o meio alguns fragmentos de lignina, através de sua ação nas ligações entre a lignina e a hemicelulose, podendo também causar um aumento do pH do meio (TENKANEN; TAMMINEN; HORTLING, 1999).

Figura 18. pH do extrato enzimático durante o crescimento de *Thermoascus aurantiacus* em meio sólido de (□) palha de trigo; (◇) palha de cana-de-açúcar; (△) bagaço de cana-de-açúcar e (○) sabugo de milho.

Os resultados da produção de enzimas por *T. aurantiacus* foram obtidos empregando 10^4 ascósporos/g de substrato, em função de um estudo da produção de xilanases em bagaço de cana e farelo de trigo realizado por Souza (1998) que demonstrou que o nível de inóculo

não foi uma variável significativa. Ficou claro em seus experimentos, que o inóculo pode ser usado no nível mais baixo (10^4 ascósporos/g de substrato) representando, assim, uma redução no custo de produção das xilanases.

Da Silva et al. (2005) obtiveram uma produção alta de endoglucanase (600 UI/g) e xilanase (1070 UI/g) em apenas 4 dias de cultivo de *T. aurantiacus* em sabugo de milho quando o meio foi inoculado com uma suspensão muito maior de esporos (10^8 ascósporos/g de substrato). Baseado neste estudo decidiu-se verificar o efeito da carga de inóculo na produção de celulasas em bagaço de cana-de-açúcar.

Pode-se notar na figura 19, que o aumento da carga inicial de inóculo elevou a produção de exoglucanase em 10 vezes e a de β -xilosidase em 5 vezes, porém não houve alteração do tempo de produção, salvo para a produção de exoglucanase que diminuiu de 10 para 7 dias. A produção de xilanase e endoglucanase não foi alterada pela inoculação com uma alta concentração de esporos. O pH dos meios inoculados com 10^8 ascósporos/g de substrato foi semelhante ao obtido com 10^4 ascósporos/g de substrato (Figura 20), sugerindo que a alteração de pH está muito mais relacionada com o metabolismo do fungo em cada substrato do que com a carga de inóculo.

Figura 19. Produção de enzimas por *Thermoascus aurantiacus* em meio sólido de bagaço de cana-de-açúcar. (■, ◆, ▲, ●, ■) 10⁴ ascósporos/g seca de substrato; (□, ◇, △, ○, □) 10⁸ ascósporos/g seca de substrato. O eixo horizontal representa o tempo de cultivo, em dias.

Figura 20. pH do extrato enzimático durante o crescimento de *Thermoascus aurantiacus* em meio sólido de bagaço de cana-de-açúcar. (Δ) 10^4 ascósporos/g seca de substrato; (Δ) 10^8 ascósporos/g seca de substrato.

Foi feita uma comparação dos perfis eletroforéticos dos extratos extracelulares de *T. aurantiacus*, utilizando as amostras referentes aos picos de produção enzimática (Figura 21). Na revelação com azul de Coomassie (Figura 21-A), pôde-se notar a presença de duas bandas protéicas, em todos os substratos, com massas molares correspondentes a 54,7 kDa e 48,1 kDa (linha 1), 52,1 kDa e 44,9 kDa (linha 2), 52,2 kDa e 44,9 kDa (linha 3) e 51,5 kDa e 44,7 kDa (linha 4). Após revelação com nitrato de prata (Figura 21-B), outras bandas apareceram no gel com massas molares maiores que 66 kDa (linhas 6 e 8) (Figura 21-B).

Os perfis enzimáticos se assemelham muito, tanto no número de bandas como em suas massas molares, principalmente para os extratos obtidos em bagaço e em palha de cana-de-açúcar.

Figura 21. SDS-PAGE com gel de Bis/Acrilamida 10 % corado com azul de Coomassie (A) e corado com Nitrato de Prata (B). P – Padrões (Albumina bovina, Albumina de ovo e Anidrase Carbônica); 1 e 5 – Cultivo inicial em sabugo de milho com 17 dias; 2 e 6 – Cultivo inicial em palha de cana-de-açúcar com 9 dias; 3 e 7 – Cultivo inicial em palha de trigo com 37 dias; 4 e 8 – Cultivo inicial em bagaço de cana-de-açúcar com 9 dias.

Pela figura 22 é possível observar que os extratos enzimáticos obtidos dos cultivos de *T. aurantiacus* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar apresentaram uma coloração bem mais clara que o da palha de cana e de trigo. Assim, a utilização dos extratos mais claros pode simplificar posteriores etapas de purificação das enzimas.

Figura 22. Coloração dos extratos enzimáticos de *Thermoascus aurantiacus* com 37 dias em sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo e palha de cana de açúcar, respectivamente.

5.2. PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS

As xilanases e celulasas foram purificadas do extrato de *T. aurantiacus*, obtido do cultivo em 17 dias no sabugo de milho. Este extrato foi escolhido pela alta atividade de xilanase e de exoglucanase e também, por ser mais claro. Acredita-se que seja mais fácil purificar as enzimas de extratos mais claros, pois os pigmentos podem adsorver na estrutura protéica interferindo na detecção das enzimas e no rendimento da purificação, alterando a mobilidade das proteínas em colunas e nos géis de eletroforese (CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2008).

A figura 23 mostra o perfil de eluição do extrato enzimático (*T. aurantiacus* em sabugo de milho) em coluna de troca iônica submetida a gradiente de pH/sal com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 3,5) e NaCl 0,2 M. Foram identificadas três frações distintas com atividade de xilanase, β -glicosidade e endoglucanase, que foram agrupadas nos picos I, II e III, respectivamente.

A xilanase não ficou adsorvida na coluna, saindo quase que em sua totalidade nos primeiros 60 mL recolhidos. Após a lavagem da coluna com o tampão, a β -glicosidade foi eluída e somente após a passagem do sal, a endoglucanase foi detectada (Tabela 10). Os picos I, II e III apresentaram volumes de 40, 15 e 10 mL e pH 5,3; 3,6 e 4,6; respectivamente.

Observa-se que esta coluna além de separar as enzimas em três picos distintos, também foi capaz de concentrá-las. A concentração inicial de proteínas totais do meio foi de 1,67 mg/mL, ao passo que a soma das concentrações de proteína dos três picos aumentou para 2,99 mg/mL (Figura 24).

Figura 23. Eluição em coluna DEAE Sepharose CL6B, pH 3,5 do meio obtido do cultivo de *Thermoascus aurantiacus* em sabugo de milho por 17 dias. (◇) Absorbância 280 nm, (□) Xilanase, (△) β-glicosidase, (○) Endoglucanase.

Figura 24. Teor de proteína total do meio inicial e das frações obtidas na purificação parcial das enzimas produzidas por *T. aurantiacus* em meio de sabugo de milho, com 17 dias.

É possível observar na tabela 10 que o rendimento de endoglucanase e xilanase nesta etapa foi baixo, assim como o fator de enriquecimento. Tal resultado pode estar relacionado ao pH usado na purificação, que mesmo tendo sido utilizado previamente com bons resultados no trabalho de Khandke, Vithayathil e Murthy (1989b), é provável que o longo tempo de

exposição neste pH tenha causado modificações irreversíveis à enzima, desnaturando-a ou diminuindo sua capacidade catalítica. Brienzo e Milagres (2007) avaliaram o efeito do pH na atividade de xilanase produzida por esta mesma linhagem, observando uma diminuição de 80 % da atividade inicial, ao determinar a atividade enzimática em pH 3,5 por 5 min. Pelos resultados da tabela 10, pode-se dizer que a cromatografia de troca iônica foi mais importante para concentrar as enzimas do que para purificá-las.

Tabela 10 – Cálculo do rendimento e do fator de purificação de cada pico, em relação ao cultivo inicial, após a cromatografia em pH 3,5.

	At. Total(UI)	At. Específica (UI/mg)	Rendimento (%)	Fator de Enriquecimento
<i>Xilanase</i>				
Início	2053,0	24,53	-	-
Pico I	939,8	26,60	45,78	1,08
Pico II	2,25	0,76	0,11	0,03
Pico III	4,71	0,19	0,23	0,01
<i>Endoglucanase</i>				
Início	98,0	1,17	-	-
Pico I	3,81	0,11	3,89	0,09
Pico II	0,12	0,04	0,12	0,03
Pico III	27,56	1,13	28,11	0,97
<i>β-glicosidase</i>				
Início	12,83	0,15	-	-
Pico I	0,53	0,02	4,13	0,10
Pico II	4,05	1,37	31,59	8,90
Pico III	2,11	0,87	16,42	0,57

Fator de Enriquecimento = Atividade específica de cada pico/Atividade específica do início

Rendimento = Atividade total de cada pico/Atividade total do início.

A figura 25 mostra que o perfil de eluição do extrato enzimático de sabugo de milho em coluna de troca iônica, pH 6,0. Foram identificadas novamente três regiões distintas com valores próximos de absorbância, com atividade de xilanase, β-glicosidade e endoglucanase, nos picos IV, V e VI, respectivamente.

Semelhante à cromatografia anterior, a xilanase produzida pelo fungo não ficou adsorvida na coluna, podendo ser recolhida nos primeiros 50 mL. Após a lavagem da coluna com o tampão, a β -glicosidade foi detectada em um único tubo e somente após a passagem do sal, a endoglucanase pôde ser detectada. Os picos I, II e III apresentaram volumes de 40, 5 e 5 mL e pH 5,9; 6,4 e 6,5; respectivamente.

Figura 25.

Eluição em coluna DEAE Sepharose CL6B, pH 3,5 do meio obtido do cultivo de *Thermoascus aurantiacus* em sabugo de milho por 17 dias. (◇) Absorbância 280 nm, (□) Xilanase, (△) β -glicosidade, (○) Endoglucanase.

Comparando-se os resultados das duas cromatografias, pode-se dizer que o ponto isoelétrico (pI) da xilanase é maior que 6,0, uma vez que a mesma não fica adsorvida na resina quer em pH 3,5; quer em pH 6,0. Esse resultado está de acordo com a xilanase I reportada por Kalogeris et al. (1998), cujo pI foi determinado como 6,8. Pôde-se perceber ainda que a atividade de xilanase diminuiu cerca de 3 vezes com o aumento de pH do tampão de eluição.

O pI da endoglucanase mostra-se menor que 3,5; já que a enzima ficou adsorvida na coluna nos dois pH's testados, deixando a coluna somente após a aplicação do sal. A atividade de endoglucanase investigada nos picos das cromatografias quase não se altera. Em 2002, Parry et al. purificaram uma endoglucanase com pI 3,7 e estável em pH 2,8–6,8 a 50 °C.

Por ficar fracamente adsorvida na resina, o pI da β -glicosidade deve estar próximo de 3,5; porque esta enzima se desprende da coluna mediante a lavagem da mesma com tampão. Após a eluição nas colunas, a atividade de β -glicosidade é duas vezes maior em pH 6,0 que em pH 3,5.

Foram realizadas eletroforeses desnaturantes e nativas das amostras referentes aos picos obtidos nas cromatografias de troca iônica em pH 3,5 e 6,0. Foram identificadas uma xilanase (Figura 26-A); uma endoglucanase (Figura 27-A) e uma β -glicosidase (Figura 28-A), respectivamente. A presença dessas enzimas purificadas pôde ser confirmada nos géis nativos das figuras 26-B, 27-B e 28-B.

A análise das eletroforeses revela que as duas cromatografias foram capazes de separar a xilanase das demais enzimas investigadas. As xilanases purificadas de *T. aurantiacus* tanto em pH 3,5; quanto em pH 6,0 apresentaram massa molar de 31,5 kDa (linhas 1 e 2 da Figura 26) e correspondem à endo- β -1,4-xylanase I de 33 kDa e pI 6,8 purificada por Kalogeris et al. (1998, 2001). No gel nativo, puderam ser observadas duas bandas referentes à atividade de xilanase. Essas bandas estão bem no começo do gel, demonstrando que não houve migração da enzima. Na eletroforese desnaturante, o detergente aniônico (SDS) rompe a estrutura secundária da proteína e aplica-lhe uma carga negativa, proporcional à sua massa. Assim, como todas as proteínas estão com carga negativa, elas são separadas exclusivamente pelo tamanho (LAEMMLI, 1970). Porém na eletroforese em condições não-desnaturantes, a

proteína mantém sua carga efetiva, que pode influenciar na migração. Se a xilanase estiver carregada positivamente, pode permanecer no topo do gel.

Figura 26. Eletroforese desnaturante com gel de Bis/Acrilamida (SDS-PAGE) 12,5 %, corado com nitrato de prata (A) e Eletroforese nativa de xilanase com gel de Bis/Acrilamida 10 %, corado com vermelho congo (B). Amostras: P – Padrões kDa (Fosforilase b, Albumina, Ovoalbumina, Anidrase Carbônica, Inibidor de tripsina e α -lactoalbumina); 1 e 3 – Pico I da cromatografia em pH 3,5; 2 e 4 – Pico I da cromatografia em pH6,0.

A endoglucanase de *T. aurantiacus* purificada na coluna DEAE Sepharose CL6B em pH 6,0 e apresentou uma massa molar de 32,4 kDa (linha 2 da Figura 27-A). Resultados semelhantes foram reportados para este fungo, tanto em cultivo sólido em palha de trigo (MAMMA et al., 2009) quanto em cultivo submerso usando papel como substrato (TONG; COLE; SHEPHERD, 1980) ou sabugo de milho (PARRY et al., 2002). A presença das endoglucanases foi confirmada no gel nativo contendo CMC. As bandas aparecem como halos escuros, uma vez que a fotografia foi tirada sem iluminação de fundo.

Figura 27. Eletroforese desnaturante com gel de Bis/Acrilamida (SDS-PAGE) 12,5 % corado com Nitrato de Prata (A) e Eletroforese nativa de endoglucanase com gel de Bis/Acrilamida 12,5 %, corado com vermelho congo (B). Amostras: P – Padrões kDa (Fosforilase b, Albumina, Ovoalbumina, Anidrase Carbônica, Inibidor de tripsina e α -lactoalbumina); 1 e 3 – Pico III da cromatografia em pH 3,5; 2 e 4 – Pico III da cromatografia em pH6,0.

A figura 28 mostra a corrida eletroforética das frações com atividade de β -glicosidase, obtidas nas duas cromatografias. Nota-se a presença de uma banda de massa molar maior que 66 kDa nas três frações, que pode ser confirmada no gel nativo. A massa da β -glicosidase tem 76,6 kDa (linhas 1, 2 e 3 da Figura 28-A), porém a enzima não pôde ser totalmente purificada. No pico II da cromatografia em pH 3,5 foi detectada somente atividade de β -glicosidase, contudo a revelação com nitrato de prata mostra a presença de uma segunda banda protéica de massa molar 28 kDa. Outros trabalhos revelam que a β -glicosidase purificada de *T. aurantiacus* tem massa molar maior que 80 kDa (KHANDKE; VITHAYATHIL; MURTHY, 1989b; TONG; COLE; SHEPHERD, 1980).

Figura 28. Eletroforese desnaturante com gel de Bis/Acrilamida (SDS-PAGE) 12,5 % corado com Nitrato de Prata (A) e Eletroforese nativa de β -glicosidade com gel de Bis/Acrilamida 10 % (B). Amostras: P – Padrões kDa (Fosforilase b, Albumina, Ovoalbumina, Anidrase Carbônica, Inibidor de tripsina e α -lactoalbumina); 1 e 4 – Pico II da cromatografia em pH 3,5; 2 e 5 – Pico III da cromatografia em pH 3,5; 3 e 6 – Pico II da cromatografia em pH6,0.

5.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A polpa celulósica de bagaço de cana-de-açúcar obtida do tratamento com H_2O_2 e NaOH foi hidrolisada com as enzimas de *T. aurantiacus* e comparativamente com o complexo celulásico, Celluclast 1.5 L.

A figura 29 mostra o perfil protéico da enzima comercial Celluclast 1.5 L. É possível observar a presença de duas bandas mais fortes com massas molares 65,4 kDa e 57,1 kDa, que devem corresponder a uma endoglucanase e uma exoglucanase, enzimas majoritárias do complexo de *T. reesei*.

Figura 29. Eletroforese desnaturante com gel de Bis/Acrilamida (SDS-PAGE) 12,5 % corado com azul de Coomassie. Amostras: P – Padrões kDa (Fosforilase b, Albumina, Ovoalbumina, Anidrase Carbônica, Inibidor de tripsina e α -lactoalbumina); 1 - Celluclast 1.5 L.

A quantidade de enzima utilizada nos ensaios de hidrólise da polpa do bagaço foi determinada baseando-se na atividade de endoglucanase, uma vez que os extratos obtidos do cultivo de *T. aurantiacus* não apresentaram atividade em papel de filtro (FPA). Para ambos os extratos a atividade de endoglucanase foi fixada em 18,6 UI/g. A atividade das outras enzimas presentes nos extratos foi diferente, conforme demonstrado na tabela 11.

Tabela 11 – Atividade das enzimas utilizadas na hidrólise da polpa de bagaço de cana-de-açúcar.

Enzimas (UI/g)	<i>T. aurantiacus</i> *	Celluclast 1.5 L
Xilanase	285,3	20,6
Endoglucanase	18,6	18,6
Exoglucanase	13,4	4,8
β -glicosidase	1,8	0,5
β -xilosidase	1,1	0,6
Fpase	0,0	6,5

*Extrato de 17 dias de cultivo em sabugo de milho

A maioria dos trabalhos da literatura utiliza este complexo de enzimas, comercializado como Celluclast 1.5 L, para a hidrólise de celulose obtida de diferentes materiais, sendo muito eficiente na sacarificação de diversos substratos celulósicos (BERLIN et al., 2006; BOUSSAID; SADDLER, 1999; MOONEY et al., 1999; MUSSATTO et al., 2008; TU; CHANDRA; SADDLER, 2007). Porém é necessária a busca de novas preparações que tragam algum benefício extra à hidrólise, como o aumento da conversão e a diminuição da carga enzimática. Para tanto, além de outros microrganismos, a combinação de enzimas e proteínas também estão sendo testadas, desde a década de 80 (SUN; CHEN, 2002).

A figura 30 mostra como as atividades enzimáticas variaram durante a hidrólise da polpa do bagaço com as enzimas de *T. aurantiacus*. Na primeira hora, ocorre o aumento da atividade de xilanase, provavelmente pela ativação térmica das enzimas, já observada anteriormente por Brienzo e Milagres (2007). O efeito da temperatura na sacarificação de celulose foi reportado por Tabka et al. (2006), que mostra que a porcentagem de glicose liberada pôde ser aumentada de 37% para 51,4%, elevando a temperatura de hidrólise da celulose obtida da palha de trigo de 37 °C para 50 °C .

A partir de 3 h, a atividade de xilanase no sobrenadante diminui e após 6 h, determinou-se apenas 81 % do valor da atividade inicial. Essa redução de atividade é, provavelmente, uma consequência da adsorção da enzima ao substrato.

Figura 30. Atividade enzimática e concentração de proteína residual detectada durante a hidrólise enzimática da polpa celulósica com enzimas de *T. aurantiacus*. (◇) Xilanase; (○) Endoglucanase; (Δ) proteínas.

Pode-se notar que essa adsorção foi reversível (Figura 30), já que a concentração de proteína e as atividades de xilanase e endoglucanase aumentaram após 24 h. A atividade de xilanase determinada em 72 h (20,08 UI/mL) é praticamente a mesma determinada após a primeira hora (17,58 UI/mL). Essa estabilidade deve-se à natureza termoestável da enzima e, além disso, pode estar associada à presença de xilana ou algum xilooligossacarídeo gerado durante a hidrólise, que podem exercer um efeito protetor à enzima (DAMASO; ANDRADE; PEREIRA JR, 2002).

A concentração das proteínas varia durante o processo indicando uma fase de adsorção e outra de dessorção. O perfil de concentração de proteínas durante a hidrólise revela a máxima adsorção em 3 h, a qual coincide com o início da diminuição da atividade enzimática no sobrenadante. Nota-se que, após 72 h de hidrólise a concentração de proteína é a mesma do início, mostrando que as proteínas foram totalmente dessorvidas do material. Sendo assim, poder-se-ia reutilizar essas enzimas, que se encontram livres na fase líquida em uma nova hidrólise (TU; CHANDRA; SADDLER, 2007).

A sacarificação da polpa do bagaço de cana-de-açúcar foi monitorada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a concentração de açúcares redutores totais pelo método de DNS. Pode-se observar que ao final de 72h (Figura 31), a concentração de açúcares determinada pelo método de DNS é duas vezes maior que a determinada pelo CLAE, isso porque além de glicose, xilose e celobiose há a liberação de monossacarídeos provenientes da hidrólise da hemicelulose e oligossacarídeos que também reagem com o DNS.

Figura 31. Açúcares liberados durante a hidrólise enzimática da polpa celulósica com enzimas de *T. aurantiacus*. (■) açúcares totais; (■) glicose; (■) xilose; (■) celobiose.

Figura 32. Conversão enzimática da polpa celulósica obtida do bagaço de cana-de-açúcar submetido à hidrólise com o extrato de *T. aurantiacus* em sabugo de milho, com 17 dias. (Δ) CEH; (●) CEC.

Cerca de 20% da hemicelulose (CEH) e 8% da celulose (CEC) presentes na polpa foram hidrolisadas com as enzimas de *T. aurantiacus* (Figura 32), indicando que o complexo enzimático do *T. aurantiacus* não foi capaz de atacar com eficiência os polissacarídeos presentes na polpa do bagaço. Independente do método usado para o acompanhamento da hidrólise da polpa do bagaço (DNS ou CLAE), o que se observa é uma baixa liberação de açúcares redutores. Vários são os fatores, relacionados às enzimas e ao substrato, que levam a uma baixa eficiência de sacarificação. A cristalinidade, a área superficial, o teor de lignina e hemicelulose são alguns dos fatores relacionados ao substrato (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). Em relação às enzimas, a concentração e a composição dos extratos enzimáticos também afetam a eficiência de conversão dos polissacarídeos (BERLIN et al., 2006).

Os dados indicam que mesmo após o pré-tratamento do bagaço com peróxido de hidrogênio, no qual grande parte da lignina e da hemicelulose foi removida, a acessibilidade à celulose foi dificultada, sugerindo a necessidade de uma quantidade maior de exoglucanase ou, até mesmo, outras proteínas. Tal fato foi relatado por Al-Zhuair (2008) ao comparar a hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) e lâminas ultrafinas de madeira utilizando 15 FPU/g de celulase de *Aspergillus niger* e demonstrar que a hidrólise da celulose amorfa é muito maior que a da celulose cristalina da madeira, visto que a produção de glicose atingiu 700 g/m³ e 1,2 g/m³, respectivamente.

Berlin et al. (2005) testaram o efeito da adição de β -glicosidase e enzimas xilanolíticas no complexo celulásico de *Trichoderma reesei* ou *Penicillium* spp. e relataram que a suplementação com β -glicosidase aumenta a sacarificação da celulose, pois esta é capaz de clivar a celobiose gerada, ao passo que a ação da xilanase melhora a acessibilidade das celulasas à celulose.

Tabka et al. (2006) avaliaram a proporção ideal na mistura de celulases, xilanases e feruloil esterase (FAE) para aumentar o rendimento da hidrólise da palha de cana explodida e verificaram que a mistura de 10 UI/g de celulases, 3 UI/g de xilanase e 10 UI/g de FAE é capaz de aumentar o rendimento da liberação de glicose de 30 para 60 %, em 50 °C.

Em comparação, a hidrólise da polpa do bagaço de cana-de-açúcar com a Celluclast 1.5 L produziu mais açúcares redutores em 24 h (10,7 g/L) que as enzimas de *T. aurantiacus* em 72 h (8,8 g/L), aplicando a mesma atividade de endoglucanase (18,6 UI/g) e menores atividades de xilanase, β -glicosidase e exoglucanase (Tabela 12). De fato, a presença de uma atividade relativa à hidrólise do papel de filtro (FPase), que é a medida da ação conjunta das três enzimas do complexo celulolítico, mostra-se necessária e muito importante para a hidrólise da celulose.

Figura 33. Conversão enzimática da polpa celulósica de bagaço de cana-de-açúcar com a celulase comercial, Celluclast 1.5 L, por 24 h. (■) CEH; (●) CEC.

A conversão enzimática da celulose com a Celluclast 1.5 L foi de 27 % em 24 h (Figura 33). Essa alta conversão está associada à grande quantidade de celobiose liberada (47 % do total dos açúcares) e, neste caso, a adição de β -glicosidase é imprescindível para a conversão completa da celulose à glicose, para a produção de etanol, por exemplo.

Na tentativa de aumentar a eficiência de hidrólise da polpa do bagaço de cana-de-açúcar suplementou-se o extrato de *T. aurantiacus* com 26 UI/g de β -glicosidase comercial, Novozym 188. Os resultados da figura 34 evidenciam um pequeno aumento na conversão enzimática da celulose durante as 72 h, mas de fato a adição da β -glicosidase não incrementou significativamente a hidrólise da polpa.

Figura 34. Conversão enzimática da polpa celulósica obtida do bagaço de cana-de-açúcar submetido à hidrólise com o extrato de *T. aurantiacus* em sabugo de milho, com 17 dias, suplementado ou não com a β -glicosidase comercial, Novozym 188. (Δ) CEH com Novozym 188; (▲) CEH sem Novozym 188; (○) CEC com Novozym 188; (●) CEC sem Novozym 188.

Por outro lado, o extrato de *T. aurantiacus* suplementado com a β -glicosidase comercial foi mais eficiente na hidrólise da hemicelulose (30%) que o não suplementado (20 %). A adição da β -glicosidase comercial favoreceu a hidrólise da hemicelulose porque a Novozym 188 não é pura e contém outras enzimas que atuam na hemicelulose. Segundo Berlin et al. (2006) além da β -glicosidase, este extrato contém 0,4 UI de xilanase/mg de proteína e 0,1 FPU/mg de proteína.

Margeot et al. (2009) mostraram que duas celobioidrolases (CBH I e CBH II) e duas endoglucanases (EG1 e EG2), em 60:20:10:10, podem compor 90% do coquetel enzimático secretado por *T. reesei*, enquanto a β -glicosidase compõe menos de 1%. Porém essa proporção não é ideal, uma vez que as condições de hidrólise dos resíduos lignocelulósicos estão longe das condições naturais favoráveis para a ação do complexo celulásico deste fungo. Assim, um modo de favorecer a hidrólise desses resíduos é melhorar as enzimas através da engenharia genética ou combinar enzimas de fungos mesófilos e termófilos.

Rosgaard et al. (2006) avaliaram o efeito da combinação de celulasas comerciais com os extratos enzimáticos produzidos por fungos termófilos na hidrólise da palha de cevada pré-tratada com vapor. Os resultados mostraram que, quando se adiciona os extratos enzimáticos, correspondendo 10 % em massa da carga de proteína total, à mistura de Celluclast e β -glicosidase (Novozym 188) é possível duplicar liberação de glicose, quando comparado com a hidrólise utilizando somente a mistura de celulasas comerciais.

Zhang et al. (2009) investigaram a adição de xilanase e pectinase à celulase comercial Spezyme CP para aumentar a conversão da celulose e hemicelulose do sabugo de milho pré-tratado com amônia. A suplementação com xilanase ou pectinase aumentou a conversão de celulose e hemicelulose, porém a adição da pectinase torna essa conversão mais efetiva. A suplementação com 0,12 mg de pectinase/g de glucana aumentou o rendimento de glicose em 7,5 % e de xilose em 29,3 %.

5.3.1. Hidrólise da polpa com enzimas produzidas em diferentes substratos

A polpa celulósica do bagaço foi tratada com enzimas de *T. aurantiacus* produzidas em bagaço e palha de cana-de-açúcar, palha de trigo e sabugo de milho com 9, 9, 8 e 17 dias, respectivamente. Como controle, a polpa também foi hidrolisada com a celulase comercial, Celluclast 1.5 L. A carga enzimática aplicada está descrita na tabela 12.

Tabela 12 – Atividade das enzimas utilizadas nas hidrólises.

Carga enzimática (UI/g)	PT ^a	PC ^b	BC ^c	SM ^d	Celluclast 1.5L
Xilanase	123,34	340,50	167,16	285,32	20,61
Endoglucanase	18,61	18,62	18,61	18,62	18,59
Exoglucanase	0,26	0,09	1,86	13,36	4,79
β -glicosidase	0,39	2,13	1,23	1,81	0,53
β -xilosidase	0,08	0,25	0,10	1,12	0,58
α -L-arabinofuranosidase	0,02	0,02	0,07	0,01	nd
Celulases Totais	0	0	0	0	6,51

^a: Palha de trigo – 8 dias; ^b: Palha de cana-de-açúcar – 9 dias; ^c: Bagaço de cana-de-açúcar – 9 dias;

^d: Sabugo de milho – 17 dias; nd: não detectado.

A conversão enzimática da celulose não passou de 15 % com qualquer extrato de *T. aurantiacus* testado. Os melhores rendimentos foram 15,0 % com a palha de cana de açúcar, em 72 h, e 14,0 % com o sabugo de milho, em 48 h (Figura 35). Isso se deve ao fato de que o sabugo de milho é o extrato que apresenta a maior proporção de atividade de exoglucanase (13,4 UI/g), endoglucanase (18,6 UI/g) e β -glicosidase (1,8 UI/g), enzimas que, em conjunto, podem agir em sinergismo (PITARELO, 2007), contribuindo com o aumento do rendimento da conversão enzimática da celulose, diminuindo o tempo de hidrólise.

O extrato da palha de cana-de-açúcar é o mais concentrado em relação à β -glicosidase (2,13 UI/g), porém apresenta a menor quantidade de exoglucanase (0,09 UI/g) entre todos os extratos testados. Esse extrato também contém a maior quantidade de xilanase (340, 5 UI/g), assim sendo, essa hemicelulase é capaz de remover uma parte da hemicelulose

presente na polpa, expondo a celulose, deixando-a mais susceptível ao ataque das celulases (ZHU et al., 2008).

Figura 35. Conversão enzimática da polpa obtida do bagaço de cana-de-açúcar com as enzimas de *T. aurantiacus* produzidas em: (□) palha de trigo, com 8 dias; (◇) palha de cana-de-açúcar, com 9 dias; (△) bagaço de cana-de-açúcar, com 9 dias; (○) sabugo de milho, com 17 dias; e (●) Celluclast 1.5 L.

Entre os extratos utilizados para a hidrólise da polpa, a Celluclast 1.5 L é o que apresenta menos xilanase (20,6 UI/g), mas ainda assim foi com ele que se obteve a maior remoção da hemicelulose da polpa (60,0 %). Com atividades de xilanase de *T. aurantiacus* até 10 vezes maiores (Tabela 12) obteve-se cerca de 20% de remoção de hemicelulose (Figura 36). A retirada de grande parte da hemicelulose contribuiu para um aumento na conversão da celulose (39,72 %), porém este efeito não pode ser considerado o único responsável por esta alta eficiência de hidrólise. Apesar da alta atividade de xilanase presente nos extratos de *T. aurantiacus*, a conversão da hemicelulose quando se utiliza esses extratos é apenas igual à metade, ou menos (Figura 36), da conversão quando se utiliza a celulase comercial, demonstrando que as enzimas do *T. reesei* são mais ativas na polpa celulósica que as enzimas do *T. aurantiacus*.

Figura 36. Conversão enzimática da hemicelulose da polpa obtida do bagaço de cana-de-açúcar com enzimas de *T. aurantiacus* produzidas em: (□) palha de trigo, com 8 dias; (◇) palha de cana-de-açúcar, com 9 dias; (△) bagaço de cana-de-açúcar, com 9 dias; (○) sabugo de milho, com 17 dias; e (●) Celluclast 1.5 L.

5.3.2. Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar

As enzimas de *T. aurantiacus* foram aplicadas no bagaço *in natura*, a fim de se observar o desempenho das xilanases na remoção da hemicelulose, considerando que ela está em maior concentração no bagaço que na polpa (Tabela 8). Foram utilizados os extratos obtidos do cultivo de *T. aurantiacus* em bagaço e palha de cana-de-açúcar, palha de trigo e sabugo de milho com 9, 9, 8 e 17 dias, respectivamente (Tabela 12).

É possível observar na figura 37, que a máxima conversão do bagaço de cana-de-açúcar com as enzimas de *T. aurantiacus* foi de 15%, praticamente a mesma obtida com a polpa do bagaço (Figura 35). Este resultado mostra que o pré-tratamento do bagaço com peróxido em meio alcalino não favoreceu a ação das enzimas de *T. aurantiacus*. A polpa contém menos lignina e hemicelulose que o bagaço, entretanto, não houve diferença na conversão enzimática. Tal resultado indica que o conhecimento da interação enzima-substrato parece ser de suma importância para a eficiência da catálise. Estes dois substratos, apesar de

diferentes na composição e estrutura não favoreceram a catálise pelas enzimas de *T. aurantiacus*.

Figura 37. Conversão enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com enzimas de *T. aurantiacus* produzidas em: (□) palha de trigo, com 8 dias; (◇) palha de cana-de-açúcar, com 9 dias; (△) bagaço de cana-de-açúcar, com 9 dias; (○) sabugo de milho, com 17 dias; e (●) Celluclast 1.5 L.

Pré-tratamentos muito severos podem degradar os polissacarídeos e formar produtos capazes de inibir a ação das celulasas, bem como uma posterior fermentação por leveduras para a produção de etanol. Porém, tratamentos muito brandos podem não remover a lignina e a hemicelulose, diminuindo a acessibilidade da celulose às celulasas e, conseqüentemente, reduzindo a quantidade de glicose liberada na hidrólise (ÖHGREN et al., 2007; SENDELIUS, 2005). Por exemplo, o pré-tratamento alcalino pode causar a solubilização, redistribuição e/ou condensação da lignina e ainda modificações na estrutura cristalina da celulose. Esses efeitos podem diminuir ou contrariar os efeitos positivos da remoção de lignina e inchamento da celulose (GREGG; SADDLER, 1996). Outro aspecto importante de pré-tratamento alcalino é a mudança da estrutura da celulose para uma forma mais densa e termodinamicamente mais estável que a celulose nativa (HENDRIKS, 2009).

A eficiência de conversão com a Celluclast 1.5 L em bagaço foi semelhante a obtida com as enzimas de *T. aurantiacus*. A maior conversão foi obtida em 24 h (16,86 %) (Figura 37) e foi 2,5 vezes menor que a conversão da polpa do bagaço (Figura 35).

A conversão da hemicelulose do bagaço *in natura* com as enzimas de *T. aurantiacus* e com a Celluclast 1.5 ficou abaixo de 20 % (Figura 38) e inferior à obtida com a polpa. Este resultado foi muito mais expressivo com a Celluclast 1.5 L, pois a conversão da hemicelulose foi reduzida de 60,0 para 17,24 %. Esses fatos sugerem que o alto teor de lignina e a forte interação química dos polissacarídeos do bagaço atrapalham a ação hidrolítica da Celluclast (MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2007; MUSSATO et al., 2008; ÖHGREN et al., 2007; YÁÑES; ALONSO; PARAJO, 2006)

Figura 38. Conversão enzimática da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar com enzimas de *T. aurantiacus* produzidas em: (□) palha de trigo, com 8 dias; (◇) palha de cana-de-açúcar, com 9 dias; (△) bagaço de cana-de-açúcar, com 9 dias; (○) sabugo de milho, com 17 dias; e (●) Celluclast 1.5 L.

5.3.3. Hidrólise da polpa celulósica tratada com protease

As proteases para o tratamento da polpa de bagaço foram obtidas do abacaxi. A bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi é o mais conhecido. Essas enzimas proteolíticas, encontradas no talo (E.C. 3.4.22.32), são glicoproteínas e enzimas sulfidrílicas, sendo as pontes de dissulfeto essenciais para a sua atividade proteolítica (MURACHI, 1976). A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica, como nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. É ainda empregada no tratamento de couros, nas indústrias têxteis para amaciamento de fibras e também na produção de detergentes (BORRACINI, 2006). No bagaço seu uso ainda não foi reportado, principalmente porque este substrato é pobre em proteínas (PIRES et al., 2006). A polpa de bagaço contém menos proteína que o bagaço *in natura* em função do tratamento com o peróxido de hidrogênio (AMJED et al., 1992), porém mesmo em baixa concentração as proteínas não são solúveis e podem promover ligações de hidrogênio entre as fibras (KELLER, 1993). Proteínas estruturais são encontradas em todas as camadas da parede celular, mas são mais abundantes na parede primária. Deste modo, pensou-se em usar proteases na polpa de bagaço no intuito de afrouxar a estrutura da parede e facilitar o acesso das celulasas.

O concentrado de proteínas do abacaxi apresenta um perfil de bandas com massas molares inferiores a 30 kDa (Figura 39). Este concentrado foi utilizado para tratar a polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar, por 24h a 45 °C, sob agitação de 120 rpm. Após este período, a reação foi termicamente tratada visando a inativação das proteases (ISHIHARA et al., 1997). O sobrenadante foi analisado e não foram detectados açúcares redutores. À polpa pré-tratada com protease foram adicionadas separadamente: as enzimas de *T. aurantiacus*

obtidas do cultivo em palha de cana-de-açúcar, uma endoglucanase, uma β -glicosidase e a Celluclast 1.5 L (Tabela 13).

Tabela 13 – Atividade das enzimas utilizadas na hidrólise da polpa de bagaço pré-tratada com proteases.

Carga enzimática (UI/g)	PC ^a	Celluclast 1.5L	EG	EG + β -G
Xilanase	123,34	20,61	nd	nd
Endoglucanase	18,61	18,59	10	10
Exoglucanase	0,26	4,79	nd	nd
β -glicosidase	0,39	0,54	nd	5
β -xilosidase	0,08	0,59	nd	nd
Celulases Totais	0	6,51	nd	nd

^a: Extrato de palha de cana-de-açúcar com 9 dias de cultivo; EG: endoglucanase purificada do extrato enzimático de *T. aurantiacus*; β -G: β -glicosidase purificada do extrato enzimático de *T. aurantiacus*; nd: não detectado.

Figura 39. Eletroforese desnaturante com gel de Bis/Acrilamida (SDS-PAGE) 12,5 % corado com nitrato de prata. Amostras: P – Padrões kDa (Fosforilase b, Albumina, Ovoalbumina, Anidrase Carbônica, Inibidor de tripsina e α -lactoalbumina); 1 – Proteínas do abacaxi.

A comparação da conversão enzimática da celulose da polpa pré-tratada, ou não, com proteases pode ser vista na figura 40. Fica claro que o pré-tratamento com a protease é capaz de aumentar o rendimento da hidrólise. Esse aumento é de 1,3 vezes com a celulase comercial; 2,2 vezes com o extrato enzimático de *T. aurantiacus*; 19,4 vezes com a endoglucanase e 5,0 vezes com a mistura de endoglucanase e β -glicosidase. Isto sugere que a protease age nas proteínas estruturais do bagaço, e provavelmente afrouxa as ligações intra e

intermoleculares existentes entre os polissacarídeos (SALOHEIMO et al., 2002) expondo as cadeias de celulose mais internas. Tal fato pode ocasionar um maior rendimento de hidrólise pela clivagem de regiões de celulose mais difíceis de serem clivadas pelas celulasas (COSGROVE, 2000).

Figura 40. Conversão enzimática da celulose da polpa do bagaço de cana-de-açúcar: (1) Celluclast 1.5 L; (2) Celluclast 1.5 L + Bromelina; (3) enzimas de *T. aurantiacus*; (4) enzimas de *T. aurantiacus* + Bromelina; (5) Endoglucanase; (6) Endoglucanase + Bromelina; (7) Endoglucanase + β -glicosidase; (8) Endoglucanase + β -glicosidase + Bromelina.

A conversão enzimática da hemicelulose também aumenta quando a polpa do bagaço é tratada com a protease. O rendimento pode chegar a 91,6 %, quando tratada com a celulase comercial, e 36,5 %, quando tratada com o extrato enzimático de *T. aurantiacus*. Isto indica que o afrouxamento causado pela protease também ocasiona uma maior acessibilidade à hemicelulose presente na polpa do bagaço.

5.3.4. Hidrólise da polpa do bagaço tratada com H₂SO₄ e xilanase

Os resultados mostrados anteriormente remetem ao fato de que a remoção da hemicelulose pode acarretar em um aumento no rendimento da conversão enzimática da celulose da polpa do bagaço. Sendo assim, foi proposto um tratamento da polpa com H₂SO₄ diluído e outro com a xilanase purificada com *T. aurantiacus*.

O pré-tratamento da polpa com o ácido diluído tem o intuito de remover a hemicelulose (MUSSATTO; ROBERTO, 2005), sem acarretar a perda extensiva de celulose. Esse tratamento foi capaz de remover 46,6 e 59,7 % da hemicelulose, quando foram aplicados 125 e 250 µL de ácido sulfúrico, respectivamente. O teor de celulose da polpa foi mantido constante, para ambos, uma vez que a concentração de glicose no hidrolisado foi baixa (0,091 e 0,229 g/L, respectivamente).

Quando o extrato bruto foi aplicado na polpa, as xilanases e outras enzimas acessórias, como arabinofuranosidase, glucuronidasas e esterases (MAGALHÃES; MILAGRES, 2009), agiram em sinergismo removendo 20 % da hemicelulose (Figura 35). No entanto, o pré-tratamento da polpa com a xilanase purificada de *T. aurantiacus* praticamente não alterou a composição de polissacarídeos da polpa do bagaço. A porcentagem de retirada da hemicelulose foi de 0,54 %, para o tratamento com 10 UI/g e de 0,69 %, para o tratamento com 20 UI/g .

A figura 41 mostra a conversão da celulose da polpa do bagaço tratada com H₂SO₄ diluído ou com a xilanase purificada com *T. aurantiacus*. É possível observar que apesar do tratamento com o ácido ser mais eficiente na remoção da hemicelulose, é o tratamento com xilanase que mostra a melhor conversão da celulose. Parece que a enzima causa mudanças na estrutura da polpa, como a abertura de poros por clivar ligações intra-moleculares, que permitem e/ou facilitam o ataque de enzimas ou agentes químicos (BEG et al., 2001; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; POLIZELI et al., 2005). Sabe-se que as pontes

diferúlicas presentes na hemicelulose podem inibir a hidrólise enzimática, porém esse efeito pode ser reduzido quando se adiciona um coquetel contendo altas concentrações de xilanase, que romperiam essas pontes com mais eficiência que as feruloil esterases (FAULDS et al., 2006).

Figura 41. Conversão da polpa de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada com H_2SO_4 ou com xilanase purificada de *T. aurantiacus* seguida da hidrólise enzimática por 72 h a 50 °C: A - (1) Celluclast 1.5L; (2) enzimas de *T. aurantiacus*; (3) 125 μ L de H_2SO_4 + Celluclast 1.5 L; (4) 125 μ L de H_2SO_4 + enzimas de *T. aurantiacus*; (5) 250 μ L de H_2SO_4 + Celluclast 1.5 L; (6) 250 μ L de H_2SO_4 + enzimas de *T. aurantiacus*. B - (1) Celluclast 1.5L; (2) enzimas de *T. aurantiacus*; (3) 125 μ L de H_2SO_4 + Celluclast 1.5 L; (4) 250 μ L de H_2SO_4 + Celluclast 1.5 L; (5) 125 μ L de H_2SO_4 + enzimas de *T. aurantiacus*; (6) 250 μ L de H_2SO_4 + enzimas de *T. aurantiacus*; (7) 10 UI de xilanase + Celluclast 1.5 L; (8) 20 UI de xilanase + Celluclast 1.5 L; (9) 10 UI de xilanase + enzimas de *T. aurantiacus*; (10) 20 UI de xilanase + enzimas de *T. aurantiacus*.

6. CONCLUSÕES

O tipo de substrato empregado para a produção de enzimas mostrou pouco efeito em diferenciar o perfil enzimático e protéico de *T. aurantiacus*;

T. aurantiacus mostrou-se mais xilanolítico que celulolítico, independente do substrato utilizado;

O aumento de 10^4 vezes na carga inicial de inóculo não alterou os níveis das enzimas produzidas pelo *T. aurantiacus*, exceto para exoglucanase, que teve sua atividade aumentada em 10 vezes, aproximadamente;

Tanto a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, quanto a hidrólise da polpa celulósica do bagaço com as enzimas do *T. aurantiacus* obtiveram 15 % de CEC, mostrando que a de diferenças na composição e estrutura não favoreceram a catálise das enzimas;

O pré-tratamento com proteases do abacaxi não teve efeito hidrolítico na polpa de bagaço, porém aumentou a CEC da hidrólise com as enzimas de *T. aurantiacus* de 9,4 % para 20,7 %, sugerindo um afrouxamento na estrutura da polpa;

O pré-tratamento com a xilanase purificada de *T. aurantiacus* também não demonstrou efeito hidrolítico na polpa, contudo foi capaz de aumentar o rendimento da hidrólise enzimática da polpa de bagaço para 30,0 %, sugerindo um rompimento de ligações internas e um afrouxamento na estrutura da polpa;

O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído foi capaz de remover até 50 % da hemicelulose presente na polpa do bagaço, porém não resultou em um aumento na CEC, sugerindo que além da remoção de hemicelulose, outras diferenças na estrutura da polpa também influenciam a conversão.

TRABALHOS FUTUROS

Tendo em vista a termoestabilidade do extrato de *T. aurantiacus*, sugere-se avaliar a conversão enzimática da celulose em temperaturas mais altas (70 °C) que as normalmente usadas com a celulase comercial (50 °C);

Reutilizar as enzimas livres no sobrenadante após 72 h de hidrólise, em celulose pura ou na polpa do bagaço;

Determinar a eficiência de conversão das celulases de *T. aurantiacus* em carboximetilcelulose e Avicel e comparar com a polpa do bagaço;

Verificar a influência das concentrações de celobiose e glicose na ativação e/ou inibição das celulases de *T. aurantiacus*;

Testar a ação de proteases em outros substratos com maiores teores de proteína.

Suplementar o extrato de *T. aurantiacus* com exoglucanase de outras fontes, a fim de se obter uma atividade em papel de filtro (FPA) e avaliar se a suplementação aumentaria a eficiência de conversão da polpa de bagaço em glicose.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. R. Growth and amylase production of *Thermoascus aurantiacus* Miede. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 15, p. 311–313, 1992.
- ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SHAIKH, H.; SINGH, R.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE; VARMA, A. J. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 6–10, 2005.
- ALFENAS, A. C.; PETUS, I.; BRUNE, W.; PASSADOS, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991, 242p.
- AL-ZUHAIR, S. The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4078–4085, 2008.
- AMJED, M.; JUNG, H. G.; DONKER, J. D. Effect of alkaline hydrogen peroxide treatment on cell wall composition and digestion kinetics of sugarcane residues and wheat straw. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 2877–2884, 1992.
- ANDREAUS, J.; RAMOS, L. P.; CAVACO-PAULO, A. Dry action of *Trichoderma reesei* cellulases on cotton fabrics. **Journal of Society of Dyers and Colourists**, v. 116, p. 121–125, 2000.
- AUER, C. G.; KRUGNER, T. L.; BARRICHELO, L. E. G. Fungos termófilos em pilhas de cavacos de *Eucalyptus* spp. com auto-aquecimento. **IPEF**, Piracicaba, n. 38, p. 28–32, 1988.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257–270, 1992.
- BAJPAI, P. Application of enzymes in the pulp and paper industry. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 147–157, 1999.
- BAUCHER, M.; HALPIN, C.; PETIT-CONIL, M.; BOERJAN, W. Lignin: Genetic engineering and impact on pulping. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 305–350, 2003.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326–338, 2001.

BENNETT, N. A.; RYAN, J.; BIELY, P.; VRŠANSKÁ, M.; KREMnický, L.; MACRIS, B. J.; KEKOS, D.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; CLAEYSSSENS, M.; NERINCKX, W.; NTAUMA, P.; BHAT, M. K. Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Thermomyces lanuginosus* ATCC 46882. **Carbohydrate Research**, v. 306, p. 445–455, 1998.

BERLIN, A.; BALAKSHIN, M.; GILKES, N.; KADLA, J.; MAXIMENKO, V.; KUBO, S.; SADDLER, J. Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 198–209, 2006.

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.

BEUKES, N.; CHAN, H.; DOI, R. H.; PLETSCHKE, B. I. Synergistic associations between *Clostridium cellulovorans* enzymes XynA, ManA and EngE against sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 492–498, 2008.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Celullose degrading enzymes and their potential industrial application. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583–620, 1997.

BIELY, P.; VRŠANSKÁ, M.; TENKANEN, M.; KLUEPFEL, D. Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic proprieties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, p. 151–166, 1997.

BIELY, P. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: COUGHLAN MP (Ed). 1993. **Hemicellulose and Hemicellulases**. London: Hazlewood GP, p. 29–51.

BIELY, P. Microbial xylanolytic enzymes. **Trends in Biotechnology**, v.3, p. 286–290, 1985.

BORRACINI, H. M. P. **Estudo do processo de extração da bromelina por micelas reversas em sistema descontínuo**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Engenharia Química, Campinas – SP, 2006.

BOUSSAID, A.; SADDLER, J. N. Adsorption and activity profiles of cellulases during the hydrolysis of two Douglas fir pulps. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 138–143, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRIENZO, M.; MILAGRES, A. M. F. Estabilidade cinética da xilanase de *Thermoascus aurantiacus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 14. 2007, Curitiba – PR, Brasil, p. 1.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction, **Biochemical Engineering Journal**, 2008. doi:10.1016/j.bej.2009.05.012.

BUCHERT, J.; TENKANEN, M.; KANTELINEN, A.; VIIKARI, L. Application of xylanases in the pulp and paper industry. **Bioresource Technology**, v. 50, p. 65–72, 1994.

BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 237–259, 2008.

BUTT, M. S.; TAHIR-NADEEM, M.; AHMAD, Z.; SULTAN, M. T. Xylanases and their applications in baking industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, p. 22–31, 2008.

CANILHA, L. **Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo**. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de Lorena – USP, Departamento de Biotecnologia, Lorena – SP, 2006.

CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Clean-up and concentration of manganese peroxidases recovered during the biodegradation of *Eucalyptus grandis* by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 193–198, 2008.

CESAR, A. C.; SILVA, R.; LUCARINI, A. C. Recuperação das enzimas proteolíticas presentes na casca e talo do abacaxi. **Revista de Iniciação Científica**, São Carlos, v. 1, p. 47–53, 1999.

CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; KALOGERIS, E.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; STAMATIS, H.; SKALTSA, H. Antimicrobial activity of acidic xylooligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxylanases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 171–175, 2003.

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

CONTE, A. J.; TEIXEIRA, A. S.; FIALHO, E. T.; SCHOULTEN, N. A.; BERTECHINI, A. G. Efeito da fitase e xilanase sobre o desempenho e as características ósseas de frangos de corte alimentados com dietas contendo farelo de arroz. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1147–1156, 2003.

COONEY, D. G.; EMERSON, R. Thermophilic fungi. An account of their biology, activities and classification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 220–229, 1964.

COSGROVE, D. J. Loosening of plant cell walls by expansions. **Nature**, v. 407, p. 321–326, 2000.

DA SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and cmcase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Mische. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 235–241, 2005.

DAMASO, M. C. T.; ANDRADE, C. M. M. C.; PEREIRA JR., N. Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces Lanuginosus* IOC-4145. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 333–338, 2002.

DENCE, C. W. The determination of lignin. In: LIN, Y.L.; DENCE, C.W. **Methods in Lignin Chemistry**. Berlin. Ed. Springer, 1992. p. 33–62.

DEMIRBAS, A. Effects of temperature and particle size on bio-char yield from pyrolysis of agricultural residues. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 72, p. 243–248, 2004.

DE VRIES, R. P.; POULSEN, C. H.; MADRID, S.; VISSER, J. *aguA*, the gene encoding an extracellular α -glucuronidase from *Aspergillus tubingensis*, is specifically induced on xylose and not on glucuronic acid. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 243–249, 1998.

ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 353–364, 2002.

ESTEBAN, R.; VILLANUEVA, J. R.; VILLA, T. G. β -D-Xylanases of *Bacillus circulans* WL-12. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, p. 733–739, 1982.

FAULDS, C. B.; MANDALARI, G.; LO CURTO, R. B.; BISIGNANO, G.; CHRISTAKOPOULOS, P.; WALDRON, K. W. Synergy between xylanases from glycoside hydrolase family 10 and family 11 and a feruloyl esterase in the release of phenolic acids from cereal arabinoxylan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 622–629, 2006.

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

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. **Journal of Food Engineering**, v. 52, p. 211–218, 2002.

GHATORA, S. K.; CHADHA, B. S.; BADHAN, A. K.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Identification and characterization of diverse xylanases from thermophilic and thermotolerant fungi. **Bioresources**, v. 1, p. 18–33, 2006.

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

GILBERT, H. J.; HAZLEWOOD, G. P. Bacterial cellulases and xylanases. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 187–194, 1993.

GILBERT, H. J.; SULLIVAN, D. A.; JENKINS, G.; KELLETT, L. E.; MINTON, N. P.; HALL, J. Molecular cloning of multiple xylanase genes from *Pseudomonas fluorescens* subsp. cellulosa. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 3239–3247, 1988.

GOMES, J.; TERLER, K.; KRATZER, R.; KAINZ, E.; STEINER, W. Production of thermostable β -mannosidase by a strain of *Thermoascus aurantiacus*: isolation, partial purification and characterization of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 969–975, 2007.

GREGG, D.; SADDLER, J. N. A techno-economic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57, p. 711–727, 1996.

GROHMANN, K.; TORGET, R.; HIMMEL, M. Optimization of diluted acid pretreatment biomass. **Biotechnology & Bioengineering Symposium**, v. 15, p. 59–80, 1985.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 17–34, 2003.

HAN, Y.; CHEN, H. Synergism between corn stover protein and cellulase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 638–645, 2007.

HAROS, M.; ROSELL, C. M.; BENEDITO, C. Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. **European Food Research and Technology**, v. 215, p. 425–430, 2002.

HATFIELD, R. D. Structural polysaccharides in roughages and their degradability. **Agronomy Journal**, v. 81, p. 39–46, 1989.

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

HIGUCHI, T. Look back over the studies of lignin biochemistry. **Journal of Wood Science**, v. 52, p. 2–8, 2006.

HUI, J. P. M.; WHITE, T. C.; THIBAUT, P. Identification of glycan structure and glycosylation sites in cellobiohydrolase II and endoglucanases I and II from *Trichoderma reesei*. **Glycobiology**, v. 12, p. 837–849, 2002.

HONG, J.; TAMAKI, H.; YAMAMOTO, K.; KUMAGAI, H. Cloning of a gene encoding thermostable cellobiohydrolase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 42–50, 2003.

HONGZHANG, C.; LIYING, L. Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 666–676, 2007.

HRMOVÁ, M.; PETRÁKOVÁ, E.; BIELY, P. Induction of cellulose and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo and heterodisaccharides composed of glucose and xylose. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 541–547, 1991.

HRMOVÁ, M.; BIELY, P.; VRŠANSKÁ, M. Specificity of cellulase and β -xylanase induction in *Trichoderma reesei* QM 9414. **Archives of Microbiology**, v. 144, p. 307–311, 1986.

IYAMA, K. Mechanisms for altering cell wall utilization. In: JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D. et al. (Eds). **Forage cell wall structure and digestibility**. Wisconsin: ASA-CSSA-SSSA, p. 621–665, 1993.

IMAI, M.; IKARI, K.; SUZUKI, I. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, v.17, p. 79–83, 2004.

ISHIHARA, M.; NOJIRI, M.; HAYASHI, N.; NISHIMURA, T.; SHIMIZU, K. Screening of fungal xylanases for production of acidic xylooligosaccharides using in situ reduced 4-O-methylglucuronoxylan substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 170-175, 1997.

ISHII, T. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. **Plant Science**, v. 127, p. 111-127, 1997.

JACOBSEN, S. E.; WYMAN, C. E. Xylose monomer and oligomer yields for uncatalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose at varying solids concentration. **Industrial Engineer and Chemical Research**, v. 41, p. 1454–1461, 2002.

JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. **Biodegradation**, v. 1, p. 163–176, 1990.

JEFFRIES, T.; KLUNGNESS, J. H.; SYKES, M.; CROPSEY, K. Comparison of enzyme-enhanced with conventional deinking of xerographic and laser-printed paper. **Tappi Journal**, v. 77, p. 173–177, 1994.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocelluloses into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**, v. 1, p. 119–134, 2007.

JØRGENSEN, 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.

JØRGENSEN, H.; MØRKEBERG, A.; KROGH, K. B. R.; OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 48–48, 2005.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Production and characterization of cellulolytic enzyme from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1099–1104, 2003.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; VRŠANSKA, M.; KEKOS, D.; BIELY, P.; MACRIS, B. J. Catalytic properties of the endoxylanase I from *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 491–501, 2001.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: characterization of two isozymes. **Journal of Biotechnology**, v. 60, p. 155–163, 1998.

KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, p.153–156, 2004.

KHANDKE, K. M.; VITHAYATHIL, P. J.; MURTHY, S. K. Purification and characterization of an α -D-Glucuronidase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 274, p.511–517, 1989 (a).

KHANDKE, K. M.; VITHAYATHIL, P. J.; MURTHY, S. K. Purification of xylanase, β -glucosidase, endocellulase and exocellulase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 274, p. 491–500, 1989 (b).

KELLER, B. Structural cell wall proteins. **Plant Physiology**, v. 101, p. 1127–1130, 1993.

KEMBHAVI, A. A.; KULHARNI, A.; PANT, A. A. Salttolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No.64. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 38, p. 83–92, 1993.

KLOCK, U.; MUÑIZ, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. S. **Química da Madeira**. 3ª Ed. revisada, Curitiba – PR. Universidade Federal do Paraná, 2005.

KUBICEK, C. P. The cellulase protein of *Trichoderma reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. In: FIECHTER A. (Ed.), **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. v. 45, p. 2–27.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In: ERIKSSON, K. E. L. (Ed.), **Biochemical Engineering Biotechnology**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. v. 57, p. 45–126.

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

KUMAR, R.; MAGO, G.; BALAN, V.; WYMAND, C. E. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3948–3962, 2009.

KUO, C-H.; LEE, C-K. Enhancement of enzymatic saccharification of cellulose by cellulose dissolution pretreatments. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 41–46, 2009.

KWON, K. S.; LEE, J.; KANG, H. G.; HAH, Y. C. Detection of β -glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 4584–4586, 1994.

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

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL JR., M. J.; LYND, L. R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 33–44, 2002.

LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 367–380, 2002.

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

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

LI, Q.; HE, W-C.; XIAN, M.; JUN, G.; XU, X.; YANG, J-M.; LI, L-Z. Improving enzymatic hydrolysis of wheat straw using ionic liquid 1-ethyl-3-methyl imidazolium diethyl phosphate pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3570–3575, 2009.

LO, Y-C.; SARATALE, G. D.; CHEN, W-N.; BAI, M-D.; CHANG, J-S. Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. **Enzyme and microbial technology**, v. 44, p. 417–425, 2009.

LOPEZ DE LEON, A.; DING, H.; BROWN, K. Polypeptides having cellulolytic enhancing activity and polynucleotides encoding same. US 2009/0019608 A1, 15 janeiro 2009.

LYND, L. R.; ELANDER, R. T.; WYMAN, C.E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57/58, p. 741–761, 1996.

MACHUCA, A. *Thermoascus aurantiacus* (cepa brasileira): aspectos do crescimento, produção enzimática e utilização no tratamento de materiais lignocelulósicos. Dissertação (Mestrado), I. B. Unicamp, Campinas – SP, 1991.

MACHUCA, A.; AOYAMA, H.; DURÁN, N. Isolation and partial characterization of an extracellular low-molecular mass component with high phenoloxidase activity from *Thermoascus aurantiacus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 256, p. 20–26, 1999.

MAGALHÃES, P. O.; MILAGRES, A. M. F. Biochemical properties of a β -mannanase and a β -xylanase produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during biopulping conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 191–195, 2009.

MAGALHÃES, P. O. **Purificação de Hemicelulases e uma β -glicosidade de *Ceriporiopsis subvermispota* produzidas em condições de biopolpação**. Tese (Doutorado), Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Departamento de Biotecnologia, Lorena – SP, 2005.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 461–488, 2000.

MAMMA, D.; HATZINIKOLAOU, D.; KEKOS, D.; STAMATIS, H.; KALOGERIS, E. Adsorption of major endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus* on cellulosic substrates. **World of Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 781–788, 2009.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. **New improvements for lignocellulosic ethanol**, Current Opinion Biotechnology, 2009. doi:10.1016/j.copbio.2009.05.009

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 426–432, 2007.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 949–954, 2002.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Laboratório de Química de Fitobiomassas, Curitiba – PR, 2005.

MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T.; PRADO, I. N.; LEMPP, B.; PAULA, M. C. Degradabilidade *in situ* e observações microscópicas de volumosos em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 1927–1936, 2007.

MEDVE, J. **Cellulose Hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of celobiohydrolase I, II and endoglucanases II.** Tese (Doutorado). Lund University, Department of Biochemistry, Lund, Sweden, 1997.

MERHEB, C. W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, v. 104, p. 127–131, 2007.

McQUEEN-MASON, S.; DURACHKO, D. M.; COSGROVE, D. J. Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. **Plant Cell**, v. 4, p. 1425–1433, 1992.

MILAGRES, A. M. F.; SANTOS, E.; PIOVAN, T.; ROBERTO, I. C. Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1387–1391, 2004.

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

MOONEY, A. C.; MANSFIELD, S. D.; BEATSON, R. P.; SADDLER, J. N. The effect of fiber characteristics on hydrolysis and cellulase accessibility to softwoods substrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 644–650, 1999.

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

MUÑOZ, I. G.; UBHAYASEKERA, W.; HENRIKSSON, H.; SZABO, I.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G.; MOWBRAY, S. L.; STAHLBERG, J. Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporum*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CHB 58) at 1.32 Å resolution and homology models of the lysozymes. **Journal of Molecular Biology**, v. 314, p. 1097–1111, 2001.

MURACHI, T. Bromelain enzymes, In: LORAND, L. (Ed.). **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, 1976. v. 45, p. 475–485.

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

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 2453–2460, 2005.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 49–58, 2002.

ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2503–2510, 2007.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. Tese (Doutorado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2003.

PALMA-FERNANDEZ E. R. D.; GOMES E.; DA SILVA R. Purification and characterization of two β -Glucosidases from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* Miehe. **Folia Microbiologica**, v. 47, p. 685–690, 2002.

PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, p. 65–72, 2004.

PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81–84, 2003.

PAPATHEOFANOUS, M. G.; BILLA, E.; KOULLAS, D. P.; MONTIES, B.; KOUKIOS, E. G. Optimizing multisteps mechanical-chemical fractionation of wheat straw components. **Industrial Crops and Products**, v. 7, p. 249–256, 1998.

PARRY, N. J.; BEEVER, D. E.; OWEN, E.; NERINCKX, W.; CLAEYSSSENS, M.; VAN BEEUMEN, J.; BHAT, M. K. Biochemical characterization and mode of action of a thermostable endoglucanase purified from *Thermoascus aurantiacus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 404, p. 243–253, 2002.

PERSSON, T.; REN, J. L.; JOELSSON, E.; JÖNSSON A-S. Fractionation of wheat and barley straw to access high-molecular-mass hemicelluloses prior to ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3906–3913, 2009.

PIRES, A. J. V.; REIS, R. A.; CARVALHO, G. G. P.; SIQUEIRA, G. R.; BERNARDES, T. F. Bagaço de cana-de-açúcar tratado com hidróxido de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 953–957, 2006.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química, Curitiba – PR, 2007.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, p. 577–591, 2005.

PRABHU, K. A.; MAHESHWARI, R. Biochemical properties of xylanases from a thermophilic fungus, *Melanocarpus albomyces*, and their action on plant cell walls. **Journal of Biosciences**, v. 24, p. 461–470, 1999.

RABELO, S. C.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. A comparison between lime and alkaline hydrogen peroxide pretreatments of sugarcane bagasse for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 144, p. 87–100, 2008.

RABELO, S. C.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Lime pretreatment of sugarcane bagasse for bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 153, p. 139–150, 2009.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 1–8, 1998.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863–871, 2003.

RANJAN, R.; THUST, S.; GOUNARIS, C. E.; WOO, M.; FLOUDAS, C. A.; KEITZ, M.; VALENTAS, K. J.; WEI, J.; TSAPATSIS, M. Adsorption of fermentation inhibitors from lignocellulosic biomass hydrolyzates for improved ethanol yield and value-added product recovery. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 122, p. 143–148, 2009.

ROCHA, G. J. M. **Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio**. Tese (Doutorado), IQSC, USP, São Carlos – SP, 2000.

ROCHE, N.; DESGRANGES, C.; DURAND, A. Study on the solid-state production of a thermostable α -l-arabinofuranosidase of *Thermoascus aurantiacus* on sugar beet pulp. **Journal of Biotechnology**, v. 38, p. 43–50, 1994.

ROSGAARD, L.; PEDERSEN, S.; CHERRY, J. R.; HARRIS, P.; MEYER, A. S. Efficiency of new fungal cellulase systems in boosting enzymatic degradation of barley straw lignocellulose. **Biotechnology Progress**, v. 22, p. 22, 493–498, 2006.

ROSSELL, C. E. V. Conversion of lignocellulose biomass (bagasse and straw) from the sugar-alcohol industry into bioethanol. In: Telma Teixeira Franco (org.) **Industrial Perspectives for Bioethanol**. Campinas: Coleção UNIEMP Inovação, 2006. p.123–142.

ROYER, J. C.; NAKAS, J. P. Interrelationship of xylanase induction and cellulase induction of *Trichoderma longibrachiatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2535–2539, 1990.

ROWELL, R. M.; HAN, J. S.; ROWELL, J. S. Characterization and factors effecting fiber properties. **Natural Polymers and Agrofibers Bases Composites**, p. 115–134, 2000.

RYU, K.; KIM, Y. Adsorption of a xylanase purified from Pulpzyme HC onto alkali-lignin and crystalline cellulose. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 987–990, 1998.

SAAD, M. B. W.; GONÇALVES, A. R. Utilização da palha da cana-de-açúcar pré-tratada biologicamente para a produção de polpa celulósica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6. 2005. Maringá – PR, Brasil, p. 98.

SAHA, B. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 30, p. 279–291, 2003.

SALOHEIMO, M.; PALOHEIMO, M.; HAKOLA, S.; PERE, J.; SWANSON, B.; NYSSONEN, E.; BHATIA, A.; WARD, M.; PENTTILA, M. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 4202–4211, 2002.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185–194, 2009.

SANTOS, E.; PIOVAN, T.; ROBERTO, I. C.; MILAGRES, A. M. F. Kinetics of solid state fermentation of sugar cane bagasse by *Thermoascus aurantiacus* for the production of xylanase. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 13–16, 2003.

SANTOS, E. **Produção de xilanase por *Thermoascus aurantiacus* ATCC 204492 em cultivo semi-sólido utilizando bagaço de cana de açúcar**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Departamento de Biotecnologia, Lorena – SP, 2001.

SAPAG, A.; WOUTERS, J.; LAMBERT, C.; IOANNES, P.; EYZAGUIRRE, J.; DEPIEREUX, E. The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. **Journal of Biotechnology**, v. 93, p. 109–131, 2002.

SASKA, M.; OZER, E. Aqueous extraction of sugarcane bagasse hemicellulose and production of xylose syrup. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 45, p. 517–523, 1995.

SELLAMI-KAMOUN, A.; HADDAR, A.; ALI, N. E-H.; GHORBEL-FRIKHA, B. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. **Microbiological Research**, v.163, p.299–306, 2008.

SENDELIUS, J. **Steam Pretreatment Optimization for Sugarcane Bagasse in Bioethanol Production**. Master of Science Thesis, Lund University, Department of Chemical Engineering, Lund – SE, 2005.

SINSABAUGH, R. L.; LIPTAK, M. A. Enzymatic conversion of plant biomass. In: ESSER, K.; LEMKE, P. A. **The Mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 347–357, (Environmental and Microbial Relationships, IV).

SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica**. John Wiley & Sons, 1996.

SOUZA, M. C. O.; ROBERTO, I. C.; MILAGRES, A. M. F. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 768–772, 1999.

SOUZA, M. C. O. **Produção de xilanase por *Thermoascus aurantiacus* em meio semi-sólido**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Departamento de Biotecnologia, Lorena – SP, 1998.

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

SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN, R. C.; SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 195–204, 2004.

SZIJÁRTÓ, N.; FAIGL, Z.; RÉCZEY, K.; MÉZESC, M.; BERSÉNYI, A. Cellulase fermentation on a novel substrate (waste cardboard) and subsequent utilization of home-produced cellulase and commercial amylase in a rabbit feeding trial. **Industrial Crops and Products**, v. 20, p. 49–57, 2004.

TABKA, M. G.; HERPÖEL–GIMBERT, I.; MONOD, F.; ASTHER, M.; SIGOILLOT, J. C. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 897–902, 2006.

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. A.; MATSUMO, R.; KAMIKUBO, T. Purification and properties of cellulases from *Eupenicillium javanicum*. **Journal Fermentation Technology**, v. 59, p. 177–183, 1981.

TENKANEN, M.; TAMMINEN, T.; HORTLING, B. Investigation of lignin-carbohydrate complexes in kraft pulps by selective enzymatic treatments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 241–248, 1999.

TONG, C. C.; COLE, A. L.; SHEPHERD, M. G. Purification and properties of the cellulases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Biochemical Journal**, v. 191, p. 83–94, 1980.

TU, M.; CHANDRA, R. P.; SADDLER, J. N. Evaluating the distribution of cellulases and the recycling of free cellulases during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 398–406, 2007.

VARDAKOU, M.; KATAPODIS, P.; TOPAKAS, E.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Synergy between enzymes involved in the degradation of insoluble wheat flour arabinoxylan. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, p. 107–112, 2004.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neuspora crassa* (medium N). **Microbial Genetic Bulletin**, v.13. p. 42–43, 1956.

WANG, H.; TOKUSIGE, Y.; SHINOYAMA, H.; FUJII, T.; URAKAMI, T. Purification and characterization of a thermostable catalase from culture broth of *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, p. 169–173, 1998.

WANG, L.; ZHANG, Y.; GAO, P.; SHI, D.; LIU, H.; GAO, H. Changes in the structural properties and rate of hydrolysis of cotton fibers during extended enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, p. 443–456, 2006.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiology Review**, v. 52, p. 305–317, 1988.

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

XU, F.; SUN, J.; SUN, R.; FOWLER, P.; BAIRD, M. S. Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. **Industrial Crops and Products**, v. 23, p. 180–193, 2006.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, p. 26–40, 2008.

YANG, R.; XU, S.; WANG, Z.; YANG, W. Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylooligosaccharides. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 677–682, 2005.

YANG, R. C.; MACKENZIE, C. R.; BILOUS, D.; NARANG, S. A. Identification of two distinct *Bacillus circulans* xylanases by molecular cloning of the genes and expression in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p. 568–572, 1989.

YÁÑES, R.; ALONSO, J. L.; PARAJÓ, J. C. Enzymatic saccharification of hydrogen peroxide-treated solids from hydrothermal processing of rice husks. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1244–1252, 2006.

YOSHIOKA, H.; NAGATO, N.; CHAVANICH, S.; NILUBOL, N.; HAYASHIDA, S. Purification and properties of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, p. 2425–2432, 1981.

YU, E. K. C.; TAN, L. U. L.; CHAN, M. K-H.; DESCHATELETS, L.; SADDLER, J. N. Production of thermostable xylanase by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, p. 16–24, 1987.

YU, X. B.; HYUN, S. Y.; YOON-MO, K. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* Rut C-30 in wheat bran-containing media. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 208–213, 1998.

ZANDONÁ FILHO, A. **Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas**. Tese (Doutorado). Universidade do Paraná, Setor de Tecnologia, Curitiba – PR, 2001.

ZHANG, M.; SU, R.; QI, W.; HE, Z. Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose by Optimizing Enzyme Complexes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2009. DOI 10.1007/s12010-009-8602-3

ZHAO, Y.; LU, W.-J.; WANG, H.-T. Supercritical hydrolysis of cellulose for oligosaccharide production in combined technology. **Chemical Engineering Journal**, v. 150, p. 411–417, 2009.

ZHOU, J.; WANG, Y.-H.; CHU, J.; LUO, L.-Z.; ZHUANG, Y.-P.; ZHANG, S.-L. Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 819–825, 2009.

ZHU, L.; O'DWYER, J. P.; CHANG, V. S.; GRANDA, C. B.; HOLTZAPPLE, M. T. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3817–3828, 2008.