**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

DAYELLE SÂMILA PESSOTTI DE OLIVEIRA GONÇALVES

**Estudo sobre o modo de ação de enzimas hidrolíticas produzidas por
fungos degradadores de madeira sobre substratos com elevado teor de
lignina**

Lorena – SP

2013

DAYELLE SÂMILA PESSOTTI DE OLIVEIRA GONÇALVES

**Estudo sobre o modo de ação de enzimas hidrolíticas produzidas por
fungos degradadores de madeira sobre substratos com elevado teor de
lignina**

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

Orientador: Prof. Dr. André Luis Ferraz

Versão reimpressa e corrigida

Lorena – SP

Agosto, 2013

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

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

Gonçalves, Dayelle Sâmila Pessotti de Oliveira

Estudo sobre o modo de ação de enzimas hidrolíticas produzidas por fungos degradadores de madeira sobre substratos com elevado teor de lignina / Dayelle Sâmila Pessotti de Oliveira Gonçalves. – –ed. Reimpressa e corrigida. –2013.
128 p. : il.

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

Orientador: André Luis Ferraz.

1. Bagaço de cana-de-açúcar 2. Hidrólise enzimática 3. Celulases 4. Endoglucanases 5. *Gloeophyllum trabeum* 6. *Talaromyces emersonii*. I. Título. II. Ferraz, André Luis, orient.

664.113 - CDU

Agradecimentos

Primeiramente, a Deus pela constante presença em minha vida, por ter me dado à oportunidade e força para chegar até aqui.

À minha Família, em especial minha mãe Denilda e a minha avó Auxiliadora pelo amor, atenção e paciência em todos os momentos, ao meu irmão Deivid e as minhas tias Renata e Fátima que sempre acreditaram na minha capacidade.

À Escola de Engenharia de Lorena/USP e ao Departamento de Biotecnologia pela oportunidade concedida para a realização desse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Ferraz, pelos ensinamentos, correções, paciência, dedicação e apoio durante esses anos. Muito Obrigada!

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, pelos conhecimentos a mim transmitidos.

A todos os funcionários, e amigos do Debiq, em especial a Babi, Isabela, Paulo, Mayara e Germano pela boa convivência e pela disponibilidade em me ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Ciência da Madeira: José Moreira, Ana Paula, Fernanda Valadares, Omar, Maria Fernanda, Ângela, Fernando, Leonardo, Thales, Zé Moreira e Zé Cobrinha pela disposição em ajudar, pelas conversas e pelos momentos de descontração.

A todas as minhas amigas de Ipatinga que mesmo distante se fizeram sempre presente me apoiando e incentivando.

À CAPES, FAPESP e CNPQ pelo apoio financeiro e a USP pela oportunidade.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”
(José de Alencar)

RESUMO

GONÇALVES, D. S. P. O. **Estudo sobre o modo de ação de enzimas hidrolíticas produzidas por fungos degradadores de madeira sobre substratos com elevado teor de lignina.** 2013. 128p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

Os fungos de decomposição parda são eficientes na degradação dos polissacarídeos da madeira, pois, além das enzimas hidrolíticas, podem gerar, via reação de Fenton, radicais hidroxila que são responsáveis pela rápida despolimerização dos polissacarídeos da parede celular sem a remoção prévia da lignina. O presente trabalho analisou se enzimas hidrolíticas do fungo de decomposição parda *Gloeophyllum trabeum* e as endoglucanases comerciais do ascomiceto *Talaromyces emersonii* apresentam efeito sinérgico com celulases comerciais durante a hidrólise enzimática de substratos com teor elevado de lignina. Os substratos em questão corresponderam a bagaço de cana pré-tratado por um processo quimiomecânico que emprega sulfito alcalino. Dois níveis de tratamento foram obtidos a partir de cargas diferenciadas de sulfito de alcalino. A carga mais elevada foi de 10 g de Na_2SO_3 e 5 g de NaOH para cada 100g de bagaço e gerou um substrato de baixa recalcitrância. O emprego de uma carga de sulfito alcalino diminuída à metade da carga anterior gerou um substrato de elevada recalcitrância. Para viabilizar a execução dos experimentos utilizando pequenas quantidades de enzima, foi desenvolvido um método de hidrólise em pequena escala empregando bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino como substrato. O método em questão empregou 20 mg de substrato e 1 mL de volume final de reação gerando dados com boa reprodutibilidade e níveis de conversão de celulose e xilana similares aos observados em ensaios tradicionais que empregam 1 g de substrato e 50 mL de meio reacional. O fungo *G. trabeum* foi cultivado com 7 diferentes fontes de carbono, sendo detectada a atividade de endoglucanase em todos os meios e alcançando níveis mais elevados nos cultivos com carboximetilcelulose, que foi, portanto, utilizado para produção das enzimas de *G. trabeum*. Um extrato de cultivo de *G. trabeum* foi parcialmente purificado, gerando um extrato com 2,16 UI de endoglucanases/mL e um teor de proteínas de 1,34 mg/mL. O uso das enzimas de *G. trabeum* e de *T. emersonii* em misturas com a Celluclast foi baseado nas cargas de endoglucanases totais, visto que a atividade em papel de filtro não foi detectável nos dois complexos enzimáticos. Para as reações de hidrólise do substrato que apresentava baixa recalcitrância, as conversões máximas de celulose e xilana foram da ordem de 80% após 72h de reação com cargas de endoglucanases de Celluclast de 120 UI/g de substrato. A mistura de enzimas que empregaram metade desta carga de endoglucanase advinda de Celluclast e outra metade de extratos de *G. trabeum* proporcionaram eficiências de hidrólise similares às obtidas com a mesma carga advinda somente de Celluclast. No caso da suplementação das misturas com endoglucanases de *T. emersonii*, as eficiências de hidrólise foram menores do que aquelas obtidas somente com Celluclast. As reações de hidrólise do substrato de elevada recalcitrância proporcionaram conversões de celulose e xilana máximas da ordem de 50% quando se empregou Celluclast como fonte de enzimas. A suplementação de parte das endoglucanases desta preparação por endoglucanases provenientes do extrato de *G. trabeum* ou de *T. emersonii* não favoreceram a hidrólise dos polissacarídeos presentes no substrato.

Palavras Chaves: Bagaço de cana-de-açúcar. Hidrólise enzimática. Celulases. Endoglucanases. *Gloeophyllum trabeum*. *Talaromyces emersonii*

ABSTRACT

GONÇALVES, D. S. P. O. **Hydrolytic enzymes produced by wood decay fungi and their action on substrates with high lignin contents.** 2013. 128p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

Brown-rot fungi can degrade wood polysaccharides in an efficient manner because they produce hydrolytic enzymes and also hydroxyl radicals via Fenton reaction. These systems are responsible for a rapid polysaccharide depolymerization without previous lignin removal from the wood cell walls. The present work evaluated the hydrolytic enzymes produced by the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum* and by the ascomycete *Talaromyces emersonii* in mixtures with commercial cellulases to hydrolyze lignin-rich substrates. The evaluated substrates were sugar cane bagasse pretreated in a chemithermomechanical process that used alkaline sulfite in the reaction media. Two levels of pretreatment were employed by using varied loads of chemicals during the cooking step. A low recalcitrance material was prepared by pretreating the sugar cane bagasse with 10 g of Na₂SO₃ and 5 g of NaOH per 100g of sugar cane bagasse. Using the half of this chemical loading resulted in a second substrate that was more recalcitrant. A small scale enzymatic hydrolysis procedure was set to permit the use of low enzymes dosage in the polysaccharide hydrolyses studies. This procedure used only 20 mg of lignocellulosic substrate in 1 mL of final reaction volume. Data obtained for cellulose and xylan conversion presented good reproducibility and average conversion values very similar to that obtained in traditional experiments that use 1 g of substrate in 50 mL of reaction medium. *G. trabeum* was cultured in 7 different carbon sources and endoglucanase activities were detected in all cases. The highest endoglucanases levels were obtained in cultures with carboxymethylcellulose as carbon source. One culture extract from this fungus was partially purified yielding a purified extract with 2.16 IU of endoglucanases/mL and a protein content of 1.34 mg/mL. The use of the enzymes from *G. trabeum* and *T. emersonii* extracts in mixtures with commercial Celluclast was based on the total loads of endoglucanases, since filter paper activities were not detectable in the extracts obtained from the studied fungi. Cellulose and xylan from the low recalcitrance substrate were converted at yields of 80% after 72 h of hydrolysis by Celluclast loaded at 120 UI of endoglucanases/g de substrate. Using enzyme mixtures with the same endoglucanase dosage but divided in 50% from Celluclast and 50% from *G. trabeum* extract yielded almost the same hydrolysis efficiency. In the case of the enzyme mixtures in which the extract from *T. emersonii* was used instead the extract from *G. trabeum* the hydrolysis efficiency was lower than that obtained by the treatment with Celluclast only. Cellulose and xylan from the low recalcitrance substrate were converted at yields of 50% after 72 h of hydrolysis by Celluclast. The replacement of this endoglucanase load with endoglucanases from *G. trabeum* or *T. emersonii* extracts resulted in lower hydrolysis efficiency.

Key words: Sugarcane bagasse. Enzymatic hydrolysis. Cellulases. Endoglucanases. *Gloeophyllum trabeum*. *Talaromyces emersonii*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura de um fragmento de hemicelulose encontrado em gramíneas.....	19
Figura 2: Esquema da adsorção improdutiva e limitação da ação das celulasas devido à existência de agregados de lignina	20
Figura 3: Degradação da celulose, conceito C1-CX	23
Figura 4: Modo de ação das celulasas sobre a celulose.....	24
Figura 5: Representação de uma estrutura hipotética da xilana e os respectivos pontos onde as enzimas podem atuar.	25
Figura 6: Mecanismo proposto para a geração de espécies reativas de oxigênio no fungo de decomposição parda <i>Gloeophyllum trabeum</i>	29
Figura 7: Conversão de celulose em um ensaio de hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino (10 % de sulfito de sódio e 5% de hidróxido de sódio) que emprega 20 mg de substrato e 1 mL de volume final de reação.....	48
Figura 8: Comparativo da eficiência de hidrólise enzimática de um mesmo substrato (bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino: 10 % de sulfito de sódio e 5% de hidróxido de sódio) em ensaios desenvolvidos com 1g/50 mL e 20 mg/mL.	49
Figura 9: Conversão de glucana e xilana durante a hidrólise em pequena escala, utilizando bagaço de cana pré-tratado com sulfito.	50
Figura 10: Curva de produção de endoglucanase por <i>G. trabeum</i> utilizando fontes de carbono sem combinações.	52
Figura 11: Curva de produção de endoglucanase por <i>G. trabeum</i> utilizando fontes de carbono combinadas.	53
Figura 12: Precipitação da CMC presente no extrato de cultivos de <i>G. trabeum</i> empregando diversos sais.....	54
Figura 13: Conversão de celulose e de xilana durante o tratamento de bagaço de cana com uma mistura de enzimas comerciais	61
Figura 14: Conversão de celulose e de xilana durante o tratamento de bagaço de cana com uma mistura de enzimas comerciais com um extrato de cultivo de <i>G. trabeum</i>	66
Figura 15: Conversão de celulose e de xilana durante o tratamento de bagaço de cana com uma mistura de enzimas comerciais suplementadas com endoglucanases de <i>T. emersonii</i>	71
Figura 16: Conversão de celulose e de xilana durante o tratamento de bagaço de cana com uma mistura de enzimas comerciais suplementadas com albumina.	75
Figura 17: Cinética da enzima β -glicosidase, presente no extrato comercial da Cellubrix.	88
Figura 18: Massa de glicose liberada na reação de FPAse, no extrato comercial da Cellubrix.	88
Figura 19: Cinética da enzima β -glicosidase, presente no extrato comercial Novozyme 188.	89
Figura 20: Dados de açúcar redutor gerados em 30 minutos com diluições progressivas do extrato de <i>G. trabeum</i>	91
Figura 21: Cinética de conversão de xilana em xilose, utilizando o extrato de <i>G. trabeum</i>	92
Figura 22: Absorbância obtida em cada tempo da reação de determinação da atividade de β -glicosidase para as amostras A1, A2 e A3, do extrato de <i>G. trabeum</i>	93
Figura 23: Cinética de conversão de avicel em glicose, utilizando o extrato de <i>G. trabeum</i>	94

Figura 24: Absorbância obtida em cada tempo da reação de determinação da atividade de β -xilosidase para as amostras A1, A2 e A3, do extrato de <i>G. trabeum</i>	95
Figura 25: Dados de açúcar redutor das amostras A1, A2 e A3 gerados em 60 minutos com diluições progressivas do extrato de Celluclast.....	97
Figura 26: Dados de açúcar redutor das amostras A4, A5 e A6 gerados em 60 minutos com diluições progressivas do extrato de Celluclast.....	97
Figura 27: Dados de açúcar redutor das amostras A1, A2 e A3 gerados em 30 minutos com diluições progressivas do extrato de Celluclast.....	98
Figura 28: Dados de açúcar redutor das amostras A4 e A5 gerados em 30 minutos com diluições progressivas do extrato de Celluclast.	99
Figura 29: Absorbância obtida em cada tempo da reação de determinação da atividade de β -glicosidase para as amostras A1, A2 e A3, da preparação Celluclast.	100
Figura 30: Absorbância obtida em cada tempo da reação de determinação da atividade de β -glicosidase para as amostras A4, A5 e A6, da preparação Celluclast.	100
Figura 31: Quantidade de açúcar redutor formado para cada tempo analisado na reação de hidrólise de xilana pela Celluclast.....	102
Figura 32: Conversão de Xilana em xilose, utilizando a preparação comercial Celluclast.	102
Figura 33: Quantidade de açúcar redutor formado para cada tempo analisado na reação de hidrólise de avicel pela Celluclast.	103
Figura 34: Conversão de Avicel em glicose, utilizando a preparação comercial Celluclast.	104
Figura 35: Absorbância obtida em cada tempo da reação de determinação da atividade de β -xilosidase para as amostras A1, A2 e A3, da preparação Celluclast.	105
Figura 36: Cinética de conversão de CMC em glicose, utilizando o extrato de Novozyme 188.....	106
Figura 37: Absorbância obtida em cada tempo da reação de determinação da atividade de β -glicosidase para as amostras A1, A2 e A3, da preparação Novozyme 188.	108
Figura 38: Cinética de conversão de xilana em xilose, utilizando o extrato Novozyme 188.	109
Figura 39: Curva de conversão de pNPX em pNP, para as amostras A1, A2 e A3, da preparação Novozyme 188.....	110
Figura 40: Dados de açúcar redutor das amostras A1, A2 e A3 gerados em 30 minutos com diluições progressivas do extrato de Novozyme 188.	111
Figura 41: Cinética de conversão de xilana em xilose, utilizando o extrato <i>T. emersonii</i>	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividades de FPAases e β -glicosidases nos extratos comerciais Cellubrix e Novozyme. ...	47
Tabela 2: Atividade máxima de endoglucanases detectada em cultivos de <i>G. trabeum</i> em diferentes meios de cultura.	52
Tabela 3: Atividade de endoglucanases presentes em um extrato de cultivo de <i>G. trabeum</i> crescido por 21 dias em CMC 2% e em precipitados proteicos obtidos pela ação de sulfato de amônio a 40% e 80% da saturação sobre o extrato bruto.	55
Tabela 4: Monitoramento do teor de proteínas e da atividade de endoglucanases no processo experimental de purificação de extratos obtidos em cultivos de <i>G. trabeum</i> em 2% de CMC por 24 dias.	56
Tabela 5: Atividade de enzimas hidrolíticas presentes no extrato de <i>G. trabeum</i> cultivado em 2% de CMC por 24 dias, concentrado/purificado por precipitação com sulfato de amônio seguida de ultrafiltração.	57
Tabela 6: Atividade de enzimas hidrolíticas presentes em enzimas comerciais.	58
Tabela 7: Caracterização dos bagaços pré-tratados com carga alta de sulfito e baixa de sulfito . .	60
Tabela 8: Atividade de enzimas hidrolíticas presentes em cada ensaio (eppendorf) de hidrólise em pequena escala do bagaço de cana.	61
Tabela 9: Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino: Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas e dados de velocidade inicial de reação quando o sistema hidrolítico era um mistura de enzimas comerciais.	62
Tabela 10: Enzimas hidrolíticas presentes no ensaio de hidrólise em pequena escala com as preparações comerciais suplementadas com um extrato de cultivo de <i>G. trabeum</i>	66
Tabela 11: Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino: Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação quando o sistema hidrolítico era um mistura de enzimas comerciais suplementada com um extrato de cultivo de <i>G. trabeum</i>	67
Tabela 12: Enzimas hidrolíticas presentes no ensaio de hidrólise em pequena escala com as preparações comerciais suplementadas com extrato de <i>T. emersonii</i>	71
Tabela 13: Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino: Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação quando o sistema hidrolítico era um mistura de enzimas comerciais suplementada com endoglucanases de <i>T. emersonii</i>	72
Tabela 14: Enzimas hidrolíticas presentes no ensaio de hidrólise em pequena escala com as preparações comerciais suplementadas com albumina sérica bovina (BSA).	75
Tabela 15: Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino: Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação quando o sistema hidrolítico era um mistura de enzimas comerciais suplementada com albumina.	76
Tabela 16: Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação de hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino e concentração de proteína quando o sistema hidrolítico era um mistura de enzimas comerciais suplementada com endoglucanases de <i>G. trabeum</i> ou albumina.	77

SIGLAS E ABREVIACÕES

PASC - Celulose intumescida com ácido fosfórico

CBH – Celobiohidrolases

2,5-DMBQ - 2,5-dimetoxi-1,4-benzoquinona

K_m – Constante de Michaelis-Menten

K_{cat} – Constante catalítica (turn-over)

FPA - Atividade de papel de filtro

pNPG - para-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo

pNPX - para-nitrofenil-β-D-xilanopiranosídeo

pNP - para-nitrofenol

CMC – Carboximetilcelulose

DNS - ácido dinitrossalicílico

UI - μmol de produto liberado por minuto nas condições de ensaio.

FPU – Unidades de Papel de filtro

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

CEC - Conversão enzimática da celulose

CSF - Canadian Standard Freeness

BSA - Albumina sérica bovina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1.	RECALCITRÂNCIA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PROCESSOS DE PRÉ-TRATAMENTO.....	17
2.1.1.	<i>Composição da biomassa Lignocelulósica</i>	<i>18</i>
2.1.2.	<i>Pré – tratamento da biomassa lignocelulósica</i>	<i>20</i>
2.2.	ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	22
2.2.1.	<i>Celulases.....</i>	<i>22</i>
2.2.2.	<i>Hemicelulases</i>	<i>24</i>
2.3.	FUNGOS DE DEGRADAÇÃO DA MADEIRA.....	25
2.3.1.	<i>Gloeophyllum trabeum.....</i>	<i>28</i>
2.3.1.1.	Endoglucanases de <i>Gloeophyllum trabeum</i>	29
2.3.2.	<i>Talaromyces emersonii.....</i>	<i>31</i>
3.	OBJETIVOS	32
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1.	REAGENTES.....	33
4.2.	FUNGO E PREPARO DO INÓCULO	33
4.3.	PREPARO DO MEIO DE CULTIVO, CONDIÇÕES DE CULTIVO	34
4.4.	PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE E OBTENÇÃO DO EXTRATO COM ENZIMAS HIDROLÍTICAS	34
4.4.1.	<i>Precipitação com Sulfato de amônio.....</i>	<i>35</i>
4.5.	DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	35
4.5.1.	<i>Cinética de hidrólise enzimática de substratos modelo.....</i>	<i>35</i>
4.5.1.1.	Endoglucanases.....	36
4.5.1.2.	Exoglucanase (Celobiohidrolase).....	37
4.5.1.3.	β -glicosidases.....	38
4.5.1.4.	β -xilosidases.....	39
4.5.1.5.	Celulases totais	39
4.5.1.6.	Xilanases	40
4.7.	PRÉ-TRATAMENTO COM SULFITO ALCALINO.....	41
4.8.	SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA	43
4.8.1.	<i>Hidrólise enzimática empregando 1 g de substrato.....</i>	<i>43</i>
4.8.2.	<i>Hidrólise enzimática empregando 20 mg de substrato (desenvolvimento do método).....</i>	<i>44</i>
4.8.3.	<i>Hidrólise enzimática empregando 20 mg de substrato (hidrólise empregando os extratos enzimáticos de teste).....</i>	<i>44</i>
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1.	DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS CELULÓSICOS EM PEQUENA ESCALA.	46
5.2.	PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASES POR <i>G. TRABEUM</i>	51
5.2.1.	<i>Caracterização das atividades de enzimas hidrolíticas nos extratos de cultivos de G. trabeum e em formulações de celulases comerciais.....</i>	<i>53</i>
5.3.	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO COM SULFITO ALCALINO	59

5.3.1. Ensaio de hidrólise enzimática com reposição da carga de endoglucanases no meio reacional a partir de extratos de <i>G. trabeum</i> e <i>T. emersonii</i>	64
5.3.2. Adição de proteínas sem atividade enzimática nos ensaios de hidrólise.....	74
6. CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE 1	87
APÊNDICE 2	90
APÊNDICE 3	96
APÊNDICE 4	113
APÊNDICE 5	121

1. INTRODUÇÃO

Os principais componentes dos materiais lignocelulósicos são celulose (40-50%), hemicelulose (25-35%) e lignina (20-30%) (FENGEL; WEGENER, 1989). Estes componentes se distribuem de forma organizada na parede celular dos vegetais lignificados. Para a utilização da celulose e da hemicelulose presente nestes materiais como fonte de açúcares é necessário que estes polissacarídeos sejam antes hidrolisados (HIMMEL et al., 2007). Na natureza, este processo ocorre pela ação dos fungos de decomposição parda e branca. Os fungos de decomposição branca degradam todos os componentes da madeira, embora algumas espécies ataquem seletivamente a lignina nos estágios iniciais de biodegradação. Os fungos de decomposição parda, por outro lado, degradam majoritariamente os polissacarídeos. Estes fungos, além de produzir algumas das enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação dos polissacarídeos, podem ainda iniciar a degradação dos polissacarídeos com base na geração de radicais hidroxila, via reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$, que em meio ácido, gera radical OH e água) (GOODELL, 2003; WYMELENBERG et al., 2010).

O modelo dos fungos degradadores de madeira merece ser explorado com o objetivo de entender como muito destes organismos podem degradar os polissacarídeos mesmo na presença de elevados teores de lignina existente no substrato. Este aspecto é relevante, pois se sabe que a lignina, além de promover uma barreira física que impede a infiltração das enzimas nas paredes celulares lignificadas, também diminui a eficiência de ação das enzimas hidrolíticas devido à adsorção improdutiva ou por inibição causada pelos compostos originados durante de sua degradação.

Neste contexto, o presente projeto visou estudar a ação de enzimas celulolíticas do fungo de decomposição parda *Gloeophyllum trabeum* e do ascomiceto *Talaromyces emersonii* sobre bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino. As endoglucanases do fungo *Talaromyces emersonii* foram escolhidas porque este ascomiceto foi inicialmente isolado de cavacos de madeira (TANSEY,

1971), um ambiente incomum para esses fungos e ao mesmo tempo propício para os fungos degradadores de madeira. A ação das enzimas foi avaliada em combinação com celulasas comerciais, usualmente produzidas por ascomicetos que não degradam madeira (NAKAZAWA et al., 2008; WALLERSTEIN, 1939). Substratos com baixo e elevado teor de lignina foram gerados após o pré-tratamento quimiotermomecânico de bagaço de cana para serem utilizados como substratos das enzimas testadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Recalcitrância da biomassa lignocelulósica, composição química e processos de pré-tratamento.

Na natureza, a conversão dos materiais lignocelulósicos até açúcares metabolizáveis é feita através de um complexo de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e oxidativas. Este processo ocorre principalmente pela ação dos fungos de decomposição parda e branca. Os fungos de decomposição branca degradam todos os componentes da madeira, embora algumas espécies ataquem seletivamente a lignina nos estágios iniciais de biodegradação. Por outro lado, os fungos de decomposição parda, degradam majoritariamente os polissacarídeos (FERRAZ, 2004). Estes fungos evoluíram no sentido de obter o máximo possível de nutrientes de um substrato pobre em nitrogênio e extremamente recalcitrante (LEVY, 1987). A recalcitrância em questão se deve a vários fatores que incluem a baixa porosidade da parede celular vegetal lignificada, o encapsulamento da celulose pela lignina e hemicelulose e o elevado teor de celulose cristalina presente nos materiais lignocelulósicos (ARANTES; SADDLER, 2010). A mesma recalcitrância que se apresenta aos fungos degradadores de materiais lignocelulósicos é a que impede a hidrólise enzimática dos polissacarídeos *in vitro*. A hidrólise *in vitro* dos polissacarídeos da biomassa representa um processo cuja aplicabilidade é muito importante dentro do contexto da produção de combustíveis oriundos de matérias primas renováveis. Para que haja uma degradação enzimática eficiente da biomassa *in vitro* é preciso facilitar o acesso das enzimas ao substrato. Usualmente, isso depende de um pré-tratamento da biomassa que permita aumentar a porosidade da parede celular a partir da remoção de um dos componentes de encapsulamento da celulose (hemicelulose e/ou lignina) ou mesmo a ruptura física da parede celular aumentando

significativamente a área superficial acessível às enzimas hidrolíticas (WYMAN et al., 2005).

Para abordar as questões mencionadas anteriormente de forma detalhada, apresenta-se a seguir uma breve revisão bibliográfica sobre a composição química e a ultra-estrutura dos materiais lignocelulósicos, bem como algumas informações relevantes sobre processos de pré-tratamento e sobre os sistemas enzimáticos hidrolíticos necessários para a hidrólise enzimática da biomassa.

2.1.1. Composição da biomassa Lignocelulósica

Material lignocelulósico é um termo empregado para descrever os principais constituintes dos vegetais lignificados (BARL et al., 1991). A biomassa lignocelulósica, geralmente contém 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose, 20-30% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos (WYMAN et al., 2005).

A celulose tem função estrutural na parede celular dos vegetais, possui um grau de polimerização médio de 9000-10000 e é formada exclusivamente por unidades de anidro-glicose unidas por ligação glicosídica β -1,4. As cadeias de celulose se organizam em microfibrilas que possuem regiões ordenadas (cristalinas), alternadas com regiões menos ordenadas (amorfas). Essas microfibrilas formam as fibrilas que, por sua vez, ordenam-se para formar as paredes celulares (FENGEL; WEGENER, 1989). A celulose é insolúvel em água e bastante resistente ao ataque químico e à degradação microbiana (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza e é formado principalmente por D-xilose, L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose e ácido 4-O-metil-glucurônico (WYMAN et al., 2005). Os anidro-açúcares da sua cadeia principal podem ser pentoses e/ou hexoses unidos por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4). Apresenta grupos pendentes onde ocorre a formação de

2.1.2. Pré – tratamento da biomassa lignocelulósica

Devido à elevada recalcitrância da parede celular, os processos de conversão da biomassa por enzimas requerem uma etapa de pré-tratamento que visa essencialmente aumentar o acesso da enzima ao substrato. Isso pode ser feito através da remoção parcial ou total da lignina e hemicelulose ou ainda por um processo físico de ruptura da parede celular que permita aumentar consideravelmente a área superficial de acesso das enzimas. De fato, é comum que um processo de pré-tratamento combine todos os efeitos mencionados anteriormente (WYMAN et al., 2005; ZHANG; LYND, 2004).

Uma das vantagens de se remover a lignina durante o pré-tratamento é diminuir a adsorção inespecífica das enzimas que serão utilizadas na etapa de hidrólise da celulose e/ou hemicelulose. Essas enzimas podem interagir com a lignina (Figura 2) impedindo o seu reciclo ou diminuindo/inibindo sua atividade. Assim, uma estratégia para superar essa limitação causada pela presença da lignina é diminuir o seu teor no substrato através de pré-tratamentos ou da adição na mistura reacional de outras proteínas (albumina, por exemplo), surfactantes não iônicos (Tween 20, por exemplo) ou polímeros (polietilenoglicol, por exemplo) para que esses compostos interajam com a lignina no lugar das enzimas hidrolíticas minimizando as adsorções indesejáveis (CANILHA et al., 2010).

Figura 2: Esquema da adsorção improdutiva e limitação da ação das celulases devido à existência de agregados de lignina (RAHIKAINEN et al., 2013)

Vários métodos de pré-tratamentos têm sido desenvolvidos nas últimas décadas e é possível classificá-los como físicos, químicos, biológicos ou uma combinação entre eles. No que diz respeito ao tipo de reagentes químicos empregados nos pré-tratamentos, é possível generalizar que os reagentes são ácidos, bases ou agentes oxidantes. Os pré-tratamentos ácidos tendem a remover uma parte expressiva da hemicelulose para a fase líquida deixando a celulose e a lignina no resíduo sólido. Já os pré-tratamentos alcalinos tendem a dissolver majoritariamente a lignina. Entretanto, dependendo da severidade do processo, tanto os tratamentos ácidos quanto os alcalinos podem degradar parte da hemicelulose e da celulose. Os pré-tratamentos oxidativos geralmente degradam e dissolvem a lignina, mas também podem levar a perdas de hemicelulose e despolimerização e oxidação da celulose (WYMAN et al., 2005).

A etapa de pré-tratamento pode ser otimizada para o fracionamento completo da biomassa ou, simplesmente, para melhorar a eficiência de um processo subsequente de hidrólise enzimática da celulose. No caso particular avaliado no presente trabalho, o pré-tratamento a ser empregado envolve o processo quimiotermodinâmico que utiliza sulfito alcalino na digestão da biomassa, seguido de uma etapa de desfibramento mecânico. Este processo foi avaliado recentemente como uma etapa de pré-tratamento de bagaço de cana para hidrólise enzimática subsequente do resíduo celulósico (MENDES et al., 2011). Os resultados mostraram que o pré-tratamento termomecânico do bagaço de cana com sulfito alcalino leva a uma diminuição de 53 e 29% nas quantidades iniciais de lignina e hemicelulose, respectivamente, e que após o pré-tratamento, as fibras do bagaço tiveram sua estrutura física alterada passando a apresentar fibrilações externas que acarretaram num aumento da hidrofilicidade da amostra elevando sua capacidade de retenção de água, resultando em um baixo valor de CSF (Canadian Standard Freeness). Além disso, a remoção da lignina pelo pré-tratamento seguido de refino ocasionou uma melhoria na hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose, que atingiu uma conversão de celulose de 85% após 96 horas de reação. Esse alto valor de conversão obtido se deve ao baixo teor de lignina residual e ao fato do material pré-tratado com sulfito alcalino conter grupos sulfônicos que lhe conferiram maior hidrofilicidade e implicaram numa menor

adsorção improdutiva das celulasas, já que a adsorção improdutiva é dependente de interações hidrofóbicas da enzima com o material sólido (TILTON; ROBERTSON; GAST, 1991). Os resultados de conversão de hemicelulose obtidos foram levemente inferiores àqueles observados para a celulose.

2.2. Enzimas envolvidas na degradação dos polissacarídeos presentes nos materiais lignocelulósicos

A hidrólise dos polissacarídeos de um material lignocelulósico consiste na despolimerização da celulose e da hemicelulose até açúcares fermentescíveis através da quebra da ligação glicosídica em presença de água. Para isso torna-se necessário o uso de catalisadores, como ácidos ou enzimas. Dentre as enzimas encontram-se as celulasas e as hemicelulasas que degradam a celulose e a hemicelulose, respectivamente.

2.2.1. Celulasas

As celulasas são uma mistura de várias enzimas, que atuam de maneira sinérgica na degradação da celulose. Estas enzimas são produzidas majoritariamente por fungos e têm sido amplamente estudadas por possuírem um grande potencial biotecnológico, como exemplo na produção de biocombustíveis (COUGHLAN; LJUNGDAHL, 1988). Vários fungos têm sido relatados como produtores eficientes de celulasas. Os principais pertencem aos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* e *Penicillium*. (DUFF; MURRAY, 1996).

O primeiro mecanismo que explicou como as celulasas degradam a celulose era baseado em um conceito C1-Cx, que propunha que os substratos cristalinos tornavam-se susceptíveis a hidrólise primeiramente pela ação de um componente “C1”, que atuava como fator de separação da cadeia de celulose, convertendo a celulose nativa em uma celulose modificada e reativa. A celulose

reativa modificada teria então suas ligações glicosídicas hidrolisadas pela enzima “Cx” e pelas β -glicosidases liberando açúcares redutores, como pode ser observado na Figura 3. Este mecanismo foi proposto por Reese et al. (1950) e complementado por Mandel e Reese (1964).

Figura 3: Degradação da celulose, conceito C1-CX (MANDELS; REESE, 1964).

Com o aumento do interesse pelos processos de degradação da celulose, novos estudos foram realizados e este conceito inicial foi modificado. Atualmente o conceito mais aceito é que pelo menos três grupos principais de celulases estão envolvidos no processo de hidrólise (Figura 4): as endoglucanases (1,4- β -D-glicana-4-glicanohidrolase; EC 3.2.1.4) que clivam aleatoriamente a cadeia de celulose; as celobiohidrolases - CBH (1,4- β -D-glicana-celobiohidrolase; EC 3.2.1.91) que são exo-celulases e liberam celobiose a partir das extremidades (redutoras e não redutoras) e; as 1,4- β -glicosidases (EC 3.2.1.21) que liberam glicose a partir de celobiose e de pequenos oligossacarídeos (BHAT; BHAT, 1997). As endoglucanases e CBHs são inibidas pela celobiose, produto da ação da própria CBH e para diminuir essa inibição é necessário à presença de β -glicosidases (LYND et al., 2002). Ainda dentro do complexo celulolítico pode existir a celobiose-desidrogenase que é responsável por oxidar vários açúcares como celobiose, lactose e, inclusive, celulose (AGUIAR; FERRAZ, 2011; HENRIKSSON; JOHANSSON; PETTERSSON, 2000).

Recentemente, Arantes e Saddler (2010) propuseram que a hidrólise da celulose tem início com uma etapa de amorfogênese na qual ocorre um

intumescimento e separação das cadeias de celulose para somente depois haver a formação de quantidades expressivas de açúcares redutores. Um possível mecanismo para descrever essa etapa inicial seria a alteração da estrutura da celulose por uma via não enzimática como o proposto por Mandels e Reese (1964), o que colocou o conceito C1-CX novamente em discussão. Os autores sugerem que a desestruturação inicial da celulose seria induzida por proteínas como aquelas denominadas GH61 e swolenina. Recentemente foi demonstrado que a função das GH61 em fungos filamentosos envolve a oxidação da celulose. Estas proteínas têm sido encontradas tanto em Ascomicetos quanto em Basidiomicetos sugerindo ser este um modelo comum de degradação oxidativa da celulose. Estas proteínas foram adicionadas às misturas de celulasas acarretando um aumento na sacarificação de celulose, o que sugere que elas podem ser usadas para melhorar a eficiência da hidrólise a partir de materiais lignocelulósicos (PHILLIPS et al., 2011).

Figura 4: Modo de ação das celulasas sobre a celulose. (NOVOZYMES)

2.2.2. Hemicelulasas

Sabendo que as hemiceluloses são formadas por diferentes resíduos de açúcares e, portanto, possuem estrutura complexa, para sua degradação é necessário um sistema enzimático complexo com enzimas divididas em dois grupos: a) as que degradam a cadeia principal que são representadas pelas

endo-xilanases e mananases e b) as que degradam os grupos pendentes formados pelas α -arabinofuranosidases, α -glucuronosidases, acetil-esterases e, no caso de hemiceluloses de gramíneas, também as feruloil esterases (BIELY, 1985; ERIKSSON; BLANCHETTE; ANDER, 1990; SJÖSTRÖM, 1981). As β -xilosidades degradam ainda a xilobiose à xilose (Figura 5).

Figura 5: Representação de uma estrutura hipotética da xilana e os respectivos pontos onde as enzimas podem atuar. Ac, grupo acetil; Arab, L-arabinofuranose; MeGIA, ácido 4-O-metil-glicurônico; Xil, D-xilose. Adaptado de Biely (1985) por Magalhães (2005).

2.3. Fungos de degradação da madeira

Fungos de decomposição parda (brown-rot) e branca (white-rot) pertencem a classe Basidiomycetes e são os dois principais tipos de fungos degradadores de madeira, pois possuem sistemas metabólicos que os permitem desestruturar a parede celular e despolimerizar seus componentes (HIGHLEY, 1987).

Os fungos de degradação parda recebem essa denominação porque tornam a madeira mais escura e quebradiça. O material biodegradado por fungos de decomposição parda tipicamente gera pedaços cúbicos que ao serem macerados geram um pó marrom. Algumas das espécies de fungos de decomposição parda que já foram estudadas em detalhes incluem *Poria*

monticola, *Gloeophyllum trabeum*, *Postia placenta* e *Laetiporus sulfureus* (HIGHLEY, 1987). Os fungos de decomposição parda são eficientes na degradação da madeira, pois podem gerar, via reação de Fenton, radicais hidroxila que são responsáveis pela rápida despolimerização dos polissacarídeos da parede celular sem a remoção prévia da lignina. Essas mudanças na estrutura da parede celular da madeira levam a uma rápida e grande perda das propriedades de resistência do material (COWLING, 1961; HIGHLEY, 1973).

Apesar de ainda não serem totalmente conhecidos os mecanismos de degradação de polissacáridos da madeira pelos fungos de decomposição parda, sugere-se que ocorram tanto por uma via oxidativa quanto por uma via hidrolítica (ENOKI; TANAKA; FUSE, 1989; HIGHLEY, 1987; WYMELENBERG et al., 2010). Análises químicas e estruturais de madeira degradada por estes fungos indicam que eles produzem compostos extracelulares capazes de penetrar profundamente na estrutura da parede celular da madeira e participar das reações de degradação (HIGHLEY; MURMANIS; PALMER, 1983). Outro estudo indica que essas moléculas difusíveis são menores do que as enzimas, visto que as enzimas produzidas por Basidiomicetos são muito grandes para penetrarem nas estruturas da parede celular e que as celulasas têm forte afinidade pelo substrato tendo efeito local e não difundido na fase inicial de degradação. Estudos complementares demonstraram que reações oxidativas participavam na degradação da celulose cristalina e que a iniciação da degradação poderia ser causada pela produção de peróxido de hidrogênio extracelular, pois é uma molécula pequena excretada pelos fungos de decomposição parda capaz de penetrar nas estruturas da célula. (HAMMEL et al., 2002; HIGHLEY, 1982; KOENIGS, 1972) Além disso, Highley (1977) demonstrou que os produtos finais da degradação de celulose por estes fungos consistiam principalmente de grupos carboxil e carbonilas, que indicam a ocorrência de reações por radicais.

A produção de radicais hidroxilas é iniciada quando os fungos de decomposição parda atacam a madeira para degradar a celulose. Os radicais livres de oxigênio, como o $\cdot\text{OH}$, são altamente reativos e são geralmente produzidos em sistemas biológicos pela reação de Fenton, cujo principio fundamental é apresentado na equação seguinte:

Para usar $\cdot\text{OH}$ como um oxidante, os fungos de decomposição parda necessitam reduzir Fe^{3+} e produzir H_2O_2 de forma extracelular (JENSEN et al., 2001). Há evidências de que essa reação é realizada pelos fungos de decomposição parda através da enzima celobiose desidrogenase e/ou pela ação de catecóis que reduzem Fe^{3+} (GOODELL et al., 1997; HYDE; WOOD, 1997). Os filtrados das culturas de fungos de decomposição parda apresentam baixíssima atividade C1 em celulose cristalina, como algodão e papel de filtro, porém produzem atividade Cx de maneira abundante (HIGHLEY, 1973).

Estudos feitos por Highley (1975) analisaram o efeito do pH e da temperatura na atividade e na estabilidade das celulasas dos fungos de decomposição parda *Gloeophyllum trabeum* e *Poria monticola* e dos fungos de decomposição branca *Coriolus versicolor* e *Ganoderma applanatum*. Os resultados demonstraram que as celulasas com atividade Cx (Figura 3) dos fungos de decomposição parda e de decomposição branca respondem de maneira diferente aos efeitos de pH e temperatura, pois as celulasas Cx dos fungos de decomposição parda possuem sua faixa de pH ótimo entre 2-3 e possuem uma estabilidade uniforme na faixa de temperatura entre 23 e 60 °C, enquanto as Cx dos fungos de decomposição branca possuem pH ótimo igual a 5 e possuem atividades menores que as dos fungos de decomposição parda em baixas temperaturas. A análise das celulasas produzidas pelos fungos de decomposição branca que apresentavam atividade C1 indicou que as mesmas são mais instáveis às variações de pH e temperatura do que as enzimas Cx dos mesmos fungos.

Os fungos de decomposição branca têm como característica a produção de enzimas oxidativas, não sendo encontrada a presença dessas enzimas no sistema celulolítico dos fungos de decomposição parda, com exceção da celobiose desidrogenase descoberta por Schmidhalter e Canevascini (1993) que é produzida por *Coniophora puteana* (Schumex Fr.) Karst.

2.3.1. *Gloeophyllum trabeum*

G. trabeum é um fungo de decomposição parda pertencente à classe Basidiomycetes. Esse fungo possui a capacidade de despolimerizar celulose e hemicelulose através de sistemas oxidativos e de enzimas celulolíticas. Estudos feitos por Varela, Mester e Tien (2003) demonstraram que a expressão máxima das enzimas hidrolíticas deste fungo é observada em meios com alta concentração de carbono e nitrogênio (1% de glicose, 5 mM de asparagina e 5 mM de tartarato de amônio), enquanto que atividades elevadas de NADH/quinona oxidoredutase são obtidas em meio com alta concentração de carbono e baixa concentração de nitrogênio (1% de glicose, 0,5 mM de asparagina e 0,5 mM de tartarato de amônio). Também foi demonstrado que em todas as condições de cultivo analisadas ocorreram à produção de oxalato e 2,5-dimetoxi-1,4-benzoquinona (2,5-DMBQ), que são utilizados pelo fungo para reduzir Fe^{3+} e gerar o reagente de Fenton envolvido na degradação da biomassa. Dois sistemas que promovem a reação de Fenton têm sido descritos, um baseia-se na produção de quinonas e outro na produção de glicopeptídeos.

A produção de quinonas por envolve a secreção de duas quinonas (2,5-dimetoxi-1,4-benzoquinona e 4,5-dimetoxi-1,2-benzoquinona) que são reduzidas às hidroquinonas correspondentes e então podem reduzir Fe^{3+} para gerar Fe^{2+} e H_2O_2 extracelular (Figura 6). O princípio deste mecanismo é a redução, pelo fungo, de uma quinona extracelular para sua hidroquinona que reagirá com Fe^{3+} para dar Fe^{+2} e uma semiquinona radical. A semiquinona em seguida reduzirá o O_2 para dar o radical peridroxila ($\cdot\text{OOH}$) e a quinona original. O peridroxila é uma fonte de H_2O_2 , o que irá gerar um novo sistema de Fenton (JENSEN et al., 2001). O radical peridroxila gerado na reação de Fenton reage rapidamente com praticamente todas as moléculas orgânicas devido a sua elevada capacidade oxidativa. Isso pode possibilitar a despolimerização da celulose, a rápida diminuição nos teores de hemicelulose e modificações na estrutura da lignina permitindo ao fungo degradar uma ampla variedade de compostos orgânicos (CURLING; CLAUSEN; WINANDY, 2002).

Figura 6: Mecanismo proposto para a geração de espécies reativas de oxigênio no fungo de decomposição parda *Gloeophyllum trabeum* (mostrado para 2,5-dimetoxihidroquinone) Adaptado de Baldrian, Valaskova (2008)

O segundo mecanismo oxidativo descrito para o fungo *G. trabeum* foi proposto por Wang e Gao (2003) e implica na secreção de um peptídeo de baixa massa molar denominado de Fator Gt. Os estudos sugerem que o Fator Gt interrompe ligações de hidrogênio inter e intra cadeias de celulose por um mecanismo que também envolve o radical $\cdot\text{HO}$ e que resulta na despolimerização de cadeias de celulose produzindo mais extremidades redutoras e não redutoras, o que torna a celulose mais acessível à degradação.

2.3.1.1. Endoglucanases de *Gloeophyllum trabeum*

Estudos feitos por Cotoras e Agosin (1992) demonstraram que as endoglucanases de *G. trabeum* podem ser produzidas na presença de

monossacarídeos, tais como glicose, lactose ou manose como a única fonte de carbono e que esta expressão foi ampliada de quatro a cinco vezes na presença de celulose ou celobiose. Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que glicose e glicerol não reprimem a produção da enzima, o que demonstra que a enzima não está sujeita à repressão catabólica.

Mansfield, Saddler e Gübitz (1998) cultivaram os fungos *Gloeophyllum trabeum* e *Gloeophyllum sepiarium* em CMC e Avicel, respectivamente, para isolar e caracterizar as endoglucanases produzidas. As atividades máximas de endoglucanase nos cultivos de *G. trabeum* e *G. sepiarium* foram reportadas como 410 e 360 nkat.mL⁻¹ (24,6 e 21,6 UI.mL⁻¹), respectivamente. As endoglucanases produzidas foram purificadas utilizando etapas de precipitação com sulfato de amônio, ultrafiltração, cromatografia de interação hidrofóbica e exclusão molecular. As endoglucanases purificadas destes cultivos apresentaram massa molar de 45.1 kDa e 40.5 kDa, respectivamente. O pH ótimo de ação das duas enzimas em estudo foi próximo a 4.1 o que tem sido descrito como comum para fungos de decomposição parda. As enzimas também foram ativadas por Ca²⁺ e Zn²⁺ e inibidas por íons de metais pesados. Os valores de Km e Kcat da endoglucanase produzida por *G. trabeum* foram de 6.3 g.L⁻¹ e 86.2 s⁻¹, respectivamente. Ambas as endoglucanases, quando combinadas com hemicelulases, aumentaram a quantidade de hemicelulose solubilizada em comparação com ensaios com hemicelulases sozinhas.

Estudos feitos por Cohen, Suzuki e Hammel (2005) demonstraram que o fungo *G. trabeum* produz uma endoglucanase processiva denominada Cel5A, o que favorece seu sistema de degradação de celulose. Endoglucanases processivas também foram produzidas por *Fomitopsis palustres*, outro fungo de decomposição parda (YOON et al., 2007) e por *Volvariella volvacea*, um fungo de decomposição branca, que produz uma endoglucanase processiva denominada EG1. A EG1 foi descrita como uma enzima que contém um domínio catalítico da família 5 das glicosil hidrolases e um módulo de ligação aos carboidratos (ZHENG; DING, 2013). Além de produzidas por fungos, as endoglucanases processivas também são produzidas por algumas bactérias como a bactéria marinha *Saccharophagus degradans* e sabe-se que em sistemas bacterianos essas endoglucanases pertencem quase que exclusivamente à família GH9. Nos

fungos e bactérias que apresentam um sistema celulolítico pobre em CBHs, endoglucanases processivas são enzimas diferenciadas, pois são capazes de degradar a celulose cristalina até celobiose atuando como se fossem também uma celobiohidrolase. A presença dessa enzima nos sistemas celulolíticos desses fungos demonstra que a visão de que os fungos de decomposição parda não produzem celulasas com atividade sobre a celulose cristalina deve ser considerada incorreta e necessita de maiores estudos.

2.3.2. *Talaromyces emersonii*

Talaromyces emersonii é um fungo do filo ascomycota, termofílico, patógeno de plantas, isolado originalmente de pilhas de cavacos de madeira. Quando cultivado em meios que contêm celulose produz um sistema de celulasas extracelular contendo quatro endoglucanases, quatro ou cinco exocelulasas e três β -glicosidases e é capaz de produzir elevado nível dessas celulasas em culturas agitadas usando bagaço de cana de açúcar como substrato (GOMES et al., 2008; MCHALE; COUGHLAN, 1981). Experimentos reportados por Ryu e Mandels (1980) indicaram uma atividade de endoglucanase de 125 e 161 UI/mL quando Avicel e papel de filtro foram empregados como substratos, respectivamente. Além disso, estudos feitos por Moloney, Considine e Goughlan (1983) demonstraram que a atividade hidrolítica em papel de filtro (FPA) é maior quando celulose insolúvel é utilizada como indutor em vez de celulose solúvel, e que os filtrados da cultura de *T. emersonii* utilizando Avicel ou papel de filtro como substrato indutor proporcionou uma atividade específica (atividade de papel de filtro (FPA) por mg de proteína) entre 0,8 e 0,9 que é aproximadamente o mesmo que o valor relatado por Ryu e Mandels (1980) para o sistema de celulase de *Trichoderma reesei*, que é o sistema de celulasas mais utilizado para o preparo de extratos comerciais de celulasas.

3. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar se enzimas hidrolíticas recuperadas de cultivos do fungo de decomposição parda *Gloeophyllum trabeum* e do ascomiceto *Talaromyces emersonii* podem apresentar efeito sinérgico com celulases comerciais durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino.

Para atingir este objetivo, as seguintes etapas foram cumpridas:

- Desenvolvimento de uma metodologia de hidrólise enzimática em pequena escala para viabilizar ensaios com baixa carga total de enzimas
- Cultivo do fungo de decomposição parda *Gloeophyllum trabeum* em diferentes fontes de carbono a fim de obter extratos ricos em enzimas hidrolíticas;
- Avaliar a eficiência das enzimas hidrolíticas de *G. trabeum* e de *T. emersonii* em combinação com celulases comerciais na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Os reagentes: para-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG), para-nitrofenil- β -D-xilanopiranosídeo (pNPX), xilana de birchwood, celobiose, Avicel, carboximetilcelulose (CMC) com viscosidade média foram obtidos da Sigma Chemical Company. A enzima Cellubrix foi obtida da Novozymes A/S. As enzimas Celluclast e Novozyme 188 são marcas da empresa Novozymes e foram obtidas junto a Sigma, sob números de catálogo C2730 e C6105, respectivamente. A endoglucanase comercial de *T. emersonii* foi obtida da empresa Megazyme Lote 30602. Os demais reagentes utilizados para execução deste trabalho apresentavam grau de pureza analítico. O bagaço de cana utilizado foi fornecido por uma usina de beneficiamento de cana-de-açúcar.

4.2. Fungo e preparo do inóculo

Gloeophyllum trabeum foi cultivado em placas de Petri com meio de cultura preparado com 2% de extrato de malte, 2% de ágar e 0,2% de extrato de levedura a 27 °C durante 7 dias.

Erlenmeyers de 2 L contendo 200 mL de meio de cultivo composto por 2,4% (p/v) de extrato de batata/dextrose e 0,7% (p/v) de extrato de levedura esterilizado a 121°C/15 min foram inoculados com 20 discos de micélio com 8 mm de diâmetro provenientes das placas de Petri recém cultivadas com *G. trabeum*.

Após 14 dias de incubação estática a 27 °C, o micélio crescido em meio líquido foi filtrado, lavado com água esterilizada e triturado em 300 mL de água também esterilizada usando um liquidificador de aço inox. O micélio foi batido 3 vezes em ciclos de 15 segundos e 60 s de repouso. Uma alíquota de 20 mL foi

retirada da suspensão obtida e filtrada em papel de filtro previamente seco e pesado em pesa-filtro. O micélio retido mais o papel de filtro foram colocados em um pesa-filtro e então secos a 100°C até massa constante para a determinação da massa de micélio (base seca) contido na suspensão recém-preparada. Com base nessa determinação, foi definido o volume de suspensão de micélio (homogeneizada) necessário para inocular cada frasco de cultivo com uma concentração de 235 mg de micélio por L de meio. Nos preparados com somente bagaço de cana ou Avicel como fonte de carbono a massa de inóculo usada foi de 500 mg de micélio por L de meio.

4.3. Preparo do meio de cultivo, condições de cultivo

O meio de cultivo foi composto por 1,0 g de NH_4NO_3 , 0,5 g de MgSO_4 , 0,2 g de Na_2HPO_4 , 0,8 g de KH_2PO_4 , 4,0 g de extrato de levedura em um litro de solução acrescido de fontes de carbono nas concentrações indicadas a seguir.

Foram avaliadas sete meios com diferentes fontes de carbono, sendo que estes foram denominados de acordo com a sua fonte de carbono. Os meios utilizados foram A (Avicel 20 g/L), B (bagaço de cana 40 g/L), C (CMC 20 g/L), L (lactose 20 g/L), CB (CMC 20g/L e bagaço de cana 40 g/L), LB (lactose 20 g/L e bagaço de cana 40 g/L) e LBC (lactose 10 g/L, bagaço de cana 40 g/L e CMC 10 g/L).

4.4. Produção de endoglucanase e obtenção do extrato com enzimas hidrolíticas

Frascos de Erlenmeyers (250 mL) contendo 40 mL do meio foram inoculados sob condições assépticas, com o volume da suspensão de inóculo correspondente a concentração de 235 mg/L (500 mg/L nos experimentos que teve somente bagaço e Avicel como fonte de carbono) e incubados estaticamente a 27°C. A amostragem foi feita a partir da filtração do conteúdo de um Erlenmeyer de cada condição em dias distribuídos ao longo do período de cultivo que foi de no máximo 55 dias. O conteúdo de cada erlenmeyer foi filtrado em filtro de vidro

sinterizado número 4, o volume do extrato filtrado foi medido e analisou-se a atividade de endoglucanase para a construção da curva de produção da enzima. Alguns extratos foram congelados em ultra-freezer e armazenado em freezer a -18 °C para uso posterior.

4.4.1. Precipitação de proteínas com Sulfato de amônio

O extrato enzimático congelado descrito no item 4.4 foi descongelado e teve o volume medido. A partir desse volume foi calculada, utilizando a tabela de fracionamento de sulfato de amônio a 25°C obtida no Methods in Enzymology (ENGLAND; SEIFTER, 1990), a quantidade de sulfato de amônio necessária para atingir a saturação de 40% e de 80% do extrato. A massa do sal foi adicionada lentamente ao extrato e o mesmo foi agitado durante 1 hora em agitador magnético. O extrato foi então centrifugado por 30 minutos a 3.400 g em centrifuga refrigerada a 4°C. O pellet foi ressuspenso em 30mL de água destilada e foi concentrado e lavado com água destilada para retirada do sal utilizando membranas de ultrafiltração de corte de 10 kDa, atingindo um volume final de 8mL. Tanto no pellet quanto no sobrenadante a atividade de endoglucanase e a quantidade de açúcares totais foram medidas.

4.5. Determinação das atividades enzimáticas

4.5.1. Cinética de hidrólise enzimática de substratos modelo

As atividades de β -glicosidase, xilanase e celobiohidrolases foram determinadas nos preparados comerciais (Novozyme 188, Celluclast 1.5L e endocelulases de *Talaromyces emersonii*) e no extrato de *Gloeophyllum trabeum* de acordo com estudos cinéticos de conversão de cada substrato modelo

específico. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os tempos de reação avaliados para cada enzima foram: a) β -glicosidase: 2, 5, 10, 20 e 30 minutos; b) xilanase: 2, 5, 10, 20 e 30 minutos e c) celobiohidrolase: 30, 45, 60 e 120 minutos.

4.5.1.1. Endoglucanases

A atividade de endoglucanase foi determinada segundo Ghose (1987), utilizando como substrato uma solução de carboximetilcelulose 2% (m/v).

Os tubos de ensaio com 0,5 mL da solução de substrato foram primeiramente pré-incubados a 50 °C. Ao substrato foram adicionados 0,5 mL de diferentes diluições enzimáticas capazes de produzirem cerca de 0,5 mg de açúcar redutor. A reação foi interrompida pela adição de 3,0 mL de DNS. Os tubos foram fervidos por 5 minutos, adicionou-se em cada um deles 20,0 mL de água destilada e foi feita a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. O branco para zerar o espectrofotômetro foi feito substituindo o substrato e o extrato por água. Controles para cada amostra foram preparados adicionando-se o reagente de DNS antes do extrato enzimático. As concentrações de açúcares redutores determinadas nos tubos “controle” foram subtraídas das concentrações de açúcares redutores totais gerados pela reação enzimática. A concentração de açúcares redutores liberada no meio reacional foi determinada com o auxílio de uma curva padrão de glicose. Para a construção da curva padrão foi realizada as mesmas condições experimentais com diferentes diluições do padrão de glicose (2 mg/mL) no lugar do extrato enzimático.

Para calcular a atividade endoglucanásica, foi necessário calcular a concentração enzimática que produza exatamente 0,5 mg de açúcares redutores. Para isso foi feito um gráfico do logaritmo da concentração do extrato enzimático contra a massa de glicose liberada. Encontrada a concentração enzimática responsável por produzir 0,5 mg de açúcares redutores, a atividade endoglucanásica foi calculada pela seguinte equação:

$$\frac{UI_{CMC}}{mL} = \frac{0,185}{\text{concentração enzimática que libera 0,5 mg de açúcar redutor}}$$

A atividade de endoglucanase quando não detectada pelo método de Ghose (1987) foi determinada segundo Tanaka et. al. (1981). Ambos os métodos consistem na hidrólise de CMC, resultando na formação de extremidades redutoras, detectadas pelo método do ácido dinitrossalicílico – DNS (MILLER, 1959). Neste caso, uma alíquota de 0,9 mL de CMC de média viscosidade (SIGMA C4888) 0,44% foi adicionada a 0,1mL do extrato enzimático devidamente diluído e a mistura foi incubada a 50°C por tempos de reação de 5, 10, 20 e 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS. Os tubos foram fervidos por 5 minutos e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. O branco para zerar o espectrofotômetro foi feito substituindo o substrato e o extrato por tampão. Controles para cada amostra foram preparados adicionando-se o reagente de DNS antes do extrato enzimático. As concentrações de açúcares redutores determinadas nos tubos “controle” foram subtraídas das concentrações de açúcares redutores totais gerados pela reação enzimática.

A absorbância foi convertida em concentração de acordo com a curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como 1 μmol de açúcar redutor liberado por minuto nas condições de ensaio. A curva de glicose foi construída misturando 0,1 mL de soluções de glicose e 0,9 mL de solução tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 5,0. Foram adicionados 1,5 mL de ácido dinitrossalicílico (DNS) e a mistura foi fervida por 5 minutos. Depois de esfriar, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. O branco foi feito substituindo a solução de glicose por solução tampão. Os valores de absorbância foram relacionados com as concentrações de glicose e a curva de calibração foi obtida.

4.5.1.2. Exoglucanase (Celobiohidrolase)

A atividade de exo-1,4- β -glucanase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Wood e Bhat (1988). Os açúcares redutores foram determinados pelo método do DNS (MILLER, 1959). Uma alíquota de 0,9 mL de suspensão de Avicel Sigma 1% foi adicionada a 0,1 mL de extrato enzimático e incubados a 50 °C por tempos de reação previamente indicados. As reações foram interrompidas com 1,5 mL de DNS. Os tubos de ensaio foram fervidos a 100 °C em banho-maria, por 5 minutos. Após esta etapa, a mistura foi centrifugada a 3400 x g por 15 minutos para retirada dos sólidos insolúveis. Realizou-se a leitura da absorbância do sobrenadante a 540 nm. O branco para zerar o espectrofotômetro foi feito substituindo o substrato e o extrato por tampão. Controles para cada amostra foram preparados adicionando-se o reagente de DNS antes do extrato enzimático.

A absorbância foi convertida em concentração de acordo com uma curva padrão de glicose previamente construída. Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como 1 μ mol de açúcar redutor liberado por minuto nas condições de ensaio.

4.5.1.3. β -glicosidases

A atividade de β -glicosidases foi determinada segundo Tan et al. (1987), através da liberação de p-nitrofenol durante a hidrólise do reagente comercial p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG). Uma alíquota de 0,8 mL de pNPG 0,1% foi adicionada a 0,2 mL do extrato enzimático devidamente diluído e a mistura foi incubada a 50 °C por tempos de reação previamente indicados. Após esse tempo, a reação foi interrompida pela adição de 2,0 mL de bicarbonato de sódio 10% e a absorbância foi medida a 410 nm. O branco para zerar o espectrofotômetro foi feito substituindo o substrato e o extrato por tampão. O controle foi preparado adicionando-se o bicarbonato antes do extrato enzimático.

A absorbância foi convertida em concentração de acordo com uma curva padrão de p-nitrofenol. Uma unidade de β -glicosidase (UI) foi definida como 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto nas condições de ensaio. A curva de p-nitrofenol

(pNP) foi construída misturando em tubos de ensaio, 0,2 mL de soluções de pNP com diferentes concentrações e 0,8 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 5,0. Em seguida, foi adicionado 2mL de bicarbonato de sódio 10% (m/v). As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 410 nm. O branco foi feito substituindo a solução de pNP por solução tampão. Os valores de absorbância foram relacionados com as concentrações de pNP e a curva de calibração foi obtida.

4.5.1.4. β -xilosidases

A metodologia para medir a atividade de β -xilosidases foi similar à usada para medir a atividade de β -glicosidases (TAN et al., 1987), porém utilizou p-nitrofenil- β -D-xilanopiranosídeo (pNPX) como substrato.

4.5.1.5. Celulases totais

A atividade de celulases totais foi determinada segundo a metodologia descrita por Ghose (1987). Em um tubo de ensaio contendo uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 (1 x 6 cm), equivalente a aproximadamente 50 mg, foi adicionado 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0; e 0,5 mL de extrato enzimático em 3 diluições diferentes. 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. Adicionou-se 20 mL de água destilada e em seguida realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm. O branco para zerar o espectrofotômetro foi feito substituindo o substrato e o extrato por tampão. Controles foram feitos para cada amostra adicionando o reagente de DNS antes do extrato enzimático.

Os valores de absorbância foram convertidos em massa de açúcares redutores solúveis através da curva padrão de glicose e usados para construir um

gráfico que relaciona o logaritmo das diluições da enzima com a quantidade de açúcar redutor liberado. A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que corresponde a liberação de 2 mg de açúcares redutores (4% de hidrólise) e o cálculo da atividade foi feito de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{FPU}{mL} = \frac{0,37}{\text{concentração enzimática que libera 2,0 mg de açúcar redutor}}$$

4.5.1.6. Xilanases

As atividades de xilanases foram determinadas segundo Bailey et al. (1992). Os açúcares redutores foram determinados pelo método do DNS (MILLER, 1959). Um volume de 0,9 mL de uma solução de xilana de birchwood 1% (SIGMA) foi adicionada a 0,1 mL de extrato enzimático e a mistura foi incubada a 50 °C por tempos de reação previamente indicados. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS e os tubos foram fervidos por 5 minutos. Após o resfriamento foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. O branco para zerar o espectrofotômetro foi feito substituindo o substrato e o extrato por tampão. O controle foi preparado adicionando-se o DNS antes do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de xilose através da curva de calibração de xilose.

A curva de xilose foi obtida de forma semelhante à curva de glicose (item 4.5.1.1), substituindo as soluções de glicose por soluções de xilose. Os valores de absorbância foram relacionados com as concentrações de xilose e dessa forma obteve-se a curva de calibração

A absorbância foi convertida em concentração de acordo com a curva padrão de xilose. Uma unidade de enzima (UI) foi definida como 1 µmol de açúcar redutor liberado por minuto nas condições de ensaio.

4.6. Determinação do teor de proteína

As proteínas do extrato foram quantificadas conforme proposto por Ghose (1987). Para a determinação do teor de proteínas, os reagentes foram preparados da seguinte forma: Reagente A – 20g de Na_2CO_3 e 4 g de NaOH foram dissolvidos em água destilada e o volume completado para 1000 mL. Reagente B1 – dissolveu-se 1 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em água destilada e o volume completado para 100 mL. Reagente B2 – dissolveu-se em água destilada 2 g de tartarato de sódio e potássio e o volume completado para 100 mL. Na preparação do Reagente C, foram misturados na seguinte ordem: 1 mL do Reagente B1, 1 mL do reagente B2 e 100 mL do Reagente A.

Uma alíquota de 1 mL de extrato enzimático e 1 mL de solução de ácido tricloroacético 10% (m/v) foram misturados e mantidos em refrigerador por 60 min. Posteriormente a suspensão foi centrifugada por 25 minutos a 3400 g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado solubilizado em 1,0 mL do Reagente A. Para quantificação de proteínas, foi misturado 0,1 mL de solução de proteína com 1 mL do Reagente C. Após 10 min, foi adicionado 0,1 mL de reagente de Folin Ciocalteu (1 N). Após 30 minutos, foi feita a leitura em espectrofotômetro em 750 nm.

As concentrações de proteínas foram determinadas utilizando curva padrão de albumina sérica bovina (BSA).

4.7. Pré-tratamento com sulfito alcalino

Os materiais pré-tratados usados no presente trabalho foram obtidos em um estudo paralelo que está sendo desenvolvido no Departamento de Biotecnologia da EEL-USP (trabalho de doutorado de Omar Uyarte). Aproximadamente 600g de bagaço de cana (base seca) foram impregnados com sulfito alcalino com uma razão sólido/líquido de 1/10 (p/v). Realizou-se uma impregnação a vácuo utilizando um reator de aço inox, submetendo o material a vácuo durante 30 min. Após este período, o licor foi transferido para o interior do reator e o sistema foi mantido sob vácuo por mais 15 minutos. O licor de sulfito

alcalino correspondeu a duas cargas distintas: a) Carga alta que foi de 5g de NaOH e 10g de Na_2SO_3 por 100 g de material lignocelulósico e; b) Carca baixa que foi de 2,5g de NaOH e 5g de Na_2SO_3 por 100 g de material lignocelulósico. A biomassa foi tratada a 120°C por 2 horas e posteriormente lavada com água e centrifugada até uma consistência de 30% (w/w). A água liberada durante a centrifugação foi coletada e usada para diluir a biomassa na etapa de desfibramento.

O material lavado foi suspenso em água até um volume final de 25 L (2% consistência) e desfibrado e um refinador de discos REGMED MD-300 com um espaço de disco de 0,1 mm (REGMED Brazil) e um consumo de energia de 250Wh.

4.7.1 – Caracterização da composição química dos bagaços pré-tratados e do material de partida

Cerca de 3 g em (massa seca) das amostras de bagaço moído a 20 Mesh foram extraídos em extrator de Soxhlet com etanol 95% durante 6 h. O teor de extrativos foi determinado para o material extraído. As amostras sem extrativos foram secas ao ar, tiveram nova umidade quantificada e então foram hidrolisadas com ácido para caracterização química (FERRAZ et al., 2000). Em tubo de ensaio, aproximadamente 0,3 g de material extraído foi mantido a 30 °C durante 1 hora na presença de 3 mL de ácido sulfúrico 72% (p/p). Em seguida a mistura foi transferida quantitativamente a erlenmeyers de 250 mL com adição de 79 mL de água destilada. O material parcialmente hidrolisado foi autoclavado a 120 °C / 1 atm por 1 h. Depois de resfriado o material foi filtrado a vácuo em filtro sinterizado nº 3 SCHOTT. O material retido foi seco em estufa a 100 °C até que atingisse massa constante para determinação gravimétrica de lignina insolúvel. Para determinação de lignina solúvel, o filtrado foi analisado em espectrofotômetro UV-visível a 205 nm considerando a absortividade molar da lignina solúvel igual a 105 $\text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. A fração solúvel foi ainda filtrada em SepPack C18 e analisada em HPLC para determinação do teor de açúcares monoméricos e ácido acético. Para

isso foi utilizada uma coluna BioRad HPX-87H a 45 °C, ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹ como fase móvel e fluxo de 0,6 mL/min. Um detector de índice de refração foi utilizado a uma temperatura controlada de 35 °C.

4.8. Sacarificação enzimática do bagaço de cana

4.8.1. Hidrólise enzimática empregando 1 g de substrato

O experimento foi conduzido com bagaço pré-tratado na consistência de 2% (p/v). A carga enzimática utilizada de celulasas foi de 6 FPU/g e de 26 UI de β -glicosidase/g de bagaço (as enzimas empregadas foram Cellubrix e Novozyme 188). As preparações comerciais das enzimas foram dissolvidas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 com azida 0,01% (m/v) para um volume final de 50 ml. Cerca de 1g de substrato foi pesado no interior de Erlenmeyers de 125 mL e a solução de enzima foi adicionada sobre o substrato. A reação foi conduzida sob agitação de 120 rpm a 45 °C. Amostras foram coletadas nos tempos de 4, 8, 24, 48 e 72 horas. Três repetições foram incubadas simultaneamente em cada experimento. A amostragem foi feita a partir de uma alíquota de 1 mL retirada de cada frasco com o auxílio de uma pipeta automática de 5 mL e uma ponteira com a ponta cortada para permitir a amostragem simultânea de sólidos e líquidos do meio reacional. Para interromper a hidrólise, o material amostrado foi fervido por 5 minutos e em seguida centrifugado a 3.400 x g, por 15 minutos. O sobrenadante foi diluído e analisado por HPLC (mesmo sistema cromatográfico descrito no item 4.6.1) para estimar a concentração de açúcares monoméricos liberados pela hidrólise. A conversão enzimática da celulose e a conversão enzimática de xilana foram estimadas com base nas massas de glicose e xilose geradas divididas pela massa de glucana e xilana presentes em cada tubo de reação. As massas de glicose e xilose foram devidamente corrigidas pelos respectivos fatores de hidrólise que correspondem a 0,9 e 0,88, respectivamente.

4.8.2. Hidrólise enzimática empregando 20 mg de substrato (desenvolvimento do método)

O experimento foi conduzido com bagaço pré-tratado na consistência de 2% (p/v). A carga enzimática utilizada de celulasas foi de 6 FPU/g e de 26 UI de β -glicosidase/g de bagaço (as enzimas empregadas foram Cellubrix e Novozyme 188). As preparações comerciais das enzimas foram dissolvidas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 com azida 0,01% (m/v) para um volume final de 1 ml. Cerca de 20mg de substrato foi pesado no interior de tubos Eppendorf de 2 mL e a solução de enzima foi adicionada sobre o substrato. Cinco repetições foram incubadas simultaneamente em cada experimento. A reação foi conduzida sob agitação de 120 rpm a 45 °C. Nos tempos de 4, 8, 24, 48 e 72 horas de reação foi feita a amostragem a partir de uma alíquota de 20 μ L retirada de cada frasco com o auxílio de uma pipeta automática de 200 μ L. Para isso, os tubos foram resfriados em banho de gelo e em seguida centrifugados a 3.400 x g por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, 20 μ L do líquido foram coletados, diluídos com água e analisados em HPLC (mesmo sistema cromatográfico descrito no item 4.6.1) para estimar o teor de açúcares monoméricos liberados. O restante do conteúdo do tubo Eppendorf foi colocado novamente sob agitação de 120 rpm a 45 °C. A conversão enzimática da celulose e de xilana foi estimada da mesma maneira descrita no item 4.7.1. Para o cálculo da concentração de glicose ou xilose no meio reacional foram consideradas as retiradas das alíquotas nos tempos predefinidos, pois a alteração do volume reacional pode afetar a concentração final. O experimento de hidrólise descrito anteriormente também foi realizado com cargas menores de enzima na reação. Foram empregadas cargas reduzidas em 50% (3 FPU e 13 UI de β -glicosidase/g de bagaço) e em 75% (1,5 FPU e 6,5 UI de β -glicosidase/g de bagaço).

4.8.3. Hidrólise enzimática empregando 20 mg de substrato (hidrólise empregando os extratos enzimáticos de teste)

A metodologia de hidrólise empregando 20 mg de substrato (item 4.7.2) também foi realizada para os estudos de eficiência de hidrólise em meios reacionais que continham as preparações Celluclast e Novozyme 188 suplementadas com enzimas dos extratos de *Gloeophyllum trabeum* e de *Talaromyces emersonii*. Nestes casos, a carga de endoglucanase na reação foi mantida constante, sendo que parte da atividade advinha da preparação Celluclast e a outra parte do extrato de um dos dois fungos citados anteriormente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho abordou a ação de enzimas hidrolíticas de um fungo de decomposição parda (*Gloeophyllum trabeum*) sobre bagaço de cana pré-tratado por um processo quimiotermomecânico que emprega sulfito alcalino. O trabalho experimental foi dividido em etapas que permitiram, além de desenvolver o estudo em questão, também aprimorar técnicas de caracterização dos extratos enzimáticos. Neste sentido, a apresentação do capítulo de resultados e discussão foi dividida em 3 tópicos principais que abordam: **a)** o desenvolvimento de um método de hidrólise enzimática de substratos celulósicos em pequena escala; **b)** a avaliação da produção de endoglucanases pelo fungo *G. trabeum* e; **c)** o emprego dos extratos enzimáticos de *G. trabeum* em misturas com enzimas comerciais para a hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com o processo sulfito alcalino.

5.1. Desenvolvimento de um método de hidrólise enzimática de substratos celulósicos em pequena escala.

A avaliação de coquetéis enzimáticos adequados para a hidrólise enzimática de biomassa envolve uma rotina experimental que inclui a reação de hidrólise em sistema agitado e a amostragem periódica da fração líquida para posterior determinação de açúcares monoméricos (MACLELLAN, 2010; WYMAN et al., 2005). Quando o número de experimentos previstos é elevado e, principalmente, quando as enzimas a serem testadas estão disponíveis em pequena quantidade, se faz necessário o desenvolvimento de ensaios em pequena escala.

Partindo da necessidade de se desenvolver um método de hidrólise em pequena escala, a eficiência de hidrólise de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino (pré-tratamento empregando 10% de Na_2SO_3 e 5% de NaOH) foi comparada em dois sistemas que empregam escalas distintas. Um dos sistemas

correspondeu ao método tradicional de hidrólise que emprega 1 g de substrato em cada frasco e 2% de consistência (2g de substrato sólido em 100 mL de solução) (RAMOS; FONTANA, 2004; YANG; WYMAN, 2006). Neste caso, a amostragem periódica para o estudo cinético se fez através da remoção de alíquotas de 1 mL de suspensão (incluí a fração sólida e a líquida). No ensaio em pequena escala, a massa de substrato foi reduzida para 20 mg e a consistência mantida em 2%. Neste caso, a amostragem periódica para o estudo cinético se fez através da interrupção da reação temporariamente em banho de gelo seguida de centrifugação a frio para amostrar somente 20 μ L da fração líquida.

Os ensaios de hidrólise foram realizados com enzimas comerciais denominadas Cellubrix e Novozyme 188, correspondendo a cargas enzimáticas finais de 6 FPU/g de substrato e 26 UI β -glicosidase/g de substrato.

A definição da carga enzimática empregada no ensaio depende de uma determinação adequada das atividades existentes em cada extrato. Para isso, os extratos de Cellubrix e Novozyme foram primeiramente analisados quanto às atividades de FPAse e β -glicosidases. Os dados de conversão dos substratos utilizados em cada ensaio estão mostrados no Apêndice 1. As atividades obtidas estão mostradas nas Tabelas 1.

Tabela 1: Atividades de FPAse e β -glicosidases nos extratos comerciais Cellubrix e Novozyme 188.

Preparações	Atividade enzimática (UI/mL)	
	FPAse	β -glicosidases
Cellubrix	26,4 $\pm$ 0,1	49,9 $\pm$ 0,4
Novozyme 188	*nd	922 $\pm$ 11

*nd: não detectável

Os ensaios de hidrólise desenvolvidos em pequena escala foram inicialmente analisados quanto à reprodutibilidade. Considerando que a massa de substrato empregada nestes experimentos era pequena (20 mg), existia a possibilidade de o ensaio não gerar dados reprodutíveis devido à baixa homogeneidade da amostra sólida e o pequeno volume de amostragem. Para avaliar esta questão foram realizados experimentos com 5 repetições autênticas

(5 tubos para uma mesma condição de reação) amostradas periodicamente ao longo das 72 h de hidrólise. Os dados obtidos para conversão de celulose e xilana estão mostrados na Figura 7. Pode-se observar que todos os pontos experimentais para um mesmo tempo de reação apresentaram boa reprodutibilidade, uma vez que os desvios padrão das quintuplicatas não ultrapassaram 8,5% do valor médio experimental. Isso permitiu verificar que, mesmo com pequena escala, não houve variação expressiva dos dados de hidrólise.

Figura 7: Conversão de celulose em um ensaio de hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino (10 % de sulfito de sódio e 5% de hidróxido de sódio) que emprega 20 mg de substrato e 1 mL de volume final de reação. A: CELULOSE e B: XILANA. O valor médio para cada tempo de reação está representado pela linha contínua em cada uma das figuras.

Os valores médios de conversão de celulose e xilana com os respectivos desvios padrão obtidos nos ensaios realizados em escalas diferentes (com 1 g e com 20 mg de substrato, respectivamente) estão mostrados na Figura 8. Os dados indicam que os níveis de conversão de polissacarídeos foram similares nos dois ensaios, sugerindo que os experimentos em pequena escala podem ser

usados para os estudos das misturas enzimáticas pretendidos no presente trabalho.

Figura 8: Comparativo da eficiência de hidrólise enzimática de um mesmo substrato (bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino: 10 % de sulfito de sódio e 5% de hidróxido de sódio) em ensaios desenvolvidos com 1g/50 mL e 20 mg/mL. A: CELULOSE e B: XILANA. Os desvios-padrão máximos para a conversão de glucana e xilana foram, respectivamente, de 7,0% e 7,9% nos ensaios com 20mg e 4,5% e 4,1% nos ensaios com 1 g.

Para confirmar se a metodologia em pequena escala apresentava sensibilidade adequada para o estudo de eficiências variáveis de hidrólise enzimática, foram feitos ensaios adicionais envolvendo o efeito da carga de enzimas sobre a eficiência da hidrólise do bagaço pré-tratado. Nestes ensaios, as cargas enzimáticas utilizadas foram: a) a mesma dos experimentos ilustrados na Figura 7 que correspondeu a 6 FPU/g de substrato e 26 UI β -glicosidase/g de substrato, denominada de carga alta (CA); b) 50% da CA, denominada de carga média (CM) e c) 25% de CA, denominada de carga baixa (CB) (Figura 9).

Nos experimentos de hidrólise com CM, as porcentagens máximas de conversão de glucana e xilana alcançadas foram de 78% e 82%, respectivamente. Nos ensaios com a CB, as porcentagens máximas de conversão de glucana e xilana alcançadas foram ambas de 68%. Percebe-se nas

conversões máximas de glucana e xilana uma diminuição de aproximadamente 10% e 14%, respectivamente, a cada vez que se dividiu a carga enzimática pela metade. Conforme demonstrado na Figura 9, nas primeiras 4 horas de hidrólise, as velocidades de hidrólise da celulose foram de $12,4\%.h^{-1}$, $7,7\%.h^{-1}$ e $4,9\%.h^{-1}$ para os ensaios com CA, CM e CB, respectivamente, indicando que também a velocidade inicial de hidrólise diminuiu com a diminuição de carga das enzimas. De maneira similar, as velocidades iniciais de hidrólise da xilana foram de $12,3\%.h^{-1}$, $8,2\%.h^{-1}$ e $5,9\%.h^{-1}$ para os ensaios com CA, CM e CB, respectivamente.

É possível notar que o ensaio em pequena escala desenvolvido no presente trabalho, além de apresentar dados reprodutíveis e similares aos obtidos com ensaios em maior escala, também são sensíveis ao efeito de carga enzimática, o que é fundamental para aplicação nos estudos das misturas de enzimas desenvolvidos nesta dissertação.

Figura 9: Conversão de glucana e xilana durante a hidrólise em pequena escala, utilizando bagaço de cana pré-tratado com sulfito. CA (6 FPU/g de bagaço), CM (3 FPU/g de bagaço) e CB (1,5 FPU/g de bagaço).

5.2. Produção de endoglucanases por *G. trabeum*

Foi realizado um estudo inicial de efeito de diferentes fontes de carbono na produção de endoglucanases por *G. trabeum*. Foram avaliadas as fontes de carbono: carboximetilcelulose (CMC), lactose, celulose avicel, bagaço de cana, além de combinações de algumas destas fontes de carbono. Os dados obtidos estão mostrados na Tabela 2 e nas Figuras 10 e 11. As atividades relativas de endoglucanases existentes em cada meio de cultivo foram determinadas por uma reação dos extratos com CMC por 10 min. A quantidade de açúcares redutores gerado por minuto foi estimada com base nesta reação em tempo fixo. Foi detectada atividade de endoglucanases em todos os meios de cultivos avaliados. Os maiores níveis de atividade foram detectados nos cultivos que empregaram CMC como fonte de carbono. Os dados da Tabela 2 indicam que a atividade máxima de endoglucanase obtida no meio com CMC como fonte de carbono foi cerca de 33-35 vezes maior do que as atividades máximas detectadas nos meios com Avicel e com bagaço de cana. As baixas atividades obtidas nos cultivos com Avicel e bagaço de cana podem ser explicadas pelo fato de ambos serem substratos de difícil assimilação que proporcionaram baixo crescimento do fungo (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999).

O bagaço de cana foi ainda combinado com as demais fontes de carbono a fim de verificar se a produção da enzima poderia ser aumentada. Como mostram os dados da Tabela 2, a combinação de bagaço de cana com lactose, CMC e lactose+CMC ocasionou uma produção de endoglucanases que não ultrapassou os níveis obtidos com CMC pura nos cultivos.

As curvas de produção de atividade de endoglucanase (Figuras 10 e 11) indicam que nos meios em que houve a combinação da fonte de carbono de fácil assimilação com o bagaço de cana, os níveis de atividade aumentaram até cerca de 17 dias de cultivo e não diminuíram de forma significativa após este período, sugerindo que os níveis de proteases nestes cultivos devem ter sido baixos mantendo as enzimas relativamente estáveis.

Tabela 2: Atividade máxima de endoglucanases detectada em cultivos de *G. trabeum* em diferentes meios de cultura.

Meio	Atividade relativa de endoglucanases* (μMol de açúcar redutor após 10 min de reação por L de extrato)	Dias de crescimento
Avicel	240	18
Bagaço de cana	250	25
Carboximetilcelulose	8610	21
Lactose	4420	10
Carboximetilcelulose + Bagaço de cana	7330	17
Lactose + Bagaço de cana	7420	17
Carboximetilcelulose + Lactose + Bagaço de cana	5340	17

(*) Medidas realizadas a partir de 1 frasco para cada tempo de cultivo avaliado. As determinações de atividade foram feitas em triplicata e a variação máxima observada foi de 2%.

Figura 10: Curva de produção de endoglucanase por *G. trabeum* utilizando fontes de carbono sem combinações. C (meio com CMC 20 g/L), L (meio com lactose 20 g/L), B (meio com bagaço de cana 40 g/L) e A (meio com avicel 20 g/L).

Figura 11: Curva de produção de endoglucanase por *G. trabeum* utilizando fontes de carbono combinadas. CB (meio com CMC 20 g/L e bagaço de cana 40 g/L), LB (meio com lactose 20 g/L e bagaço de cana 40 g/L), LBC (meio com lactose 10 g/L, bagaço de cana 40 g/L e CMC 10 g/L).

5.2.1. Caracterização das atividades de enzimas hidrolíticas nos extratos de cultivos de *G. trabeum* e em formulações de celulasas comerciais

Após a definição de um meio de cultivo adequado para produzir endoglucanases com o fungo *G. trabeum*, novos cultivos foram conduzidos a fim de gerar um volume de extrato que fosse suficiente (aproximadamente 200 mL) para a recuperação de endoglucanases a serem empregadas nos ensaios de hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado. Para isso, *G. trabeum* foi cultivado por 24 dias em 2% de CMC como fonte de carbono. A atividade de endoglucanases neste extrato bruto foi de 0,9 UI/mL. Este nível de atividade permite a realização dos ensaios de hidrólise enzimática pretendidos, desde que se empregue os ensaios em pequena escala previamente desenvolvidos. No entanto, um problema associado com as enzimas produzidas em meio que emprega CMC como fonte de carbono é que o CMC residual presente no meio de cultivo pode funcionar como um substrato para a ação das enzimas e pode, além de interferir na determinação das atividades (reação controle com elevado teor de açúcares redutores iniciais), também gerar produtos de hidrólise que inibem a ação de enzimas como as celobiohidrolases e as β -glicosidases. O CMC residual pode

ainda ser hidrolisado pelas enzimas celulolíticas durante os ensaios de hidrólise de substratos lignocelulósicos, o que levaria a um aumento artificial nos níveis de conversão de celulose nos experimentos de hidrólise. Desta forma, foi buscado um método de remoção do CMC residual presente nos extratos em estudo.

Para a remoção do CMC foram feitos testes com diversos sais que podem causar a sua precipitação. Os sais testados foram: sulfato de cobre (proporção de 2:1 (g de sal/g de CMC na amostra)), cloreto de bário (proporção 1:1 e 10:1) e cloreto de cálcio (proporção 1:1 e 10:1). Na Figura 12 pode-se observar que não ocorreu precipitação do CMC quando foi utilizado o cloreto de cálcio, enquanto que quando se utilizou os demais sais houve a precipitação do CMC em maior ou menor intensidade. As frações líquidas de cada um dos ensaios de precipitação foram analisadas quanto à atividade de endoglucanases. Foi possível observar que o sulfato de cobre, apesar de ter precipitado o CMC, inativou completamente as endoglucanases presentes no extrato. O cloreto de bário permitiu precipitar somente uma parte do CMC; quando a proporção deste sal foi aumentada, aumentou-se a precipitação do CMC, porém a maior parte da atividade da endoglucanase foi perdida (dados não mostrados). De uma forma geral, a estratégia de buscar a precipitação do CMC mantendo a enzima em solução e ativa se mostrou ineficaz.

Figura 12: Precipitação da CMC presente no extrato de cultivos de *G. trabeum* empregando diversos sais.

Uma segunda estratégia de purificação foi então desenvolvida visando precipitar a enzima com sulfato de amônio, buscando manter o CMC em solução. A abordagem experimental foi inicialmente feita com um extrato de um cultivo de 21 dias. O extrato bruto (30 mL) foi dividido em 2 frações de 15 mL e foram feitas precipitações com 40% e 80% da saturação de sulfato de amônio. O precipitado obtido em cada caso foi ressuspensão em água e ensaiado para a atividade de endoglucanases. Os dados obtidos estão mostrados na Tabela 3. Parte da atividade de endoglucanase inicial foi detectada nos dois precipitados, porém houve baixa recuperação de atividade nos dois casos. Entre as duas concentrações de sulfato de amônio testadas, aquela que permitiu recuperar a maior proporção da atividade de endoglucanase foi a de 80% da saturação. Além de permitir recuperar as endoglucanases, a precipitação com sulfato de amônio visou à separação entre enzima e CMC residual. Para confirmar se havia ou não CMC contaminando o precipitado proteico, o material redissolvido foi analisado quanto ao teor de açúcares totais pelo método do Fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O resultado do teste foi a ausência de coloração avermelhada no tubo de reação, indicando que não havia CMC no precipitado. Com base nos testes descritos anteriormente, optou-se por empregar a precipitação com sulfato de amônio a 80% da saturação para se recuperar as enzimas presentes no extrato enzimático, mesmo havendo perda expressiva de atividade, pois o precipitado se mostrou livre de CMC que era o objetivo principal da etapa de purificação em questão.

Tabela 3: Atividade de endoglucanases presentes em um extrato de cultivo de *G. trabeum* crescido por 21 dias em CMC 2% e em precipitados proteicos obtidos pela ação de sulfato de amônio a 40% e 80% da saturação sobre o extrato bruto.

Tratamentos	Atividade Total (UI)
Extrato Bruto	13,5
Precipitado c/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 40% de saturação	0,95
Precipitado c/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 80% de saturação	3,15

Num segundo grupo de experimentos de precipitação das proteínas presentes nos extratos brutos dos cultivos de *G. trabeum*, foram tratados 174 mL de extrato dos cultivos de 24 dias em CMC, conforme mostrado na Tabela 4. Após a etapa de precipitação com sulfato de amônio, o precipitado foi redissolvido em 25 mL de água e dessalinizado por ultrafiltração. Pode-se observar que o rendimento final de recuperação de endoglucanases foi baixo (cerca de 15%), corroborando os dados anteriores. A baixa recuperação da atividade de endoglucanase pode ser atribuída à precipitação incompleta das enzimas ou mesmo a inativação durante a precipitação. Entretanto, como o objetivo do trabalho era avaliar a eficiência das enzimas desse fungo na hidrólise do bagaço de cana e compará-la com a eficiência do coquetel comercial normalmente utilizado, foi dada sequência ao trabalho empregando a enzima recuperada, mesmo que com baixo rendimento.

Tabela 4: Monitoramento do teor de proteínas e da atividade de endoglucanases no processo experimental de purificação de extratos obtidos em cultivos de *G. trabeum* em 2% de CMC por 24 dias.

Etapas	Volume (mL)	Concentração de Proteínas (mg.mL ⁻¹)	Proteína total (mg)	Atividade Enzimática (UI.mL ⁻¹)	Atividade Total (UI)	Rendimento (%)	Atividade Específica (UI.mg ⁻¹)
Extrato Bruto	174	*nd	*nd	0,90±0,01	156,6	100	*nd
Precipitação c/ (NH ₄) ₂ SO ₄	25	*nd	*nd	0,98±0,04	24,5	16	*nd
Ultrafiltração	8	1,34	10,72	2,9±0,1	23,2	15	2,16

*nd: não determinado

O extrato concentrado foi então analisado quanto às atividades de FPAse e endoglucanases (CMCase) de acordo com a metodologia de Ghose (1987) e as atividades de β -glicosidases, xilanases, β -xilosidases e celobiohidrolases foram determinadas a partir da cinética de conversão de seus respectivos substratos. Cada tempo de reação foi analisado a partir de 3 repetições autênticas (3 tubos por experimento) e a compilação dos resultados está mostrada na Tabela 5. O Apêndice 2 contém os dados e gráficos que deram origem as atividades determinadas.

Tabela 5: Atividade de enzimas hidrolíticas presentes no extrato de *G. trabeum* cultivado em 2% de CMC por 24 dias, concentrado/purificado por precipitação com sulfato de amônio seguida de ultrafiltração.

	Enzimas hidrolíticas ensaiadas				
	CMCase	β -Glicosidase	Celobiohidrolase	Xilanase	β -Xilosidase
Atividade (UI.mL ⁻¹)	2,9±0,1	1,97±0,06	0,138±0,008	55,9±0,6	0,211±0,002

A Tabela 5 mostra que no extrato purificado houve a predominância de atividade de xilanases, seguida de CMCase e β -glicosidase. As atividades dos 3 grupos de enzimas celulolíticas foram detectadas no extrato, porém não foi possível detectar atividade de FPAse, visto que não foi possível atingir a conversão de 4% de papel de filtro em açúcares redutores num período de 60 min de reação (Ghose, 1987). A baixa capacidade de conversão de papel de filtro pode ser atribuída pela baixa atividade de celobiohidrolase, sugerindo a baixa capacidade do extrato para converter os oligossacarídeos gerados pelas endoglucanases em celobiose. A relação da atividade de endoglucanases com celobiohidrolases do extrato em estudo foi de 7,2, enquanto que para endoglucanases/beta-glicosidases foi de 1,47.

O extrato concentrado descrito na Tabela 5 foi utilizado como sistema enzimático complementar ao encontrado em enzimas comerciais para realizar a hidrólise dos polissacarídeos contidos no bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino. As enzimas comerciais utilizadas foram uma mistura de celulases de *Trichoderma reesei*, comercializada pela SIGMA sob número de catálogo C2730 e β -glicosidase de *Aspergillus niger*, comercializada pela SIGMA sob número de catálogo C6105. Um grupo de experimentos paralelos foi ainda realizado com a mistura das celulases comerciais SIGMA com endoglucanases de *Talaromyces emersonii*, comercializada pela MEGAZYME sob lote número 30602.

As atividades de FPAse, endoglucanases (CMCase), β -glicosidases, xilanases, β -xilosidases e celobiohidrolases foram determinadas também nestes extratos e a compilação dos resultados está mostrada na Tabela 6. O Apêndice 3 contém os dados e gráficos que deram origem as atividades determinadas.

Tabela 6: Atividade de enzimas hidrolíticas presentes em enzimas comerciais.

Preparações enzimáticas	Atividade (UI.mL ⁻¹) ou concentração de proteínas (mg.mL ⁻¹)						
	FPase	CMCase	β-Glicosidase	Celobiohidrolase	Xilanase	β-Xilosidase	Proteína
Sigma C2730 (Celluclast)	45±2	549±54	77±2	101±11	485±10	29,0±0,4	107±5
Sigma C6105 (Novozyme 188)	nd**	0,0 (29±3)*	752±2	nd**	2517±25	8,38±0,07	62±3
Endoglucanases <i>T. emersonii</i>	nm ⁺	60,6±1,9	nd**	nm ⁺	43,7±0,6	nm ⁺	6,8±0,3

(*) Valor de atividade medido pela metodologia de Tanaka et al., 1981.

nd*: não detectado no extrato diluído 100x

nm+: não foi medida

Com base nos dados da tabela 6 é possível calcular as relações endoglucanase:celobiohidrolase:beta-glicosidase na Celluclast como 7,3:1,3:1. Este preparado enzimático tem sido amplamente empregado em ensaios de hidrólise enzimática de substratos celulósicos, desde que suplementado com beta-glicosidase (RAMOS; FONTANA, 2004; TEWALT; SCHILLING, 2010). No caso do extrato concentrado preparado a partir dos cultivos de *G. trabeum* esta relação foi de 1,5:0,07:1, indicando que o extrato de *G. trabeum* deve ser considerado como um eventual suplemento de endoglucanases e beta-glicosidases na hidrólise, mas que como tal, pode não suprir a demanda necessária de celobiohidrolases para a hidrólise completa da celulose até glicose. Por outro lado, o extrato de *G. trabeum* contém uma atividade elevada de xilanases, correspondendo a uma relação xilanases/endoglucanases de 19:1, contra 0,9:1 observado na Celluclast. Este dado indica que o extrato de *G. trabeum* pode facilitar a hidrólise de xilana quando usado como suplemento da Celluclast, desde que as xilanases estejam em níveis limitantes na Celluclast. O preparado comercial de *T. emersonii*, como esperado, por ser uma preparação purificada, apresentou basicamente a atividade de endoglucanases, com uma atividade expressiva de xilanases.

Ainda com base nos dados da Tabela 6 foi possível determinar a relação de 1:12 para as atividades de FPAse/endoglucanases no extrato comercial Celluclast. Este dado é fundamental para o propósito do presente trabalho, visto que o uso das enzimas de *G. trabeum* e de *T. emersonii* em misturas com a Celluclast está baseado nas cargas de endoglucanases totais, visto que a atividade de FPAse nos dois últimos complexos enzimáticos não é detectável de acordo com a metodologia de Ghose (1987). Por exemplo, os experimentos de avaliação dos extratos fúngicos em estudo foram realizados tomando como base a atividade de endoglucanase total. Com isso, um ensaio tradicional de hidrólise enzimática onde se emprega 10 FPU/g de substrato, tem-se 120 UI de endoglucanase/g de substrato. No caso dos ensaios de hidrólise realizados em pequena escala (20mg de substrato, conforme descrito no item 5.1) são necessárias 0,2 FPU por tubo de reação ou 2,4 UI de endoglucanase por ensaio. Pode-se notar que o extrato concentrado recuperado dos cultivos de *G. trabeum* continha 8 mL com 2,87 UI/mL, correspondendo a um total de 23 UI de endoglucanases. Esta atividade enzimática total permite desenvolver até 9 ensaios de hidrólise enzimática em pequena escala empregando a carga máxima de celulasas (10 FPU/g), o que seria inviável nos ensaios com 1 g de substrato.

Cada uma das atividades enzimáticas medidas nas preparações em estudo foi feita para buscar manter um parâmetro fixo nos estudos subsequentes de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado. O valor que se buscou manter fixo foi o de endoglucanase.

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

Os substratos empregados nos estudos de hidrólise enzimática foram preparados em um trabalho desenvolvido pelo aluno de doutorado Omar Uyarte Noriega, sob orientação do Prof. André Ferraz. Foram preparados dois substratos distintos com o objetivo de se obter níveis diferentes de deslignificação e remoção de componentes durante a etapa de pré-tratamento. Um dos substratos foi obtido em um tratamento sulfito alcalino com carga elevada de reagentes (5g de NaOH e

10g de Na_2SO_3 para cada 100 g de bagaço tratado) que resulta em um material com baixo teor de lignina e de fácil hidrólise por celulasas comerciais (MENDES et al., 2011). O outro substrato foi preparado por um pré-tratamento mais ameno (carga baixa de sulfito alcalino de 2,5g de NaOH e 5g de Na_2SO_3 para cada 100 g de bagaço tratado) que gera um substrato mais recalcitrante devido ao maior teor de lignina e hemicelulose residuais. As características de cada um dos bagaços utilizados como substrato pode ser encontrada na Tabela 7. Após os processamentos quimiotermomecânicos se observa que a perda de xilana e glucana foi semelhante nos dois tratamentos. Já a perda de lignina no bagaço pré-tratado com carga alta de sulfito alcalino foi de aproximadamente 52%, enquanto que no tratamento com baixa carga de sulfito alcalino a perda de lignina foi de aproximadamente 26%. O substrato preparado pelo pré-tratamento mais ameno (baixa carga de sulfito alcalino) representa um material mais recalcitrante e com maior teor de lignina residual que deve ser mais difícil de hidrolisar com celulasas comerciais.

Tabela 7: Caracterização dos bagaços pré-tratados com carga alta de sulfito (5,0g de NaOH e 10g de Na_2SO_3 para cada 100 g de bagaço tratado) e baixa de sulfito (2,5g de NaOH e 5g de Na_2SO_3 para cada 100 g de bagaço tratado).

Amostras	Na_2SO_3 (g/100 g de bagaço)	NaOH (g/100 g de bagaço)	CFS (mL) 250 Wh	Rendimento (g/100 g de bagaço)	Composição de bagaço (g/100 g em base polpa)			Composição de bagaço (g/100 g de bagaço original)		
					Lignina	Xilana	Glucana	Lignina	Xilana	Glucana
não tratado	0	0	nd*	100	24,0 ± 0,1	26,0 ± 1,0	42,0 ± 2,0	24,0 ± 0,1	26,0 ± 1,0	42,0 ± 2,0
Carga Baixa	5	2,5	330	83,2	21,2 ± 0,4	20,1 ± 0,8	47,5 ± 1,9	17,7 ± 0,3	16,7 ± 0,6	39,5 ± 1,6
Carga Alta	10	5	120	74,9	14,7 ± 0,5	20,3 ± 0,1	54,7 ± 0,6	11,6 ± 0,4	16,0 ± 0,1	40,7 ± 0,4

*nd: não determinado

A conversão de celulose e xilana destes substratos foi inicialmente avaliada em reações de hidrólise empregando celulasas comerciais de *T. reesei* (SIGMA-Celluclast) complementadas com beta-glicosidases de *A. niger* (SIGMA-Novozym188). Os ensaios foram feitos com 3 cargas de enzimas: a) 10FPU e 15 UI de β -glicosidases Novozyme 188 por grama de substrato que foi denominada de carga total ou de 100%, b) 50% da carga total e c) 25% da total. A compilação das atividades enzimáticas hidrolíticas presentes nos ensaios em questão está mostrada na Tabela 8 e serve como uma referência para a interpretação dos

dados obtidos (Figura 13). A Tabela 9 compila os dados de conversão após 72 h de reação e as velocidades iniciais de hidrólise medidas após 4 h de reação.

Figura 13: Conversão de celulose e de xilana durante o tratamento de bagaço de cana (pré-tratado com carga alta e carga baixa de sulfito alcalino) com uma mistura de enzimas comerciais (Celluclast e Novozyme 188).

Tabela 8: Atividade de enzimas hidrolíticas presentes em cada ensaio (eppendorf) de hidrólise em pequena escala do bagaço de cana.

Carga enzimática	FPAse (UI.mL ⁻¹)	CMCase (UI.mL ⁻¹)	β-Glicosidase (UI.mL ⁻¹)	Celobiohidrolase (UI.mL ⁻¹)	Xilanase (UI.mL ⁻¹)	β-Xilosidase (UI.mL ⁻¹)	Proteína (mg.mL ⁻¹)
Alta	0,2	2,4	0,64	0,44	3,2	0,13	0,50
Média	0,1	1,2	0,32	0,22	1,6	0,07	0,25
Baixa	0,05	0,6	0,16	0,11	0,8	0,03	0,12

Tabela 9: Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino: Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação quando o sistema hidrolítico era um mistura de enzimas comerciais (Celluclast e Novozyme 188).

TRATAMENTOS COM CELLUCLAST*	BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM 5g DE NaOH E 10g DE Na ₂ SO ₃				BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM 2,5g DE NaOH E 5g DE Na ₂ SO ₃			
	CONVERSÃO DE CELULOSE		CONVERSÃO DE XILANA		CONVERSÃO DE CELULOSE		CONVERSÃO DE XILANA	
	Velocidade Inicial (%.h ⁻¹)	Eficiência em 72hs (%)	Velocidade Inicial (%.h ⁻¹)	Eficiência em 72hs (%)	Velocidade Inicial (%.h ⁻¹)	Eficiência em 72hs (%)	Velocidade Inicial (%.h ⁻¹)	Eficiência em 72hs (%)
Carga 100%	11,1 ± 0,4	82 ± 2	9,9 ± 0,4	86 ± 2	7,6 ± 0,4	48 ± 2	5,4 ± 0,3	45 ± 1
Carga 50%	7,3 ± 0,2	75 ± 1	6,6 ± 0,2	74 ± 1	6,0 ± 0,4	45 ± 4	4,0 ± 0,2	40 ± 3
Carga 25%	4,3 ± 0,3	65 ± 1	4,0 ± 0,3	64 ± 1	3,8 ± 0,3	37 ± 1	2,5 ± 0,3	30 ± 1

* Os ensaios com Celluclast foram complementados com β-glicosidases conforme descrito no item 4.8.3, sendo que a carga de β-glicosidases foi diminuída proporcionalmente com a carga de Celluclast.

Os dados indicam que mesmo a menor carga de enzimas usada (2,5FPU/g) na hidrólise de bagaço pré-tratado com carga alta de sulfito alcalino proporcionou maiores conversões de celulose e hemicelulose do que as conversões obtidas com a maior carga de enzimas (10 FPU/g) aplicadas no substrato pré-tratado com baixa carga de sulfito alcalino. Este dado é um indicativo de que o pré-tratamento com maior carga de sulfito alcalino permite uma melhoria notável nos níveis de conversão de polissacarídeos devido principalmente à remoção de lignina do material original, gerando um substrato mais poroso e desestruturado que também deve ocasionar menor adsorção improdutiva das enzimas sobre a lignina residual, corroborando um trabalho prévio desenvolvido em nosso próprio grupo de pesquisas (MENDES et al., 2011). A maior conversão de celulose em glicose obtida para os experimentos com bagaço pré-tratado com carga alta de sulfito alcalino foi de 82% e de xilana em xilose foi de 86%, ambas atingidas já nas primeiras 48 horas de hidrólise com 10 FPU/g de substrato. Já para o bagaço pré-tratado com carga baixa de sulfito alcalino, a conversão de celulose foi de 48% e conversão de xilana foi de 45% obtidas somente após 72 horas de hidrólise com a maior carga de enzimas aplicada (10 FPU/g).

Avaliando os efeitos de carga enzimática nas hidrólises de celulose em um mesmo substrato (Figura 13) pode-se notar que ao reduzir a carga de enzimas à metade e a 25% do valor máximo, a eficiência de hidrólise após 72h diminuiu, respectivamente, de 82% para 75% e 65% nos ensaios com o bagaço pré-tratado com elevada carga de sulfito alcalino. No caso do bagaço pré-tratado com baixa carga de sulfito alcalino, estes valores foram de 48%, 45% e 37%, respectivamente. A conversão de xilana seguiu uma tendência similar à observada para a conversão da celulose. Duas observações são pertinentes a partir destes dados. A primeira indica que a diminuição da carga total de enzima nos ensaios não gera uma diminuição proporcional nos níveis de conversão dos polissacarídeos. Isso sugere que, dependendo das especificidades de um processo de hidrólise, tais como custo de enzimas, possibilidade de reciclagem e tempo de reação, é possível ponderar qual seria um nível de hidrólise desejável em função de outras variáveis. Por exemplo, a conversão de 65% da celulose presente no bagaço pré-tratado com elevada carga de sulfito alcalino pode ser obtida com 12 h, 24 h ou 72 h de reação se as cargas de enzimas comerciais forem respectivamente 10 FPU/g, 5 FPU/g e 2,5 FPU g. A outra observação é que a diminuição de carga de enzimas a 25% da carga máxima ocasionou maior perda de eficiência na hidrólise dos dois substratos, indicando que, neste nível de carga enzimática, algumas das atividades envolvidas passam efetivamente a ser limitante para que o processo de conversão chegue à glicose e xilose.

A comparação da eficiência das hidrólises dos bagaços pré-tratados em estudo com dados reportados por Rezende et al. (2011) com bagaço de cana pré-tratado em dois passos (primeiro um pré-tratamento ácido com H_2SO_4 1% e depois uma deslignificação alcalina com NaOH 1%) mostram que a eficiência de conversão de celulose obtida pelos autores utilizando 25 FPU e 50 UI de β -glicosidase por grama de bagaço foi de 72,4%, após 48h de hidrólise, valores similares aos encontrados no presente trabalho empregando menos do que a metade da carga enzimática. Resultados obtidos por Zhao, Wang e Liu (2007) após o pré-tratamento do bagaço de cana com ácido peracético na melhor condição encontrada (carga de 50% de ácido peracético, na proporção líquido/sólido de 6:1, temperatura de 80 °C e tempo de reação de 2 horas)

indicaram uma conversão, após 72 horas de hidrólise, de 80% da celulose em glicose utilizando uma carga de 20 FPU/g de celulose. A mesma amostra quando pré-tratada sob as mesmas condições com ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio proporcionou resultados de conversão inferiores.

Outro fator importante a ser analisado nas reações de hidrólise em estudo é a velocidade inicial de conversão, pois a velocidade inicial pode indicar uma situação de hidrólise onde ainda não há inibição pelos produtos e também há uma disponibilidade plena de enzimas hidrolíticas no meio reacional. Utilizando-se como substrato o bagaço pré-tratado com carga alta de sulfito alcalino, as velocidades iniciais de hidrólise da celulose calculadas nas primeiras 4 horas foram de $11,1\% \cdot h^{-1}$, $7,3\% \cdot h^{-1}$ e $4,3\% \cdot h^{-1}$ para os ensaios com 100% (CA), 50% (CM) e 25% (CB) de carga enzimática, respectivamente. Já as velocidades iniciais de hidrólise da xilana foram inferiores às de celulose, atingindo $9,9\% \cdot h^{-1}$, $6,6\% \cdot h^{-1}$ e $4,0\% \cdot h^{-1}$ para os ensaios com CA, CM e CB, respectivamente. Quando se utilizou como substrato o bagaço pré-tratado com baixa carga de sulfito alcalino, valores de velocidades iniciais inferiores foram encontrados tanto para a hidrólise de celulose quanto de xilana. Para esse substrato as velocidades iniciais de hidrólise da celulose foram de $7,6\% \cdot h^{-1}$, $6,0\% \cdot h^{-1}$ e $3,8\% \cdot h^{-1}$ para os ensaios com CA, CM e CB de carga enzimática, respectivamente, enquanto que as velocidades iniciais de hidrólise da xilana foram de $5,4\% \cdot h^{-1}$, $4,0\% \cdot h^{-1}$ e $2,5\% \cdot h^{-1}$ para as mesmas cargas enzimáticas. Esses resultados demonstram que assim como as eficiências finais de conversão, as velocidades iniciais de hidrólise diminuem com a diminuição da carga das enzimas (Tabela 9).

5.3.1. Ensaio de hidrólise enzimática com reposição da carga de endoglucanases no meio reacional a partir de extratos de *G. trabeum* e *T. emersonii*

O embasamento inicial do presente trabalho considerou que o complexo hidrolítico de fungos de decomposição parda seria mais adequado para a hidrólise de substratos ricos em lignina do que os preparados comerciais de *T. reesei*, amplamente usados atualmente. Para validar ou refutar esta hipótese, avaliamos

o extrato de cultivos de *G. trabeum* e também um preparado comercial contendo majoritariamente endoglucanases produzidas pelo ascomiceto *T. emersonii*. Trata-se de um ascomiceto e não um fungo de decomposição parda, mas suas endoglucanases foram escolhidas para serem avaliadas neste estudo, pois eram disponíveis comercialmente na forma purificada e também são produzidas por uma espécie de fungo que foi originalmente isolada de um habitat onde prevaleciam cavacos de madeira como fonte de carbono; um ambiente incomum para o crescimento de ascomicetos e ao mesmo tempo propício para os fungos que produzem sistemas hidrolíticos eficientes para degradar celulose, mesmo na presença de lignina (GOMES et al., 2008; MCHALE; COUGHLAN, 1980; MCHALE; COUGHLAN, 1981)

5.3.1.1. Endoglucanases de *G. trabeum*

A eficiência de conversão de celulose e xilana nos bagaços de cana pré-tratados também foi avaliada em ensaios onde parte da atividade de endoglucanases presentes na Celluclast foi substituída com endoglucanases presentes no extrato de cultivos de *G. trabeum*. Os dados obtidos estão mostrados na Figura 14. A Tabela 10 mostra as atividades enzimáticas presentes em cada experimento a fim de permitir uma visualização imediata das cargas de enzima em cada caso. A Tabela 11 compila os dados de conversão enzimática dos polissacarídeos após 72 h de reação, bem como a velocidade inicial de reação em cada caso. As eficiências e velocidades de hidrólise obtidas em cada sistema foram comparadas a partir dos valores médios e os respectivos desvios padrão empregando o teste de Tukey com significância de 99% (Apêndice 4). Os dados discutidos no texto como significativamente diferentes são aqueles em que o teste de Tukey indicou um valor de $p < 0,01$.

Considerando que a mistura de extratos enzimáticos complexos (presença de uma grande diversidade de atividades enzimáticas) em um experimento de hidrólise pode ser avaliada por diferentes aspectos, buscamos delinear a

interpretação dos resultados considerando sempre a eficiência de hidrólise do sistema que emprega a mistura Celluclast+Novozyme 188 como referência.

Figura 14: Conversão de celulose e de xilana durante o tratamento de bagaço de cana (pré-tratado com carga alta e carga baixa de sulfito alcalino) com uma mistura de enzimas comerciais (Celluclast e Novozyme 188) com um extrato de cultivo de *G. trabeum*.

Tabela 10: Enzimas hidrolíticas presentes no ensaio de hidrólise em pequena escala com as preparações comerciais suplementadas com um extrato de cultivo de *G. trabeum*.

Preparações	Atividade (UI.mL ⁻¹) ou concentração de proteínas (mg.mL ⁻¹)						
	FPase	CMCase	β-Glicosidase	Celobiohidrolase	Xilanase	β-Xilosidase	Proteínas
*Celluclast 100%	0,2	2,4	0,6	0,44	3,2	0,13	0,50
*Celluclast 50%	0,1	1,2	0,3	0,22	1,6	0,07	0,25
*Celluclast 25%	0,05	0,6	0,16	0,11	0,8	0,04	0,13
50% <i>G. trabeum</i> + 50% *Celluclast	-	2,4	1,2	0,28	25,0	0,16	0,81
25% <i>G. trabeum</i> + 25% *Celluclast	-	1,2	0,6	0,14	12,5	0,08	0,40

* Os ensaios com Celluclast foram complementados com β-glicosidases conforme descrito no item 4.8.3, sendo que a carga de β-glicosidases foi diminuída proporcionalmente com a carga de Celluclast.

Tabela 11: Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino: Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação quando o sistema hidrolítico era um mistura de enzimas comerciais (Celluclast e Novozyme 188) suplementada com um extrato de cultivo de *G. trabeum*.

TRATAMENTOS	BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM 5g DE NaOH E 10g DE Na ₂ SO ₃				BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM 2,5g DE NaOH E 5g DE Na ₂ SO ₃			
	CONVERSÃO DE CELULOSE		CONVERSÃO DE XILANA		CONVERSÃO DE CELULOSE		CONVERSÃO DE XILANA	
	Velocidade Inicial (%·h ⁻¹)	Eficiência em 72hs (%)	Velocidade Inicial (%·h ⁻¹)	Eficiência em 72hs (%)	Velocidade Inicial (%·h ⁻¹)	Eficiência em 72hs (%)	Velocidade Inicial (%·h ⁻¹)	Eficiência em 72hs (%)
*Celluclast 100%	11,1 ± 0,4	82 ± 2	9,9 ± 0,4	86 ± 2	7,6 ± 0,4	48 ± 2	5,4 ± 0,3	45 ± 1
*Celluclast 50%	7,3 ± 0,2	75 ± 1	6,6 ± 0,2	74 ± 1	6,0 ± 0,4	45 ± 4	4,0 ± 0,2	40 ± 3
*Celluclast 25%	4,3 ± 0,3	65 ± 1	4,0 ± 0,3	64 ± 1	3,8 ± 0,3	37 ± 1	2,5 ± 0,3	30 ± 1
<i>G. trabeum</i> 50% + *Celluclast 50%	11,5 ± 0,3	87 ± 2	11,2 ± 0,4	94 ± 3	8,0 ± 0,04	53 ± 1	6,4 ± 0,2	47 ± 3
<i>G. trabeum</i> 25% + *Celluclast 25%	7,4 ± 0,2	80 ± 2	7,7 ± 0,2	89 ± 3	5,4 ± 0,1	45 ± 2	4,1 ± 0,1	42 ± 6

* Os ensaios com Celluclast foram complementados com β-glicosidases conforme descrito no item 4.8.3, sendo que a carga de β-glicosidases foi diminuída proporcionalmente com a carga de Celluclast.

Hidrólise do substrato de baixa recalcitrância (bagaço pré-tratado com alta carga de sulfito alcalino)

No ensaio onde a carga de endoglucanases foi dividida entre 50% de Celluclast e 50% de extrato de *G. trabeum*, as cargas de endoglucanase, celobiohidrolase e β-glicosidase eram de 2,4:0,28:1,15 (expressas em UI/mL de meio reacional). Por outro lado, no ensaio de referência com 100% de Celluclast, as atividades das mesmas enzimas eram de 2,4:0,44:0,64. Comparando as cargas enzimáticas celulolíticas dos dois experimentos, podemos notar que se empregou a mesma atividade final de endoglucanase e que nos ensaios com o extrato de *G. trabeum* havia uma menor carga de celobiohidrolases e maior carga de beta-glicosidases. Nestas condições, as conversões de celulose após 72h de reação foram de 87% no sistema com extrato de *G. trabeum* e 82% no extrato

com 100% de Celluclast. A comparação dos dados de hidrólise de celulose mostra que ao utilizar 50% da carga de endoglucanases provenientes do extrato de *G. trabeum* obtiveram-se resultados estatisticamente semelhantes para a eficiência de hidrólise, mesmo numa situação em que a atividade de celobiohidrolase foi diminuída de 0,44UI/mL para 0,28 UI/mL. Este tipo de efeito também foi notado nos ensaios em que havia menores cargas totais de enzimas, pois quando a atividade de endoglucanases foi de 1,2 UI/mL (50% da carga máxima), a hidrólise de celulose no ensaio que empregava somente Celluclast proporcionou 75% de conversão da celulose após 72 h de reação, enquanto que no ensaio similar, porém com atividade de endoglucanases dividida entre aquela proveniente de Celluclast e do extrato de *G. trabeum*, a conversão de celulose foi de 80%.

A hidrólise de xilana nos dois grupos de experimentos mencionados anteriormente mostrou que houve maior conversão de xilana quando se empregou as misturas enzimáticas que continham os extratos de *G. trabeum*. Um resultado interessante obtido com a suplementação da preparação de Celluclast com *G. trabeum* é que quando a preparação de Celluclast 25% foi suplementada com 25% de endoglucanases de *G. trabeum* foram alcançados, tanto para conversão de celulose quanto de xilana, valores estatisticamente semelhantes aos obtidos com a carga de 100% da preparação de Celluclast sem suplementação (Figura 14 e Tabela 11).

As velocidades iniciais de hidrólise de celulose nos experimentos que empregaram 100% de Celluclast e naqueles onde a atividade de endoglucanase foi dividida entre 50% de Celluclast e 50% do extrato de *G. trabeum* foram estatisticamente iguais, sugerindo que a diferença de desempenho dos dois meios reacionais surgiu ao longo da reação e não no início. Isso poderia sugerir que a mistura de *G. trabeum* era menos sujeita aos processos de adsorção improdutiva das celulasas. No caso da hidrólise de xilana nas mesmas reações, pode-se notar que as velocidades iniciais obtidas pelas preparações que continham o extrato de *G. trabeum* foram ligeiramente superiores às aquelas observadas com 100% de Celluclast. Isso poderia ser explicado pela maior atividade de xilanases no sistema que continha o extrato de *G. trabeum*.

Quando se busca explicar a eficiência de hidrólise de celulose nos sistemas em que havia a presença de extrato de *G. trabeum*, mesmo havendo uma baixa atividade de celobiohidrolases, é possível considerar que neste extrato havia endoglucanases diferenciadas como é o caso das endoglucanases processivas. Essas enzimas podem hidrolisar a celulose até celobiose, exercendo funções de endoglucanase e celobiohidrolase conjuntamente (ZHENG; DING, 2013). A elevada carga de beta-glicosidases presente no extrato de *G. trabeum* também poderia auxiliar na hidrólise (remoção) de celobiose, minimizando a inibição das endoglucanases processivas por celobiose. A presença de endoglucanases processivas em *G. trabeum* já foi detectada nos estudos feitos por Cohen, Suzuki e Hammel (2005). Estes autores denominaram essa enzima de Cel5A e identificaram que ela pertence à família das glicosil hidrolases 5 (GH5). A presença de uma endoglucanase processiva também foi detectada nos estudos de Zheng e Ding (2013) avaliando o fungo de decomposição branca *Volvariella volvacea*. Neste caso a enzima foi denominada EG 1, pois possuía um módulo de ligação à celulose (CBM1).

Outra possível explicação para taxas elevadas de conversão de polissacarídeos encontradas nos experimentos que empregaram Celluclast suplementada com extrato de *G. trabeum* seria a concentração elevada de proteínas presente no ensaio. Esse fator é importante, pois as proteínas podem diminuir a adsorção improdutiva das celulases na lignina durante a hidrólise, visto que as proteínas do extrato que não tem ação hidrolítica podem se adsorver na lignina evitando que as celulases sejam adsorvidas e percam a função hidrolítica.

Hidrólise do substrato de elevada recalcitrância (bagaço pré-tratado com baixa carga de sulfito alcalino)

Para o bagaço pré-tratado com carga baixa de sulfito alcalino, as conversões de celulose e xilana obtidas com os meios reacionais que continham 50% da atividade de endoglucanases provenientes do extrato de *G. trabeum* foram ligeiramente superiores às aquelas obtidas pelas reações com 100% de

Celluclast. Esses dados corroboram com a idéia, já mencionada, da presença de endoglucanases processivas que degradam eficientemente a celulose

5.3.1.2 Endoglucanases de *T. emersonii*

Uma forma de avaliar o papel das endoglucanases na hidrólise dos substratos em estudo é empregar enzimas purificadas. Optou-se por empregar endocelulases de *T. emersonii*, pois este fungo, conforme descrito anteriormente, é oriundo de um habitat onde prevalecem substratos lignocelulósicos e hipoteticamente, as enzimas em questão estariam menos sujeitas a problemas de adsorção improdutiva sobre lignina. Para comparar a eficiência de conversão de celulose e xilana das enzimas do extrato de *T. emersonii* foram feitos dois experimentos similares aos descritos anteriormente para o extrato de *G. trabeum*. Parte da atividade de endoglucanases presentes na Celluclast (50 e 25%) foi substituída por endoglucanases de *T. emersonii*. As hidrólises foram realizadas tanto com o bagaço pré-tratado com carga alta de sulfito alcalino (5g de NaOH e 10g de Na₂SO₃) quanto com o bagaço pré-tratado com carga baixa de sulfito alcalino (2,5g de NaOH e 5g de Na₂SO₃). Os dados obtidos estão mostrados na Figura 15. A Tabela 12 mostra as atividades enzimáticas presentes em cada experimento a fim de permitir uma visualização imediata das cargas de enzima em cada caso. A Tabela 13 compila os dados de conversão enzimática dos polissacarídeos após 72 h de reação, bem como a velocidade inicial de reação em cada caso. As análises estatísticas comparando os experimentos encontram-se no Apêndice 5.

Figura 15: Conversão de celulose e de xilana durante o tratamento de bagaço de cana (pré-tratado com carga alta e carga baixa de sulfito alcalino) com uma mistura de enzimas comerciais (Celluclast e Novozyme 188) suplementadas com endoglucanases de *T. emersonii*.

Tabela 12: Enzimas hidrolíticas presentes no ensaio de hidrólise em pequena escala com as preparações comerciais suplementadas com extrato de *T. emersonii*.

Preparações	Atividade (UI.mL ⁻¹) ou concentração de proteínas (mg.mL ⁻¹)						Proteínas
	FPase	CMCase	β-Glicosidase	Celobiohidrolase	Xilanase	β-Xilosidase	
*Celluclast 100%	0,2	2,4	0,64	0,44	3,2	0,13	0,50
*Celluclast 50%	0,1	1,2	0,32	0,22	1,6	0,07	0,25
*Celluclast 25%	0,05	0,6	0,16	0,11	0,8	0,04	0,13
50% <i>T. emersonii</i> + 50% *Celluclast	-	2,4	0,32	0,22	2,4	0,07	0,38
25% <i>T. emersonii</i> + 25% *Celluclast	-	1,2	0,16	0,11	1,2	0,03	0,19

* Os ensaios com Celluclast foram complementados com β-glicosidases conforme descrito no item 4.7.3, sendo que a carga de β-glicosidases foi diminuída proporcionalmente com a carga de Celluclast.

Tabela 13: Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino: Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação quando o sistema hidrolítico era um mistura de enzimas comerciais (Celluclast e Novozyme 188) suplementada com endoglucanases de *T. emersonii*.

TRATAMENTOS	BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM 5g DE NaOH E 10g DE Na ₂ SO ₃				BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM 2,5g DE NaOH E 5g DE Na ₂ SO ₃			
	CONVERSÃO DE CELULOSE		CONVERSÃO DE XILANA		CONVERSÃO DE CELULOSE		CONVERSÃO DE XILANA	
	Velocidade Inicial (%·h ⁻¹)	Eficiência em 72hs (%)	Velocidade Inicial (%·h ⁻¹)	Eficiência em 72hs (%)	Velocidade Inicial (%·h ⁻¹)	Eficiência em 72hs (%)	Velocidade Inicial (%·h ⁻¹)	Eficiência em 72hs (%)
*Celluclast 100%	11,1 ± 0,4	82 ± 2	9,9 ± 0,4	86 ± 2	7,6 ± 0,4	48 ± 2	5,4 ± 0,3	45 ± 1
*Celluclast 50%	7,3 ± 0,2	75 ± 1	6,6 ± 0,2	74 ± 1	6,0 ± 0,4	45 ± 4	4,0 ± 0,2	40 ± 3
*Celluclast 25%	4,3 ± 0,3	65 ± 1	4,0 ± 0,3	64 ± 1	3,8 ± 0,3	37 ± 1	2,5 ± 0,3	30 ± 1
<i>T. emersonii</i> 50% + *Celluclast 50%	9,2 ± 0,3	74 ± 3	6,6 ± 0,2	75 ± 3	6,4 ± 0,4	42 ± 2	4,0 ± 0,4	37 ± 2
<i>T. emersonii</i> 25% + *Celluclast 25%	5,2 ± 0,3	69 ± 6	3,5 ± 0,1	64 ± 6	4,5 ± 0,1	37 ± 2	2,6 ± 0,1	20 ± 1

* Os ensaios com Celluclast foram complementados com β-glicosidasases conforme descrito no item 4.8.3, sendo que a carga de β-glicosidasases foi diminuída proporcionalmente com a carga de Celluclast.

Para as reações de hidrólise do substrato de baixa recalcitrância (bagaço pré-tratado com alta carga de sulfito alcalino), é possível destacar que as conversões máximas de celulose obtidas com 1,2 UI/mL de endoglucanases no meio reacional que continha somente Celluclast (50 % da carga máxima de Celluclast) e 2,4UI/mL de endoglucanases, sendo 50% de Celluclast e 50% de *T. emersonii*, não apresentaram diferenças significativas. Quando a carga de endoglucanases no meio reacional foi reduzida para 25% da carga máxima de Celluclast (0,6 UI/mL), também não houve diferença significativa nas eficiências de hidrólise nos sistemas que empregavam somente Celluclast e Celluclast suplementada com 0,6UI/mL de endoglucanases de *T. emersonii*. Com relação à hidrólise de xilana também não se observou diferenças nas eficiências de hidrólise. Quando se utilizou o substrato de alta recalcitrância também não foram encontradas diferenças significativas entre os valores de eficiência final de hidrólise e velocidades iniciais tanto para a conversão de celulose quanto de xilana.

As cargas de endoglucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase (expressas em UI/mL de meio reacional) no ensaio com 100% de Celluclast eram de 2,4:0,44:0,64. No ensaio com a mesma carga de endoglucanases dividida entre 50% de Celluclast e 50% de *T. emersonii*, estas atividades eram de 2,4:0,22:0,32. Os dados mostram que a manutenção de uma carga elevada somente de endoglucanases (2,4 UI/mL) afetou negativamente a eficiência de hidrólise, visto que a conversão de celulose diminuiu de 82% no primeiro caso para 74% no segundo. A comparação dos dados de hidrólise obtidos com cargas totais de enzimas menores mostra ainda que a eficiência de hidrólise de celulose no ensaio com 50% da carga de endoglucanases provenientes de *T. emersonii* foi a mesma que aquela obtida no ensaio com 50% da carga inicial de Celluclast não suplementada, indicando que a adição de endoglucanases de *T. emersonii* não acarretou em nenhum aumento de eficiência de hidrólise da celulose. Os dados com a carga de 25% de Celluclast também mostram a mesma tendência.

Além das enzimas já citadas, que são fundamentais na hidrólise de celulose, observa-se também pela Tabela 12 que outras enzimas têm suas cargas diminuídas, como as xilanases e as β -xilosidases que são muito importantes na hidrólise da xilana. A falta dessas enzimas no extrato suplementado parece ter refletido diretamente na eficiência de conversão do substrato, pois nos ensaios com endoglucanases de *T. emersonii* foi detectado o acúmulo de celobiose ou outros oligossacarídeos correspondendo a aproximadamente 10% da celulose inicial nas primeiras 24 h de reação dos ensaios em que se empregou o substrato de baixa recalcitrância.

Analisando os valores encontrados de velocidades iniciais, Tabela 13, percebe-se que a velocidade inicial de hidrólise da celulose obtida na reação com a preparação de Celluclast suplementada com 50% de endoglucanases de *T. emersonii* é inferior à preparação de Celluclast com a mesma carga de endoglucanase sem suplementação e é superior à velocidade encontrada para a preparação de Celluclast sem suplementação e com 50% da carga de endoglucanase, o que demonstra que durante as horas iniciais da hidrólise a principal enzima envolvida na conversão de celulose é a endoglucanase, uma vez que a diferença entre as quantidades de endoglucanase alterou a velocidade

inicial da reação. Além disso, a ausência de celobiohidrolase no extrato de *T. emersonii* impediu que a conversão do substrato fosse tão eficiente quanto à preparação sem suplementação, uma vez que mesmo ao repor as quantidades de endoglucanases a conversão alcançada não foi igual e a velocidade inicial consequentemente também foi menor.

5.3.2. Adição de proteínas sem atividade enzimática nos ensaios de hidrólise

Para analisar se a concentração de proteínas é um fator que interfere nas taxas de conversão de celulose e xilana foram feitos testes de hidrólise utilizando as preparações comerciais de Celluclast+Novozyme suplementadas com albumina sérica bovina (BSA). Foram utilizadas as enzimas comerciais nas cargas de 100% (10FPU/g) e 50% (5FPU/g) suplementadas com 0,314 e 0,157 mg.mL⁻¹ de BSA, respectivamente. A adição de BSA foi feita para igualar a carga proteica dos ensaios em que houve suplementação com o extrato de *G. trabeum*. Os dados obtidos estão mostrados na Figura 16 e a Tabela 14 compila as concentrações de enzimas e proteínas presentes nos meios reacionais.

Figura 16: Conversão de celulose e de xilana durante o tratamento de bagaço de cana (pré-tratado com carga alta e carga baixa de sulfito alcalino) com uma mistura de enzimas comerciais (Celluclast e Novozyme 188) suplementadas com albumina.

Tabela 14: Enzimas hidrolíticas presentes no ensaio de hidrólise em pequena escala com as preparações comerciais suplementadas com albumina sérica bovina (BSA).

	FPase (FPU.mL ⁻¹)	CMCase (UI.mL ⁻¹)	β- Glicosidase (UI.mL ⁻¹)	Celobiohidrolase (UI.mL ⁻¹)	Xilanase (UI.mL ⁻¹)	β- Xilosidase (UI.mL ⁻¹)	Proteína (mg.mL ⁻¹)
*Celluclast 100%	0,2	2,4	0,64	0,44	3,2	0,13	0,50
*Celluclast 50%	0,1	1,2	0,32	0,22	1,6	0,07	0,25
*Celluclast 100% + BSA	0,2	2,4	0,64	0,44	3,2	0,13	0,81
*Celluclast 50% + BSA	0,1	1,2	0,32	0,22	1,6	0,07	0,41

* Os ensaios com Celluclast foram complementados com β-glicosidasas conforme descrito no item 4.8.3, sendo que a carga de β-glicosidasas foi diminuída proporcionalmente com a carga de Celluclast.

Tabela 15: Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino: Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação quando o sistema hidrolítico era um mistura de enzimas comerciais (Celluclast e Novozyme 188) suplementada com albumina.

TRATAMENTOS	BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM 5g DE NaOH E 10g DE Na ₂ SO ₃				BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM 2,5g DE NaOH E 5g DE Na ₂ SO ₃			
	CONVERSÃO DE CELULOSE		CONVERSÃO DE XILANA		CONVERSÃO DE CELULOSE		CONVERSÃO DE XILANA	
	Velocidade Inicial (%.h ⁻¹)	Eficiência em 72hs (%)	Velocidade Inicial (%.h ⁻¹)	Eficiência em 72hs (%)	Velocidade Inicial (%.h ⁻¹)	Eficiência em 72hs (%)	Velocidade Inicial (%.h ⁻¹)	Eficiência em 72hs (%)
*Celluclast 100%	11,1 ± 0,4	82 ± 2	9,9 ± 0,4	86 ± 2	7,6 ± 0,4	48 ± 2	5,4 ± 0,3	45 ± 1
*Celluclast 50%	7,3 ± 0,2	75 ± 1	6,6 ± 0,2	74 ± 1	6,0 ± 0,4	45 ± 4	4,0 ± 0,2	40 ± 3
*Celluclast c/ albumina 100%	10,6 ± 0,5	86 ± 3	9,6 ± 0,5	98 ± 6	7,9 ± 0,03	58 ± 1	5,9 ± 0,02	57 ± 1
*Celluclast c/ albumina 50%	7,3 ± 0,1	81 ± 2	6,7 ± 0,2	83 ± 2	6,5 ± 0,2	53 ± 2	4,6 ± 0,2	48 ± 2

* Os ensaios com Celluclast foram complementados com β-glicosidases conforme descrito no item 4.8.3, sendo que a carga de β-glicosidases foi diminuída proporcionalmente com a carga de Celluclast.

A análise da Figura 16 mostra que as cinéticas de conversão de celulose e xilana dos sistemas hidrolíticos com Celluclast, sem suplementação e com suplementação de albumina, são similares até 48 horas de reação utilizando como substrato o bagaço de baixa recalcitrância. Entretanto, para o bagaço com alta recalcitrância, as curvas se mantiveram similares durante as primeiras 8 horas. Após 8 horas de hidrólise observa-se que a adição de albumina proporciona um incremento na conversão de celulose e xilana dos sistemas suplementados em comparação aos não suplementados, indicando que a adição de albumina foi importante para diminuir a adsorção improdutiva das enzimas, que é um fator que interfere no rendimento da hidrólise. Além disso, a adição de proteínas na preparação comercial não ocasionou variações significativas nas velocidades iniciais de conversão de celulose e xilana em nenhum dos dois substratos utilizados. Os resultados acima descritos colocam em dúvida se o

efeito benéfico verificado anteriormente nos resultados da preparação de Celluclast suplementadas com o extrato de *G. trabeum* é devido à presença de endoglucanases processivas, a alta concentração proteica do extrato de *G. trabeum*, ou por ambos, visto que os valores obtidos em todos os casos alcançaram conversões de celulose e xilana estatisticamente similares à respectiva condição controle, conforme demonstrado na Tabela 16.

Tabela 16: Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação de hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino e concentração de proteína quando o sistema hidrolítico era uma mistura de enzimas comerciais (Celluclast e Novozyme 188) suplementada com endoglucanases de *G. trabeum* ou albumina.

	BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM 5g DE NaOH E 10g DE Na ₂ SO ₃		BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM 2,5g DE NaOH E 5g DE Na ₂ SO ₃		
	CONVERSÃO DE CELULOSE	CONVERSÃO DE XILANA	CONVERSÃO DE CELULOSE	CONVERSÃO DE XILANA	
TRATAMENTOS	Eficiência em 72hs (%)	Eficiência em 72hs (%)	Eficiência em 72hs (%)	Eficiência em 72hs (%)	Proteína (mg.mL ⁻¹)
*Celluclast 100%	82 ± 2	86 ± 2	48 ± 2	45 ± 1	0,5
*Celluclast + albumina 100%	86 ± 3	98 ± 6	58 ± 1	57 ± 1	0,81
<i>G. trabeum</i> 50% + *Celluclast 50%	87 ± 2	94 ± 3	53 ± 1	47 ± 3	0,81
*Celluclast 50%	75 ± 1	74 ± 1	45 ± 4	40 ± 3	0,25
*Celluclast + albumina 50%	81 ± 2	83 ± 2	53 ± 2	48 ± 2	0,41
<i>G. trabeum</i> 25% + *Celluclast 25%	80 ± 2	89 ± 3	45 ± 2	42 ± 6	0,41
*Celluclast 25%	65 ± 1	64 ± 1	37 ± 1	30 ± 1	0,13

* Os ensaios com Celluclast foram complementados com β-glicosidases conforme descrito no item 4.8.3, sendo que a carga de β-glicosidases foi diminuída proporcionalmente com a carga de Celluclast.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho analisou se enzimas hidrolíticas recuperadas de cultivos do fungo de decomposição parda *Gloeophyllum trabeum* e do fungo ascomiceto *Talaromyces emersonii* apresentam efeito sinérgico com celulases comerciais durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com sulfito. As atividades experimentais foram divididas em: a) desenvolvimento de um método de hidrólise de bagaço de cana pré-tratado empregando somente 20 mg de substrato; b) produção de endoglucanases por *G. trabeum*; c) caracterização das atividades hidrolíticas presentes nos extratos do fungo, bem como em preparações comerciais de celulases (Cellubrix, Celluclast, Novozyme 188 e endocelulases comerciais de *T. emersonii*); e d) o teste de misturas das enzimas comerciais com os extratos de *G. trabeum* e das enzimas comerciais com extrato de *T. emersonii* para hidrolisar o bagaço pré-tratado.

O desenvolvimento do método de hidrólise em pequena escala (20 mg de substrato e 1 mL de volume final de reação) mostrou dados experimentais com boa reprodutibilidade (desvios menores do que 7,9% do valor médio de conversão de cada polissacarídeo). Os níveis de conversão de celulose e xilana foram similares àqueles observados em ensaios tradicionais que empregam 1 g de substrato e 50 mL de meio reacional. A partir da metodologia em pequena escala, foi desenvolvido um estudo referente ao efeito da carga de enzimas comerciais sobre a eficiência da hidrólise do bagaço pré-tratado. Os dados indicaram que a carga máxima de enzima empregada (6 FPU/g e 26 UI b-glicosidase/g) proporcionou a conversão total da celulose e da xilana presente no substrato. Ao reduzir a carga inicial de enzimas à metade e a 1/4 do valor inicial, as conversões máximas de glucana e xilana não diminuíram de maneira proporcional à diminuição de carga.

O fungo *G. trabeum* foi cultivado em 7 diferentes fontes de carbono, sendo que em todos os meios foi detectada atividade de endoglucanase e os níveis mais elevados foram detectados nos cultivos com carboximetilcelulose (CMC). O fungo foi cultivado por 24 dias em CMC e as enzimas foram precipitadas com sulfato de amônio (80% de saturação) para remoção do CMC. As atividades dos extratos foram medidas e as relações endoglucanase:celobiohidrolase:beta-glicosidase foram de 2,4:0,44:0,64 e 2,4:0,28:1,15 para Celluclast e extrato de *G. trabeum*, respectivamente. O preparado comercial de *T. emersonii*, como esperado, por ser uma preparação purificada,

apresentou basicamente a atividade de endoglucanases, com uma atividade expressiva de xilanases.

O uso das enzimas de *G. trabeum* em misturas com a Celluclast-mostrou que para as reações de hidrólise tanto do substrato de baixa recalcitrância (bagaço pré-tratado com alta carga de sulfito alcalino) quanto do substrato de alta recalcitrância (bagaço pré-tratado com baixa carga de sulfito alcalino) as conversões máximas de celulose e xilana obtidas com as preparações suplementadas em 50 ou 25% da carga total com endoglucanases de *G. trabeum* foram similares ou ligeiramente superiores àquelas obtidas com a mesma carga somente de Celluclast. No entanto, os ensaios em que se suplementou Celluclast com albumina em cargas que simulavam o meio reacional suplementado com extrato de *G. trabeum* indicaram que o simples incremento da concentração de proteínas no meio reacional proporcionou as melhorias no processo de hidrólise obtido com os extratos de *G. trabeum*.

As preparações suplementadas em 50 ou 25% da carga total com endoglucanases de *T. emersonii* obtiveram conversões máximas similares ou ligeiramente inferiores àquelas obtidas com a mesma carga somente de Celluclast.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, p. 1729-1738, 2011.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnol Biofuels**, v. 3, p. 4, 2010.

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

BALDRIAN, P.; VALASKOVA, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiol Rev**, v. 32, p. 501-21, 2008.

BARL, B.; BILIADERIS, C. G.; MURRAY, E. D.; MACGREGOR, A. W. Combined chemical and enzymic treatments of corn husk lignocellulosics. **Journal of the Science of Food and Agriculture** v. 56, p. 195-214, 1991.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnol Adv**, v. 15, p. 583-620, 1997.

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

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S. S.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática uma estratégia de desconstrução da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v. 44, p. 48 - 54, 2010.

COHEN, R.; SUZUKI, M. R.; HAMMEL, K. E. Processive Endoglucanase Active in Crystalline Cellulose Hydrolysis by the Brown Rot Basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 2412-2417, 2005.

COTORAS, M.; AGOSIN, E. Regulatory aspects of endoglucanase production by the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. **Experimental Mycology**, v. 16, p. 253-260, 1992.

COUGHLAN, M. P.; LJUNGDAHL, G. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. In: AUBERT, J. P.; BEGUIN, P. e MILLET, J. (Ed.). **Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation**. London: Academic Press Limited, v.43, p.11-30, 1988.

COWLING, E. B. **Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white-rot and brown-rot fungi**. Washington: US Dept. of Agriculture, Technical Bulletin 1258, 1961.

CURLING, S. F.; CLAUSEN, C. A.; WINANDY, J. E. Relationships between mechanical properties, weight loss, and chemical composition of wood during incipient brown-rot decay. **Forest Products Journal**, v. 52, p. 34-39, 2002.

DUBOIS, M.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical chemistry**, v. 3, p. 350-356, 1956.

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

EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Wood chemistry and wood biotechnology**. Berlin: De Gruyter, Pulp and Paper Chemistry and Technology, ISBN 9783110213393, 2009.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. **Methods Enzymology**, v. 182, p. 285-300, 1990.

ENOKI, A.; TANAKA, H.; FUSE, G. Relationship between degradation of wood and production of H_2O_2 - producing or one-electron oxidases by brown-rot fungi. **Wood Science and Technology**, v. 23, p. 1-12, 1989.

ERIKSSON, K. E. L.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Springer Series in Wood Science, Berlin: Springer Berlin Heidelberg, ISBN 9783642466892, 1990.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, ISBN 613 3935638396, 1989.

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

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

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

GOMES, I.; SARKAR, P. K.; RAHMAN, S. R.; RAHIM, M. A.; GOMES, D. J. Production of Cellulase from *Talaromyces emersonii* and Evaluation of Its Application in Eco-Friendly Functional Finishing of Jute-Based Fabrics. **Bangladesh Journal of Microbiology**, v. 24, p. 109-114, 2008.

GOODELL, B. Brown-rot fungal degradation of wood: our evolving view. In: (Ed.). **Wood Deterioration and Preservation**. Washington: ACS Symposium Series, v.845, cap. 6, p.97-118. ISBN 9780841237971, 2003.

GOODELL, B.; JELLISON, J.; LIU, J.; DANIEL, G.; PASZCZYNSKI, A.; FEKETE, F.; KRISHNAMURTHY, S.; JUN, L.; XU, G. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 133-162, 1997.

HAMMEL, K. E.; KAPICH, A. N.; JENSEN JR, K. A.; RYAN, Z. C. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 445-453, 2002.

HENRIKSSON, G.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. A critical review of cellobiose dehydrogenases. **J Biotechnol**, v. 78, p. 93-113, 2000.

HIGHLEY, T. Properties of Cellulases of Two Brown-Rot Fungi and Two White-Rot Fungi. **Wood and Fiber Science**, v. 6, p. 275-281, 1975.

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

HIGHLEY, T. L. Requirements for cellulose degradation by a brown-rot fungus. **Material u. Organismen**, v. 12, p. 25 - 36, 1977.

HIGHLEY, T. L. Is extracellular hydrogen-peroxide involved in cellulose degradation by brown-rot fungi. **Material Und Organismen**, v. 17, p. 205-214, 1982.

HIGHLEY, T. L. **Biochemical aspects of brown-rot and white-rot decay**. International research group on wood preservation. 1987.

HIGHLEY, T. L.; MURMANIS, L.; PALMER, J. G. Electron-Microscopy of Cellulose Decomposition by Brown-Rot Fungi. **Holzforschung**, v. 37, p. 271-277, 1983.

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

HIMMEL, M. E.; ADNEY, W. S.; BAKER, J. O.; ELANDER, R.; MCMILLAN, J. D.; NIEVES, R. A.; SHEEHAN, J. J.; THOMAS, S. R.; VINZANT, T. B.; ZHANG, M. Advanced bioethanol production technologies: a perspective. In: (Ed.). **Fuels and chemicals from biomass**. Washington: ACS Publications, p.2-45. ISBN 0841235082, 1997.

HIMMEL, M. E.; DING, S.-Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. **Science**, v. 315, p. 804-807, 2007.

HYDE, S. M.; WOOD, P. M. A mechanism for production of hydroxyl radicals by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*: Fe(III) reduction by cellobiose dehydrogenase and Fe(II) oxidation at a distance from the hyphae. **Microbiology-Uk**, v. 143, p. 259-266, 1997.

JENSEN, K. A., JR.; HOUTMAN, C. J.; RYAN, Z. C.; HAMMEL, K. E. Pathways for extracellular Fenton chemistry in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, p. 2705-11, 2001.

KOENIGS, J. W. Production of Extracellular Hydrogen-Peroxide and Peroxidase by Wood-Rotting Fungi. **Phytopathology**, v. 62, p. 100-110, 1972.

LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; CHO, N. S.; HOFRICHTER, M.; ROGALSKI, J. Biodegradation of lignin by white rot fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 175-185, 1999.

LEVY, J. F. The Natural History of the Degradation of Wood [and Discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences**, v. 321, p. 423-433, 1987.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 66, p. 506-77, 2002.

MACLELLAN, J. Strategies to Enhance Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Lignocellulosic Biomass. **MMG 445 Basic Biotech eJournal**, v. 6, p. 31-35, 2010.

MAGALHÃES, P. O. **Purificação de Hemicelulases de uma β -glicosidase de *Ceriporiopsis subvermispora* produzidas em condições de biopolpação**. 2005. (Doutorado). Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena/SP, 2005.

MANDELS, M.; REESE, E. Fungal cellulases and the microbial decomposition of cellulosic fabric (Volume 5). **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 22, p. 225-240, 1964.

MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 804-816, 1999.

MANSFIELD, S. D.; SADDLER, J. N.; GÜBITZ, G. M. Characterization of endoglucanases from the brown rot fungi *Gloeophyllum sepiarium* and *Gloeophyllum trabeum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 133-140, 1998.

MCHALE, A.; COUGHLAN, M. P. Synergistic hydrolysis of cellulose by components of the extracellular cellulase system of *Talaromyces emersonii*. **FEBS Lett**, v. 117, p. 319-22, 1980.

MCHALE, A.; COUGHLAN, M. P. The cellulolytic system of *Talaromyces emersonii*: Identification of the various components produced during growth on cellulosic media. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 662, p. 145-151, 1981.

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

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

MOLONEY, A. P.; CONSIDINE, P. J.; COUGHLAN, M. P. Cellulose hydrolysis by the cellulases produced by *Talaromyces emersonii* when grown on different inducing substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 1169-1173, 1983.

NAKAZAWA, H.; OKADA, K.; KOBAYASHI, R.; KUBOTA, T.; ONODERA, T.; OCHIAI, N.; OMATA, N.; OGASAWARA, W.; OKADA, H.; MORIKAWA, Y. Characterization of the catalytic domains of *Trichoderma reesei* endoglucanase I, II, and III, expressed in *Escherichia coli*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 81, p. 681-9, 2008.

NOVOZYMES, B. Cellulose to ethanol conversion technology. VIKSO-NIELSEN, A. <http://www.bioenergy.novozymes.com/en/learn-more/webinars/Documents/Cellulose%20to%20Ethanol%20Conversion%20Technology.pdf>. 10/03/2013

PHILLIPS, C. M.; BEESON, W. T.; CATE, J. H.; MARLETTA, M. A. Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. **ACS Chem Biol**, v. 6, p. 1399-406, 2011.

RAHIKAINEN, J.; MARTIN-SAMPEDRO, R.; HEIKKINEN, H.; ROVIO, S.; MARJAMAA, K.; TAMMINEN, T.; ROJAS, O.; KRJUS, K. Negative effect of lignin on cellulose bioconversion - lignin model surfaces for the study of cellulase-lignin interactions. **COST Young Researchers' Forum**, 2013.

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

RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Enzymatic Saccharification of Cellulosic Materials. In: SPENCER, J. F. T. e SPENCER, A. L. R. (Ed.). **Methods in Biotechnology: Environmental Microbiology: Methods and Protocols**. Totowa, New Jersey: Humana Press, v.16, cap. 21, p.219-233, 2004.

REESE, E. T.; SIU, R. G.; LEVINSON, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **Journal of Bacteriology**, v. 59, p. 485-97, 1950.

REZENDE, C.; DE LIMA, M.; MAZIERO, P.; DEAZEVEDO, E.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, p. 1-19, 2011.

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

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 263-289, 2010.

SCHMIDHALTER, D. R.; CANEVASCINI, G. Isolation and Characterization of the Cellobiose Dehydrogenase from the Brown-Rot Fungus *Coniophora puteana* (Schum ex Fr.) Karst. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, p. 559-563, 1993.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry: fundamentals and applications**. San Diego: Academic Press, 1981. TAPPI PRESS 012647480X.

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

TANAKA, M.; TANIGUCHI, M.; MATSUNO, R.; KAMIKUBO, T. Purification and Properties of Cellulases from *Eupenicillium-Javanicum*: Studies on the Re-Utilization of Cellulosic Resources. **Journal of Fermentation Technology**, v. 59, p. 177-183, 1981.

TANSEY, M. R. Isolation of Thermophilic Fungi from Self-Heated, Industrial Wood Chip Piles. **Mycologia**, v. 63, p. 537-547, 1971.

TEWALT, J.; SCHILLING, J. Assessment of saccharification efficacy in the cellulase system of the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, p. 1785-1793, 2010.

TILTON, R. D.; ROBERTSON, C. R.; GAST, A. P. Manipulation of hydrophobic interactions in protein adsorption. **Langmuir**, v. 7, p. 2710-2718, 1991.

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

WALLERSTEIN, L. Enzyme preparations from microorganisms - Commercial production and industrial application. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 31, p. 1218-1224, 1939.

WANG, W.; GAO, P. J. Function and mechanism of a low-molecular-weight peptide produced by *Gloeophyllum trabeum* in biodegradation of cellulose. **Journal of Biotechnology**, v. 101, p. 119-130, 2003.

WILLFÖR, S.; SUNDBERG, A.; HEMMING, J.; HOLMBOM, B. Polysaccharides in some industrially important softwood species. **Wood Science and Technology**, v. 39, p. 245-257, 2005.

WILLFÖR, S.; SUNDBERG, A.; PRANOVICH, A.; HOLMBOM, B. Polysaccharides in some industrially important hardwood species. **Wood Science and Technology**, v. 39, p. 601-617, 2005.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for Measuring Cellulase Activities. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 87-112, 1988.

WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.; VIKARI, L. Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. In: (Ed.). **Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. 2 Edition**. Nova York: Marcel Dekker, cap. 43, p.995-1033, 2005.

WYMELENBERG, A. V.; GASKELL, J.; MOZUCH, M.; SABAT, G.; RALPH, J.; SKYBA, O.; MANSFIELD, S. D.; BLANCHETTE, R. A.; MARTINEZ, D.; GRIGORIEV, I.; KERSTEN, P. J.; CULLEN, D. Comparative transcriptome and secretome analysis of wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, p. 3599-610, 2010.

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

YOON, J. J.; CHA, C. J.; KIM, Y. S.; SON, D. W.; KIM, Y. K. The brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* has the endo-glucanases capable of degrading microcrystalline cellulose. **J Microbiol Biotechnol**, v. 17, p. 800-5, 2007.

ZHANG, P. H. Y.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-81, 2006.

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

ZHAO, X. B.; WANG, L.; LIU, D. H. Effect of several factors on peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 1115-1121, 2007.

ZHENG, F.; DING, S. Processivity and Enzymatic Mode of a Glycoside Hydrolase Family 5 Endoglucanase from *Volvarella volvacea*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 989-996, 2013.

APÊNDICE 1

As atividades das enzimas β -glicosidases e FPAse contidas na preparação comercial Cellubrix foi avaliada e os dados estão mostrados nas Figuras 17 e 18. O estudo foi feito para avaliar os intervalos de tempo em que se detecta a velocidade máxima de reação e assim poder estimar corretamente as atividades dessas enzimas. Cada tempo de reação foi analisado a partir de 3 repetições autênticas (3 tubos por experimento).

A atividade de β -glicosidase foi avaliada com base no estudo cinético da conversão de pNPG em p-nitrofenol conforme mostrado na Figura 17. A velocidade máxima de reação foi observada durante todo o tempo de reação analisado (até 30 min), momento em que a diluição da preparação comercial foi de 1: 1000 causou uma conversão de 11% do substrato e uma atividade calculada de 49,9 UI/mL.

A atividade em papel de filtro da preparação Cellubrix foi determinada a partir de 3 diluições do extrato bruto que corresponderam a 1:50, 1:100 e 1:143. A Figura 18 mostra a massa de açúcar redutor formada no meio reacional em função de diluições progressivas da preparação de Cellubrix e apontam para uma diluição extrapolada de 1:83 como aquela que geraria 2 mg de açúcares redutores em 60 min de reação, correspondendo a 4% de conversão do papel de filtro em açúcares redutores como definido no método padrão descrito por Ghose (1987). Com base nestes dados e conforme descrito na metodologia, a atividade em papel de filtro calculada foi de 26,4 FPU/mL.

Figura 17: Cinética da enzima β -glicosidase, presente no extrato comercial da Cellubrix.

Figura 18: Massa de glicose liberada na reação de FPase, no extrato comercial da Cellubrix.

De forma similar ao descrito para o estudo da Cellubrix, as atividades hidrolíticas presentes na preparação Novozyme 188 também foram determinadas com base nos estudos das cinéticas de conversão de cada substrato específico. Não foram detectada atividade de FPase no extrato e os dados obtidos para β -glicosidases estão mostrados na Figura 19. Para a atividade de β -glicosidases a velocidade máxima de reação foi observada durante todo o tempo de reação analisado (até 30 min). Com a diluição da preparação comercial de 1: 1000 obteve-se no tempo de 30 minutos uma conversão de 10,3% do substrato e uma atividade calculada de 922 UI/mL foi obtida.

Figura 19: Cinética da enzima β -glicosidase, presente no extrato comercial Novozyme 188.

APÊNDICE 2

1) CMCase - *Gloeophyllum trabeum* – amostra precipitada com sulfato de amônio (80% de saturação)

Metodologia de Ghose, 1987 (Measurement of Cellulase Activities) - Temperatura: 50°C

Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8 - [S]: Solução tampão pH 4,8, com 2% de CMC (SIGMA C5013)

Para calcular a atividade endoglucanásica estimou-se a concentração enzimática que produziu exatamente 0,5 mg de glicose. Para isso foi feito um gráfico do logaritmo da concentração do extrato enzimático contra massa de glicose liberada (Figura 20). Encontrada a concentração enzimática responsável por produzir 0,5 mg de glicose, a atividade endoglucanásica foi calculada pela seguinte equação:

$$\frac{UI_{CMC}}{mL} = \frac{0,185}{\text{concentração enzimática que libera 0,5 mg de açúcar redutor}}$$

Para a primeira repetição (A1) os valores encontrados para a diluição enzimática que liberou 0,5 mg de glicose foi de 1:15 e a concentração enzimática que liberou 0,5 mg de glicose = 0,063. Assim utilizando a equação encontramos que a A1 = 2,93 UI.mL⁻¹. Do mesmo modo foram calculadas as atividades para outras duas repetições. Obtendo os valores de A2 e A3 iguais a 2,76 e 2,93 UI.mL⁻¹, respectivamente. Pela média entre as repetições temos que a atividade média do extrato é de **2,9±0,1** UI.mL⁻¹.

Figura 20: Dados de açúcar redutor gerados em 30 minutos com diluições progressivas do extrato de *G. trabeum*.

2) Xilanase - *Gloeophyllum trabeum* – amostra precipitada com sulfato de amônio (80% de saturação)

Metodologia de Bailey, Biely e Poutanen, 1992 (Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity) - Temperatura: 50°C

Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 5,3

[S]: Solução tampão pH 5,3 com 1% de Xilana de Birchwood (SIGMA X0502)]

A atividade de xilanase presente no extrato foi determinada de acordo com a cinética de conversão de xilana em açúcares redutores. Para isso a quantidade de açúcar redutor liberado (μmol) em cada um dos tempos analisados (2, 5, 10, 20 e 30 minutos) foi calculada utilizando uma curva padrão de xilose e as absorbâncias obtidas a partir de uma diluição de 40x do extrato. A partir desses valores as quantidades de açúcares liberados foram convertidas em porcentagens de conversão de xilana. A cinética de conversão de xilana nos tempos analisados se encontra na Figura 21. Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizado o tempo de 5 minutos, pois neste tempo a reação se manteve em velocidade máxima. O cálculo foi feito segundo a equação:

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

O cálculo para a primeira repetição foi: $Atividade = \frac{281,41}{5} = 53,3 \text{ UI/mL}$

As atividades de xilanase encontradas para as outras duas repetições foram de 53,1 e 55,2. A atividade média de xilanase no extrato foi de **55,9±0,6**.

Figura 21: Cinética de conversão de xilana em xilose, utilizando o extrato de *G. trabeum*.

3) β -Glicosidases - *Gloeophyllum trabeum* – amostra precipitada com sulfato de amônio (80% de saturação)

Metodologia de Tan, Mayers e Saddler, 1987 - Temperatura: 50°C

Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8

[S]: Solução tampão pH 4,8 com 0,1% de p-Nitrophenyl β -D-Glucopyranoside (Sigma N-7006)

A atividade de β -glicosidases presente no extrato foi determinada de acordo com a cinética de conversão de p-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) em p-nitrofenolato (pNP). Para isso a quantidade de p-nitrofenolato (μmol) produzida em cada um dos tempos analisados (2, 5, 10, 20 e 30 minutos) foi calculada utilizando o coeficiente angular da curva de regressão linear (obtida no gráfico feito com as absorbâncias obtidas a partir de uma diluição de 50x do extrato de *G. trabeum* versus tempo) e o coeficiente de extinção molar (ξ) do pNP (Figura 22). O ξ do pNP foi calculado no laboratório e o valor obtido e que foi utilizado nos cálculos é $15366 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A determinação da atividade foi feita segundo a equação:

$$\frac{UI}{mL} = \left(\left(\left(\left(\frac{\left(\frac{\text{coeficiente angular}}{\xi} \right) \times 3}{1000} \right) * 10^6 \right) * \frac{1}{0,1} \right) \times \text{diluição} \right)$$

O cálculo feito para a primeira repetição foi:

$$Atividade = \left(\left(\left(\left(\frac{\left(\frac{0,02}{15366} \right) \times 3}{1000} \right) * 10^6 \right) * \frac{1}{0,1} \right) \times 50 \right) = 1,95 \text{ UI/mL}$$

Os valores encontrados para a segunda e terceira repetição foram de 2,03 e 1,97. A atividade média de β -glicosidasas no extrato foi de **2,0 $\pm$ 0,1**.

Figura 22: Absorbância obtida em cada tempo da reação de determinação da atividade de β -glicosidase para as amostras A1, A2 e A3, do extrato de *G. trabeum*

4) Celobiohidrolases - *Gloeophyllum trabeum* – amostra precipitada com sulfato de amônio (80% de saturação)

Metodologia de Wood and Bhat, 1988 (Methods for Measuring Cellulase Activities)

Temperatura: 50°C - Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 5,0

[S]: Solução tampão com 1% Avicel

A atividade de celobiohidrolase presente no extrato foi determinada de acordo com a cinética de conversão de avicel (celulose microcristalina) em açúcares redutores. Para isso a quantidade de açúcar redutor liberado (μmol) em

cada um dos tempos analisados (15, 30, 45 e 60 minutos) foi calculada utilizando uma curva padrão de glicose e as absorbâncias obtidas após a reação, utilizando extrato sem diluir. As quantidades de açúcares liberadas foram convertidas em porcentagens de conversão de avicel. A cinética de conversão de avicel nos tempos analisados se encontra na Figura 23. Para o cálculo de atividade enzimática foi utilizado o tempo de 15 minutos, pois neste tempo a reação se manteve em velocidade máxima. O cálculo foi feito segundo a equação:

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

O cálculo para a primeira repetição foi: $Atividade = \frac{2,22}{15} = 0,15 \text{ UI/mL}$

As atividades de celobiohidrolases encontradas para as outras duas repetições foram de 0,13 e 0,14. A atividade média de celobiohidrolases no extrato foi de **0,14±0,01**.

Figura 23: Cinética de conversão de avicel em glicose, utilizando o extrato de *G. trabeum*.

5) β -Xilosidase - *Gloeophyllum trabeum* – amostra precipitada com sulfato de amônio (80% de saturação)

Metodologia de Tan, Mayers e Saddler, 1987 (Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus) - Temperatura: 50°C

Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8

[S]: Solução tampão pH 4,8 com 0,1% de p-Nitrophenyl β -D-Xylanopyranoside (Sigma N-7006)

A atividade de β -xilosidase presente no extrato foi determinada de acordo com a cinética de conversão de p-nitrofenol- β -D-xilanopiranosídeo (pNPX) em p-nitrofenolato (pNP). Para isso a quantidade de p-nitrofenolato (μmol) produzida

em cada um dos tempos analisados (10, 20 e 30 minutos) foi calculada utilizando o coeficiente angular da curva de regressão linear (obtida no gráfico feito com as absorbâncias encontradas a partir de uma diluição de 10x do extrato versus tempo) e o coeficiente de extinção molar (ξ) do pNP (Figura 24). O ξ do pNP foi calculado no laboratório e o valor obtido e que foi utilizado nos cálculos é 15366. A determinação da atividade foi feita segundo a equação:

$$\frac{UI}{mL} = \left(\left(\left(\left(\frac{\text{coeficiente angular}}{\xi} \right) \times 3 \right) \times 10^6 \right) \times \frac{1}{0,1} \right) \times \text{diluição}$$

O cálculo feito para a primeira repetição foi:

$$\text{Atividade} = \left(\left(\left(\left(\frac{0,0107}{15366} \right) \times 3 \right) \times 10^6 \right) \times \frac{1}{0,1} \right) \times 10 = 0,20 \text{ UI/mL}$$

Os valores encontrados para a segunda e terceira repetição foram ambos de 0,21. A atividade média de β -xilosidase no extrato foi de **0,21 $\pm$ 0,002**.

Figura 24: Absorbância obtida em cada tempo da reação de determinação da atividade de β -xilosidase para as amostras A1, A2 e A3, do extrato de *G. trabeum*.

APÊNDICE 3

1) Celluclast

FPase – Celluclast *Trichoderma reesei* ATCC 26921

Metodologia de Ghose, 1987 (Measurement of Cellulase Activities)

Temperatura: 50°C - Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8

[S]: 50mg de papel de filtro Whatman nº1 (1.0 x 6.0 cm)

Para calcular a atividade de FPase estimou-se a concentração enzimática que produziu exatamente 2,0 mg de glicose. Para isso foi feito um gráfico do logaritmo da concentração do extrato enzimático contra massa de glicose liberada (Figuras 25 e 26). Encontrada a concentração enzimática responsável por produzir 2,0 mg de glicose, a atividade de FPase foi calculada pela seguinte equação:

$$\frac{UI_{CMC}}{mL} = \frac{0,37}{\text{concentração enzimática que libera 2,0 mg de açúcar redutor}}$$

Para a primeira repetição (A1) os valores encontrados para a diluição enzimática que liberou 2,0 mg de glicose foi de 1:110 e a concentração enzimática que liberou 2,0 mg de glicose = 0,009. Assim utilizando a equação encontramos que a A1 = 41,1 UI.mL⁻¹. Do mesmo modo foram calculadas as atividades para outras 5 repetições. Obtendo os valores de A2, A3, A4, A5 e A6 iguais a 43,5, 47,6, 46,6, 45,9 e 46,6 UI.mL⁻¹, respectivamente. Pela média entre as repetições temos que a atividade média do extrato é de 45,2±2,4 UI.mL⁻¹.

Figura 25: Dados de açúcar redutor das amostras A1, A2 e A3 gerados em 60 minutos com diluições progressivas do extrato de Celluclast.

Figura 26: Dados de açúcar redutor das amostras A4, A5 e A6 gerados em 60 minutos com diluições progressivas do extrato de Celluclast.

CMCase – Celluclast (Cellulase, from *Trichoderma reesei* ATCC 26921)

Enzima: Metodologia de Ghose, 1987 (Measurement of Cellulase Activities)

Temperatura: 50°C

Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8

[S]: Solução tampão pH 4,8, com 2% de CMC (SIGMA C5013)

Para calcular a atividade endoglucanásica estimou-se a concentração enzimática que produziu exatamente 0,5 mg de glicose. Para isso foi feito um gráfico do logaritmo da concentração do extrato enzimático contra massa de glicose liberada (Figuras 27 e 28). Encontrada a concentração enzimática

responsável por produzir 0,5 mg de glicose, a atividade endoglucanásica foi calculada pela seguinte equação:

$$\frac{UI_{CMC}}{mL} = \frac{0,185}{\text{concentração enzimática que libera 0,5 mg de açúcar redutor}}$$

Para a primeira repetição (A1) os valores encontrados para a diluição enzimática que liberou 0,5 mg de glicose foi de 1:3300 e a concentração enzimática que liberou 0,5 mg de glicose = 0,0003. Assim utilizando a equação encontramos que a A1 = 662,8 UI.mL⁻¹. Do mesmo modo foram calculadas as atividades para outras quatro repetições. Obtendo os valores de A2, A3, A4 e A5 iguais a 479,4, 495,5, 604,9 e 549,4 UI.mL⁻¹, respectivamente. Pela média entre as repetições temos que a atividade média do extrato é de **550,4±63,8** UI.mL⁻¹.

Figura 27: Dados de açúcar redutor das amostras A1, A2 e A3 gerados em 30 minutos com diluições progressivas do extrato de Celluclast.

Figura 28: Dados de açúcar redutor das amostras A4 e A5 gerados em 30 minutos com diluições progressivas do extrato de Celluclast.

β-Glicosidase - Celluclast (Cellulase, from *Trichoderma reesei* ATCC 26921)

Metodologia de Tan, Mayers e Saddler, 1987 (Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus) - Temperatura: 50°C

Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8

[S]: Solução tampão pH 4,8 com 0,1% de p-Nitrophenyl β-D-Glucopyranoside (Sigma N-7006)

A atividade de β-glicosidase presente no extrato foi determinada de acordo com a cinética de conversão de p-nitrofenol-β-D-glicopiranosídeo (pNPG) em p-nitrofenolato (pNP). Para isso a quantidade de p-nitrofenolato (μmol) produzida em cada um dos tempos analisados (2, 5, 10, 20 e 30 minutos) foi calculada utilizando o coeficiente angular da curva de regressão linear (obtida no gráfico feito com as absorbâncias obtidas a partir de uma diluição de 1000x do extrato versus tempo) e o coeficiente de extinção molar (ξ) do pNP (Figuras 29 e 30). O ξ do pNP foi calculado no laboratório e o valor obtido e que foi utilizado nos cálculos é 15366 M⁻¹cm⁻¹. A determinação da atividade foi feita segundo a equação:

$$\frac{UI}{mL} = \left(\left(\left(\left(\frac{\text{coeficiente angular}}{\xi} \right) \times 3 \right) \times 10^6 \right) \times \frac{1}{0,1} \right) \times \text{diluição}$$

O cálculo feito para a primeira repetição foi:

$$Atividade = \left(\left(\left(\left(\frac{0,079}{15366} \right) \times 3 \right) \times 10^6 \right) \times \frac{1}{0,1} \right) \times 1000 = 77,8 \text{ UI/mL}$$

Do mesmo modo foram calculadas as atividades para outras quatro repetições. Obtendo os valores de A2, A3, A4 A5 e A6 iguais a 77,8, 75,0, 76,7, 79,2 e 75,6 UI.mL⁻¹, respectivamente. A atividade média de β-glicosidase no extrato foi de **77,0±1,5** UI.mL⁻¹.

Figura 29: Absorbância obtida em cada tempo da reação de determinação da atividade de β-glicosidase para as amostras A1, A2 e A3, da preparação Celluclast.

Figura 30: Absorbância obtida em cada tempo da reação de determinação da atividade de β-glicosidase para as amostras A4, A5 e A6, da preparação Celluclast.

Xilanase - Celluclast (Cellulase, from *Trichoderma reesei* ATCC 26921)

Metodologia de Bailey, Biely e Poutanen, 1992 (Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity) - Temperatura: 50°C

Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 5,3

[S]: Solução tampão pH 5,3 com 1% de Xilana de Birchwood (SIGMA X0502)]

A atividade de xilanase presente no extrato foi determinada de acordo com a cinética de conversão de xilana em açúcares redutores. Para isso a quantidade de açúcar redutor liberado (μmol) em cada um dos tempos analisados (2, 5, 10, 20 e 30 minutos) foi calculada utilizando uma curva padrão de xilose e as absorbâncias obtidas a partir de uma diluição de 1000x do extrato. A partir desses valores as quantidades de açúcares liberados foram convertidas em porcentagens de conversão de xilana (Figura 32). Como a enzima se manteve em velocidade máxima durante todo o tempo analisado, o cálculo de atividade enzimática foi realizado utilizando-se o coeficiente angular da reta obtida entre quantidades de açúcar redutor liberado e os tempos analisados, conforme Figura 31. O cálculo foi feito segundo a equação:

$$\frac{UI}{mL} = \frac{\text{coeficiente angular} * \text{diluição}}{\text{volume de extrato utilizado na reação}}$$

O cálculo para a primeira repetição foi:

$$Atividade = \frac{0,04844 * 1000}{0,1} = 484,4 \frac{UI}{mL}$$

As atividades de xilanase encontradas para as outras duas repetições foram de 495,1 e 475,5 $UI \cdot mL^{-1}$. A atividade média de xilanases no extrato foi de **485,0 $\pm$ 9,9 $UI \cdot mL^{-1}$** .

Figura 31: Quantidade de açúcar redutor formado para cada tempo analisado na reação de hidrólise de xilana pela Celluclast.

Figura 32: Conversão de Xilana em xilose, utilizando a preparação comercial Celluclast.

Celobiohidrolase - Celluclast (Cellulase, from *Trichoderma reesei* ATCC 26921)

Metodologia de Wood and Bhat, 1988 (Methods for Measuring Cellulase Activities)

Temperatura: 50°C - Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 5,0

[S]: Solução tampão com 1% Avicel

A atividade de celobiohidrolase presente no extrato foi determinada de acordo com a cinética de conversão de avicel (celulose microcristalina) em açúcares redutores. Para isso a quantidade de açúcar redutor liberado (μmol) em

cada um dos tempos analisados (30, 45, 60 e 120 minutos) foi calculada utilizando uma curva padrão de glicose e as absorbâncias obtidas após a reação, utilizando extrato diluído 1000x. As quantidades de açúcares liberadas foram convertidas em porcentagens de conversão de avicel. A cinética de conversão de avicel nos tempos analisados se encontra na Figura 34. Como a enzima se manteve em velocidade máxima durante todo o tempo analisado, o cálculo de atividade enzimática foi realizado utilizando-se o coeficiente angular da reta obtida entre as absorbâncias encontradas e os tempos analisados, conforme Figura 33. O cálculo foi feito segundo a equação:

$$\frac{UI}{mL} = \frac{\text{coeficiente angular} * \text{diluição}}{\text{volume de extrato utilizado na reação}}$$

O cálculo para a primeira repetição foi:

$$Atividade = \frac{0,008725 * 1000}{0,1} = 87,3 \frac{UI}{mL}$$

As atividades de celobiohidrolase encontradas para as outras duas repetições foram de 97,7 e 97,7 UI.mL⁻¹. A atividade média de celobiohidrolases no extrato foi de **94,2±6,0** UI.mL⁻¹.

Figura 33: Quantidade de açúcar redutor formado para cada tempo analisado na reação de hidrólise de avicel pela Celluclast.

Figura 34: Conversão de Avicel em glicose, utilizando a preparação comercial Celluclast.

β -Xilosidase - Celluclast (Cellulase, from *Trichoderma reesei* ATCC 26921)

Metodologia de Tan, Mayers e Saddler, 1987 (Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus) - Temperatura: 50°C

Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8

[S]: Solução tampão pH 4,8 com 0,1% de p-Nitrophenyl β -D-Xylanopyranoside (Sigma N-7006)

A atividade de β -xilosidase presente no extrato foi determinada de acordo com a cinética de conversão de p-nitrofenol- β -D-xilanopiranosídeo (pNPX) em p-nitrofenolato (pNP). Para isso a quantidade de p-nitrofenolato (μ mol) produzida em cada um dos tempos analisados (2, 5, 10, 20 e 30 minutos) foi calculada utilizando o coeficiente angular da curva de regressão linear (obtida no gráfico feito com as absorbâncias encontradas a partir de uma diluição de 1000x do extrato versus tempo) e o coeficiente de extinção molar (ξ) do pNP (Figura 35). O ξ do pNP foi calculado no laboratório e o valor obtido e utilizado nos cálculos é 15366. A determinação da atividade foi feita segundo a equação:

$$\frac{UI}{mL} = \left(\left(\left(\left(\frac{\text{coeficiente angular}}{\xi} \right) \times 3 \right) \times 10^6 \right) \times \frac{1}{0,2} \right) \times \text{diluição}$$

O cálculo feito para a primeira repetição foi:

$$Atividade = \left(\left(\left(\left(\frac{0,02993}{15366} \right) \times 3 \right) \times 10^6 \right) \times \frac{1}{0,2} \right) \times 1000 = 29,2 \text{ UI/mL}$$

Os valores encontrados para a segunda e terceira repetição foram ambos de 29,3 e 28,6 UI.mL⁻¹. A atividade média de β-xilosidase no extrato foi de **29,0±0,4 UI.mL⁻¹**.

Figura 35: Absorbância obtida em cada tempo da reação de determinação da atividade de β-xilosidase para as amostras A1, A2 e A3, da preparação Celluclast.

2. Novozyme 188

CMCase – Novozyme 188 (Cellobiase from *Aspergillus niger*)

Metodologia de Tanaka et al, 1981

Temperatura: 50°C - Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8

[S]: 50mg de papel de filtro Whatman nº1 (1.0 x 6.0 cm)

Não foi possível se detectar a atividade de endoglucanase (CMCase) utilizando a metodologia proposta por Ghose (1987), assim a atividade foi medida utilizando a metodologia de Tanaka et al. (1981). A atividade presente no extrato foi determinada pela cinética de conversão de CMC em açúcares redutores. Para

isso a quantidade de açúcar redutor liberada (μmol) em cada um dos tempos analisados (2, 5, 10, 20 e 30 minutos) foi calculada utilizando uma curva padrão de glicose e as absorbâncias obtidas a partir de uma diluição de 500x do extrato. A partir desses valores as quantidades de açúcares liberados foram convertidas em porcentagens de conversão de CMC. A cinética de conversão de CMC nos tempos analisados se encontra na Figura 37. Para o cálculo de atividade enzimática foi utilizado o tempo de 5 minutos, pois neste tempo a reação se manteve em velocidade máxima. O cálculo foi feito segundo a equação:

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

O cálculo para a primeira repetição foi: $Atividade = \frac{154,5}{5} = 30,9 \text{ UI/mL}$

Os valores encontrados para a segunda e terceira repetição foram ambos de 25,1 e 29,9 UI.mL^{-1} . A atividade média de endoglucanases no extrato foi de **28,6 $\pm$ 3,1 UI.mL^{-1}** .

Figura 36: Cinética de conversão de CMC em glicose, utilizando o extrato de Novozyme 188.

β -Glicosidases - Novozyme 188 (Cellobiase from *Aspergillus niger*)

Metodologia de Tan, Mayers e Saddler, 1987 (Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus) - Temperatura: 50°C

Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8

[S]: Solução tampão pH 4,8 com 0,1% de p-Nitrophenyl β -D-Glucopyranoside (Sigma N-7006)

A atividade de β -glicosidase presente no extrato foi determinada de acordo com a cinética de conversão de p-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) em p-nitrofenolato (pNP). Para isso a quantidade de p-nitrofenolato (μmol) produzida em cada um dos tempos analisados (2, 5, 10, 20 e 30 minutos) foi calculada utilizando o coeficiente angular da curva de regressão linear (obtida no gráfico feito com as absorbâncias obtidas a partir de uma diluição de 15000x do extrato versus tempo) e o coeficiente de extinção molar (ξ) do pNP (Figuras 37). O ξ do pNP foi calculado no laboratório e o valor obtido que foi utilizado nos cálculos é $15366 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A determinação da atividade foi feita segundo a equação:

$$\frac{UI}{mL} = \left(\left(\left(\left(\frac{\left(\frac{\text{coeficiente angular}}{\xi} \right) \times 3}{1000} \right) * 10^6 \right) * \frac{1}{0,1} \right) \times \text{diluição} \right)$$

O cálculo feito para a primeira repetição foi:

$$Atividade = \left(\left(\left(\left(\frac{\left(\frac{0,0254}{15366} \right) \times 3}{1000} \right) * 10^6 \right) * \frac{1}{0,1} \right) \times 15000 = 750,7 \text{ UI/mL} \right)$$

Do mesmo modo foram calculadas as atividades para outras duas repetições. Obtendo os valores de A2 e A3 iguais a 753,2 e 753,3 UI.mL^{-1} , respectivamente. A atividade média de β -glicosidase no extrato foi de **752,4 $\pm$ 1,5** UI.mL^{-1} .

Figura 37: Absorvância obtida em cada tempo da reação de determinação da atividade de β -glicosidase para as amostras A1, A2 e A3, da preparação Novozyme 188.

Xilanase - Novozyme 188 (Cellobiase from *Aspergillus niger*)

Metodologia de Bailey, Biely e Poutanen, 1992 (Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity) - Temperatura: 50°C

Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 5,3

[S]: Solução tampão pH 5,3 com 1% de Xilana de Birchwood (SIGMA X0502)]

A atividade de xilanase presente no extrato foi determinada de acordo com a cinética de conversão de xilana em açúcares redutores. Para isso a quantidade de açúcar redutor liberado (μmol) em cada um dos tempos analisados (2, 5, 10, 20 e 30 minutos) foi calculada utilizando uma curva padrão de xilose e as absorvâncias obtidas a partir de uma diluição de 2000x do extrato. A partir desses valores as quantidades de açúcares liberados foram convertidas em porcentagens de conversão de xilana. A cinética de conversão de xilana nos tempos analisados se encontra na Figura 38. Para o cálculo de atividade enzimática foi utilizado o tempo de 2 minutos, pois neste tempo a reação se manteve em velocidade máxima. O cálculo foi feito segundo a equação:

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

O cálculo para a primeira repetição foi:

$$Atividade = \frac{4978,40}{2} = 2489,2 \text{ UI/mL}$$

As atividades de xilanase encontradas para as outras duas repetições foram de 2536,2 e 2526,8 UI.mL⁻¹. A atividade média de xilanase no extrato foi de **2517,4±24,9 UI.mL⁻¹**.

Figura 38: Cinética de conversão de xilana em xilose, utilizando o extrato Novozyme 188.

β-Xilosidases - Novozyme 188 (Cellobiase from *Aspergillus niger*)

Metodologia de Tan, Mayers e Saddler, 1987 (Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus) - Temperatura: 50°C

Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8

[S]: Solução tampão pH 4,8 com 0,1% de p-Nitrophenyl β-D-Xylanopyranoside (Sigma N-7006)

A atividade de β-xilosidases presente no extrato foi determinada de acordo com a cinética de conversão de p-nitrofenol-β-D-xilanopiranosídeo (pNPX) em p-nitrofenolato (pNP). Para isso a quantidade de p-nitrofenolato (μmol) produzida em cada um dos tempos analisados (2, 5, 10, 20 e 30 minutos) foi calculada utilizando o coeficiente angular da curva de regressão linear (obtida no gráfico feito com as absorbâncias encontradas a partir de uma diluição de 100x do extrato versus tempo) e o coeficiente de extinção molar (ξ) do pNP (Figura 39). O ξ do pNP foi calculado no laboratório e o valor obtido foi utilizado nos cálculos é 15366. A determinação da atividade foi feita segundo a equação:

$$\frac{UI}{mL} = \left(\left(\left(\left(\frac{\left(\frac{\text{coeficiente angular}}{\xi} \right) \times 3}{1000} \right) * 10^6 \right) * \frac{1}{0,2} \right) \times \text{diluição} \right)$$

O cálculo feito para a primeira repetição foi:

$$\text{Atividade} = \left(\left(\left(\left(\frac{\left(\frac{0,04265}{15366} \right) \times 3}{1000} \right) * 10^6 \right) * \frac{1}{0,2} \right) \times 100 = 8,3 \text{ UI/mL} \right)$$

Os valores encontrados para a segunda e terceira repetição foram ambos de 8,3 e 8,5 UI.mL⁻¹. A atividade média de β-xilosidase no extrato foi de **8,4±0,1** UI.mL⁻¹.

Figura 39: Curva de conversão de pNPX em pNP, para as amostras A1, A2 e A3, da preparação Novozyme 188.

3) *Talaromyces emersonii*

CMCase – *Talaromyces emersonii* Lote 30602

Enzima: Metodologia de Ghose, 1987 (Measurement of Cellulase Activities)

Temperatura: 50°C

Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 4,8

[S]: Solução tampão pH 4,8, com 2% de CMC (SIGMA C5013)

Para calcular a atividade endoglucanásica estimou-se a concentração enzimática que produziu exatamente 0,5 mg de glicose. Para isso foi feito um gráfico do logaritmo da concentração do extrato enzimático contra massa de

glicose liberada (Figura 40). Encontrada a concentração enzimática responsável por produzir 0,5 mg de glicose, a atividade endoglucanásica foi calculada pela seguinte equação:

$$\frac{UI_{CMC}}{mL} = \frac{0,185}{\text{concentração enzimática que libera 0,5 mg de glicose}}$$

Para a primeira repetição (A1) os valores encontrados para a diluição enzimática que liberou 0,5 mg de glicose foi de 1:333 e a concentração enzimática que liberou 0,5 mg de glicose = 0,003. Assim a atividade média do extrato é de **61,6±1,9 UI.mL⁻¹**.

Figura 40: Dados de açúcar redutor das amostras A1, A2 e A3 gerados em 30 minutos com diluições progressivas do extrato de Novozyme 188.

Xilanase - *Talaromyces emersonii* Lote 30602

Metodologia de Bailey, Biely e Poutanen, 1992 (Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity) - Temperatura: 50°C

Tampão Acetato de Sódio/ ácido acético, 50 mM, pH 5,3

[S]: Solução tampão pH 5,3 com 1% de Xilana de Birchwood (SIGMA X0502)]

A atividade de xilanase presente no extrato foi determinada de acordo com a cinética de conversão de xilana em açúcares redutores. Para isso a quantidade de açúcar redutor liberado (μmol) em cada um dos tempos analisados (2, 3, 5, 10,

20, 30 e 40 minutos) foi calculada utilizando uma curva padrão de xilose e as absorbâncias obtidas a partir de uma diluição de 100x do extrato. A partir desses valores as quantidades de açúcares liberados foram convertidas em porcentagens de conversão de xilana. A cinética de conversão de xilana obtida nos tempos analisados se encontra na Figura 41. Para o cálculo de atividade enzimática foi utilizado os valores de açúcares redutores obtidos nos tempos em a reação se manteve em velocidade máxima. O cálculo para encontrar a atividade de xilanase no extrato foi feito segundo a equação:

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

As atividades de xilanases encontradas foram de 43,4, 44,2 e 43,5 UI.mL⁻¹. A atividade média de xilanases no extrato foi de **43,7±0,5 UI.mL⁻¹**.

Figura 41: Cinética de conversão de xilana em xilose, utilizando o extrato *T. emersonii*.

APÊNDICE 4

4.1) Análise estatística (Teste de Tukey com 99% de confiança) da conversão de celulose alcançada pelos tratamentos com as enzimas comerciais (Celluclast), enzimas comerciais com albumina e as enzimas comerciais suplementadas com enzimas do fungo *G. trabeum* utilizando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino carga alta. Com carga enzimática AA (10 FPU/g de bagaço de cana)

<i>Tabela da Anova</i>	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Fator	2	181,9043655	90,95218274	8,233735591	0,011428878
Resíduos	8	88,37027299	11,04628412		

<i>Níveis</i>	<i>Centro</i>	<i>Limite.Inferior</i>	<i>Limite.Superior</i>	<i>P-valor</i>
Glicose Celluclast alb AA-Glicose Celluclast AA	7,81189	-1,8601	17,4839	0,0295
Glicose <i>G. trabeum</i> AA-Glicose Celluclast AA	8,49083	-1,1811	18,1628	0,0197
Glicose <i>G. trabeum</i> AA-Glicose Celluclast alb AA	0,67894	-10,1346	11,4925	0,9662

Fator	% de conversão
Glicose Celluclast AA	73,63520647
Glicose Celluclast AA	82,23822281
Glicose Celluclast AA	75,09328905
Glicose Celluclast AA	77,79357278
Glicose Celluclast AA	82,04905499
Glicose Celluclast alb AA	89,19197564
Glicose Celluclast alb AA	84,71011321
Glicose Celluclast alb AA	84,01920052
Glicose <i>G. trabeum</i> AA	84,8153513
Glicose <i>G. trabeum</i> AA	85,87386942
Glicose <i>G. trabeum</i> AA	89,26889072

Glicose Celluclast AA – somente enzimas comerciais, carga de 100% (10 FPU/g)

Glicose Celluclast alb AA – enzimas comerciais com adição de albumina, carga 100%

Glicose *G. trabeum* AA – 50% enzimas comerciais + 50% de enzimas de *G. trabeum*

4.2) Análise estatística (Teste de Tukey com 99% de confiança) da conversão de xilana alcançada pelos tratamentos com as enzimas comerciais (Celluclast), enzimas comerciais com albumina e as enzimas comerciais suplementadas com enzimas do fungo *G. trabeum* utilizando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino carga alta. Com carga enzimática AA (10 FPU/g de bagaço de cana).

<i>Tabela da Anova</i>	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Fator	2	297,5101292	148,7550646	12,07762901	0,003831351
Resíduos	8	98,53262722	12,3165784		

<i>Níveis</i>	<i>Centro</i>	<i>Limite.Inferior</i>	<i>Limite.Superior</i>	<i>P-valor</i>
Xilose Celluclast alb AA-Xilose Celluclast AA	11,3961	1,1831	21,6091	0,00539
Xilose <i>G. trabeum</i> AA-Xilose Celluclast AA	9,2485	-0,9644	19,4615	0,01687
Xilose <i>G. trabeum</i> AA-Xilose Celluclast alb AA	-2,1476	-13,5661	9,2708	0,74238

Fator	% de conversão
Xilose Celluclast AA	80,23490959
Xilose Celluclast AA	89,22444481
Xilose Celluclast AA	82,30932511
Xilose Celluclast AA	85,39331454
Xilose Celluclast AA	89,03044154
Xilose Celluclast alb AA	96,52819893
Xilose Celluclast alb AA	93,37564503
Xilose Celluclast alb AA	100
Xilose <i>G. trabeum</i> AA	92,96208509
Xilose <i>G. trabeum</i> AA	93,10702997
Xilose <i>G. trabeum</i> AA	97,39189103

Xilose Celluclast AA – somente enzimas comerciais, carga de 100% (10 FPU/g)

Xilose Celluclast alb AA – enzimas comerciais com adição de albumina, carga 100%

Xilose *G. trabeum* AA – 50% enzimas comerciais + 50% de enzimas de *G. trabeum*

4.3) Análise estatística (Teste de Tukey com 99% de confiança) da conversão de celulose alcançada pelos tratamentos com as enzimas comerciais (Celluclast), enzimas comerciais com albumina e as enzimas comerciais suplementadas com enzimas do fungo *G. trabeum* utilizando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino carga alta. Com carga enzimática de AM (5 FPU/g de bagaço de cana).

Tabela da Anova	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Fator	2	69,80864027	34,9043	12,1464	0,003766462
Resíduos	8	22,98901758	2,87362		

Níveis	Centro	Limite Inferior	Limite Superior	P-valor
Glicose Celluclast AM-Glicose Celluclast alb AM	-5,5104	-10,4436	-0,5773	0,0053
Glicose <i>G. trabeum</i> AM-Glicose Celluclast alb AM	-1,0149	-6,5303	4,5004	0,7515
Glicose <i>G. trabeum</i> AM-Glicose Celluclast AM	4,4955	-0,4376	9,4286	0,0163

Fator	% de conversão
Glicose Celluclast AM	73,84278972
Glicose Celluclast AM	75,53245842
Glicose Celluclast AM	74,63116261
Glicose Celluclast AM	75,91464655
Glicose Celluclast AM	76,93758899
Glicose Celluclast alb AM	80,41941493
Glicose Celluclast alb AM	83,14318738
Glicose Celluclast alb AM	79,08400571
Glicose <i>G. trabeum</i> AM	79,32356165
Glicose <i>G. trabeum</i> AM	82,17957772
Glicose <i>G. trabeum</i> AM	78,09857262

Glicose Celluclast AM – somente enzimas comerciais, carga de 50% (5 FPU/g)

Glicose Celluclast alb AM – enzimas comerciais com adição de albumina, carga 50%

Glicose *G. trabeum* AM – 25% enzimas comerciais + 25% de enzimas de *G. trabeum*

4.4) Análise estatística (Teste de Tukey com 99% de confiança) da conversão de xilana alcançada pelos com as enzimas comerciais (Celluclast), enzimas comerciais com albumina e as enzimas comerciais suplementadas com enzimas do fungo *G. trabeum* utilizando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino carga alta. Com carga enzimática AM (5 FPU/g de bagaço de cana).

<i>Tabela da Anova</i>	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Fator	2	468,5348251	234,2674126	68,71251142	9,158E-06
Resíduos	8	27,27508079	3,409385099		

<i>Níveis</i>	<i>Centro</i>	<i>Limite.Inferior</i>	<i>Limite.Superior</i>	<i>P-valor</i>
Xilose Celluclast AM-Xilose Celluclast alb AM	-9,4827	-14,8561	-4,1093	0,00028
Xilose G. trabeum AM-Xilose Celluclast alb AM	5,7979	-0,2096	11,8055	0,0121
Xilose G. trabeum AM-Xilose Celluclast AM	15,2807	9,9073	20,6540	8,70E-06

Fator	% de conversão
Xilose Celluclast AM	72,32228958
Xilose Celluclast AM	73,67423372
Xilose Celluclast AM	73,22179388
Xilose Celluclast AM	73,80236473
Xilose Celluclast AM	74,97056086
Xilose Celluclast alb AM	82,23854281
Xilose Celluclast alb AM	85,4543108
Xilose Celluclast alb AM	81,55013913
Xilose <i>G. trabeum</i> AM	87,79479317
Xilose <i>G. trabeum</i> AM	91,98283191
Xilose <i>G. trabeum</i> AM	86,85923196

Xilose Celluclast BM – somente enzimas comerciais, carga de 50% (5 FPU/g)

Xilose Celluclast alb BM – enzimas comerciais com adição de albumina, carga 50%

Xilose *G. trabeum* BM – 25% enzimas comerciais + 25% de enzimas de *G. trabeum*

4.5) Análise estatística (Teste de Tukey com 99% de confiança) da conversão de celulose alcançada pelos tratamentos com as enzimas comerciais (Celluclast), enzimas comerciais com albumina e as enzimas comerciais suplementadas com enzimas do fungo *G. trabeum* utilizando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino carga baixa. Com carga enzimática BA (10 FPU/g de bagaço de cana).

<i>Tabela da Anova</i>	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Fator	2	187,5305082	93,7652541	48,51197241	3,36672E-05
Resíduos	8	15,46261666	1,932827083		

<i>Níveis</i>	<i>Centro</i>	<i>Limite.Inferior</i>	<i>Limite.Superior</i>	<i>P-valor</i>
Glicose Celluclast BA-Glicose Celluclast alb BA	-9,9581	-14,0039	-5,9123	2,566E-05
Glicose G. trabeum BA-Glicose Celluclast alb BA	-5,3684	-9,8918	-0,8451	0,00374
Glicose G. trabeum BA-Glicose Celluclast BA	4,5896	0,5438	8,6354	0,00489

Fator	% de conversão
Glicose Celluclast BA	50,21862392
Glicose Celluclast BA	45,56909315
Glicose Celluclast BA	48,09858978
Glicose Celluclast BA	48,56222323
Glicose Celluclast BA	49,38895087
Glicose Celluclast alb BA	57,70397683
Glicose Celluclast alb BA	59,21174365
Glicose Celluclast alb BA	58,06124243
Glicose <i>G. trabeum</i> BA	54,02593373
Glicose <i>G. trabeum</i> BA	52,20331651
Glicose <i>G. trabeum</i> BA	52,64223759

Glicose Celluclast BA – somente enzimas comerciais, carga de 100% (10 FPU/g)

Glicose Celluclast alb BA – enzimas comerciais com albumina, carga 100%

Glicose G. trabeum BA – 50% enzimas comerciais + 50% de enzimas de *G. trabeum*

4.6) Análise estatística (Teste de Tukey com 99% de confiança) da conversão de xilana alcançada pelos tratamentos com as enzimas comerciais (Celluclast), enzimas comerciais com albumina e as enzimas comerciais suplementadas com enzimas do fungo *G. trabeum* utilizando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino carga baixa. Com carga enzimática de BA (10 FPU/g de bagaço de cana)

<i>Tabela da Anova</i>	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Fator	2	277,8064266	138,9032133	44,36995252	4,67668E-05
Resíduos	8	25,04455478	3,130569347		

<i>Níveis</i>	<i>Centro</i>	<i>Limite.Inferior</i>	<i>Limite.Superior</i>	<i>P-valor</i>
Xilose Celluclast BA-Xilose Celluclast alb BA	-11,8170	-16,9660	-6,6680	4,302E-05
Xilose G. trabeum BA-Xilose Celluclast alb BA	-10,0916	-15,8483	-4,3349	0,00029
Xilose G. trabeum BA-Xilose Celluclast BA	1,7253	-3,4235	6,8743	0,41641

Fator	% de conversão
Xilose Celluclast BA	46,49910255
Xilose Celluclast BA	43,10171823
Xilose Celluclast BA	44,85445352
Xilose Celluclast BA	45,21296511
Xilose Celluclast BA	46,22634104
Xilose Celluclast alb BA	56,78117665
Xilose Celluclast alb BA	57,77346439
Xilose Celluclast alb BA	56,43327096
Xilose <i>G. trabeum</i> BA	47,92105087
Xilose <i>G. trabeum</i> BA	43,63320175
Xilose <i>G. trabeum</i> BA	49,158684

Xilose Celluclast BA – somente enzimas comerciais, carga de 100% (10 FPU/g)

Xilose Celluclast alb BA – enzimas comerciais com albumina, carga 100%

Xilose *G. trabeum* BA – 50% enzimas comerciais + 50% de enzimas de *G. trabeum*

4.7) Análise estatística (Teste de Tukey com 99% de confiança) da conversão de celulose alcançada pelos tratamentos com as enzimas comerciais (Celluclast), enzimas comerciais com albumina e as enzimas comerciais suplementadas com enzimas do fungo *G. trabeum* utilizando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino carga baixa. Com carga enzimática de BM (5 FPU/g de bagaço de cana).

<i>Tabela da Anova</i>	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Fator	2	149,288815	74,64440748	8,767943074	0,009632881
Resíduos	8	68,10665338	8,513331673		

<i>Níveis</i>	<i>Centro</i>	<i>Limite.Inferior</i>	<i>Limite.Superior</i>	<i>P-valor</i>
Glicose Celluclast BM-Glicose Celluclast alb BM	-8,4498	-16,9408	0,0411	0,0102
Glicose G. trabeum BM-Glicose Celluclast alb BM	-7,9390	-17,4322	1,5541	0,02502
Glicose G. trabeum BM-Glicose Celluclast BM	0,5107	-7,9802	9,0017	0,96894

Fator	% de conversão
Glicose Celluclast BM	41,16048123
Glicose Celluclast BM	42,23350809
Glicose Celluclast BM	50,2516036
Glicose Celluclast BM	46,32407484
Glicose Celluclast BM	44,6552874
Glicose Celluclast alb BM	51,52559846
Glicose Celluclast alb BM	54,32300593
Glicose Celluclast alb BM	54,27595645
Glicose <i>G. trabeum</i> BM	46,18793597
Glicose <i>G. trabeum</i> BM	47,33001494
Glicose <i>G. trabeum</i> BM	42,78937234

Glicose Celluclast BM – somente enzimas comerciais, carga de 50% (5 FPU/g)

Glicose Celluclast alb BM – enzimas comerciais com albumina, carga 50%

Glicose *G. trabeum* BM – 25% enzimas comerciais + 25% de enzimas de *G. trabeum*

4.8) Análise estatística (Teste de Tukey com 99% de confiança) da conversão de xilana alcançada pelos tratamentos com as enzimas comerciais (Celluclast), enzimas comerciais com albumina e as enzimas comerciais suplementadas com enzimas do fungo *G. trabeum* utilizando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino carga baixa. Com carga enzimática de BM (5 FPU/g de bagaço de cana).

<i>Tabela da Anova</i>	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Fator	2	136,5936666	68,29683329	4,736609957	0,043940822
Resíduos	8	115,3514162	14,41892702		

<i>Níveis</i>	<i>Centro</i>	<i>Limite.Inferior</i>	<i>Limite.Superior</i>	<i>P-valor</i>
Xilose Celluclast BM-Xilose Celluclast alb BM	-8,4337	-19,4840	2,6165	0,03818
Xilose G. trabeum BM-Xilose Celluclast alb BM	-6,4874	-18,8420	5,8671	0,15284
Xilose G. trabeum BM-Xilose Celluclast BM	1,9463	-9,10400	12,9966	0,76916

<i>Fator</i>	<i>% de conversão</i>
Xilose Celluclast BM	36,41134872
Xilose Celluclast BM	37,7825886
Xilose Celluclast BM	44,62246825
Xilose Celluclast BM	40,75807239
Xilose Celluclast BM	40,31434543
Xilose Celluclast alb BM	46,6047619
Xilose Celluclast alb BM	49,06823274
Xilose Celluclast alb BM	49,56158853
Xilose <i>G. trabeum</i> BM	41,95126372
Xilose <i>G. trabeum</i> BM	47,84759385
Xilose <i>G. trabeum</i> BM	35,97338274

Xilose Celluclast BM – somente enzimas comerciais, carga de 50% (5 FPU/g)

Xilose Celluclast alb BM – enzimas comerciais com albumina, carga 50%

Xilose *G. trabeum* BM – 25% enzimas comerciais + 25% de enzimas de *G. trabeum*

APÊNDICE 5

5.1) Análise estatística (Teste de Tukey com 99% de confiança) da conversão de celulose alcançada pelos tratamentos com as enzimas comerciais (Celluclast) e as enzimas comerciais suplementadas com enzimas do fungo *T.emersonii* utilizando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino carga alta. Com carga enzimática de AA (10 FPU/g de bagaço de cana) e com carga enzimática de AM (5 FPU/g de bagaço de cana)

Tabela da Anova	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Fator	2	38,28545419	19,1427271	2,200013488	0,153468802
Resíduos	12	104,4142349	8,701186242		

Níveis	Centro	Limite.Inferior	Limite.Superior	P-valor
Glicose Celluclast AM-Glicose Celluclast AA	-2,7901	-9,4466	3,8663	0,3272
Glicose T. emersonii AA-Glicose Celluclast AA	-3,7714	-10,4279	2,8850	0,1493
Glicose T. emersonii AA-Glicose Celluclast AM	-0,9812	-7,6377	5,6752	0,8602

Fator	% de conversão
Glicose Celluclast AA	73,63520647
Glicose Celluclast AA	82,23822281
Glicose Celluclast AA	75,09328905
Glicose Celluclast AA	77,79357278
Glicose Celluclast AA	82,04905499
Glicose Celluclast AM	73,84278972
Glicose Celluclast AM	75,53245842
Glicose Celluclast AM	74,63116261
Glicose Celluclast AM	75,91464655
Glicose Celluclast AM	76,93758899
Glicose T. emersonii AA	69,27569931
Glicose T. emersonii AA	76,40081409
Glicose T. emersonii AA	75,97418544
Glicose T. emersonii AA	76,39970947
Glicose T. emersonii AA	73,90190504

Glicose Celluclast AA – enzimas comerciais (Celluclast), carga de 100% (10 FPU/g)

Glicose Celluclast AM – enzimas comerciais (Celluclast), carga de 50% (5 FPU/g)

Glicose *T. emersonii* AA – 50% enzimas comerciais + 50% de enzimas de *T. emersonii*

5.2) Análise estatística (Teste de Tukey com 99% de confiança) da conversão de xilana alcançada pelos tratamentos com as enzimas comerciais (Celluclast) e as enzimas comerciais suplementadas com enzimas do fungo *T.emersonii* utilizando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino carga alta. Com carga enzimática de AA (10 FPU/g de bagaço de cana) e com carga enzimática de AM (5 FPU/g de bagaço de cana)

<i>Tabela da Anova</i>	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Fator	2	403,1288931	201,5644465	23,16396464	7,58277E-05
Resíduos	12	104,419662	8,7016385		

<i>Níveis</i>	<i>Centro</i>	<i>Limite.Inferior</i>	<i>Limite.Superior</i>	<i>P-valor</i>
Xilose Celluclast AM-Xilose Celluclast AA	-11,6402	-18,2969	-4,9835	0,000118
Xilose <i>T. emersonii</i> AA-Xilose Celluclast AA	-10,2152	-16,8719	-3,5585	0,000385
Xilose <i>T. emersonii</i> AA-Xilose Celluclast AM	1,4249	-5,2316	8,0816	0,731324

Fator	% de conversão
Xilose Celluclast AA	80,23490959
Xilose Celluclast AA	89,22444481
Xilose Celluclast AA	82,30932511
Xilose Celluclast AA	85,39331454
Xilose Celluclast AA	89,03044154
Xilose Celluclast AM	72,32228958
Xilose Celluclast AM	73,67423372
Xilose Celluclast AM	73,22179388
Xilose Celluclast AM	73,80236473
Xilose Celluclast AM	74,97056086
Xilose <i>T. emersonii</i> AA	69,66512663
Xilose <i>T. emersonii</i> AA	76,13664317
Xilose <i>T. emersonii</i> AA	76,40476132
Xilose <i>T. emersonii</i> AA	77,1091401
Xilose <i>T. emersonii</i> AA	75,80044127

Xilose Celluclast AA – enzimas comerciais (Celluclast), carga de 100% (10 FPU/g)

Xilose Celluclast AM – enzimas comerciais (Celluclast), carga de 50% (5 FPU/g)

Xilose *T. emersonii* AA – 50% enzimas comerciais + 50% de enzimas de *T. emersonii*

5.3) Análise estatística (Teste de Tukey com 99% de confiança) da conversão de celulose alcançada pelos tratamentos com as enzimas comerciais (Celluclast) e as enzimas comerciais suplementadas com enzimas do fungo *T.emersonii* utilizando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino carga alta. Com carga enzimática de AM (5 FPU/g de bagaço de cana) e com carga enzimática de AB (2,5 FPU/g de bagaço de cana)

<i>Tabela da Anova</i>	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Fator	2	256,7910194	128,3955097	9,056469172	0,004004688
Resíduos	12	170,1265788	14,1772149		

<i>Níveis</i>	<i>Centro</i>	<i>Limite.Inferior</i>	<i>Limite.Superior</i>	<i>P-valor</i>
Glicose Celluclast AM-Glicose Celluclast AB	9,9981	1,5014	18,4948	0,00326
Glicose T. emersonii AM-Glicose Celluclast AB	3,5621	-4,9346	12,0588	0,32715
Glicose T. emersonii AM-Glicose Celluclast AM	-6,4360	-14,9327	2,06069	0,04702

<i>Fator</i>	<i>% de conversão</i>
Glicose Celluclast AM	73,84278972
Glicose Celluclast AM	75,53245842
Glicose Celluclast AM	74,63116261
Glicose Celluclast AM	75,91464655
Glicose Celluclast AM	76,93758899
Glicose Celluclast AB	66,50410086
Glicose Celluclast AB	64,07963751
Glicose Celluclast AB	64,31876492
Glicose Celluclast AB	65,36426034
Glicose Celluclast AB	66,60106039
Glicose T. emersonii AM	63,12796578
Glicose T. emersonii AM	63,32995818
Glicose T. emersonii AM	72,71598055
Glicose T. emersonii AM	67,73635769
Glicose T. emersonii AM	77,76820352

Glicose Celluclast AM – enzimas comerciais (Celluclast), carga de 50% (5 FPU/g)

Glicose Celluclast AB – enzimas comerciais (Celluclast), carga de 25% (2,5 FPU/g)

Glicose *T. emersonii* AM – 25% enzimas comerciais + 25% de enzimas de *T. emersonii*

5.4) Análise estatística (Teste de Tukey com 99% de confiança) da conversão de xilana alcançada pelos tratamentos com as enzimas comerciais (Celluclast) e as enzimas comerciais suplementadas com enzimas do fungo *T.emersonii* utilizando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino carga alta. Com carga enzimática de AM (5 FPU/g de bagaço de cana) e com carga enzimática de AB (2,5 FPU/g de bagaço de cana).

<i>Tabela da Anova</i>	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Fator	2	308,2243701	154,1121851	12,7998788	0,001056762
Resíduos	12	144,4815415	12,04012846		

<i>Níveis</i>	<i>Centro</i>	<i>Limite.Inferior</i>	<i>Limite.Superior</i>	<i>P-valor</i>
Xilose Celluclast AM-Xilose Celluclast AB	9,3361	1,5059	17,1663	0,00296
Xilose <i>T. emersonii</i> AM-Xilose Celluclast AB	-0,5371	-8,3673	7,2930	0,96760
Xilose <i>T. emersonii</i> AM-Xilose Celluclast AM	-9,8733	-17,7034	-2,0431	0,00194

<i>Fator</i>	<i>% de conversão</i>
Xilose Celluclast AM	72,32228958
Xilose Celluclast AM	73,67423372
Xilose Celluclast AM	73,22179388
Xilose Celluclast AM	73,80236473
Xilose Celluclast AM	74,97056086
Xilose Celluclast AB	63,44511733
Xilose Celluclast AB	63,44485696
Xilose Celluclast AB	63,87328358
Xilose Celluclast AB	64,61618077
Xilose Celluclast AB	65,93101129
Xilose <i>T. emersonii</i> AM	61,8274999
Xilose <i>T. emersonii</i> AM	59,53759249
Xilose <i>T. emersonii</i> AM	71,77650495
Xilose <i>T. emersonii</i> AM	67,66536644
Xilose <i>T. emersonii</i> AM	57,81773304

Xilose Celluclast AM – enzimas comerciais (Celluclast), carga de 50% (5 FPU/g)

Xilose Celluclast AB – enzimas comerciais (Celluclast), carga de 25% (2,5 FPU/g)

Xilose *T. emersonii* AM – 25% enzimas comerciais + 25% de enzimas de *T. emersonii*

5.5) Análise estatística (Teste de Tukey com 99% de confiança) da conversão de celulose alcançada pelos tratamentos com as enzimas comerciais (Celluclast) e as enzimas comerciais suplementadas com enzimas do fungo *T.emersonii* utilizando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino carga baixa. Com carga enzimática de BA (10 FPU/g de bagaço de cana) e com carga enzimática de BM (5 FPU/g de bagaço de cana)

<i>Tabela da Anova</i>	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Fator	2	111,1203849	55,56019243	8,080005166	0,005988122
Resíduos	12	82,51508452	6,876257043		

<i>Níveis</i>	<i>Centro</i>	<i>Limite.Inferior</i>	<i>Limite.Superior</i>	<i>P-valor</i>
Glicose Celluclast BM-Glicose Celluclast BA	-3,4425	-9,3599	2,4749	0,1368
Glicose T. emersonii BA-Glicose Celluclast BA	-6,6657	-12,5831	-0,7483	0,00447
Glicose T. emersonii BA-Glicose Celluclast BM	-3,2232	-9,14066	2,6941	0,16907

<i>Fator</i>	<i>% de conversão</i>
Glicose Celluclast BA	50,21862392
Glicose Celluclast BA	45,56909315
Glicose Celluclast BA	48,09858978
Glicose Celluclast BA	48,56222323
Glicose Celluclast BA	49,38895087
Glicose Celluclast BM	41,16048123
Glicose Celluclast BM	42,23350809
Glicose Celluclast BM	50,2516036
Glicose Celluclast BM	46,32407484
Glicose Celluclast BM	44,6552874
Glicose <i>T. emersonii</i> BA	41,02089474
Glicose <i>T. emersonii</i> BA	42,91177121
Glicose <i>T. emersonii</i> BA	38,24968363
Glicose <i>T. emersonii</i> BA	43,45386387
Glicose <i>T. emersonii</i> BA	42,87255321

Glicose Celluclast BA – enzimas comerciais (Celluclast), carga de 100% (10 FPU/g)

Glicose Celluclast BM – enzimas comerciais (Celluclast), carga de 50% (5 FPU/g)

Glicose *T. emersonii* BA – 50% enzimas comerciais + 50% de enzimas de *T. emersonii*

5.6) Análise estatística (Teste de Tukey com 99% de confiança) da conversão de xilana alcançada pelos tratamentos com as enzimas comerciais (Celluclast) e as enzimas comerciais suplementadas com enzimas do fungo *T.emersonii* utilizando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino carga baixa. Com carga enzimática de BA (10 FPU/g de bagaço de cana) e com carga enzimática de BM (5 FPU/g de bagaço de cana)

<i>Tabela da Anova</i>	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Fator	2	167,5453631	83,77268156	14,62903303	0,000605389
Resíduos	12	68,71760946	5,726467455		

<i>Níveis</i>	<i>Centro</i>	<i>Limite.Inferior</i>	<i>Limite.Superior</i>	<i>P-valor</i>
Xilose Celluclast BM-Xilose Celluclast BA	-5,2011	-10,6012	0,1989	0,01265
Xilose <i>T. emersonii</i> BA-Xilose Celluclast BA	-8,0754	-13,4755	-2,6754	0,00048
Xilose <i>T. emersonii</i> BA-Xilose Celluclast BM	-2,8743	-8,2744	2,5257	0,18123

Fator	% de conversão
Xilose Celluclast BA	46,49910255
Xilose Celluclast BA	43,10171823
Xilose Celluclast BA	44,85445352
Xilose Celluclast BA	45,21296511
Xilose Celluclast BA	46,22634104
Xilose Celluclast BM	36,41134872
Xilose Celluclast BM	37,7825886
Xilose Celluclast BM	44,62246825
Xilose Celluclast BM	40,75807239
Xilose Celluclast BM	40,31434543
Xilose <i>T. emersonii</i> BA	35,7507337
Xilose <i>T. emersonii</i> BA	38,04226758
Xilose <i>T. emersonii</i> BA	33,74269211
Xilose <i>T. emersonii</i> BA	38,49409751
Xilose <i>T. emersonii</i> BA	39,48736677

Xilose Celluclast BA – enzimas comerciais (Celluclast), carga de 100% (10 FPU/g)

Xilose Celluclast BM – enzimas comerciais (Celluclast), carga de 50% (5 FPU/g)

Xilose *T. emersonii* BA – 50% enzimas comerciais + 50% de enzimas de *T. emersonii*

5.7) Análise estatística (Teste de Tukey com 99% de confiança) da conversão de celulose alcançada pelos tratamentos com as enzimas comerciais (Celluclast) e as enzimas comerciais suplementadas com enzimas do fungo *T.emersonii* utilizando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino carga baixa. Com carga enzimática de BM (5 FPU/g de bagaço de cana) e com carga enzimática de BB (2,5 FPU/g de bagaço de cana).

<i>Tabela da Anova</i>	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Fator	2	205,3987465	102,6993733	17,59913631	0,000270104
Resíduos	12	70,02573635	5,835478029		

<i>Níveis</i>	<i>Centro</i>	<i>Limite.Inferior</i>	<i>Limite.Superior</i>	<i>P-valor</i>
Glicose Celluclast BM-Glicose Celluclast BB	7,6338	2,1826	13,0850	0,00083
Glicose T. emersonii BM-Glicose Celluclast BB	-0,4154	-5,8666	5,0357	0,96018
Glicose T. emersonii BM-Glicose Celluclast BM	-8,0492	-13,5005	-2,5980	0,00053

Fator	% de conversão
Glicose Celluclast BM	41,16048123
Glicose Celluclast BM	42,23350809
Glicose Celluclast BM	50,2516036
Glicose Celluclast BM	46,32407484
Glicose Celluclast BM	44,6552874
Glicose Celluclast BB	35,64959551
Glicose Celluclast BB	39,10558832
Glicose Celluclast BB	37,31902876
Glicose Celluclast BB	37,1689618
Glicose Celluclast BB	37,21260159
Glicose <i>T. emersonii</i> BM	33,90347445
Glicose <i>T. emersonii</i> BM	37,41900275
Glicose <i>T. emersonii</i> BM	38,42581267
Glicose <i>T. emersonii</i> BM	37,68932357
Glicose <i>T. emersonii</i> BM	36,94085433

Glicose Celluclast BM – enzimas comerciais (Celluclast), carga de 50% (5 FPU/g)

Glicose Celluclast BB – enzimas comerciais (Celluclast), carga de 25% (2,5 FPU/g)

Glicose *T. emersonii* BM – 25% enzimas comerciais + 25% de enzimas de *T. emersonii*

5.8) Análise estatística (Teste de Tukey com 99% de confiança) da conversão de xilana alcançada pelos tratamentos com as enzimas comerciais (Celluclast) e as enzimas comerciais suplementadas com enzimas do fungo *T.emersonii* utilizando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino carga baixa. Com carga enzimática de BM (5 FPU/g de bagaço de cana) e com carga enzimática de BB (2,5 FPU/g de bagaço de cana).

Tabela da Anova	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Fator	2	960,3961721	480,198086	121,740874	1,07381E-08
Resíduos	12	47,33313342	3,944427785		

Níveis	Centro	Limite.Inferior	Limite.Superior	P-valor
Xilose Celluclast BM-Xilose Celluclast BB	9,7405	5,2587	14,2223	1,431E-05
Xilose T. emersonii BM-Xilose Celluclast BB	-9,8592	-14,3410	-5,3775	1,266E-05
Xilose T. emersonii BM-Xilose Celluclast BM	-19,5998	-24,0816	-15,1180	6,941E-09

Fator	% de conversão
Xilose Celluclast BM	36,41134872
Xilose Celluclast BM	37,7825886
Xilose Celluclast BM	44,62246825
Xilose Celluclast BM	40,75807239
Xilose Celluclast BM	40,31434543
Xilose Celluclast BB	28,96112583
Xilose Celluclast BB	31,99668284
Xilose Celluclast BB	29,86883059
Xilose Celluclast BB	30,4886443
Xilose Celluclast BB	29,87079416
Xilose T. emersonii BM	19,58566705
Xilose T. emersonii BM	19,82824019
Xilose T. emersonii BM	21,48868659
Xilose T. emersonii BM	20,84841906
Xilose T. emersonii BM	20,13860529

Xilose Celluclast BM – enzimas comerciais (Celluclast), carga de 50% (5 FPU/g)

Xilose Celluclast BB – enzimas comerciais (Celluclast), carga de 25% (2,5 FPU/g)

Xilose *T. emersonii* BM – 25% enzimas comerciais + 25% de enzimas de *T. emersonii*