

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ANA SÍLVIA DE ALMEIDA SCARCELLA

Cultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em resíduos agroindustriais: consórcio microbiano no desenvolvimento de um coquetel enzimático para sacarificação de cana-de-açúcar

Ribeirão Preto  
2020

ANA SÍLVIA DE ALMEIDA SCARCELLA

Cultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em resíduos agroindustriais: consórcio microbiano no desenvolvimento de um coquetel enzimático para sacarificação de cana-de-açúcar

**Versão Corrigida**

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

Área de Concentração: Bioquímica

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

Ribeirão Preto

2020

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

Serviço de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Scarcella, Ana Sílvia de Almeida

Cultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em resíduos agroindustriais: consórcio microbiano no desenvolvimento de um coquetel enzimático para sacarificação de cana-de-açúcar. Ribeirão Preto, 2020.

267 p.: il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica. Versão Corrigida.

Orientadora: Polizeli, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes.

1. *Mycothermus thermophilus*. 2. *Trichoderma reesei* RP698. 3. Consórcio enzimático. 4. Sacarificação de cana-de-açúcar. 5. Sacarificação de Cana Energia. 6. Secretoma.

SCARCELLA, ASA. Cultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em resíduos agroindustriais: consórcio microbiano no desenvolvimento de um coquetel enzimático para sacarificação de cana-de-açúcar [doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2020.

Aprovado em:

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_



## **APOIO E SUPORTE FINANCEIRO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, por meio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2014/50884-5), e do Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 465319 / 2014-9) e Acordos de Cooperação / FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia de Portugal / FCT - Projeto de Pesquisa – Regular (FAPESP 2018/07522-6).

## **NORMALIZAÇÃO ADOTADA**

Esta tese está de acordo com:

Diretrizes para apresentações de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver) / Sistema Integrado de Bibliotecas da USP; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro... [et al.] - - 3. ed. rev. ampl. mod. - -São Paulo: SIBi/USP, 2016. 100p.: il. - - (Caderno de estudos; 9).

DOI: 10.11606/9788573140569

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, com amor e gratidão pela força, compreensão, carinho, presença e apoio incondicional ao longo desta jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Lúcia e Luiz Carlos, à minha irmã Ana Carolina e minha tia Luiza por estarem sempre ao meu lado ao longo do desenvolvimento e elaboração deste trabalho. Ao meu sobrinho e afilhado Lorenzo por todos os momentos de bagunças que possibilitaram momentos de distração e alegria durante esta jornada.

À professora Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli pela confiança, apoio e dedicação no exercício de me orientar.

Ao Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge por todo o suporte prestado ao longo destes anos. À Dra. Adriana Grandis pela ajuda nas discussões dos dados obtidos.

À Dra. Monica Stropa Ferreira Nozawa pelo apoio, paciência e todo ensinamento transmitido durante minha jornada pela pós-graduação.

À Dra. Monalisa Carneiro Sampaio (CCA – UFSCar, Araras - SP), ao Dr. Mauro Xavier (IAC, Ribeirão Preto – SP) e ao Dr. Júlio Cezar Araujo do Espírito Santo (GranBio) por disponibilizar o material vegetal utilizado neste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Maurício Cauti e o Dr. Cláudio Roberto Neri, do Departamento de Química da FFCLRP, pelas análises termogravimétricas.

Ao Renato Augusto Corrêa dos Santos pela colaboração com as análises de bioinformática.

Aos amigos e companheiros de laboratório pela amizade, convivência e pela gentil ajuda para a conclusão deste trabalho, Alex, Ana Vici, Emanuelle, Enrico, Guilherme, Juliana, Malena, Monica, Paula, Rosy, Tássio, Thiago, Vanessa, Yuri.

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

Aos amigos Henrique, Fabiano, Letícia, Natália, Izabela pela caminhada e apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao pessoal do Departamento de Bioquímica e Imunologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por todo o suporte oferecido ao longo destes quatro anos de estudos e aprendizados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol pelo apoio para a realização deste trabalho.

## RESUMO

SCARCELLA, ASA. Cultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em resíduos agroindustriais: consórcio microbiano no desenvolvimento de um coquetel enzimático para sacarificação de cana-de-açúcar [doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2020.

O aumento da atividade agroindustrial levou ao acúmulo de grandes quantidades de biomassa lignocelulósica. Este tipo de material é a fonte mais abundante de carbono renovável da natureza, representando um valioso substrato industrial com potencial biotecnológico. O custo da produção de bioetanol a partir de resíduos agroindustriais depende, em grande parte, da biomassa recalcitrante e das enzimas envolvidas na sacarificação da parede celular, sendo necessária a otimização da produção enzimática para minimizar este fator. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo a elaboração e otimização de um coquetel enzimático obtido a partir dos fungos *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 visando a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar (SCB), cana-de-açúcar SP80-3280 e Cana Energia (EC). O cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em palha de milho apresentou os melhores resultados de sacarificação, liberando  $40,40 \pm 2,81 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de açúcar redutor (AR) para SCB,  $30,33 \pm 1,39 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR para EC e  $33,18 \pm 1,04 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR para SP80-3280, sendo os principais açúcares liberados glucose e xilose. Além disso, foi realizada uma investigação, por análise proteômica, das enzimas secretadas por estes microrganismos quando crescidos em cana-de-açúcar SP80-3280, Cana Energia e palha de milho como única fonte de carbono. Como resultado do secretoma do cultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 crescidos em cana-de-açúcar SP80-3280 e Cana Energia foram identificadas 56 proteínas relacionadas à degradação da parede celular vegetal em todas as condições analisadas, entre elas glicosil hidrolases, carboidratos esterases e proteínas de atividades auxiliares. Já no cocultivo dos microrganismos crescidos em palha de milho durante 5 dias, foram identificadas 27 proteínas divididas entre celulases, hemicelulases, pectinases e proteínas de atividades auxiliares. Foram identificadas duas proteínas não descritas para estes fungos até o momento, sendo elas a ácido celobiônico fosforilase e a 4-O-metil glucurônico metil esterases. Ademais, estudou-se o efeito de diferentes pré-tratamentos das biomassas, sendo que o pré-tratamento

alcalino possibilitou melhor sacarificação das biomassas, mostrando um aumento na quantidade dos açúcares liberados e alcançando  $215,01 \pm 11,02 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR para a hidrólise de SCB,  $177,16 \pm 16,00 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR para EC e  $220,64 \pm 29,02 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR para SP80-3280. Foram aplicados diferentes coquetéis na hidrólise de cana-de-açúcar comercial, Cana Energia tipo I e tipo II proveniente da GranBio, comprovando que os melhores resultados de liberação de AR foram gerados após o uso do coquetel obtido pelo cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em palha de milho. Todos os resultados demonstraram que existe uma forte correlação entre a enzimas a serem utilizadas e a composição da biomassa. Foi observado ainda, os benefícios do cocultivo de microrganismos para a obtenção de um coquetel diversificado com elevado potencial de aplicação e de baixo custo.

Palavras-chaves: *Mycothermus thermophilus*. *Trichoderma reesei* RP698. Consórcio enzimático. Sacarificação de cana-de-açúcar. Sacarificação de Cana Energia. Secretoma.

## ABSTRACT

SCARCELLA, ASA. Cultivation of *Mycothermus thermophilus* and *Trichoderma reesei* RP698 in agro-industrial residues: microbial consortium in the development of an enzymatic cocktail for saccharification of sugarcane [thesis]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2020.

The increase in agro-industrial activity led to the accumulation of large amounts of lignocellulosic biomass. This kind of material is the most abundant source of renewable carbon in nature, representing a valuable industrial substrate with biotechnological potential. The cost of bioethanol producing from agro-industrial residues depends, in large extend, on the recalcitrant biomass and the enzymes involved in the saccharification of the cell wall, what makes the optimization of the enzymatic production necessary in order to minimize this factor. Therefore, this work focused on the elaboration and optimization of an enzymatic cocktail obtained from the fungi *Mycothermus thermophilus* and *Trichoderma reesei* RP698 aiming at the saccharification of sugarcane bagasse (SCB), sugarcane SP80-3280 and energy cane (EC). The co-cultivation of *M. thermophilus* and *T. reesei* RP698 in corn straw showed the best saccharification results , releasing  $40.40 \pm 2.81 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  of reducing sugar (RS) for SCB,  $30.33 \pm 1.39 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  of RS for EC and  $33.18 \pm 1.04 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  of RS for SP80-3280, the main sugars released were glucose and xylose. Also, an investigation by proteomic analysis of the enzymes secreted by these microorganisms, grown in sugarcane SP80-3280, energy cane and corn straw as the only carbon source, was carried out. As a result of the secretome of the cultivation of *M. thermophilus* and *T. reesei* RP698 grown in sugarcane SP80-3280 and energy cane, 56 proteins related to the degradation of the plant cell wall, were identified in all conditions analyzed, including glycosyl hydrolases, carbohydrates esterases and auxiliary activity proteins. Twenty-seven proteins were identified in the cultivation of microorganisms grown in corn straw for 5 days. These proteins are divided into cellulases, hemicellulases, pectinases and proteins of auxiliary activities. Two proteins, which were not described for these fungi so far, have also been identified. They were named as cellobionic acid phosphorylase and 4-O-methyl glucuronic methyl esterases. In addition, the effect of different biomass pretreatments was studied, and the alkaline pretreatment enabled a better saccharification of the biomass, showing an increase in



the amount of sugars released, reaching  $215.01 \pm 11.02 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  of RS for SCB hydrolysis,  $177.16 \pm 16.00 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  of RS for EC and  $220.64 \pm 29.02 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  of RS for SP80-3280. Different cocktails were applied in the hydrolysis of commercial sugar cane, energy cane type I and type II from GranBio, proving that the best results of AR release were generated after the use of the cocktail obtained by the co-cultivation of *M. thermophilus* and *T reesei* RP698 grown in corn straw. All the results showed that there is a strong correlation between the enzymes to be used in the saccharification process and the composition of the biomass. The benefits of microorganism co-cultivation was also verified in obtaining a diversified cocktail with high application potential at low cost.

Keywords: *Mycothermus thermophilus*. *Trichoderma reesei* RP698. Enzymatic consortium. Sugarcane saccharification. Energy Cane saccharification. Secretome.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A unidade básica da arquitetura da parede celular da cana-de-açúcar.....	31
<b>Figura 2.</b> Esquema comparativo da cana-de-açúcar e Cana Energia tipo I e II.....	33
<b>Figura 3.</b> Esquema da ação das enzimas hemicelulolíticas. ....	35
<b>Figura 4.</b> Estrutura da celulose e ação de enzimas na hidrólise da celulose. ....	38
<b>Figura 5.</b> Diagrama esquemático da utilização do ácido aldônico em <i>Neurospora crassa</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	42
<b>Figura 6.</b> Esquema da bioconversão da biomassa lignocelulósica em etanol de segunda geração.....	44
<b>Figura 7.</b> Esquema hipotético para degradação da parede celular da cana-de-açúcar. ....	49
<b>Figura 8.</b> Aplicação de extratos enzimáticos produzidos por fungos filamentosos crescidos em bagaço de cana-de-açúcar (SCB) e Cana Energia (EC) na hidrólise de: (A) SCB e; (B) EC. ....	80
<b>Figura 9.</b> <i>Heatmap</i> do padrão de produção de holocelulases por <i>Mycothermus thermophilus</i> cultivado em (A) SCB; (B) EC; (C) SP80-3280 por 5 dias. ....	82
<b>Figura 10.</b> <i>Heatmap</i> do padrão de produção de holocelulases por <i>Trichoderma reesei</i> RP698 cultivado em (A) SCB; (B) EC; (C) SP80-3280 por 5 dias.....	84
<b>Figura 11.</b> Ensaio de confronto com <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 a: 30 °C (A), 35 °C (B) e 40 °C (C). ....	93
<b>Figura 12.</b> Microscopia eletrônica de varredura da cana-de-açúcar antes (A, C e E) e após (B, D e F) tratamento enzimático. (A e B) bagaço de cana (SCB); (C e D) Cana Energia (EC); (E e F) cana-de-açúcar SP80-3280. ....	98
<b>Figura 13.</b> Análise termogravimétrica da cana-de-açúcar antes (A, C e E) e após (B, D e F) tratamento enzimático. (A e B) bagaço de cana (SCB); (C e D) Cana Energia (EC); (E e F) cana-de-açúcar SP80-3280. ....	100
<b>Figura 14.</b> Análise das enzimas obtidas a partir da produção do coquetel em biorreator.....	102
<b>Figura 15.</b> Secreção proteica obtida a partir do cocultivo de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 crescidos em palha de milho em biorreator do tipo tanque agitado.....	103
<b>Figura 16.</b> Sacarificação enzimática das canas SCB, EC e SP80-3280 pela aplicação do coquetel obtido a partir do cocultivo de <i>M. thermophilus</i> e <i>T. reesei</i> RP698 crescidos	

em palha de milho em biorreator do tipo tanque agitado. ....	104
<b>Figura 17.</b> Caracterização do coquetel enzimático em relação à: (A) temperatura; (B) pH e (C) carga de proteínas na sacarificação das canas SCB, EC e SP80-3280...	107
<b>Figura 18.</b> Caracterização do coquetel enzimático em relação à: (A) tempo de hidrólise; (B) porcentagem de biomassa e (C) influência de surfactantes na liberação de açúcares redutores das canas SCB, EC e SP80-3280. ....	109
<b>Figura 19.</b> Cromatografia de camada delgada da liberação de açúcares após: 96 horas (SP80-3280); 24 horas (SCB) e 48 horas (EC) de hidrólise enzimática.....	111
<b>Figura 20.</b> Representação das CAZymes detectadas no secretoma de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 em palha de milho (PM) e glucose (Glu). ....	118
<b>Figura 21.</b> Hidrólise enzimática da cana-de-açúcar SP80-3280 e da Cana Energia (EC) por extratos de <i>Trichoderma reesei</i> RP698, <i>Mycothermus thermophilus</i> e o cocultivo destes microrganismos crescidos em SP80 e EC durante 5 dias. ....	127
<b>Figura 22.</b> <i>Heatmap</i> do número de enzimas de cada família CAZY secretadas por <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>T. reesei</i> RP698 em cultivos únicos e cocultivo após 1 e 2, 5 e 7 e 8 dias (d) de crescimento em SP80-3280 e EC. ....	141
<b>Figura 23.</b> Representação comparativa da detecção de CAZymes dos fungos <i>Mycothermus thermophilus</i> (Mt) e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 (Tr) em cultivos únicos e cocultivo em: (A): glucose; (B) cana-de-açúcar SP80-3280 e (C) EC.....	143
<b>Figura 24.</b> Representação comparativa da detecção de CAZymes em glucose, cana-de-açúcar SP80-3280 e EC por: (A) <i>Mycothermus thermophilus</i> ; (B) <i>Trichoderma reesei</i> RP698 e (C) cocultivo.....	144
<b>Figura 25.</b> Representação da detecção de CAZymes a partir do cocultivo durante 5 dias em glucose, cana-de-açúcar SP80-3280, EC e PM. ....	150
<b>Figura 26.</b> Liberação de açúcares redutores, em $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ , após aplicação do coquetel obtido pelo cocultivo de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 em palha de milho em (A) bagaço de cana-de-açúcar (SCB); (B) Cana Energia (EC); (C) cana-de-açúcar variedade SP80-3280.....	157
<b>Figura 27.</b> Cromatografia de camada delgada dos hidrolisados de SCB; SP80-3280 e EC após pré-tratamento: alcalino (NaOH); alcalino com peróxido de hidrogênio (NaOH:H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ); <i>organosolv</i> (Organ); <i>organosolv</i> com ácido sulfúrico (Organ:H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) e Autohidrólise.....	159
<b>Figura 28.</b> Cromatografia de camada delgada dos hidrolisados de SCB; SP80-3280 e	

EC após pré-tratamento com lacase. ....	160
<b>Figura 29.</b> Cromatografia de camada delgada dos hidrolisados de SCB; SP80-3280 e EC após pré-tratamento com Hidróxido de Sódio 4% e diferentes tempos de exposição. ....	162
<b>Figura 30.</b> Cromatografia de camada delgada dos hidrolisados de SCB; SP80-3280 e EC após pré-tratamento com NaOH em diferentes concentrações.....	163
<b>Figura 31.</b> Modelo hipotético da degradação dos componentes da parede celular de cana-de-açúcar. ....	196

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Enzimas responsáveis pela degradação da lignina. ....	34
<b>Tabela 2.</b> Enzimas responsáveis pela degradação da cadeia principal da xilana.....	36
<b>Tabela 3.</b> Enzimas responsáveis pela degradação da hemicelulose.....	37
<b>Tabela 4.</b> Enzimas necessárias para hidrólise da celulose.....	40
<b>Tabela 5.</b> Enzimas envolvidas na degradação da pectina. ....	43
<b>Tabela 6.</b> Variedades e partes das canas-de-açúcar estudadas para produção de etanol de segunda geração. ....	55
<b>Tabela 7.</b> Desenho experimental para análise do secretoma de <i>Trichoderma reesei</i> RP698 e <i>Mycothermus thermophilus</i> . ....	68
<b>Tabela 8.</b> Produção de holocelulases pelos fungos filamentosos cultivados em bagaço de cana-de-açúcar (SCB).....	75
<b>Tabela 9.</b> Produção de holocelulases pelos fungos filamentosos cultivados em Cana Energia (EC).....	77
<b>Tabela 10.</b> Composição do bagaço de cana-de-açúcar (SCB), colmo de Cana Energia (EC) e cana-de-açúcar SP80-3280. ....	78
<b>Tabela 11.</b> Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar (SCB), Cana Energia (EC) e cana de açúcar SP80-3280 com extratos obtidos por <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 cultivados em SP80-3280.....	86
<b>Tabela 12.</b> Sacarificação de SCB, EC e SP80-3280 pelos extratos enzimáticos de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 produzidos em meio suplementado com diferentes resíduos.....	89
<b>Tabela 13.</b> Produção enzimática pelos fungos <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 em palha de milho (PM) e sabugo de milho (SM).....	91
<b>Tabela 14.</b> Relação de crescimento de <i>Trichoderma reesei</i> RP698 e <i>Mycothermus thermophilus</i> em diferentes temperaturas ( $\text{mm}^2 \text{d}^{-1}$ ).....	92
<b>Tabela 15.</b> Hidrólise enzimática da cana-de-açúcar a partir do cocultivo de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 em palha de milho (PM) e sabugo de milho (SM). ....	94
<b>Tabela 16.</b> Extratos enzimáticos do cocultivo de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 produzidos em meio suplementado com PM e SM a 35 e 40 °C. ....	96
<b>Tabela 17.</b> Secreção de proteínas pelo cocultivo de <i>Mycothermus thermophilus</i> e	

<i>Trichoderma reesei</i> RP698 em glucose e palha de milho (PM). .....	113
<b>Tabela 18.</b> CAZymes detectadas no secretoma do cocultivo de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698. ....	115
<b>Tabela 19.</b> Número de enzimas de cada família CAZy secretadas pelo cocultivo de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 em glucose e palha de milho após 5 dias de cultivo. ....	117
<b>Tabela 20.</b> Produção de proteínas por <i>Mycothermus thermophilus</i> em função do tempo de cultivo e da fonte de carbono. ....	121
<b>Tabela 21.</b> Produção de proteínas por <i>Trichoderma reesei</i> RP698 em função do tempo de cultivo e da fonte de carbono. ....	122
<b>Tabela 22.</b> Produção de proteínas pelo cocultivo de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 em função do tempo de cultivo e da fonte de carbono. ....	123
<b>Tabela 23.</b> Produção enzimática pelos fungos <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP689 em cultivos únicos e cocultivo crescidos em glucose, cana-de-açúcar SP80-3280 e Cana Energia durante diferentes tempos. ....	125
<b>Tabela 24.</b> CAZymes detectadas no secretoma de <i>Mycothermus thermophilus</i> . ...	129
<b>Tabela 25.</b> CAZymes detectadas no secretoma de <i>Trichoderma reesei</i> RP698. ....	132
<b>Tabela 26.</b> CAZymes detectadas no secretoma do cocultivo de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698. ....	135
<b>Tabela 27.</b> CAZymes detectadas pelos cultivos únicos e cocultivo <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 em glucose, cana-de-açúcar SP80-3280 e Cana Energia (EC) em diferentes tempos de cultivo. ....	145
<b>Tabela 28.</b> CAZymes detectadas no quinto dia de cocultivo de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 em diferentes fontes de carbono. ....	151
<b>Tabela 29.</b> Composição dos açúcares ( $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de biomassa seca) do bagaço de cana-de-açúcar (SCB), Cana Energia (EC) e cana-de-açúcar SP80-3280 <i>in natura</i> e após diferentes pré-tratamentos. ....	156
<b>Tabela 30.</b> Liberação de açúcares redutores, em $\mu\text{mol/mL}$ , após aplicação do coquetel enzimático otimizado nas biomassas pré-tratadas com Hidróxido de Sódio (NaOH) 4% durante diferentes tempos de exposição. ....	161
<b>Tabela 31.</b> Liberação de açúcares redutores, em $\mu\text{mol/mL}$ , após aplicação do coquetel enzimático otimizado nas biomassas pré-tratadas com diferentes concentrações de Hidróxido de Sódio (NaOH) durante 60 minutos. ....	163

<b>Tabela 32.</b> Sacarificação enzimática das canas comerciais utilizadas pela GranBio após aplicação de diferentes coquetéis produzidos por <i>Mycothermus thermophilus</i> (Mt) e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 (Tr) em SCB, EC e SP80. ....	167
<b>Tabela 33.</b> Sacarificação enzimática das canas energia tipo I utilizadas pela GranBio após aplicação de diferentes coquetéis produzidos por <i>Mycothermus thermophilus</i> (Mt) e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 (Tr) em SCB, EC e SP80.....	169
<b>Tabela 34.</b> Sacarificação enzimática das canas energia do tipo II utilizadas pela GranBio após aplicação de diferentes coquetéis produzidos por <i>Mycothermus thermophilus</i> (Mt) e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 (Tr) em SCB, EC e SP80.....	171
<b>Tabela 35.</b> Sacarificação enzimática das canas com maior teor de açúcares utilizadas pela GranBio após aplicação do coquetel obtido pelo cocultivo de <i>Mycothermus thermophilus</i> (Mt) e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 (Tr) em palha de milho (PM). ....	174

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>DNS:</b> ácido 3,5-dinitrosalicílico	<b>GH:</b> glicosil hidrolase
<b>TCA:</b> ácido tricloroacético	<b>HMF:</b> hidroximetilfurfural
<b>TFA:</b> ácido trifluoroacético	<b>HPLC:</b> <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
<b>AA:</b> atividade auxiliar	<b>MAN:</b> mananase
<b>AIR:</b> <i>alcohol insoluble residue</i>	<b>MEV:</b> Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>AR:</b> açúcar redutor	<b>PA:</b> palha de arroz
<b>TGA:</b> análise termogravimétrica	<b>PF:</b> palha de feijão
<b>ARA:</b> arabinanase	<b>PM:</b> palha de milho
<b>ARF:</b> arabinofuranosidase	<b>p/v:</b> peso por volume
<b>AXE:</b> acetil xilano esterase	<b>PGase:</b> poligalacturonase
<b>SCB:</b> bagaço de cana-de-açúcar	<b>pH:</b> potencial hidrogeniônico
<b>BDA:</b> batata dextrose ágar	<b>SM:</b> sabugo de milho
<b>BGAL:</b> $\beta$ -galactosidase	<b>2G:</b> segunda geração
<b>BGL:</b> $\beta$ -glucosidase	<b>TLC:</b> <i>Thin Layer Chromatography</i>
<b>BXI:</b> $\beta$ -xilosidase	<b>v.v.m.:</b> volume de ar por volume de meio por minuto
<b>BC:</b> bagaço de cevada	<b>XYN:</b> xilanase
<b>EC:</b> Cana Energia	<b>XEG:</b> xiloglucanase
<b>CAZy:</b> <i>Carbohydrate-Active Enzyme Database</i>	<b>XG:</b> xiloglucano
<b>CC:</b> casca de café	
<b>CE:</b> casca de eucalipto	
<b>CBH:</b> celobiohidrolase	
<b>CBM:</b> <i>Carbohydrate binding module</i>	
<b>DBO:</b> Demanda Bioquímica de Oxigênio	
<b>DDT:</b> Ditiotreitól	
<b>SE:</b> elétron secundário	
<b>EC:</b> Enzyme Commission Number	
<b>EG:</b> endoglucanase	
<b>FAE:</b> feruloil esterase	
<b>FASP:</b> Filter Aided Sample Preparation	



## LISTA DE SÍMBOLOS

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**: ácido sulfúrico

**α**: alfa

**β**: beta

**g**: grama

**g**: gravidade

**°C**: graus Celsius

**NaOH**: hidróxido de sódio

**Mn<sup>2+</sup>**: manganês

**m/v**: massa por volume

**μ**: micro

**μg**: micrograma

**μL**: microlitro

**mg**: miligrama

**mL**: mililitro

**mm**: milímetro

**mM**: milimolar

**min**: minuto

**M**: molar

**nm**: nanômetro

**rpm**: rotações por minuto

**L**: litro

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: peróxido de hidrogênio

**U**: unidade

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>26</b>
1.1. Biodiversidade fúngica	28
1.2. Biomassa lignocelulósica	29
1.2.1. Cana-de-açúcar	30
1.2.2. Cana Energia	32
1.3. Parede celular das plantas	33
1.3.1. Lignina e o complexo lignolítico	33
1.3.2. Hemicelulose e o complexo hemicelulolítico	35
1.3.3. Celulose e complexo celolítico	38
1.3.4. Pectina e seu sistema de degradação enzimático	42
1.4. Degradação da biomassa para produção de etanol 2G	44
1.5. Bioprocesso - fermentação para a produção de etanol 2G	47
1.6. Consórcios enzimáticos: solução <i>versus</i> problemática	47
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
2.1. Objetivo geral	52
2.2. Objetivos específicos	52
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>53</b>
3.1. Microrganismos e manutenção das cepas	54
3.2. Temperatura ótima de crescimento microbiano e ensaio de duplo-confronto	54
3.3. Material vegetal	54
3.4. Análise de monossacarídeos neutros	56
3.5. Produção do coquetel enzimático	57
3.5.1. Produção enzimática a partir de diferentes canas-de-açúcar	57
3.5.2. Produção enzimática a partir de resíduos agroindustriais	57
3.5.3. Produção enzimática a partir do cocultivo de <i>T. reesei</i> RP698 e <i>M. thermophilus</i>	57
3.5.4. Cocultivo de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 em biorreator	58
3.6. Determinação das atividades enzimáticas	58
3.7. Quantificação de proteínas	60

3.8. Sacarificação enzimática das canas-de-açúcar _____	61
3.9. Caracterização bioquímica do coquetel enzimático _____	61
3.9.1. Efeito da temperatura _____	61
3.9.2. Efeito do pH _____	61
3.9.3. Concentração de proteína _____	62
3.9.4. Tempo de hidrólise _____	62
3.9.5. Efeito da carga de sólidos _____	62
3.9.6. Influência de surfactantes _____	62
3.10. Aplicação do coquetel caracterizado na sacarificação enzimática de canas comerciais e energia _____	63
3.11. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica _____	63
3.11.1. Pré-tratamento enzimático _____	63
3.11.2. Autohidrólise _____	64
3.11.3. <i>Organosolv</i> com etanol _____	64
3.11.4. <i>Organosolv</i> com etanol e ácido sulfúrico _____	64
3.11.5. Alcalino com Peróxido de Hidrogênio _____	65
3.11.6. Alcalino _____	65
3.12. Análises das canas-de-açúcar _____	66
3.12.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) _____	66
3.12.2. Análises termogravimétricas _____	66
3.13. Determinação dos açúcares por Cromatografia de Camada Delgada ____	67
3.14. Cultivo de <i>Trichoderma reesei</i> RP698 e <i>Mycothermus thermophilus</i> crescidos em Cana Energia e Cana-de-açúcar SP80-3280 _____	67
3.14.1. Obtenção do extrato para análise da secreção de enzimas pelos fungos filamentosos _____	67
3.14.2. Precipitação de proteínas com Ácido Tricloro Acético _____	69
3.14.3. Desnaturação, redução e digestão proteica: FASP _____	69
3.14.4. Preparo das amostras em coluna C18 para espectrometria de massas 70	
3.14.5. Identificação das proteínas _____	70
3.14.6. Anotação de CAZymes _____	71
3.15. Análises estatísticas _____	71
<b>4. RESULTADOS _____</b>	<b>72</b>

**PARTE I: PRODUÇÃO DE HOLOCELULASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS E POTENCIAL DE HIDRÓLISE DE CANA-DE-AÇÚCAR E CANA ENERGIA \_\_\_\_\_ 73**

4.1. Produção de holocelulases em cana-de-açúcar e Cana Energia por diferentes fungos filamentosos \_\_\_\_\_ 74

4.2. Potencial de aplicação do extrato de enzimas fúngicas no bagaço de cana-de-açúcar e na Cana Energia \_\_\_\_\_ 78

4.3. Perfil da produção de enzimas pelos fungos filamentosos *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em diferentes canas-de-açúcar \_\_\_\_ 81

4.4. Efeito da aplicação enzimática de coquetel de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 produzido em SP80-3280 na hidrólise do bagaço da cana, Cana Energia e cana SP80-3280 \_\_\_\_\_ 85

**PARTE II: SACARIFICAÇÃO DE DIFERENTES VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR POR COQUETÉIS ENZIMÁTICOS PRODUZIDOS POR CULTURAS DE *Mycothermus thermophilus* E *Trichoderma reesei* RP698 SUPLEMENTADAS COM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: VALORIZAÇÃO DE COCULTIVO DE FUNGOS PARA MELHORAR OS NÍVEIS ENZIMÁTICOS \_\_\_\_\_ 87**

4.5. Sacarificação de cana-de-açúcar a partir de extratos produzidos em diferentes resíduos \_\_\_\_\_ 88

4.6. Temperatura de crescimento e ensaios de atividade inibitória \_\_\_\_\_ 92

4.7. Cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 para hidrólise de cana-de-açúcar \_\_\_\_\_ 93

4.8. Mudanças morfológicas e estruturais no bagaço de cana-de-açúcar, Cana Energia e cana-de-açúcar SP80-3280 após aplicação do coquetel produzido por cocultivo em palha de milho \_\_\_\_\_ 97

4.9. Análises termogravimétricas do bagaço da cana-de-açúcar, Cana Energia e cana SP80-3280 hidrolisadas por coquetel obtido a partir do cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em palha de milho \_ 99

**PARTE III: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO COQUETEL OBTIDO PELO COCULTIVO DE *Mycothermus thermophilus* E *Trichoderma reesei* RP698 EM PALHA DE MILHO \_\_\_\_\_ 101**

4.10. Produção do coquetel enzimático em Biorreator BioFlo 310 \_\_\_\_\_ 102

4.11. Caracterização das condições do coquetel enzimático na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar, Cana Energia e cana SP80-3280 \_\_\_\_\_ 105

4.12. Análise dos açúcares liberados após a hidrólise das diferentes canas-de-açúcar por Cromatografia de camada delgada (TLC)	110
<b>PARTE IV: ANÁLISE DO SECRETOMA DO COCULTIVO DE <i>Mycothermus thermophilus</i> E <i>Trichoderma reesei</i> RP698 EM PALHA DE MILHO</b>	<b>112</b>
4.13. Secreção de proteínas e análise das atividades de celulasas e xilanases obtidas a partir do cocultivo de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698	113
4.14. Secretoma do cocultivo de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 crescidos em palha de milho	113
<b>PARTE V: ANÁLISE COMPARATIVA DO SECRETOMA DE <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 EM CULTIVOS ÚNICOS OU COCULTIVO EM CANA-DE-AÇÚCAR SP80-3280 E CANA ENERGIA</b>	<b>119</b>
4.15. Produção de proteínas pelos fungos em função do tempo de cultivo e da fonte de carbono	120
4.16. Atividade de xilanases, endoglucanases, celobiohidrolases e $\beta$ -glucosidases pelos fungos nas condições selecionadas e capacidade hidrolítica de seus extratos enzimáticos	124
4.17. Perfil de CAZymes dos secretomas de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 em cultivos únicos e cocultivo nas diferentes canas	128
4.18. Diferenças na secreção de proteínas por <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 em cultivos únicos e cocultivo em diferentes fontes de carbono	138
4.19. Comparação entre os secretomas de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 em cultivos únicos e cocultivo	142
<b>PARTE VI: EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTOS NAS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR E SEUS IMPACTOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA</b>	<b>153</b>
4.20. Análise composicional dos carboidratos do bagaço de cana-de-açúcar, Cana Energia e cana-de-açúcar SP80-3280 <i>in natura</i> e pré-tratados	154
4.21. Efeito dos diferentes pré-tratamentos na hidrólise das biomassas lignocelulósicas	157
<b>PARTE VII: POTENCIAL DE APLICAÇÃO DOS COQUETÉIS ENZIMÁTICOS NA HIDRÓLISE DE CANAS-DE-AÇÚCAR DE INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA</b>	<b>165</b>

4.22. Potencial de aplicação dos coquetéis de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698 cultivados em bagaço de cana-de-açúcar, Cana Energia e cana-de-açúcar SP80-3280	166
4.23. Aplicação do consórcio enzimático obtido do cocultivo de <i>Mycothermus thermophilus</i> e <i>Trichoderma reesei</i> RP698	172
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>175</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>197</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>197</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>197</b>
<b>APÊNDICE I</b>	<b>197</b>
<b>APÊNDICE II</b>	<b>197</b>

# 1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade compreende a variabilidade de vida na Terra, porém, na maioria das vezes, é discutida somente em termos de grandes organismos. Entretanto, os microrganismos são os mais abundantes e diversos, dentro deste cenário convém salientar que foram as primeiras formas de vida celular e estavam ativos há mais de 3 bilhões de anos antes mesmo do aparecimento de macrorganismos (1,2).

Desta forma, grande é o interesse sobre o conhecimento da biodiversidade microbiana que paralelamente contribui para a expansão do conhecimento biológico, sendo os fungos de grande interesse, uma vez que sabe-se que os fungos filamentosos são fontes promissoras de produção de enzimas e outros compostos de interesse industrial que podem vir a compor diferentes sistemas multi-enzimáticos. Dentre os fungos utilizados em processos industriais, os mais estudados são os pertencentes ao gênero *Aspergillus* (1), todavia os gêneros *Humicola*, *Thichoderma* e *Mycothermus* tem ganhado bastante visibilidade devido ao potencial de produção de enzimas envolvidas no processo de obtenção de bioenergia (3–5).

O termo bioenergia refere-se à energia obtida através de biomassa lignocelulósica, como por exemplo o bioetanol, o qual pode contribuir para o desenvolvimento econômico e para o meio ambiente. Além disso, os biocombustíveis auxiliam na mitigação das mudanças climáticas, já que esses oferecem uma alternativa de carbono neutra (6).

A crescente expansão da atividade agroindustrial levou ao acúmulo de uma grande quantidade de resíduos lignocelulósicos de diferentes origens, como madeira e diversos resíduos agroindustriais em todo o mundo (7,8). No mundo, cerca de 146 bilhões de toneladas de resíduos são produzidas anualmente (9). Sendo assim, a produção de etanol por meio da bioconversão de biomassa lignocelulósica representa uma promissora fonte de bioenergia, visto que esta é em sua maioria um resíduo agroindustrial, sendo de fácil obtenção e grande abundância na natureza (8,10).

À vista disso, o interesse econômico em cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) aumentou significativamente nos últimos anos devido ao aumento da demanda mundial para a produção de energia de maneira sustentável. A conversão da biomassa lignocelulósica em etanol e outros compostos químicos pode ser realizada utilizando um sistema multi-enzimático agindo em sinergismo (11), sendo de fundamental importância o estudo de diferentes microrganismos e a compreensão da secreção das enzimas de interesse que possam ser aplicadas nestes processos.



No Brasil, as empresas GranBio e Raízen são exemplos reais e bem-sucedidos da tecnologia de Etanol de Segunda Geração (2G), porém com processos diferentes. A GranBio possui uma biorrefinaria, a Bioflex 1, que opera a primeira planta em escala comercial de etanol 2G, do Hemisfério Sul. Nesta planta há a conversão de resíduos de cana-de-açúcar em etanol 2G e lignina (<http://www.granbio.com.br/>). A Raízen utiliza como matéria-prima para o Etanol 2G, a palha e bagaço de cana-de-açúcar que são submetidos à um processo altamente tecnológico de hidrólise e dupla fermentação, resultando em um produto com a mesma composição química do etanol comum (<https://www.raizen.com.br/>).

### 1.1. Biodiversidade fúngica

Os fungos são microrganismos eucarióticos, com uma parede celular rígida e quimiorganotróficos, isto é, nutrem-se através da secreção de enzimas que digerem compostos mais complexos (12), como por exemplo polissacarídeos da parede celular vegetal.

Dentre os fatores que podem influenciar o crescimento dos microrganismos, a temperatura possui grande destaque, uma vez que eles podem ser divididos em diferentes classes térmicas de organismos, ou seja, apresentam diferentes temperaturas ótimas de crescimento. Entre os microrganismos estudados com potencial de aplicação industrial destacam-se os mesófilos e os termófilos. Os mesófilos são organismos que crescem melhor em temperaturas de 20 a 45 °C, enquanto que os termófilos são os microrganismos que possuem temperatura ótima de crescimento entre 45 e 80 °C (12).

O fungo mesofílico *Trichoderma reesei* é um dos principais microrganismos de interesse industrial utilizado para a produção de holocelulases (13). Seu genoma e a maquinaria para a síntese de enzimas envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica já foram descritos (13,14) o que lhe confere tamanho destaque.

Nos últimos anos, os fungos termofílicos, como o *Mycothermus thermophilus* (*Scytalidium thermophilum*), têm se destacado por sua capacidade de produzir enzimas como amilases, xilanases e celulases (3,15).

Desta maneira, a análise do secretoma fúngico tem ganhado grande visibilidade, uma vez que através destes estudos é possível conhecer as proteínas

secretadas por diferentes microrganismos cultivados em condições distintas (15–19). Estas análises possibilitam uma melhor compreensão da maneira ideal de cultivo para obtenção das proteínas de interesse industrial, além de possibilitar a descoberta de proteínas que ainda não foram descritas na literatura para os microrganismos estudados.

Além do secretoma, outra estratégia que está sendo estudada para a elaboração de coquetéis enzimáticos de alta eficiência na hidrólise da biomassa, é o cocultivo de microrganismos, já que consiste na produção simultânea de enzimas de interesse entre dois ou mais organismos. Entretanto, devido as diferentes classes térmicas de fungos (3,12), faz-se necessário analisar o crescimento dos mesmos em distintas temperaturas. No âmbito das produção de bioenergia, essa abordagem permite a obtenção de um coquetel enzimático diverso e eficiente (20), uma vez que as enzimas podem atuar em maior sinergismo e minimizar o efeito dos inibidores enzimáticos devido à sacarificação da parede celular das biomassas lignocelulósicas.

## **1.2. Biomassa lignocelulósica**

A biomassa lignocelulósica é a fonte mais abundante de carbono renovável da natureza, representando um valioso substrato industrial com potencial para diversas aplicações, tais como a produção de bioenergia, papel e celulose, tecnologia de alimentos, entre outras (21).

A biomassa vegetal é constituída por materiais poliméricos densamente recalcitrantes como: proteínas, lignina, holocelulose (uma fração constituída de fibras de celulose envolto em hemicelulose-pectina), cinzas, sais e minerais (22,23). A rede de polissacarídeos na parede celular de plantas é uma das estruturas mais complexas, sendo que sua composição lignocelulósica depende da sua origem, seja derivado de madeira dura, madeira macia ou gramíneas (8,24,25). Os polissacarídeos da parede celular armazenam energia, a qual uma vez acessada de maneira eficiente pode ser utilizada para produção de etanol de segunda geração (26), sendo a cana-de-açúcar um dos maiores exemplos.

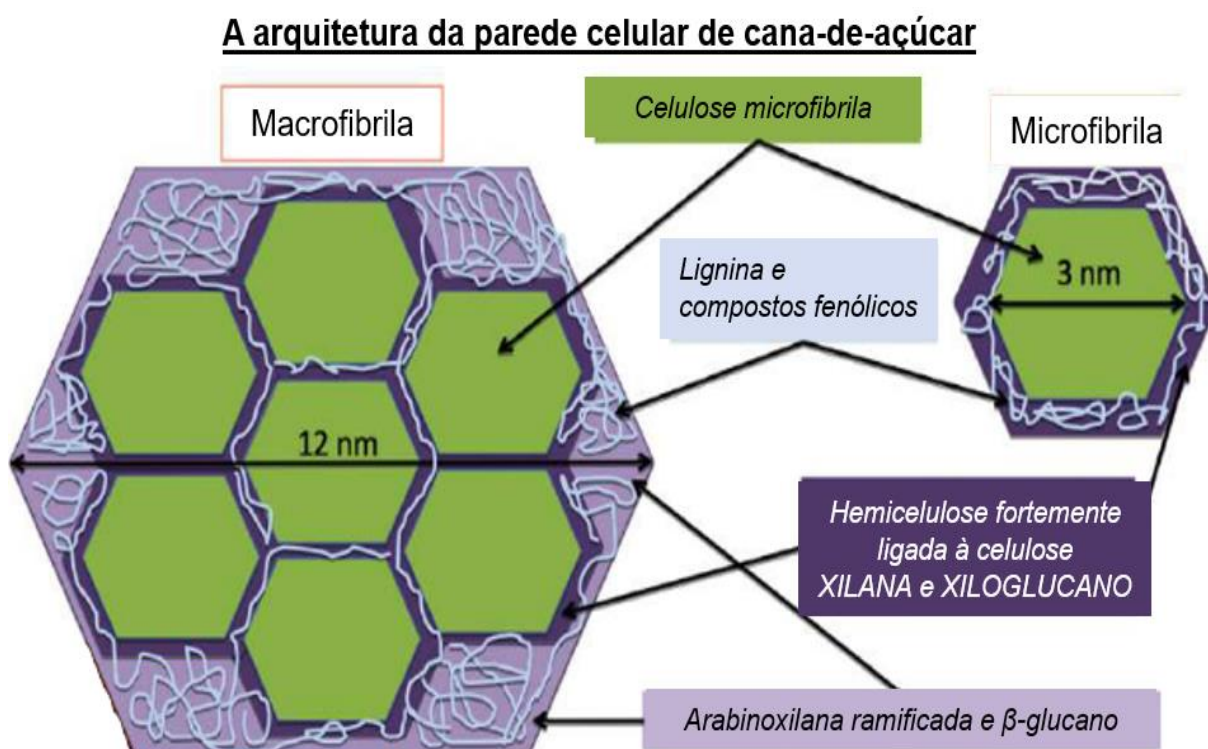
### 1.2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é uma gramínea pertencente ao grupo das monocotiledôneas (27). Atualmente, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com uma produção de 391.767 mil toneladas na safra 2018/2019, na região centro-sul do país (28). O cultivo de cana-de-açúcar tem como um dos propósitos a produção de etanol de primeira geração, que é aquele obtido a partir da sacarose presente no colmo. Além disso, é uma cultura que tem sido utilizada há muito tempo na produção de açúcar, mas, recentemente, a bioeletricidade e o etanol tornaram-se os mais famosos produtos de valor agregado gerados através de sua queima e fermentação respectivamente (29).

Os subprodutos gerados pelo setor sucro energético são a vinhaça, que consiste em uma suspensão de sólidos, substâncias orgânicas e minerais, e o bagaço, que é um resíduo lignocelulósico (30). Desta maneira, a cana-de-açúcar é um recurso interessante uma vez que é renovável e barato, possuindo potencial de produção e geração de produtos químicos e bioenergia (31).

O bagaço de cana-de-açúcar é uma matéria-prima muito promissora para a produção de etanol de segunda geração na perspectiva do processo em grande escala. A cana-de-açúcar apresenta parede celular secundária, com composição em torno de 22 % de lignina, 8% de pectina, 43 % de celulose e 26 % de hemicelulose, porém os últimos dois componentes são mais predominantes (**Figura 1**) (26,27,32,33).

**Figura 1.** A unidade básica da arquitetura da parede celular da cana-de-açúcar.



Fonte: Adaptado de Buckeridge, Grandis e Tavares (27).

A produção de Bioetanol a partir de bagaço de cana pode compartilhar a infraestrutura em que o etanol convencional é produzido, tais como unidades de fermentação e destilação, o que diminui os custos em equipamentos (34). Desta forma, o sucesso do processo de produção de bioetanol a partir de bagaço depende em grande parte da própria biomassa e do repertório de enzimas envolvidas na despolimerização dos polissacarídeos constituintes na parede celular (6).

Existem diferentes variedades comerciais de cana-de-açúcar no mundo, dentre elas a SP80-3280 é muito estudada, principalmente quanto à estrutura e composição de sua parede celular (26,27). Sendo assim, torna-se possível aumentar a eficiência da hidrólise, uma vez que esta variedade apresenta a estrutura da parede celular definida (26). Estudos recentes com esta variedade identificaram as ligações covalentes presentes nos polímeros da parede celular da cana-de-açúcar, sendo elas, glucosídicas e ésteres, que são as ligações que precisam ser clivadas para que ocorra a liberação dos monossacarídeos que serão posteriormente fermentados (26,27). Além das ligações covalentes, há outras classes de ligações que são caracterizadas dentro da parede, como as ligações: (i) iônicas, que ocorre entre pectinas e cálcio na lamela média; (ii) não covalentes específicas, como as ligações de hidrogênio que os

xiloglucanos produzem à superfície da celulose; e (iii) ligações polissacarídicas não específicas (ligações de hidrogênio) relacionadas com as interações polissacarídeo-polissacarídeo que ocorrem devido à proximidade dos polímeros na parede (27).

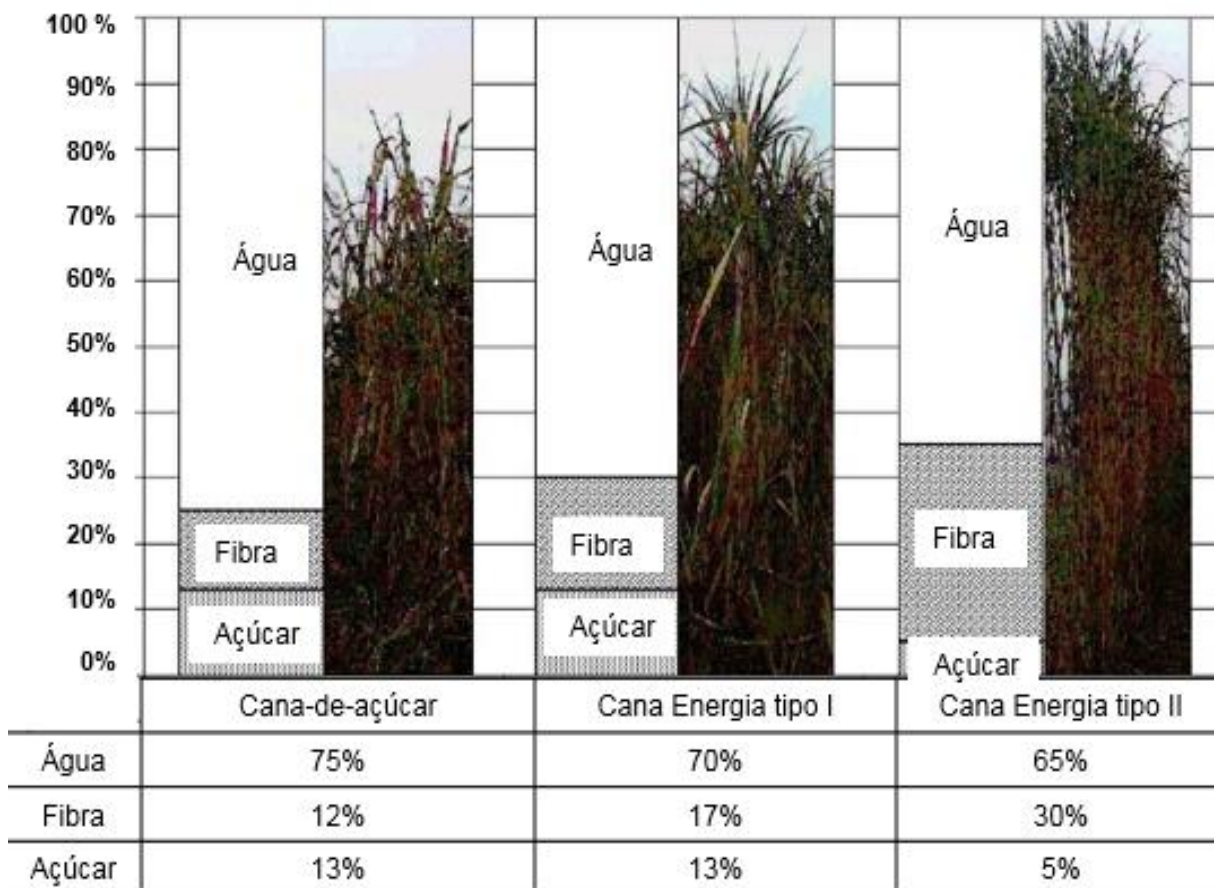
Com o conhecimento das ligações presentes nos polímeros da parede celular dessa biomassa, Buckeridge e De Souza (35) propuseram o código glicômico da cana-de-açúcar, que consiste na rede entrelaçada de polímeros formando uma estrutura altamente organizada (27). Com ele é possível determinar as estratégias que melhor funcionariam para a desmontagem da parede celular e a subsequente liberação de açúcares fermentescíveis.

### 1.2.2. Cana Energia

A geração de matéria-prima para a bioenergia depende de uma produção agrícola estável em termos de rendimentos de biomassa, que pode ser limitada por estresses abióticos (36). Sendo assim, nos últimos anos a Cana Energia ganhou visibilidade, pois advém do melhoramento genético da cana-de-açúcar *S. spontaneum*, para aumentara eficiência energética e a adaptabilidade em diferentes ambientes (36–39). Segundo Tew e Cobill (37), existem dois tipos de Cana Energia (**Figura 2**):

- Cana Energia de tipo I: é uma cana selecionada e cultivada para maximizar seus componentes de açúcar e fibra. De modo geral, apresenta em torno de 70% de água, 13% de açúcar e 17% de fibra.
- Cana Energia de tipo II: é a cana selecionada e cultivada principalmente para maximizar o teor de fibra, que é em torno de 30%, ou seja, quase duas vezes mais que a de tipo I e cana-de-açúcar comercial. Este tipo de cana apresenta baixo teor de açúcar (5%) e somente 65% de água. Espera-se que ela suporte ambientes mais temperados que as comerciais.

**Figura 2.** Esquema comparativo da cana-de-açúcar e Cana Energia tipo I e II.



Fonte: Adaptado de Tew e Cobill (37).

Portanto, a Cana Energia apresenta uma maior capacidade de acúmulo de biomassa, devido aos altos valores de fibra distribuídos nas frações de celulose, hemicelulose e lignina (38), quando comparada às as canas-de-açúcar comerciais (aproximadamente 12%). Por esta razão, a Cana Energia pode apresentar potencial como fonte de matéria-prima para a geração de eletricidade e, principalmente, para a produção de etanol celulósico.

### 1.3. Parede celular das plantas

#### 1.3.1. Lignina e o complexo lignolítico

A lignina faz parte da constituição da parede celular, apresenta natureza

polimérica e tridimensional, sendo extremamente complexa. É constituída de unidades de fenilpropano unidas por ligações C-O-C e C-C e com diferentes teores de grupos alcóolicos e metoxílicos dependendo da madeira (23,40). O acoplamento das unidades de fenilpropano não ocorre de forma regular e repetitiva, o que é atribuído ao mecanismo de biossíntese pela polimerização de três diferentes monômeros: o álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (41,42).

A deposição de lignina nas paredes celulares é considerada um marco da transição entre as paredes primárias e secundárias, uma vez que esta restringe a expansão como consequência da diferenciação dos tecidos. Desta maneira, as paredes celulares tornam-se recalcitrante e menos flexível, devido a uma maior proporção de domínios estruturais finos que dificultam o ataque enzimático (25,43).

A lignina é responsável por proteger os polissacarídeos da parede celular da planta da degradação microbiana, conferindo assim resistência à deterioração. Além disso, também é um dos fatores mais importantes em relação à limitação na conversão de biomassa lignocelulósica a biocombustíveis, já que a remoção da lignina é um processo dispendioso (44).

O processo de biodegradação da lignina é um evento oxidativo que demanda um complexo sistema enzimático de baixa especificidade (42). As principais enzimas envolvidas nesse processo estão representadas na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Enzimas responsáveis pela degradação da lignina.

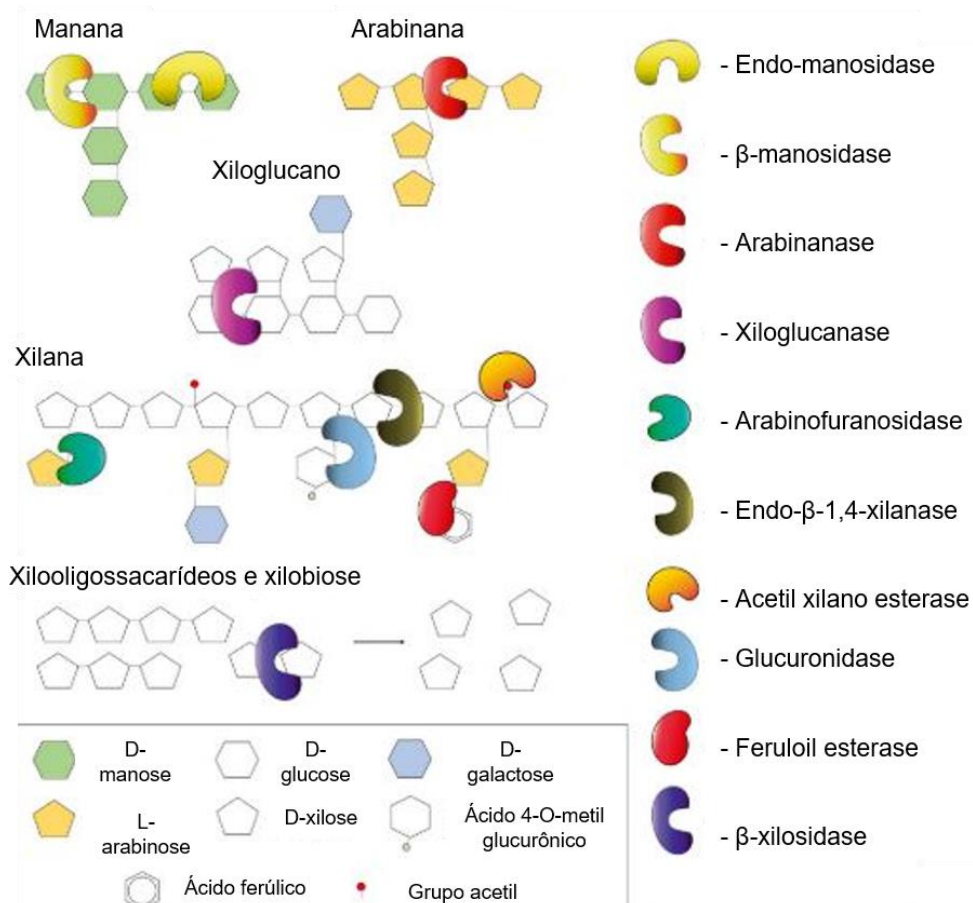
Enzimas	Função	EC	Referência
Lignina peroxidase	Apresenta alto potencial redox capaz de oxidar os compostos aromáticos não fenólicos; Requer peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) para a oxidação do álcool à veratraldeído	1.11.1.14	(45)
Manganês peroxidase	Heme proteína extracelular e glicosilada; Assemelha-se à lignina peroxidase, entretanto, além de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , requerem íons Mn <sup>2+</sup>	1.11.1.13	(45,46)
Lacase	Catalisa a oxidação de substratos fenólicos ou aminas aromáticas para formar produtos distintos através de diferentes vias	1.10.3.2	(47)

### 1.3.2. Hemicelulose e o complexo hemicelulolítico

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo composto por diferentes proporções de subunidades de monossacarídeos de D-xilose, D-manose, D-galactose, L-arabinose e açúcares ácidos (48–51). A hemicelulose tem peso molecular menor que a celulose, além da sua cadeia central, ela possui ramos de cadeias laterais que consistem em diferentes açúcares (52). A xilana, principal heteropolissacarídeo das hemiceluloses, é composta por resíduos de  $\beta$ -D-xilanopiranosil, unidos por ligações  $\beta$ -1,4 glucosídicas (53).

A hidrólise completa da hemicelulose requer a participação de enzimas responsáveis pelas clivagens das cadeias principais e laterais (**Figura 3**). Para a conversão enzimática da xilana a seus componentes poliméricos faz-se necessária a participação sinérgica de várias enzimas (1,54).

**Figura 3.** Esquema da ação das enzimas hemicelulolíticas.



Fonte: Adaptado de POLIZELI (1).



As principais enzimas xilanolíticas são a endo- $\beta$ -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8) e a  $\beta$ -D-xilosidade (EC 3.2.1.37) (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Enzimas responsáveis pela degradação da cadeia principal da xilana.

Enzimas	Função	CAZy	Referência
Endo- $\beta$ -1,4-xilanases	Clivam ligações glucosídicas internas da cadeia principal da xilana	GH10; GH11	(1,53,54)
	$\beta$ -D-xilosidades	Clivam substratos sintéticos;	GH3;
Clivam a xilobiose em xilose		GH43	

Além destas enzimas, existem outras que participam do processo de degradação da xilana, como a: (i)  $\alpha$ -glucuronidasases (EC 3.2.1.139); (ii) acetilesterases (EC 3.1.1.6); (iii) acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72); (iv)  $\alpha$ -arabinofuranosidasases (EC 3.2.1.55); (v) arabinanases (EC 3.2.1.99); (vi) feruloil esterases (EC 3.1.1.73) e ácido *p*-cumárico esterases (EC 3.1.1). A função destas enzimas e sua classificação pelo CAZy estão descritas na **Tabela 3**.

A parede celular da cana-de-açúcar consiste em três componentes de hemicelulose: glucuronoarabino xilana,  $\beta$ -glucano e xiloglucano (27). Os arabinoxilanos podem ser ramificados (com arabinose, galactose, ésteres acetílicos e raramente com ácido glucurônico) ou não ramificados (27,56). A presença de xiloses unidas por ligações  $\alpha$ -1,2-glucosídicas à L-galactose contribui para a recalcitrância da biomassa (56) (**Tabela 3**).

O  $\beta$ -glucano é um grupo heterogêneo de polímeros de glucose, compreendendo resíduos  $\beta$ -D-glucosil unidos por ligações  $\beta$ -glucosídicas, sendo que podem ser divididos em quatro grupos:  $\beta$ -1,4-glucano (celulose),  $\beta$ -1,3-glucano (laminarina) e  $\beta$ -1,3(4)-glucano,  $\beta$ -1,3-1,4-glucano (liquenano), sendo que este último pode ser convertido em monossacarídeos para produção de etanol (57,58). Para degradação do liquenano é importante a utilização de liquenases (EC 3.2.1.73) (58) (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Enzimas responsáveis pela degradação da hemicelulose.

Enzimas	Função	CAZy	Referência
$\alpha$ -glucuronidasas	Hidrolisam as ligações $\alpha$ -1,2 entre ácido glucurônico e resíduos de xilose na glucuronoxilana	GH67; GH115	
Acetilesterases e acetil xilana esterases	Removem os substituintes O-acetil a partir da posição C-2 ou C-3 dos resíduos de xilose na acetilxilana	CE1; CE 3-5; CE 7; CE16	
$\alpha$ -arabinofuranosidasas	Liberam monômeros terminais de arabinose a partir de oligo- e polissacarídeos	GH3; GH51; GH54; GH62	(1,23,59)
Arabinanases	Hidrolisam cadeias L-arabinofuranosil a partir de arabinanas de forma randômica, liberando arabino-oligossacarídeos	GH43; GH93	
Feruloil esterases Ácido p-cumárico esterases	Clivam ligações éster na xilana, respectivamente, entre as cadeias laterais de arabinose e do ácido ferúlico, e entre arabinose e ácido p-cumárico	CE1	
$\alpha$ -galactosidasas	Hidrolisam as ligações L-galactosídeo em arabinoxilano	GH95; GH97	(56,60)
Liquenases	Clivam especificamente as ligações $\beta$ -D-1,4-glucosídicas adjacentes às ligações $\beta$ -1,3 em $\beta$ -1,3-1,4-glucanos.	GH16	(57,58,61)
Xiloglucanases	Hidrolisam a cadeia principal de resíduos de glucose substituídos	GH12; GH74	(23,62)

O xiloglucano está intercalado com as microfibrilas de celulose por meio da ligação de hidrogênio, fornecendo assim a rede de suporte da parede celular, protegendo-a de entrar em colapso devido ao estresse osmótico (63). Este polímero

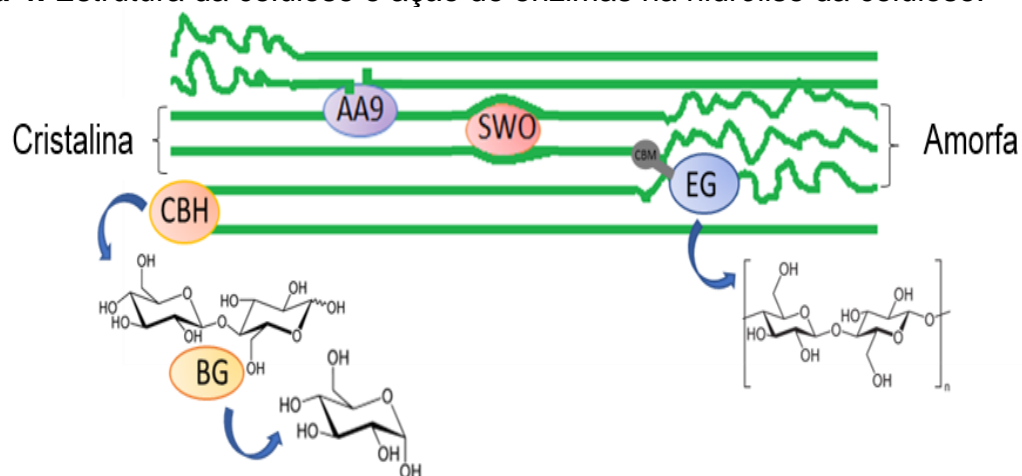
é constituído por uma cadeia principal linear de ligações  $\beta$ -1,4-glucano, mas distingue-se por ter até 75% de glucose ligado de forma covalente a resíduos de xilose na posição de O-6. Além disso, dependendo da fonte de xiloglucano, alguns resíduos de xilose podem ser ligados à galactose, e alguns resíduos de galactose podem ser ligados com fucose (35). A hidrólise de xiloglucano é catalisada por xiloglucanases específicas ou endoglucanases xiloglucano-específico (EC 3.2.1.151) que representam uma nova classe de enzimas degradantes de polissacarídeos (**Tabela 3**).

### 1.3.3. Celulose e complexo celulolítico

A celulose, principal fonte de carbono renovável na natureza, é um polímero linear composto por subunidades de D-glucose unidos por ligações glucosídicas  $\beta$ -1,4, formando dímeros de celobiose. Estes dímeros de celobiose formam longas cadeias ligadas entre si por pontes de hidrogênio e forças de van der Waals (7). Ela é um polissacarídeo estruturalmente simples, que é recalcitrante à degradação enzimática devido à sua cristalinidade e interligação com os outros polímeros da parede celular, tais como hemicelulose e lignina (23,64,65).

As cadeias de celulose são orientadas em paralelo e formam domínios cristalinos altamente organizados, intercalados por regiões mais desorganizadas, as estruturas amorfas (**Figura 4**) (53).

**Figura 4.** Estrutura da celulose e ação de enzimas na hidrólise da celulose.



AA9 (em roxo) refere-se à monooxigenases; SWO (em rosa): Solenina; EG (em azul): endoglucanase; CBH (em laranja): celobiohidrolase e BG (em amarelo):  $\beta$ -glucosidase.  
Fonte: Adaptado de PASIN e colaboradores (9).

As microfibrilas celulósicas são cerca de 70% cristalinas, possuindo elevada resistência, além de serem impermeáveis à água, resistentes ao ataque químico e biológico, sendo tão estáveis que são muito difíceis de quebrar (23). Para melhorar ainda mais a recalcitrância da celulose, a repetição de unidade de glucose tem seis doadores de ligação de hidrogênio e nove receptores de hidrogênio, oferecendo inúmeras maneiras de estabilizar as ligações de hidrogênio inter e intramoleculares (23).

O complexo celulolítico é composto por três tipos de enzimas e envolve a ação sinérgica das mesmas: (i) as endoglucanases (EC 3.2.1.4); (ii) as exoglucanases ou celobiohidrolases (E.C. 3.2.1.176; EC 3.2.1.91) e (iii) as  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21). A degradação da celulose ocorre por intermédio deste complexo, que promove a hidrólise desse polímero até glucose (**Figura 4**). A endoglucanase (EG) representada em azul na região amorfa, com um módulo de ligação ao carboidrato (“Carbohydrate Binding Module” – CBM) ligado à região cristalina, libera pequenas cadeias de celulose; celobiohidrolase (CBH) em laranja liga-se à terminação cristalina liberando celobiose;  $\beta$ -glicosidase (BG) em amarelo cliva a celobiose em glucose; AA9 em roxo atua na região cristalina deixando uma ruptura na cadeia de celulose; Swolenina em rosa atuando entre as cadeias de celulose, resultando em uma estrutura menos cristalina (9). A função destas enzimas e sua classificação pelo CAZy estão descritas na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Enzimas necessárias para hidrólise da celulose.

Enzimas	Função	CAZy	Referência
Endo- $\beta$ -1,4-glucanases	Clivam ligações $\beta$ -1,4-glucosídicas intramoleculares, e sua atividade é frequentemente determinada sob uma cadeia de celulose com alto grau de polimerização	GH 5 a 9; GH 12; GH 44-45; GH 48; GH 51; GH 61 e GH 124	
Exoglucanases	Celobiohidrolase I (CBHI), hidrólise das ligações $\beta$ -1,4-glucosídicas em celobiose e celotetraose a partir da extremidade não redutora da celulose;	GH6;	(1,23,66)
	Celobiohidrolase II (CBHII) cliva a ligação $\beta$ -1,4-glucosídicas a partir da extremidade redutora da celulose, liberando celobiose	GH7	
$\beta$ -D-glucosidases	Hidrolisam celobiose e outras celodextrinas, com grau de polimerização de até 6, liberando glucose	GH1; GH3	
Lítica polissacarídeo monooxigenase cobre dependente	Cliva a cadeia de celulose por meio de um processo oxidativo de C-1, C-4 e C-6	AA9	(9,23)
Celobiose desidrogenase	Oxida a celobiose à celobiolactona na presença de um receptor de elétrons	CDH	

Além do domínio catalítico, muitas glicosil hidrolases incluem um CBM adicional (**Figura 4**), capaz de auxiliar o reconhecimento e a ligação do polissacarídeo, aumentando a especificidade da enzima pelo substrato e, assim, melhoram a taxa de

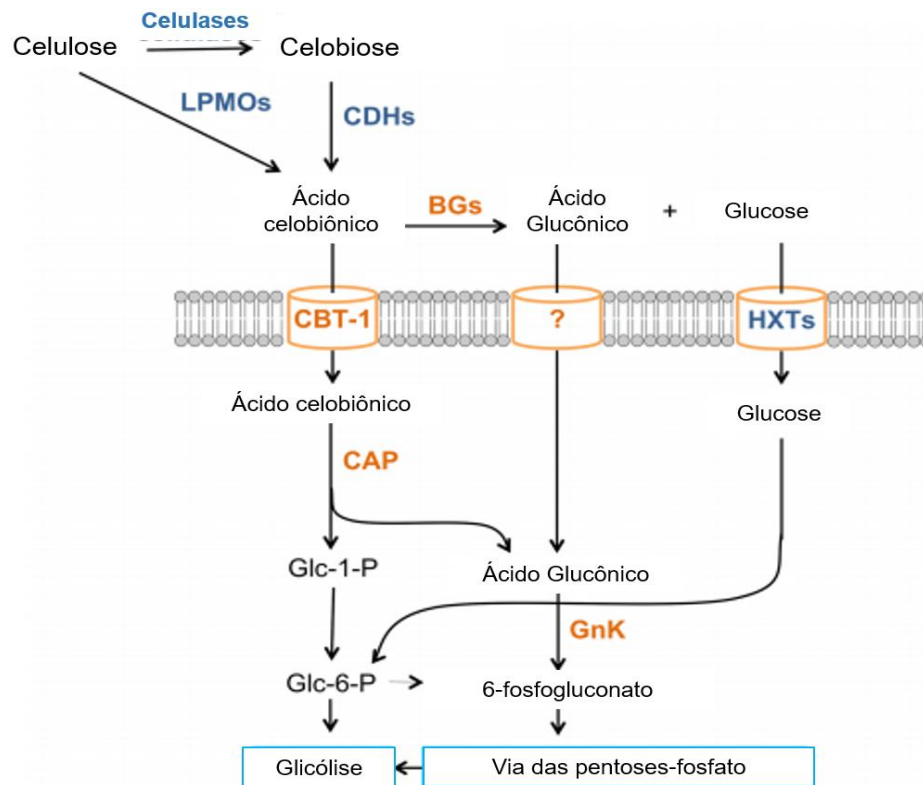
hidrólise (67).

Recentemente, alguns estudos propuseram a degradação oxidativa da celulose através da ação da ácido celobiônico fosforilase (GH94), que podem ser utilizada como alternativa para  $\beta$ -glucosidase (68–70). Neste modelo, o ácido celobiônico, a forma de ácido aldônico da celobiose, é um produto primário do sistema de degradação da celulose oxidativa (70).

Nihira e colaboradores (69) propuseram um possível mecanismo do metabolismo oxidativo da celulose, em que, inicialmente, a celulose é degradada por endoglucanases e celobiohidrolases. A celobiose resultante como componente principal é oxidada pela celobiose desidrogenase para produzir celobiono-1,5-lactona, que reage espontaneamente com a água para formar o ácido celobiônico. Este ácido é liberado da celulose pela ação combinada de LPMO e celobiohidrolases.

O ácido celobiônico é transportado para o citoplasma, seguido de uma fosforólise pela ácido celobiônico fosforilase para produzir a glucose-1-fosfato e o ácido D-glucônico. Glucose-1-fosfato liberada é convertida em D-glicose-6-fosfato por a-fosfoglucomutase (EC 2.7.5.1) para entrar na glicólise. O ácido D-glucônico liberado é convertido em 5-fosfato de ribulose via 6-fosfogluconato pela reação sequencial de gluconocinase (EC 2.7.1.12) e 6-fosfogluconato desidrogenase (EC 1.1.1.44) para entrar na via da pentose fosfato (69). A **Figura 5** apresenta um diagrama da via do consumo do ácido aldônico.

**Figura 5.** Diagrama esquemático da utilização do ácido aldônico em *Neurospora crassa* e *Saccharomyces cerevisiae*.



As enzimas são abreviadas da seguinte forma: LPMOs: polissacarídeo lítico monooxigenases, CDHs: celobiose desidrogenases, BGs: β-glicosidases, CBT-1: transportador celobiônico, HXTs: transportadores hexóxicos, CAP: ácido celobiônico fosforilase, GnK: gluconocinase. Fonte: Adaptado de Li *et al.* (71).

#### 1.3.4. Pectina e seu sistema de degradação enzimático

As pectinas são polissacarídeos heterogêneos, que formam a lamela média, sendo o maior componente dentro dela. Estes polissacarídeos são materiais adesivos na porção extracelular, encontrados nas células vegetais superiores e localizadas nas paredes primárias (9). A estrutura consiste em ligações axiais com unidades ácidas de α-1,4-D-galacturônico e contém moléculas de galactose, arabinose, xilose e L-ramnose como cadeias laterais (72).

Os principais polissacarídeos da pectina detectados nas paredes celular da cana-de-açúcar são homogalacturonano e ramnogalacturonano I (27). O homogalacturonano é uma cadeia homopolimérica não ramificada de porções ligadas a α-1,4 de ácido D-galacturônico, já o ramnogalacturonano I exibe um alto grau de diversidade entre o tipo de célula e o número de açúcares, e é composto por unidades repetidas de um dissacarídeo constituído por L-ramnose e ácido D-galacturônico,

unidos por ligações  $\alpha$ -1,4-glucosídicas (73).

Para que ocorra total degradação da pectina na parede celular vegetal é preciso um conjunto de enzimas complexas, as pectinases (EC 3.2.1.15), que estão descritas na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Enzimas envolvidas na degradação da pectina.

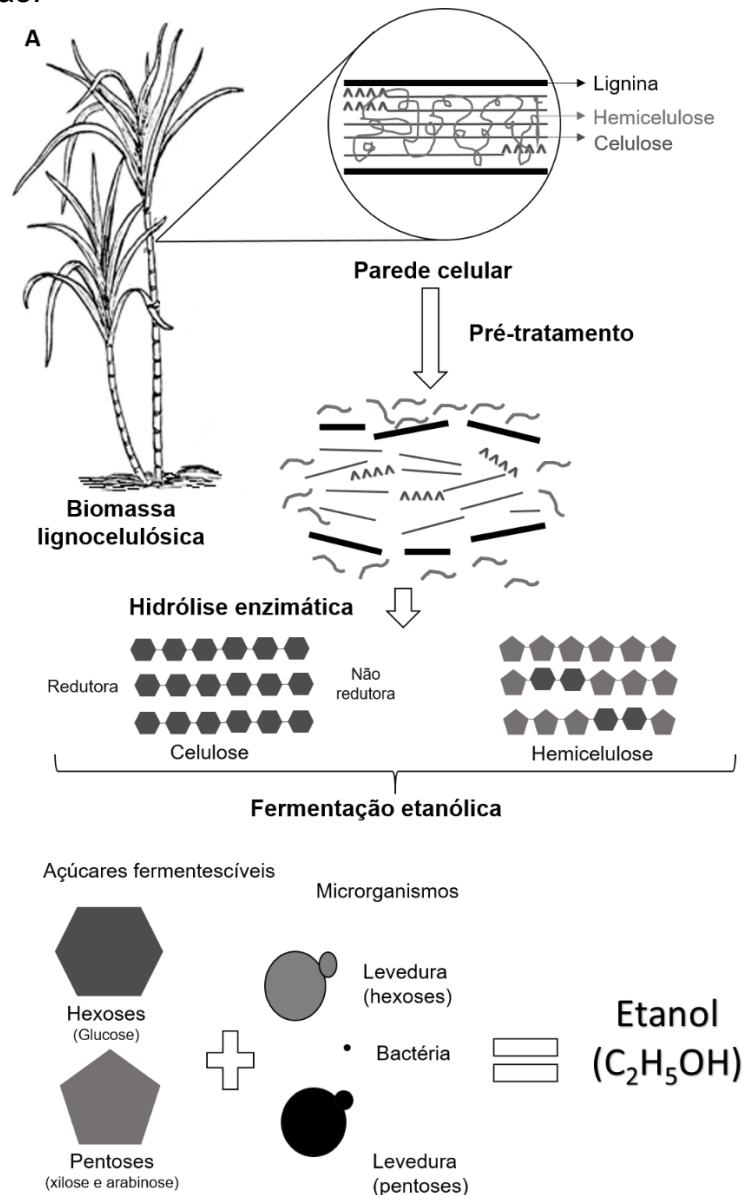
<i>Enzimas</i>	<i>Função</i>	<i>EC</i>	<i>Referência</i>
Endopoligalacturonase	Ataca aleatoriamente as ligações $\alpha$ -1,4-glucosídicas da cadeia polissacarídica, liberando oligômeros de ácido galacturônico.	3.2.1.15	(9)
Exopoligalacturonase	Tipo I: hidrolisa o ácido D-galacturônico na extremidade não redutora; Tipo II: libera o di-galacturonato da extremidade não redutora do ácido poligalacturônico	3.2.1.67 3.2.1.82	(9,74)
<i>Pectina esterase</i>	Catalisa o grupo metoxil da pectina formando ácido péctico	3.1.1.11	(75)
<i>Endopectina liase</i>	Realiza a reação de trans-eliminação da pectina.	4.2.2.10	
Endopectato liase	Cliva a região interna ácido $\alpha$ -1,4-poligalacturônico por meio da reação de $\beta$ -eliminação, formando molécula com dupla ligação	4.2.2.2	(76)
Exopectato liase	Cliva a extremidade não redutora do ácido $\alpha$ -1,4-poligalacturônico por meio da reação de $\beta$ - eliminação, formando molécula com dupla ligação	4.2.2.9	
$\beta$ -galactosidase	Hidrolisa resíduos de $\beta$ -1,4-galactosil ligados a L-ramnose do ramnogalacturonano de tipo I	-	(77)



#### 1.4. Degradação da biomassa para produção de etanol 2G

A conversão de biomassa lignocelulósica em combustíveis renováveis pode ser considerada uma promissora tecnologia para substituir os combustíveis fósseis, além de atender à necessidade global por combustíveis com menor teor de carbono, pois minimiza a produção líquida de gases do efeito estufa, mantendo a sustentabilidade ambiental e estimulando a economia global (8,24,32,78–81). A produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica consiste em algumas etapas como: pré-tratamento; hidrólise e fermentação (**Figura 6**).

**Figura 6.** Esquema da bioconversão da biomassa lignocelulósica em etanol de segunda geração.



Fonte: Adaptado de Pasin e colaboradores (9).

Segundo Buckeridge e colaboradores (82), quatro rotas podem ser estudadas para a produção de etanol celulósico: hidrólise química, que consiste em um ácido ou base que possibilita a produção de açúcares fermentescíveis livres e oligômeros; enzimática, associada com algum pré-tratamento químico ou mecânico; autohidrólise e fermentação de pentoses.

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é crucial para assegurar a conversão dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis para a produção de bioetanol, já que alterará a composição química e estrutura física dos substratos (83,84). A lignina é considerada um dos principais obstáculos para a sacarificação enzimática eficiente da biomassa lignocelulósica (85). Sendo assim, o processo de pré-tratamento tem por objetivo separar os carboidratos da matriz, da lignina, beneficiando o acesso enzimático aos polissacarídeos, visto que a presença de lignina acarreta na ligação inespecífica e inativação das celulasas, impossibilitando o alto rendimento de etanol (86,87). Além disso, o pré-tratamento possibilita a remoção da hemicelulose que impede o acesso das celulasas à celulose, além da redução da cristalinidade e do grau de polimerização da celulose; e aumento da porosidade do material (22,88). Segundo Buckeridge e colaboradores (27), essa etapa permite quebrar algumas ligações covalentes entre a lignina e a celulose ou a hemicelulose, tornando a biomassa lignocelulósica mais acessível ao ataque enzimático.

Segundo Pasin e colaboradores (9), existem uma grande gama de pré-tratamentos disponíveis, sejam eles químicos, físicos ou biológicos. Os tipos de pré-tratamentos dependem do material utilizado e da finalidade do uso das frações lignocelulósicas. Desta maneira, o pré-tratamento utilizado deve ser energeticamente eficiente, sendo que vários critérios devem ser considerados, como: (i) evitar a redução do tamanho das partículas de biomassa; (ii) preservar a fração de hemicelulose, impedindo a degradação ou perda de carboidratos; (iii) reduzir a formação de compostos inibidores do crescimento de microrganismos durante a fermentação, minimizando os custos de produção (1).

O pré-tratamento ácido consiste na utilização de ácidos concentrados ou diluídos, associados a temperaturas acima de 120 °C, para diminuir a dureza da biomassa lignocelulósica, aumentando a acessibilidade à celulose. Neste tipo de pré-tratamento, a lignina e a hemicelulose são removidas e os açúcares da hemicelulose são dissolvidos (9,89).

Assim como o pré-tratamento ácido, o alcalino utiliza temperatura no processo,

além de uma base diluída. Entretanto, esse processo emprega temperaturas e pressões mais baixas em comparação com outras tecnologias de pré-tratamento, e pode ser realizado em condições ambientais (89). Ele é usado para deslignificar a biomassa, portanto, há menos danos aos açúcares presentes (90). O pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio pode efetivamente diminuir o conteúdo de lignina na maioria das biomassas lignocelulósicas e resultar em menor degradação de açúcar e formação de inibidores comparados aos os pré-tratamentos ácidos (88).

O pré-tratamento térmico, também conhecido como autohidrólise, é um processo considerado amigável ambientalmente, uma vez que não requer a adição e recuperação de produtos químicos diferentes da água (9,90). Nesse método, a biomassa lignocelulósica é tratada com água em altas temperaturas e pressão para quebrar a estrutura lignocelulósica (89,91). Desta maneira, este processo baseia-se na despolimerização seletiva da hemicelulose, que é catalisada por íons hidrônio gerados *in situ* pela autoionização da água e pelo ácido acético dos grupos acetil (90).

O pré-tratamento baseado na explosão a vapor é um método físico-químico que utiliza vapor de alta pressão para romper a ligação entre os componentes poliméricos, e a descompressão, responsável pela quebra da estrutura da lignocelulose (27,92). A descompressão explosiva e a alta temperatura causam degradação da hemicelulose, que é extraída como fração solúvel em água (92).

Além desses pré-tratamentos, existem processos que utilizam solventes orgânicos aquosos, conhecidos como *organosolv*, que consistem na deslignificação da biomassa lignocelulósica com solubilização simultânea da hemicelulose (89). Durante o processo de *organosolv*, a estrutura da lignina é hidrolisada em fragmentos de menor peso molecular que se dissolvem no solvente aquoso (89,90).

Durante o pré-tratamento dos resíduos celulósicos, compostos inibidores podem ser formados, como furfural, hidroximetilfurfural (HMF), compostos fenólicos e ácidos orgânicos, que poderiam ter um impacto na ação das enzimas hidrolíticas, assim como nos microrganismos envolvidos no processo de fermentação dos açúcares em etanol (22,87).

Com a obtenção de um coquetel enzimático de elevada eficiência hidrolítica, algumas análises podem ser empregadas para caracterização da biomassa lignocelulósica antes e após a aplicação do consórcio enzimático. Dentre as opções disponíveis, duas são utilizadas amplamente, a análise termogravimétrica (TGA) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) (20,91,93). A TGA é uma técnica analítica

que consiste em investigar as propriedades fundamentais da estrutura da lignocelulose (93). Já a MEV, que permite a análise de microestruturas, propicia uma análise das características morfológicas do material lignocelulósico, podendo comparar a disposição das fibras antes e depois da aplicação do coquetel enzimático (20,93).

### **1.5. Bioprocesso - fermentação para a produção de etanol 2G**

Segundo Shen e Agblevor (94), existem dois modos de operação para a produção de bioetanol de biomassa lignocelulósica: hidrólise e fermentação separadas ou simultâneas.

Os esforços na integração de processos ainda são limitados por obstáculos, tais como a temperatura de hidrólise e fermentação que são diferentes, a necessidade de microrganismos industriais capazes de fermentar pentoses e hexoses de maneira eficiente, o controle na formação e eliminação de compostos inibitórios correntes ao longo do processo, além da padronização das condições ideais para a integração de dois ou mais processos a serem efetuados simultaneamente em um único biorreator (95).

A fermentação alcoólica consiste na transformação dos açúcares do mosto ou do hidrolisado em etanol, gás carbônico e energia, devido à ação catalítica das leveduras ou bactérias. As pentoses são fermentadas por leveduras do gênero *Candida*, *Komagataella* e *Meyerozyma* enquanto que as hexoses são assimiladas por leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* (96). Outro importante produtor de bioetanol, a bactéria *Zymomonas mobilis* se mostrou um promissor organismo etanologênico para a produção em grande escala de bioetanol, visto que apresenta maior rendimento em relação às leveduras (97).

### **1.6. Consórcios enzimáticos: solução versus problemática**

Para a produção de etanol de segunda geração, em que a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica é necessária, a fim de produzir açúcares fermentescíveis, a chave para o aumento da eficiência da hidrólise pode ser a compreensão da

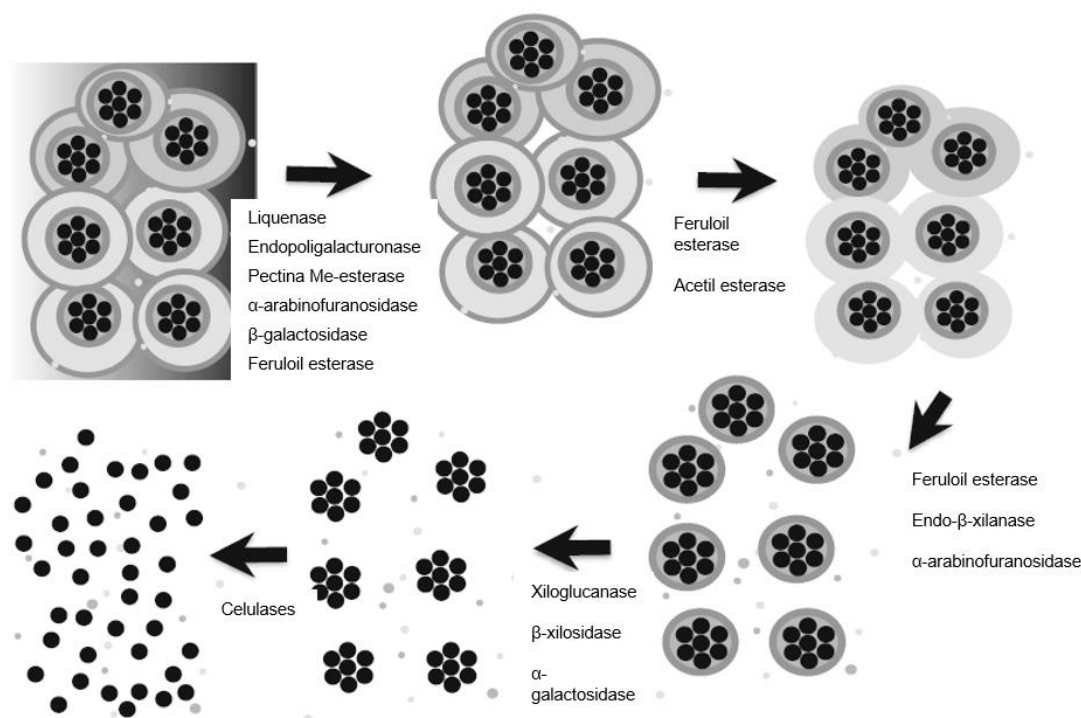
estrutura da parede celular das plantas (26).

Segundo Buckeridge e colaboradores (35), as paredes das plantas apresentam regiões de polímeros que interagem com outras cadeias poliméricas, por exemplo, xiloglucano e celulose, de tal modo que endoglucanases não possam atacar as ligações glucosídicas. Sendo assim, há a necessidade de formulação de coquetéis enzimáticos eficientes, visto que a sinergia entre enzimas hidrolíticas leva em consideração que a estrutura dos polissacarídeos da parede celular pode desempenhar um papel importante nas propriedades cinéticas da reação de hidrólise (6,35,98).

Os coquetéis enzimáticos comerciais disponíveis para a despolimerização de materiais lignocelulósicos são vagamente definidos pelos fabricantes como uma mistura complexa que contém cerca de 80 a 200 proteínas, incluindo hemicelulases, celulasas e enzimas acessórias (6,84). A busca por coquetéis enzimáticos com melhor desempenho foi realizada com diversos anos de estudos de bioprospecção, otimização de cepas através de engenharia genética e desenvolvimento de estratégias de pré-tratamento afim de abrandar os efeitos inibitórios (9,51).

O conhecimento adquirido recentemente através do código glicômico da parede da cana-de-açúcar possibilitou a compreensão das enzimas necessárias à sua degradação, sugerindo que o processo de sacarificação se inicie com a ação de liquenases e pectinases, seguidas de hemicelulases e celulasas (**Figura 7**) (18,26,27).

**Figura 7.** Esquema hipotético para degradação da parede celular da cana-de-açúcar.



Fonte: Adaptado de De Souza *et al.* (26).

As enzimas atuam de uma maneira sinérgica para degradação do substrato, isto significa que quando as enzimas trabalham em conjunto apresentam atividade mais elevada do que quando adicionadas individualmente (22,99). Desta maneira, muitos estudos de sinergismo estão sendo realizados para elucidar o mecanismo de ação das enzimas isoladas, assim como da interação entre elas (22,51,100).

A sacarificação enzimática é vantajosa quando comparada aos outros métodos químicos uma vez que é, por natureza, um processo mais específico e ecológico. Desta maneira, por apresentar condições de operação mais suaves, há a redução da formação de compostos biológicos inibitórios (101). Durante a hidrólise enzimática, oligossacarídeos, dissacarídeos e monômeros são formados o que pode causar uma inibição por feedback das enzimas envolvidas, e quando estes atingem concentrações elevadas, podem ter um impacto na eficiência da hidrólise da biomassa lignocelulósica (22).

Todas as enzimas exercem um papel crucial na hidrólise enzimática, mas  $\beta$ -glucosidases são as enzimas chaves para a hidrólise de lignocelulose e produção de biocombustíveis, uma vez que são as responsáveis pela liberação de glucose, principal açúcar fermentescível. Assim, torna-se necessário que estas enzimas sejam

ativas em um amplo intervalo de pH, estáveis a temperaturas elevadas, possuam uma elevada eficiência catalítica, além de serem tolerantes aos inibidores e à glucose (102).

Fica claro portanto que a alta complexidade e associação do complexo de carboidratos-lignina na biomassa vegetal, é o principal obstáculo na bioconversão. Neste contexto, muito tem sido investido em tecnologia para tornar este processo economicamente viável, como o desenvolvimento de uma etapa de pré-tratamento eficiente e otimização de coquetéis enzimáticos para a desconstrução da parede celular (103), uma vez que a produção de enzimas hidrolíticas deve ser levada em consideração para minimizar os custos financeiros e tornar o processo industrial do etanol de segunda geração comercialmente viável (1). Desta maneira, o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos para obter açúcares fermentáveis é crucial, e envolve a escolha de microrganismos eficientes na produção dessas enzimas, principalmente fungos, como os do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma* (1,104).

Sendo assim, para que ocorra a conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis de maneira viável é necessário não somente a redução no custo de produção de enzimas, como também a melhoria da eficiência das mesmas presentes nos coquetéis de hidrólise (11). No que diz respeito ao primeiro aspecto, uma ferramenta alternativa e eficaz para combater a crise enfrentada devido ao alto custo das enzimas hidrolíticas, seria a imobilização das enzimas, já que a mesma possibilita a recuperação e reuso das mesmas, e portanto, resultaria em uma economia no processo de produção de biocombustíveis (43,105,106). Já para o segundo aspecto, os surfactantes vêm se destacando, um vez que são um dos aditivos mais comuns para evitar adsorção não produtiva (inespecífica) de enzimas ao seu substrato e, assim, levando à melhora da hidrólise. Os agentes tenso-ativos são utilizados de três maneiras na bioconversão: durante o pré-tratamento, durante a hidrólise enzimática e para a reciclagem de enzimas após hidrólise (22,107).

## 2. OBJETIVOS



## 2.1. Objetivo geral

Desenvolver um coquetel enzimático contendo uma gama de hemicelulases, celulases e enzimas acessórias, a partir do cocultivo de *Trichoderma reesei* RP698 e *Mycothermus thermophilus*, visando à degradação da parede celular de bagaço de cana-de-açúcar, colmo de Cana Energia e colmo de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 com potencial para produção de etanol de segunda geração.

## 2.2. Objetivos específicos

1. *Screening* de holocelulases produzidas por fungos filamentosos;
2. Obtenção de coquetel enzimático produzido pelos fungos *Trichoderma reesei* RP698 e *Mycothermus thermophilus*, a partir de bagaço de cana-de-açúcar, colmo de Cana Energia e de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280;
3. Obtenção de coquetel enzimático produzido pelos fungos *Trichoderma reesei* RP698 e *Mycothermus thermophilus* crescidos em diferentes resíduos agroindustriais;
4. Otimização das condições de sacarificação do coquetel enzimático;
5. Teste do coquetel otimizado em canas submetidas a diferentes pré-tratamentos;
6. Aplicação do coquetel enzimático em outras canas-de-açúcar comerciais e canas energia da GranBio;
7. Análise do secretoma obtido pelo cocultivo de *Trichoderma reesei* RP698 e *Mycothermus thermophilus* cultivado em palha de milho
8. Análise comparativa do secretoma de *Trichoderma reesei* RP698 e *Mycothermus thermophilus* crescidos em Cana Energia e cana-de-açúcar variedade SP80-3280

# 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Microrganismos e manutenção das cepas

As espécies fúngicas utilizadas neste trabalho foram: *Aspergillus awamori*, *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niveus*, *Aspergillus terreus*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 (mutante obtido no laboratório pelo Prof. Dr. João Atílio Jorge (4)). Os fungos mesofílicos e termofílicos são mantidos na Micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular, do Departamento de Biologia, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. A manutenção das cepas foi realizada em tubos de cultivo contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) (Himedia®) ou meio de aveia (108). Foram realizados repiques periódicos cultivando as cepas em estufa a 30 °C, para os mesofílicos, e a 40 °C, para os termofílicos, durante 5 dias.

### 3.2. Temperatura ótima de crescimento microbiano e ensaio de duplo-confronto

Para testar a taxa de crescimento micelial em diferentes temperaturas ( $\text{mm}^2 \text{dias}^{-1}$ ), os fungos selecionados *T. reesei* RP698 e *M. thermophilus* foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de Batata Dextrose Ágar (BDA) e incubadas a 30, 35 e 40 °C, por 7 dias em incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). O teste foi realizado em triplicatas e o crescimento radial (mm) das colônias foi medido diariamente.

Para avaliar o potencial antagônico das cepas, foi realizado um ensaio de confronto. Cada cepa foi inoculada em lados opostos das placas de BDA, a aproximadamente 1,5 cm das bordas, e incubada a 30, 35 e 40 °C, por até 15 dias. Após esse período, as placas foram verificadas quanto à presença de antagonismo.

### 3.3. Material vegetal

Os substratos lignocelulósicos utilizados para sacarificação enzimática estão apresentados na **Tabela 6**.

**Tabela 6.** Variedades e partes das canas-de-açúcar estudadas para produção de etanol de segunda geração.

	Variedade		Amostra	Local
	SCB	Mix	Bagaço	Usina da Pedra
Comerciais	SP80-3280	SP80-3280	Colmo	Ridesa – UFSCar
	1A	RB92579	Palha	GranBio
	1B	RB92579	Colmo desfibrado	GranBio
	1C	RB92579	Colmo desfibrado e prensado	GranBio
	1D	RB92579	Colmo desfibrado, prensado e lavado	GranBio
	2A	RB867515	Palha	GranBio
	2B	RB867515	Colmo desfibrado	GranBio
	2C	RB867515	Colmo desfibrado e prensado	GranBio
	2D	RB867515	Colmo desfibrado, prensado e lavado	GranBio
	Cana Energia tipo I: maior teor de açúcares	EC	Cana Energia	Colmo
3A		Vertex 3	Palha	GranBio
3B		Vertex 3	Colmo desfibrado	GranBio
3C		Vertex 3	Colmo desfibrado e prensado	GranBio
3D		Vertex 3	Colmo desfibrado, prensado e lavado	GranBio
4A		Vertex 4	Palha	GranBio
4B		Vertex 4	Colmo desfibrado	GranBio
4C		Vertex 4	Colmo desfibrado e prensado	GranBio
4D		Vertex 4	Colmo desfibrado, prensado e lavado	GranBio
Cana Energia tipo II: maior teor de fibras		5E	Vertex 2	Cana integral desfibrada
	5F	Vertex 2	Cana integral desfibrada e prensada	GranBio
	5G	Vertex 2	Cana integral desfibrada, prensada e lavada	GranBio
	6E	Vertex 7	Cana integral desfibrada	GranBio
	6F	Vertex 7	Cana integral desfibrada e prensada	GranBio
	6G	Vertex 7	Cana integral desfibrada, prensada e lavada	GranBio
	7E	Vertex 9	Cana integral desfibrada	GranBio
	7F	Vertex 9	Cana integral desfibrada e prensada	GranBio
	7G	Vertex 9	Cana integral desfibrada, prensada e lavada	GranBio

Fonte: Dados da autora.

As amostras de cana-de-açúcar foram lavadas por imersão em etanol 92 °GL por uma hora e depois com água da torneira até os açúcares no material fossem completamente removidos. A determinação de açúcares redutores (AR) foi realizada

pelo método de Miller (109). Todas as amostras foram secas em estufa a 50 °C durante 3 dias e trituradas em um moinho de facas com peneira de malha de 25 mesh (SL-32 - SOLAB). As análises de composição foram determinadas como descrito por Van Soest (110).

Além das biomassas lignocelulósicas obtidas para hidrólise foram utilizadas os seguintes materiais como fonte de carbono para a produção enzimática: bagaço de cevada (BC) fornecido pela indústria cervejeira “Cervejaria Invicta” (Ribeirão Preto - SP); palha de feijão (PF) da indústria de alimentos “Broto Legal” (Campinas - SP); casca de café (CC) do “Café Vicentini” (Altinópolis - SP); sabugo de milho (SM) da “Dow Agrosciences” (Jardinópolis - SP); palha de milho (PM) da “Dow Agrosciences” (Jardinópolis - SP); casca de eucalipto (CE) da International Paper (Luis Antônio - SP); palha de arroz (PA) da Broto Legal (Porto Ferreira - SP); bagaço de cana (SCB) (mix de variedades: CTC4, CTC 7, CTC20, IAC SP95500, RB 867515, RB 966928), da Pedra Agroindustrial (Serrana - SP); cana-de-energia (EC) do Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas (Ribeirão Preto - SP); e colmo da cana SP80-3280 da Ridesa (Centro de Ciências Agrárias da UFSCar, Araras - SP).

### 3.4. Análise de monossacarídeos neutros

A análise dos monossacarídeos neutros de SCB, EC e SP80-3280 *in natura* e pré-tratadas foi realizada no Laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas (Instituto de Biociências (IB) – USP, São Paulo – SP), do Prof. Dr. Marcos Buckeridge, pela Dra. Adriana Grandis. Açúcares solúveis (glucose, frutose, sacarose e rafinose) foram extraídos quatro vezes a partir de 20 mg de massa seca das biomassas lignocelulósicas utilizando 1,5 mL de etanol 80% a 80 °C por 20 minutos. Foram hidrolisadas 2 mg de frações de resíduos insolúvel em álcool (AIR - *Alcohol Insoluble Residue*) com ácido trifluoroacético (TFA) 2 M a 100 °C por uma hora. A solução de monossacarídeos foi seca a vácuo, ressuspensa em um mL de água deionizada, filtrada em membrana de 0,22 µm (Merk Millipore®) e analisada por HPAEC-PAD em uma coluna CarboPac SA10 (Sistema ICS 5.000, Dionex-Thermo®). A solução foi eluída com 99,2 % de água e 0,8% (v/v) de hidróxido de sódio (1 mL.min<sup>-1</sup>). Os monossacarídeos foram detectados usando uma adição pós-coluna de 500 mM de hidróxido de sódio (0,5 mL.min<sup>-1</sup>). Arabinose, fucose, galactose, glucose, manose,

ramnose e xilose foram utilizados como padrões a 200 mM para calibrar o equipamento (111).

### **3.5. Produção do coquetel enzimático**

#### **3.5.1. Produção enzimática a partir de diferentes canas-de-açúcar**

A produção enzimática foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio mínimo (112) suplementado com biomassa lignocelulósica 1%. As biomassas utilizadas para produção foram o bagaço de cana-de-açúcar (SCB) e a Cana Energia (EC). Os meios foram inoculados com 1 mL de uma solução com  $10^7$  esporos de *A. awamori*, *A. brasiliensis*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. niveus*, *A. terreus*, *H. grisea*, *H. insolens*, *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698. Em seguida, foram incubados a 30 °C (para os *Aspergillus* e *T. reesei* RP698) e 40 °C (*M. thermophilus*, *H. grisea* e *H. insolens*), 120 rpm por 120 horas. Após este período, os meios foram filtrados a vácuo para obtenção do extrato enzimático.

#### **3.5.2. Produção enzimática a partir de resíduos agroindustriais**

A produção enzimática foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mínimo (112) suplementado com 1% de biomassa lignocelulósica. As biomassas utilizadas foram: bagaço de cevada (BC); casca de café (CC); casca de eucalipto (CE); palha de arroz (PA); palha de feijão (PF); palha de milho (PM); sabugo de milho (SM). Os meios foram inoculados com 1 mL de uma solução contendo  $10^7$  esporos de *T. reesei* RP698 ou *M. thermophilus* e mantidos a 30 °C (para *T. reesei* RP698) e 40 °C (para *M. thermophilus*), sob agitação de 120 rpm por 120 horas. Em seguida, os meios foram filtrados a vácuo para obtenção do extrato bruto enzimático.

#### **3.5.3. Produção enzimática a partir do cocultivo de *T. reesei* RP698 e *M. thermophilus***

O cocultivo dos fungos para a produção enzimática foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mínimo (112) suplementado com 1 % de palha de milho e sabugo de milho. Foram inoculados com 1 mL de uma solução contendo  $10^7$  esporos de *T. reesei* RP698 e *M. thermophilus*. As produções foram avaliadas a 35 e 40 °C, 120 rpm por 120 horas. Em seguida, obteve-se o extrato enzimático por filtração a vácuo.

#### **3.5.4. Cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em biorreator**

Para o cultivo em biorreator (BioFlo 310 Benchtop BioReactor), primeiramente foi preparado um pré-inóculo do fungo *T. reesei* RP698 em frasco Erlenmeyer com 250 mL de meio mínimo (112). Em seguida, foram inoculados 10 mL de uma solução de  $10^7$  esporos, sendo o mesmo incubado a 35 °C, 120 rpm por 48 horas. Foi preparado um outro frasco contendo 250 mL de meio mínimo para *M. thermophilus* nas mesmas condições que o fungo *T. reesei* RP698, sendo o crescimento realizado durante 24 horas, tempo necessário para que ambos os fungos apresentassem a mesma massa para inóculo no biorreator, que foi previamente determinado pela massa seca dos microrganismos.

O cocultivo foi realizado em biorreator do tipo tanque agitado contendo 4,5 L de MM suplementado com PM 1%, a 35 °C, pH inicial de 6,5, agitação de 275 rpm, vazão de ar 2 v.v.m. (volume de ar por volume de meio por minuto), durante 120 horas. A cada 24 horas foram retiradas amostras de 50 mL para análise de proteínas e sacarificação enzimática.

#### **3.6. Determinação das atividades enzimáticas**

As atividades de endoglucanase (EG), xilanase (XYN), arabinanase (ARA), xiloglucanase (XEG), mananase (MAN) e poligalacturonase (PGase) foram mensuradas pela formação de açúcares redutores de acordo com o método de Miller (109). O branco foi realizado com a incubação do substrato e do tampão, sendo a enzima adicionada somente na fase de fervura do DNS.

Para a endoglucanase, a mistura reacional foi constituída de 0,025 mL de carboximetilcelulose a 1 % (p/v) (Sigma-Aldrich®), 0,010 mL de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 0,015 mL de solução enzimática. Em seguida, a mistura foi incubada a 50 °C, por 20 minutos.

Para xilanase, a mistura reacional foi constituída de 0,025 mL de xilana beechwood a 1 % (p/v) (Sigma -Aldrich®), 0,010 mL de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 0,015 mL de solução enzimática. Em seguida, a mistura foi incubada a 50 °C, por 5 minutos.

Para arabinanase, a mistura reacional foi constituída de 0,025 mL de arabinana desramificada a 1 % (p/v) (Megazyme®), 0,010 mL de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 0,015 mL de solução enzimática. Em seguida, a mistura foi incubada a 50 °C, por 20 minutos.

Para xiloglucanase, a mistura reacional foi constituída de 0,025 mL de xiloglucano de tamarindo a 1 % (p/v) (Megazyme®), 0,010 mL de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 0,015 mL de solução enzimática. Em seguida, a mistura foi incubada a 50 °C, por 10 minutos.

Para mananase, a mistura reacional foi constituída de 0,025 mL de locust bean 0,5 % (p/v) (Sigma-Aldrich®), 0,010 mL de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 0,015 mL de solução enzimática. Em seguida, a mistura foi incubada a 50 °C, por 5 minutos.

Para poligalacturonase, a mistura reacional foi constituída de 0,025 mL de ácido poligalacturônico sal sódico 1% (p/v) (Sigma-Aldrich®), 0,010 mL de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 0,015 mL de solução enzimática. Em seguida, a mistura foi incubada a 50 °C, por 20 minutos.

Os ensaios foram interrompidos pela adição de 0,05 mL de DNS, e em seguida, fervidos por 5 minutos. A quantificação de açúcares redutores liberados foi estimada pela absorbância a 540 nm, utilizando-se para o cálculo uma curva padrão de celobiose, glucose, xilose, arabinose, manose e ácido galacturônico (1 mg/mL), correspondente aos substratos de cada atividade enzimática. Uma unidade (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  de açúcares redutores (AR), nas condições do ensaio.

As atividades da celobiohidrolase (CBH),  $\beta$ -glucosidase (BGL),  $\beta$ -xilosidase (BXI), arabinofuranosidase (ARF), acetil xilano esterase (AXE) e  $\beta$ -galactosidase (BGAL) foram determinadas por clivagem de p-nitrofenil-celobiosídeo (Sigma-Aldrich®), p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (Sigma-Aldrich®), p-nitrofenil- $\beta$ -D-



xilanopiranosídeo (Sigma-Aldrich®), *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (Sigma-Aldrich®), *p*-nitrofenilacetato (Sigma-Aldrich®) e *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (Sigma-Aldrich®) respectivamente, seguida de revelação da reação por meio da adição de carbonato de cálcio 200 mM, como descrito a seguir. O branco foi obtido pela incubação do substrato e do tampão, sendo a enzima adicionada somente após a adição do carbonato de sódio. A mistura reacional (0,025 mL de substrato (2 mM), 0,010 mL de acetato de sódio a 100 mM, pH 5,0 e 0,015 mL de solução de enzima) foi incubada a 50 °C, durante 5 (BXI, ARF e AXE) ou 10 minutos (CBH, BGL e BGAL). Os ensaios foram interrompidos pela adição de 0,05 mL de carbonato de sódio 200 mM. A quantificação do *p*-nitrofenol liberado foi estimada por absorvância a 410 nm. Uma unidade (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  de *p*-nitrofenol, nas condições do ensaio.

A atividade de feruloil esterase (FAE) foi determinada utilizando arabinoxilano de trigo insolúvel (Megazyme®), como substrato. O ensaio foi composto de 0,1 mL de substrato 1% (p/v), 0,04 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 0,06 mL do extrato enzimático. A mistura foi incubada a 50 °C, sob agitação de 300 rpm, por 30 minutos. Em seguida a mistura foi centrifugada e o sobrenadante utilizado para as leituras. Para cada reação enzimática foi realizado um branco, em que a enzima foi previamente fervida. Além deste, foi feito um segundo branco somente com o substrato e tampão. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 310 nm, utilizando-se uma curva padrão de ácido ferúlico (1 mg/mL). A unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{g}$  de produto por minuto, nas condições de ensaio.

### **3.7. Quantificação de proteínas**

A análise de proteínas foi feita utilizando o reagente de Bradford (BioRad®), conforme as especificações do fabricante. Assim, um volume de 160  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foi incubado a temperatura ambiente com 40  $\mu\text{L}$  do reagente por 5 minutos. A absorvância foi lida em leitor de microplacas em comprimento de onda de 595 nm, utilizando-se uma curva padrão de albumina de soro bovino (1 mg/mL).

### **3.8. Sacarificação enzimática das canas-de-açúcar**

Os extratos enzimáticos contendo celulases e hemicelulases foram aplicados em ensaios com volume final de 1 mL contendo: 3% de bagaço (p/v), 0,1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 0,9 mL de extrato. Os experimentos foram conduzidos a 50 °C, sob agitação de 200 rpm, por 24 horas. Após este período, o material foi centrifugado (4800 rpm) a 4 °C e realizadas as análises de liberação de açúcar redutor pelo método de Miller (109).

### **3.9. Caracterização bioquímica do coquetel enzimático**

A caracterização bioquímica do coquetel enzimático foi realizada a partir do extrato obtido pelo cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em palha de milho (PM) (item 3.5.4.). As condições de aplicação do mesmo foram caracterizadas para as seguintes biomassas lignocelulósicas: bagaço de cana-de-açúcar (SCB), Cana Energia (EC) e cana-de-açúcar variedade SP80-3280 (SP80). A quantificação dos açúcares redutores, em  $\mu\text{mol/mL}$ , ocorreu de acordo com o método de Miller (109).

#### **3.9.1. Efeito da temperatura**

As hidrólises enzimáticas de SCB, EC e SP80 foram realizadas conforme descrito anteriormente (item 3.8). O experimento foi conduzido em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, com carga de 1% de proteína no coquetel. As temperaturas testadas para a performance do coquetel variaram de 45 a 70 °C.

#### **3.9.2. Efeito do pH**

Após a seleção da temperatura do coquetel (50 °C), foi testado o efeito do pH na sacarificação enzimática com a mesma carga de proteína do item anterior. Para estas análises foram utilizados: tampão acetato de sódio, 50 mM na faixa de pH de 4,0 a 5,5 e tampão fosfato de sódio, 50 mM na faixa de pH de 6,0 a 7,0.

### **3.9.3. Concentração de proteína**

Após determinada as condições ótimas de temperatura (50 °C) e pH (4,0 para SCB e SP80-3280 e 4,5 para EC) do coquetel enzimático para as diferentes canas-de-açúcar, foram testadas também diferentes concentrações de proteínas. Os ensaios foram realizados da seguinte forma: bagaço 3% (p/V), 0,1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, sendo pH 4,0 (para SCB e SP80) e pH 4,5 (para EC) e as diferentes concentrações de proteínas. O volume final de hidrólise foi mantido em 1 mL. Os experimentos foram conduzidos com as seguintes concentrações do coquetel: 1%, 3%, 6%, 9%, 12% e 15% (mg de proteínas do coquetel / 100 mg de biomassa). Os experimentos foram conduzidos a 50 °C, sob agitação de 200 rpm, por 24 horas.

### **3.9.4. Tempo de hidrólise**

Com as condições de temperatura (50 °C), pH (4,0 para SCB e SP80-3280 e 4,5 para EC) e concentração de proteínas otimizados, foram analisados diferentes tempos de hidrólise. Os experimentos foram conduzidos de acordo o item 3.9.3., com 0,12 mg de proteínas/mg de biomassa, sendo que as amostras foram retiradas a cada 24 horas, durante 5 dias.

### **3.9.5. Efeito da carga de sólidos**

Após selecionadas as melhores condições de hidrólise em relação a temperatura, pH, concentração de proteínas e tempo de 24, 48 e 96 horas (SCB, EC e SP80-3280, respectivamente), foi estudado o efeito da quantidade de biomassa em relação a sacarificação enzimática. A concentração de biomassa variou de 0,5 a 4 %.

### **3.9.6. Influência de surfactantes**

Foram testados a influência dos seguintes surfactantes (0,15 g de surfactante/ g de biomassa): Tween –20, Tween –80 e Triton X-100 na liberação de açúcares redutores (107), nas condições ótimas de aplicação do coquetel enzimático para

degradação de cada biomassa.

### **3.10. Aplicação do coquetel caracterizado na sacarificação enzimática de canas comerciais e energia**

O coquetel obtido em biorreator a partir do cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em PM foi aplicado na hidrólise das canas SCB, EC e SP80-3280, após a otimização do coquetel para cada biomassa (item 3.9). O ensaio de sacarificação foi realizado, com volume final de reação de 1 mL, da seguinte maneira:

1. Para SCB: 4% de biomassa, 0,12 mg de proteína por mg de biomassa, 0,1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0 e, se necessário, água destilada para completar o volume da reação. O ensaio foi incubado a 50 °C, sob agitação de 200 rpm, durante 24 horas;

2. Para EC: 3% de biomassa, 0,12 mg de proteína por mg de biomassa, 0,1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 e, se necessário, água destilada para completar o volume da reação. O ensaio foi incubado a 50 °C, sob agitação de 200 rpm, durante 48 horas;

3. Para SP80-3280: 3% de biomassa, 0,12 mg de proteína por mg de biomassa, 0,1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0 e, se necessário, água destilada para completar o volume da reação. O ensaio foi incubado a 50 °C, sob agitação de 200 rpm, durante 96 horas;

4. Foram realizadas as hidrólises do material da Granbio (**Tabela 6**), nas seguintes condições: para as canas comerciais, seguiu-se a aplicação conforme o otimizado para a cana SP80-3280; para as canas energia, a aplicação deu-se igual para EC.

Após o tempo de ação do coquetel enzimático, o material foi centrifugado 4800 rpm (Centrífuga refrigerada Eppendorf 5810R), a 4 °C e realizadas as análises de liberação de açúcar redutor de acordo com o método de Miller (109).

### **3.11. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica**

#### **3.11.1. Pré-tratamento enzimático**

As canas SCB, EC e SP80-3280 foram tratadas com extrato bruto rico em lacase de *Lentinus sajor caju*. O pré-tratamento foi conduzido com a aplicação de 50 U.g<sup>-1</sup> de biomassa do extrato enzimático (113,114), cedido pela doutoranda Emanuelle Neiverth de Freitas do nosso laboratório, com carga de sólidos fixada em 5 %, tampão acetato de sódio na concentração final de 50 mM, pH 5,0, totalizando um volume final de 5 mL. Este foi incubado a 50 °C durante 24 horas. Após o tratamento, as amostras foram filtradas e lavadas com 500 mL de água destilada. O material foi seco em estufa a 50 °C.

### **3.11.2. Autohidrólise**

O pré-tratamento foi realizado em um reator cilíndrico de aço inoxidável (5,0 cm de diâmetro interno e 12,8 cm de altura interna) com volume de trabalho de 50 mL. As canas SCB, EC e SP80-3280 foram pré-tratadas a 190 °C, durante 20 minutos, enquanto a carga de sólidos foi fixada a 10 % (p/v), conforme descrito por Michelin e Teixeira (91). O reator foi imerso em um banho de óleo, com um circulador de aquecimento aberto com controle de temperatura. Após, o reator foi imediatamente resfriado em um banho de gelo para extinguir a reação. O material resultante foi armazenado até o uso a 20 °C.

### **3.11.3. Organosolv com etanol**

O pré-tratamento *organosolv* foi realizado no mesmo reator descrito no item 3.11.2., com volume de trabalho de 50 mL. As canas SCB, EC e SP80-3280 foram pré-tratadas a 170 °C, durante 60 minutos com uma solução de etanol 50 % (v/v), utilizando carga de sólidos de 10 % (p/v) (115). Após este tempo, esperou-se o reator atingir 60 °C. Em seguida, o material foi filtrado a vácuo e a fração líquida recolhida e congelada. A fração sólida foi lavada com a mesma solução de etanol 50 %, seguida por lavagem abundante com água destilada. O material resultante foi seco a 50 °C até peso constante.

### **3.11.4. Organosolv com etanol e ácido sulfúrico**

O pré-tratamento *organosolv* com etanol e ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) foi realizado no mesmo reator do item 3.11.2., com volume de trabalho de 50 mL. As canas SCB, EC e SP80-3280 foram tratadas a 170 °C, durante 10 minutos com uma solução de etanol a 50 % (v/v) contendo 1 % (p/v) de ácido sulfúrico (116), sendo carga de sólidos fixada em 10 % (p/v). O reator foi aquecido até a temperatura desejada. Após a reação estar completa, o reator foi resfriado a 60 °C usando um recipiente de gelo e a biomassa tratada foi separada da fração líquida. A fração sólida foi lavada abundantemente com água destilada e o material resultante foi seco a 50 °C.

### 3.11.5. Alcalino com Peróxido de Hidrogênio

O pré-tratamento alcalino com peróxido de hidrogênio foi modificado de Rico e colaboradores (114). O tratamento das biomassas foi conduzido em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de uma solução de 2 % (p/v) de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e 1 % (p/v) de NaOH com 6 % de carga de sólidos. Os materiais vegetais foram submetidos à extração de peróxido alcalino a 50 °C durante 1 hora. Em seguida, o material foi lavado abundantemente com água destilada, e a biomassa resultante foi seca a 50 °C.

### 3.11.6. Alcalino

O pré-tratamento alcalino foi conduzido em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de uma solução de 4 % (1M) de hidróxido de sódio (NaOH) e 10 % de carga de sólidos. Os frascos foram cobertos com papel alumínio e autoclavados a 121 °C, 1 atm durante 60 minutos. Em seguida, os materiais resultantes deste processo foram filtrados e a fração líquida foi recolhida para análises posteriores. Os sólidos resultantes foram lavados com água destilada a 60 °C para remoção da hemicelulose e lignina presentes nas fibras (117). A biomassa foi seca a 50 °C.

Após o resultado da sacarificação enzimática das biomassas, foram estudados o efeito de diferentes tempos de autoclavagem e concentrações de NaOH nas canas SCB, EC e SP80-3280. Inicialmente, os pré-tratamentos foram conduzidos com 25 mL de uma solução de 4% de NaOH e 10 % de carga de sólidos. Os frascos foram cobertos com papel alumínio e autoclavados a 121 °C, 1 atm durante 15, 30, 45 e 75

minutos. Com o tempo de pré-tratamento fixado em 60 minutos, foram então testadas as seguintes concentrações de NaOH: 1%, 2%, 8% e 16%.

### **3.12. Análises das canas-de-açúcar**

#### **3.12.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As canas SCB, EC e SP80-3280 foram analisadas, antes e após a sacarificação, por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram fixadas em suporte de amostra de alumínio através de adesivos de carbono condutivo (*Electron Microscopy Sciences* - EMS). Sequencialmente, as amostras foram inseridas em um sistema Bal-Tec (SCD-050 *Sputter Coater*) para sobreposições de carbono e ouro (sputtering catódico / tempo de 120 segundos) sob uma pressão de 0,1 mbar. A caracterização morfológica das amostras foi realizada em microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss (EVO 50) sob vácuo de  $10^{-5}$  Torr e tensão de aceleração de 20 kV. Micrografias foram gravadas no modo de contraste SE (elétron secundário). As análises foram realizadas no Departamento de Química, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

#### **3.12.2. Análises termogravimétricas**

Análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas em SCB, EC e SP80-3280, antes e após a sacarificação, utilizando o Analisador Térmico Simultâneo - DSC / TGA (Discovery SDT Q600). Em um cadinho de alumínio, 10 mg de amostra foram pesados e depois aquecidos a 800 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>. Os experimentos foram conduzidos sob atmosfera de ar com vazão de 100 mL.min<sup>-1</sup> (20). As análises foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. José Mauricio Cautit, do Departamento de Química, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

### 3.13. Determinação dos açúcares por Cromatografia de Camada Delgada

Os produtos formados pela hidrólise enzimática de SCB, EC e SP80-3280 *in natura* e pré-tratados foram analisados em cromatografia de camada delgada (TLC (*Thin Layer Chromatography*) –Merck 25 folhas de alumínio 20x20 cm sílica gel 60). Foram aplicados 5 µL de cada hidrolisado e 10 µL de padrão contendo: glucose e celobiose, e xilose e xilobiose (0,1 % m/v). A placa foi colocada em uma cuba de vidro contendo solução n-butanol, etanol e água destilada, na proporção de 5:3:2. A corrida foi realizada duas vezes e a revelação da placa foi realizada borrifando uma solução com 18 mL de metanol, 2 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e 0,04 g de orcinol, e revelada em estufa a 100°C por aproximadamente 5 minutos até o aparecimento das bandas.

### 3.14. Cultivo de *Trichoderma reesei* RP698 e *Mycothermus thermophilus* crescidos em Cana Energia e Cana-de-açúcar SP80-3280

#### 3.14.1. Obtenção do extrato para análise da secreção de enzimas pelos fungos filamentosos

Inicialmente, foi testada a produção de proteínas pelos fungos *T. reesei* RP698 e *M. thermophilus* crescidos em meio mínimo líquido (112), suplementado com Cana Energia (1 % p/v) e cana-de-açúcar SP80-3280 (1 % p/v) conforme padronizado (item 3.5.1) como única fonte de carbono, durante 10 dias. Além do cultivo individual dos fungos nessas biomassas, foi realizado o cocultivo dos mesmos a 35 °C. Também foram realizados os crescimentos dos fungos em glicerol, frutose e glucose, como controle do experimento. A cada 24 horas foram retiradas amostras de cada um destes cultivos para dosagem de proteínas (item 3.7).

Após quantificação das proteínas, o cultivo dos fungos foi conduzido em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio mínimo líquido (112), suplementados com 1 % de fonte de carbono, sob agitação de 120 rpm, nas condições descritas na **Tabela 7**. Todo o experimento foi realizado em triplicata, totalizando 135 amostras. Os cultivos foram filtrados em malha de nylon, para evitar a perda de proteínas durante o processo de filtração, especialmente as celulasas. A biomassa



resultante foi guardada para a desorção enzimática das mesmas. Foram dosadas as atividades de endoglucanase, celobiohidrolase,  $\beta$ -glucosidase e xilanase dos extratos obtidos conforme descrito no item 3.6.

**Tabela 7.** Desenho experimental para análise do secretoma de *Trichoderma reesei* RP698 e *Mycothermus thermophilus*.

Fungo / T° de cultivo	Fonte de carbono	Tempo de cultivo (dias)
<i>T. reesei</i> RP698 (30 °C)	Glucose (controle)	
	Cana Energia (EC)	
	Cana SP80-3280	1
<i>M. thermophilus</i> (40 °C)	Glucose (controle)	2
	Cana Energia (EC)	5
	Cana SP80-3280	7
<i>T. reesei</i> RP698 + <i>M. thermophilus</i> (35 °C)	Glucose (controle)	8
	Cana Energia (EC)	
	Cana SP80-3280	
	Palha de milho (PM)	5

Fonte: Dados da autora.

Para a análise do secretoma dos fungos, o extrato do 1° e 2° dias de cada condição foram associados. O tempo de cultivo de 5 dias foi utilizado individualmente, enquanto os experimentos de 7 e 8 dias também foram reunidos. Além disso, todas as triplicatas de cada condição também foram somadas. Desta forma, ao final foram obtidas 27 amostras, divididas da seguinte maneira para cada fungo e para o cocultivo:

1. Controle, tempo inicial (1° + 2° dias de cultivo) e suas triplicatas;
2. Controle com 5 dias de cultivo e suas triplicatas;
3. Controle, tempo final (7° + 8° dias de cultivo) e suas triplicatas;
4. Cultivo em Cana Energia, tempo inicial (1° + 2° dias de cultivo) e suas triplicatas;
5. Cultivo em Cana Energia com 5 dias de cultivo e suas triplicatas;
6. Cultivo em Cana Energia, final (7° + 8° dias de cultivo) e suas triplicatas;
7. Cultivo em cana-de-açúcar variedade SP80, tempo inicial (1° + 2° dias de

cultivo) e suas triplicatas;

8. Cultivo em cana-de-açúcar variedade SP80 com 5 dias de cultivo e suas triplicatas;

9. Cultivo em cana-de-açúcar variedade SP80, tempo final (7<sup>o</sup> + 8<sup>o</sup> dias de cultivo) e suas triplicatas;

Além da análise do secretoma dos fungos crescidos em cana-de-açúcar SP80-3280 e Cana Energia, foi analisado também o secretoma do cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP696 crescido em palha de milho durante 5 dias em biorreator (ver item 3.5.4).

### **3.14.2. Precipitação de proteínas com Ácido Tricloro Acético**

Após a concentração de proteínas das amostras ser determinada (item 3.6), foi realizada a precipitação das mesmas. Para a sequência dos procedimentos foi utilizado aproximadamente 250 µg de proteínas totais. Em seguida, foi adicionado o ácido tricloro acético (TCA) 20% gelado e misturado gentilmente, na proporção de 1:1 ( $V_{\text{extrato}}:V_{\text{TCA}}$ ). Esta mistura foi incubada a -20 °C durante 72 horas. Após este período, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm (Centrífuga refrigerada Eppendorf 5810R,) durante 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* recuperado.

### **3.14.3. Desnaturação, redução e digestão proteica: FASP**

O *pellet* recuperado na etapa de precipitação de proteínas com TCA (item 3.14.2) foi ressuspenso em 250 µL de uma solução A (ureia 8 M, Ditiotretitol (DTT) 7,5 mM e bicarbonato de amônio 100 mM). A mistura foi incubada em banho seco a 37 °C por 1 hora. Em seguida, foi adicionado, na proporção V:V, uma solução B (ureia 8 M, Iodoacetamida 50 mM e bicarbonato de amônio 100 mM). A mistura foi incubada em temperatura ambiente ao abrigo da luz durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 50 µL de DTT 50 mM. Após esta etapa, foi realizada uma nova precipitação com TCA 20% (V:V) a -20 °C durante 30 minutos. Posteriormente, os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 15.000 rpm (Centrífuga refrigerada Eppendorf 5810R) por 30 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi lavado com 500 µL de acetona gelada e centrifugado a 15.000 rpm por 10 minutos, sendo o

sobrenadante descartado. Esta etapa foi realizada duas vezes. Após a lavagem do pellet, o mesmo foi ressuscitado com 250  $\mu$ L no tampão bicarbonato de amônio 10 mM. Foi adicionado tripsina na proporção de 1:50 ( $\mu$ g de tripsina para  $\mu$ g de proteína) e a mistura foi incubada a 37 °C, por 16 horas. Para interromper a atividade da tripsina, foi adicionado 1  $\mu$ L de ácido fórmico em cada tudo (118).

#### **3.14.4. Preparo das amostras em coluna C18 para espectrometria de massas**

Em princípio as amostras foram acidificadas para a concentração de 0.1% com ácido trifluoroacético (TFA). Em seguida as colunas C18 (Waters®) foram lavadas com 2 mL de metanol 100 %, seguido por 2 mL de acetonitrila 100 %. Para o equilíbrio das colunas foi utilizado primeiramente 5 mL do Tampão A (TFA 0,1% em água). Em seguida foram adicionadas as amostras na coluna C18 e coletado o *flowthrough* em tubos Eppendorf limpos. Depois desta etapa a coluna foi lavada com 3 mL do tampão A, seguida da lavagem com 5 mL do tampão B (0.1 % de TFA em 10% de acetonitrila e 90 % de água). Por fim, as amostras foram eluídas com 1,5 mL do tampão C (0.1 % de TFA em 70 % de acetonitrila e 30 % de água) e armazenadas em tubos Eppendorfs limpos.

Para a conservação das amostras proteicas, as mesmas foram liofilizadas e armazenadas em freezer -80 °C.

#### **3.14.5. Identificação das proteínas**

As análises para identificação das proteínas foram realizadas na *facility* Biomass – Mass Spectrometry e Proteome Research do Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) da Universidade de São Paulo (São Paulo – SP). As análises foram realizadas no LTQ-Orbitrap Velos ETD (Thermo Scientific®) acoplado ao Easy nanoLC II (Thermo). Os peptídeos foram separados em uma coluna C18RP em um gradiente de 115 min. As condições instrumentais foram verificadas usando 100 fmol de uma digestão trípica de BSA como padrão. Para a identificação de proteínas foi realizada a busca em bancos de dados de proteínas (NCBIInr - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/> e Uniprot – <http://www.uniprot.org/>) através do software Proteome Discovery versão 1.4 (Thermo Scientific) utilizando a ferramenta

de busca SEQUEST (<http://fields.scripps.edu/sequest/>), que correlaciona os espectros de MS2 de peptídeos composto por sequência de aminoácidos com as sequências depositadas nos respectivos bancos.

#### **3.14.6. Anotação de CAZymes**

As sequências das proteínas identificadas (item 3.14.5) nos experimentos foram baixadas do banco de dados do Uniprot (119). Domínios conservados de CAZymes foram identificados usando os perfis HMM (*Hidden Markov Model*, ou Modelo Oculto de Markov) disponíveis no banco de dados dbCAN2 (120) v. 2019-08-08, no programa hmmscan da suite HMMER v. 3.2.1 (121). Após identificação, os resultados foram filtrados usando o script hmmscan-parser.sh, disponibilizado no dbCAN2 (21/07/2015), e-value < 1e-17 e cobertura > 0,45, de acordo com as especificações do dbCAN2 para a análise dos domínios em fungos. As anotações de CAZymes foram adicionadas nos resultados com um script 'in house' na linguagem Perl, usando as descrições de famílias no dbCAN2 (2019-09-06, com modificações pela autora).

#### **3.15. Análises estatísticas**

Todos os testes foram realizados em triplicatas, sendo analisados as médias e desvio padrão. Os dados foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias usando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. As diferenças no crescimento e na liberação de açúcares redutores foram analisadas usando ANOVA unidirecional seguido por um teste t pareado. As análises foram realizadas em Past v. 2.17c (122).

## 4. RESULTADOS

PARTE I: PRODUÇÃO DE  
HOLOCELULASES POR FUNGOS  
FILAMENTOSOS E POTENCIAL DE  
HIDRÓLISE DE CANA-DE-AÇÚCAR E  
CANA ENERGIA

#### 4.1. Produção de holocelulases em cana-de-açúcar e Cana Energia por diferentes fungos filamentosos

Os fungos estudados para a produção de enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico foram: *A. awamori*, *Aspergillus brasiliensis*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. niveus*, *A. terreus*, *Humicola grisea*, *H. insolens*, *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698; cultivados em bagaço cana-de-açúcar (SCB) e Cana Energia (EC) durante 5 dias.

A **Tabela 8** apresenta a produção de holocelulases por microrganismos cultivados em SCB. *M. thermophilus* foi o único fungo capaz de produzir todas as enzimas testadas; este microrganismo apresentou os melhores níveis de CBH (0,16 U/mL), BGL (0,39 U/mL), XYN (21,12 U/mL), BXI (0,02 U/mL) e MAN (0,50 U/mL). O segundo melhor produtor de enzimas, o fungo *T. reesei* RP698, destacou-se principalmente na produção de EG (0,20 U/mL), XEG (0,41 U/mL) e AXE (0,05 U/mL), sendo ARF a única enzima que não foi produzida. Em seguida, *A. niveus* não foi capaz de produzir BXI e AXE. No entanto, esse fungo apresentou a melhor atividade de ARA (0,15 U/mL) e o segundo melhor nível de XEG (0,37 U/mL). *A. brasiliensis*, *A. terreus*, *A. flavus* e *H. insolens* apresentaram uma série de atividades enzimáticas, mas sem nível de destaque quando comparados aos demais fungos. *A. clavatus*, *A. awamori* e *H. grisea* tiveram a pior produção, uma vez que os dois primeiros tiveram apenas produção de EG e XYN, e o último, além de EG e XYN, também produziu um baixo nível enzimático de MAN. Apesar da baixa gama de enzimas produzidas por *A. clavatus*, esse fungo apresentou o segundo melhor nível de XYN (19,53 U/mL).

**Tabela 8.** Produção de holocelulases pelos fungos filamentosos cultivados em bagaço de cana-de-açúcar (SCB).

Microrganismos	Enzimas (U/mL)									
	EG*	CBH	BGL	XYN	BXI	ARA	ARF	XEG	MAN	AXE
<i>A. clavatus</i>	0,02	n.d.**	n.d.	19,53	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>A. awamori</i>	0,01	n.d.	n.d.	0,83	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>A. niveus</i>	0,05	0,01	0,09	3,24	n.d.	<b>0,15</b>	0,01	0,37	0,07	n.d.
<i>A. brasiliensis</i>	0,04	n.d.	0,03	0,31	0,01	0,04	n.d.	0,07	0,02	n.d.
<i>A. terreus</i>	0,07	0,06	0,03	9,46	n.d.	0,03	n.d.	0,21	0,01	0,01
<i>A. flavus</i>	0,02	0,03	0,02	0,25	n.d.	0,01	n.d.	0,03	n.d.	0,01
<i>M. thermophilus</i>	0,18	<b>0,16</b>	<b>0,39</b>	<b>21,12</b>	<b>0,02</b>	0,13	<b>0,02</b>	0,22	<b>0,50</b>	0,01
<i>T. reesei</i> RP698	<b>0,20</b>	0,01	0,04	11,48	0,01	0,03	n.d.	<b>0,41</b>	0,03	<b>0,05</b>
<i>H. insolens</i>	0,10	0,01	0,02	9,83	n.d.	0,06	n.d.	0,20	0,02	0,01
<i>H. grisea</i>	0,07	n.d.	n.d.	0,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,01	n.d.

\*EG: endoglucanase; CBH: celobiohidrolase; BGL:  $\beta$ -glucosidase; XYN: xilanase; BXI:  $\beta$ -xilosidase; ARA: arabinanase; ARF: arabinofuranosidase; XEG: xiloglucanase; MAN: mananase; AXE: acetil xilano esterase. \*\* n.d.: não detectada. Fungos cultivados em meio mínimo suplementado com SCB1%, a 30 °C, 37 °C ou 40 °C, por 120 horas. Fonte: Dados da autora.



A **Tabela 9** apresenta a produção enzimática de fungos cultivados em EC. Assim como o cultivo em SCB, *M. thermophilus* foi o único microrganismo que produziu todas as enzimas quando cultivadas em EC. Além disso, este fungo apresentou o melhor nível de EG (0,21 U/mL), CBH (0,14 U/mL), BGL (0,40 U/mL), XYN (27,67 U/mL), BXI (0,03 U/mL), ARA (0,09 U/mL), ARF (0,17 U/mL), MAN (0,57 U/mL) e AXE (0,08 U/mL).

Embora *H. insolens* também tenha produzido todas as enzimas, seus níveis foram muito baixos, exceto para XYN, que resultou na segunda melhor atividade enzimática com 12,67 U/mL.

Em segundo lugar, os fungos *A. brasiliensis* e *A. flavus* produziram todas as holocelulases, exceto MAN e BXI, respectivamente. No entanto, os níveis de atividade foram baixos quando comparados a *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698.

O fungo *T. reesei* RP698 apresentou o melhor nível de XEG (0,34 U/mL) e a terceira melhor atividade de XYN (7,02 U/mL). *A. awamori*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. terreus* e *H. grisea* foram os piores produtores de acordo com a gama das atividades enzimáticas obtidas.

**Tabela 9.** Produção de holocelulases pelos fungos filamentosos cultivados em Cana Energia (EC).

Microrganismos	Enzimas (U/mL)									
	EG	CBH	BGL	XYN	BXI	ARA	ARF	XEG	MAN	AXE
<i>A. clavatus</i>	0,03	n.d.	0,01	2,72	n.d.	0,02	n.d.	0,04	0,05	0,01
<i>A. awamori</i>	0,05	0,02	0,06	2,14	0,01	0,05	n.d.	0,08	n.d.	0,01
<i>A. niveus</i>	0,07	0,01	0,04	2,81	n.d.	<b>0,09</b>	n.d.	0,16	n.d.	0,01
<i>A. brasiliensis</i>	0,05	0,01	0,03	1,86	0,01	0,05	0,01	0,15	n.d.	0,01
<i>A. terreus</i>	0,07	0,02	0,02	0,82	n.d.	n.d.	0,01	0,12	n.d.	0,01
<i>A. flavus</i>	0,02	0,02	0,03	2,93	n.d.	0,03	0,01	0,05	0,11	0,01
<i>M. thermophilus</i>	<b>0,21</b>	<b>0,14</b>	<b>0,40</b>	<b>27,67</b>	<b>0,03</b>	<b>0,09</b>	<b>0,17</b>	0,18	<b>0,57</b>	<b>0,08</b>
<i>T. reesei</i> RP698	0,15	n.d.	0,01	7,02	n.d.	0,04	n.d.	<b>0,34</b>	n.d.	0,02
<i>H. insolens</i>	0,11	0,01	0,04	12,67	0,01	0,07	0,01	0,23	0,03	0,01
<i>H. grisea</i>	n.d.	n.d.	n.d.	0,55	n.d.	0,01	n.d.	0,01	0,01	n.d.

\*EG: endoglucanase; CBH: celobiohidrolase; BGL:  $\beta$ -glucosidase; XYN: xilanase; BXI:  $\beta$ -xilosidase; ARA: arabinanase; ARF: arabinofuranosidase; XEG: xiloglucanase; MAN: mananase; AXE: acetil xilano esterase. \*\* n.d.: não detectada.

Fungos cultivados em meio mínimo suplementado com SCB 1%, a 30 °C, 37 °C ou 40 °C, por 120 horas.

Fonte: Dados da autora.

## 4.2. Potencial de aplicação do extrato de enzimas fúngicas no bagaço de cana-de-açúcar e na Cana Energia

Após a produção de holocelulases, foi analisada a capacidade dos extratos enzimáticos de hidrolisar SCB e EC *in natura*, ou seja, sem nenhum pré-tratamento para disponibilizar melhor acesso aos componentes da parede celular pelas enzimas. Optou-se por não realizar nenhum pré-tratamento, uma vez que este processo acarreta um aumento do custo do produto.

Para tal, tornou-se necessário conhecer a composição das biomassas lignocelulósicas utilizadas. Na **Tabela 10** é possível observar a composição de lignina, celulose e hemicelulose de SCB e EC, comparada com a variedade da cana comercial SP80-3280. SCB e EC apresentaram baixo teor de lignina (6,5 e 8,0 %, respectivamente) e altas quantidades de celulose (36,6 % para SCB e 39,4 % para EC) e hemicelulose (39,2 % e 38,3 %, respectivamente).

**Tabela 10.** Composição do bagaço de cana-de-açúcar (SCB), colmo de Cana Energia (EC) e cana-de-açúcar SP80-3280.

Biomassa	Composição (%)			Referência
	Lignina	Celulose	Hemicelulose	
Bagaço de cana-de-açúcar (SCB)	6,5	36,6	39,2	Este trabalho
Cana Energia (EC)	8,0	39,4	38,3	Este trabalho
Cana-de-açúcar SP80-3280	21,8	40,7	29,9	(123)

Fonte: Dados da autora.

Os experimentos de hidrólise foram conduzidos nas mesmas condições das dosagens das atividades enzimáticas; tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e a hidrólise foi incubada a 50 °C por 24 horas. Durante o experimento, foi realizado um controle demonstrando que as biomassas não apresentavam açúcares redutores (AR), resultando em 0,01  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$  para SCB e 0,04  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$  para EC. Os dados de liberação AR, após aplicação dos extratos enzimáticos, estão apresentados na

**Figura 8.**

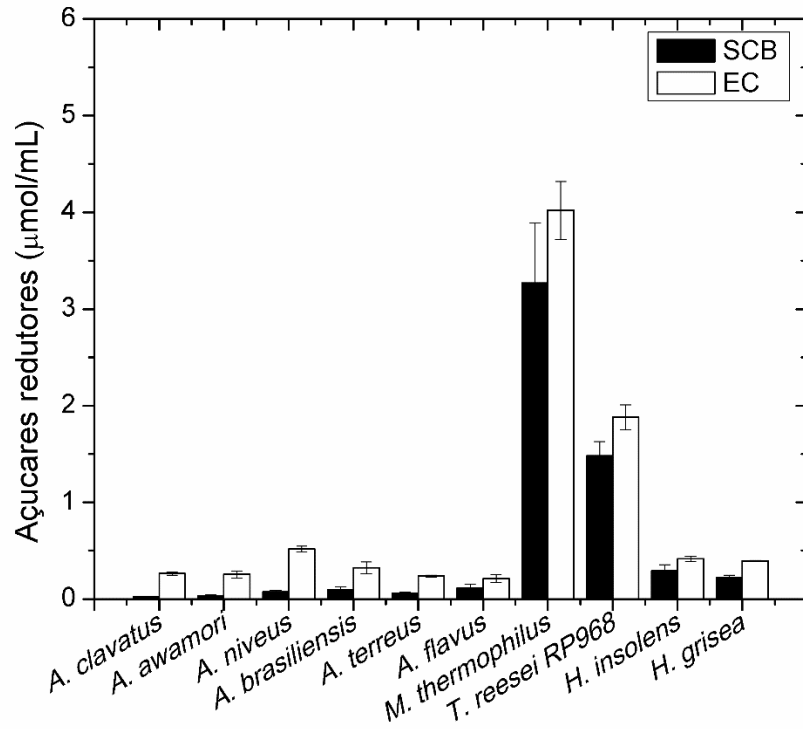
Foi observado que na hidrólise de SCB utilizando o extrato de *M. thermophilus* produzido com EC, a liberação de AR foi 1,23 vezes maior ( $4,02 \pm 0,30 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) do que a liberada pelo extrato produzido com SCB (**Figura 8A**). Em contrapartida, os extratos de *T. reesei* RP698 produzidos com SCB e EC apresentaram resultados de hidrólise com menor liberação de AR. Mesmo assim, o extrato deste fungo crescido em EC liberou 1,28 vezes mais AR ( $1,88 \pm 0,13 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) do que quando o microrganismo foi cultivado em SCB ( $1,48 \pm 0,15 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) (**Figura 8A**).

Quando o coquetel de *M. thermophilus* foi aplicado à sacarificação EC (**Figura 8B**) a liberação de AR foi quase a mesma ( $4,81 \pm 0,25 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  para SCB e  $4,55 \pm 0,61 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  EC), independentemente da fonte de carbono utilizada para obter o coquetel enzimático. Por outro lado, o extrato de *T. reesei* RP698 cultivado em EC liberou 1,52 vezes mais AR ( $2,08 \pm 0,08 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) do que quando o fungo foi cultivado em SCB ( $1,37 \pm 0,04 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ).

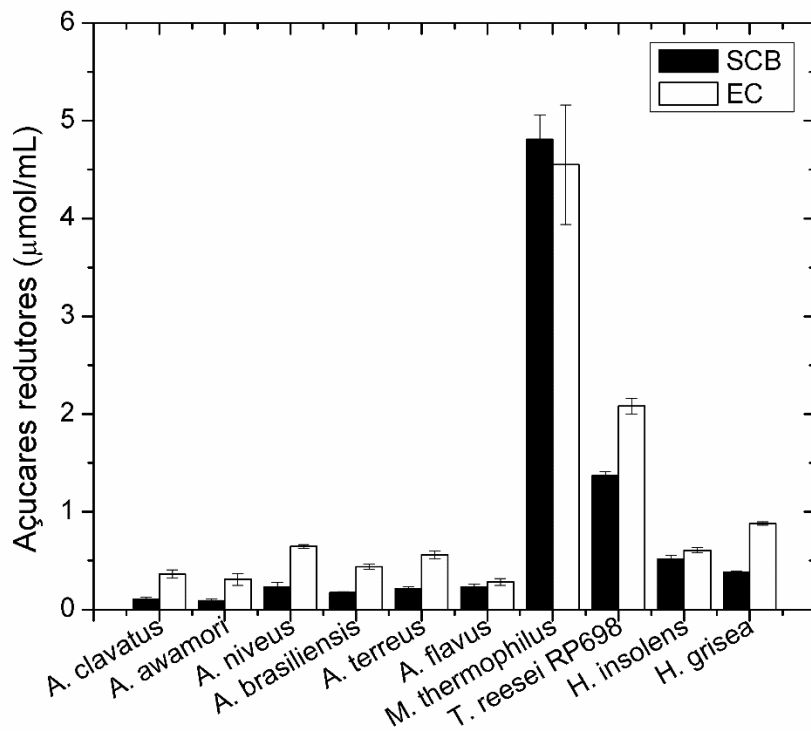
A liberação de AR pelas espécies de *Aspergillus* e *Humicola* foi quase inexistente ou muito baixa ( $<1 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) (**Figura 8**), provavelmente devido ao fato de as culturas desses fungos na SCB e EC não favorecerem a produção de holocelulases (**Tabela 8 e Tabela 9**).

**Figura 8.** Aplicação de extratos enzimáticos produzidos por fungos filamentosos crescidos em bagaço de cana-de-açúcar (SCB) e Cana Energia (EC) na hidrólise de: (A) SCB e; (B) EC.

**A**



**B**



Fonte: Dados da autora.

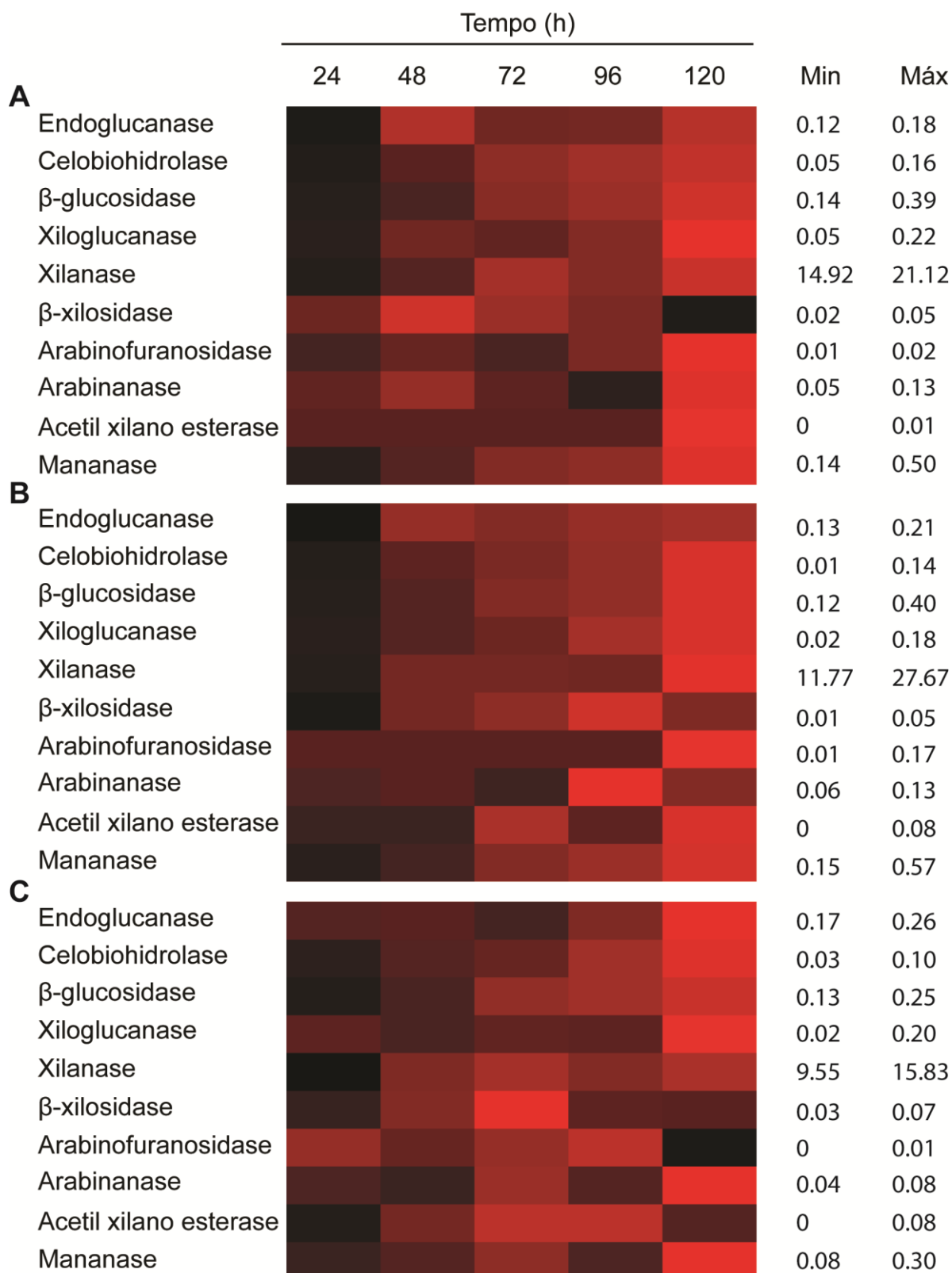
#### 4.3. Perfil da produção de enzimas pelos fungos filamentosos *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em diferentes canas-de-açúcar

Posteriormente ao teste de produção de holocelulases, os fungos *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 foram selecionados como os melhores fungos produtores de holocelulases. Dessa forma, foi estudado o perfil de produção de: EG, CBH, BGL, XYN, BXI, ARN, ARF, XEG, MAN e AXE ao longo de 5 dias de cultivo nas mesmas condições anteriormente estudadas para a seleção desses fungos e também cultivados na variedade de cana-de-açúcar SP80-3280, a qual é o alvo do projeto do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) do Bioetanol, com o qual este trabalho foi vinculado.

A **Figura 9** apresenta o perfil de holocelulases de *M. thermophilus* crescidas em SCB, EC e SP80-3280. Em SCB (**Figura 9A**), as enzimas começaram a ser produzidas após 24 horas de cultivo, exceto a AXE, que levou 48 horas para ser produzida. Em geral, as enzimas apresentaram o mesmo padrão de produção ao longo do tempo de cultivo, atingindo seu pico de atividade em 120 horas. No entanto, o BXI atingiu o nível mais alto de atividade em 48 horas (0,05 U/mL), com uma redução em sua atividade nas próximas 72 horas, atingindo o nível mais baixo em 120 horas (0,02 U/mL).

Em EC (**Figura 9B**), o perfil de produção das holocelulases foi muito semelhante, pois também iniciaram suas atividades com 24 horas, exceto a AXE, que demorou 48 horas para ser produzida, assim como em SCB. A maioria das enzimas atingiu seu pico de atividade em 120 horas, com exceção da BXI e da ARA, que foram detectadas com 96 horas de cultivo. Em SP80-3280 (**Figura 9C**), o padrão de produção foi o mesmo em relação ao início das atividades, ou seja, 48 horas para a AXE e 24 horas para as outras enzimas.

**Figura 9.** Heatmap do padrão de produção de holocelulases por *Mycothermus thermophilus* cultivado em (A) SCB; (B) EC; (C) SP80-3280 por 5 dias.



A escala de gradiente de cores representa os valores mais baixos (preto) e mais altos (vermelho). Os valores mínimos (Min) e máximos (Máx) referem-se as atividades enzimáticas em U/mL.

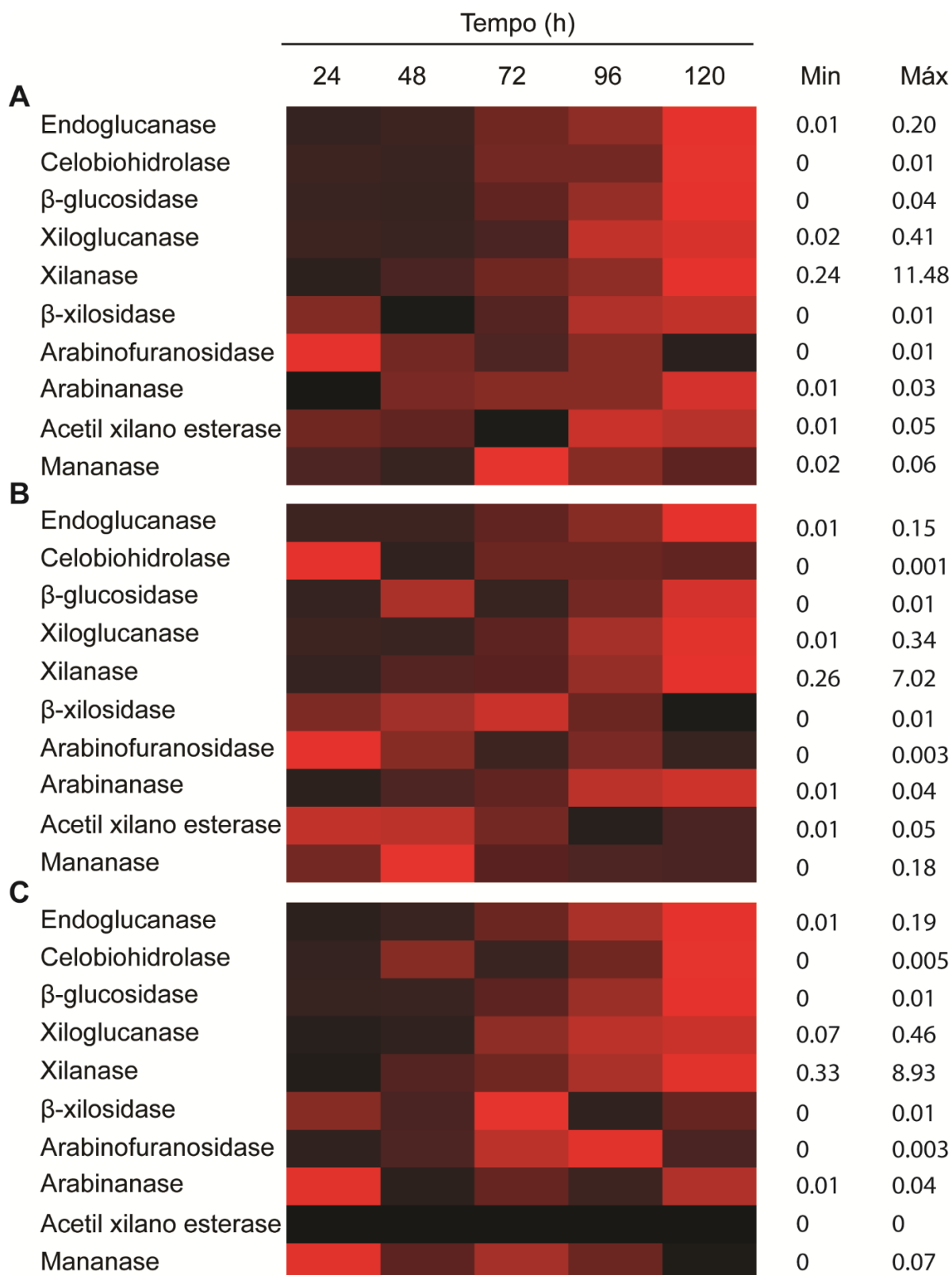
Fonte: Dados da autora.

Dessa forma, BGL (0,40 U/mL), XYN (27,67 U/mL), ARF (0,17 U/mL), MAN (0,57 U/mL) apresentaram maior atividade quando EC foi utilizada como fonte de carbono com 120 horas de cultivo. Os melhores níveis de CBH (0,16 U/mL), XEG (0,22 U/mL) foram no cultivo com SCB, enquanto EG (0,26 U/mL) foi com SP80-3280, também em 120 horas. O pico de atividade do BXI (0,05 U/mL) foi obtido em SCB (48 horas), EC (96 horas) e SP80-3280 (48 horas), enquanto o da ARA (0,13 U/mL) foi obtido em SCB (120 horas) e EC (96 horas). Finalmente, a melhor atividade de AXE (0,08 U/mL) foi obtida na SP80-3280 (72-96 horas) e na EC (120 horas).

A produção de holocelulases de *T. reesei* RP698 ao longo de 5 dias de cultivo em SCB, EC e SP80-3280 (**Figura 10**) mostrou resultados semelhantes ao obtido por *M. thermophilus*, pois foi possível observar os níveis enzimáticos de todas as holocelulases estudadas. No entanto, o padrão de produção foi um pouco diferente. Em SCB (**Figura 10A**), o início das atividades de EG, XEG, XYN, BXI, ARF, ARA, AXE e MAN ocorreram em 24 horas, mas BGL e CBH apareceram com 72 horas de cultivo. Com exceção da ARF (0,03 U/mL) que atingiu o pico de sua atividade em 24 horas, as demais holocelulases apresentaram o nível mais alto em 120 horas. Apenas EG (0,20 U/mL), XEG (0,41 U/mL) e XYN (11,48 U/mL) apresentaram atividades significativas. Em EC (**Figura 10B**), a produção enzimática foi muito similar a quando o microrganismo foi cultivado em SCB, em que apenas a ARF e o CBH não apresentaram atividade detectada (< 0,01 U/mL). Assim como em SCB, a EC mostrou atividade significativa apenas de EG (0,15 U/mL), XEG (0,34 U/mL) e XYN (7,02 U/mL) com 120 horas de cultivo. Em SP80-3280 (**Figura 10C**), as atividades de CBH, ARF e AXE detectadas foram menores que 0,01 U/mL durante as 120 horas. BGL e BXI apresentaram os níveis mais baixos de enzima de 0,01 U / mL. Assim como para SCB, o cultivo de *T. reesei* RP698 com SP80-3280 apresentou apenas atividades satisfatórias de EG (0,19 U/mL), XEG (0,46 U/mL) e XYN (8,93 U/mL).



**Figura 10.** Heatmap do padrão de produção de holocelulases por *Trichoderma reesei* RP698 cultivado em (A) SCB; (B) EC; (C) SP80-3280 por 5 dias.



A escala de gradiente de cores representa os valores mais baixos (preto) e mais altos (vermelho). Os valores mínimos (Min) e máximos (Máx) referem-se as atividades enzimáticas em U/mL.

Fonte: Dados da autora.

#### 4.4. Efeito da aplicação enzimática de coquetel de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 produzido em SP80-3280 na hidrólise do bagaço da cana, Cana Energia e cana SP80-3280

Após estudar a produção de holocelulases por *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 cultivados em SCB, EC e SP80-3280, os extratos com 120 horas de cultivo foram avaliados quanto à capacidade de hidrolisar essas biomassas lignocelulósicas. Os resultados da liberação de AR, em  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ , podem ser vistos na **Tabela 11**.

O extrato de *M. thermophilus* cultivado em SP80-3280 apresentou um aumento de 1,22 vezes na hidrólise de SCB ( $4,91 \pm 0,39 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR) em relação ao extrato EC ( $4,02 \pm 0,30 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR). Para a hidrólise SP80-3280, o melhor extrato de *M. thermophilus* foi aquele em que o fungo cresceu em SP80-3280, liberando  $6,10 \pm 0,44 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR. Assim, *M. thermophilus* cultivado em SP80-3280 apresentou potencial para sacarificação de biomassa lignocelulósica, uma vez que os melhores resultados de hidrólise de SCB e SP80-3280 foram obtidos pela aplicação do coquetel enzimático obtido nessas condições. No entanto, vale ressaltar que a maior liberação de AR da EC ocorreu com o extrato cultivado em SCB ( $4,81 \pm 0,25 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ).

Os resultados da sacarificação das diferentes canas-de-açúcar foram bastante satisfatórios; com extratos de *T. reesei* RP698 produzido em SP80-3280, a liberação de AR foi de  $2,20 \pm 0,14 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  (SCB) e  $4,61 \pm 0,14 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  (EC),  $3,17 \pm 0,14 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  (SP80-3280). Entretanto, a maior liberação de AR da cana-de-açúcar SP80-3280 foi com o extrato crescido em SCB ( $4,73 \pm 0,18 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ).

**Tabela 11.** Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar (SCB), Cana Energia (EC) e cana de açúcar SP80-3280 com extratos obtidos por *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 cultivados em SP80-3280.

Microrganismo	Fonte de carbono	Liberação de açúcares redutores ( $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ )		
		SCB	EC	SP80-3280*
<i>M. thermophilus</i>	SCB	3,27 $\pm$ 0,62	4,81 $\pm$ 0,25	4,34 $\pm$ 0,33
	EC	4,02 $\pm$ 0,30	4,55 $\pm$ 0,61	3,05 $\pm$ 0,29
	SP80-3280*	<b>4,91 <math>\pm</math> 0,39</b>	4,40 $\pm$ 0,06	<b>6,10 <math>\pm</math> 0,44</b>
<i>T. reesei</i> RP698	SCB	1,48 $\pm$ 0,15	1,37 $\pm$ 0,04	4,73 $\pm$ 0,18
	EC	1,88 $\pm$ 0,13	2,08 $\pm$ 0,08	1,56 $\pm$ 0,09
	SP80-3280*	<b>2,20 <math>\pm</math> 0,14</b>	<b>4,61 <math>\pm</math> 0,14</b>	3,17 $\pm$ 0,14

\*Os demais resultados já foram apresentados (**Figura 8**) e encontram-se na Tabela para fins de comparação

Fonte: Dados da autora.

Neste capítulo, nenhum pré-tratamento foi escolhido, uma vez que esse processo implica em um valor agregado no produto e o objetivo foi avaliar a eficiência de coquetéis enzimáticos em biomassa *in natura*.

PARTE II: SACARIFICAÇÃO DE  
DIFERENTES VARIEDADES DE CANA-  
DE-AÇÚCAR POR COQUETÉIS  
ENZIMÁTICOS PRODUZIDOS POR  
CULTURAS DE *Mycothermus thermophilus*  
E *Trichoderma reesei* RP698  
SUPLEMENTADAS COM RESÍDUOS  
AGROINDUSTRIAIS: VALORIZAÇÃO DE  
COCULTIVO DE FUNGOS PARA  
MELHORAR OS NÍVEIS ENZIMÁTICOS

#### 4.5. Sacarificação de cana-de-açúcar a partir de extratos produzidos em diferentes resíduos

Para *M. thermophilus* (**Tabela 12**), a maior liberação de AR ocorreu com o extrato produzido pelo cultivo do microrganismo em PM ( $6,73 \pm 0,64 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR para SCB;  $6,93 \pm 0,75 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR para EC e  $5,43 \pm 0,27 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR para SP80-3280), seguido de SM ( $4,68 \pm 0,36 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR para SCB;  $5,37 \pm 0,17 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR para EC e  $5,21 \pm 0,16 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  para SP80-3280). Somente para a hidrólise da cana-de-açúcar SP80-3280 que não houve diferença significativa ( $P > 0,01$ ) entre os dois extratos (PM e SM) utilizados. Estes resultados são melhores que os obtidos após aplicação do extrato produzido pelo fungo cultivado em SCB, melhorando a hidrólise em 2,06 vezes para SCB, 1,44 vezes para EC e 1,25 vezes para SP80-3280. Não houve liberação de AR após aplicação do extrato produzido com CC. Para a hidrólise de SCB, não houve diferença significativa ( $P > 0,01$ ) entre a aplicação de PA, BC, CE e PF, que apresentaram menores liberação de AR. Os piores resultados para hidrólise de EC e SP80-3280 foram com PA ( $0,39 \pm 0,12 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  e  $0,63 \pm 0,14 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR, respectivamente).

Assim como *M. thermophilus*, para *T. reesei* RP698 (**Tabela 12**), o melhor extrato foi o de PM para todas as canas testadas ( $4,69 \pm 0,44 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  AR para SCB,  $2,32 \pm 0,25 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  para EC e  $4,93 \pm 0,33 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  para SP80-3280), seguido pelo extrato produzido a partir do crescimento em SM para as canas SCB e EC ( $3,77 \pm 0,31 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  AR e  $3,77 \pm 0,14 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR, respectivamente) e PF para a variedade SP80-3280 ( $3,38 \pm 0,20 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR). Os melhores resultados foram 3,17 vezes (SCB) e 2,75 vezes (EC) maiores que quando aplicado o extrato obtido pelo cultivo em SCB. O pior resultado foi com o extrato de PA ( $0,40 \pm 0,10 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR). Os resultados da aplicação do coquetel de *T. reesei* RP698 cultivado com CC, CE e BC foram significativamente menores ( $P < 0,01$ ) que PM e SM.

**Tabela 12.** Sacarificação de SCB, EC e SP80-3280 pelos extratos enzimáticos de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 produzidos em meio suplementado com diferentes resíduos.

Resíduo	Açúcar redutor ( $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ )					
	<i>Mycothermus thermophilus</i>			<i>Trichoderma reesei</i> RP698		
	SCB	EC	SP80-3280	SCB	EC	SP80-3280
Palha de arroz	0,38±0,19a*	0,39±0,12a	0,63±0,14a	0,39±0,09a	0,40±0,10a	0,36±0,02a
Casca de café	0	0	0	2,18±0,15b	1,55±0,25b	1,48±0,25b
Bagaço de cevada	0,52±0,25a	0,85±0,06ab	2,22±0,25b	0,69±0,16ac	1,10±0,28b	1,50±0,14b
Casca de eucalipto	0,73±0,17a	0,89±0,15ab	1,19±0,29a	1,24±0,27cf	1,28±0,28b	1,76±0,24b
Palha de feijão	0,73±0,23a	1,33±0,12b	3,22±0,55c	<b>2,52±0,31b</b>	<b>2,46±0,22c</b>	<b>3,38±0,20c</b>
Palha de milho	<b>6,73±0,64b</b>	<b>6,93±0,75c</b>	<b>5,43±0,27d</b>	<b>4,69±0,44d</b>	<b>2,32±0,25c</b>	<b>4,93±0,33d</b>
Sabugo de milho	<b>4,68±0,36c</b>	<b>5,37±0,17d</b>	<b>5,21±0,16d</b>	<b>3,77±0,31e</b>	<b>3,77±0,14d</b>	1,57±0,21b
Bagaço de cana-de-açúcar**	3,27±0,62d	4,81±0,25e	4,34±0,33e	1,48±0,15f	1,37±0,04b	<b>4,73±0,18d</b>

\*Letras semelhantes na coluna não indicam diferenças significativas ( $P>0,01$ ).

\*\* Estes resultados já foram apresentados (**Figura 8**) e encontram-se na Tabela para fins de comparação.

Fonte: Dados da autora.

Como observado na **Tabela 12**, as melhores hidrólises das paredes celulares das canas estudadas ocorreram com os extratos produzidos em PM e SM. Com os resíduos selecionados foi estudada a produção de EG, CBH, BGL, XYN, BXI, ARA, ARF, XEG e AXE a partir do crescimento de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698.

Os coquetéis de fungos obtidos de PM e SM mostraram uma grande quantidade dessas enzimas presentes (**Tabela 13**). As maiores atividades de EG ( $0,37 \pm 0,10$  U/mL), XYN ( $40,14 \pm 2,23$  U/mL) e XEG ( $2,20 \pm 0,21$  U/mL) foram obtidas pelo cultivo de *T. reesei* RP698 em PM. Já o cultivo de *M. thermophilus* em PM apresentou melhores níveis enzimáticos de CBH ( $0,15 \pm 0,01$  U/mL), BGL ( $0,23 \pm 0,02$  U/mL) e AXE ( $0,06 \pm 0,02$  U/mL). O nível de ARA mais alto foi obtido pelo crescimento de *M. thermophilus* em SM ( $0,18 \pm 0,03$  U/mL). *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 crescidos em PM e SM não foram capazes de produzir BXI e ARF. Na **Tabela 13** é possível observar que as enzimas apresentaram melhores níveis enzimáticos quando os fungos foram crescidos em PM.

**Tabela 13.** Produção enzimática pelos fungos *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em palha de milho (PM) e sabugo de milho (SM).

Extrato	Enzimas (U/mL)								
	EG*	CBH	BGL	XYN	BXI	XEG	ARF	ARA	AXE
<i>Trichoderma reesei</i> RP 98									
PM	<b>0,37 ± 0,10</b>	0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,02	<b>40,14 ± 2,23</b>	0,01 ± 0,00	<b>2,20 ± 0,21</b>	0	0,09 ± 0,01	0
SM	0,21 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	22,73 ± 2,37	0	1,04 ± 0,08	0	0,11 ± 0,04	0
<i>Mycothermus thermophilus</i>									
PM	0,18 ± 0,03	<b>0,15 ± 0,01</b>	<b>0,23 ± 0,02</b>	4,17 ± 0,37	0,01 ± 0,00	0,22 ± 0,05	0	0,05 ± 0,02	<b>0,06 ± 0,02</b>
SM	0,10 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,18 ± 0,02	6,28 ± 0,51	0,01 ± 0,00	0,40 ± 0,10	0	<b>0,18 ± 0,03</b>	0,06 ± 0,00

\*EG = endoglucanase; CBH = celobiohidrolase; BGL =  $\beta$ -glucosidase; XYN = xilanase; BXI =  $\beta$ -xilosidase; XEG = xiloglucanase; ARF = arabinofuranosidase; ARA = arabinanase; AXE = acetil xilano esterase.

Fonte: Dados da autora.



#### 4.6. Temperatura de crescimento e ensaios de atividade inibitória

Para escolher a temperatura de crescimento mais adequada para ambas as espécies no cocultivo foram consideradas as características fisiológicas dos fungos *T. reesei* RP698 (mesofílico) e *M. thermophilus* (termofílico), em culturas concomitantes, sendo estes cultivados a 30, 35 e 40 °C.

*M. thermophilus* apresentou a menor taxa de crescimento em todas as temperaturas testadas em comparação com *T. reesei* RP698 (**Tabela 14**). Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) para a taxa de crescimento de *T. reesei* RP698 a 30 e 35 °C, mas foi mais lenta a 40 °C. Para *M. thermophilus*, o crescimento a 30 °C foi significativamente mais lento ( $P < 0,05$ ) do que a 35 °C e 40 °C. Não foi testada temperatura superior a 40 °C, devido a diminuição da taxa de crescimento do fungo mesofílico *T. reesei* RP698, que poderia acarretar dificuldade para o cocultivo dos microrganismos estudados.

**Tabela 14.** Relação de crescimento de *Trichoderma reesei* RP698 e *Mycothermus thermophilus* em diferentes temperaturas ( $\text{mm}^2 \text{d}^{-1}$ ).

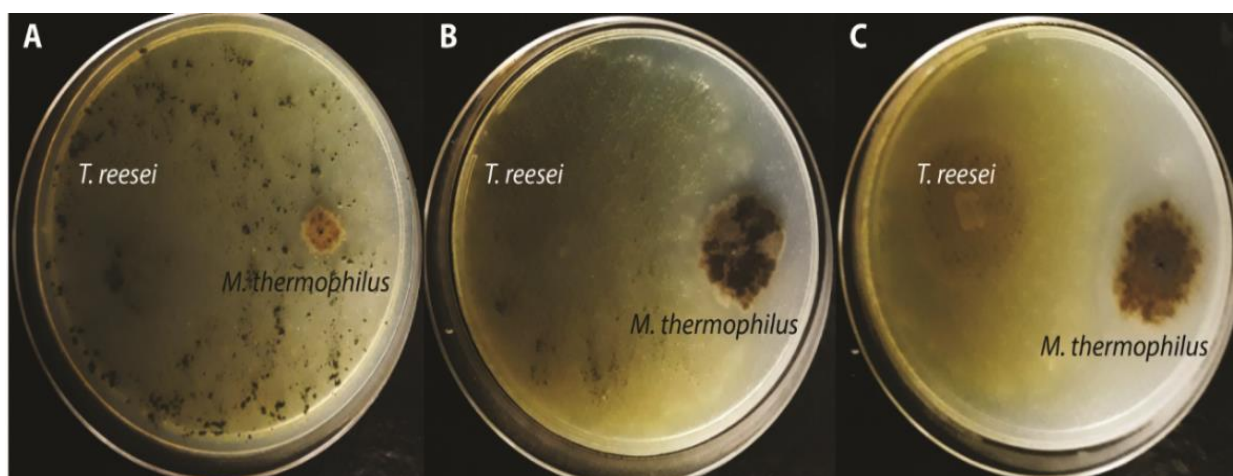
Espécies	Temperatura		
	30 °C	35 °C	40 °C
<i>Trichoderma reesei</i> RP698	6,92 ± 0,52a*	6,25 ± 0,25a	4,92 ± 0,72b
<i>Mycothermus thermophilus</i>	0,33 ± 0,29a	1,79 ± 0,26b	2,33 ± 0,38b

\* Letras semelhantes na linha indicam que não há diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

Fonte: Dados da autora.

A **Figura 11** apresenta o ensaio de confronto dos microrganismos nas diferentes temperaturas testadas. Devido ao pouco crescimento de *M. thermophilus* a 30 °C, foram testadas as temperaturas de 35 e 40 °C para o cocultivo dos microrganismos. Em relação ao ensaio de duplo-confronto, não foi observada atividade inibitória nas temperaturas testadas, embora tenha havido uma dominância de *T. reesei* RP698 a 30 °C, devido ao seu crescimento mais rápido.

**Figura 11.** Ensaio de confronto com *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 a: 30 °C (A), 35 °C (B) e 40 °C (C).



Fungos crescido em meio BDA, por 7 dias.  
Fonte: Dados da autora.

#### 4.7. Cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 para hidrólise de cana-de-açúcar

Avaliou-se o cocultivo entre *M. thermophilus* (fungo termofílico) e *T. reesei* RP698 (fungo mesofílico) em PM e SM, os quais como demonstrado anteriormente foram os extratos que apresentaram melhores resultados individuais de hidrólise das canas SCB, EC e SP80-3280. As produções enzimáticas foram testadas a partir do cocultivo nas temperaturas de 35 e 40 °C, pois sob essas condições há crescimento de ambos os fungos, como discutido anteriormente. Em seguida, realizou-se a sacarificação de SCB, EC e SP80-3280 com extratos enzimáticos produzidos a partir dos referidos cultivos (**Tabela 15**).

Para SCB, a melhor hidrólise foi com o cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em SM a 40 °C ( $7,87 \pm 0,10 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR), melhorando 1,68 vezes a hidrólise em relação a *M. thermophilus* e 2,09 vezes melhor que *T. reesei* RP698 quando esses fungos foram cultivados em SM individualmente (**Tabela 12**). Embora o cocultivo em SM a 40 °C tenha apresentado o melhor resultado, não houve diferença significativa ( $P > 0,01$ ) entre este cocultivo e a hidrólise enzimática após aplicação do extrato obtido pelo cocultivo em PM e SM a 35 °C ( $7,27 \pm 0,33 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR e  $6,52 \pm 0,50 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR, respectivamente). O resultado menos expressivo foi com PM

( $4,23 \pm 0,69 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR) a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , pois houve diminuição na liberação de RS quando comparado à hidrólise individual de fungos (**Tabela 12**).

Para EC, a maior liberação de AR ocorreu após aplicação do extrato obtido do cocultivo em PM a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  (**Tabela 15**), sendo que houve uma melhora de 1,75 vezes na quantidade de AR liberada ( $12,11 \pm 0,46 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) quando comparado aos extrato de *M. thermophilus* ( $6,93 \pm 0,75 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) nesse mesmo resíduo e 5,22 vezes maior que o extrato de *T. reesei* RP698 em PM ( $2,32 \pm 0,25 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) (**Tabela 12**). As coculturas no SM a  $35$  e  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $7,30 \pm 0,67 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  e  $6,07 \pm 0,14 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR) também apresentaram maiores níveis de AR liberados quando comparadas às hidrólises com os extratos individuais de *M. thermophilus* ( $5,37 \pm 0,17 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) e *T. reesei* RP698 ( $3,77 \pm 0,14 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ).

Para SP80-3280 (**Tabela 15**), assim como para EC, o melhor resultado foi a hidrólise do cocultivo em PM a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $9,27 \pm 0,49 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR) que melhorou 1,71 vezes quando comparado com o cultivo individual de *M. thermophilus* no mesmo resíduo e 1,88 vezes para *T. reesei* RP698 (**Tabela 12**). Não houve diferença significativa ( $P > 0,01$ ) entre o cocultivo em PM e SM a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $7,13 \pm 0,08 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  e  $7,20 \pm 0,24 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR, respectivamente) e o cocultivo em SM a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $6,25 \pm 0,67 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR).

**Tabela 15.** Hidrólise enzimática da cana-de-açúcar a partir do cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em palha de milho (PM) e sabugo de milho (SM).

Resíduo	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Açúcares redutores ( $\mu\text{mol/mL}$ )		
		SCB	EC	SP80-3280
PM	35	<b><math>7,27 \pm 0,33\text{a}^*</math></b>	<b><math>12,11 \pm 0,46\text{a}</math></b>	<b><math>9,27 \pm 0,49\text{a}</math></b>
PM	40	$4,23 \pm 0,69\text{b}$	$4,09 \pm 0,91\text{b}$	$7,13 \pm 0,08\text{b}$
SM	35	$6,52 \pm 0,50\text{a}$	$7,30 \pm 0,67\text{c}$	$6,25 \pm 0,67\text{b}$
SM	40	<b><math>7,87 \pm 0,10\text{a}</math></b>	$6,07 \pm 0,14\text{bc}$	$7,20 \pm 0,24\text{b}$

\* Letras semelhantes na coluna não indicam diferenças significativas ( $P > 0,01$ ).

Fonte: Dados da autora.

Na **Tabela 16** é possível observar a produção enzimática dos resíduos que apresentaram os melhores resultados de hidrólise da cana-de-açúcar. Ao comparar a produção individual com as coculturas (**Tabela 13**), foi possível analisar a produção de enzimas que não foram previamente produzidas, como BXI, ARF e AXE para *T.*

*reesei* RP698 tanto para PM, quanto para SM, nas duas temperaturas testadas do cocultivo.

Já para o *M. thermophilus*, apenas a ARF aparece como novidade em todas as condições testadas para o cocultivo nos diferentes resíduos. Além disso, foi possível concluir que EG teve sua atividade reduzida tanto para PM quanto SM. CBH houve um aumento de atividade a partir do cocultivo em SM, assim como BGL. XYN se manteve constante em SM, porém houve uma redução de atividade em PM.

**Tabela 16.** Extratos enzimáticos do cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 produzidos em meio suplementado com PM e SM a 35 e 40 °C.

Extrato	Enzimas (U/mL)								
	EG	CBH	BGL	XYN	BXI	XEG	ARF	ARA	AXE
PM (35 °C)	0,22 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,21 ± 0,01	13,60 ± 1,33	0,09 ± 0,02	2,29 ± 0,08	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,00
SM (35 °C)	0,12 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,17 ± 0,01	22,95 ± 0,61	0,02 ± 0,00	0,23 ± 0,14	0,02 ± 0,01	0,23 ± 0,04	0,01 ± 0,00
PM (40 °C)	0,26 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,18 ± 0,01	2,98 ± 0,67	0,06 ± 0,01	0,44 ± 0,10	0,01 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,02 ± 0,00
SM (40 °C)	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,26 ± 0,05	10,84 ± 0,60	0,06 ± 0,01	0,22 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,09 ± 0,02	0,01 ± 0,00

\*EG = endoglucanase; CBH = celobiohidrolase; BGL = β-glucosidase; XYN = xilanase; BXI = β-xilosidase; XEG = xiloglucanase; ARF = arabinofuranosidase; ARA = arabinanase; AXE = acetil xilano esterase.

Fonte: Dados da autora.

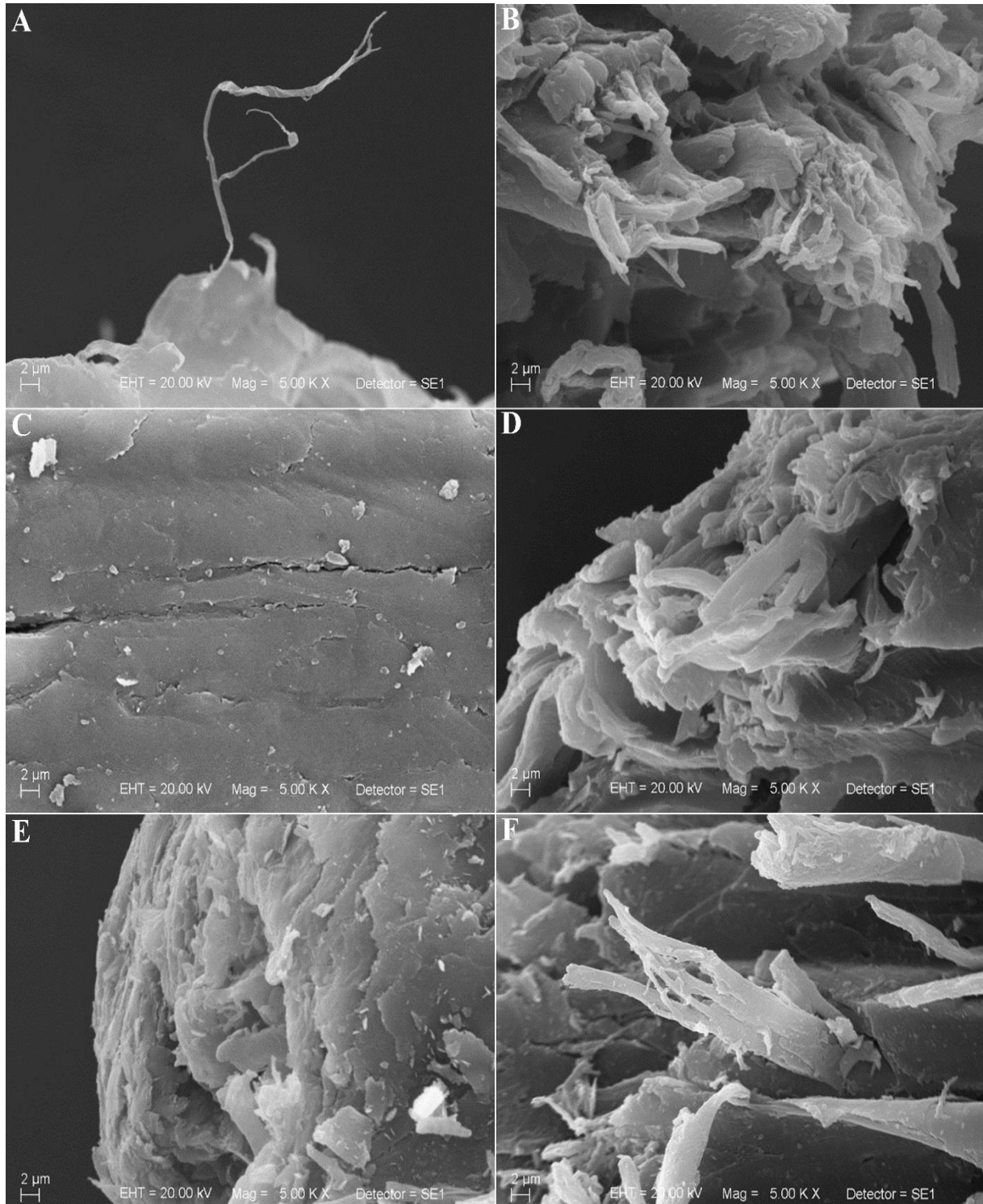
#### 4.8. Mudanças morfológicas e estruturais no bagaço de cana-de-açúcar, Cana Energia e cana-de-açúcar SP80-3280 após aplicação do coquetel produzido por cocultivo em palha de milho

Considerando que os melhores resultados de sacarificação foram obtidos a partir da aplicação do extrato bruto produzido pelo cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 (35 °C), em meio líquido mínimo contendo palha de milho, foi realizada uma microscopia eletrônica de varredura (MEV) do material vegetal antes e após a ação do coquetel enzimático para avaliação da degradação da parede celular de SCB, EC e SP80-3280 (**Figura 12**).

As micrografias das canas *in natura* antes da aplicação do coquetel mostraram estruturas das biomassas lignocelulósicas: SCB (**Figura 12A**), EC (**Figura 12C**) e cana-de-açúcar SP80-3280 (**Figura 12E**) compactas, ordenadas, uniformes e lisas.

As fibras são constituídas por faixas paralelas cobertas por partículas superficialmente que podem ser extrativos, como ceras, por exemplo. Devido à ação do coquetel de enzimas, é possível observar maior desfibrilação das canas em estudo (**Figura 12B, D e F**), uma vez que a área superficial das fibras foi modificada, adquirindo um aspecto mais áspero quando comparada com as fibras do material *in natura*. O rompimento das fibras, mostrou a desorganização e o aumento da porosidade da estrutura da lignocelulósica. No entanto, parte da estrutura fibrilar foi mantida, revelando a necessidade de otimização das condições de hidrólise.

**Figura 12.** Microscopia eletrônica de varredura da cana-de-açúcar antes (A, C e E) e após (B, D e F) tratamento enzimático. (A e B) bagaço de cana (SCB); (C e D) Cana Energia (EC); (E e F) cana-de-açúcar SP80-3280.



Aumento de 5000X.  
Fonte: Dados da autora.

#### **4.9. Análises termogravimétricas do bagaço da cana-de-açúcar, Cana Energia e cana SP80-3280 hidrolisadas por coquetel obtido a partir do cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em palha de milho**

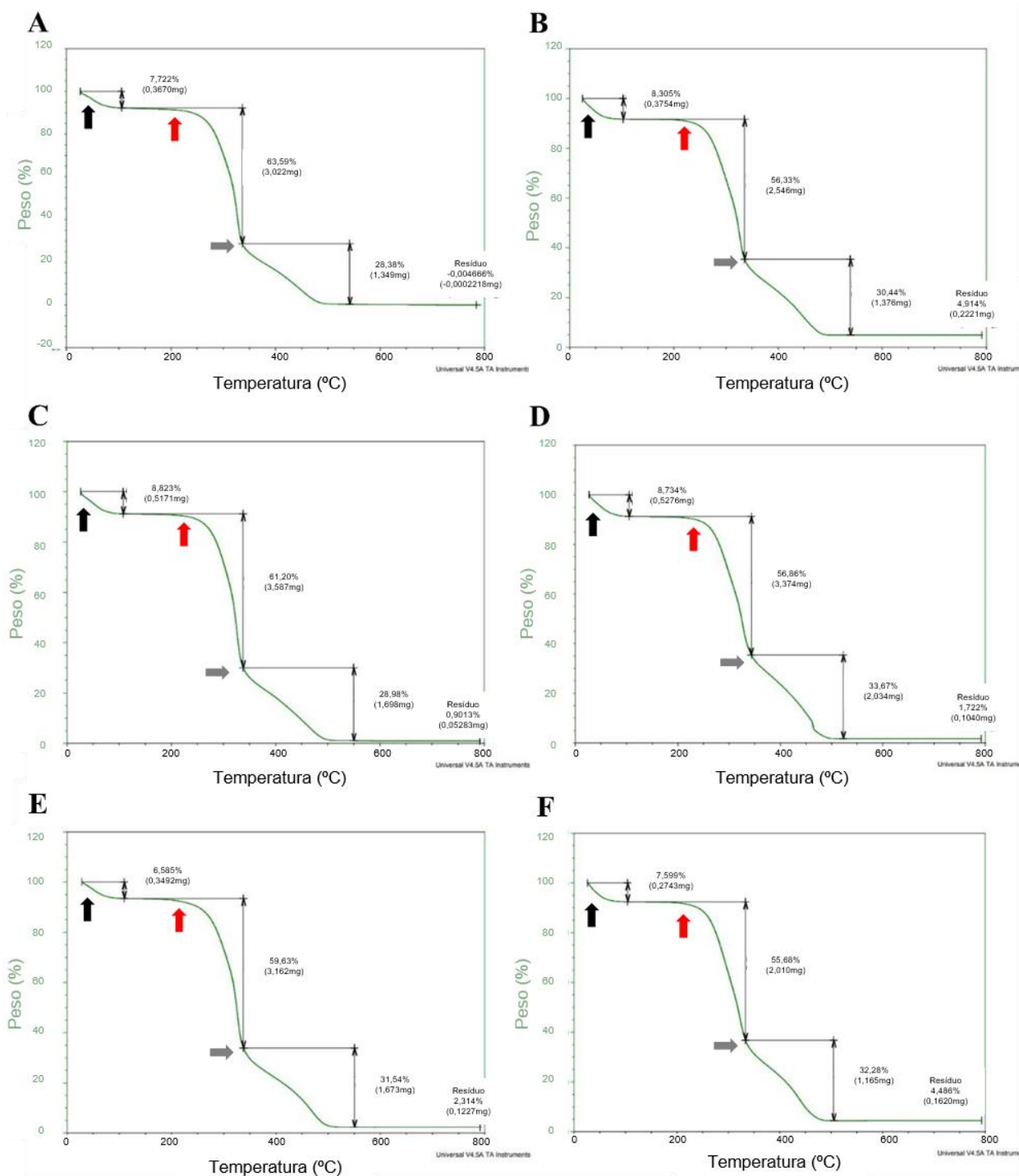
As mesmas amostras analisadas por MEV foram submetidas à análise termogravimétrica (TGA) (**Figura 13**). Todas as amostras, *in natura* e após a hidrólise, apresentaram perfis de TGA semelhantes aos três passos da decomposição. A perda de massa inicial ocorreu abaixo de 100 °C, o que está relacionado à liberação de água. A segunda etapa de decomposição, entre 200 e 350 °C, corresponde à perda de massa relacionada à decomposição de hemicelulose, celulose e lignina. O último passo, entre 320 e 350 °C, corresponde à degradação final da lignina. O teor de cinzas é o resíduo final.

As amostras de SCB, EC e SP80-3280 *in natura* apresentaram maiores teores de massa na segunda etapa de decomposição (3,022 mg, 3,587 mg e 3,162 mg, respectivamente, indicado pelas setas vermelhas (**Figura 13A, C e E**).

A hidrólise enzimática causou alterações no material lignocelulósico, que corroboram com os resultados prévios apresentados. Provavelmente, isso se deve a um menor teor de celulose e hemicelulose após a hidrólise, o que pode ser evidenciado por uma menor porcentagem de perda de massa correspondente a essa fração do material no TGA (2,546 mg para SCB, 3,374 mg para EC e 2,010 mg para SP80-3280) (**Figura 13B, D e F**).



**Figura 13.** Análise termogravimétrica da cana-de-açúcar antes (A, C e E) e após (B, D e F) tratamento enzimático. (A e B) bagaço de cana (SCB); (C e D) Cana Energia (EC); (E e F) cana-de-açúcar SP80-3280.



Três eventos de perda de massa são claramente distintos: liberação de umidade (seta preta), decomposição da hemicelulose, celulose e lignina (seta vermelha) e degradação final da lignina (seta cinza).

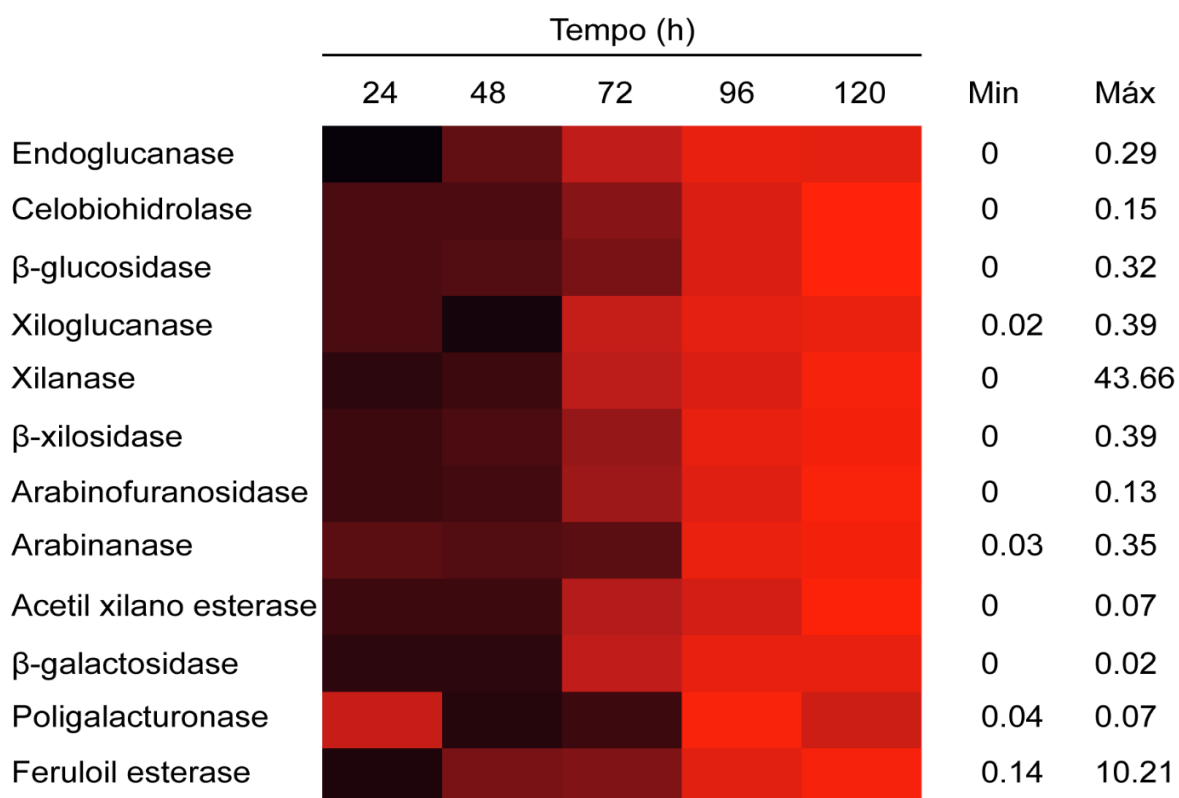
Fonte: Dados da autora.

PARTE III: CARACTERIZAÇÃO  
BIOQUÍMICA DO COQUETEL OBTIDO  
PELO COCULTIVO DE *Mycothermus*  
*thermophilus* E *Trichoderma reesei* RP698  
EM PALHA DE MILHO

#### 4.10. Produção do coquetel enzimático em Biorreator BioFlo 310

A produção do coquetel enzimático a partir do cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em PM em biorreator foi realizada com o intuito de se obter maior quantidade das enzimas responsáveis pela degradação da parede celular das diferentes canas estudadas (SCB, EC e SP80-3280). O cultivo foi realizado durante 5 dias e a produção enzimática ao longo destes dias e o perfil enzimático pode ser visto na **Figura 14**.

**Figura 14.** Análise das enzimas obtidas a partir da produção do coquetel em biorreator.



A escala de gradiente de cores representa os valores mais baixos (preto) e mais altos (vermelho). Os valores mínimos (Min) e máximos (Máx) referem-se as atividades enzimáticas em U/mL.

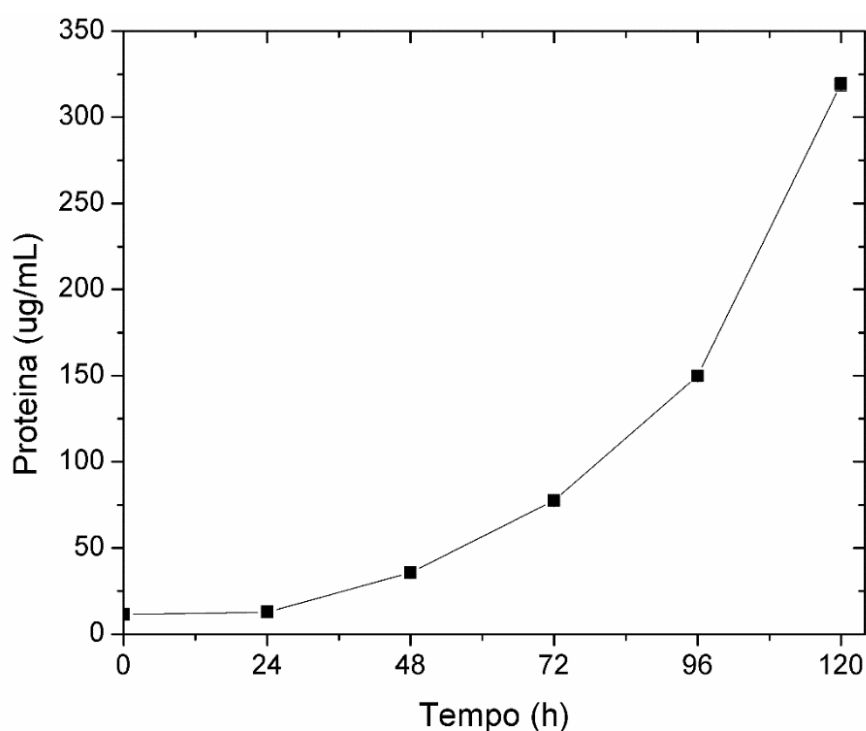
Fonte: Dados da autora.

Nas primeiras 24 horas de cultivo houve a produção de xiloglucanase (XEG), arabinanase (ARA), poligalacturonase (PGase) e feruloil esterase (FAE). Com 48 horas de cultivo, houve a secreção de endoglucanase (EG),  $\beta$ -glucosidase (BGL), xilanase (XYN),  $\beta$ -xilosidase (BXI) e arabinofuranosidade (ARF). Com 72 horas, houve

a produção de acetil xilano esterase (AXE) e  $\beta$ -galactosidase (BGAL). Sendo assim, ao final das 120 horas de cultivo, foi possível obter uma gama de celulasas e hemicelulasas, com atividades bastante satisfatórias. Comparando os resultados da produção em biorreator com a produção em frascos (**Parte II, Tabela 16**), houve uma melhora na atividade de todas as enzimas, com exceção da XEG, em que os níveis enzimáticos diminuíram de 2,29 U/mL para 0,39 U/mL.

Além da produção enzimática, o coquetel foi avaliado em relação a sua produção de proteínas (**Figura 15**). Em 24 horas de cultivo, a produção de proteínas foi baixa, mas ao longo dos dias houve um aumento da concentração proteica, alcançando o seu pico com 120 horas com 330  $\mu$ g de proteínas/mL.

**Figura 15.** Secreção proteica obtida a partir do cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 crescidos em palha de milho em biorreator do tipo tanque agitado.



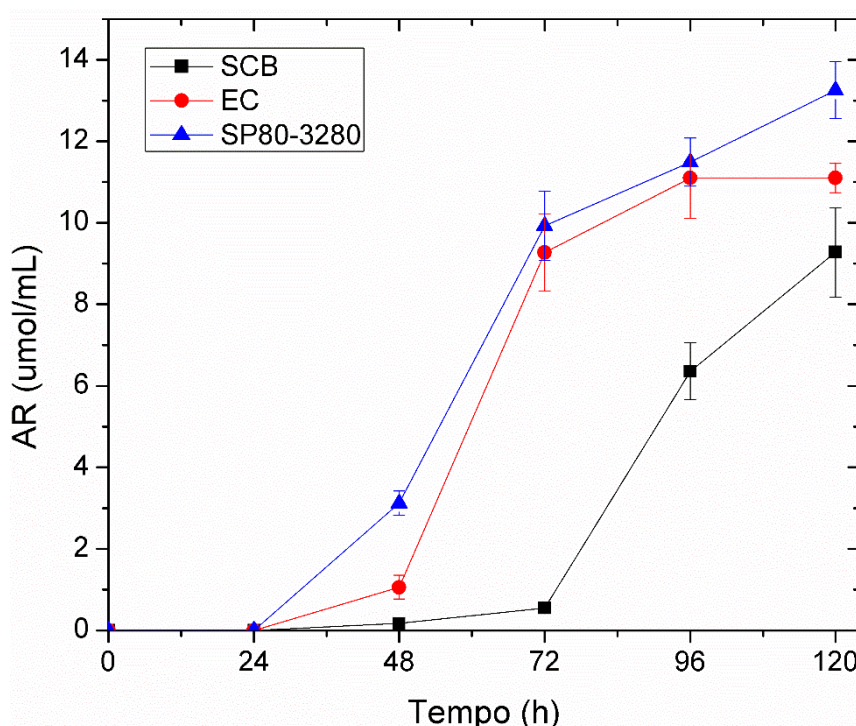
Fonte: Dados da autora.

A análise de sacarificação das canas em relação ao tempo de cultivo em biorreator do coquetel enzimático (**Figura 16**) mostrou que em 24 horas não há liberação de açúcares redutores (AR), o que pode ser explicado pela baixa atividade enzimática encontrada no coquetel (**Figura 14**). Para SCB (**Figura 16**), foi possível observar que após a aplicação do coquetel enzimático a liberação de AR é quase nula

ao longo das primeiras 72 horas de cultivo; com o extrato de 96 horas há o início da sacarificação enzimática da cana, mas somente com o cultivo 120 horas houve máxima liberação de AR. Este resultado é 1,5 vezes maior que a quantidade de AR obtida a partir do coquetel produzido em frascos (**Parte II, Tabela 15**).

Para EC e SP80-3280 (**Figura 16**), o padrão de sacarificação é bem parecido. Com o extrato de 48 horas já há uma liberação de AR, que foi aumentando progressivamente com o tempo. Para EC, os extratos de 96 horas e 120 horas apresentam a mesma capacidade de sacarificação, liberando  $11,10 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR. Este valor de AR é 10% menor ( $12,11 \pm 0,46 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) que o coquetel obtido em frasco (120 horas) (**Parte II, Tabela 15**). Para SP80-3280, com o extrato de 120 horas houve um aumento de 1,43 vezes da quantidade de AR disponível, quando comparado com o cultivo em frascos Erlenmeyers nas mesmas condições, alcançando um pico de liberação de  $13,26 \pm 0,70 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  AR. Desta maneira, optou-se por otimizar o coquetel obtido a partir do Biorreator BioFlo 310 com 5 dias de cultivo, uma vez que testes com tempos de cultivo acima dos testados demandariam um aumento de gastos na produção final do coquetel.

**Figura 16.** Sacarificação enzimática das canas SCB, EC e SP80-3280 pela aplicação do coquetel obtido a partir do cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 crescidos em palha de milho em biorreator do tipo tanque agitado.



Fonte: Dados da autora.

#### 4.11. Caracterização das condições do coquetel enzimático na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar, Cana Energia e cana SP80-3280

Com o intuito de aumentar a degradação da parede celular, o coquetel enzimático proposto foi otimizado em relação a temperatura, pH de hidrólise e porcentagem de proteína (mg de proteína/100 mg de biomassa) para cada uma das três canas estudadas. Já para o estudo das diferentes concentrações de proteínas, o coquetel foi concentrado para diminuir o volume de trabalho e aumentar a quantidade de proteína do mesmo. Após essas análises, com a melhor concentração proteica do coquetel, foi averiguado o melhor tempo de hidrólise, diferentes porcentagens biomassa e o efeito dos surfactantes: Tween –20; Tween –80; e Triton X-100, na sacarificação enzimática.

Para a determinação das melhores condições de hidrólise das diferentes canas, o coquetel foi incubado em diferentes condições: (i) temperaturas que variaram de 45 a 70 °C, com variação de 5 °C; (ii) pH, na faixa de 4,0 a 7,0 e (iii) carga proteica do coquetel de 1 a 15 mg a cada 100 mg de biomassa (**Figura 17**).

A **Figura 17A** apresenta os dados de liberação de AR após a aplicação do consórcio enzimático nas canas em diferentes temperaturas. Neste experimento, o coquetel foi aplicado com a concentração de 1 mg de proteína por 100 mg de biomassa, 3 % de biomassa, tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, durante 24 horas. Os melhores resultados de hidrólise ocorreram a 50 °C, temperatura em que houve a maior quantidade de açúcares liberados. Para EC e SP80-3280 houve liberação de  $12,05 \pm 0,66 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR e  $12,81 \pm 0,83 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ , respectivamente. Enquanto que para SCB, a liberação foi 1,40 vezes menor que para as demais canas ( $8,70 \pm 0,56 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR). Com o aumento da temperatura de hidrólise, houve uma diminuição da sacarificação enzimática,  $2,05 \pm 0,43$  a  $7,09 \pm 0,32 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR para SCB, de  $4,90 \pm 0,39$  a  $8,05 \pm 0,97 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR para EC e  $4,37 \pm 0,64$  a  $10,43 \pm 0,59 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR para SP80-3280.

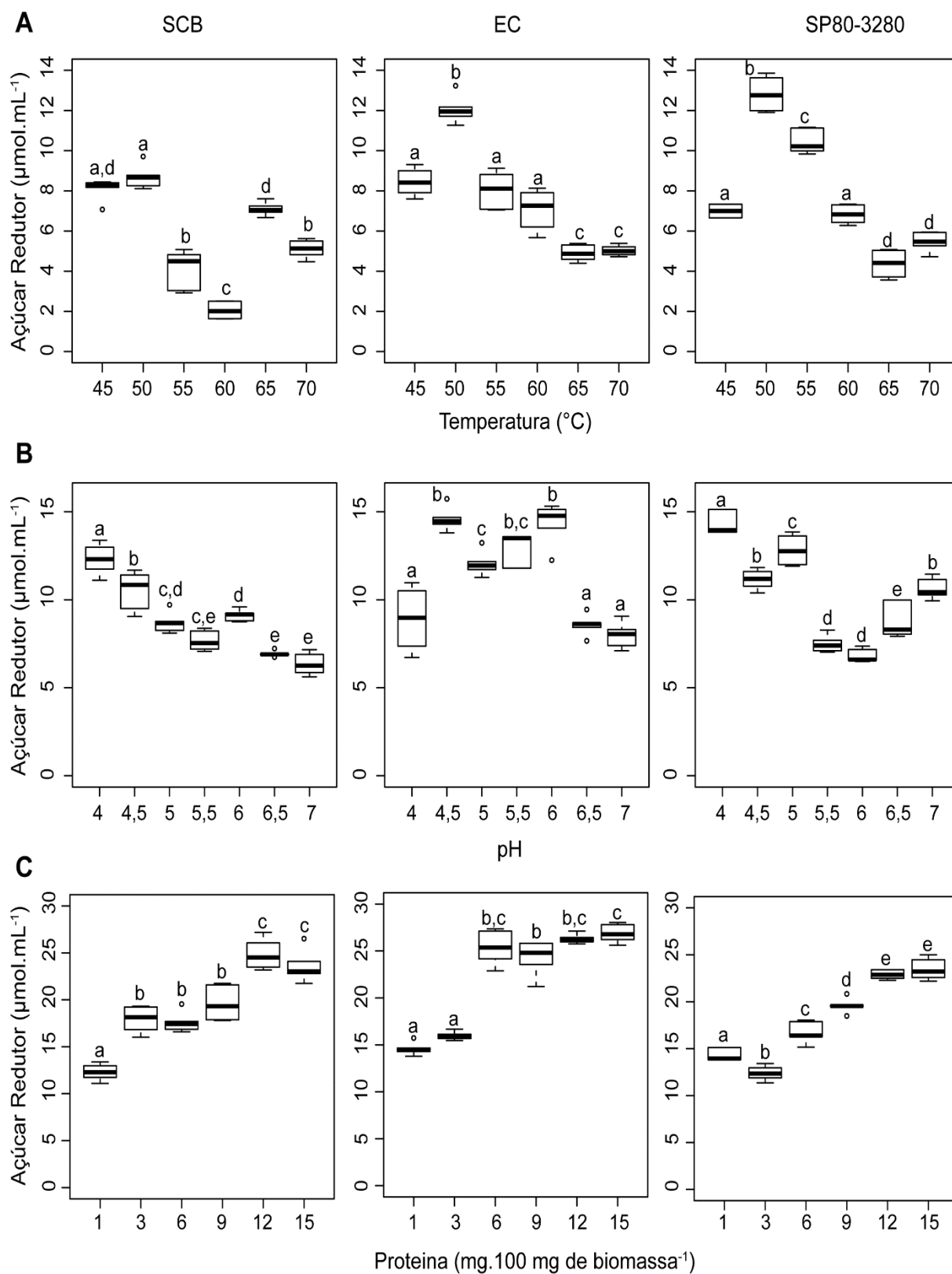
A **Figura 17B** ilustra o efeito do pH na liberação de AR. Após fixada a temperatura de 50 °C, que apresentou os melhores resultados de hidrólise, foi realizado o experimento com a mesma carga proteica, porém em diferentes pH. O coquetel enzimático obtido do cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 apresentou melhor hidrólise das canas em pH mais ácidos, sendo que para as canas comerciais

SCB e SP80-3280 o melhor pH foi 4,0, enquanto para EC foi 4,5. Não houve diferença significativa ( $P > 0,01$ ) entre as hidrólises conduzidas em pH 4,5 e 6,0 para EC, sendo os melhores resultados de liberação de açúcares,  $14,57 \pm 0,64$  e  $14,38 \pm 1,14$   $\mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR, respectivamente. Assim como para EC, a sacarificação de SP80-3280 apresentou elevados níveis de açúcares liberados ( $14,31 \pm 0,64$   $\mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR). Entretanto, tal resultado foi obtido com a aplicação do coquetel em pH 4,0. O segundo melhor resultado de hidrólise, foi com a SCB em pH 4,0, liberando  $12,30 \pm 0,85$   $\mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR.

Determinadas as condições de aplicação do coquetel a 50 °C e pH 4,0 para SCB e SP80-3280 e pH 4,5 para EC, foi testado o efeito de diferentes cargas proteicas do coquetel na hidrólise das canas estudadas. A **Figura 17C** ilustra o efeito da carga proteica, em mg de proteína por 100 mg de biomassa lignocelulósica, na sacarificação enzimática das canas SCB, EC e SP80-3280. O melhor resultado de sacarificação foi para EC, com liberação de  $26,30 \pm 0,47$   $\mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR com uma carga de 12 % de proteína do coquetel.

Para SCB e SP80-3280, não houve diferença significativa ( $P > 0,01$ ) entre a aplicação do coquetel com carga de 12 e 15 % de proteínas na liberação de AR. Entretanto, para SCB houve uma maior hidrólise quando aplicado 12 mg de proteína por 100 mg de biomassa ( $24,82 \pm 1,58$   $\mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR), enquanto que para SP80-3280 o melhor resultado foi com 15 % de carga proteica do coquetel ( $23,45 \pm 1,12$   $\mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR). Uma vez que não houve diferença entre as concentrações de proteínas aplicadas na hidrólise de SCB, EC e SP80-3280, optou-se por dar continuidade nos experimentos de otimização com a menor a carga proteica (12 mg).

**Figura 17.** Caracterização do coquetel enzimático em relação à: (A) temperatura; (B) pH e (C) carga de proteínas na sacarificação das canas SCB, EC e SP80-3280.



\* Letras semelhantes indicam que não há diferenças significativas ( $P > 0,01$ ).

Fonte: Dados da autora.

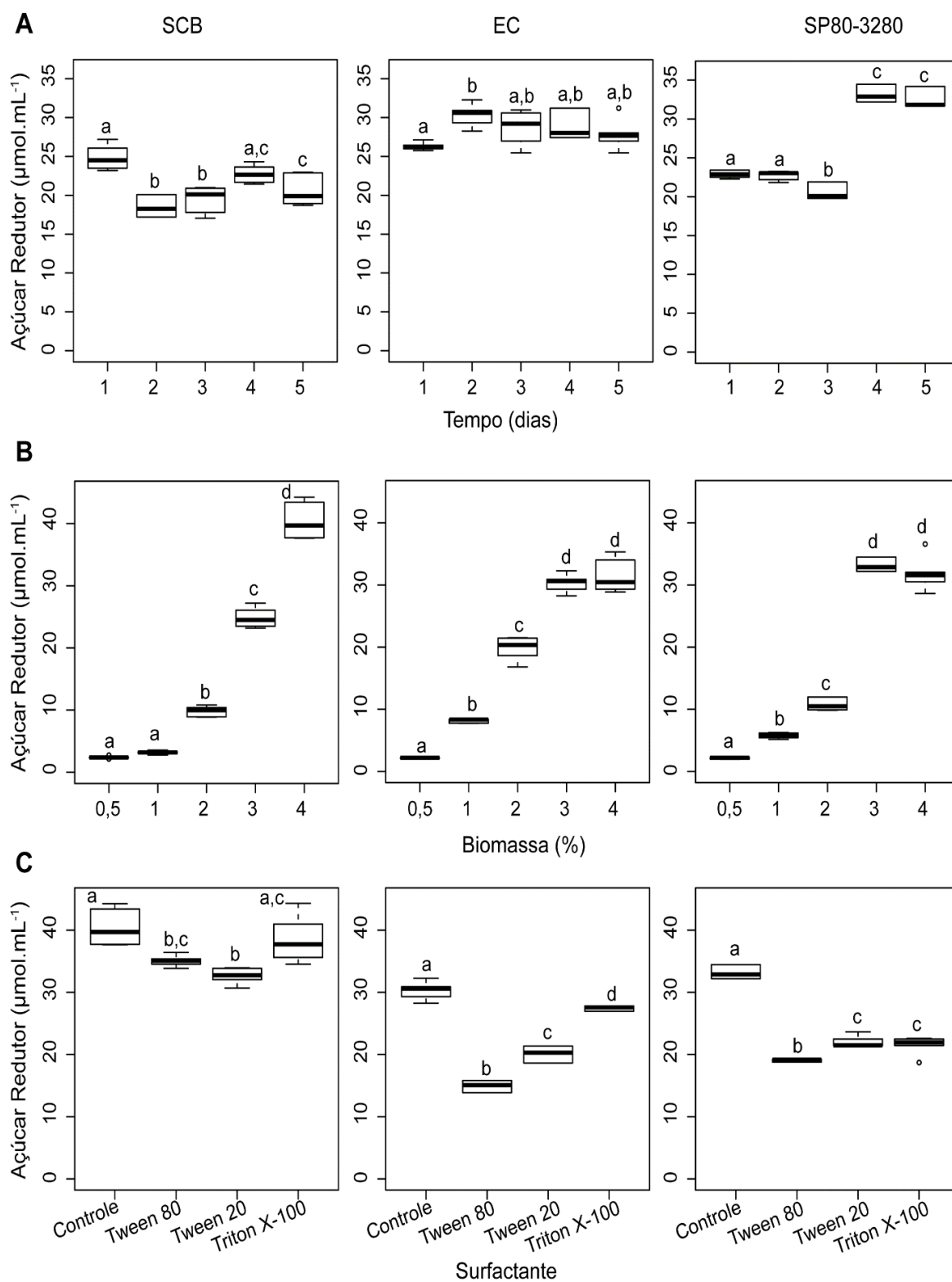


A **Figura 18** apresenta o efeito do coquetel enzimático em diferentes tempos de hidrólises, porcentagem de biomassa e influência de surfactantes na liberação de AR na sacarificação de SCB, EC e SP80-3280. Para determinação desses parâmetros, os experimentos foram conduzidos nas condições já padronizadas e estabelecidas. Sendo assim, as hidrólises ocorreram a 50 °C, com 0,12 mg de proteína por mg de biomassa, em pH 4,0, para SCB e SP80, e pH 4,5 para EC. Inicialmente, a quantidade de biomassa utilizada foi de 3 % de biomassa, uma vez que a hidrólise teve o volume fixado em 1 mL.

Para SCB, a melhor liberação de AR ocorreu com 24 horas de hidrólise ( $24,82 \pm 1,58 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) (**Figura 18A**), sendo este tempo utilizado nos demais experimentos. Em relação a diferentes concentrações de biomassa, foi observado que com o aumento da quantidade de SCB houve maior liberação de AR. Desta maneira, a melhor sacarificação aconteceu com 4 % de biomassa, liberando  $40,40 \pm 2,82 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR (**Figura 18B**). Não foram testadas maiores quantidades de biomassa devido à necessidade de alta carga proteica do coquetel para aplicação. Portanto, a quantidade de biomassa fixada para a continuidade dos experimentos com SCB foi de 4 %. Para esta mesma biomassa, não houve diferença significativa ( $P > 0,01$ ) entre a aplicação do coquetel sem adição de surfactantes e com Triton X-100 (**Figura 18C**). Entretanto, a maior liberação de AR ocorreu na ausência deste aditivo. A adição de Tween -80 e Tween -20 gerou um efeito inibitório da ação enzimática, reduzindo de 13 a 19 % a quantidade AR liberados, respectivamente.

Para EC, não houve diferença significativa ( $P > 0,01$ ) entre os tempos de 2 a 5 dias de hidrólise (**Figura 18A**), entretanto a melhor liberação de AR foi obtida com 48 horas de hidrólise ( $30,33 \pm 1,39 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ), tempo utilizado na continuidade dos experimentos. Da mesma forma, o aumento da quantidade de biomassa favoreceu a sacarificação da biomassa (**Figura 18B**), sendo que os melhores resultados foram obtidos com uma carga entre 3 e 4 % de biomassa ( $30,33 \pm 1,39$  e  $31,40 \pm 2,63 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR, respectivamente). Como não houve diferença significativa ( $P > 0,01$ ) entre as duas quantidades de biomassa utilizada, optou-se por trabalhar com a menor biomassa possível. Assim como para SCB, a adição de surfactantes não-iônicos teve uma influência negativa na liberação de AR na hidrólise enzimática da parede celular de EC (**Figura 18C**). O efeito inibitório do coquetel reduziu de 9 a 51 % a liberação de AR após o acréscimo de Tween -80 e Triton X-100, respectivamente.

**Figura 18.** Caracterização do coquetel enzimático em relação à: (A) tempo de hidrólise; (B) porcentagem de biomassa e (C) influência de surfactantes na liberação de açúcares redutores das canas SCB, EC e SP80-3280.



\* Letras semelhantes indicam que não há diferenças significativas ( $P > 0,01$ ).

Fonte: Dados da autora.

Para SP80-3280, os piores resultados de liberação de AR foram períodos menores de hidrólise, não havendo diferença significativa entre 24 e 48 horas ( $P > 0,01$ ), da mesma forma não houve diferença entre 4 e 5 dias (**Figura 18A**). Entretanto, o tempo de 98 horas de hidrólise mostrou a melhor sacarificação da biomassa, liberando  $33,18 \pm 1,04 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR, sendo este tempo fixado para a continuidade dos experimentos. Assim como para SCB e EC, o aumento da carga desta cana teve um efeito positivo na eficiência do coquetel enzimático (**Figura 18B**), mostrando que é possível hidrolisar maiores quantidades de biomassa utilizando a mesma carga proteica. O melhor resultado de hidrólise de SP80-3280 foi com 3 % de biomassa ( $33,18 \pm 1,04 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR). Todavia não houve diferença significativa ( $P > 0,01$ ) quando comparado com maior quantidade de biomassa para hidrólise (4%), porém a liberação de AR foi 4 % menor ( $31,83 \pm 2,65 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) do que quando utilizado 3 % de SP80-3280. Como observado para as demais canas, a adição de Tween-80, Tween-20 e Triton X-100 apresentou um efeito negativo na liberação de açúcares, uma vez que houve uma drástica redução da quantidade de AR liberados, de  $33,18 \pm 1,04 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  para  $19,07 \pm 0,22 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  (**Figura 18C**).

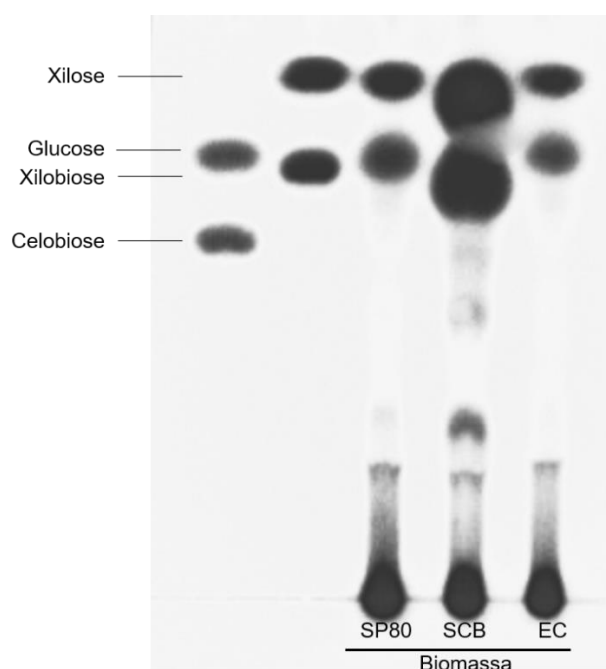
Como foi observado na **Figura 17** e **Figura 18**, cada biomassa possui uma condição especial de aplicação do coquetel. Para todas as canas, a temperatura de hidrólise foi de 50 °C, com carga de 12 mg de proteínas por 100 mg de biomassa. Para SCB, foi determinada melhor condição com 4 % de biomassa, pH 4,0, e 24 horas de hidrólise. Para EC, os melhores resultados indicam que deve ser utilizado 3% de biomassa, pH 4,5 e 48 horas de hidrólise. Já para a cana-de-açúcar SP80-3280, recomenda-se trabalhar com 3 % de biomassa, pH 4,0 e 96 horas de hidrólise.

#### **4.12. Análise dos açúcares liberados após a hidrólise das diferentes canas-de-açúcar por Cromatografia de camada delgada (TLC)**

A **Figura 19** apresenta os perfis de concentrações de açúcares liberados durante a hidrólise enzimática de SCB, EC e SP80-3280 após a otimização das condições de aplicação do coquetel obtido do cocultivo dos fungos estudados crescidos em PM. Foram determinadas as seguintes condições de aplicação do coquetel para uma maior eficiência de hidrólise: 50 °C, pH 4,0 a 4,5, concentração de 0,12 mg de proteínas por mg de biomassa seca, carga de sólidos totais entre 3 e 4 %,

durante 24 horas para SCB, 48 horas para EC e 96 horas para SP80-3280. Foram calculadas as quantidades de cada enzima aplicada durante a hidrólise, isto ocorreu com base no volume de coquetel utilizado devido a carga de proteína presente no mesmo. Desta maneira, nas condições determinadas foram aplicadas: 217 U de EG; 120 U de CBH; 191 U de BGL; 5730 U de XYN; 105 U de BXI; 275 U de XEG; 12 U de AXE; 83 U de ARF; 50 U de ARA; 25 U de BGAL; 1 U de PGase e 1065 U de FAE por g de biomassa seca.

**Figura 19.** Cromatografia de camada delgada da liberação de açúcares após: 96 horas (SP80-3280); 24 horas (SCB) e 48 horas (EC) de hidrólise enzimática.



Foram utilizadas canas *in natura* para hidrólise.  
Fonte: Dados da autora.

A sacarificação de SP80-3280 e EC mostraram o mesmo perfil de liberação de xilose e glucose, com uma quantidade de AR gerados de  $5,46 \pm 0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $5,98 \pm 0,19 \text{ mg.mL}^{-1}$  de hidrolisado, respectivamente. Assim como esperado, para SCB houve uma maior quantidade de glucose e xilose, indicado pelas bandas de tamanhos maiores na **Figura 19**, devido à maior quantidade de AR liberados ( $7,28 \pm 0,51 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Além desses monossacarídeos, a hidrólise de SCB pelo coquetel otimizado mostrou pequenas quantias de outros açúcares não identificados por esta metodologia.

PARTE IV: ANÁLISE DO SECRETOMA  
DO COCULTIVO DE *Mycothermus  
thermophilus* E *Trichoderma reesei* RP698  
EM PALHA DE MILHO

#### 4.13. Secreção de proteínas e análise das atividades de celulases e xilanases obtidas a partir do cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698

Após ser mostrado o potencial do coquetel obtido pelo cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 cultivados em palha de milho (PM) em biorreator, foi realizada a análise de secreção de proteínas de interesse na degradação da parede celular vegetal. Para tal, inicialmente, foi caracterizado o coquetel produzido (**Parte III**) e a partir das condições padronizadas foi obtido o extrato de duas produções, com 5 dias de cultivo, em biorreator. O controle do experimento foi realizado pelo cocultivo dos microrganismos com glucose.

A quantidade de proteína secretada, assim como as atividades de EG, CBH, BGL e XYN podem ser vistas na **Tabela 17**. Foram analisadas estas enzimas, uma vez que as mesmas são as que possuem maior atuação na degradação da parede celular vegetal. Como pode ser observado, o controle do experimento apresentou menor quantidade de proteínas secretadas ( $42,44 \pm 3,98 \mu\text{g/mL}$ ). Além disso, como esperado, não apresentou atividade de EG, CBH, BGL, porém uma pequena atividade de XYN foi detectada ( $0,23 \pm 0,08 \text{ U/mL}$ ). Para o cocultivo em PM, foram detectadas as atividades de EG, CBH, BGL e XYN.

**Tabela 17.** Secreção de proteínas pelo cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em glucose e palha de milho (PM).

Fonte de carbono	Proteínas ( $\mu\text{g/mL}$ )	Atividade (U/mL)			
		EG*	CBH	BGL	XYN
Glucose	$42,44 \pm 3,98$	n.d.	n.d.	n.d.	$0,23 \pm 0,08$
PM	$5536,97 \pm 65,59$	$10,05 \pm 0,56$	$5,55 \pm 0,25$	$8,80 \pm 0,65$	$264,47 \pm 10,81$

\*EG = endoglucanase; CBH = celobiohidrolase; BGL =  $\beta$ -glucosidase; XYN = xillanase; n.d. = não detectado.

Fonte: Dados da autora.

#### 4.14. Secretoma do cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 crescidos em palha de milho

Na análise do secretoma total foram identificados 355 diferentes tipos de

proteínas, distribuídas de maneira diferenciada entre o cocultivo crescido em PM e glucose. A **Tabela 18** apresenta as proteínas secretadas que possuem ação na degradação da parede celular vegetal.

Do total de proteínas secretadas, 34 foram classificadas entre: glicosil hidrolase (GH), carboidrato esterases (CE) e enzimas auxiliares (AA) (**Tabela 18**).

Dentre as GH identificadas nos experimentos (**Tabela 18**), foram identificadas 12 distintas famílias (GH1, GH3, GH5, GH6, GH7, GH10, GH11, GH30, GH35, GH45, GH54 e uma não identificada), e somente uma GH11 foi secretada quando os fungos foram crescidos nas duas fontes de carbono, glucose e PM, sendo que 21 proteínas são exclusivas do cultivo com PM.

Além das GH, foram identificadas duas carboidrato esterases pertencentes a duas famílias distintas (CE5 e CE15), destas somente uma foi exclusiva do cultivo em PM (CE15) (**Tabela 18**). Foram identificadas 5 diferentes proteínas de atividade auxiliares (AA), sendo as AA1 encontrada somente no cultivo controle, ou seja, com glucose como única fonte de carbono. Outras duas proteínas AA9 foram secretadas na presença de PM como fonte de carbono. Também foi secretada uma lacase, que não foi possível relacionar com nenhuma família CAZY.

As 34 enzimas secretadas foram distribuídas entre 18 classes de famílias CAZy. A **Tabela 19** mostra o número de enzimas secretadas pertencentes a cada uma delas. Foram secretadas 3 proteínas com potencial de ação na lignina (AA1, AA2 e uma família não identificada); 2 proteínas com ação na degradação de pectina (GH30 e GH35); 14 proteínas que atuam na xilana ou arabinoxilana (GH10, GH11, GH54, CE5 e CE15); uma proteína com ação no xiloglucano (família não identificada); e 17 proteínas que são responsáveis pela hidrólise da celulose (GH1, GH3, GH5, GH6, GH7, GH45, AA9).

**Tabela 18.** CAZymes detectadas no secretoma do cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698.

Família CAZY	Descrição	Número de acesso	Fonte de carbono	Possível Polissacarídeo / Substrato
GH1	Beta-glucosidase 1B	Q25BW4	PM	Celulose
GH3	Provável beta-glucosidase L	A1DCV5	PM	Celulose
GH3	Beta-glucosidase cel3A	G4N7Z0	Glucose	Celulose
GH5	Endoglucanase EG-II	P07982	PM	Celulose
GH5	Endoglucanase 3	Q12624	PM	Celulose
GH6	Exoglucanase-6 <sup>a</sup>	Q9C1S9	PM	Celulose
GH6	Exoglucanase-6B	Q7SIG5	PM	Celulose
GH6	Exoglucanase 2	P07987	PM	Celulose
GH7	Exoglucanase 1	P15828	PM	Celulose
GH7	Exoglucanase 1	P19355	PM	Celulose
GH7	Exoglucanase 1	P38676	PM	Celulose
GH7	Exoglucanase 1	P62694	PM	Celulose
GH7	Endoglucanase EG-1	Q12622	PM	Celulose
GH7	Endoglucanase EG-1	Q12714	PM	Celulose
GH10	Endo-1,4-beta-xilanase A	B3A0S5	PM	Xilana/Arabinoxilana
GH10	Endo-1,4-beta-xilanase 3	G0RA32	Glucose	Xilana/Arabinoxilana
GH10	Putativa endoglucanase type F	P46239	PM	-
GH10	Endo-1,4-beta-xilanase C	Q00177	PM	Xilana/Arabinoxilana
GH11	Endo-1,4-beta-xilanase 4	G4NA54	Glucose	Xilana/Arabinoxilana
GH11	Endo-1,4-beta-xilanase 2	P36217	Glucose; PM	Xilana/Arabinoxilana
GH11	Endo-1,4-beta-xilanase 1	P55334	PM	Xilana/Arabinoxilana
GH11	Endo-1,4-beta-xilanase G	Q0ZHI9	Glucose	Xilana/Arabinoxilana
GH30	Endo-beta-1,6-galactanase	Q76FP5	PM	Pectina

Continua...



... continuação **Tabela 18.**

Família CAZY	Descrição	Número de acesso	Fonte de carbono	Possível Polissacarídeo / Substrato
GH35	Provável beta-galactosidase A	B8QGZ3	PM	Pectina
GH45	Endoglucanase-5	P43316	PM	Celulose
GH54	Arabinofuranosidase/ $\beta$ -xilosidase	P48792	Glucose	Xilana/Arabinoxilana
-	Xiloglucanase	Q7Z9M8	PM	Xiloglucano
CE5	Acetil xilana esterase	Q99034	Glucose; PM	Xilana/Arabinoxilana
CE15	4-O-metil-glucurônico metilesterase	G0RV93	PM	Xilana/Arabinoxilana
AA1	Lacase 1	Q70KY3	Glucose	Lignina
AA2	Peroxidase 22	P24102	PM	Lignina
AA9	Endoglucanase-4	O14405	PM	Celulose
AA9	Endoglucanase-7	Q7Z9M7	PM	Celulose
-	Lacase 1	A0A0B4F1I0	Glucose	Lignina

Fonte: Dados da autora.

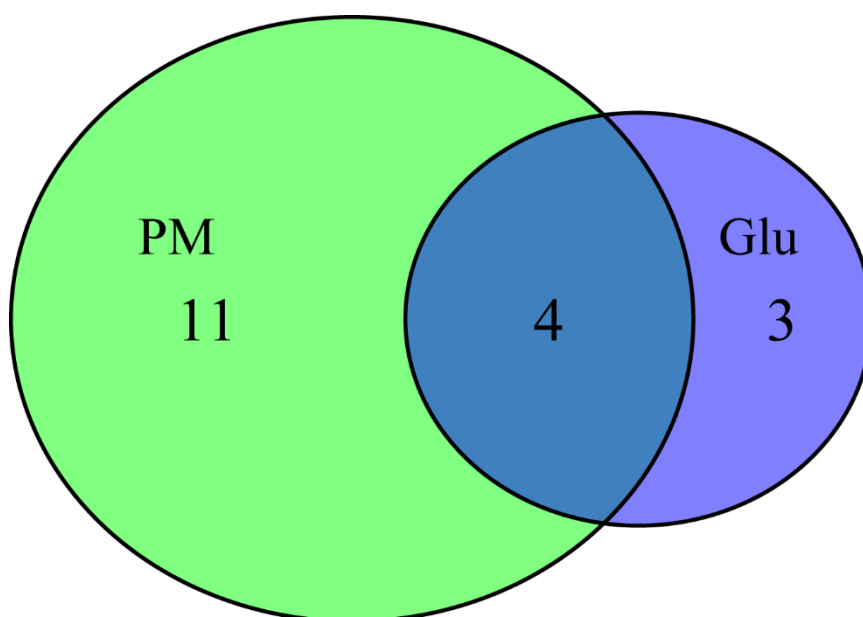
**Tabela 19.** Número de enzimas de cada família CAZy secretadas pelo cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em glucose e palha de milho após 5 dias de cultivo.

Família CAZy		Cocultivo		Ocorrência
		Glucose	PM	
<b>Lignina</b>				
AA1	Lacase-1 (68,9 kDa)	1	0	Glucose
AA2	Peroxidase 22 (38,1 kDa)	0	1	PM
-	Lacase 1 (68,9 kDa)	1	0	Glucose
<b>Pectina</b>				
GH30	Endo-beta-1,6-galactanase (52,7 kDa)	0	1	PM
GH35	Provável beta-galactosidase A (110,3 kDa)	0	1	PM
<b>Xilana / Arabinoxilana</b>				
GH10	Putativa endoglucanase tipo F (41,2 kDa) / Endo-1,4-beta-xilanase A ou C (35,8 - 36,2 kDa) / Endo-1,4-beta-xilanase 3 (38,1 kDa)	1	4	Glucose; PM
GH11	Endo-1,4-beta-xilanase 1 ou 2 ou 4 (24,2 - 25,6 kDa) / Endo-1,4-beta-xilanase G (27,4 kDa)	3	2	Glucose; PM
GH54	Arabinofuranosidase/ $\beta$ -xilosidase (51,1 kDa)	1	0	Glucose
CE5	Acetil xilana esterase (30,7 kDa)	1	1	Glucose; PM
CE15	4-O-metil-glucurônico metilesterase (48,3 kDa)	0	1	PM
<b>Xiloglucano</b>				
-	Xiloglucanase (87,1 kDa)	0	1	PM
<b>Celulose</b>				
GH1	Beta-glucosidase 1B (60,6 kDa)	0	1	PM
GH3	Beta-glucosidase cel3A (82,8 kDa) / Provável beta-glucosidase L (78,7 kDa)	1	1	Glucose; PM
GH5	Endoglucanase EG-II (44,2 kDa) / Endoglucanase 3 (42,5 kDa)	0	2	PM
GH6	Exoglucanase-6A (51,2 kDa) / Exoglucanase 2 (49,6 kDa) / Endoglucanase-6B (37,7 kDa)	0	3	PM
GH7	Exoglucanase 1 (54 - 55,7 kDa) / Endoglucanase EG-1 (47,9 - 48,3 kDa)	0	6	PM
GH45	Endoglucanase-5 (22,8 kDa)	0	1	PM
AA9	Endoglucanase-4 ou 7 (26,8 - 35,5 kDa)	0	2	PM

Fonte: Dados da autora.

Dentre as proteínas secretadas, 11 classes de CAZymes foram exclusivas do cocultivo em PM (AA2, GH30, GH35, CE15, não identificadas, GH1, GH5, GH6, GH7, GH45 e AA9), 3 classes de CAZymes foram exclusivas da glucose (AA1, não identificada e GH54) (**Figura 20**). Desta maneira, é possível concluir que dentre as 34 proteínas secretadas pertencentes a 18 distintas famílias CAZy, apenas quatro foram detectadas em glucose e PM (**Figura 20 e Tabela 19**).

**Figura 20.** Representação das CAZymes detectadas no secretoma de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em palha de milho (PM) e glucose (Glu).



Fonte: Dados da autora.

Desta maneira, os dados apresentados mostraram que o coquetel obtido pelo cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em PM possui potencial de aplicação na hidrólise de biomassa lignocelulósica, uma vez que apresentou uma variedade de enzimas que atuam na degradação da parede celular vegetal (**Tabela 18 e Tabela 19**).

PARTE V: ANÁLISE COMPARATIVA DO  
SECRETOMA DE *Mycothermus*  
*thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698  
EM CULTIVOS ÚNICOS OU COCULTIVO  
EM CANA-DE-AÇÚCAR SP80-3280 E  
CANA ENERGIA

#### 4.15. Produção de proteínas pelos fungos em função do tempo de cultivo e da fonte de carbono

Após selecionados os fungos *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 para a produção de um coquetel enzimático com capacidade de hidrolisar a parede celular de diferentes canas-de-açúcar, optou-se por estudar as proteínas secretadas pelos mesmos quando crescido em EC e SP80-3280. A escolha por essas fontes de carbono deu-se pelo fato deste estudo estar vinculado ao INCT do Bioetanol, sob coordenação do Prof. Dr. Marcos Buckeridge, que possui grande interesse no estudo destas canas. Além disso, ao longo deste trabalho foi possível verificar que o cocultivo dos dois microrganismos em PM possibilitou melhor sacarificação das canas, sendo esta condição adicionada ao estudo do secretoma, porém com EC e SP80-3280 como fonte de carbono.

Com as condições de estudo determinadas, inicialmente, fez-se a análise da quantidade de proteína secretada pelos fungos quando crescidos em EC e SP80-3280 durante 10 dias de cultivos. Também foram quantificadas as proteínas secretadas pelos fungos crescidos em glicerol, glucose e frutose, sendo estas fontes de carbono consideradas controles do experimento.

As **Tabela 20**, **Tabela 21** e **Tabela 22** apresentam os dados de quantificação das proteínas ao longo dos 10 dias do cultivo individual e também do cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em cada condição a ser estudada. De modo geral, o cultivo em glicerol apresentou o pior perfil de secreção de proteínas pelos fungos em cultivos únicos. Desta maneira, esta fonte de carbono foi descartada como controle do experimento, uma vez que para as análises de secretoma faz-se necessário uma quantidade em torno de 200 a 250 µg de proteínas totais. A secreção de proteínas pelos fungos cultivados em glucose e frutose foi bastante similar, exceto para *M. thermophilus* que apresentou menor produção quando cultivado em frutose. Por este motivo, optou-se por prosseguir os experimentos com glucose como fonte de carbono para controle experimental.

Com base na quantificação de proteínas secretadas pelo cultivo individual e o cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698, foram selecionados 5 dias para análises: 1 e 2 dias; 5 dias (tempo de cultivo dos coquetéis elaborados neste trabalho, **Parte I, II e III**); e 7 e 8 dias. Após 8 dias de cultivo não houve aumento da quantidade de proteínas secretadas.

**Tabela 20.** Produção de proteínas por *Mycothermus thermophilus* em função do tempo de cultivo e da fonte de carbono.

<b>Fonte de Carbono</b>	<b>Proteína (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>									
	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>96h</b>	<b>120h</b>	<b>144h</b>	<b>168h</b>	<b>192h</b>	<b>216h</b>	<b>240h</b>
<i>Glucose</i>	0	1,21	4,02	6,05	10,61	12,53	16,57	10,22	9,95	8,28
		$\pm 1,31$	$\pm 1,71$	$\pm 0,07$	$\pm 0,14$	$\pm 0,06$	$\pm 0,47$	$\pm 0,43$	$\pm 0,19$	$\pm 0,61$
<i>Frutose</i>	1,18	1,53	1,65	2,15	2,06	3,14	4,46	4,85	4,70	4,70
	$\pm 0,19$	$\pm 0,39$	$\pm 0,14$	$\pm 0,52$	$\pm 0,36$	$\pm 0,54$	$\pm 0,94$	$\pm 0,93$	$\pm 0,14$	$\pm 0,11$
<i>Glicerol</i>	0	0	0	0,21	0,25	0,12	0,34	0,39	0,29	0
				$\pm 0,09$	$\pm 0,11$	$\pm 0,09$	$\pm 0,09$	$\pm 0,13$	$\pm 0,10$	
<i>SP80-3280</i>	14,05	62,42	81,82	121,17	132,56	187,07	223,35	223,51	223,75	245,49
	$\pm 0,54$	$\pm 2,28$	$\pm 3,31$	$\pm 2,71$	$\pm 3,98$	$\pm 9,86$	$\pm 11,71$	$\pm 5,83$	$\pm 17,36$	$\pm 23,77$
<i>Cana Energia</i>	10,76	51,41	71,78	102,59	129,58	168,32	205,17	200,64	213,25	211,96
	$\pm 0,39$	$\pm 4,68$	$\pm 5,32$	$\pm 5,64$	$\pm 3,25$	$\pm 8,80$	$\pm 18,13$	$\pm 8,91$	$\pm 12,98$	$\pm 17,09$

Fonte: Dados da autora.

**Tabela 21.** Produção de proteínas por *Trichoderma reesei* RP698 em função do tempo de cultivo e da fonte de carbono.

<b>Fonte de Carbono</b>	<b>Proteína (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>									
	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>96h</b>	<b>120h</b>	<b>144h</b>	<b>168h</b>	<b>192h</b>	<b>216h</b>	<b>240h</b>
<i>Glucose</i>	0,03 $\pm 0,04$	6,11 $\pm 2,01$	10,08 $\pm 1,52$	104,85 $\pm 4,86$	100,28 $\pm 24,34$	84,08 $\pm 21,20$	91,55 $\pm 2,63$	92,28 $\pm 1,26$	71,35 $\pm 26,74$	70,54 $\pm 31,77$
<i>Frutose</i>	0,13 $\pm 0,03$	6,38 $\pm 0,80$	9,11 $\pm 1,14$	14,88 $\pm 1,67$	32,80 $\pm 2,98$	60,88 $\pm 2,20$	80,35 $\pm 1,50$	97,70 $\pm 2,10$	107,04 $\pm 2,79$	113,83 $\pm 6,55$
<i>Glicerol</i>	0	0	0,13 $\pm 0,01$	0,30 $\pm 0,12$	0,67 $\pm 0,06$	1,24 $\pm 0,09$	1,58 $\pm 0,17$	3,17 $\pm 1,27$	5,83 $\pm 1,29$	9,85 $\pm 0,00$
<i>SP80-3280</i>	10,82 $\pm 0,63$	17,11 $\pm 0,73$	25,37 $\pm 1,67$	34,18 $\pm 2,73$	42,59 $\pm 1,38$	44,04 $\pm 0,62$	47,27 $\pm 3,68$	25,93 $\pm 0,99$	49,62 $\pm 0,25$	38,50 $\pm 2,96$
<i>Cana Energia</i>	8,11 $\pm 0,19$	12,79 $\pm 1,49$	17,66 $\pm 3,15$	24,44 $\pm 1,96$	28,56 $\pm 1,45$	38,14 $\pm 1,36$	44,73 $\pm 4,53$	51,80 $\pm 6,41$	50,91 $\pm 5,52$	40,00 $\pm 4,74$

Fonte: Dados da autora.

**Tabela 22.** Produção de proteínas pelo cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em função do tempo de cultivo e da fonte de carbono.

Fonte de Carbono	Proteína ( $\mu\text{g/mL}$ )									
	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	192h	216h	240h
Glucose	2,01 $\pm$	6,32 $\pm$	15,92 $\pm$	37,80 $\pm$	42,44 $\pm$	48,67 $\pm$	30,01 $\pm$	24,01 $\pm$	21,12 $\pm$	28,13 $\pm$
	0,30	2,05	0,77	11,09	3,98	12,00	6,35	1,78	3,95	4,08
Frutose	0,62 $\pm$	5,83 $\pm$	16,07 $\pm$	56,67 $\pm$	68,53 $\pm$	81,62 $\pm$	96,97 $\pm$	113,45 $\pm$	123,39 $\pm$	125,09 $\pm$
	0,12	1,63	0,59	3,24	3,32	5,11	4,43	7,83	1,13	12,54
Glicerol	0	0	0	1,62 $\pm$	4,35 $\pm$	11,40 $\pm$	17,16 $\pm$	29,11 $\pm$	54,38 $\pm$	66,71 $\pm$
				0,23	0,20	0,46	1,06	5,38	5,98	8,88
SP80-3280	13,96 $\pm$	52,99 $\pm$	68,00 $\pm$	90,38 $\pm$	102,30 $\pm$	125,01 $\pm$	139,23 $\pm$	160,73	178,83 $\pm$	174,38 $\pm$
	0,48	1,57	2,23	4,12	3,58	6,88	9,17	$\pm$ 6,79	13,40	7,90
Cana Energia	10,17	40,44	63,01 $\pm$	91,43	102,50 $\pm$	126,06 $\pm$	141,25 $\pm$	168,57 $\pm$	182,38 $\pm$	149,90 $\pm$
	$\pm$ 0,21	$\pm$ 5,45	3,97	$\pm$ 4,52	3,15	9,35	16,74	17,50	4,74	4,42

Fonte: Dados da autora.



Conforme foi observado nas **Tabela 20**, **Tabela 21** e **Tabela 22** houve uma tendência de aumento da quantidade de proteínas até o sétimo ou oitavo dia, provavelmente devido ao aumento de secreção de proteínas do metabolismo secundário do fungo. A diminuição de proteínas nos últimos dias de cultivo deve ter ocorrido pela ação de proteases, por esta razão optou-se por não estudar tempos maiores de cultivo.

#### **4.16. Atividade de xilanases, endoglucanases, celobiohidrolases e $\beta$ -glucosidases pelos fungos nas condições selecionadas e capacidade hidrolítica de seus extratos enzimáticos**

Após a análise da produção de proteínas durante os 10 dias de crescimento dos fungos nas condições estudadas, verificou-se a atividade de xilanases (XYN), endoglucanases (EG), celobiohidrolases (CBH) e  $\beta$ -glucosidases (BGL) pelos fungos *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em cultivos únicos e cocultivo em glucose, cana-de-açúcar SP80-3280 e Cana Energia (EC) durante 1, 2, 5, 7 e 8 dias. Optou-se por estudar essas enzimas, uma vez que são as principais enzimas envolvidas na conversão da celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis, que foi o objeto de estudo deste trabalho.

A **Tabela 23** apresenta os resultados das atividades enzimáticas nas diferentes condições estudadas. É possível verificar que não houve produção das quatro enzimas analisadas ou a atividade foi relativamente baixa quando os microrganismos foram crescidos em glucose (controle). Nos primeiros dias de cultivos, os microrganismos ainda não tinham consumido toda a glucose, o que pode ter reprimido a a síntese das enzimas EG, CBH, BGL e XYN.

De maneira geral, EG, CBH, BGL e XYN não apresentaram níveis de atividade enzimática significativos durante os dois primeiros dias de cultivo, com exceção para a xilanase, quando o fungo *M. thermophilus* já apresentava aproximadamente 10 U/mL de atividade no segundo dia. A partir do quinto dia, foi possível averiguar a atividade de celulasas. Durante os 8 dias de cultivo do fungo *T. reesei* RP698 a produção de  $\beta$ -glucosidase foi muito inferior a das demais enzimas, uma vez que o maior nível foi de 0,01 U/mL (**Tabela 23**).

**Tabela 23.** Produção enzimática pelos fungos *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP689 em cultivos únicos e cocultivo crescidos em glucose, cana-de-açúcar SP80-3280 e Cana Energia durante diferentes tempos.

Cultivo		Tempo (dias)				
Microrganismo	Fonte de Carbono	1	2	5	7	8
<b>Xilanase (U/mL)</b>						
<i>M. thermophilus</i>	Glucose	n.d.*	n.d.	0,26 ± 0,08	0,16 ± 0,08	0,20 ± 0,00
<i>M. thermophilus</i>	SP80-3280	3,72 ± 0,70	9,83 ± 1,10	14,29 ± 1,54	17,91 ± 3,76	14,72 ± 1,58
<i>M. thermophilus</i>	Cana Energia	1,80 ± 0,81	10,58 ± 0,87	22,50 ± 1,38	19,88 ± 2,00	20,75 ± 1,42
<i>T. reesei</i> RP698	Glucose	0,23 ± 0,07	n.d.	n.d.	0,38 ± 0,09	n.d.
<i>T. reesei</i> RP699	SP80-3280	0,15 ± 0,04	2,09 ± 0,31	4,55 ± 0,74	9,09 ± 1,54	16,79 ± 1,52
<i>T. reesei</i> RP698	Cana Energia	0,11 ± 0,05	1,48 ± 0,22	6,53 ± 0,52	15,90 ± 2,53	19,62 ± 2,23
<i>Cocultivo</i>	Glucose	0,23 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,23 ± 0,08	0,11 ± 0,06	0,70 ± 0,03
<i>Cocultivo</i>	SP80-3280	0,36 ± 0,09	2,51 ± 0,23	10,43 ± 1,26	20,01 ± 1,36	26,52 ± 3,88
<i>Cocultivo</i>	Cana Energia	0,16 ± 0,09	1,96 ± 0,25	10,11 ± 1,26	10,54 ± 2,05	20,88 ± 3,08
<b>Endoglucanase (U/mL)</b>						
<i>M. thermophilus</i>	Glucose	n.d.	n.d.	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	n.d.
<i>M. thermophilus</i>	SP80-3280	0,05 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,03
<i>M. thermophilus</i>	Cana Energia	n.d.	0,08 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,02
<i>T. reesei</i> RP698	Glucose	0,01 ± 0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>T. reesei</i> RP699	SP80-3280	n.d.	n.d.	0,28 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,12 ± 0,02
<i>T. reesei</i> RP698	Cana Energia	n.d.	0,05 ± 0,01	0,14 ± 0,04	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,03
<i>Cocultivo</i>	Glucose	n.d.	n.d.	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	n.d.
<i>Cocultivo</i>	SP80-3280	n.d.	0,14 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,20 ± 0,02
<i>Cocultivo</i>	Cana Energia	n.d.	0,08 ± 0,04	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,02

Continua...

... continuação **Tabela 23.**

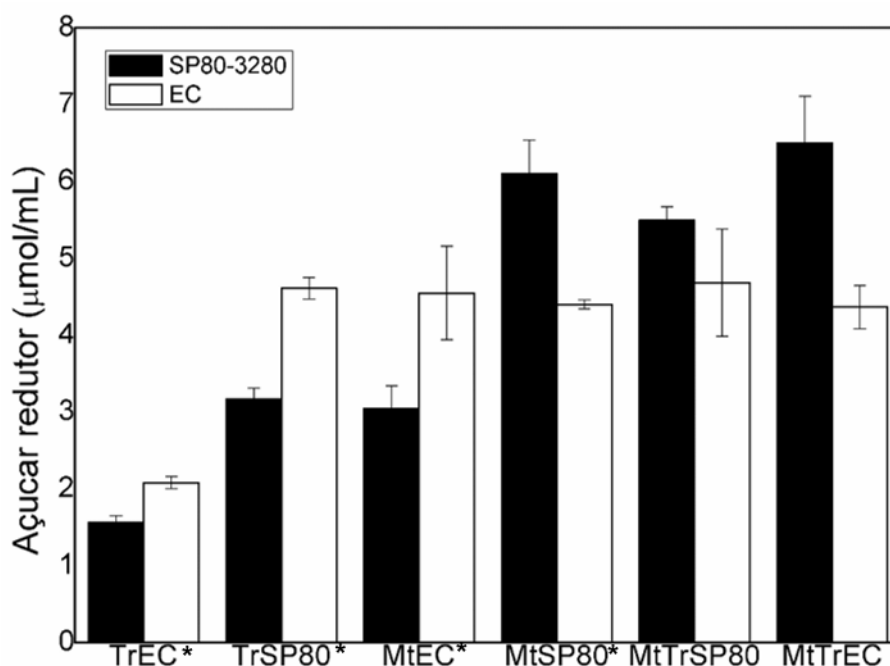
Cultivo		Tempo (dias)				
Microrganismo	Fonte de Carbono	1	2	5	7	8
<b>Celobiohidrolase (U/mL)</b>						
<i>M. thermophilus</i>	Glucose	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>M. thermophilus</i>	SP80-3280	n.d.	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,1
<i>M. thermophilus</i>	Cana Energia	n.d.	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
<i>T. reesei</i> RP698	Glucose	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>T. reesei</i> RP699	SP80-3280	n.d.	n.d.	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00
<i>T. reesei</i> RP698	Cana Energia	n.d.	n.d.	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<i>Cocultivo</i>	Glucose	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Cocultivo</i>	SP80-3280	n.d.	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,00
<i>Cocultivo</i>	Cana Energia	n.d.	n.d.	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01
<b>β-glucosidase (U/mL)</b>						
<i>M. thermophilus</i>	Glucose	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>M. thermophilus</i>	SP80-3280	0,02 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,19 ± 0,02
<i>M. thermophilus</i>	Cana Energia	n.d.	0,06 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,19 ± 0,02
<i>T. reesei</i> RP698	Glucose	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>T. reesei</i> RP699	SP80-3280	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,01 ± 0,00
<i>T. reesei</i> RP698	Cana Energia	n.d.	n.d.	n.d.	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<i>Cocultivo</i>	Glucose	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Cocultivo</i>	SP80-3280	n.d.	n.d.	0,08 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,02
<i>Cocultivo</i>	Cana Energia	n.d.	n.d.	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,11 ± 0,02

\* n.d. = não detectado.

Fonte: Dados da autora.

Após analisadas as atividades de xilanas, endoglucanases, celobiohidrolases e  $\beta$ -glucosidasas a partir do cultivo individual de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 e o cocultivo destes fungos crescidos em cana-de-açúcar SP80-3280 e EC, optou-se por analisar a ação enzimática dos extratos obtidos no quinto dia de cultivo nas biomassas estudadas. A **Figura 21** apresenta os dados de hidrólise enzimática das cana-de-açúcar SP80-3280 e EC em função dos diferentes extratos produzidos. A sacarificação de EC apresentou boa liberação de AR ( $\geq 4,5 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) com quase todos os extratos estudados, exceto com o coquetel produzido pelo *T. reesei* RP698 crescido em EC, em que a quantidade de AR foi de  $2 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ , mostrando que houve um tendência dos extratos produzidos em cultivos únicos em EC hidrolisarem melhor esta biomassa. Os melhores resultados de hidrólise da cana-de-açúcar SP80-3280 foram obtidos com os coquetéis obtidos a partir do cultivo de *M. thermophilus* cultivado em SP80-3280 e do cocultivo dos dois fungos estudados crescido em EC, com liberação de  $6,10 \pm 0,44$  e  $6,50 \pm 0,61 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR, respectivamente.

**Figura 21.** Hidrólise enzimática da cana-de-açúcar SP80-3280 e da Cana Energia (EC) por extratos de *Trichoderma reesei* RP698, *Mycothermus thermophilus* e o cocultivo destes microrganismos crescidos em SP80 e EC durante 5 dias.



\*Estes resultados já foram apresentados (**Tabela 11**) e encontram-se na Figura para fins de comparação.

Fonte: Dados da autora.

#### 4.17. Perfil de CAZymes dos secretomas de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em cultivos únicos e cocultivo nas diferentes canas

Na análise do secretoma total foram identificados 709 diferentes tipos de proteínas, distribuídas de maneira diferenciada entre as diferentes canas e o controle do experimento, sendo que deste total, 50 foram classificadas como enzimas extracelulares relacionadas à degradação da biomassa. As enzimas foram identificadas para cada classe de enzimas (foi usada a classificação CAZymes) em cada família de GH, CE e AA diretamente relacionada à degradação da biomassa.

A partir da **Tabela 24** é possível observar que *M. thermophilus* secretou amplo número de proteínas envolvidas na degradação da parede celular vegetal em todos os pontos de tempo e fonte de carbono analisados. Foram identificadas 28 diferentes CAZymes para *M. thermophilus*, dentre elas estão as principais CAZymes envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica, que atuam nos mais diversos componentes da parede celular, como por exemplo, pectina, xilana, arabinoxilana, xiloglucano e celulose. As CAZymes identificadas pertencem às seguintes famílias: GH3, GH5, GH6, GH7, GH10, GH11, GH43, GH45, GH53, GH94, CE5, CE15, AA9, PL4 e uma não identificada. Destas CAZymes, 3 não foram exclusivas dos cultivos em SP80-3280 e/ou EC (GH6 (Q9C1S9), GH7 (P15828) e GH11(P48793)), mostrando que estas podem ser constitutivas do microrganismo, ou seja, não são induzidas diferentemente pela fonte de carbono (**Tabela 24**). Além disso, as enzimas pertencentes às famílias GH3 e GH94, que são enzimas envolvidas na liberação de glucose da celulose, foram exclusivas da condição controle como pode ser observado na **Tabela 24**. As enzimas pertencentes às famílias GH94 e CE15 não haviam sido identificadas em nenhum outro secretoma.

**Tabela 24.** CAZymes detectadas no secretoma de *Mycothermus thermophilus*.

Família CAZY	Descrição	Número de acesso	Substrato / tempo	Possível Polissacarídeo / Substrato
GH3	Beta-glucosidase cel3A	G4NI45	G5d	Celulose
GH5	Endoglucanase 3	Q12624	SP1+2d; SP5d; SP7,+8d; EC1+2d; EC5d	Celulose
GH6	1,4-beta-D-glucano celobiohidrolase CEL6C	B2AE04	SP1+2d; SP5d; SP7,+8d; EC1+2d; EC5d	Celulose
GH6	Exoglucanase-6B	Q7SIG5	SP1+2d; SP5d; SP7,+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose
GH6	Exoglucanase-6 <sup>a</sup>	Q9C1S9	G5d; G7+8d; SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d	Celulose
GH7	Exoglucanase 1	P15828	G5d; G7+8d; SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose
GH7	Exoglucanase 1	P38676	G5d; EC1+2d; EC5d	Celulose
GH7	Endoglucanase 1	P56680	EC7+8d	Celulose
GH7	Exoglucanase 1	P62694	EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose
GH7	Exoglucanase 1	Q00548	SP1+2d	Celulose
GH7	Endoglucanase EG-1	Q12622	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d	Celulose
GH10	Endo-1,4-beta-xilanase A	B3A0S5	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d	Xilana/Arabinoxilana
GH10	Putativa endoglucanase tipo F	P46239	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d	-
GH10	Endo-1,4-beta-xilanase 1	P79046	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH10	Endo-1,4-beta-xilanase 6	Q8NJ73	EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH11	Endo-1,4-beta-xilanase B	I1RII8	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d	Xilana/Arabinoxilana
GH11	Endo-1,4-beta-xilanase	P48793	G7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH11	Endo-1,4-beta-xilanase 1	P55334	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH43	Alfa-L-arabinofuranosidase B	G4MMH2	SP7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH45	Endoglucanase-5	P43316	SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose

Continua...

... continuação **Tabela 24.**

Família CAZY	Descrição	Número de acesso	Substrato / tempo	Possível Polissacarídeo / Substrato
GH53	Arabinogalactano endo-beta- 1,4-galactanase	P83691	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d	Pectina
GH94	Ácido celobiônico fosforilase	Q7S0S2	G5d	Celulose
-	Xiloglucanase	Q7Z9M8	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d	Xiloglucano
CE5	Acetil xilana esterase	P30272	SP1+2d	Xilana/Arabinoxilana
CE15	4-O-metil-glucurônico metilesterase	B2ABS0	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
CE15	4-O-metil-glucurônico metilesterase	Q7S1X0	SP5d; EC1+2d; EC5d	Xilana/Arabinoxilana
AA9	Polissacarídeo monooxigenase Cel61a	G2Q9T3	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC7+8d	Celulose
PL4	Putativa ramnogalacturonase	P78710	SP5d	Pectina

Fonte: Dados da autora.

A **Tabela 25** apresenta as CAZymes detectadas, mostrando que *T. reesei* RP698, assim como *M. thermophilus*, secretou ampla número de proteínas envolvidas na conversão da parede celular vegetal em todos os tempos e fonte de carbono analisados. Foram identificadas 24 diferentes CAZymes para *M. thermophilus*. Também foram detectadas as principais CAZymes envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica. Entretanto, o secretoma de *T. reesei* RP698 apresentou proteínas envolvidas no processo de degradação da lignina, manana e  $\beta$ -glucano, que não foram identificadas para *M. thermophilus* (**Tabela 24**). As CAZymes identificadas pertencem as seguintes famílias: GH5, GH6, GH7, GH10, GH11, GH30, GH45, GH54, GH55, GH67, GH94, CE5, CE15, CE16, AA1, AA9, PL4 e duas não identificadas. Destas CAZymes, 6 não foram exclusivas dos cultivos em SP80-3280 e/ou EC (GH6 (P07987), GH7 (P19355), GH10 (G0RA32), GH11(P36217), GH54 (P48792) e A0A0B4F1I0) (**Tabela 25**). Diferente do secretoma de *M. thermophilus* (**Tabela 24**), no secretoma de *T. reesei* RP698 (**Tabela 25**) foi detectado a proteína GH94, em dois tempos de cultivo, tanto para SP80 quanto EC.

Neste estudo, foram identificadas 38 GH e 11 outras proteínas nos cultivos individuais de *M. thermophilus* (**Tabela 24**) e *T. reesei* RP698 (**Tabela 25**) que desempenham um papel importante na degradação da biomassa. As diferenças encontradas entre a secreção destes dois microrganismos podem ser devidas à fonte de carbono, às condições de cultura ou ao projeto experimental. No entanto, para ambos os fungos foram encontradas as proteínas hidrolíticas mais importantes como celobiohidrolases e endoglucanases. Também foram detectadas hemicelulases envolvidas na clivagem da cadeia principal de xilana (ou arabinoxilana), xiloglucano (xilanasase e xiloglucanase), manana (endo-1,4-beta-manosidase) e  $\beta$ -glucano (endo-1,3-beta-glucosidase) e a cadeia lateral de hemiceluloses, incluindo  $\alpha$ -arabinofuranosidase e acetil xilana esterase.



**Tabela 25.** CAZymes detectadas no secretoma de *Trichoderma reesei* RP698.

Família CAZY	Descrição	Número de acesso	Substrato / tempo	Possível Polissacarídeo / Substrato
GH5	Endoglucanase EG-II	A0A024SH20	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose
GH5	Manana endo-1,4-beta-manosidase A	B2B3C0	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Manana
GH5	Manana endo-1,4-beta-manosidase A	Q99036	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Manana
GH6	Exoglucanase 2	P07987	G5d; G7+8d; SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose
GH7	Exoglucanase 1	P15828	SP7+8d	Celulose
GH7	Exoglucanase 1	P19355	G5d; SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose
GH7	Endoglucanase tipo C	P46237	SP1+2d	Celulose
GH7	Endoglucanase EG-1	Q12714	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose
GH10	Endo-1,4-beta-xilanase 3	G0RA32	G5d; G7+8d; SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH11	Endo-1,4-beta-xilanase 4	G4NA54	G5d	Xilana/Arabinoxilana
GH11	Endo-1,4-beta-xilanase 2	P36217	G5d; G7+8d; SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH11	Endo-1,4-beta-xilanase G	Q0ZHI9	G5d	Xilana/Arabinoxilana
GH30	Endo-beta-1,6-galactanase	Q76FP5	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Pectina
GH54	Arabinofuranosidase/ $\beta$ -xilosidase	P48792	G5d; SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana

Continua...

...continuação **Tabela 25.**

Família CAZY	Descrição	Número de acesso	Substrato / tempo	Possível Polissacarídeo / Substrato
GH55	Glucano endo-1,3-beta-glucosidase	P53626	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC7+8d	$\beta$ -glucano
GH67	Alfa-glucuronidase	Q99024	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH94	Ácido celobiônico fosforilase	Q7S0S2	SP1+2d; SP5d; EC5d; EC7+8d	Celulose
-	Xiloglucanase	Q7Z9M8	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xiloglucano
CE5	Acetil xilana esterase	Q99034	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
CE15	4-O-metil-glucurônico metilesterase	G0RV93	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
CE16	Acetil esterase	A7J2C6	SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
AA1	Lacase 1	Q70KY3	G5d; G7+8d	Lignina
AA9	Endoglucanase-7	Q7Z9M7	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose
-	Lacase 1	A0A0B4F1I0	G5d; G7+8d; SP5d	Lignina

Fonte: Dados da autora.

Após analisados as CAZymes secretadas pelos microrganismos em cultivos individuais nas fontes de carbono de interesse, foi realizado o estudo de CAZymes secretadas pelo cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em glucose (controle), SP80-3280 e EC. A **Tabela 26** apresenta as CAZymes detectadas, sendo possível observar que o cocultivo secretou amplo número de proteínas envolvidas na conversão da parede celular vegetal em todos os tempos e fontes de carbono analisados. Foram identificadas 43 diferentes CAZymes no cocultivo. Assim como para os cultivos individuais dos microrganismos (**Tabela 24** e **Tabela 25**), também foram detectadas as principais CAZymes envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica. As CAZymes identificadas pertencem às seguintes famílias: GH3, GH5, GH6, GH7, GH10, GH11, GH30, GH43, GH45, GH53, GH54, GH55, GH67, GH94, CE5, CE15, CE16, AA1, AA9, PL4 e duas não identificadas. Destas CAZymes, 3 não foram exclusivas dos cultivos em SP80-3280 e/ou EC (GH10 (G0RA32), GH54 (P48792) e CE5 (Q99034)) (**Tabela 26**).

Como pode ser observado, o cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 apresentou enzimas de ambos os microrganismos, que foram identificadas nos cultivos individuais. Desta maneira, o coquetel obtido a partir do cocultivo apresentou uma maior variedade de enzimas envolvidas na degradação da parede celular das diferentes variedades de cana.

**Tabela 26.** CAZymes detectadas no secretoma do cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698.

Família CAZY	Descrição	Número de acesso	Substrato / tempo	Possível Polissacarídeo / Substrato
GH3	Beta-glucosidase cel3A	G4N7Z0	G5d	Celulose
GH5	Endoglucanase EG-II	A0A024SH20	SP5d; SP7+8; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose
GH5	Endoglucanase 3	Q12624	SP5d; SP7+8; EC5d; EC7+8d	Celulose
GH5	Manana endo-1,4-beta-manosidase A	B2B3C0	EC1+2d; EC5d	Manana
GH5	Manana endo-1,4-beta-manosidase A	Q99036	SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Manana
GH6	1,4-beta-D-glucano celobiohidrolase CEL6C	B2AE04	SP5d; SP7+8d; EC5d; EC7+8d	Celulose
GH6	Exoglucanase 2	P07987	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d	Celulose
GH6	Exoglucanase-6B	Q7SIG5	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose
GH6	Exoglucanase-6A	Q9C1S9	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose
GH7	Exoglucanase 1	P15828	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose
GH7	Exoglucanase 2	P19355	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose
GH7	Exoglucanase 1	P38676	SP5d; EC7+8d	Celulose
GH7	Endoglucanase 1	P56680	SP1+2d	Celulose
GH7	Exoglucanase 1	P62694	EC7+8d	Celulose
GH7	Endoglucanase EG-1	Q12622	SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose
GH7	Endoglucanase EG-1	Q12714	SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose
GH10	Endo-1,4-beta-xilanase A	B3A0S5	SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH10	Endo-1,4-beta-xilanase 3	G0RA32	G5d; G7+8d; SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana

Continua...

...continuação **Tabela 26.**

Família CAZY	Descrição	Número de acesso	Substrato / tempo	Possível Polissacarídeo / Substrato
GH10	Putativa endoglucanase tipo F	P46239	SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH10	Endo-1,4-beta-xilanase 1	P79046	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH10	Endo-1,4-beta-xilanase 6	Q8NJ73	SP1+2d	Xilana/Arabinoxilana
GH11	Endo-1,4-beta-xilanase 4	G4NA54	G5d; G7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH11	Endo-1,4-beta-xilanase B	I1RII8	SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH11	Endo-1,4-beta-xilanase 2	P36217	G5d; G7+8d; SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH11	Endo-1,4-beta-xilanase 1	P55334	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH11	Endo-1,4-beta-xilanase G	Q0ZHI9	G5d; G7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH30	Endo-beta-1,6-galactanase	Q76FP5	SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Pectina
GH43	Alfa-L-arabinofuranosidase B	G4MMH2	EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH45	Endoglucanase-5	P43316	SP5d; SP7+8d	Celulose
GH53	Arabinogalactano endo-beta-1,4- galactanase	P83691	SP5d; SP7+8d; EC5d; EC7+8d	Pectina
GH54	Arabinofuranosidase/ $\beta$ -xilosidase	P48792	G5d; G7+8d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH67	Alfa-glucuronidase	Q99024	EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
GH94	Ácido celobiônico fosforilase	Q7S0S2	SP1+2d; EC1+2d	Celulose
-	Xiloglucanase	Q7Z9M8	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xiloglucano
CE5	Acetil xilana esterase	Q99034	G5d; G7+8d; SP1+2d; SP5d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana

Continua...

... continuação **Tabela 26.**

Família CAZY	Descrição	Número de acesso	Substrato / tempo	Possível Polissacarídeo / Substrato
CE15	4-O-metil-glucurônico metilesterase	B2ABS0	EC5d	Xilana/Arabinoxilana
CE15	4-O-metil-glucurônico metilesterase	G0RV93	SP1+2d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Xilana/Arabinoxilana
CE16	Acetil esterase	A7J2C6	EC1+2d	Xilana/Arabinoxilana
AA1	Lacase 1	Q70KY3	G5d	Lignina
AA9	Polissacarídeo monooxigenase Cel61a	G2Q9T3	EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose
AA9	Endoglucanase-7	Q7Z9M7	SP1+2d; SP5d; SP7+8d; EC1+2d; EC5d; EC7+8d	Celulose
-	Lacase 1	A0A0B4F1I0	G5d	Lignina
PL4	Putativa ramnogalacturonase	P78710	SP5d; EC5d	Pectina

Fonte: Dados da autora.

#### 4.18. Diferenças na secreção de proteínas por *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em cultivos únicos e cocultivo em diferentes fontes de carbono

Um objetivo adicional do estudo do secretoma de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 foi realizar uma análise comparativa entre as três condições de cultivo, mas avaliando todas as enzimas produzidas ao longo dos tempos de cultivos. A **Figura 22** apresenta um *Heatmap* representando o número de enzimas identificadas para cada classe de enzimas (foi usada a classificação CAZymes) em cada família de GH, CE e AA diretamente relacionada à degradação da biomassa (**Tabela 24**, **Tabela 25** e **Tabela 26**) em *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em cultivos únicos e cocultivo após 1 e 2, 5 e 7 e 8 dias de crescimento em glucose, colmo de cana-de-açúcar SP80-3280 e colmo de Cana Energia (EC) não tratados. O secretoma em glucose foi considerado o controle do experimento, com o intuito de ver quais enzimas poderiam ser constitutivas dos microrganismos. Como esperado, o cultivo em glucose apresentou menor número de CAZymes quando comparadas com o cultivo em SP80-3280 e EC (**Tabela 24**, **Tabela 25**, **Tabela 26** e **Figura 22**).

O padrão de produção de enzimas observado para *M. thermophilus* foi semelhante para SP80-3280 e EC (**Figura 22**). O padrão de secreção de proteínas pelo microrganismo cultivado em SP80-3280 foi bastante similar ao padrão obtido pelo cultivo em EC. Inicialmente, foram secretas endo- $\beta$ -1,4-galactanase (GH53), endoxilanasas (GH10 e GH11), acetil xilana esterase (CE5) e 4-O-metil-glucurônico metilesterase (CE15), endoglucanase (GH5), exoglucanase (GH6 e GH7), ácido celobiônico fosforilase (GH94) e monooxigenase (AA9). Com 5 dias de cultivo, houve a secreção de uma ramnogalacturonase (PL4) e o desaparecimento da acetil xilana esterase (CE5) quando cultivado em SP80-3280 e o desaparecimento da monooxigenase (AA9) em EC. Nos dias 7 e 8 de cultivo, houve a secreção de uma  $\alpha$ -arabinofuranosidase (GH43) e uma monooxigenase (AA9) e o desaparecimento de uma endoglucanase (GH5) e da ácido celobiônico fosforilase (GH94) em EC. Já para SP80-3280, houve somente o aparecimento de uma endoglucanase (GH45).

Dentre as enzimas que atuam na pectina, foi observado somente uma classe de enzima (PL4) secretada exclusivamente no cultivo de *M. thermophilus* em SP80-3280, porém houve uma classe (GH53) produzida quando o microrganismo foi cultivado em ambas as fontes de carbono (**Figura 22** e **Tabela 24**). Foram

identificadas 5 classes de enzimas (GH10, GH11, GH43, CE5 e CE15) relacionadas com a degradação de xilana / arabinoxilana, sendo que destas, uma única classe de família (CE5) foi exclusiva do cultivo em SP80-3280 e outra classe de enzima (GH43) foi exclusiva do cultivo em EC (**Figura 22 e Tabela 24**). Foram identificadas 6 classes (GH5, GH6, GH7, GH45, GH94 e AA9) de enzimas relacionadas com a degradação da celulose, porém somente a GH45 foi exclusiva do cultivo em SP80-3280, as demais foram identificadas em ambas as fontes de carbono (**Figura 22 e Tabela 24**). No cultivo de *M. thermophilus* foram detectadas 9 classes de enzimas que apareceram tanto no cultivo em SP80-3280 e EC (**Figura 22**). Dentro das classes de enzimas detectadas houve diferenças no número de proteínas identificadas (**Tabela 24**).

O padrão de secreção de enzimas observado para *T. reesei* RP698 foi idêntico para SP80-3280 e EC (**Figura 22**). Inicialmente, foram secretas endo- $\beta$ -1,6-galactanase (GH30), glucano endo- $\beta$ -1,3-glucosidase (GH55), endoxilanasas (GH10 e GH11),  $\alpha$ -glucuronidase (GH67), arabinofuranosidase/ $\beta$ -xilosidase (GH54), acetil xilana esterase (CE5), 4-O-metil-glucurônico metilesterase (CE15), acetil esterase (CE16), xiloglucanase, endoglucanase (GH5), exoglucanase (GH6 e GH7), ácido celobiônico fosforilase (GH94), monooxigenase (AA9) e endo- $\beta$ -1,4-manosidase (GH5). Com 5 dias de cultivo, houve a secreção de duas lacases (AA1 e uma não identificada). Em EC, houve o desaparecimento de GH55. Nos dias 7 e 8 de cultivo, houve o desaparecimento de um lacase em EC e da xiloglucanase em SP80-3280.

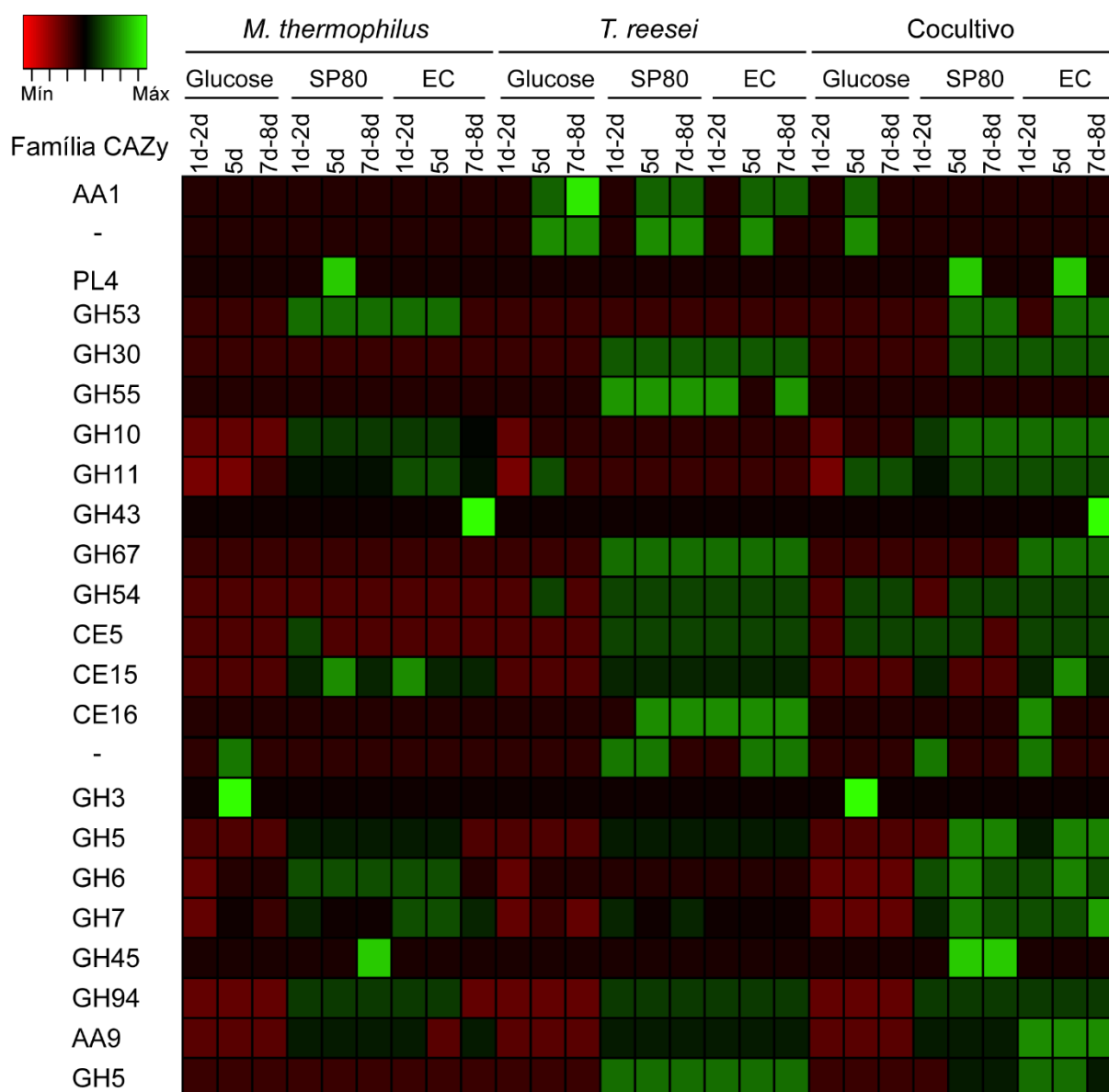
Foram detectadas 18 classes de enzimas compartilhadas nos dois cultivos (**Figura 22 e Tabela 25**). Dentre as enzimas envolvidas na degradação da lignina, foi identificada uma classe de enzimas (AA1) e uma que não foi identificada (**Figura 22 e Tabela 25**). Foram observadas 7 classes de enzimas (GH10, GH11, GH54, GH67 CE5, CE15 e CE16) relacionadas com a degradação de xilana / arabinoxilana (**Figura 22 e Tabela 25**). Para a hidrólise de  $\beta$ -glucano foi identificada uma classe de enzima (GH55), uma xiloglucanase que atua na degradação do xiloglucano e uma classe de enzima (GH5) relacionada com a hidrólise de manana. Foram identificadas 6 classes de enzimas (GH5, GH6, GH7, GH45, GH94 e AA9) relacionadas com a degradação da celulose, porém somente a GH45 foi exclusiva do cultivo em SP80-3280, as demais foram identificadas em ambas as fontes de carbono (**Figura 22 e Tabela 25**). Assim como para *M. thermophilus*, para *T. reesei* RP698 também foram detectadas diferenças na quantidade de proteínas identificadas dentro da mesma classe de enzima, porém a diferença foi menor do que para *M. thermophilus* (**Tabela 25**).



O cocultivo apresentou um padrão semelhante de secreção de enzimas quando comparado com os cultivos únicos de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698, porém com algumas modificações em SP80-3280 e EC (**Figura 22**). Em SP80-3280, com 1 e 2 dias de cultivo houve o aparecimento de endoxilanasas (GH10 e GH11), acetil xilana esterase (CE5), 4-O-metil-glucurônico metilesterase (CE15), xiloglucanase, exoglucanases (GH6 e GH7), ácido celobiônico fosforilase (GH94) e monooxigenase (AA9). Com 5 dias, houve o surgimento de uma ramnogalacturonase (PL4), uma endo- $\beta$ -1,4-galactanase (GH53), uma endo- $\beta$ -1,6-galactanase (GH30), uma arabinofuranosidase/ $\beta$ -xilosidase (GH54), duas endoglucanases (GH5 e GH45) e uma endo- $\beta$ -1,4-manosidase (GH5). Entretanto, houve o desaparecimento de 4-O-metil-glucurônico metilesterase (CE15) e xiloglucanase. O padrão de secreção em EC nos primeiros dias de cultivo foi bastante similar ao obtido pelo cultivo em SP80-3280, com diferença do surgimento de uma endo- $\beta$ -1,6-galactanase (GH30), uma  $\alpha$ -glucuronidase (GH67), arabinofuranosidase/ $\beta$ -xilosidase (GH54), acetil esterase (CE16) e endo- $\beta$ -1,4-manosidase (GH5). Com 5 dias de cultivo, o surgimento de algumas CAZymes foi idêntico ao cultivo em SP80-3280, mantendo o padrão de surgimento e desaparecimento de enzimas. Com 7 e 8 dias, houve o aparecimento de um  $\alpha$ -arabinofuranosidase (GH43), que ainda não tinha sido detectada no cocultivo.

Dentre as pectinases, foram observadas três classes de enzimas (PL4, GH30 e GH53) secretadas em ambas as fontes de carbono (**Figura 22 e Tabela 26**). Foram identificadas 8 classes de enzimas (GH10, GH11, GH43, GH54, GH67, CE5, CE15 e CE16) relacionadas com a degradação de xilana / arabinoxilana, sendo que destas 3 classes de enzimas (GH43, GH67 e CE16) foram exclusivas do cultivo em EC (**Figura 22 e Tabela 26**). Para a hidrólise de xiloglucano, uma classe não foi identificada dentre as CAZymes. Foram identificadas 6 classes (GH5, GH6, GH7, GH45, GH94 e AA9) de enzimas relacionadas com a degradação da celulose, porém somente a GH45 foi exclusiva do cultivo em SP80-3280, as demais foram identificadas em ambas as fontes de carbono (**Figura 22 e Tabela 26**). No cocultivo foram detectadas 15 classes de enzimas que apareceram tanto no cultivo em SP80-3280 quanto no cultivo em EC (**Figura 22**). Foi detectada uma variedade de classes de enzimas, porém o número de CAZymes variou de acordo com a fonte de carbono (**Tabela 26**).

**Figura 22.** Heatmap do número de enzimas de cada família CAZY secretadas por *Mycothermus thermophilus* e *T. reesei* RP698 em cultivos únicos e cocultivo após 1 e 2, 5 e 7 e 8 dias (d) de crescimento em SP80-3280 e EC.



Este mapa inclui apenas enzimas / proteínas relacionadas à degradação da biomassa (**Tabela 24**, **Tabela 25** e **Tabela 26**). A escala de gradiente de cores representa menor (vermelho) e maior (verde) número de CAZymes.

Fonte: Dados da autora.

Apesar da variedade de enzimas secretadas por ambos os fungos, uma análise comparativa do número total de classe de enzimas (**Figura 22**) e CAZymes (**Tabela 24**, **Tabela 25** e **Tabela 26**) sugeriu que no cocultivo houve maior secreção de proteínas e, neste quesito, a melhor fonte de carbono foi a cana-de-açúcar SP8032-80. Entretanto, para o cultivo individual não houve uma diferença significativa entre o número de proteínas secretadas nas duas fontes de carbono, independentemente do

tempo de cultivo.

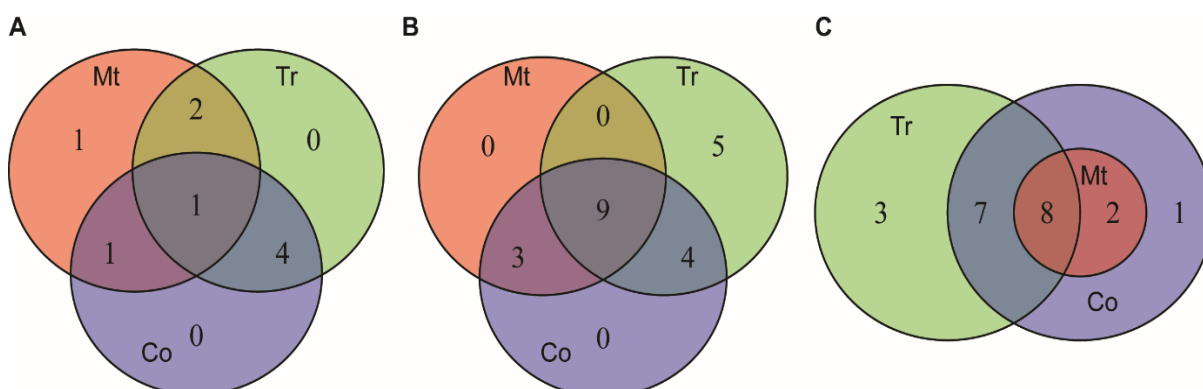
#### 4.19. Comparação entre os secretomas de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em cultivos únicos e cocultivo

Os perfis dos secretomas desses dois fungos quando comparados indicam que eles diferiram consideravelmente (**Tabela 24**, **Tabela 25**, **Tabela 26** e **Figura 22**). Foi realizada uma análise comparativa da detecção de famílias de CAZymes. A **Figura 23** e a **Figura 24** representam a detecção das CAZymes secretadas por *M. thermophilus* (Mt), *T. reesei* RP698 (Tr) em cultivos únicos e cocultivo (Co) em glucose, SP80-3280 e EC levando em conta todos os dias de cultivo. Todas as CAZymes detectadas podem ser observadas na **Tabela 28**.

A **Figura 23A** apresenta a comparação das CAZymes secretadas pelos fungos em cultivos únicos e cocultivo em glucose. Foram detectadas 9 CAZymes pertencentes as distintas famílias CAZy. Destas, uma CAZyme foi exclusiva do *M. thermophilus*; 2 CAZymes foram compartilhadas entre os dois cultivos únicos; 4 CAZymes entre o *T. reesei* e o cocultivo; 1 CAZyme entre *M. thermophilus* e o cocultivo e uma única CAZyme presente nas 3 condições estudadas. A **Figura 23B** apresenta a comparação das CAZymes secretadas pelos fungos em cultivos únicos e cocultivo na cana-de-açúcar SP80-3280. Foram identificadas 21 CAZymes nos cultivos em SP80-3280. Dentre as CAZymes detectadas, 5 foram exclusivas de *T. reesei* RP698 (AA1, não identificada, GH55, GH67 e CE16); 4 foram compartilhadas entre *T. reesei* RP698 e o cocultivo (GH30, GH54, não identificada e GH5); 3 entre *M. thermophilus* e o cocultivo (PL4, GH53 e GH45); e 9 presentes nos três cultivos analisados (GH10, GH11, CE5, CE15, GH5, GH6, GH7, GH94 e AA9) (**Tabela 27**).

A **Figura 23C** apresenta a comparação das CAZymes secretadas pelos fungos em cultivos únicos e cocultivo na EC. Foram identificadas 21 CAZymes, sendo que 3 foram exclusivas de *T. reesei* RP698 (AA1, uma não identificada e GH55); uma exclusiva do cocultivo (PL4); 7 foram compartilhadas entre *T. reesei* RP698 e o cocultivo (GH30, GH54, GH67, CE5, CE16, uma não identificada e GH5); 2 entre *M. thermophilus* e o cocultivo (GH43 e GH53); e 8 presentes nos três cultivos analisados (GH10, GH11, CE15, GH5, GH6, GH7, GH94 e AA9) (**Tabela 27**).

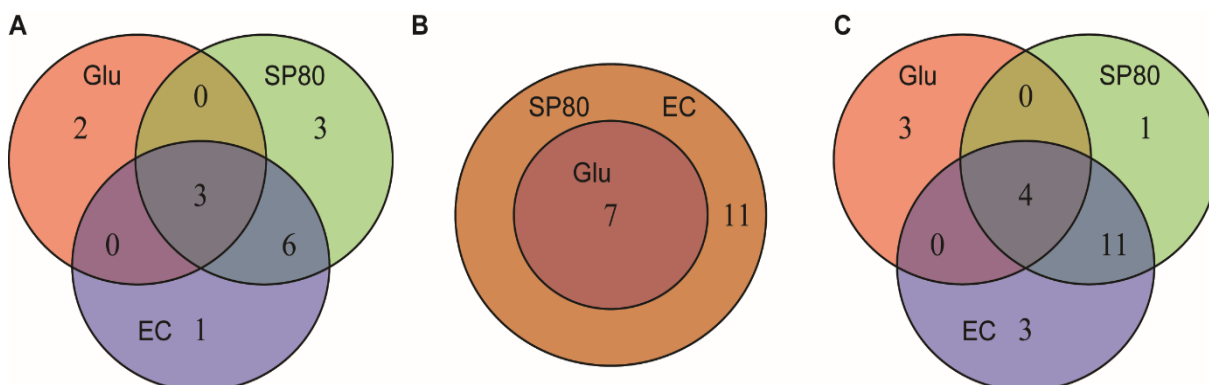
**Figura 23.** Representação comparativa da detecção de CAZymes dos fungos *Mycothermus thermophilus* (Mt) e *Trichoderma reesei* RP698 (Tr) em cultivos únicos e cocultivo em: (A): glucose; (B) cana-de-açúcar SP80-3280 e (C) EC.



Fonte: Dados da autora.

A **Figura 24A** apresenta as CAZymes secretadas por *M. thermophilus* nas três fontes de carbono estudadas. Foram detectadas 15 distintas família CAZy, sendo que: 2 CAZymes foram exclusivas do cultivo em glucose (não identificada e GH3); 3 foram exclusivas para SP80-3280 (PL4, CE5 e GH45); uma única em EC (GH43); 6 foram compartilhadas pelo cultivo em EC e SP80-3280 (GH53, GH10, CE15, GH5, GH94 e AA9) e 3 foram detectadas nas três condições e fontes de carbono estudadas (GH11, GH6, GH7) (**Tabela 27**). A **Figura 24B** apresenta as CAZymes secretadas por *T. reesei* RP698 nas três fontes de carbono estudadas. Foram detectadas 18 famílias CAZy com o cultivo de *T. reesei* RP698 nas diferentes fontes carbono, sendo 11 compartilhadas pelo cultivo em SP80-3280 e EC (GH30, GH55, GH67, CE5, CE15, CE16, não identificada, GH5, GH94, AA9 e GH5) e 7 CAZymes compartilhadas pelas três fontes de carbono estudadas (AA1, não identificada, GH10, GH11, GH54, GH6 e GH7) (**Tabela 27**). A **Figura 24C** apresenta as CAZymes secretadas pelo cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em glucose, SP80-3280 e EC. Foram identificadas 22 famílias CAZy, sendo 3 exclusivas do cultivo em glucose (AA1, não identificada e GH3); uma exclusiva do cultivo em SP80-3280 (GH45); e 3 exclusivas do cultivo em EC (GH43, GH67 e CE16). Além disso, 11 CAZymes foram compartilhadas pelo cultivo nas canas SP80-3280 e EC (PL4, GH53, GH30, CE15, não identificada, GH5, GH6, GH7, GH94, AA9 e GH5) e 4 CAZymes foram compartilhadas nas três fontes de carbono (GH10, GH11, GH54 e CE5) (**Tabela 27**).

**Figura 24.** Representação comparativa da detecção de CAZymes em glucose, cana-de-açúcar SP80-3280 e EC por: (A) *Mycothermus thermophilus*; (B) *Trichoderma reesei* RP698 e (C) cocultivo.



Fonte: Dados da autora.

Assim, conclui-se que o cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 secretou maior número de proteínas envolvidas na hidrólise dos componentes da parede celular (**Tabela 26 e Figura 24**), além de ter sido o secretoma com o maior número de CAZymes detectadas, dados que corroboraram com os resultados previamente obtidos.

**Tabela 27.** CAZymes detectadas pelos cultivos únicos e cocultivo *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em glucose, cana-de-açúcar SP80-3280 e Cana Energia (EC) em diferentes tempos de cultivo.

Família CAZy	<i>M. thermophilus</i>			<i>T. reesei</i> RP698			Cocultivo			Ocorrência				
	Glu	SP80	EC	Glu	SP80	EC	Glu	SP80	EC	<i>M. thermophilus</i>	<i>T. reesei</i> RP698	Cocultivo	Singularidade	
	1 d; 2 d 5 d	7 d; 8 d 1 d; 2 d 5 d	7 d; 8 d 1 d; 2 d 5 d	7 d; 8 d 1 d; 2 d 5 d	7 d; 8 d 1 d; 2 d 5 d	7 d; 8 d 1 d; 2 d 5 d	7 d; 8 d 1 d; 2 d 5 d	7 d; 8 d 1 d; 2 d 5 d	7 d; 8 d 1 d; 2 d 5 d	7 d; 8 d				
<b>Lignina</b>														
AA1	Lacase-1 (68,9 kDa)	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 1 2	0 1 1	0 1 1	0 1 0	0 0 0	0 0 0	N	S	S	TR
-	Lacase 1 (68,9 kDa)	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 1 1	0 1 1	0 1 0	0 1 0	0 0 0	0 0 0	N	S	S	TR
<b>Pectina</b>														
PL4	Putativa ramnogalacturonase (58,0 kDa)	0 0 0	0 1 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 1 0	0 1 0	S	N	S	MT
GH53	Arabinogalactano endo-beta-1,4-galactanase (35,5 kDa)	0 0 0	1 1 1	1 1 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 1 1	0 1 1	S	N	S	MT
GH30	Endo-beta-1,6-galactanase (52,7 kDa)	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	1 1 1	1 1 1	0 0 0	0 1 1	1 1 1	N	S	S	TR

Continua...

...continuação Tabela 27.

Família CAZy	<i>M. thermophilus</i>			<i>T. reesei</i> RP698			Cocultivo			Ocorrência				
	Glu	SP80	EC	Glu	SP80	EC	Glu	SP80	EC	<i>M. thermophilus</i>	<i>T. reesei</i> RP698	Cocultivo	Singularidade	
	1 d; 2 d; 5 d	7 d; 8 d	1 d; 2 d; 5 d	7 d; 8 d	1 d; 2 d; 5 d	7 d; 8 d	1 d; 2 d; 5 d	7 d; 8 d	1 d; 2 d; 5 d	7 d; 8 d	1 d; 2 d; 5 d	7 d; 8 d		
<b>β-glucano</b>														
GH55 Glucano endo-1,3- beta-glucosidase (81,2 kDa)	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	1 1 1	1 0 1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	N	S	N	TR
<b>Xilana / Arabinoxilana</b>														
GH10 Putativa endoglucanase tipo F (41,2 kDa) / Endo-1,4-beta- xilanase A ou C (35,8 - 36,2 kDa) / Endo-1,4-beta- xilanase 3 (38,1 kDa)	0 0 0	3 3 3	3 3 2	0 1 1	1 1 1	1 1 1	0 1 1	3 4 4	4 4 4	S	S	S	Ambos	
GH11 Endo-1,4-beta- xilanase 1 ou 2 ou 4 (24,2 - 25,6 kDa) / Endo-1,4-beta- xilanase G (27,4 kDa)	0 0 1	2 2 2	3 3 2	0 3 1	1 1 1	1 1 1	0 3 3	2 3 3	3 3 3	S	S	S	Ambos	

Continua...

... continuação Tabela 27.

Família CAZy	<i>M. thermophilus</i>			<i>T. reesei</i> RP698			Cocultivo			Ocorrência					
	Glu	SP80	EC	Glu	SP80	EC	Glu	SP80	EC	<i>M. thermophilus</i>	<i>T. reesei</i> RP698	Cocultivo	Singularidade		
	1 d; 2 d 5 d	7 d; 8 d 1 d; 2 d 5 d	7 d; 8 d 1 d; 2 d 5 d	7 d; 8 d 1 d; 2 d 5 d	7 d; 8 d 1 d; 2 d 5 d	7 d; 8 d 1 d; 2 d 5 d	7 d; 8 d 1 d; 2 d 5 d	7 d; 8 d 1 d; 2 d 5 d	7 d; 8 d 1 d; 2 d 5 d						
GH43	Alfa-L-arabinofuranosidase B (52,4 kDa)	0 0 0	0 0 0	0 0 1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 1	S	N	S	Ambos
GH67	Alfa-glucuronidase (93,4 kDa)	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	1 1 1	1 1 1	1 1 1	0 0 0	0 0 0	1 1 1	N	S	S	TR
GH54	Arabinofuranosidase/B-xilosidase (51,1 kDa)	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 1 0	1 1 1	1 1 1	1 1 1	0 1 1	0 1 1	1 1 1	N	S	S	TR
CE5	Acetil xilana esterase (30,7 kDa)	0 0 0	1 0 0	0 0 0	0 0 0	1 1 1	1 1 1	1 1 1	0 1 1	1 1 0	1 1 1	S	S	S	Ambos
CE15	4-O-metil-glucurônico metilesterase (48,3 kDa)	0 0 0	1 2 1	2 1 1	0 0 0	1 1 1	1 1 1	1 1 1	0 0 0	1 0 0	1 2 1	S	S	S	Ambos
CE16	Acetil esterase (39,1 kDa)	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 1 1	1 1 1	1 1 1	0 0 0	0 0 0	1 0 0	N	S	S	TR
<b>Xiloglucano</b>															
-	Xiloglucanase (87,1 kDa)	0 1 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	1 1 0	0 1 1	0 1 1	0 0 0	1 0 0	1 0 0	S	S	S	Ambos

Continua...



... continuação Tabela 27.

		<i>M. thermophilus</i>			<i>T. reesei</i> RP698			Cocultivo			Ocorrência																				
		Glu	SP80	EC	Glu	SP80	EC	Glu	SP80	EC	<i>M. thermophilus</i>	<i>T. reesei</i> RP698	Cocultivo	Singularidade																	
Família CAZy		1 d; 2 d	5 d	7 d; 8 d	1 d; 2 d	5 d	7 d; 8 d	1 d; 2 d	5 d	7 d; 8 d	1 d; 2 d	5 d	7 d; 8 d	1 d; 2 d	5 d	7 d; 8 d															
<b>Celulose</b>																															
GH3	Beta-glucosidase cel3A (82,8 kDa) / Provável beta-glucosidase L (78,7 kDa)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	N	S	TR							
GH5	Endoglucanase EG-II (44,2 kDa) / Endoglucanase 3 (42,5 kDa)	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	2	2	1	2	2	S	S	S	Ambos
GH6	Exoglucanase-6A (51,2 kDa) / Exoglucanase 2 (49,6 kDa) / Endoglucanase-6B (37,7 kDa) / 1,4-beta-D-glucano celobiohidrolase CEL6C (42,5 kDa)	0	1	1	3	3	3	3	3	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	3	4	3	3	4	3	S	S	S	Ambos

Continua...

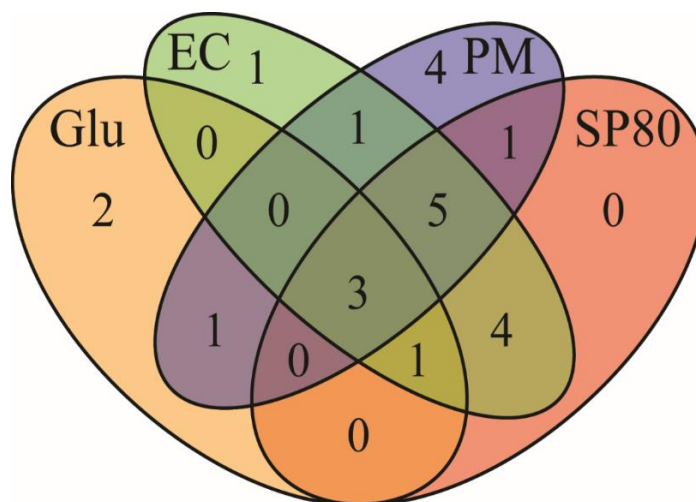
... continuação Tabela 27.

Família CAZy	<i>M. thermophilus</i>			<i>T. reesei</i> RP698			Cocultivo			Ocorrência					
	Glu		SP80	Glu		SP80	EC	Glu		SP80	EC	<i>M. thermophilus</i>	<i>T. reesei</i> RP698	Cocultivo	Singularidade
	1 d; 2 d	5 d	7 d; 8 d	1 d; 2 d	5 d	7 d; 8 d	1 d; 2 d	5 d	7 d; 8 d	1 d; 2 d	5 d				
GH7	Exoglucanase 1 (48,3 - 55,7 kDa)/ Endoglucanase EG-1 (47,9 kDa) / Endoglucanase type C (46,4 kDa)		0 2 1	3 2 2	4 4 3	0 1 0	3 2 3	2 2 2	0 0 0	3 5 4	4 4 6	S	S	S	Ambos
GH45	Endoglucanase-5 (22,8 kDa)		0 0 0	0 0 1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 1 1	0 0 0	S	N	S	MT
GH94	Ácido celobiônico fosforilase (89,5 kDa)		0 0 0	1 1 1	1 1 0	0 0 0	1 1 1	1 1 1	0 0 0	1 1 1	1 1 1	S	S	S	Ambos
AA9	Endoglucanase-4 ou 7 (26,8 - 35,5 kDa) / Polissacarídeo monooxigenase Cel61a (34,9 kDa)		0 0 0	1 1 1	1 0 1	0 0 0	1 1 1	1 1 1	0 0 0	1 1 1	2 2 2	S	S	S	Ambos
<b>Manana</b>															
GH5	Manana endo-1,4-beta-manosidase A (47,0 kDa)		0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	2 2 2	2 2 2	0 0 0	0 1 1	2 2 1	N	S	S	TR

Fonte: Dados da autora.

Foi realizada ainda uma análise comparativa da detecção de CAZymes secretadas pelo cocultivo em PM (**Parte IV, Tabela 18**), glucose, SP80-3280 e EC (**Tabela 26**). A **Figura 25** apresenta a representação comparativa entre estes dados. Todas as CAZymes detectadas podem ser observadas na **Tabela 28**, nela as enzimas estão separadas de acordo com os componentes da parede celular com as quais cada uma é responsável por sua degradação. Foram identificadas 23 CAZymes, sendo 2 exclusivas do cultivo em glucose (AA1 e não identificada); uma CAZyme em EC (GH67); 4 CAZymes em PM (AA2, GH35, não identificada e GH1) e nenhum CAZymes foi exclusiva do cultivo em SP80-3280. Ademais, dentre as CAZymes detectadas, uma foi compartilhada no cultivo em glucose e PM (GH3); uma foi compartilhada entre PM e SP80-3280 (GH45); uma foi detectada tanto em PM quanto em EC (CE15); e 4 CAZymes foram compartilhadas entre SP80-3280 e EC (PL4, GH53, GH94 e GH5). Além disso, foram detectadas 5 CAZymes compartilhadas entre PM, SP80-3280 e EC (GH30, GH5, GH6, GH7 e AA9); 3 CAZymes em todas as fontes de carbono estudadas e uma compartilhada entre glucose, SP80-3280 e EC (GH10, GH11 e CE5).

**Figura 25.** Representação da detecção de CAZymes a partir do cocultivo durante 5 dias em glucose, cana-de-açúcar SP80-3280, EC e PM.



Fonte: Dados da autora.

Desta maneira, conclui-se que o melhor coquetel foi obtido pelo cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em PM, uma vez que houve maior número de proteínas secretadas pertencentes às distintas classes de enzimas estudadas (**Figura 25 e Tabela 28**).

**Tabela 28.** CAZymes detectadas no quinto dia de cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em diferentes fontes de carbono.

	Família CAZy	Cocultivo				Ocorrência
		Glucose	SP80-3280	EC	PM	
<b>Lignina</b>						
AA1	Lacase-1 (68,9 kDa)	1	0	0	0	Glucose
AA2	Peroxidase 22 (38,1 kDa)	0	0	0	1	PM
-	Lacase 1 (68,9 kDa)	1	0	0	0	Glucose
<b>Pectina</b>						
PL4	Putativa ramnogalacturonase (58,0 kDa)	0	1	1	0	SP80-3280 e EC
GH53	Arabinogalactano endo-beta-1,4-galactanase (35,5 kDa)	0	1	1	0	SP80-3280 e EC
GH30	Endo-beta-1,6-galactanase (52,7 kDa)	0	1	1	1	SP80-3280; EC e PM
GH35	Provável beta-galactosidase A (110,3 kDa)	0	0	0	1	PM
<b>Xilana / Arabinoxilana</b>						
GH10	Putativa endoglucanase type F (41,2 kDa) / Endo-1,4-beta-xilanase A ou C (35,8 - 36,2 kDa) / Endo-1,4-beta-xilanase 3 (38,1 kDa)	1	4	4	4	Todos
GH11	Endo-1,4-beta-xylanase 1 ou 2 ou 4 (24,2 - 25,6 kDa) / Endo-1,4-beta-xilanase G (27,4 kDa)	3	3	3	2	Todos
GH67	Alfa-glucuronidase (93,4 kDa)	0	0	1	0	EC
GH54	Arabinofuranosidase/B-xilosidase (51,1 kDa)	1	1	1	0	Glucose; SP80-3280 e EC
CE5	Acetil xilana esterase (30,7 kDa)	1	1	1	1	Todos
CE15	4-O-metil-glucurônico metilesterase (48,3 kDa)	0	0	2	1	EC e PM
<b>Xiloglucano</b>						
-	Xiloglucanase (87,1 kDa)	0	0	0	1	PM

Continua...

...continuação **Tabela 28.**

Família CAZy		Cocultivo				Ocorrência
		Glucose	SP80-3280	EC	PM	
<b>Celulose</b>						
GH1	Beta-glucosidase 1B (60,6 kDa)	0	0	0	1	PM
GH3	Beta-glucosidase cel3A (82,8 kDa) / Provável beta-glucosidase L (78,7 kDa)	1	0	0	1	Glucose e PM
GH5	Endoglucanase EG-II (44,2 kDa) / Endoglucanase 3 (42,5 kDa)	0	2	2	5	SP80-3280; EC e PM
GH6	Exoglucanase-6A (51,2 kDa) / Exoglucanase 2 (49,6 kDa) / Endoglucanase-6B (37,7 kDa) / 1,4-beta-D-glucano celobiohidrolase CEL6C (42,5 kDa)	0	4	4	3	SP80-3280; EC e PM
GH7	Exoglucanase 1 (54 - 55,7 kDa)/ Endoglucanase EG-1 (47,9 - 48,3 kDa)	0	5	4	6	SP80-3280; EC e PM
GH45	Endoglucanase-5 (22,8 kDa)	0	1	0	1	SP80-3280 e PM
GH94	Ácido celobiônico fosforilase (89,5 kDa)	0	1	1	0	SP80-3280 e EC
AA9	Endoglucanase-4 ou 7 (26,8 - 35,5 kDa) / Polissacarídeo monooxigenase Cel61a (34,9 kDa)	0	1	2	3	SP80-3280; EC e PM
<b>Manana</b>						
GH5	Manana endo-1,4-beta-manosidase A (47,0 kDa)	0	1	2	0	SP80-3280 e EC

Fonte: Dados da autora.

PARTE VI: EFEITO DE PRÉ-  
TRATAMENTOS NAS VARIEDADES DE  
CANA-DE-AÇÚCAR E SEUS IMPACTOS  
NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

#### 4.20. Análise composicional dos carboidratos do bagaço de cana-de-açúcar, Cana Energia e cana-de-açúcar SP80-3280 *in natura* e pré-tratados

Após a otimização do coquetel enzimático para aplicação em cana-de-açúcar *in natura*, ou seja, sem prévia exposição a algum pré-tratamento, foram estudados diferentes pré-tratamentos, sendo eles: hidrotérmico, *organosolv*, ácido e alcalino. A aplicação do coquetel em cada material pré-tratado foi realizada de acordo com as condições determinadas (item 4.11). A **Tabela 29** apresenta os resultados da composição dos carboidratos de SCB, EC e SP80-3280 *in natura* e pré-tratadas. A análise dos monossacarídeos neutros corresponde apenas à composição das hemiceluloses presentes nas biomassas lignocelulósicas. Em nenhuma das biomassas analisadas houve a presença do monossacarídeo de ramnose.

Esta análise dos componentes da parede celular das diferentes canas mostrou um padrão similar dos monossacarídeos, mesmo que em quantidades diferentes para cada cana estudada (SCB, EC e SP80-3280). Para as três canas sem tratamento houve maior quantidade de xilose ( $159,44 \pm 41,44$   $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de SCB;  $149,25 \pm 19,21$   $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de EC e  $151,36 \pm 21,35$   $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de SP80-3280), seguida por arabinose ( $24,80 \pm 10,19$   $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de SCB;  $24,89 \pm 2,18$   $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de EC e  $22,10 \pm 6,13$   $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de SP80-3280) e glucose ( $14,08 \pm 7,04$   $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de SCB;  $8,34 \pm 1,10$   $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de EC e  $14,04 \pm 4,76$   $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de SP80-3280).

A análise dos componentes da parede celular de SCB *in natura* e pré-tratadas revelou as seguintes tendências após a exposição das biomassa a diferentes pré-tratamentos: (i) os monossacarídeos fucose, galactose, xilose e manose diminuíram após os pré-tratamentos de autohidrólise, *organosolv* (Organ), *organosolv* e ácido sulfúrico (Organ:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), alcalino (NaOH) e alcalino com peróxido de hidrogênio (NaOH:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); (ii) houve um aumento do monossacarídeo arabinose de  $24,80 \pm 10,19$  para  $27,39 \pm 3,50$   $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de AIR) após SCB ser exposto ao pré-tratamento alcalino, e de glucose (de  $14,08 \pm 7,04$  para  $15,37 \pm 1,93$   $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de AIR) com o pré-tratamento alcalino com peróxido de hidrogênio.

Assim como para SCB, a análise da composição dos açúcares da parede de EC apresentou algumas tendências após a biomassa ser exposta aos pré-tratamentos: (i) os monossacarídeos fucose, galactose e manose diminuíram nos diferentes pré-tratamentos estudados; (ii) arabinose mostrou um aumento de 1,36 vezes após aplicação do pré-tratamento alcalino; (iii) glucose foi 1,10 e 1,25 vezes

maior para as biomassas pré-tratadas com NaOH e NaOH:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente; (iv) não houve alteração em relação a xilose após EC passar pelo pré-tratamento de autohidrólise e alcalino.

A análise dos componentes da parede celular de SP80-3280 apresentou um padrão bastante similar ao de SCB, principalmente após a exposição da biomassa aos diferentes pré-tratamentos. De modo geral, houve uma tendência de diminuição dos monossacarídeos das amostras analisadas após os seguintes pré-tratamentos: autohidrólise; *organosolv*; e *organosolv* e ácido sulfúrico. Entretanto, o pré-tratamento de autohidrólise para SP80-3280 possibilitou um aumento dos monossacarídeos de glucose e manose, enquanto o pré-tratamento alcalino, assim como para as demais biomassas estudadas, mostrou um aumento da quantidade de arabinose em sua composição.



**Tabela 29.** Composição dos açúcares ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de biomassa seca) do bagaço de cana-de-açúcar (SCB), Cana Energia (EC) e cana-de-açúcar SP80-3280 *in natura* e após diferentes pré-tratamentos.

Biomassa	Fucose $\mu\text{g}/\text{mg AIR}$	Arabinose $\mu\text{g}/\text{mg AIR}$	Galactose $\mu\text{g}/\text{mg AIR}$	Ramnose $\mu\text{g}/\text{mg AIR}$	Glucose $\mu\text{g}/\text{mg AIR}$	Xilose $\mu\text{g}/\text{mg AIR}$	Manose $\mu\text{g}/\text{mg AIR}$
<b>SCB</b>							
<i>in natura</i>	<b>0,62 ± 0,17</b>	<b>24,80 ± 10,19</b>	<b>6,20 ± 2,76</b>	n.d.*	<b>14,08 ± 7,04</b>	<b>159,44 ± 41,44</b>	<b>1,60 ± 0,81</b>
Autohidrólise	<b>0,59 ± 0,10</b>	20,19 ± 4,76	4,60 ± 1,13	n.d.	12,24 ± 3,90	<b>158,27 ± 21,39</b>	1,22 ± 0,36
Organ	0,15 ± 0,13	7,18 ± 0,05	1,34 ± 0,16	n.d.	11,97 ± 1,14	102,32 ± 2,09	0,51 ± 0,05
Organ:H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,47 ± 0,06	11,82 ± 0,56	2,60 ± 0,15	n.d.	12,45 ± 0,81	124,22 ± 9,27	0,93 ± 0,03
NaOH	0,54 ± 0,20	27,39 ± 3,50	4,62 ± 0,49	n.d.	<b>14,93 ± 1,48</b>	132,59 ± 18,97	0,55 ± 0,28
NaOH:H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	n.d.	18,13 ± 1,95	2,07 ± 0,31	n.d.	<b>15,37 ± 1,93</b>	72,90 ± 7,00	0,31 ± 0,04
<b>EC</b>							
<i>in natura</i>	0,66 ± 0,26	24,89 ± 2,18	<b>4,39 ± 0,50</b>	n.d.	8,34 ± 1,10	<b>149,25 ± 19,21</b>	<b>0,96 ± 0,16</b>
Autohidrólise	<b>0,70 ± 0,02</b>	18,09 ± 0,78	3,31 ± 0,12	n.d.	8,09 ± 1,52	145,59 ± 9,59	<b>0,92 ± 0,37</b>
Organ	0,38 ± 0,05	8,52 ± 0,77	1,18 ± 0,15	n.d.	8,14 ± 1,64	105,42 ± 7,04	0,55 ± 0,07
Organ:H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,51 ± 0,24	11,02 ± 2,57	1,51 ± 0,39	n.d.	6,66 ± 1,05	114,44 ± 27,28	0,69 ± 0,20
NaOH	<b>0,81 ± 0,41</b>	<b>33,79 ± 3,31</b>	<b>4,26 ± 0,32</b>	n.d.	<b>9,16 ± 2,49</b>	<b>152,53 ± 31,06</b>	<b>0,71 ± 0,11</b>
NaOH:H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,09 ± 0,15	17,95 ± 1,73	1,49 ± 0,22	n.d.	<b>10,46 ± 1,91</b>	70,03 ± 8,25	0,24 ± 0,04
<b>SP80-3280</b>							
<i>in natura</i>	0,65 ± 0,16	<b>22,10 ± 6,13</b>	<b>5,38 ± 1,52</b>	n.d.	14,04 ± 4,76	<b>151,36 ± 21,35</b>	2,04 ± 0,83
Autohidrólise	<b>0,77 ± 0,20</b>	<b>19,94 ± 2,58</b>	<b>5,90 ± 1,31</b>	n.d.	<b>22,09 ± 6,33</b>	<b>149,12 ± 1,53</b>	<b>3,03 ± 0,87</b>
Organ	0,17 ± 0,14	6,39 ± 0,40	1,44 ± 0,34	n.d.	11,57 ± 2,66	97,04 ± 9,28	0,62 ± 0,12
Organ:H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,65 ± 0,11	12,96 ± 2,00	3,00 ± 0,29	n.d.	6,64 ± 0,87	134,22 ± 20,53	0,72 ± 0,10
NaOH	0,62 ± 0,27	<b>25,93 ± 1,25</b>	4,65 ± 0,16	n.d.	10,54 ± 2,68	133,78 ± 11,80	0,59 ± 0,07
NaOH:H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,31 ± 0,01	16,81 ± 0,93	1,85 ± 0,02	n.d.	10,35 ± 0,94	75,25 ± 3,88	0,23 ± 0,02

\* n.d. = não detectado.

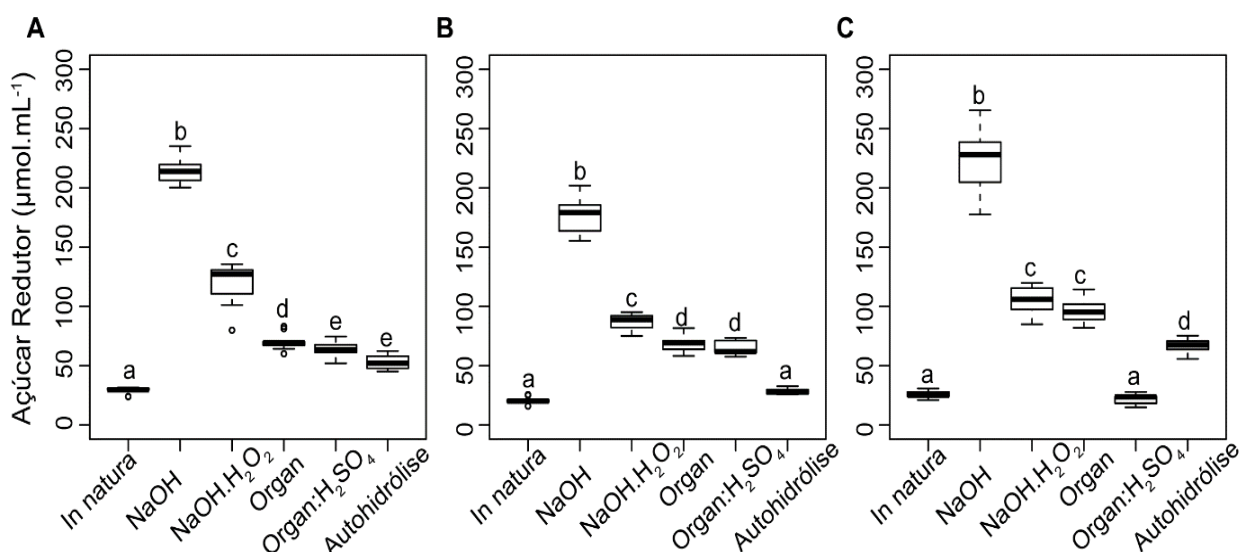
Fonte: Dados da autora.

#### 4.21. Efeito dos diferentes pré-tratamentos na hidrólise das biomassas lignocelulósicas

Após a otimização do coquetel obtido pelo cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 crescidos em PM, o consórcio enzimático otimizado foi aplicado para averiguar o efeito da liberação de AR nos diferentes pré-tratamentos das canas SCB, EC e SP80-3280. As condições de aplicação do coquetel se mantiveram as mesmas padronizadas para as canas *in natura*. Para todas as canas, a temperatura de hidrólise foi de 50 °C e a aplicação do coquetel foi realizada com 0,12 mg de proteína por mg de biomassa, sendo 4% para SCB e 3% para EC e SP80-3280. Para SCB foi utilizado o tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0 e a hidrólise foi realizada durante 24 horas; para EC, a hidrólise foi conduzida em pH 4,5 durante 48 horas; e para SP80-3280, em pH 4,0 durante 96 horas de hidrólise.

A **Figura 26** ilustra o efeito da aplicação do coquetel caracterizado e otimizado nas canas *in natura* e após pré-tratamentos: (i) alcalino (NaOH); (ii) alcalino com peróxido de hidrogênio (NaOH:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); (iii) *organosolv* (Organ); (iv) *organosolv* com ácido sulfúrico (Organ:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e (v) autohidrólise.

**Figura 26.** Liberação de açúcares redutores, em  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ , após aplicação do coquetel obtido pelo cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 em palha de milho em (A) bagaço de cana-de-açúcar (SCB); (B) Cana Energia (EC); (C) cana-de-açúcar variedade SP80-3280.



\* Letras semelhantes indicam que não há diferenças significativas ( $P > 0,001$ ).

Fonte: Dados da autora.

Para SCB (**Figura 26A**), o pré-tratamento com NaOH foi o que apresentou o melhor resultado de hidrólise, liberando  $215,01 \pm 11,02 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR, um aumento de 7,42 vezes quando comparado com SCB *in natura* ( $28,99 \pm 2,95 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR). O segundo melhor pré-tratamento foi com NaOH:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que apresentou uma liberação 45 % menor que o pré-tratamento com NaOH, mesmo assim, a sacarificação foi 4,10 vezes maior que SCB não tratada. Os demais pré-tratamentos, apesar de apresentarem melhor liberação de AR do que SCB *in natura* não foram tão promissores quanto os pré-tratamentos alcalinos, sendo que os pré-tratamentos Organ:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e autohidrólise não apresentaram diferenças significativas entre si ( $P > 0,001$ ).

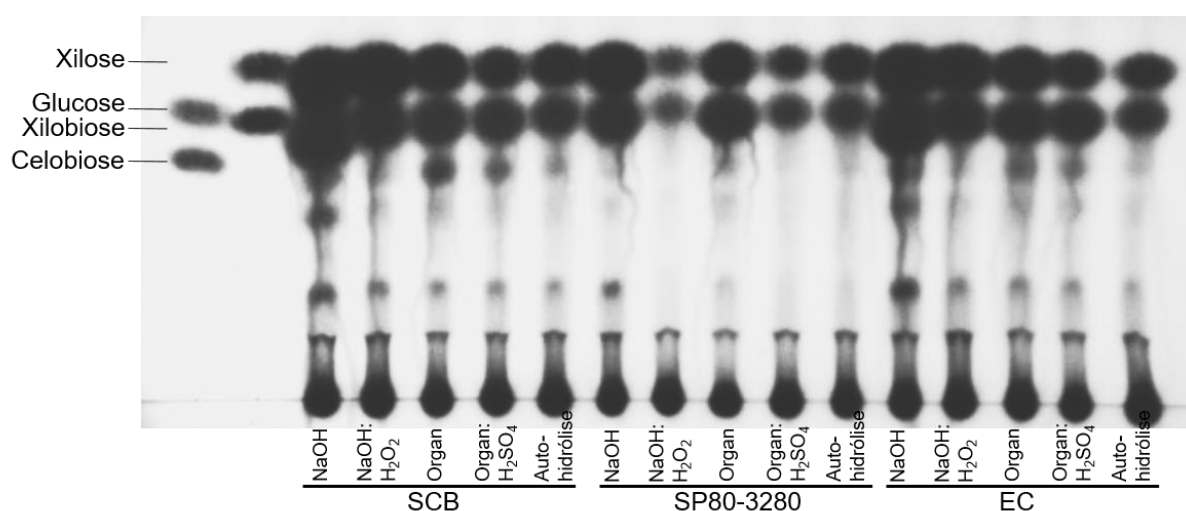
Para EC (**Figura 26**), a maior liberação de AR ocorreu com a biomassa pré-tratada com NaOH ( $177,16 \pm 16,00 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ), representando um aumento de 8,51 vezes quando comparada com a biomassa *in natura*, ou seja, sem nenhum pré-tratamento. O segundo melhor resultado de hidrólise foi após a exposição de EC ao pré-tratamento alcalino com peróxido de hidrogênio (NaOH:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), liberando 4,18 vezes mais AR que a biomassa *in natura*. Não houve diferença significativa entre a liberação de AR dos pré-tratamentos *organosolv* (Organ) e *organosolv* com ácido sulfúrico (Organ:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ( $P > 0,001$ ). O pior pré-tratamento para este tipo de biomassa foi a autohidrólise ( $28,41 \pm 2,37 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR), que não apresentou diferença significativa na quantidade de AR liberada quando comparada com EC *in natura* ( $20,81 \pm 3,01 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ).

Para SP80-3280 (**Figura 26C**), assim como para SCB e EC, o melhor pré-tratamento foi com NaOH que apresentou a maior liberação de AR ( $220,64 \pm 29,02 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ), um resultado 8,61 vezes melhor que a hidrólise de SP80-3280 *in natura*. Não houve diferença significativa ( $P > 0,001$ ) entre o pré-tratamento alcalino com peróxido de hidrogênio (NaOH:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ( $105,06 \pm 11,23 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR) e *organosolv* (Organ) ( $96,54 \pm 10,10 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR). O terceiro melhor resultado de sacarificação ocorreu com a biomassa pré-tratada por autohidrólise, que liberou 2,61 vezes maior quantidade de AR que SP80-3280 *in natura*. A pior liberação de AR da biomassa pré-tratada foi com Organ:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ( $22,09 \pm 4,40 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) que não apresentou diferença significativa ( $P > 0,001$ ) quando comparado com SP80-3280 *in natura*.

A **Figura 27** apresenta os açúcares presentes nos hidrolisados de SCB, EC e SP80-3280 após os cinco pré-tratamentos estudados. Os hidrolisados aplicados

apresentavam os açúcares liberados durante a hidrólise da biomassa somados aos açúcares já presentes da própria biomassa e do coquetel enzimático. De modo geral, foi possível observar que o pré-tratamento com NaOH foi o que mostrou maior liberação de xilose e glucose, pelo tamanho das bandas apresentadas. Além desses monossacarídeos, houve a liberação de celobiose e outros sacarídeos, em menor quantidade, que não foram identificadas pelos padrões utilizados na Cromatografia de Camada Delgada. Os demais perfis de liberação de açúcares foram bem semelhantes ao perfil das biomassas pré-tratadas com NaOH, mas diferem quando comparados com os perfis de açúcares de SCB, EC e SP80-3280 *in natura* (Figura 19).

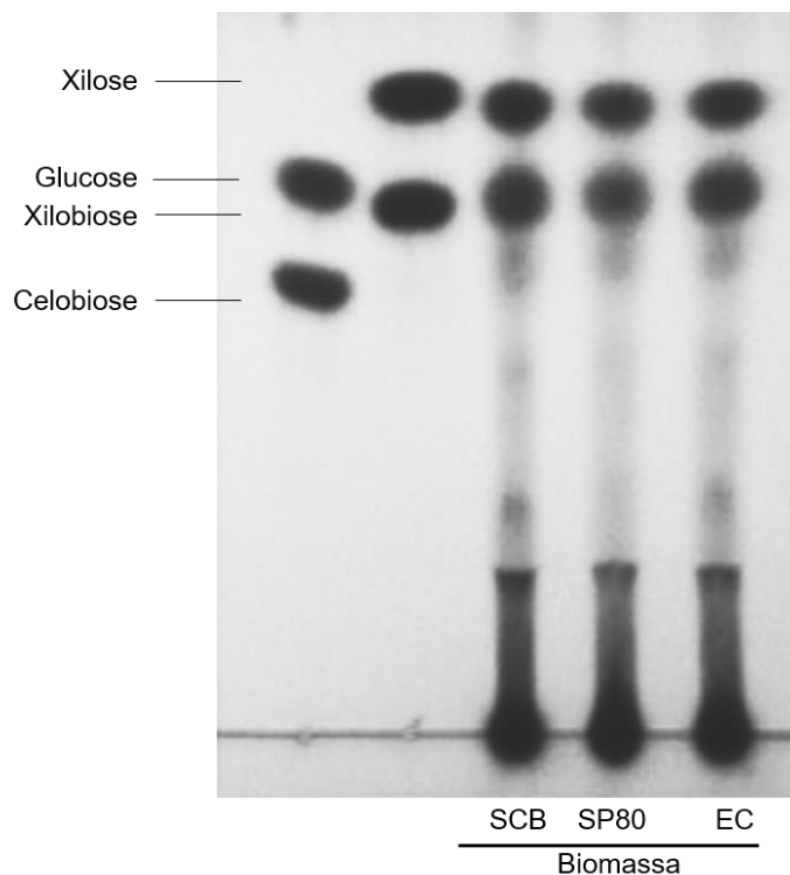
**Figura 27.** Cromatografia de camada delgada dos hidrolisados de SCB; SP80-3280 e EC após pré-tratamento: alcalino (NaOH); alcalino com peróxido de hidrogênio (NaOH:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); *organossolv* (Organ); *organosolv* com ácido sulfúrico (Organ:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e Autohidrólise.



Fonte: Dados da autora.

Além destes pré-tratamentos, foi estudado um pré-tratamento enzimático com a lacase de *Lentinus sajor caju*. Entretanto, a hidrólise desse material apresentou o pior resultado de sacarificação, sendo a liberação de  $11,55 \pm 0,77 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR para SCB,  $21,54 \pm 2,32 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR para EC e  $10,66 \pm 2,04 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR para SP80-3280. A Figura 28 apresenta os açúcares liberados após a aplicação do coquetel em SCB, SP80-3280 e EC pré-tratados com a lacase, apresentando somente glucose e xilose liberados.

**Figura 28.** Cromatografia de camada delgada dos hidrolisados de SCB; SP80-3280 e EC após pré-tratamento com lacase.



Fonte: Dados da autora.

Como observado na **Figura 26** foi unânime que o melhor pré-tratamento para as três biomassa estudadas foi o alcalino com NaOH 4 % durante 60 minutos, sendo assim, optou-se por estudar duas variáveis importantes para este pré-tratamento: tempo de exposição e concentração de NaOH.

Os dados de hidrólise de SCB, EC e SP80-3280 após o pré-tratamento com NaOH 4 % e diferentes tempos de exposição estão apresentados na **Tabela 30**. Para SCB, os melhores resultados de liberação de AR foram com 60 e 75 minutos de pré-tratamento da biomassa com NaOH ( $215,01 \pm 11,02 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR e  $218,73 \pm 19,20 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR, respectivamente), sendo que não houve diferença significativa ( $P > 0,001$ ). Tempos inferiores a 60 minutos apresentaram uma redução na quantidade de AR liberados. Para EC, a maior liberação de AR ( $177,16 \pm 16,00 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) ocorreu com o material pré-tratado durante 60 minutos. Assim como para SCB, houve uma drástica redução da quantidade de AR liberada com os demais

tempos de pré-tratamento. Para SP80-3280, três tempos de pré-tratamentos apresentaram melhores resultados, sendo eles: 15 minutos ( $220,49 \pm 18,43 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR); 45 minutos ( $221,21 \pm 16,18 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR) e 60 minutos ( $220,64 \pm 29,02 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR). Não houve diferença significativa entre eles ( $P > 0,001$ ).

**Tabela 30.** Liberação de açúcares redutores, em  $\mu\text{mol/mL}$ , após aplicação do coquetel enzimático otimizado nas biomassas pré-tratadas com Hidróxido de Sódio (NaOH) 4% durante diferentes tempos de exposição.

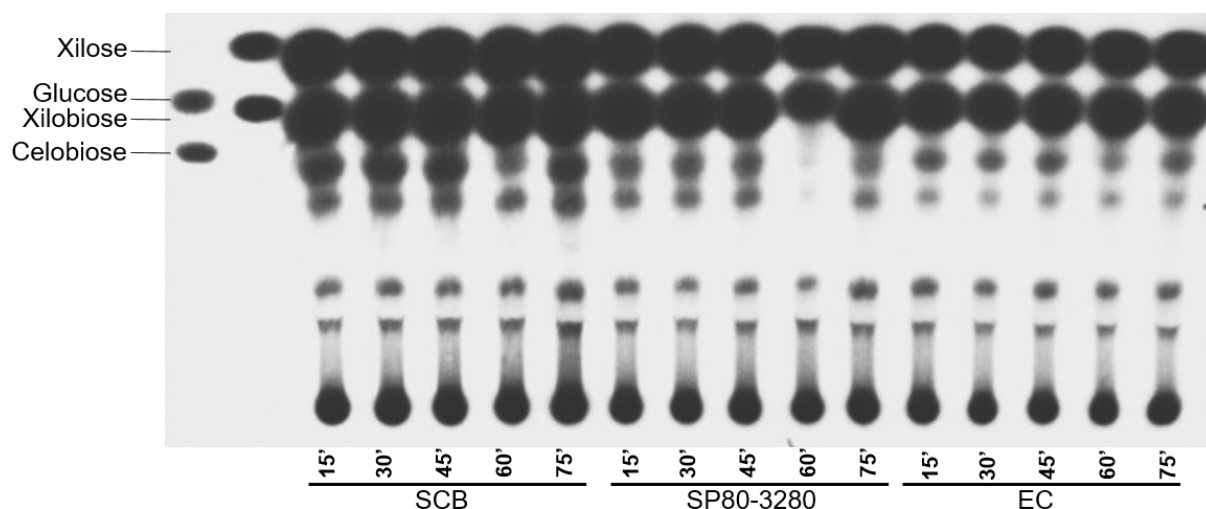
NaOH	AR ( $\mu\text{mol/mL}$ )		
	SCB	EC	SP80-3280
15'	$184,71 \pm 18,27a^*$	$110,06 \pm 11,24a$	<b><math>220,49 \pm 18,43a</math></b>
30'	$173,82 \pm 15,83a,b$	$106,21 \pm 15,71a$	$189,92 \pm 9,53b$
45'	$160,72 \pm 19,72b$	$155,16 \pm 15,07b,c$	<b><math>221,21 \pm 16,18a</math></b>
60'	<b><math>215,01 \pm 11,02c</math></b>	<b><math>177,16 \pm 16,00b</math></b>	<b><math>220,64 \pm 29,02a</math></b>
75'	<b><math>218,73 \pm 19,20c</math></b>	$150,70 \pm 19,26c$	$214,51 \pm 16,53a,b$

\*Letras semelhantes na coluna indicam que não há diferenças significativas ( $P > 0,001$ ).

Fonte: Dados da autora.

A **Figura 29** ilustra os dados obtidos a partir da Cromatografia de Camada Delgada dos hidrolisados de SCB, SP80-3280 e EC pré-tratados em diferentes tempos com NaOH 4%. A aplicação do coquetel otimizado a partir do cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em PM mostrou que não houve diferença dos açúcares liberados entre os pré-tratamentos.

**Figura 29.** Cromatografia de camada delgada dos hidrolisados de SCB; SP80-3280 e EC após pré-tratamento com Hidróxido de Sódio 4% e diferentes tempos de exposição.



Fonte: Dados da autora.

A **Tabela 31** apresenta os dados de sacarificação enzimática de SCB, EC e SP80-3280 pré-tratadas com diferentes concentrações de NaOH durante 60 minutos, melhor tempo de tratamento conforme determinado anteriormente (**Tabela 30**). Para SCB, o melhor resultado de hidrólise ocorreu com a biomassa pré-tratada com 4 % de NaOH ( $215,01 \pm 11,02 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$  de AR). Tanto com a redução quanto com o aumento da concentração de NaOH houve uma diminuição da quantidade de AR liberada, esta queda corresponde de aproximadamente 7 a 23 % de redução da quantidade de AR disponíveis.

Assim como para SCB, a sacarificação de EC apresentou o mesmo padrão de sacarificação, ou seja, a biomassa pré-tratada com NaOH 4 % ( $177,16 \pm 16,00 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$  de AR) mostrou melhor liberação de AR após aplicação do coquetel otimizado, enquanto que com nas demais concentrações houve uma redução acentuada de hidrólise da biomassa. Para SP80-3280, o melhor resultado também ocorreu com a biomassa pré-tratada com NaOH 4 % ( $220,64 \pm 29,02 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$  de AR), entretanto não houve diferença significativa ( $P > 0,001$ ) entre a quantidade de AR liberada a partir de SP80-3280 pré-tratada com 8 e 16 % de NaOH,  $216,00 \pm 12,11 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $198,93 \pm 12,62 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$  de AR, respectivamente.

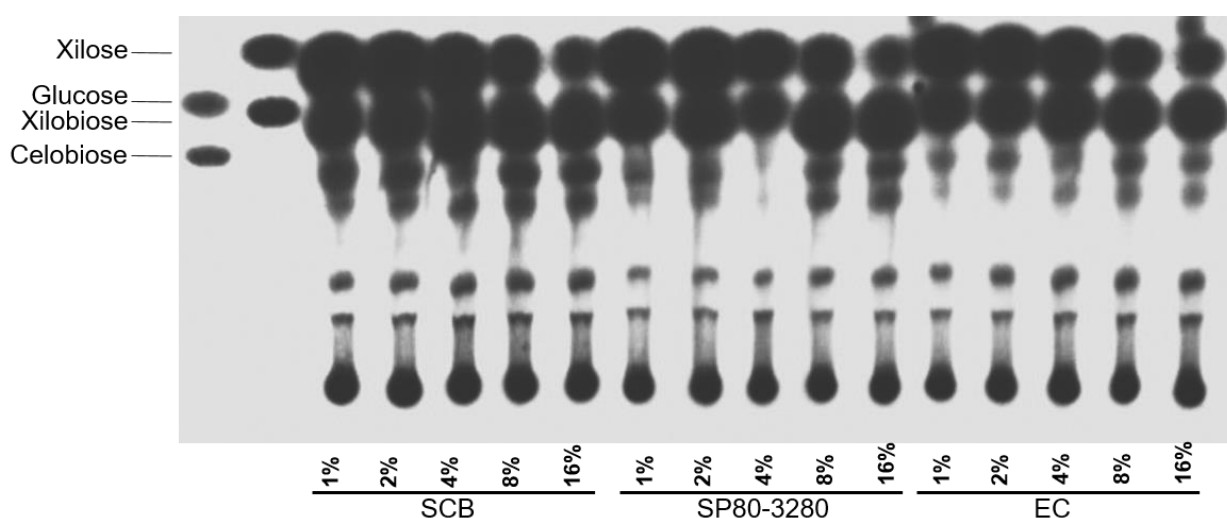
**Tabela 31.** Liberação de açúcares redutores, em  $\mu\text{mol/mL}$ , após aplicação do coquetel enzimático otimizado nas biomassas pré-tratadas com diferentes concentrações de Hidróxido de Sódio (NaOH) durante 60 minutos.

NaOH (%)	AR ( $\mu\text{mol/mL}$ )		
	SCB	EC	SP80-3280
1	165,63 $\pm$ 16,01a,e*	117,26 $\pm$ 9,23 <sup>a</sup>	132,77 $\pm$ 11,47a
2	198,79 $\pm$ 16,90b,e	137,41 $\pm$ 16,36a,c	143,28 $\pm$ 12,59a
4	<b>215,01 <math>\pm</math> 11,02c</b>	<b>177,16 <math>\pm</math> 16,00b,c</b>	<b>220,64 <math>\pm</math> 29,02b</b>
8	199,36 $\pm$ 14,94d,e	152,81 $\pm$ 14,29c	<b>216,00 <math>\pm</math> 12,11b</b>
16	180,95 $\pm$ 16,50e	141,53 $\pm$ 18,85a,c	<b>198,93 <math>\pm</math> 12,62b</b>

\*Letras semelhantes na coluna indicam que não há diferenças significativas ( $P > 0,001$ ).  
Fonte: Dados da autora.

A **Figura 30** ilustra os resultados da Cromatografia de Camada Delgada dos hidrolisados de SCB, SP80-3280 e EC pré-tratados com diferentes concentrações de NaOH durante 60 minutos. Assim como, para os demais pré-tratamentos, os açúcares predominantes da sacarificação enzimática das biomassas foram os monossacarídeos de glucose e xilose, seguido do dissacarídeo de celobiose e outros sacarídeos que não foram identificados pelos padrões utilizados na corrida.

**Figura 30.** Cromatografia de camada delgada dos hidrolisados de SCB; SP80-3280 e EC após pré-tratamento com NaOH em diferentes concentrações.



Fonte: Dados da autora.

Os resultados obtidos mostraram que o coquetel, obtido pelo cocultivo de *M.*



*thermophilus* e *T. reesei* RP698 em PM no biorreator BioFlo310, possui elevado potencial hidrolítico, quando associado com pré-tratamentos das biomassas lignocelulósicas (**Figura 26**). Dentre os pré-tratamentos estudados, foi observado que o com hidróxido de sódio (NaOH) 4 %, durante 60 minutos de autoclavagem, foi o que possibilitou os melhores resultados de hidrólise para as três canas estudadas. Sendo assim, a cana-de-açúcar SP80-3280 e SCB ( $220,64 \pm 29,02$  e  $215,01 \pm 11,02$   $\mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR, respectivamente) apresentaram melhores resultados de sacarificação, seguida pela hidrólise de EC ( $177,16 \pm 16,00$   $\mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR).

PARTE VII: POTENCIAL DE APLICAÇÃO  
DOS COQUETÉIS ENZIMÁTICOS NA  
HIDRÓLISE DE CANAS-DE-AÇÚCAR DE  
INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA

#### 4.22. Potencial de aplicação dos coquetéis de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698 cultivados em bagaço de cana-de-açúcar, Cana Energia e cana-de-açúcar SP80-3280

Por fim, com o intuito de analisar a aplicação de coquetéis enzimáticos em diferentes resíduos gerados a partir da produção de cana-de-açúcar foi realizada uma parceria com a empresa GranBio (São Miguel dos Campos – AL). Para os testes de hidrólise foram utilizadas 25 amostras (**Material e Métodos, Tabela 6**).

Como descrito anteriormente, os melhores extratos enzimáticos foram os obtidos a partir do cultivo de *M. thermophilus* (Mt) e *T. reesei* RP698 (Tr). Desta maneira, foram testados 6 diferentes coquetéis destes microrganismos crescidos em SCB, EC e SP80-3280, canas estudadas neste trabalho. As condições de hidrólise foram padronizadas com a aplicação de 0,9 mL do consórcio enzimático, 0,1 de tampão de acetato de sódio, 50 mM, pH 5,0 em 30 mg de biomassa, a 50 °C, durante 24 horas. Os resultados foram divididos pelo tipo de biomassa a serem hidrolisadas.

A **Tabela 32** apresenta os dados de hidrólise dos resíduos gerados a partir de duas variedades comerciais de cana-de-açúcar submetidas a diferentes processos industriais. Para cada variedade foram obtidas 4 amostras divididas da seguinte maneira: amostra A corresponde a palha; amostra B ao colmo desfibrado; amostra C ao colmo desfibrado e prensado e amostra D ao colmo desfibrado, prensado e lavado.

De modo geral, as melhores hidrólises enzimáticas foram obtidas após a aplicação dos coquetéis de *M. thermophilus* crescidos em EC ou SP80-3280. A maior liberação de AR ocorreu com a aplicação dos extratos de MtEC e MtSP80 na hidrólise da variedade RB92579 (1B-1D). Para essa variedade, a aplicação dos extratos TrSCB, TrEC e TrSP80 apresentaram bons resultados, exceto para a palha da cana (1A), cuja liberação de açúcar foi mais baixa que para os extratos de *M. thermophilus*. Já para a variedade RB867515 (2A-2D), o extrato de MtSP80 foi o que apresentou melhor resultado de liberação de AR, independente da amostra utilizada (palha ou colmo da cana-de-açúcar). A melhora dos extratos de *M. thermophilus* na sacarificação das canas-de-açúcar deve-se ao fato da gama de celulases e hemicelulases encontradas nestes coquetéis (**Figura 9**). Sendo assim, pode-se concluir que para as canas comerciais estudadas a maior quantidade de AR foi obtida com os extratos MtEC ( $10,64 \pm 0,64 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) e MtSP80 ( $10,32 \pm 1,53 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) sobre a cana RB92579 (1B e 1D, respectivamente) (**Tabela 32**).

**Tabela 32.** Sacarificação enzimática das canas comerciais utilizadas pela GranBio após aplicação de diferentes coquetéis produzidos por *Mycothermus thermophilus* (Mt) e *Trichoderma reesei* RP698 (Tr) em SCB, EC e SP80.

Variedade	Coquetel enzimático (liberação de AR em $\mu\text{mol/mL}$ )					
	MtSCB	MtEC	MtSP80	TrSCB	TrEC	TrSP80
1 <sup>a</sup> RB92579	1,54 ± 0,04	4,46 ± 0,35	3,02 ± 0,47	0,66 ± 0,15	0,82 ± 0,11	2,04 ± 0,14
1B RB92579	7,83 ± 0,89	7,43 ± 0,60	<b>10,32 ± 1,53</b>	2,05 ± 0,08	<b>6,03 ± 0,39</b>	8,08 ± 0,14
1C RB92579	6,40 ± 0,21	7,11 ± 0,28	<b>7,26 ± 0,78</b>	2,11 ± 0,12	4,90 ± 0,13	6,00 ± 0,14
1D RB92579	<b>9,10 ± 0,57</b>	<b>10,64 ± 0,64</b>	<b>9,80 ± 0,51</b>	<b>9,69 ± 1,31</b>	4,43 ± 0,16	<b>9,81 ± 1,14</b>
2 <sup>a</sup> RB867515	<b>4,61 ± 0,06</b>	<b>5,51 ± 0,52</b>	5,97 ± 0,36	1,99 ± 0,13	1,19 ± 0,08	1,25 ± 0,14
2B RB867515	4,43 ± 0,29	3,60 ± 0,23	<b>6,54 ± 0,79</b>	1,44 ± 0,07	<b>2,91 ± 0,21</b>	2,78 ± 0,14
2C RB867515	2,24 ± 0,06	2,38 ± 0,26	<b>6,46 ± 0,26</b>	<b>2,24 ± 0,05</b>	1,48 ± 0,13	<b>3,41 ± 0,14</b>
2D RB867515	1,97 ± 0,02	3,63 ± 0,68	5,07 ± 0,47	0,89 ± 0,03	1,63 ± 0,07	2,48 ± 0,14

Fonte: Dados da autora.

A **Tabela 33** apresenta os dados de hidrólise das canas energia de tipo I, que apresenta maior teor de açúcar, pelos extratos de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698. Foram estudadas duas variedades de Cana Energia, que passaram pelos mesmos processos das cana-de-açúcar comerciais. Desta maneira, foram utilizadas quatro amostras para Cana Energia.

No entanto, assim como para as comerciais, os coquetéis produzidos por *M. thermophilus* apresentaram melhor capacidade hidrolítica destas canas. Para a variedade Vertex 3 (3A-3D), o extrato de MtSP80 liberou de  $3,56 \pm 0,05$  a  $7,30 \pm 0,30$   $\mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR, sendo que houve uma redução de até 65 % para o mesmo tipo de amostra, ou seja, colmo desfibrado (1B e 3B). Entretanto, para a variedade Vertex 4 (4A-4C), a aplicação de MtSCB possibilitou maior quantidade de AR disponíveis de ( $4,01 \pm 0,20$  a  $6,56 \pm 0,44$   $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ), exceto para a amostra 4D que o melhor resultado foi com MtSP80 ( $4,56 \pm 0,15$   $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ). Com isto, foi possível concluir que para a Cana Energia tipo I a maior quantidade de AR foram obtidos com os hidrolisados sobre o colmo desfibrado, prensado e lavado da Vertex 3 ( $7,30 \pm 0,30$   $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ).

De modo geral, os melhores resultados de sacarificação, após aplicação dos coquetéis em estudo, foram obtidos com as amostras de colmo (B-D). Este fato ocorreu tanto para as canas comerciais, quanto para as canas energia de tipo I. Foi observado que a aplicação de MtSCB e MtEC na cana-de-açúcar RB867515 e Vertex 4 apresentou melhor resultado na amostra de palha, tornando-se um exceção aos demais resultados.

**Tabela 33.** Sacarificação enzimática das canas energia tipo I utilizadas pela GranBio após aplicação de diferentes coquetéis produzidos por *Mycothermus thermophilus* (Mt) e *Trichoderma reesei* RP698 (Tr) em SCB, EC e SP80.

Variedade	Coquetel enzimático (liberação de AR em $\mu\text{mol/mL}$ )					
	MtSCB	MtEC	MtSP80	TrSCB	TrEC	TrSP80
3A Vertix 3	3,54 $\pm$ 0,21	<b>3,71 <math>\pm</math> 0,61</b>	4,93 $\pm$ 0,30	<b>0,81 <math>\pm</math> 0,13</b>	1,12 $\pm$ 0,08	2,42 $\pm$ 0,14
3B Vertix 3	2,03 $\pm$ 0,11	2,65 $\pm$ 0,08	3,56 $\pm$ 0,05	0,39 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,06	<b>2,44 <math>\pm</math> 0,14</b>
3C Vertix 3	1,81 $\pm$ 0,08	2,96 $\pm$ 0,48	4,07 $\pm$ 0,08	0,58 $\pm$ 0,07	0,47 $\pm$ 0,06	1,90 $\pm$ 0,14
3D Vertix 3	<b>4,14 <math>\pm</math> 0,10</b>	2,41 $\pm$ 0,05	<b>7,30 <math>\pm</math> 0,30</b>	0,62 $\pm$ 0,05	<b>1,54 <math>\pm</math> 0,13</b>	2,31 $\pm$ 0,14
4A Vertix 4	<b>6,56 <math>\pm</math> 0,44</b>	<b>6,14 <math>\pm</math> 0,19</b>	2,57 $\pm$ 0,29	1,04 $\pm$ 0,24	1,11 $\pm$ 0,03	2,93 $\pm$ 0,14
4B Vertix 4	4,01 $\pm$ 0,20	3,33 $\pm$ 0,40	3,41 $\pm$ 0,30	1,12 $\pm$ 0,12	1,50 $\pm$ 0,08	2,62 $\pm$ 0,14
4C Vertix 4	4,63 $\pm$ 0,35	2,69 $\pm$ 0,39	<b>5,07 <math>\pm</math> 0,52</b>	<b>1,65 <math>\pm</math> 0,04</b>	1,12 $\pm$ 0,11	<b>3,09 <math>\pm</math> 0,14</b>
4D Vertix 4	1,76 $\pm$ 0,09	4,01 $\pm$ 0,25	4,56 $\pm$ 0,15	1,63 $\pm$ 0,16	<b>2,78 <math>\pm</math> 0,23</b>	2,16 $\pm$ 0,02

Fonte: Dados da autora.

A **Tabela 34** apresenta os resultados da liberação de AR das três canas energias de tipo II após a aplicação dos coquetéis. Desta maneira, o material utilizado para a hidrólise foi a cana integral, não havendo separação entre sua palha e colmo. As canas energia (Vertex 2, Vertex 7 e Vertex 9) passaram por diferentes processos industriais, possibilitando que para cada uma fosse obtida três distintas amostras, sendo elas: amostra E corresponde a cana integral desfibrada; amostra F, cana integral desfibrada e prensada; e amostra G, cana integral desfibrada, prensada e lavada.

Para a Vertex 2 (5E–5G), os melhores resultados foram com MtEC e MtSP80, assim como para a Vertex 7 (6E-6G). Já para a Vertex 9 (7E-7G), houve melhor liberação de AR a partir de TrSP80 (7E e 7G), mesmo com a menor quantidade de enzimas produzidas (**Parte I, Figura 10**), enquanto que para 7F foi o extrato de MtEC. Apesar dos bons resultados obtidos com as canas energias de tipo II, foi possível ver que os coquetéis testados não foram tão eficientes quanto para as canas-de-açúcar comerciais. Desta maneira, fez-se necessários testes com outros coquetéis estudados para aprimorar a hidrólise da parede celular destas canas. Sendo assim, entre três variedades de Cana Energia (Vertex 2, Vertex 7 e Vertex 9) os maiores níveis de AR foram obtidos com a Vertex 9 com a cana integral desfibrada, prensada e lavada (7G) com ambos os coquetéis enzimáticos produzidos a partir do cultivo em cana-de-açúcar SP80-3280 ( $6,81 \pm 0,75$  e  $6,67 \pm 0,27 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR), mas estes níveis não foram significativamente diferentes daqueles observados para a cana integral desfibrada (7E) hidrolisada com MtSCB e TrSP80 ( $6,16 \pm 0,48$  e  $6,75 \pm 0,74 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR) (**Tabela 34**).

Comparando a hidrólise das várias variedades de cana utilizadas pela GranBio foi possível concluir que os maiores níveis foram para a cana comercial RB92579, colmo desfibrado e prensado com o coquetel MtSP80 ( $10,32 \pm 1,53 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR) ou esta mesma cana após lavagem com o coquetel MtEC ( $10,64 \pm 0,64 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR) (**Tabela 32**).

**Tabela 34.** Sacarificação enzimática das canas energia do tipo II utilizadas pela GranBio após aplicação de diferentes coquetéis produzidos por *Mycothermus thermophilus* (Mt) e *Trichoderma reesei* RP698 (Tr) em SCB, EC e SP80.

Variedade	Coquetel enzimático (liberação de AR em $\mu\text{mol/mL}$ )					
	MtSCB	MtEC	MtSP80	TrSCB	TrEC	TrSP80
5E Vertex 2	1,60 $\pm$ 0,23	2,47 $\pm$ 0,11	1,93 $\pm$ 0,06	1,07 $\pm$ 0,07	1,22 $\pm$ 0,05	1,40 $\pm$ 0,18
5F Vertex 2	2,76 $\pm$ 0,33	4,27 $\pm$ 0,16	<b>4,32 <math>\pm</math> 0,27</b>	<b>1,86 <math>\pm</math> 0,21</b>	<b>1,60 <math>\pm</math> 0,03</b>	1,34 $\pm$ 0,14
5G Vertex 2	<b>2,82 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>4,51 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>4,31 <math>\pm</math> 0,26</b>	0,51 $\pm$ 0,09	1,11 $\pm$ 0,10	<b>2,38 <math>\pm</math> 0,10</b>
6E Vertex 7	1,51 $\pm$ 0,06	3,57 $\pm$ 0,08	2,38 $\pm$ 0,25	2,34 $\pm$ 0,13	0,66 $\pm$ 0,12	1,07 $\pm$ 0,03
6F Vertex 7	<b>2,78 <math>\pm</math> 0,11</b>	4,43 $\pm$ 0,17	4,84 $\pm$ 0,27	1,80 $\pm$ 0,20	<b>4,48 <math>\pm</math> 0,17</b>	4,49 $\pm$ 0,33
6G Vertex 7	2,34 $\pm$ 0,15	<b>5,03 <math>\pm</math> 0,31</b>	<b>5,41 <math>\pm</math> 0,12</b>	<b>4,44 <math>\pm</math> 0,09</b>	3,39 $\pm$ 0,09	5,05 $\pm$ 0,26
7E Vertex 9	<b>6,16 <math>\pm</math> 0,48</b>	4,69 $\pm$ 0,12	6,22 $\pm$ 0,37	2,45 $\pm$ 0,23	<b>4,56 <math>\pm</math> 0,52</b>	<b>6,75 <math>\pm</math> 0,74</b>
7F Vertex 9	4,47 $\pm$ 0,11	<b>5,61 <math>\pm</math> 0,12</b>	5,12 $\pm$ 0,26	<b>2,84 <math>\pm</math> 0,10</b>	2,47 $\pm$ 0,06	4,29 $\pm$ 0,19
7G Vertex 9	5,68 $\pm$ 0,41	5,78 $\pm$ 0,46	<b>6,81 <math>\pm</math> 0,75</b>	2,59 $\pm$ 0,15	4,12 $\pm$ 0,01	<b>6,67 <math>\pm</math> 0,27</b>

Fonte: Dados da autora.



#### 4.23. Aplicação do consórcio enzimático obtido do cocultivo de *Mycothermus thermophilus* e *Trichoderma reesei* RP698

Os resultados iniciais de aplicação de coquetéis obtidos por *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 cultivados nas canas (SCB, EC e SP80-3280) utilizadas neste trabalho comprovaram que os microrganismos selecionados para a elaboração do consórcio enzimático apresentaram elevada capacidade hidrolítica, principalmente para material lignocelulósico não tratado previamente. Sendo assim, a próxima etapa foi analisar o potencial de aplicação do coquetel obtido pelo cocultivo dos dois microrganismos crescidos em PM nas diferentes canas fornecidas pela GranBio. Desta maneira, foram testados o coquetel de duas maneiras: (i) antes do processo de caracterização bioquímica do coquetel (**Parte II**); e (ii) após otimização das condições de aplicação (**Parte III**).

A **Tabela 35** apresenta os dados da liberação de AR após a aplicação dos coquetéis nas condições descritas acima. Para as canas comerciais, as condições de hidrólise com o coquetel otimizado foram as mesmas determinadas para a cana-de-açúcar SP80-3280. A amostra de palha de cana-de-açúcar das canas-de-açúcar comerciais que apresentou o melhor resultado foi a 1A, que aumentou 5,9 vezes a liberação de açúcares redutores ( $26,38 \pm 2,46 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR) quando comparado com o coquetel MtEC (**Tabela 32**). Já para a hidrólise de colmo, a melhor sacarificação ocorreu com a amostra de colmo desfibrado, prensado e lavado 1D, em que a liberação de AR alcançou o máximo de  $36,16 \pm 1,20 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de açúcares, um aumento de 3,4 vezes quando comparado pela hidrólise de MtEC (**Tabela 32**).

Para as canas energias (tipo I e II), as condições de hidrólise com o coquetel otimizado foram as mesmas determinadas para EC (**Parte III**). Os melhores resultados de hidrólise das canas energias de tipo I foram a partir do uso de sua palha após aplicação do coquetel otimizado. Para as amostras obtidas a partir de colmo (B – D), houve uma variação em relação a maior liberação de AR, seja para o coquetel otimizado ou não. Entretanto, ainda assim os coquetéis produzidos a partir de PM apresentaram melhor sacarificação do material quando comparado com os coquetéis obtidos a partir do cultivo individual dos fungos em SCB, EC e SP80-3280.

Para as canas energias de tipo II, as amostras de cana integral desfibradas (E)

não apresentaram resultados satisfatórios com a aplicação do coquetel não otimizado, com exceção da Vertix 9 (7E) que liberou  $8,54 \pm 0,69 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR, ou seja um aumento de 1,27 vezes na quantidade liberada de açúcares quando comparado com o coquetel TrSP80. Entretanto, após aplicação do coquetel otimizado, foi possível averiguar maior quantidade de AR disponível, alcançando um valor 2,46 vezes maior que o coquetel não otimizado. Sendo assim, o melhor resultado de sacarificação para este tipo de biomassa ocorreu com a hidrólise da Vertix 9, após desfibrilação, lavagem e prensagem da cana integral.

Com estes resultados, foi possível concluir que a melhor hidrólise ocorreu com a amostra do colmo desfibrado, prensado e lavado da cana comercial RB92579 (1D) ( $36,13 \pm 1,20 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR) após o coquetel obtido pelo cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em PM ser aplicado nas condições padronizadas anteriormente.

Desta maneira, foi comprovado a eficiência deste coquetel nas mais distintas variedades de canas estudadas, mostrando o elevado potencial hidrolítico do mesmo. Além disso, os resultados destas canas utilizadas nas indústrias sucroalcooleiras podem ser aprimorados após pré-tratamento da biomassa, como já foi observado anteriormente (**Parte VI**).

**Tabela 35.** Sacarificação enzimática das canas com maior teor de açúcares utilizadas pela GranBio após aplicação do coquetel obtido pelo cocultivo de *Mycothermus thermophilus* (Mt) e *Trichoderma reesei* RP698 (Tr) em palha de milho (PM).

Biomassa lignocelulósica	Liberação de AR ( $\mu\text{mol/mL}$ )	
	MtTrPM	MtTrPM <sub>OTIM.</sub>
1 <sup>a</sup> RB92579	8,11 $\pm$ 0,46	<b>26,38 <math>\pm</math> 2,46</b>
1B RB92579	14,06 $\pm$ 0,65	21,52 $\pm$ 2,41
1C RB92579	16,33 $\pm$ 0,30	18,65 $\pm$ 1,20
1D RB92579	12,73 $\pm$ 0,54	<b>36,13 <math>\pm</math> 1,20</b>
2 <sup>a</sup> RB867515	8,64 $\pm$ 0,67	20,96 $\pm$ 1,21
2B RB867515	7,95 $\pm$ 0,39	14,24 $\pm$ 0,85
2C RB867515	7,16 $\pm$ 0,68	4,78 $\pm$ 0,51
2D RB867515	4,76 $\pm$ 0,30	11,88 $\pm$ 0,93
3 <sup>a</sup> Vertex 3	4,27 $\pm$ 0,10	<b>14,56 <math>\pm</math> 0,22</b>
3B Vertex 3	5,75 $\pm$ 0,51	13,01 $\pm$ 0,55
3C Vertex 3	3,52 $\pm$ 0,21	5,65 $\pm$ 0,37
3D Vertex 3	9,82 $\pm$ 0,65	12,57 $\pm$ 0,55
4 <sup>a</sup> Vertex 4	9,98 $\pm$ 0,35	<b>14,99 <math>\pm</math> 1,75</b>
4B Vertex 4	4,97 $\pm$ 0,24	8,95 $\pm$ 0,60
4C Vertex 4	4,84 $\pm$ 0,11	11,01 $\pm$ 0,78
4D Vertex 4	6,61 $\pm$ 0,31	11,43 $\pm$ 0,47
5E Vertex 2	1,50 $\pm$ 0,01	8,46 $\pm$ 1,49
5F Vertex 2	6,61 $\pm$ 0,22	<b>13,81 <math>\pm</math> 0,58</b>
5G Vertex 2	6,47 $\pm$ 0,40	10,38 $\pm$ 0,37
6E Vertex 7	2,08 $\pm$ 0,19	7,62 $\pm$ 1,00
6F Vertex 7	8,42 $\pm$ 0,15	<b>14,70 <math>\pm</math> 0,69</b>
6G Vertex 7	7,24 $\pm$ 0,04	12,35 $\pm$ 0,90
7E Vertex 9	8,54 $\pm$ 0,69	21,03 $\pm$ 0,78
7F Vertex 9	10,37 $\pm$ 0,02	15,58 $\pm$ 0,42
7G Vertex 9	6,42 $\pm$ 0,65	<b>27,78 <math>\pm</math> 1,62</b>

Fonte: Dados da autora.

## 5. DISCUSSÃO

A demanda global por alternativas aos combustíveis fósseis vem aumentando, uma vez que há vários acordos mundiais para combater as mudanças climáticas, principalmente na redução da emissão de gases de efeito estufa, nesse sentido o bioetanol é considerado uma alternativa promissora para minimizar tais efeitos (124,125). Dessa forma, por ser um recurso abundante e renovável a biomassa lignocelulósica possui potencial de baixo custo para a produção de combustíveis, já que esta consiste em biopolímeros com alto valor energético (126). Entretanto, é necessária a conversão destes polímeros em açúcares, sendo a tecnologia enzimática considerada como a mais sustentável para a bioconversão da biomassa lignocelulósica em monossacarídeos fermentescíveis (98).

Os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Humicola*, *Mycothermus* (ou *Scytalidium*) e *Trichoderma* são conhecidos por sua capacidade de produzir enzimas responsáveis pela degradação da parede celular das plantas (1,14,15,18,23,104,127–129). Por esta razão, neste estudo foi realizada uma triagem de fungos pertencentes aos gêneros citados para a escolha dos melhores produtores de holocelulases envolvidas na degradação da parede celular de diferentes canas-de-açúcar. Para tal, os microrganismos foram cultivados em diferentes biomassas lignocelulósicas, sendo elas: bagaço de cana-de-açúcar (SCB), colmo de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 e colmo de Cana Energia (EC).

A primeira foi escolhida devido à abundância encontrada nas usinas sucroalcooleiras, uma vez que este resíduo é gerado durante o processo de produção de açúcar e etanol de primeira geração, podendo ser uma mistura de variedades de canas-de-açúcar, como foi o caso de SCB usado neste trabalho.

Já a escolha da cana-de-açúcar SP80-3280 deve-se aos estudos envolvendo sua parede celular e do potencial em se melhorar a compreensão das enzimas necessárias para degradação mesma, como demonstrado por Buckeridge e colaboradores (26,27,35).

Outro ponto relevante foi a escolha da Cana Energia como fonte de estudo. Tew e Cobil (2008) (37) relataram que esta biomassa é conhecida por apresentar capacidade de acúmulo de biomassa, ou seja, foi aprimorada para maximizar o teor de fibras com sua distribuição nas frações de celulose, hemicelulose e lignina, potencializando a produção de açúcares passíveis de serem fermentados, com consequente aumento da produção do etanol 2G. Ademais, este foi o primeiro estudo da sacarificação enzimática utilizando esse tipo de biomassa, o que é bastante

promissor para a produção de etanol de segunda geração.

Dessa forma, entre os microrganismos estudados para produção de holocelulases, os fungos mesofílico, *T. reesei* RP698, e termofílico, *M. thermophilus*, cultivados em SCB e EC, apresentaram os melhores perfis de produção enzimática e, quando comparados com a literatura, produziram elevados níveis de xilanases (XYN) (21,12 a 27,67 U/mL) (129–131); e níveis médios de xiloglucanase (XEG) (0,34 a 0,41 U/mL) (132), endoglucanase (EG) (0,20 a 0,21 U/mL) e celobiohidrolase (CBH) (0,14 a 0,16 U/mL) (133). Devido à variedade de enzimas produzidas por esses microrganismos, os resultados de sacarificação de SCB e de EC apresentaram maior liberação de açúcares redutores (AR) quando comparados aos extratos produzidos pelas espécies de *Aspergillus* e *Humicola*, provavelmente pelo fato de as culturas desses fungos em SCB e EC não favoreceram a produção de holocelulases, como pode ser constatado nas **Tabela 8** e **Tabela 9**.

Tendo em vista o potencial de uso dos extratos brutos de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 para a hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica, foi verificado que os melhores resultados de hidrólise de SCB e EC foram obtidos após aplicação do coquetel obtido com o fungo *M. thermophilus* cultivado em SCB, e também em EC (**Figura 8**). Assim, este microrganismo foi selecionado por seu grande potencial de produzir um consórcio enzimático capaz de hidrolisar de maneira eficiente as biomassas em estudo (**Figura 9**), como já tinha sido previamente descrito por Basotra *et al.* (2016) (15). Assim sendo, estes resultados obtidos podem ser explicados, principalmente, pela composição polissacarídica de SCB e EC, uma vez que elas apresentam baixo teor de lignina e altas quantidades de hemicelulose e celulose (**Tabela 10**), o que pode ter favorecido a produção das holocelulases para a degradação da parede celular vegetal. Franco *et al.* (2013) (123) mostraram que a composição das canas estudadas assemelham-se com a cana-de-açúcar SP80-3280, principalmente pelo teor de celulose e hemicelulose.

Apesar da hidrólise de EC e SCB ter sido de 2 a 3,5 vezes menor quando aplicados os coquetéis de *T. reesei* RP698 cultivado em SCB e EC (**Figura 8**), os extratos produzidos por este fungo foi o segundo melhor na liberação de AR, uma vez que o fungo é conhecido como bom produtor de celulasas, como foi relatado por Li e colaboradores (2017) (14). Além disso, Silva e colaboradores (2020) também relataram o potencial de produção de celulasas pelo mutante *T. reesei* RP698 (4). Por esta razão optou-se também por trabalhar com este microrganismo.

Tendo selecionados os microrganismos *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 como melhores produtores de holocelulases (**Tabela 8** e **Tabela 9**), optou-se por também estudar seus cultivos na cana-de-açúcar SP80-3280 e aplicar os diferentes coquetéis obtidos na sacarificação de SCB, EC e SP80-3280. Os resultados da hidrólise enzimática das diferentes canas-de-açúcar foram interessantes; com o extrato bruto de *M. thermophilus* cultivado em SP80-3280, foi liberado um máximo de:  $4,81 \pm 0,25 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR (SCB) e  $6,10 \pm 0,44 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR (SP80-3280), porém para a hidrólise de EC o melhor extrato foi obtido a partir do cultivo deste microrganismo em SCB, liberando  $4,91 \pm 0,39 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR (**Tabela 11**). A aplicação do extrato bruto de *T. reesei* RP698 apresentou um padrão bem parecido ao de *M. thermophilus*, ou seja, SP80-3280 e SCB foram as melhores fontes de carbono para cultivo do microrganismo. A liberação de AR foi de  $4,73 \pm 0,18 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  (SCB),  $2,20 \pm 0,14 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  (EC) com o extrato de *T. reesei* RP698 cultivado em SP80-3280 e  $4,61 \pm 0,14 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  (SP80-3280) com o coquetel produzido em SCB (**Tabela 11**). Desta maneira, os resultados iniciais foram bastante promissores, quando comparado com a literatura, uma vez que foi obtido maior liberação de AR que Goldbeck *et al.* (2014) (84), que obteve  $1,543 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de açúcar liberado e Lima *et al.* (2016) (20) com  $20 \mu\text{mol}$  de AR/mL/g de biomassa .

A melhor liberação de AR, após aplicação dos coquetéis estudados, pode ser explicada pela gama de holocelulases produzidas por estes fungos (**Figura 9** e **Figura 10**), uma vez que para hidrólise total da holocelulose é necessária a ação de enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico trabalhando sinergicamente (1,23) e os coquetéis obtidos através do cultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 diferem dos encontrados na literatura (20,84,107), uma vez que muitos não apresentam a variedade de enzimas produzidas pelos microrganismo em estudo, como demonstrado ao longo do trabalho. Além da melhor liberação de açúcares (cerca de  $1,5 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR) relatada por Goldbeck e colaboradores (84), a biomassa utilizada pelos autores foi exposta a um pré-tratamento ácido, enquanto que as biomassa usadas até este momento neste estudo não foram expostas a nenhum pré-tratamento. Mesmo sabendo que esta estratégia poderia proporcionar melhor acesso aos componentes da parede celular por enzimas, como relatado por Van Dyk e Pletschke (2012) (22), Srinorakutara *et al.* (2013) (87) e Buckeridge, Grandis e Tavares (2019) (27). Desta maneira, optou-se por não a utilizar até concluir a elaboração e otimização de um coquetel enzimático eficiente.

Após verificar a eficiência dos coquetéis obtidos por *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698, fez-se um estudo para avaliar o perfil de hidrólise com extratos produzidos em diferentes resíduos agroindustriais. Pães e colaboradores (2019) (19) relataram que os coquetéis obtidos pelo cultivo de fungos filamentosos em resíduos agroindustriais apresentam uma grande diversidade de holocelulases em sua composição, mostrando que essa seria uma importante alternativa para produção de enzimas de interesse industrial, já que, muitas vezes, estes resíduos são gerados em grandes quantidades (9) e não são totalmente utilizados nas indústrias como relatado por Ayres *et al.* (2014) (134).

Desta maneira, após a obtenção dos coquetéis pelo cultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 nos diferentes resíduos estudados, sendo eles: bagaço de cevada (BC); casca de café (CC); casca de eucalipto (CE); palha de arroz (PA); palha de feijão (PF); palha de milho (PM); sabugo de milho (SM), foi realizada a hidrólise enzimática de SCB, EC e SP80-3280. A escolha destes resíduos, ocorreu devido ao fato serem considerados como promissoras fontes de carbono para produção de holocelulases por fungos filamentosos de diferentes espécies, como foi relatado por Scarcella *et al.* (135,136) e Pasin *et al.* (137,138). Para os dois microrganismos estudados, os extratos que conferiram os melhores resultados de hidrólise foram aqueles cultivados em PM e SM (**Tabela 12**).

Assim sendo, os extratos que obtiveram os melhores resultados de hidrólise mostraram 3,5 a 4,9 vezes para *M. thermophilus*, e 2,4 a 3,2 vezes para *T. reesei* RP698 maior liberação de AR do que quando comparados aos extratos obtidos a partir microrganismos recombinantes estudados por Goldbeck e colaboradores (2014) (84). Ademais, ao calcular a quantidade de AR liberada pela quantidade de biomassa utilizada, foi possível observar que a maior sacarificação foi de 203  $\mu\text{mol}$  de AR/mL/g de EC após aplicação do extrato bruto de *M. thermophilus* cultivado com PM, seguida de 164,33  $\mu\text{mol}$  de AR/mL/g de SP80-3280 com o coquetel obtido pelo cultivo de *T. reesei* RP698 em PM, apresentando 10,15 e 8,22 mais AR liberado (20  $\mu\text{mol}$  de AR/mL/g de biomassa) do que aqueles demonstrados a partir de um coquetel obtido expressão heteróloga de enzimas fúngicas descrito por Lima e colaboradores (2016) (20). Desta maneira, os resultados mostram a eficiência da degradação da parede celular da cana-de-açúcar pelos extratos enzimáticos brutos de ambos os fungos selvagens mesmo com as biomassas *in natura*, uma vez que as biomassas ainda não tinham sido submetidas a nenhum pré-tratamento, como é comumente visto. Além



disto, estes resultados são provenientes de um coquetel enzimático obtido a partir dos cultivo de fungos selvagens em resíduos agroindustriais, enquanto que os coquetéis utilizados para comparação foram obtidos a partir da expressão heteróloga de enzimas fúngicas (20,84). Esta expressão muitas vezes está associada ao aumento de custo de produção das mesmas, devido à necessidade de fontes indutoras específicas, normalmente de alto custo, o que leva a um maior gasto para a obtenção de etanol 2G, tornando o processo em si menos rentável.

Como as melhores hidrólises enzimáticas das diferentes canas-de-açúcar e Cana Energia ocorreram com os extratos de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 produzidos em palha de milho (PM) e sabugo de milho (SM), foi realizado um estudo do perfil enzimático desses coquetéis, os quais mostraram uma grande quantidade de enzimas presentes (**Tabela 13**). Estes extratos podem ser considerados verdadeiros coquetéis enzimáticos, já que os fungos que crescem nessas diferentes fontes de carbono sintetizam um arsenal de enzimas distintas, uma vez que possuem uma resposta de expressão gênica compatível com o substrato de cultivo. Desta forma, a composição do consórcio enzimático depende da composição de cada substrato e das maquinarias de síntese proteica dos mesmos, ainda que Borin *et al.* (2015) relatem não saber como os microrganismos assimilam essas diferenças entre os substratos utilizados como fonte de carbono (18).

A síntese de proteínas e enzimas responsáveis pela degradação da parede celular da biomassa lignocelulósica já é conhecida para celulasas de *Trichoderma reesei* (14,18,104,139–141). Entretanto, para o *M. thermophilus*, os estudos ainda não estão tão avançados quanto para fungos do gênero *Aspergillus* ou *Trichoderma*, porém já é conhecido o potencial desses microrganismos para a produção de holocelulasas para bioconversão de biomassa lignocelulósica em etanol e outros subprodutos (15). Assim, é sugestivo que para a hidrólise da cana-de-açúcar e, conseqüentemente, a formação de açúcares fermentescíveis, a junção de extratos enzimáticos garante a melhora deste efeito.

Os maiores níveis enzimáticos foram obtidos para o coquetel de *T. reesei* RP698 cultivado no meio suplementado com PM (**Tabela 13**), EG (0,37 U/mL), XYN (40,14 U/mL) e XEG (2,20 U/mL). O coquetel obtido a partir do cultivo deste fungo em PM consistiu em altas atividades de XYN e XEG (130–132); níveis médios de EG e CBH (18,133). Entretanto, as atividades de ARF, BXI, AXE, ARA e BGL não foram detectadas, ou os níveis encontrados foram muito baixos. Com isso, foi possível

verificar através dos resultados de hidrólises das diferentes biomassas que as atividades da ARA, ARF, AXE e BXI não são as mais importantes para a degradação da parede celular vegetal, apesar de possuírem certo potencial na sacarificação da cana-de-açúcar como foi reportado por de Souza *et al.* (2013) (26) e Buckeridge, Grandis e Tavares (2019) (27). Ao analisar as atividades enzimáticas do extrato bruto de *M. thermophilus* crescido em PM como única fonte de carbono, verificou-se que os níveis foram inferiores ao de *T. reesei* RP698, exceto para CBH, BGL, ARA e AXE (**Tabela 13**). Embora os níveis enzimáticos tenham sido menores, houve uma melhor ação das enzimas para a degradação da parede celular da cana, provavelmente, devido ao maior sinergismo entre elas.

Coquetéis produzidos a partir do cultivo de fungos em resíduo agroindustrial podem induzir a produção de diversas celulasas e hemicelulasas requeridas para uma hidrólise efetiva da biomassa lignocelulósica. Dessa forma, a utilização dos extratos brutos resultam em uma hidrólise mais eficiente da cana-de-açúcar (2,4 a 4,5 vezes maior) do que quando comparados aos coquetéis compostos por algumas enzimas, como relatado anteriormente por Giese *et al.* (2013) (107) que testaram a hidrólise somente com celulasas ou como descrito por Goldbeck *et al.* (2014) (84), que utilizaram coquetel enzimático contendo apenas xilanases,  $\beta$ -xilosidases e arabinofuranosidases expressas em *E. coli* ou *A. nidulans*. Sendo que este último, acrescentou uma etapa de purificação das proteínas de interesse, que pode influenciar no valor do produto final.

Apesar do coquetel obtido por *T. reesei* RP698 crescido em SP80-3280 apresentar dados de hidrólise bem próximos à capacidade dos demais coquetéis produzidos a partir dos outros resíduos estudados, observou-se que o consórcio enzimático de *M. thermophilus* produzido em PM e SM (**Tabela 12**) resultou em uma eficiência maior na hidrólise das biomassas testadas do que os coquetéis produzidos a partir de alguma cana (**Tabela 11**). Por esta razão, foram escolhidas PM e SM como fontes de carbono para o cocultivo, uma vez que apresentaram os melhores resultados de liberação de AR (**Tabela 12**). Esta diferença de hidrólise das canas a partir dos extratos obtidos a partir do cultivo nos diferentes resíduos, pode ter ocorrido pela maior produção de enzimas, tanto em variedade quanto em nível de atividade enzimática. Ademais, Pointner *et al.* (2014) mostraram que a análise composicional do sabugo de milho consiste em 38,8% de celulose e 44,4% de hemicelulose (142), ao passo que Song e colaboradores (2014) relataram que a palha de milho apresenta

em sua composição maior quantidade de celulose (49,3%) quando comparado com as canas estudadas (**Tabela 10**), porém a quantidade de hemicelulose é menor (28,8%) (143). Estas pequenas diferenças na composição podem afetar negativamente a indução das enzimas de interesse. Devido a essas divergências na composição e ao fato do cultivo em PM e SM terem apresentado os melhores resultados, foi descartado o cocultivo com SP80-3280 como única fonte de carbono para dar continuidade ao trabalho de elaboração do consórcio enzimático.

Sendo assim, foi realizado o cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em PM e SM para averiguar os resultados da sacarificação da cana-de-açúcar e da Cana Energia a partir do consórcio enzimático obtido. A estratégia de cocultivo possibilita a produção de enzimas de interesse por dois ou mais fungos cultivados juntos, podendo ser obtido um coquetel com maior quantidade de enzimas alvo. Não há muitos estudos abordando esta estratégia, porém Kumar *et al.* (2016) (144) e Metreveli *et al.* (2017) (145) mostraram que o cocultivo pode ser eficiente para obtenção de xilanases e celulases. Dentre as barreiras para que a metodologia seja executada com êxito, uma que merece bastante destaque é a otimização do cultivo de microrganismos com temperatura ótima de crescimento distintas, como os selecionados neste trabalho (*M. thermophilus*, termofílico e *T. reesei* RP698, mesofílico). Para tal, fez-se necessário um estudo para averiguar a taxa de crescimento em diferentes temperaturas (**Tabela 14**). Outro aspecto que merece ser pontuado é a necessidade de ensaios de confronto entre os microrganismos, já que para o sucesso dessa estratégia os fungos não podem produzir compostos que inibam o crescimento conjunto, como foi observado na **Figura 11**, em que foi possível ver que os microrganismos podem crescer concomitantemente, uma vez que não houve inibição entre eles.

Em geral, o coquetel obtido do cocultivo apresentou uma liberação de AR significativamente maior quando comparada às culturas individuais ( $P < 0,01$ ) (**Tabela 15**). A melhor sacarificação foi obtida com o extrato produzido pelo cocultivo em PM a 35 °C. Houve melhora de 1,75 vezes na liberação de AR com este extrato para a hidrólise da EC ( $12,11 \pm 0,46 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ) quando comparado ao extrato de *M. thermophilus* ( $6,93 \pm 0,75 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ) produzido a partir do meio suplementado com o mesmo resíduo (PM) e 5,22 vezes maior que o de *T. reesei* RP698 com PM ( $2,32 \pm 0,25 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ) (**Tabela 12**). Este resultado mostrou-se bastante promissor, uma vez que quando calculada a liberação AR pela quantidade de biomassa utilizada, houve

uma liberação de 403,67  $\mu\text{mol}$  de AR/mL/g de EC. Esses dados são 20,18 vezes maiores (20  $\mu\text{mol}$  de AR/mL/g de bagaço) que os obtidos por Lima e colaboradores (2016) (20) a partir do cocultivo de linhagens recombinantes de *A. nidulans* com potencial de produção de arabinanase, arabinofuranosidase, xilanase e xiloglucanase.

O segundo melhor resultado de liberação de AR foi da cana-de-açúcar SP80-3280, em que foram obtidos  $9,27 \pm 0,49 \mu\text{mol mL}^{-1}$  de AR liberados (**Tabela 15**), melhorando 1,71 vezes para *M. thermophilus* e 5,90 vezes para *T. reesei* RP698, quando comparados com os cultivos individuais nos mesmos resíduos. Para SCB, a maior quantidade AR foi obtida quando aplicado o extrato produzido pelo cocultivo em SM a 40 °C ( $7,87 \pm 0,10 \mu\text{mol mL}^{-1}$  AR) (**Tabela 15**), aumentado 1,68 vezes a hidrólise em relação a *M. thermophilus* em SM e 2,09 vezes melhor que *T. reesei* RP698 no mesmo resíduo. Embora o extrato de SM a 40 °C tenha apresentado o melhor resultado para SCB, não houve diferença significativa ( $P > 0,01$ ) entre a hidrólise enzimática com o coquetel deste cocultivo e com o cocultivo em PM a 35 °C. O pior resultado foi com PM a 40 °C para SCB e EC, sendo que para SCB houve menor liberação de AR quando comparado à hidrólise individual de fungos (**Tabela 12**).

A produção enzimática a partir do cocultivo dos microrganismos em PM e SM apresentaram os melhores resultados de hidrólise da cana. Além disso, enzimas que não foram produzidas anteriormente nos cultivos individuais, como BXI, ARF e AXE, foram observadas no cocultivo. Além disso, as atividades de XYN, XEG e EG foram superiores às encontradas na literatura (18,131,132). O melhoramento da sacarificação de cana-de-açúcar (em PM a 35 °C) a partir do cocultivo entre *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 pode ser explicado por uma possível melhora de sinergismo entre as enzimas, uma vez que houve uma melhora na atividade de holocelulases, mesmo que os níveis enzimáticos, em sua maioria, não sejam mais altos quando comparados aos cultivos individuais.

Após ter selecionado o coquetel obtido pelo cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em PM como o melhor para a sacarificação das diferentes canas estudadas, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) (**Figura 12**) e as análises termogravimétricas (TGA) (**Figura 13**) dos materiais *in natura* e hidrolisados. Optou-se por realizar estas análises com objetivo de averiguar e confirmar o efeito do coquetel na degradação das biomassas lignocelulósicas. A MEV e TGA, após aplicação do coquetel enzimático, comprovaram o efeito na desconstrução da parede celular, tornando as fibras mais desorganizadas.

Michelin e Teixeira (2016) (91) mostraram que a MEV é uma importante técnica de análise, uma vez que por meio desta é possível analisar as características morfológicas do material lignocelulósico, como também foi observado por Saha e colaboradores (2018) (93). Michelin e Teixeira (2016) utilizaram a TGA para investigar as propriedades fundamentais da lignocelulose e obtiveram resultados bastante satisfatórios para diferentes biomassas estudadas (91), assim como Lima e colaboradores (2016) (20), que também analisaram o material da cana-de-açúcar parcialmente hidrolisado pelo coquetel recombinante estudado. As análises realizadas neste trabalho mostraram o efeito do coquetel nas fibras, uma vez que pela MEV foi possível observar um efeito de desfibrilação das canas, assim como redução dos componentes da parede analisados pela TGA. Estes resultados estão de acordo com os obtidos e apresentados por Lima e colaboradores (2016) (20), Michelin e Teixeira (2016) e Saha e colaboradores (2018) (93).

Além dos estudos de diferentes pré-tratamentos das biomassas, a otimização da sacarificação enzimática deve ser estudada com o intuito de aumentar a eficiência do coquetel. Embora já existam produções em escala comercial de etanol de segunda geração (2G), como é o caso das empresas GranBio (São Miguel dos Campos – AL) e Raízen (Piracicaba - SP), é preciso concentrar esforços na otimização de processos como foi demonstrado por Arias *et al.* (2016) (146), Pratto *et al.* (2016) (147), Jung *et al.* (2017) (148) e Tasselli *et al.* (2019) (149). Com isso, após seleção das melhores condições de obtenção do coquetel a partir do cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em PM a 35 °C, foi realizado o escalonamento para biorreator BioFlo 310 com capacidade de trabalho de 5 L. O coquetel obtido foi aplicado nos três tipos de canas estudadas e foram testadas diferentes variáveis: temperatura, pH, concentração proteica do coquetel, tempo de hidrólise, carga de sólidos e o efeito de surfactantes.

Para todas as canas (SCB, EC e SP80-3280), a temperatura para hidrólise foi de 50 °C, sendo o melhor resultado obtido a partir da sacarificação de SP80-3280 ( $12,81 \pm 0,83 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR), seguida por EC ( $12,05 \pm 0,66 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR) e SCB ( $8,70 \pm 0,56 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR) (**Figura 17**). Estes dados correspondem a um aumento de 1,38 vezes de AR liberados para SP80-3280 e 1,20 vezes mais para SCB quando comparadas com a aplicação do coquetel obtido a partir do cultivo em frascos Erlenmeyers de 250 mL (**Tabela 15**). A temperatura de 50 °C determinada nos experimentos está de acordo a descrita para a maioria dos coquetéis e enzimas associados a hidrólise de biomassa lignocelulósica como foi mostrado nos

experimentos realizados por Goldbeck *et al.* (2016) (51), Arias *et al.* (2016) (146) e Tasselli *et al.* (2019) (149). Apesar da melhor temperatura de ação do coquetel ter sido 50 °C, é possível trabalhar na faixa de 40 a 55 °C, uma vez que o coquetel apresentou bons resultados de sacarificação na faixa citada.

Com a temperatura de aplicação do coquetel determinada (50 °C), foi testado o efeito de diferentes pH na liberação de AR. Para SCB e SP80-3280 foi determinado que o melhor pH de hidrólise é 4,0, enquanto que para EC é 4,5, mostrando um aumento significativo de AR liberados quando comparado com o pH 5,0, que foi o pH inicial escolhido para estudo da sacarificação (**Figura 17**). Martini e colaboradores (2016) (96) relataram que pH mais baixos (ácidos) prejudicam o crescimento das leveduras responsáveis pela fermentação dos açúcares em etanol, principal alvo quando se pensa no processo em escala industrial. Perna, Bastos e Ceccatto-Antonini (2018) corroboraram com esta afirmação, uma vez que houve inibição do crescimento da levedura *Meyerozyma guilliermondi* em pH 3,5 (150). Sendo assim, não foram testados pH de hidrólise menores que 4,0. Além disso, os coquetéis comerciais disponíveis no mercado, normalmente, apresentam melhores resultados em pH 5,0 (91,149). O mesmo ocorre para muitas das enzimas não comerciais utilizadas na hidrólise de biomassa lignocelulósica (20,51,84). Apesar do pH de hidrólise para cada biomassa lignocelulósica apresentar diferença, é importante mostrar que este coquetel pode ser aplicado em uma faixa de pH entre 4,0 e 5,0, já que apresentou uma boa sacarificação das canas estudadas nestas condições.

Decorridas as análises de hidrólise de SCB, EC e SP80-3280 em função de diferentes temperaturas e pH, e estabelecidas as condições de trabalho, avaliou-se o aumento da carga proteica do coquetel para os ensaios. Para tanto, o coquetel foi concentrado 30 vezes. Optou-se por trabalhar com carga proteica e, não pela aplicação de FPases, como foi padronizado nos experimentos realizados por Hernández-Beltrán *et al.* (2018) (151), Tasselli *et al.* (2019) (149) e Xu *et al.* (2019) (152), devido ao fato do coquetel também apresentar hemicelulases, sendo assim, foi possível manter um padrão para aplicação de proteínas e não em relação a uma enzima específica.

Inicialmente, foi aplicado 1 mg de proteína presente no coquetel, por mg de biomassa a ser hidrolisada. Os ensaios realizados mostraram a necessidade do aumento dessa concentração para uma maior eficiência. Para tal, houve a necessidade de aplicar 12 a 15 vezes mais proteínas, sendo que não houve diferença

significativa ( $P > 0,01$ ) entre essas concentrações. Sendo assim, optou-se por trabalhar com uma menor concentração de proteínas, ou seja, 12 mg de proteína por mg de biomassa, que liberou  $24,82 \pm 1,58 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR (SCB),  $26,30 \pm 0,47 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR (EC) e  $22,89 \pm 0,46 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR (SP80-3280) (**Figura 17**). Esses resultados eram esperados, uma vez que Valadares *et al.* (2016) relataram que experimentos com diferentes cargas enzimáticas mostraram que a eficiência da hidrólise depende do nível de atividade da enzima (153) e com o aumento da carga proteica, conseqüentemente, há o aumento das atividades enzimáticas.

Após determinadas as condições de temperatura, pH e concentração proteica do coquetel, foi analisada o tempo de aplicação do coquetel, mostrando que para a hidrólise de cada cana estudada, foi preciso um diferente tempo de aplicação do coquetel, variando de 24 a 96 horas (**Figura 18**). Com os tempos de aplicação determinados, foi estudada a carga de sólidos, em que foi observado o aumento da sacarificação com o aumento da quantidade de biomassa, fato já esperado e, assim, comprovado pelos dados obtidos e de acordo com os dados na literatura (148,151,152,154). Para EC ( $30,33 \pm 1,39 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR) e SP80-3280 ( $33,18 \pm 1,04 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR), o ideal é trabalhar com uma carga de 3% de sólidos, enquanto que para SCB seria 4% ( $40,40 \pm 2,39 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  de AR) (**Figura 18**).

Ramos *et al.* (2015) relataram que o aumento da carga de sólidos possibilita uma melhora de hidrólise das biomassas lignocelulósicas (95), fato que foi confirmado por Hernández-Beltrán *et al.* (2018) (151) e corroborando com os resultados demonstrados neste trabalho. Devido à elevada carga proteica necessária para hidrólise do material, não foi possível analisar maiores taxas de SCB, uma vez que o volume necessário do coquetel ultrapassaria o volume final da reação fixado em 1 mL, já que o consórcio enzimático apresentou  $5,54 \text{ mg de proteína.mL}^{-1}$ , quantidade bastante inferior à de coquetéis comerciais, como o Cellic Ctec2 da Novozymes, utilizado nos experimentos de hidrólise de Baral e colaboradores (2019) (155). Desta maneira, para analisar maior porcentagem desta biomassa, seria necessário estudo de escalonamento de produção do coquetel em processo industrial, ou seja, em tanques de maiores volumes.

Com todas as principais variáveis para aplicação do coquetel determinadas, foi estudado o efeito de surfactantes nas liberação de AR, uma vez que Van Dyk e Pletschke (2012) (22) e Wang e colaboradores (2018) (156) relataram que o uso de surfactantes durante a hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica pode prevenir

a adsorção produtiva de enzimas ao seu substrato. Para as três canas estudadas, foi observado o mesmo efeito negativo após adição de surfactantes não-iônicos na sacarificação enzimática das mesmas, sendo esses dados bastante interessantes.

Menon, Prakash e Rao (201) (62) mostraram que a utilização de surfactantes está relacionada ao aumento da eficiência do coquetel enzimático na hidrólise do material vegetal, sendo esta afirmação comprovada pelos experimentos realizados por Giese (2013) (107), efeito contrário ao observado nos experimentos de hidrólise das canas SCB, EC e SP80-3280 (**Figura 18**). Isto ocorreu, provavelmente, devido a algum efeito inibitório das enzimas presentes no coquetel pelo uso dos surfactantes testados. Para afirmar esta teoria, seria necessário estudar a ação dos surfactantes nas enzimas purificadas. Entretanto, tal processo acarretaria maior custo de produção das proteínas de interesse. Além disso, muitas vezes as enzimas purificadas podem atuar de maneira diferentes quando presentes em extratos brutos. Assim sendo, a utilização destes com o coquetel otimizado não é recomendada por causa da redução da sacarificação das canas estudadas, mesmo com muitos estudos afirmando a importância dos surfactantes na eficiência dos coquetéis enzimáticos (22,62,156,157).

Deste modo, foi possível concluir que apesar das biomassas lignocelulósicas estudadas para hidrólise pertencerem a mesma classe de gramíneas (Monocotiledônea), foi possível observar que as diferenças composicionais das mesmas (**Tabela 10**) influenciaram no efeito do coquetel durante a caracterização bioquímica do mesmo (**Figura 17** e **Figura 18**). A diferença entre as canas foi comprovada pela análise da composição dos monossacarídeos da parede celular, que pertencem fração da hemicelulose, visto que apesar de possuírem os mesmos monossacarídeos em sua composição, há divergências na quantidade entre as canas estudadas (**Tabela 29**), o que pode influenciar na recalcitrância da biomassa, uma vez que o complexo lignina-carboidrato é composto por ligações que interligam lignina, celulose e hemicelulose, como foi descrito por Buckeridge, Grandis e Tavares (2019) (27).

Há maior diferença entre as canas SCB (mistura de variedades) e SP80-3280 com a EC, provavelmente pelo fato de as duas primeiras serem canas comerciais utilizadas na indústria sucroalcooleira para a produção de açúcar e etanol de primeira geração (1G), enquanto que a EC é uma cana com potencial de acúmulo de biomassa, em que toda composição polissacarídica e lignina são alteradas, o que pode resultar em diferença na recalcitrância da mesma.



A eficiência da sacarificação das biomassas estudadas ocorreu pela alta variedade de enzimas presentes no coquetel (**Figura 14**), já que Segato *et al.* (2014) (23) e Pasin *et al.* (2020) (9) relataram ser de suma importância a presença de diferentes celulases e hemicelulases para a completa degradação de parede celular vegetal. A secreção de proteínas envolvidas na degradação da parede celular pode estar relacionada a uma expressão gênica diferencial em função da composição da parede celular de PM pelo cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 neste resíduo.

Após a caracterização das condições de aplicação do coquetel elaborado, foram analisados os hidrolisados de SCB, EC e SP80-3280 por Cromatografia em Camada Delgada. Esta análise permitiu avaliar qualitativamente os açúcares presentes nos hidrolisados (glucose e xilose, **Figura 19**) e, se os mesmos poderiam ser assimilados por leveduras para a produção de etanol. Reis e colaboradores (2018) mostraram que a glucose pode ser utilizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 (158), enquanto que Perna, Basto e Ceccato-Antonini (2018) demonstraram o uso de pentoses pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* para a produção de etanol (150). Através destes resultados foi possível observar que as condições de hidrólise para SCB ainda poderiam ser aprimoradas, uma vez que houve o aparecimento de bandas que não correspondem aos padrões de glucose, xilose, celobiose e xilobiose usados. Provavelmente, isto ocorreu para essa biomassa devido ao fato de SCB ser uma mistura de diferentes variedades cultivadas na Usina da Pedra (Serrana – SP) (**Tabela 6**), além de uma possível hidrólise incompleta dos polissacarídeos pelas enzimas.

Para melhor compreensão do padrão de hidrólise de cada biomassa, foi realizada uma análise do secretoma de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 cultivado em diferentes biomassas. Este tipo de análise tem sido uma estratégia bastante utilizada (16–19), pois através dela é possível decifrar e compreender quais as proteínas podem estar envolvidas no processo de degradação da biomassa lignocelulósica.

O secretoma foi obtido pelo cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em PM, no biorreator BioFlo 310, nas condições padronizadas para aplicação do coquetel, durante 5 dias de cultivo. Este coquetel apresentou a maioria das enzimas requeridas para a degradação da parede celular da cana-de-açúcar (1,9,23,26,27), incluindo várias glicosil hidrolases (GH) e carboidrato esterases (CE), como era esperado

devido à complexidade da biomassa utilizada (**Tabela 18**). Além dessas proteínas, foram secretadas monooxigenases (LPMOs) (**Tabela 18**) que são responsáveis pela degradação oxidativa da celulose (159,160). Não foram identificadas lacases, o que era esperado, uma vez que estes microrganismos não são conhecidos como clássicos produtores de ligninases e, sim, os basidiomicetos (113,161). Nesta condição, foram identificadas 27 proteínas associadas à degradação da biomassa lignocelulósica, sendo duas  $\beta$ -glucosidases (GH1 e GH3); doze celulases (GH5, GH6, GH7 e GH45); cinco xilanases (GH10 e GH11); uma endo- $\beta$ -1,6-galactanase (GH30); uma  $\beta$ -galactosidase (GH35); uma xiloglucanase (família não identificada); uma acetil xilana esterase (CE5); uma 4-O-metil glucurônico metil esterase (CE15) e duas LPMOs (AA9) (**Tabela 19**).

Prosseguindo as análises, fez-se uma divisão didática, em que todas as enzimas foram analisadas individualmente dentro dos seus respectivos grupos: celulases, hemicelulases e pectinases.

O consórcio enzimático apresentou duas celulases pertencente a GH5, que é o maior e mais funcional grupo, sendo que as enzimas relacionadas com a subfamília GH5\_5 apresentam atividade de endo- $\beta$ -1,4-glucanase (162). Três celulases da família GH6 e sete celulases GH7, sendo que estas podem ser divididas em celobiohidrolases (CBHs) e endoglucanases (EGs), com base no modo de ação na celulose (23,133,163,164). Uma endoglucanase GH45, que assim como as demais celulases clivam as ligações internas da molécula de celulose, produzindo celobiose (23). Dentre as  $\beta$ -glucosidases, foram identificadas duas pertencentes à família GH1 e GH3. As  $\beta$ -glucosidases são conhecidas por desempenharem um papel de catálise da hidrólise da celobiose e das celodextrinas em glucose (5,23), sendo as enzimas pertencentes à família GH1 as mais conhecidas pela tolerância à altas concentrações de glucose (5,165), enquanto que muitas GH3 são conhecidas por sua bifuncionalidade, ou seja podem atuar como  $\beta$ -glucosidases e  $\beta$ -xilosidases (166). Ademais, foram identificadas também três monooxigenases, que são conhecidas por clivar a cadeia de celulose por meio de um processo oxidativo de C-1, C-4 e C-6 (23,159).

Dentre as xilanases secretadas, foram identificadas três pertencentes a família GH10 e duas GH11. A família GH10 consiste em endo-1,4- $\beta$ -xilanases e endo- $\beta$ -1,3-xilanases, entretanto estudos sobre as especificidades do substrato revelaram que elas podem não ser altamente específicas para a xilana e também podem ter atividade

em substratos de celulose de baixo peso molecular (54). Já a família GH11, apresentou apenas endo- $\beta$ -1,4-xilanases que são consideradas como verdadeiras xilanases, uma vez que são exclusivamente ativas em substratos contendo xilose (54,129).

Neste secretoma foram identificadas duas proteínas pertencentes as carboidrato esterases, sendo uma acetil xilana esterase (CE5) e uma 4-O-metil glucurônico metil esterase (CE15). As acetil xilana esterases (CE5) removem os substituintes O-acetil a partir da posição C-2 dos resíduos de xilose na acetilxilana e xilooligossacarídeos (167). A 4-O-metil glucurônico metil esterase (CE15), é uma proteína que deve ter um destaque, pois até o momento não tinha sido descrita para os microrganismos estudados.

O complexo lignina-carboidrato possui ligações covalentes entre lignina e hemicelulose nas paredes celulares das plantas, sendo este responsável, em parte, pela recalcitrância de resíduos lignocelulósicos (27,168). Estas ligações impedem a separação de lignina, hemicelulose e celulose dificultando o uso destes para aplicações industriais, como a produção de bioetanol. Monrad e colaboradores (2018) relataram a importância das glucuronil esterases, uma vez que estas promovem a separação de lignina, hemicelulose e celulose, fator crucial para a utilização eficiente da biomassa (168). Isto pode ocorrer, devido ao fato destas enzimas serem capazes de direcionar as ligações éster entre as porções de lignina e os grupos laterais de ácido glucurônico da xilana (168,169), possibilitando maior acessibilidade das enzimas hidrolíticas ao substrato e, conseqüentemente, maior liberação de açúcares.

Além dessas enzimas relatadas, foi identificada uma xiloglucanase, entretanto não foi identificada a família a qual esta enzima pertence. Estas enzimas apresentam elevada importância para o aumento da eficiência hidrolítica, uma que as xiloglucanases são as enzimas responsáveis pela clivagem do xiloglucano em polímeros de glucose não ramificados, embora apresentem mecanismos distintos entre as diferentes famílias de glicosil hidrolases (23,132).

Dentre as enzimas envolvidas na degradação da pectina, foi identificada uma endo- $\beta$ -1,6-galactanase pertencente à família GH30, que reconhece especificamente  $\beta$ -1,6-galactano de arabinogalactano e libera galactose e galactooligômeros ligados a  $\beta$ -1,6 com um grau de polimerização de dois a cinco (170,171). Além disso, uma  $\beta$ -galactosidase da família GH35 foi identificada. As enzimas pertencentes à esta família hidrolisam resíduos de  $\beta$ -1,4-galactosil ligados a L-ramnose do ramnogalacturonano

de tipo I, além de sintéticos como p-nitrofenil-p-D-galactopiranosose e oligossacarídeos que possuem resíduos de  $\beta$ -D-galactosil nas extremidades não redutoras, como a lactose (77).

Os dados do secretoma do cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em PM (**Tabela 18**) somado aos dados das atividades enzimáticas (**Figura 14**), mostram que o coquetel obtido apresenta as enzimas necessárias para a degradação de cana-de-açúcar, como fora proposto por de Souza *et al.* (2013) (26) e Buckeridge, Grandis e Tavares (2019) (27), além do aparecimento de três enzimas que não tinham sido identificadas para esses fungos, a endo-beta-1,6-galactanase (GH30), a 4-O-metil glucurônico metil esterase (CE15) e a monooxigenase (AA9) (**Tabela 18**). Estes resultados reforçam a importância do estudo individual de cada holocelulase e do sinergismo entre elas, já que a compreensão da ação de enzimas como AA9 e CE15 ainda se faz necessário. Contudo, os dados gerados neste trabalho possibilitam um avanço no entendimento do papel de cada holocelulase na degradação da biomassa.

Portanto, a análise sistêmica dos secretomas, junto aos ensaios de sacarificação das biomassas lignocelulósicas, é um estudo fundamental que permite o reconhecimento de proteínas pouco conhecidas, como a 4-O-metil glucurônico metil esterase, além de permitir uma visão geral do papel de diferentes enzimas no processo de degradação da parede celular vegetal.

Com todas essas informações em mãos e com o objetivo de elaborar um modelo de degradação da parede celular da cana-de-açúcar e da Cana Energia a partir dos dados gerados neste trabalho, também foram analisadas as proteínas secretadas por *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em cultivos únicos e cocultivo dos mesmos. Para tal, os microrganismos foram cultivados em diferentes fontes de carbono, sendo elas: glucose (controle), EC e cana-de-açúcar SP80-3280, visto que essas informações também são de suma importância para o projeto subsidiado pelo INCT ao qual este trabalho está vinculado. Após análise dos perfis de secreção de proteínas nas condições estudadas, foi possível compreender melhor a ação dos coquetéis na hidrólise de SCB, EC e SP80-3280. Neste estudo optou-se, inicialmente, pela utilização dos coquetéis obtidos no quinto dia de cultivo.

O coquetel de *M. thermophilus* crescido em SP80-3280 apresentou seis celulasas, divididas entre as famílias GH5, GH6 e GH7; cinco xilanase (GH10 e GH11); uma xiloglucanase (sem família identificada); duas enzimas relacionadas com a degradação de pectina (GH53 e PL4); duas 4-O-metil glucurônico metil esterases

(CE15) e uma monooxigenase (AA9), apresentando uma parte das enzimas necessárias para a degradação desta biomassa, como proposto por de Souza *et al.* (2013) (26) e Buckeridge, Grandis e Tavares (2019) (27). Não foram identificadas  $\beta$ -glucosidases (BGL) e  $\beta$ -xilosidases (BXI) neste extrato, entretanto BGL teve sua atividade detectada pelo método de dosagem utilizado. Além disso, foi identificada uma ácido celobiônico fosforilase (GH94) que foi descrita como uma enzima que atua na degradação oxidativa de celulose por Nihira *et al.* (69), o que pode justificar os bons resultados de hidrólise obtidos. A não identificação das BGL e BXI pode ter ocorrido pela presença de proteases secretadas (dados não mostrados).

Em contrapartida, o coquetel obtido pelo cultivo de *T. reesei* em SP80-3280 apresentou mais enzimas em sua composição, sendo elas: quatro celulasas (GH5, GH6 e GH7); uma glucano endo- $\beta$ -1,3-glucosidase (GH55); duas xilanases (GH10 e GH11); uma arabinofuranosidase/ $\beta$ -xilosidase (GH54); uma  $\alpha$ -glucuronidase (GH67); uma ácido celobiônico fosforilase (GH94); uma xiloglucanase (família não identificada); uma endo- $\beta$ -1,6-glucanase (GH30); uma manana endo-1,4-beta-manosidase (GH5); uma acetil xilana esterase (CE5); uma 4-O-metil glucurônico metil esterase (CE15); uma acetil esterase (CE16); duas lacases (AA1 e família não identificada) e uma monooxigenase (AA9). Este último coquetel é mais próximo ao proposto por Souza *et al.* (26) e Buckeridge e colaboradores (27).

O extrato de *M. thermophilus* em EC consistiu em oito celulasas (GH5, GH6, GH7 e GH45); seis xilanases (GH10 e GH11); uma endo- $\beta$ -1,4-galactanase (GH53); uma ácido celobiônico fosforilase (GH94); uma xiloglucanase (família não identificada); e uma 4-O-metil glucurônico esterase (CE15). O coquetel obtido a partir de SP80-3280 é muito similar ao de EC, diferenciando-se somente pela identificação de uma monooxigenase (AA9) e um ramnogalacturonase (PL4).

Já o coquetel obtido a partir do cocultivo em EC apresentou dez celulasas (GH5, GH6 e GH7); sete xilanases (GH10 e GH11); uma xiloglucanase (sem família identificada); duas endo- $\beta$ -1,4-galactanasas (GH30 e GH53); uma arabinofuranosidase/ $\beta$ -xilosidase (GH54); uma  $\alpha$ -glucuronidase (GH67); uma acetil xilana esterase (CE5); duas 4-O-metil glucurônico metil esterases (CE15) e duas monooxigenases (AA9); e uma ramnogalacturonano liase (PL4). Não foram identificadas  $\beta$ -glucosidases no coquetel, porém foi detectada uma baixa atividade no extrato (**Tabela 23**). A ausência destas enzimas ou a baixa atividade das mesmas pode prejudicar a eficiência do consórcio enzimático, uma vez que já é bastante

conhecida sua importância no processo de degradação da celulose (5,23,165,172,173). Ademais, duas enzimas (ácido celobiônico fosforilase e 4-O-metil glucurônico metil esterases) que não tinham tido sua importância relatadas por de Souza *et al.* (2013) (26) e Buckeridge, Grandis e Tavares (2019) (27) foram detectadas no coquetel, as mesmas obtidas pelo cocultivo de *T. reesei* RP698 e *M. thermophilus* em PM (CE15 e AA9). O perfil das proteínas secretadas pelo cocultivo em SP80-3280 difere um pouco do já descrito para EC, pela ausência da  $\alpha$ -glucuronidase (GH67); 4-O-metil glucurônico esterase (CE15) e a presença de outra endoglucanase pertencente à família GH45, reforçando a importância de ação de algumas enzimas que se mantiveram nos dois extratos (**Figura 22**).

Os perfis de proteínas secretadas pelos fungos estudados nestas condições foram bastante semelhantes aos encontrados na literatura com o *A. niger*, *T. reesei*, e outros fungos cultivados em diferentes biomassas lignocelulósicas (16–19). Entretanto, neste trabalho foram identificadas proteínas que não tinham sido identificadas em tais estudos, como por exemplo, a ácido celobiônico fosforilase (GH94), a 4-O-metil glucurônico metil esterase (CE15), ramnogalacturonase (PL4) e as ligninases (AA1). O secretoma de *M. thermophilus* cultivado em celulose, farelo de trigo e palha de arroz (proporção 3:1:1), assim como para *T. reesei* não apresenta relatos de GH94 e PL4 identificadas, entretanto foi identificada a 4-O-metil glucurônico metil esterase (CE15) (15), mostrando que ela pode ter alguma importância durante o processo de degradação da parede celular de diferentes biomassas como foi relatado por Monrad *et al.* (2018) (168).

Comparado com estudos prévios, foram identificadas uma quantidade satisfatória de CAZymes no cultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 nas diferentes condições estudadas (PM, EC e SP80-3280). Adav *et al.* (2010) identificaram 30 enzimas a partir do cultivo de *A. niger* em biorreator com glucose como fonte de carbono (174). Borin *et al.* (2015) relataram a detecção de 45 CAZymes secretadas por *T. reesei* cultivado em bagaço ou colmo de cana-de-açúcar (18). Basotra *et al.* (2016) detectaram 62 CAZymes a partir do cultivo de *M. thermophilus* em celulose em pó, farelo de trigo e palha de arroz, na proporção 3:1:1 (15).

Foram observadas diferenças para os microrganismos cultivados em outras fontes de carbono, desde o número de CAZymes até classes de enzimas identificadas envolvidas na degradação de parede celular vegetal. Essas diferenças podem ocorrer devido à fonte de carbono, condições de cultivo ou desenho experimental, uma vez

que em relação ao primeiro fator, essas divergências podem estar relacionadas às diferenças na recalcitrância dos substratos utilizados, o que reflete os diferentes níveis de complexidade das paredes celulares, como foi discutido na **Tabela 29**. Entretanto, como os fungos percebem essas diferenças permanece incerto.

No entanto as proteínas mais importantes encontradas neste estudo também estavam presentes nos trabalhos de Borin *et al.* (2015) (18), Basostra *et al.* (2016) (15), Florencio *et al.* (2016) (17), da Silva *et al.* (2019) (16) como celobiohidrolases, endoglucanases e  $\beta$ -glucosidases. Também foram identificadas enzimas envolvidas na degradação da pectina, além de hemicelulases envolvidas na clivagem da cadeia principal de xilana e arabinoxilana, xiloglucano,  $\beta$ -glucano e a cadeia lateral de hemiceluloses.

Dentre as proteínas que não tinham sido identificadas em outros secretomas descritos na literatura, a ácido celobiônico fosforilase (GH94) merece destaque, uma vez que apresenta ação na degradação da celulose e há poucos estudos da ação desta enzima (69–71). Li *et al.* (2015) relataram que a ácido celobiônico fosforilase desempenha um papel crucial no catabolismo do ácido celobiônico, permitindo que seja uma alternativa à  $\beta$ -glucosidase (71). Desta maneira, pode-se concluir que *T. reesei* RP698 desenvolveu uma via alternativa para a completa degradação da celulose, este fato pode ser comprovado pelo fato desta enzima ter sido encontrada somente no cultivo individual de *T. reesei* RP698, tanto em EC quanto SP80-3280, e apresentar bons resultados de hidrólise.

Os dados obtidos a partir dos secretomas de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em cultivos únicos e cocultivos em diferentes fontes de carbonos corroboraram com a literatura que afirma a importância de distintas enzimas para hidrólise completa da parede celular, como foi descrito por de Souza *et al.* (2013) (26) e Buckeridge, Grandis e Tavares (2019) (27), uma vez que além das secreção das principais enzimas envolvidas na hidrólise de celulose e hemicelulose, foram identificadas enzimas acessórias que tiveram sua importância relatada por Segato *et al.* (2014) (23), Polizeli *et al.* (2016) (1) e Pasin *et al.* (2020) (9), que afirmaram que estas são responsáveis por auxiliar na completa degradação dos componentes da parede celular.

Com todas essas informações em mãos, além dos diferentes tempos de análise dos secretomas (EC, SP80-3280 e PM) (**Tabela 18**, **Tabela 24**, **Tabela 25** e **Tabela 26**) e as dosagens das atividades das diferentes enzimas nos coquetéis (**Figura 9**, **Figura 10** e **Figura 14**), foi possível propor um modelo da degradação da parede

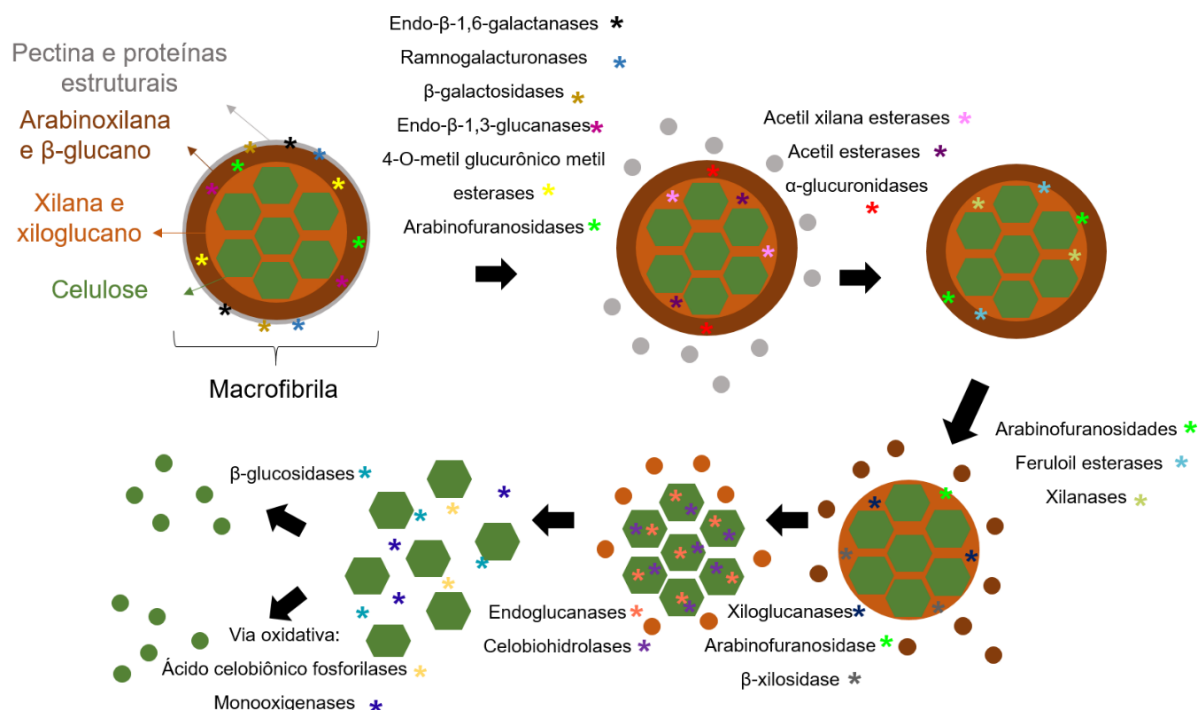
celular de cana-de-açúcar e Cana Energia. Algumas enzimas apesar de não terem sido identificadas nos secretomas analisados, foram detectadas pelas metodologias de dosagem de atividade enzimática utilizadas. Isto pode ter ocorrido devido a presença de alguma protease presente no meio.

Optou-se por unir todas as informações obtidas para a construção do modelo de degradação. Sendo assim, neste modelo, inicialmente teríamos a ação de seis enzimas: endo- $\beta$ -1,6-galactanases, ramnogalacturonases,  $\beta$ -galactosidases, endo- $\beta$ -1,3-glucanase, 4-O-metil glucurônico metil esterases e arabinofuranosidases. Em seguida, a acetil xilana esterase, acetil esterases e  $\alpha$ -glucuronidases teriam um papel na degradação, para a posterior ação de arabinofuranosidases, feruloil esterases, xilanases e xiloglucanases. Novamente as arabinofuranosidases teriam suas ações associadas com  $\beta$ -xilosidases, completando o processo de degradação da hemicelulose. A partir de então, as endoglucanases e celobiohidrolases começam agir e, tornam-se possível duas vias para a liberação de glucose a partir da degradação da celulose: (i) a partir da ação de  $\beta$ -glucosidases e (ii) via oxidativa de degradação a partir da ação combinada de monooxigenases e ácido celobiônico fosforilases.

Neste modelo proposto não foram incluídas as liquenases, como proposto por de Souza e colaboradores (26), uma vez que não foram identificadas essas enzimas nos secretomas estudados. Entretanto, foi adicionada uma endo- $\beta$ -1,3-glucanase que é responsável pela clivagem da ligação  $\beta$ -1,3-glucosídica do  $\beta$ -glucano. Além disso, o modelo se assemelha bastante ao citado, com pequenas modificações no início do processo, pela inclusão de 4-O-metil glucurônico metil esterases e  $\alpha$ -glucuronidases e o final do processo em que propõe a via de degradação oxidativa da celulose, com ação de AA9 e ácido celobiônico fosforilases. Entretanto, a AA9 aparece nos secretomas, mesmo quando não foram identificadas a ácido celobiônico fosforilases, mostrando que ela tem importância na sacarificação das biomassas, podendo agir também junto às celulasas, uma vez que induzem quebras oxidativas na cadeia da celulose. Este modelo hipotético pode ser visto na figura abaixo (**Figura 31**).



**Figura 31.** Modelo hipotético da degradação dos componentes da parede celular de cana-de-açúcar.



Fonte: Elaborada pela autora.

Com a composição enzimática/proteica do coquetel obtido a partir do cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 produzido em biorreator e com PM como fonte de carbono, determinada pela análise do secretoma, foi demonstrada a necessidade de aprimorar ainda mais os estudos de hidrólise de SCB, EC e SP80-3280.

A lignina é considerada um dos principais obstáculos para a sacarificação enzimática eficiente da biomassa lignocelulósica (85) dificultando o acesso das enzimas à celulose, que é o carboidrato mais abundante no material lignocelulósico (152). Por conseguinte, muitos métodos de pré-tratamentos foram desenvolvidos para melhorar a digestibilidade da biomassa lignocelulósica e, conseqüentemente, aumentar a eficiência geral da bioconversão em açúcares fermentescíveis (175). Assim foram estudados diferentes pré-tratamentos das biomassas, que tem por objetivo interferir na estrutura e/ou quantidade de lignina nas mesmas e melhorar a acessibilidade do coquetel, focando no aumento da eficiência hidrolítica do coquetel.

A etapa de pré-tratamento no processo de bioconversão da biomassa lignocelulósica apresenta eficácia na degradação das paredes celulares. Segundo

Buckeridge, Grandis e Tavares (2019) (27), isto ocorre devido à hidratação das paredes que possibilita a quebra de algumas ligações covalentes e, assim, torna a biomassa lignocelulósica mais acessível às enzimas responsáveis pela hidrólise do material. Dentre os pré-tratamentos disponíveis, os mais conhecidos são: alcalino (85,147,152,154,176); ácido (107,177); *organosolv* (88,116,175) e autohidrólise (27,91,178), que foram objeto de estudo deste trabalho. Buckeridge, Grandis e Tavares (2019) relataram que esses distintos pré-tratamentos possuem mecanismos de ação diferentes, como por exemplo, o alcalino que libera a lignina e disponibiliza celulose e hemicelulose para hidrólise, enquanto que a autohidrólise é responsável pela remoção da hemicelulose (27). A eficácia destes pré-tratamento na degradação da parede celular pode ser comprovada pela diferença na composição da porção de hemicelulose da parede celular das biomassas (**Tabela 29**) principal polissacarídeo afetado pelos pré-tratamentos (147,179).

Comparando os resultados de hidrólise de SCB, EC e SP80-3280 expostas aos diferentes pré-tratamentos (**Figura 26**) com a composição dos açúcares presentes nas mesmas (**Tabela 29**), foi possível observar SCB e SP80-3280 apresentaram maior quantidade de açúcares nas biomassas após pré-tratamento de autohidrólise, porém os resultados de hidrólise foram bem menores que os expostos a outros pré-tratamentos, que disponibilizaram maior acessibilidade das enzimas aos componentes da parede celular. Isto pode ocorrer devido ao fato da autohidrólise liberar furfural e HMF, como foi descrito por Michelin e colaboradores (2012) (180), que são inibidores da atividade das enzimas hidrolíticas. Para EC, os melhores resultados, em relação a composição de açúcares na biomassa, correspondem ao do pré-tratamento alcalino. A Cana Energia apresenta uma particularidade, como foi descrito por Tew e Cobil (2008) (37) e da Silva *et al.* (2017) (36), esta biomassa apresenta maior teor de fibra, o que pode explicar a diferença de composição desta em relação as canas comerciais (**Tabela 29**), e esta diferença no teor de fibra pode afetar o complexo lignina-carboidrato, tornando a biomassa mais ou menos recalcitrante, por isso a diferença na composição de açúcares após os pré-tratamentos em relação as demais canas estudadas.

Os resultados obtidos da sacarificação destas biomassas mostraram que os melhores efeitos foram gerados pelo pré-tratamento alcalino (NaOH 4%, 121 °C, 1,0 atm, 60 minutos), uma vez que houve maior aumento da hidrólise da parede celular destes materiais. A liberação de AR foi aproximadamente  $215,01 \pm 11,02 \mu\text{mol.mL}^{-1}$

( $\approx 38,74$  mg/mL) para a hidrólise de SCB,  $177,16 \pm 16,00$   $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $\approx 31,92$  mg/mL) para EC e  $220,64 \pm 29,02$   $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $\approx 39,75$  mg/mL) para a cana-de-açúcar SP80-3280 (**Tabela 31**). A liberação de AR foi maior para todas as canas pré-tratadas, atingindo um aumento de até 7,42 vezes para SCB, 8,51 vezes para EC e 8,61 vezes para SP80-3280 quando comparado com os resultados da sacarificação das biomassas *in natura* (**Figura 26**). Estes dados são bastantes superiores aos relatados na literatura (20,51,84,181), provavelmente devido a diminuição da recalcitrância das biomassa, seja pela quebra de ligações covalentes do complexo lignina-carboidrato, remoção ou disponibilização de algum componente da parede celular após a exposição da biomassa a este tipo de pré-tratamento (27,182,183).

Desta maneira, há um maior acesso enzimático aos polissacarídeos, como descrito por Gray, Zhao e Emptage (2006) e Srinorakutara *et al.* (2013), que relataram que a presença de lignina acarreta na ligação inespecífica e inativação das celulases (86,87), além do aumento da porosidade da biomassa como descrito por Van Dyk e Pletschke (2012) (22) e Zhang *et al.* (2018) (88), que possibilitou melhor acesso do coquetel e, conseqüentemente, maior sacarificação das biomassas lignocelulósicas.

Sendo assim, avaliou-se diferentes concentrações de NaOH e tempo de exposição do mesmo, porém foi observado que ambos os fatores influenciam na hidrólise das biomassas, uma vez que houve alteração no padrão de açúcares liberados (**Tabela 30** e **Tabela 31**). De modo geral, tempos menores de exposição, provavelmente, afetam menos as biomassas, ou seja, há menor exposição das fibras para o ataque enzimático. Isto explicaria a menor liberação de AR. Em relação as distintas concentrações foram observadas que com NaOH 1 e 2% houve menor liberação de AR, ou seja, as fibras devem ter sido menos afetadas. Entretanto, concentrações acima de 8% de NaOH propiciaram menor sacarificação das biomassas. Provavelmente, a elevada concentração de NaOH gerou maior quantidade de componentes que inibem a ação de alguma enzima do coquetel. Desta maneira, foi possível concluir que para as canas estudadas (SCB, EC e SP80-3280) o melhor pré-tratamento foi com NaOH 4%, durante 60 minutos de exposição desta solução.

Ademais, Lamounier e colaboradores (2020) relataram uma liberação de 43,25 g/L ( $\approx 43,28$  mg/mL) de AR totais após aplicação do coquetel comercial da Novozymes Cellic Ctec3 em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH a 2%, no experimento foi utilizado 3% de biomassa e a hidrólise ocorreu com 24 horas (184).

Sendo assim, foi possível concluir que os dados de hidrólise obtidos neste trabalho são bastante promissores, uma vez que se aproximam dos obtidos com o uso de coquetel comercial Cellic Ctec3. Cintra e colaboradores testaram o coquetel comercial da Dupont Accellerase 1500 na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar explodido à vapor e obtiveram 5,1 g/L de glucose liberados (185), valor bem inferior ao obtido após aplicação do coquetel estudado nas canas expostas ao pré-tratamento alcalino.

Após aplicado o coquetel nas biomassas expostas à diferentes pré-tratamentos, foi analisado o perfil de açúcares presentes nos hidrolisados por TLC, para verificar se houve mudança no padrão de hidrólise entre os pré-tratamentos e o material *in natura*. Em todos os pré-tratamentos, foi observado uma elevada quantidade de açúcares, sendo glucose e xilose predominantes. Estes açúcares presentes nos hidrolisados podem ser convertidos em bioetanol como descrito anteriormente na literatura (9,27,65,186).

Com a composição de alguns coquetéis determinada, foi estudada suas aplicações em diferentes canas utilizadas pela indústria sucroalcooleira na produção de produção de etanol 2G (**Tabela 32**, **Tabela 33**, **Tabela 34** e **Tabela 35**). É provável que alguma fração tenha sido afetada ou perdida durante a moagem da cana-de-açúcar, o que pode ter afetado a hidrólise das mesmas. Como observado ao longo do trabalho, o coquetel obtido pelo cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em PM também foi o que resultou em melhores quantidades de AR liberados para estas canas utilizadas pela empresa GranBio. Desta maneira, para resultados mais confiáveis para o uso deste coquetel pela indústria sucroalcooleira, propõe-se realizar mais experimentos com as biomassas expostas ao pré-tratamento padrão utilizado pela GranBio.

Nesse sentido, *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 mostraram ser microrganismos com grande potencial de aplicação biotecnológica, mas com muitas informações a serem decifradas. Ademais, foi demonstrado com sucesso a possibilidade de usar dois fungos de interesse industrial na obtenção de um coquetel enzimático com alta eficiência na hidrólise de diferentes canas, como SCB, EC e SP80-3280 e canas já utilizadas para a produção de etanol 2G (GranBio).

Foi mostrada a importância de estudar diferentes fontes de carbono para produção de holocelulases, uma vez que para a sacarificação de cana-de-açúcar e Cana Energia os melhores resultados foram obtidos a partir do cultivo dos microrganismos em outros resíduos que não a própria cana.

Por fim, os resultados obtidos reforçam a importância de estudos para melhor compreensão da ação da monooxigenase, para confirmar quando esta enzima começa agir no processo de degradação da parede vegetal, uma vez que esta foi identificada nos primeiros dias de cultivo e seguiu durante todo o cultivo.

Além disso, seria interessante aprofundar os conhecimentos a respeito da 4-O-metil glucurônico metil esterase e da ácido celobiônico fosforilase. As informações obtidas possibilitariam um avanço no entendimento do papel individual de cada uma destas enzimas na degradação da biomassa.

## 6. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos pode-se concluir que o fungo termofílico *Mycothermus thermophilus* e o mesofílico *Trichoderma reesei* RP698 são promissores produtores de holocelulases, apresentando grande potencial para serem adicionados em coquetéis enzimáticos com o objetivo de degradar a parede celular de diferentes biomassas lignocelulósicas, uma vez que produzem uma gama de celulases e hemicelulases.

Ademais, o uso de resíduos agroindustriais mostrou-se uma importante alternativa para a obtenção de enzimas, por se tratar de biomassas lignocelulósicas disponíveis em grandes quantidades e fácil obtenção, além de serem excelentes indutores de holocelulases. Desta maneira, torna-se possível reduzir o custo de produção de enzimas alvo, uma das maiores barreiras para tornar o etanol de segunda geração e outros sub-produtos economicamente viáveis.

O cocultivo de microrganismos foi bastante eficiente, aumentando consideravelmente a sacarificação de SCB, EC e SP80-3280, provavelmente devido ao maior sinergismo entre as enzimas presentes no coquetel, uma vez que os resultados obtidos de hidrólise de SCB, EC e SP80-3280 foram muito satisfatórios.

O uso de diferentes tecnologias de pré-tratamentos possibilitou melhor acessibilidade do coquetel, proporcionando uma maior digestibilidade das paredes celulares de SCB, EC e SP80-3280, sendo o tratamento alcalino o que apresentou os melhores resultados de sacarificação.

Os secretomas de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 crescidos nas mais diversas condições levaram à identificação de um arsenal de enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal, possibilitando melhor compreensão do processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica. Além disso, também foram identificadas enzimas que não tinham sido antes relatadas em outros secretomas, como a ácido celobiônico fosforilase, envolvida na degradação oxidativa da celulose, e a 4-O-metil glucurônico metil esterase que é responsável pela separação da lignina, celulose e hemicelulose.

Por fim, o coquetel obtido do cocultivo de *M. thermophilus* e *T. reesei* RP698 em palha de milho, após otimizado para aplicação em SCB, EC e SP80-3280, apresentou resultados bastante promissores, aproximado de resultados encontrados

na literatura com a utilização de coquetéis comerciais. O coquetel otimizado apresentou valores de liberação de AR de 74 a 92 % similares aos relatados com o uso do coquetel comercial Cellic Ctec3.

Assim, a utilização de bagaço de cana-de-açúcar, da cana-de açúcar SP80-3280 e da Cana Energia agregou valores econômicos e de sustentabilidade neste trabalho, além de ser o primeiro estudo completo do uso potencial de Cana Energia para produção de enzimas, análise da composição dos monossacarídeos da parede celular e hidrólise da biomassa com foco na produção de etanol 2G.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Polizeli MLTM, Vici AC, Scarcella ASA, Cereia M, Pereira MG. Enzyme system from *Aspergillus* in current industrial uses and future applications in the production of second-generation ethanol. In: Gupta VK, editor. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. 1 ed. Elsevier; 2016. p. 127–40.
2. Chase AB, Dolan KL, Mohamed DJ, Martiny JBH. Microbial Biodiversity. *Ref Modul Life Sci*. 2017;1–10.
3. de Oliveira TB, Gomes E, Rodrigues A. Thermophilic fungi in the new age of fungal taxonomy. *Extremophiles*. 2015;19(1):31–7.
4. Silva JCR, Salgado JCS, Vici AC, Ward RJ, Polizeli MLTM, Guimarães LHS, et al. A novel *Trichoderma reesei* mutant RP698 with enhanced cellulase production. *Brazilian J Microbiol*. 2020;51:537–45.
5. Meleiro LP, Salgado JCS, Maldonado RF, Carli S, Moraes LAB, Ward RJ, et al. Engineering the GH1  $\beta$ -glucosidase from *Humicola insolens*: Insights on the stimulation of activity by glucose and xylose. *PLoS One*. 2017;12(11):1–26.
6. Mohanram S, Amat D, Choudhary J, Arora A, Nain L. Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. *Sustain Chem Process*. 2013;1(1):15.
7. Sánchez C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv*. 2009;27(2):185–94.
8. Anwar Z, Gulfraz M, Irshad M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *J Radiat Res Appl Sci*. 2014;7(2):163–73.
9. Pasin TM, Almeida PZ, Scarcella ASA, Infante JC, Polizeli MLTM. Bioconversion of agro-industrial residues to second-generation bioethanol. In: Nanda S, Vo D-VN, Sarangi PK, editores. *Biorefinery of Alternative Resources: Targeting Green Fuels and Platform Chemicals*. Springer Nature; 2020. p. 23–47.
10. Mathew GM, Sukumaran RK, Singhanian RR, Pandey A. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. *J Sci Ind Res (India)*. 2008;67(11):898–907.
11. Delabona PS, Cota J, Hoffmam ZB, Paixão DAA, Farinas CS, Cairo JPLF, et al. Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. *Bioresour Technol*. 2013;131:500–7.
12. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap P V., Clark DP. *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed; 2010. 1160 p.
13. Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, et al.

- Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol.* 2008;26(5):553–60.
14. Li WC, Huang CH, Chen CL, Chuang YC, Tung SY, Wang TF. *Trichoderma reesei* complete genome sequence, repeat-induced point mutation, and partitioning of CAZyme gene clusters. *Biotechnol Biofuels.* 2017;10(1):1–20.
  15. Basotra N, Kaur B, Di Falco M, Tsang A, Chadha BS. *Mycothermus thermophilus* (Syn. *Scytalidium thermophilum*): Repertoire of a diverse array of efficient cellulases and hemicellulases in the secretome revealed. *Bioresour Technol.* 2016;222:413–21.
  16. da Silva DS, Dantzger M, Assis MA, Gallardo JCM, Teixeira GS, Missawa SK, et al. Lignocellulolytic characterization and comparative secretome analysis of a *Trichoderma erinaceum* strain isolated from decaying sugarcane straw. *Fungal Biol.* 2019;123:330–40.
  17. Florencio C, Cunha FM, Badino AC, Farinas CS, Ximenes E, Ladisch MR. Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: Enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. *Enzyme Microb Technol.* 2016;90:53–60.
  18. Borin GP, Sanchez CC, De Souza AP, De Santana ES, De Souza AT, Leme AFP, et al. Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129275.
  19. Paës G, Navarro D, Benoit Y, Blanquet S, Chabbert B, Chaussepied B, et al. Tracking of enzymatic biomass deconstruction by fungal secretomes highlights markers of lignocellulose recalcitrance. *Biotechnol Biofuels.* 2019;12:76.
  20. Lima MS, Damasio ARL, Crnkovic PM, Pinto MR, da Silva AM, da Silva JCR, et al. Co-cultivation of *Aspergillus nidulans* recombinant strains produces an enzymatic cocktail as alternative to alkaline sugarcane bagasse pretreatment. *Front Microbiol.* 2016;7:583.
  21. Damásio ARL, Pessela BC, Mateo C, Segato F, Prade RA, Guisan JM, et al. Immobilization of a recombinant endo-1,5-arabinanase secreted by *Aspergillus nidulans* strain A773. *J Mol Catal B Enzym.* 2012;77:39–45.
  22. Van Dyk JS, Pletschke BI. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol Adv.* 2012;30(6):1458–80.
  23. Segato F, Damásio ARL, de Lucas RC, Squina FM, Prade RA. Genomics review of holocellulose deconstruction by *Aspergilli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014;78(4):588–613.

24. Damásio ARL, Braga CMP, Brenelli LB, Citadini AP, Mandelli F, Cota J, et al. Biomass-to-bio-products application of feruloyl esterase from *Aspergillus clavatus*. Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97(15):6759–67.
25. Tavares EQP, Buckeridge MS. Do plant cell walls have a code? Plant Sci. 2015;241:286–94.
26. de Souza AP, Leite DCC, Pattathil S, Hahn MG, Buckeridge MS. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. Bioenergy Res. 2013;6(2):564–79.
27. Buckeridge MS, Grandis A, Tavares EQP. Disassembling the glycomic code of sugarcane cell walls to improve second-generation bioethanol production. In: Ray R, Ramachandran R, editores. Bioethanol Production from Food Crops. 1 ed. Elsevier; 2019. p. 31–43.
28. UNICA. Posição em 01/09/2018 [Internet]. Avaliação quinzenal da safra 2018/2019 da região centro-sul. 2018 [Acesso 5 ago. 2019]. Disponível em: <http://www.unica.com.br/>
29. Cotrim CA, Soares JSM, Kobe B, Menossi M. Crystal structure and insights into the oligomeric state of UDP-glucose pyrophosphorylase from sugarcane. PLoS One. 2018;13(3):1–13.
30. Cheavegatti-Gianotto A, de Abreu HMC, Arruda P, Bessalho Filho JC, Burnquist WL, Creste S, et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. Trop Plant Biol. 2011;4(1):62–89.
31. Bhatia L, Paliwal S. Ethanol production potential of *Pachysolen tannophilus* from sugarcane bagasse. Int J Biotechnol Bioeng Res. 2011;2(2):271–6.
32. de Souza AP, Grandis A, Leite DCC, Buckeridge MS. Sugarcane as a bioenergy source: history, performance, and perspectives for second-generation bioethanol. Bioenergy Res. 2014;7(1):24–35.
33. Rocha GJM, Gonçalves AR, Oliveira BR, Olivares EG, Rossell CE V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. Ind Crops Prod. 2011;35:274–9.
34. Rivera EC, Rabelo SC, dos Reis Garcia D, Filho RM, da Costa AC. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: determining optimal enzyme loading using neural networks. J Chem Technol Biotechnol. 2010;85(7):983–92.
35. Buckeridge MS, de Souza AP. Breaking the “Glycomic Code” of cell wall polysaccharides may improve second-generation bioenergy production from biomass. BioEnergy Res. 2014;7:1065–1073.

36. da Silva JA. The importance of the wild cane *Saccharum spontaneum* for bioenergy genetic breeding. *Sugar Tech.* 2017;19(3):229–40.
37. Tew T, Cobill RM. Genetic improvement of sugarcane (*Saccharum* spp.) as an energy crop. In: Vermerris W, editor. *Genetic Improvement of Bioenergy Crops.* 2008. p. 249–72.
38. Carvalho-Netto O V., Bressiani JA, Soriano HL, Fiori CS, Santos JM, Barbosa GV, et al. The potential of the energy cane as the main biomass crop for the cellulosic industry. *Chem Biol Technol Agric.* 2014;1(1):1–8.
39. Rubio LCS, Tomazela AL, Matsuoka S, Santos EGD dos, Kennedy AJ. Energy Cane: its concept, development, characteristics, and prospects. *Adv Bot.* 2014;2014:1–13.
40. Klock U, De Muñiz GIB, Hernandez JA, De Andrade AS. *Química da madeira.* 2005. 86 p.
41. Ferraz AL. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: Esposito E, Azevedo JL, editores. *Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia.* Caxias do Sul: EDUCS; 2004. p. 215–44.
42. Bon EPS, Gírio F, Pereira Jr N. Enzima na produção de etanol. In: Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML, Vermelho AB, Paiva CLA, Alencastro RB, et al., editores. *Enzima em biotecnologia: produção, aplicações e mercado.* Rio de Janeiro: Interciência; 2008.
43. Rani V, Mohanram S, Tiwari R, Nain L, Arora A. Beta-Glucosidase: key enzyme in determining efficiency of cellulase and biomass hydrolysis. *J Bioprocess Biotech.* 2014;5(01):197.
44. Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* 2010;153(3):895–905.
45. Carvalho CC. *Produção de ligninases por basidiomicetos através de fermentação em estado sólido e aplicação de enzimas [dissertação].* Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro; 2004.
46. Gonçalves AZL. *Produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos sólidos agroindustriais, visando potencial aplicação na produção animal [tese].* Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro; 2010.
47. Nagai M, Sato T, Watanabe H, Saito K, Kawata M, Enei H. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003;60(3):327–35.
48. Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. *Appl Microbiol*

- Biotechnol. 2005;67(5):577–91.
49. Humar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2008;35:377–91.
  50. Damásio ARL, Silva TM, Almeida FBR, Squina FM, Ribeiro DA, Leme AFP, et al. Heterologous expression of an *Aspergillus niveus* xylanase GH11 in *Aspergillus nidulans* and its characterization and application. *Process Biochem.* 2011;46(6):1236–42.
  51. Goldbeck R, Gonçalves TA, Damásio ARL, Brenelli LB, Wolf LD, Paixão DAA, et al. Effect of hemicellulolytic enzymes to improve sugarcane bagasse saccharification and xylooligosaccharides production. *J Mol Catal B Enzym.* 2016;131:36–46.
  52. Fengel G, Wegener G. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions.* 1984. 613 p.
  53. Polizeli MLTM, Corrêa ECP, Polizeli AM, Jorge JA. Hydrolases from microorganisms used for degradation of plant cell wall and bioenergy. In: Buckeridge MS, Goldman GH, editores. *Routes to Cellulosic Ethanol.* 1 ed. New York, USA: Springer; 2011. p. 115–34.
  54. Heinen PR, Betini JHA, Polizeli MLTM. Xylanases. *Ref Modul Life Sci.* 2017;1–12.
  55. Polizeli MLTM. Properties and comercial applications of xylanases from fungi. In: RAI MK, editor. *Advances in Fungal Biotechnology.* Nova Dehli: I.K. International Publisher; 2009. p. 82–101.
  56. Biely P, Singh S, Puchart V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. *Biotechnol Adv.* 2016;34(7):1260–74.
  57. Chaari F, Chaabouni SE. Fungal  $\beta$ -1,3-1,4-glucanases: production, proprieties and biotechnological applications. *J Sci Food Agric.* 2019;99(6):2657–64.
  58. Lin Y, Jin W, Wang J, Cai Z, Wu S, Zhang G. A novel method for simultaneous purification and immobilization of a xylanase-lichenase chimera via SpyTag/SpyCatcher spontaneous reaction. *Enzyme Microb Technol.* 2018;115:29–36.
  59. Hoffmam ZB, Zanphorlin LM, Cota J, Diogo JA, Almeida GB, Damásio ARL, et al. Xylan-specific carbohydrate-binding module belonging to family 6 enhances the catalytic performance of a GH11 endo-xylanase. *N Biotechnol.* 2016;33(4):467–72.
  60. Rogowski A, Briggs JA, Mortimer JC, Tryfona T, Terrapon N, Lowe EC, et al. Glycan complexity dictates microbial resource allocation in the large intestine. *Nat Commun.* 2015;6:7481.

61. Elgharbi F, Ben Hlima H, Ameri R, Bejar S, Hmida-sayari A. A trimeric and thermostable lichenase from *B. pumilus* US570 strain: Biochemical and molecular characterization. *Int J Biol Macromol*. 2017;95:273–80.
62. Menon V, Prakash G, Rao M. Enzymatic hydrolysis and ethanol production using xyloglucanase and *Debaromyces hansenii* from tamarind kernel powder: Galactoxyloglucan predominant hemicellulose. *J Biotechnol*. 2010;148(4):233–9.
63. Benko Z, Siika-aho M, Viikari L, Réczey K. Evaluation of the role of xyloglucanase in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Enzyme Microb Technol*. 2008;43(2):109–14.
64. Gao D, Chundawat SPS, Sethi A, Balan V, Gnanakaran S, Dale BE. Increased enzyme binding to substrate is not necessary for more efficient cellulose hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(27):10922–7.
65. Robak K, Balcerek M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. *Food Technol Biotechnol*. 2018;56(2):174–87.
66. Zhang YHP, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng*. 2004;88(7):797–824.
67. Furtado GP, Santos CR, Cordeiro RL, Ribeiro LF, Moraes LAB de, Damásio ARL, et al. Enhanced xyloglucan-specific endo- $\beta$ -1,4-glucanase efficiency in an engineered CBM44-XegA chimera. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99(12):5095–5107.
68. Mulinari EJ. Análise do secretoma do fungo termofílico *Thermothielavioides terrestris*: prospecção, expressão heteróloga e caracterizações biofísicas e bioquímicas de algumas enzimas [tese]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2019.
69. Nihira T, Saito Y, Nishimoto M, Kitaoka M, Igarashi K, Ohtsubo K, et al. Discovery of cellobionic acid phosphorylase in cellulolytic bacteria and fungi. *FEBS Lett*. 2013;587(21):3556–61.
70. Nam YW, Nihira T, Arakawa T, Saito Y, Kitaoka M, Nakai H, et al. Crystal structure and substrate recognition of cellobionic acid phosphorylase, which plays a key role in oxidative cellulose degradation by microbes. *J Biol Chem*. 2015;290(30):18281–92.
71. Li X, Chomvong K, Yu VY, Liang JM, Lin Y, Cate JHD. Cellobionic acid utilization: From *Neurospora crassa* to *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*. 2015;8:120.
72. Polizeli MLTM, Damásio ARL, Maller A, Cabral H, Polizeli AM, Rai M. Pectinases produced by microorganisms: properties and applications. In: Polizeli MLTM, Rai

- M, editores. Fungal Enzymes. CRC, Boca Raton; 2013. p. 327–51.
73. Ochoa-Jiménez VA, Berumen-Varela G, Fernández-Valle R, Martín-Ernesto, Hernández T. Rhamnogalacturonan lyase: A pectin modification enzyme of higher plants. *Emirates J Food Agric*. 2018;30(11):910–7.
  74. Khan M, Nakkeeran E, Umesh-Kumar S. Potential application of pectinase in developing functional foods. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2013;4:21–34.
  75. Amin F, Bhatti HN, Bilal M, Asgher M. Improvement of activity, thermo-stability and fruit juice clarification characteristics of fungal exo-polygalacturonase. *Int J Biol Macromol*. 2017;95:974–84.
  76. Yang Y, Zhang Y, Li B, Yang X, Dong Y, Qiu D. A *Verticillium dahliae* pectate lyase induces plant immune responses and contributes to virulence. *Front Plant Sci*. 2018;9:1–15.
  77. Kondo T, Nishimura Y, Matsuyama K, Ishimaru M, Nakazawa M, Ueda M, et al. Characterization of three GH35  $\beta$ -galactosidases, enzymes able to shave galactosyl residues linked to rhamnogalacturonan in pectin, from *Penicillium chrysogenum* 31B. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104(3):1135–48.
  78. Dodd D, Cann IKO. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy*. 2009;1(1):2–17.
  79. Arantes V, Saddler JN. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnol Biofuels*. 2011;4(1):3.
  80. Shields S, Boopathy R. Ethanol production from lignocellulosic biomass of energy cane. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2011;65(1):142–6.
  81. Alvarez TM, Goldbeck R, Santos CR dos, Paixão DAA, Gonçalves TA, Franco Cairo JPL, et al. Development and biotechnological application of a novel endoxylanase family GH10 identified from sugarcane soil metagenome. *PLoS One*. 2013;8(7).
  82. Buckeridge MS, de Souza AP, Arundale RA, Anderson-Teixeira KJ, Delucia E. Ethanol from sugarcane in Brazil: A “midway” strategy for increasing ethanol production while maximizing environmental benefits. *GCB Bioenergy*. 2012;4(2):119–26.
  83. Soccol CR, Vandenberghe LPDS, Medeiros ABP, Karp SG, Buckeridge M, Ramos LP, et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresour Technol*. 2010;101(13):4820–5.
  84. Goldbeck R, Damásio ARL, Gonçalves TA, Machado CB, Paixão DAA, Wolf LD, et al. Development of hemicellulolytic enzyme mixtures for plant biomass deconstruction on target biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98:8513–25.



85. Xu C, Zhang J, Zhang Y, Guo Y, Xu H, Liang C, et al. Lignin prepared from different alkaline pretreated sugarcane bagasse and its effect on enzymatic hydrolysis. *Int J Biol Macromol*. 2019;141:484–92.
86. Gray KA, Zhao L, Emptage M. *Bioethanol*. *Curr Opin Chem Biol*. 2006;10(2):141–6.
87. Srinorakutara T, Suttikul S, Boonvitthya N. Effect of different pretreatment methods on enzymatic saccharification and ethanol production from sugarcane shoots and leaves. *J Food Sci Eng*. 2013;3:309–16.
88. Zhang H, Fan M, Li X, Zhang A, Xie J. Enhancing enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by ferric chloride catalyzed organosolv pretreatment and Tween 80. *Bioresour Technol*. 2018;258:295–301.
89. Polizeli MLTM, Peralta RM, Bracht A, Michelin M, Somera AF. Enzymes prospection from fungi and biomass pretreatment for biorefinery application. In: Silva RN, editor. *Mycology: Current and Future Developments*. 1 ed. Sharjah: Bentham Science Publishers; 2016. p. 57–81.
90. Michelin M, Ruiz HA, Silva DP, Ruzene DS, Teixeira JA, Polizeli MLTM. Cellulose from Lignocellulosic Waste. In: Gopal K, Mérillon RJ-M, editores. *Polysaccharides*. 1 ed. Basel, Switzerland: Springer International Publishing; 2014. p. 1–33.
91. Michelin M, Teixeira JA. Liquid hot water pretreatment of multi feedstocks and enzymatic hydrolysis of solids obtained thereof. *Bioresour Technol*. 2016;216:862–9.
92. Shrotri A, Kobayashi H, Fukuoka A. Catalytic conversion of structural carbohydrates and lignin to chemicals. In: *Advances in Catalysis*. 1 ed. Elsevier Inc.; 2017. p. 59–123.
93. Saha K, Dwibedi P, Ghosh A, Sikder J, Chakraborty S, Curcio S. Extraction of lignin , structural characterization and bioconversion of sugarcane bagasse after ionic liquid assisted pretreatment. *3 Biotech*. 2018;8:374.
94. Shen J, Agblevor FA. Ethanol production of semi-simultaneous saccharification and fermentation from mixture of cotton gin waste and recycled paper sludge. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2011;34(1):33–43.
95. Ramos LP, da Silva L, Ballem AC, Pitarelo AP, Chiarello LM, Silveira MHL. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. *Bioresour Technol*. 2015;175:195–202.
96. Martini C, Tauk-Tornisielo SM, Codato CB, Bastos RG, Ceccato-Antonini SR. A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016;32:80.

97. He M, Wu B, Qin H, Ruan Z, Tan F, Wang J, et al. *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries. *Biotechnol Biofuels*. 2014;7(1):101.
98. Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink VG. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels*. 2012;5(1):45.
99. Li J, Zhou P, Liu H, Xiong C, Lin J, Xiao W, et al. Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies. *Bioresour Technol*. 2014;155:258–65.
100. Meyer AS, Rosgaard L, Sørensen HR. The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. *J Cereal Sci*. 2009;50(3):337–44.
101. Marques S, Alves L, Roseiro JC, Gírio FM. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. *Biomass and Bioenergy*. 2008;32(5):400–6.
102. Cota J, Corrêa TLR, Damásio ARL, Diogo JA, Hoffmam ZB, Garcia W, et al. Comparative analysis of three hyperthermophilic GH1 and GH3 family members with industrial potential. *N Biotechnol*. 2015;32(1):13–20.
103. Mandelli F, Brenelli LB, Almeida RF, Goldbeck R, Wolf LD, Hoffmam ZB, et al. Simultaneous production of xylooligosaccharides and antioxidant compounds from sugarcane bagasse via enzymatic hydrolysis. *Ind Crops Prod*. 2014;52:770–5.
104. Paula RG, Antoniêto ACC, Ribeiro LFC, Carraro CB, Nogueira KMV, Lopes DCB, et al. New genomic approaches to enhance biomass degradation by the industrial fungus *Trichoderma reesei*. *Int J Genomics*. 2018;1974151.
105. Borges DG, Baraldo Junior A, Farinas CS, de Lima Camargo Giordano R, Tardioli PW. Enhanced saccharification of sugarcane bagasse using soluble cellulase supplemented with immobilized  $\beta$ -glucosidase. *Bioresour Technol*. 2014;167:206–13.
106. Maitan-Alfenas GP, Visser EM, Guimarães VM. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. *Curr Opin Food Sci*. 2015;1:44–9.
107. Giese EC, Pierozzi M, Dussán KJ, Chandel AK, Da Silva SS. Enzymatic saccharification of acid-alkali pretreated sugarcane bagasse using commercial enzyme preparations. *J Chem Technol Biotechnol*. 2013;88(7):1266–72.
108. Emerson R. An experimental study of the life cycles and taxonomy of *Allomyces*. *Lloydia*. 1941;4:77–144.
109. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*. 1959 Mar 1;31(3):426–8.

110. Van Soest P. Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by ruminates: voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility. *J Anim Sci.* 1965;24(March):834–43.
111. Pagliuso D, Grandis A, Igarashi ES, Lam E, Buckeridge MS. Correlation of apiose levels and growth rates in Duckweeds. *Front Chem.* 2018;6:1–10.
112. Barratt RW, Johnson GB, Ogata WN. Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics.* 1965;52(1):233–46.
113. de Freitas EN, Bubna GA, Brugnari T, Kato CG, Nolli M, Rauen TG, et al. Removal of bisphenol A by laccases from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* and evaluation of ecotoxicity of degradation products. *Chem Eng J.* 2017;330:1361–9.
114. Rico A, Rencoret J, Del Río JC, Martínez AT, Gutiérrez A. Pretreatment with laccase and a phenolic mediator degrades lignin and enhances saccharification of Eucalyptus feedstock. *Biotechnol Biofuels.* 2014;7(1):1–14.
115. Wolf LD. Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros [dissertação]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2011.
116. Choi J-H, Jang S-K, Kim J-H, Park S-Y, Kim J-C, Jeong H, et al. Simultaneous production of glucose, furfural, and ethanol organosolv lignin for total utilization of high recalcitrant biomass by organosolv pretreatment. *Renew Energy.* 2019;130:952–60.
117. Nascimento VM, Manrich A, Tardioli PW, Giordano RC, Rocha GJM, Giordano R de LC. Alkaline pretreatment for practicable production of ethanol and xyloligosaccharides. *Bioethanol.* 2016;2:112–25.
118. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods.* 2009;6:359.
119. UniProt Consortium. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D506–15.
120. Zhang H, Yohe T, Huang L, Entwistle S, Wu P, Yang Z, et al. DbCAN2: A meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W95–101.
121. Eddy SR. A new generation of homology search tools based on probabilistic inference. *Genome Informatics.* 2009;23(1):205–11.
122. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron.* 2001;4(1)(1):1–9.
123. Franco HCJ, Pimenta MTB, Carvalho JLN, Magalhães PSG, Rossell CEV,

- Braunbeck OA, et al. Assessment of sugarcane trash for agronomic and energy purposes in Brazil. *Sci Agric*. 2013;70(5):305–12.
124. Antunes FAF, Chandel AK, Terán-Hilares R, Ingle AP, Rai M, Milessi TSS, et al. Overcoming challenges in lignocellulosic biomass pretreatment for second-generation (2G) sugar production: emerging role of nano, biotechnological and promising approaches. *3 Biotech*. 2019;9:230.
  125. Fatma S, Hameed A, Noman M, Ahmed T, Sohail I, Shahid M, et al. Lignocellulosic biomass: A sustainable bioenergy source for future. *Protein Pept Lett*. 2018;25:148–63.
  126. Singhvi MS, Gokhale D V. Lignocellulosic biomass: Hurdles and challenges in its valorization. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103:9305–20.
  127. Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat MK. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(3):461–88.
  128. Tenkanen M, Vršanská M, Siika-Aho M, Wong DW, Puchart V, Penttilä M, et al. Xylanase XYN IV from *Trichoderma reesei* showing exo- and endo-xylanase activity. *FEBS J*. 2013;280(1):285–301.
  129. Heinen PR, Bauermeister A, Ribeiro LF, Messias JM, Almeida PZ, Moraes LAB, et al. GH11 xylanase from *Aspergillus tamaritii* Kita: Purification by one-step chromatography and xylooligosaccharides hydrolysis monitored in real-time by mass spectrometry. *Int J Biol Macromol*. 2018;108:291–9.
  130. Michelin M, Silva TM, Jorge JA, Polizeli MLTM. Purification and biochemical properties of multiple xylanases from *Aspergillus ochraceus* tolerant to Hg<sup>2+</sup> ion and a wide range of pH. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014;206–20.
  131. Ribeiro LF, De Lucas RC, Vitcosque GL, Ribeiro LF, Ward RJ, Rubio M V, et al. A novel thermostable xylanase GH10 from *Malbranchea pulchella* expressed in *Aspergillus nidulans* with potential applications in biotechnology. *Biotechnol Biofuels*. 2014;7(1):115.
  132. Vitcosque GL, Ribeiro LFC, de Lucas RC, da Silva TM, Ribeiro LF, Damasio ARL, et al. The functional properties of a xyloglucanase (GH12) of *Aspergillus terreus* expressed in *Aspergillus nidulans* may increase performance of biomass degradation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(21):9133–44.
  133. Segato F, Damasio ARL, Gonçalves T, Murakami MT, Squina FM, Polizeli M, et al. Two structurally discrete GH7-cellobiohydrolases compete for the same cellulosic substrate fiber. *Biotechnol Biofuels*. 2012;5(1):21.
  134. Ayres RU. Economic growth. In: *Bubble Economy: Is Sustainable Growth Possible?* Cambridge, Massachusetts; London, England: MIT Press; 2014. p. 277–306.
  135. Scarcella ASA, Pasin TM, Contato AG, Lucas RC, Oliveira TB, Michelin M, et al.

- Production of an enzymatic cocktail by *Aspergillus awamori* grown on corn straw with stirred tank bioreactor. In: Microbiotec'19 Congress. 2019.
136. Scarcella ASA, Pasin TM, Lucas RC, Polizeli MLTM. Comparison of the holocellulolytic complex secreted by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niveus* grown on different industrial residues to reduce and optimize the production cost of 2G ethanol. In: XXII National Bioprocesses Symposium (SINAFERM) XIII Enzymatic Hydrolysis of Biomass Symposium (SHEB); UberlândiaMGBrazil. Campinas: Galoá; 2019.
  137. Pasin TM, Scarcella ASA, Contato AG, Lucas RC, Oliveira TB, Michelin M, et al. Brewers' spent grain as substrates for production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by different *Aspergillus* species. In: Microbiotec'19 Congress. 2019.
  138. Pasin TM, Scarcella ASA, Oliveira TB, Lucas RC, Cereia M, Betini JHA, et al. Paper industry Wastes as carbon sources for *Aspergillus* species cultivation and production of an enzymatic cocktail for biotechnological applications. Ind Biotechnol. 2020;16(2):56–60.
  139. Paula RG, Antoniêto ACC, Carraro CB, Lopes DCB, Persinoti GF, Peres NTA, et al. The duality of the MAPK signaling pathway in the control of metabolic processes and cellulase production in *Trichoderma reesei*. Sci Rep. 2018;8:14931.
  140. Jourdier E, Ben Chaabane F, Poughon L, Larroche C, Monot F. Simple kinetic model of cellulase production by *Trichoderma reesei* for productivity or yield maximization. Chem Eng Trans. 2012;27:313–8.
  141. Nogueira KM V, De Paula RG, Antoniêto ACC, Reis TF, Carraro CB, Silva AC, et al. Characterization of a novel sugar transporter involved in sugarcane bagasse degradation in *Trichoderma reesei*. Biotechnol Biofuels. 2018;11:84.
  142. Pointner M, Kuttner P, Obrlik T, Jäger A, Kahr H. Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels. Agron Res. 2014;12(2):391–6.
  143. Song Z, Yang G, Liu X, Yan Z, Yuan Y, Liao Y. Comparison of seven chemical pretreatments of corn straw for improving methane yield by anaerobic digestion. PLoS One. 2014;9(4):1–8.
  144. Kumar A, Gautam A, Dutt D. Co-cultivation of *Penicillium* sp. AKB-24 and *Aspergillus nidulans* AKB-25 as a cost-effective method to produce cellulases for the hydrolysis of pearl millet stover. Fermentation. 2016;2:12.
  145. Metreveli E, Kachlishvili E, Singer SW, Elisashvili V. Alteration of white-rot basidiomycetes cellulase and xylanase activities in the submerged co-cultivation and optimization of enzyme production by *Irpex lacteus* and *Schizophyllum commune*. Bioresour Technol. 2017;241:652–60.
  146. Arias JM, Modesto LFA, Polikarpov I, Pereira Jr N. Design of an enzyme cocktail

- consisting of different fungal platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse: Optimization and synergism studies. *Biotechnol Prog.* 2016;32(5):1222–9.
147. Pratto B, de Souza RBA, Sousa R, da Cruz AJG. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane straw: kinetic study and semi-mechanistic modeling. *Appl Biochem Biotechnol.* 2016;178:1430.
  148. Jung YH, Park HM, Kim DH, Yang J, Kim KH. Fed-batch enzymatic saccharification of high solids pretreated lignocellulose for obtaining high titers and high yields of glucose. *Appl Biochem Biotechnol.* 2017;182(3):1108–20.
  149. Tasselli G, Filippucci S, D'Antonio S, Cavalaglio G, Turchetti B, Cotana F, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of cellulosic fraction obtained from stranded driftwood feedstocks for lipid production by *Solicozozyma terricola*. *Biotechnol Reports.* 2019;24:e00367.
  150. Perna MSC, Bastos RG, Ceccato-Antonini SR. Single and combined effects of acetic acid, furfural, and sugars on the growth of the pentose-fermenting yeast *Meyerozozyma guilliermondii*. *3 Biotech.* 2018;8:119.
  151. Hernández-Beltrán JU, Hernández-Escoto H. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings through fed-batch operation. *Biomass and Bioenergy.* 2018;119:191–7.
  152. Xu C, Zhang J, Zhang Y, Guo Y, Xu H, Xu J, et al. Enhancement of high-solids enzymatic hydrolysis efficiency of alkali pretreated sugarcane bagasse at low cellulase dosage by fed-batch strategy based on optimized accessory enzymes and additives. *Bioresour Technol.* 2019;292:121993.
  153. Valadares F, Gonçalves TA, Gonçalves DSPO, Segato F, Romanel E, Milagres AMF, et al. Exploring glycoside hydrolases and accessory proteins from wood decay fungi to enhance sugarcane bagasse saccharification. *Biotechnol Biofuels.* 2016;9(1):1–12.
  154. Gomes AC, Moysés DN, Santa Anna LMM, Castro AM. Fed-batch strategies for saccharification of pilot-scale mild-acid and alkali pretreated sugarcane bagasse: Effects of solid loading and surfactant addition. *Ind Crops Prod.* 2018;119:283–9.
  155. Baral P, Jain L, Kurmi AK, Kumar V, Agrawal D. Augmented hydrolysis of acid pretreated sugarcane bagasse by PEG 6000 addition: a case study of Cellic CTec2 with recycling and reuse. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2019;(0123456789).
  156. Wang W, Zhuang X, Tan X, Wang Q, Chen X, Yu Q, et al. Dual effect of nonionic surfactants on improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Energy and Fuels.* 2018;32(5):5951–9.
  157. Luo Z, Zhang Y, Bao J. Extracellular secretion of  $\beta$ -glucosidase in ethanologenic *E. coli* enhances ethanol fermentation of cellobiose. *Appl Biochem Biotechnol.*

- 2014;174(2):772–83.
158. Reis VR, Bassi APG, Cerri BC, Almeida AR, Carvalho IGB, Bastos RG, et al. Effects of feedstock and co-culture of *Lactobacillus fermentum* and wild *Saccharomyces cerevisiae* strain during fuel ethanol fermentation by the industrial yeast strain PE-2. *AMB Express*. 2018;8:23.
  159. Basotra N, Dhiman SS, Agrawal D, Sani RK, Tsang A, Chadha BS. Characterization of a novel Lytic Polysaccharide Monooxygenase from *Malbranchea cinnamomea* exhibiting dual catalytic behavior. *Carbohydr Res*. 2019;478:46–53.
  160. Chalak A, Villares A, Moreau C, Haon M, Grisel S, D'Orlando A, et al. Influence of the carbohydrate-binding module on the activity of a fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenase on cellulosic substrates. *Biotechnol Biofuels*. 2019;12:206.
  161. Brugnari T, Gimenez M, Adriana G, Neiverth E, Freitas D, Graça A, et al. A highly reusable MANAE-agarose-immobilized *Pleurotus ostreatus* laccase for degradation of bisphenol A. *Sci Total Environ*. 2018;634:1346–51.
  162. Onuma H, Hara K, Sugita K, Kano A, Fukuta Y, Shirasaka N. Purification and characterization of a glycoside hydrolase family 5 endoglucanase from *Tricholoma matsutake* grown on barley based solid-state medium. *J Biosci Bioeng*. 2019;128(6):669–76.
  163. Schiano-di-Cola C, Kołaczowski B, Sørensen TH, Christensen SJ, Cavaleiro AM, Windahl MS, et al. Structural and biochemical characterization of a family 7 highly thermostable endoglucanase from the fungus *Rasamsonia emersonii*. *FEBS J*. 2019;10.1111/febs.15151.
  164. Bernardi AV, Yonamine DK, Uyemura SA, Dinamarco TM. A thermostable *Aspergillus fumigatus* GH7 endoglucanase over-expressed in *Pichia pastoris* stimulates lignocellulosic biomass hydrolysis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9).
  165. Cao H, Zhang Y, Shi P, Ma R, Yang H, Xia W, et al. A highly glucose-tolerant GH1  $\beta$ -glucosidase with greater conversion rate of soybean isoflavones in monogastric animals. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2018;45(6):369–78.
  166. Patel H, Kumar AK, Shah A. Purification and characterization of novel bi-functional GH3 family  $\beta$ -xylosidase/ $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* ADH-11. *Int J Biol Macromol*. 2018;109:1260–9.
  167. Biely P. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. *Biotechnol Adv*. 2012;30(6):1575–88.
  168. Monrad RN, Eklöf J, Krogh KBRM, Biely P. Glucuronoyl esterases: diversity, properties and biotechnological potential. A review. *Crit Rev Biotechnol*. 2018;38(7):1121–36.

169. Arnling Bååth J, Giummarella N, Klaubauf S, Lawoko M, Olsson L. A glucuronoyl esterase from *Acremonium alcalophilum* cleaves native lignin-carbohydrate ester bonds. *FEBS Lett.* 2016;590:2611–8.
170. Knoch E, Dilokpimol A, Geshi N. Arabinogalactan proteins: Focus on carbohydrate active enzymes. *Front Plant Sci.* 2014;5:1–9.
171. Villa-Rivera MG, Zavala-Páramo MG, Conejo-Saucedo U, López-Romero E, Lara-Márquez A, Cano-Camacho H. Differences in the expression profile of endo- $\beta$ -(1,6)-D-galactanase in pathogenic and non-pathogenic races of *Colletotrichum lindemuthianum* grown in the presence of arabinogalactan, xylan or *Phaseolus vulgaris* cell walls. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2017;99:75–86.
172. Arthornthurasuk S, Jenkhetkan W, Suwan E, Chokchaichamnankit D, Srisomsap C, Wattana-Amorn P, et al. Molecular characterization and potential synthetic applications of GH1  $\beta$ -glucosidase from higher termite *Microcerotermes annandalei*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2018;186(4):877–94.
173. Mohsin I, Poudel N, Li DC, Papageorgiou AC. Crystal structure of a GH3  $\beta$ -glucosidase from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum*. *Int J Mol Sci.* 2019;20(23):1–15.
174. Adav SS, Li AA, Manavalan A, Punt P, Sze SK. Quantitative iTRAQ secretome analysis of *Aspergillus niger* reveals novel hydrolytic enzymes. *J Proteome Res.* 2010;9(8):3932–40.
175. Zhou Z, Lei F, Li P, Jiang J. Lignocellulosic biomass to biofuels and biochemicals: A comprehensive review with a focus on ethanol organosolv pretreatment technology. *Biotechnol Bioeng.* 2018;115:2683–702.
176. Monte JR, Laurito-Friend DF, Mussatto SI, Milagres AMF. Comparative evaluation of acid and alkaline sulfite pretreatments for enzymatic saccharification of bagasses from three different sugarcane hybrids. *Biotechnol Prog.* 2018;34(4):944–51.
177. Pietrobon VC, Monteiro RTR, Pompeu GB, Borges EP, Lopes ML, de Amorim HV, et al. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with acid or alkali. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2011;54(4):229–33.
178. Neves P V., Pitarelo AP, Ramos LP. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: Effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies. *Bioresour Technol.* 2016;208:184–94.
179. Abo BO, Gao M, Wang Y, Wu C, Ma H, Wang Q. Lignocellulosic biomass for bioethanol: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. *Rev Environ Health.* 2019;34(1):57–68.
180. Michelin M, Polizeli MLTM, Ruzene DS, Silva DP, Ruiz HA, Vicente AA, et al. Production of xylanase and  $\beta$ -xylosidase from autohydrolysis liquor of corncob



- using two fungal strains. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2012;35(7):1185–92.
181. Scarcella ASA, Somera AF, Nunes CC, Gomes E, Vici AC, Buckeridge MS, et al. Matrix discriminant analysis evidenced surface-Lithium as an important factor to increase the hydrolytic saccharification of sugarcane bagasse. *Molecules.* 2019;24(19):3614.
  182. Aita GA, Salvi DA, Walker MS. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of dilute ammonia pretreated energy cane. *Bioresour Technol.* 2011;102(6):4444–8.
  183. Balakshin M, Capanema E, Berlin A. Isolation and analysis of Lignin–Carbohydrate Complexes preparations with traditional and advanced methods. In: *Studies in Natural Products Chemistry.* Elsevier B.V.; 2014. p. 83–115.
  184. Lamounier KFR, Rodrigues PO, Pasquini D, dos Santos AS, Baffi MA. Ethanol production and other bioproducts by *Galactomyces geotrichum* from sugarcane bagasse hydrolysate. *Curr Microbiol.* 2020;(0123456789).
  185. Cintra LC, da Costa IC, de Oliveira ICM, Fernandes AG, Faria SP, Jesuino RSA, et al. The boosting effect of recombinant hemicellulases on the enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse. *Enzyme Microb Technol.* 2020;133:109447.
  186. Silveira MHL, Vanelli BA, Chandel AK. Second generation ethanol production: Potential biomass feedstock, biomass deconstruction, and chemical platforms for process valorization. In: Chandel AK, Silveira MHL, editores. *Advances in Sugarcane Biorefinery.* Elsevier; 2018. p. 135–52.

# ANEXOS

**MEIOS DE CULTIVO****Meio Batata Dextrose Agar (BDA) (Himedia)**

BDA	3,9 g
Água deionizada q.sp.	100 mL

Autoclavar a 121° C por 20 minutos.

**Meio de Aveia**

Farelo de aveia	4,0 g
Glucose	1,0 g
Ágar	2,0 g
Água deionizada q.s.p.	100 mL

Autoclavar a 121° C por 20 minutos.

**Meio mínimo**

Sais de nitrato (20x)	5 mL
Elementos traço (1000x)	0,1 mL
Glucose	1,0 g
Água destilada q.s.p	100 mL

Ajustar pH para 6,5.

Autoclavar a 121° C por 15 minutos.

## SOLUÇÕES

### Soluções utilizadas nos meios de cultura

#### Sais de nitrato 20x

NaNO <sub>3</sub>	120 g
KCl	10,4 g
MgSO <sub>4</sub>	10,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30,4 g
Água destilada q.s.p	1 L

Adicionar algumas gotas de clorofórmio

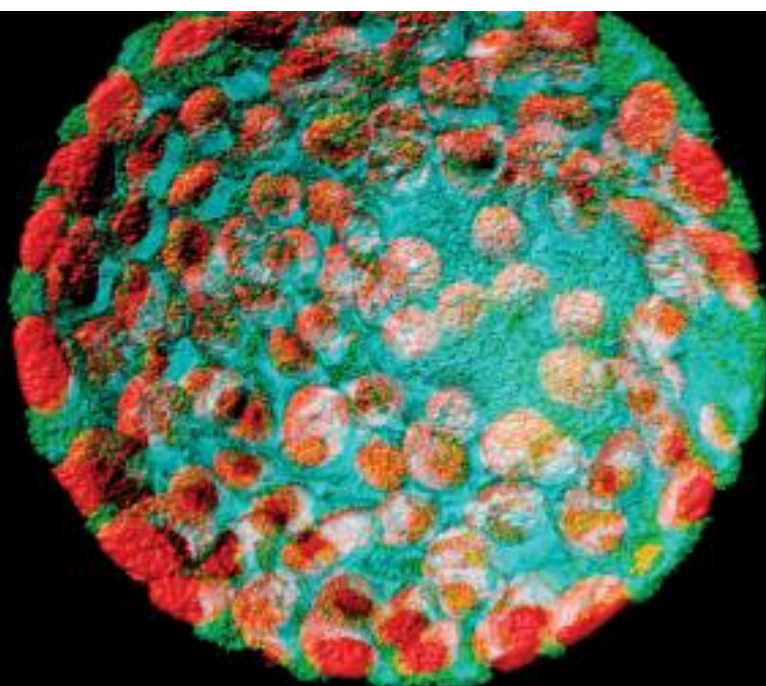
#### Solução de elementos traço 1000x

ZnSO <sub>4</sub>	2,2 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,0 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
CoCl <sub>2</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,16 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,16 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,11 g
Na <sub>2</sub> EDTA	5,0 g
Água destilada q.s.p	100 mL

Ajustar pH para 6,5.

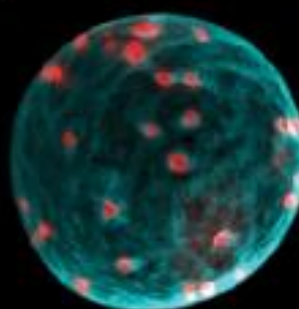
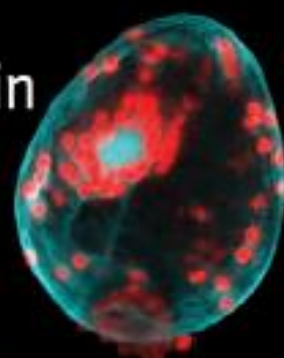
Adicionou-se algumas gotas de clorofórmio

# APÊNDICE I



# New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering

Aspergillus System Properties and Applications



Edited by  
Vijai Kumar Gupta

## Chapter 9

# Enzyme System from *Aspergillus* in Current Industrial Uses and Future Applications in the Production of Second-Generation Ethanol

M.L.T.M. Polizeli, A.C. Vici, A.S.A. Scarcella, M. Cereia and M.G. Pereira

*Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil*

## INTRODUCTION

Currently, features such as climate change, scarcity of petroleum reserves, and increase in the costs of fuels have stimulated an unprecedented research into the production of alternative fuels, preferably from renewable energy sources. Beyond these reasons, it is necessary to be aware of environmental preservation, what justifies new viable technologies for the production of fuels.

The replacement of petroleum-derived fuels by biofuels could contribute to reduce environmental impacts and lignocellulosic biomass from sugarcane has been identified as an excellent alternative among the potential sources of biofuel production.

Ethanol production from sucrose corresponds to one-third of sugarcane biomass. The other two-thirds correspond to bagasse and straw. Currently, bagasse is used as a fuel, being burned in boilers to fulfill the demands of industrial energy, but statistics show that there is still a surplus of 30% of this product. Straw is usually burned before harvest in order to facilitate this process, or it is left in the field to be used as a fertilizer and pest control (Leal et al., 2013; Pereira et al., 2015).

There is a technological challenge to be overcome so that straw does not undergo decomposition in the field (Dias et al., 2013; Gnansounou et al., 2015). One solution is to take advantage of the sugar contained in the bagasse and straw to produce second-generation ethanol—named this way in reference to the oldest form of production, made from sugarcane juice. Second-generation ethanol is considered the biofuel with the greatest potential to replace fossil fuels and may also increase productivity without changing the planted area (Santos et al., 2011; Pereira et al., 2015).

Brazil, followed by India, China, and Thailand are the largest sugarcane producers in the world. A large extension of its territory is destined to the cultivation of sugarcane. The crop of 2014/15 was estimated in 613 million tons of sugarcane to be processed by Brazilian sugar-alcohol mills, resulting in an ethanol production of approximately 28 billion liters and an output of sugar of about 36 million tons. In the production of first-generation ethanol each ton of processed sugarcane bagasse generates 140 kg of bagasse and 140 kg of trash, on a dry base (db) (Oliveira et al., 2013; Pereira et al., 2015).

Bagasse and straw from sugarcane are constituted by lignocellulosic components (cellulose, hemicellulose, and lignin) connected in a complex manner in the cell wall. Hemicellulose is mainly composed by xylose (five-carbon sugar), and few industries use this. Lignin has a high calorific potential to produce energy that can be used in industrial processes, such as ethanol production. This intricate architecture and the recalcitrant nature of the biomass result in a technological barrier for second-generation ethanol production.

In order to obtain the complete degradation of cellulose and hemicellulose up to, especially, glucose, it is suggested to subject sugarcane bagasse to physical and chemical pre-treatments. For example, steam explosion, acid and alkali treatments, followed by the use of efficient enzymatic systems. Doing so would increase sugar yields that could be used by yeasts in the fermentation process, which is the final phase of bioethanol production (Oliveira et al., 2013).

This chapter will focus on the components and the functional properties of the cellulolytic and hemicellulolytic systems produced by *Aspergillus*, which are important filamentous fungi related to the production of enzymes that



degrade plant cell wall components, completing the enormous spectrum of possibilities where enzyme systems can be used in current industrial applications.

## BIODIVERSITY AND BIOPROSPECTING

Biodiversity comprises the variability of life on Earth, including genetic variability in populations and species; the variability of flora and fauna species, macroscopic fungi and microorganisms, the variability of ecological functions performed by organisms in the ecosystems and, the variability of communities, habitats, and ecosystems formed by organisms (<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Seresvivos/Ciencias/biodiversidade.php>). The network of living organisms, through a combination of biochemical activities of its plants, animals, and microorganisms, unifies physical and chemical atmosphere, geosphere, and hydrosphere in an environmental system including millions of species.

All the benefits produced by this network can be used to overcome the energy problems the world faces today, generating solutions and profits. On the other hand, local and global environmental changes can generate indirect effects on biodiversity influencing the intensity and magnitude of existing stressors, such as invasive species, rainfall, fire regime, structure, functions and processes of ecosystems, leading to biodiversity loss, as well as genetic variety loss and species extinction, especially in vulnerable and fragmented ecosystems.

It is estimated that only 10% (2.0 million) of the species existing in the world are known. Brazilian biodiversity is estimated to be between 15 and 25% (200,000 species) of global biodiversity (most of these are large taxa). However, there is a big gap of knowledge to be remedied and these data justify the prospection of new species.

Therefore, the need for new strategies as bioprospecting, aiming to improve and expand the studies on the biota that can collect, isolate, and make available existing information is evident for the conservation and implementation of management practices that could increase the resilience of ecosystems, reducing environmental impact changes and other stressors.

## The Genus *Aspergillus*

In the context of microorganism biodiversity, fungi from *Aspergillus* genus are frequently found on the soil. This genus contributes with the expansion of biological knowledge, because they can be used as biochemical and molecular tools and they can be easily isolated and studied.

*Aspergillus* genus was initially described in 1729 by Pier Antonio Micheli, marking the starting point of mycology as science in his "New Genera Plantarum" (Micheli, 1729). The genus name is due to the morphological similarity of the conidial head to a sprinkler. Later, the term was

validated by Link in 1809. It belongs to Eurotiales order, and Trichocomaceae family. About one-third of *Aspergillus* species have been described as having a well-known sexual type (Geiser et al., 2008).

*Aspergillus* comprises a diverse group of species based on morphological, physiological, and phylogenetic characters which significantly affect biotechnology as in food production, indoor environments, and human health.

*Aspergillus* was traditionally associated with nine teleomorphic genera, but the phylogenetic data suggest that along with *Polypaecilum*, *Phialosimplex*, *Dichotomomyces*, and *Cristaspora* genera, *Aspergillus* form a monophyletic clade close to *Penicillium* (Samson et al., 2014). The number of recognized species of *Aspergillus* has been changing due to the construction of phylogeny by biochemical and molecular tools, and the application of the phylogenetic species concept. Currently the genus *Aspergillus* comprises 339 species, which were collected and identified by ITS, calmodulin,  $\beta$ -tubulin, and RPB2 sequences (Samson et al., 2014).

*Aspergillus* species are used in the fermentation industry, but are also responsible for various plant diseases, which may lead to a possible accumulation of mycotoxins. The aflatoxin produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, and the ochratoxinogenic species, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, and *Aspergillus carbonarius* are often found in agricultural products. Studies on the biodiversity of *Aspergillus* species that produce toxins are useful to clarify molecular, biochemical, and ecological characteristics of the different species in relation to adapting to different environmental and geographical conditions, and their potential toxigenicity (Perrone et al., 2007).

*Aspergillus* rapidly multiply in stored or decaying plant material (grains, fruits, seeds, etc.). They use a wide range of temperature and humidity, and are aerobic, infecting many substrates (Perrone et al., 2007).

## Section *Nigri*

Species of *Aspergillus nigri*, included in *Nigri* section have been widely studied for the past 70 years, especially using morphological criteria. Despite being intensively studied through biochemical and molecular criteria for classification purposes, it remains very controversial.

Abarca et al. (2004) conducted a broad review on *Nigri* section describing the taxonomic problems and the importance of different species described up to that point. In the same year, Samson et al. (2004) described four new species, forming 15 taxa: *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricensis*, *A. ellipticus*, *A. japonicus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. sclerotiumniger*, *A. tubigensis*, and *A. vadensis*. The authors based their study on the differentiation between eight different kinds



of profiles, some secondary metabolites and morphological characteristics. New species proposals, such as *A. ibericus* (Serra et al., 2006), *A. avarum* (Perrone et al., 2008), *A. scleroticarbonarius*, and *A. aculeatinus* (Noonim et al., 2008) were subsequently added to this new classification.

### ENZYME SYSTEM FROM ASPERGILLUS APPLIED IN CURRENT INDUSTRIAL USES AND SECOND-GENERATION ETHANOL

Many *Aspergillus* species, mainly the black *Aspergillus* strains, are used in the biotechnology and food industries due to their capacity to secrete high amounts of enzymes and organic acids. Among industrial applications of *Aspergillus* sp. metabolites, some are noteworthy such as, citric acid, chymosin, arabinanase, asparaginase,  $\beta$ -galactosidase, glucoamilase, lipase, phytase, protease, hemicellulase, and cellulase produced by *A. niger*; kojic acid,  $\alpha$ -amylase, asparaginase,  $\beta$ -galactosidase, pectin esterase, glucose oxidase, lipase, phytase, protease, and tannase from *Aspergillus oryzae*; and itaconic acid and lovastatin produced by *Aspergillus terreus* (Olempska-Bleer et al., 2006; Meyer, 2008; Fiedler et al., 2013). Citric acid and kojic acid are used in the food industry while itaconic acid is used in the polymer industry, and lovastatin in the pharmaceutical industry. Regarding the *Aspergillus* enzymes,

$\alpha$ -amylase and glucoamylase are applied in starch processing;  $\beta$ -galactosidase and phytase are used in the food industry; lipase and protease are employed in the food and detergent industries; and cellulases and hemicellulases are applied in textile, pulp, and paper industries (Meyer, 2008).

Green methods of biomass transformation use fungal enzymes, as for example, in the conversion of lignocellulosic biomass, abundant in several agroindustrial residues. Fungi secrete multiple enzymes able to hydrolyze complex polysaccharides releasing monomeric fermentable sugars, especially glucose and xylose, which can be converted into second-generation ethanol (Fig. 9.1).

Several industrial companies use degrading enzymes obtained from *Trichoderma reesei* for biomass production, however, *Aspergillus* represent an interesting alternative with enormous potential to obtain these enzymes (Baker et al., 2008; Bennett, 2010)

### Lignocellulosic Biomasses Depolymerization for Second-Generation Ethanol Production

Approximately 90% of plant cell wall consists of polysaccharides and these are divided into three main groups: cellulose, hemicellulose, and pectin (McNeil et al., 1984). Pectin is a complex carbohydrate polymer abundant in fruits. Small pectin amounts are present in biomass used

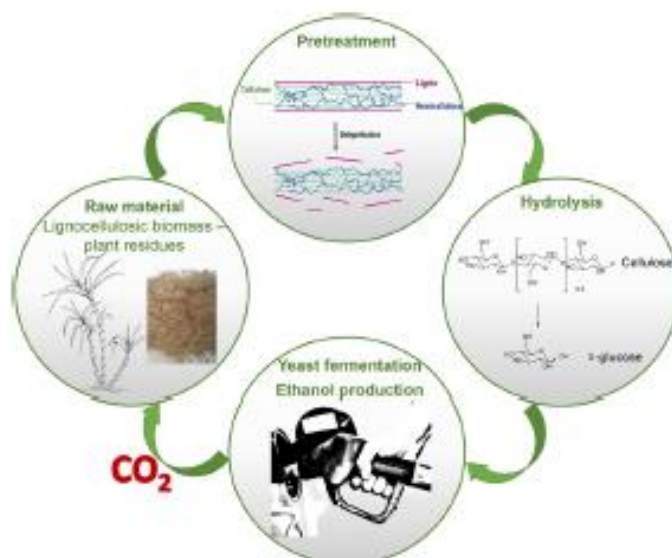


FIGURE 9.1 Second-generation ethanol production and CO<sub>2</sub> recycling. Lignocellulosic biomasses are pretreated for delignification. Hemicellulose is hydrolyzed in fermentable sugars, which are used for ethanol production.

for ethanol production (Segato et al., 2014). Cellulose and hemicellulose quantities are variable in plants, for example, sugarcane bagasse has about 35% cellulose and 24% hemicellulose whereas pine wood has 28–36% cellulose and 10–16% hemicellulose (Carrasco et al., 1994; Rezende et al., 2011). Nevertheless, cellulose and hemicellulose amounts may vary according to the plant variety utilized.

Hemicellulose and lignin (an aromatic polymer) interact with cellulose fibrils, by covalent crosslinks, producing a rigid structure in the plant cell wall (De Vries and Visser, 2001). The economic success of second-generation ethanol production depends on the optimization of the depolymerization of lignocellulosic biomass. However, as the lignocellulose is a recalcitrant material it is necessary to perform a pretreatment step that breaks the plant cell wall and fractionates its constituents or makes them more accessible to enzymatic hydrolysis.

Pretreatment can be physical (eg, extrusion), chemical (eg, alkali, acid, and organosolv) or a combination of both processes (eg,  $\text{SO}_2$ -steam explosion, microwave, and  $\text{CO}_2$  explosion). Each pretreatment has a specific effect on different lignocellulosic fractions and should be chosen according to the next steps to be performed for material hydrolysis (Alvira et al., 2010).

Cellulases, hemicellulases, and accessory enzymes are required for biomass hydrolysis and these enzymes act in cooperation or synergism; therefore, they should compose enzymatic cocktails for biomass saccharification. Synergism has been reported for many *Aspergillus* enzymes, including many xylanases and accessory enzymes involved in xylan degradation (De Vries and Visser, 2001). These enzymes are glycosyl hydrolyzes included in CAZy families.

As most polymers of plant cell wall are insoluble or connected to cellulose matrix, many cellulases and hemicellulases are modular proteins. In addition to catalytic domain (CD), these enzymes include other functional modules such as carbohydrate binding modules (CBMs). CBMs facilitate interaction between the enzyme and insoluble polysaccharides increasing enzyme concentration on substrate surface, improving the hydrolysis rate (Guillén et al., 2010; Furtado et al., 2015).

### Structure and Degradation of Cellulose

Cellulose consists on a linear polymer made by hundreds to thousands of  $\alpha$ -glucose units connected by  $\beta$ -1,4-glycoside linkages. Thirty-six parallel glucan chains compose the cellulose 10-nm diameter microfibrils in a paracrystalline, linear, and hexagonal arrangement (Himmel et al., 2007). Cellulose chains are formed by successive glucose residues rotated 180 degrees forming a cellobiose repetition (a glucose disaccharide). The crystalline structure of cellulose is maintained by intra- and intermolecular hydrogen bonds and van der Waals forces, because glucose chair conformation in cellulose forces the hydroxyl groups into radial orientation and the aliphatic hydrogen atoms into axial positions (Himmel et al., 2007; Sorek et al., 2014). Apart from this crystalline structure, cellulose presents amorphous regions and the relative amounts of crystalline and amorphous cellulose vary depending on the origin (Lin et al., 1987; De Vries and Visser, 2001).

Cellulose can be hydrolyzed into cellobiose and glucose through the action of several enzymes including cellobiohydrolases, endoglucanases,  $\beta$ -glucosidases, and accessory enzymes (Fig. 9.2).

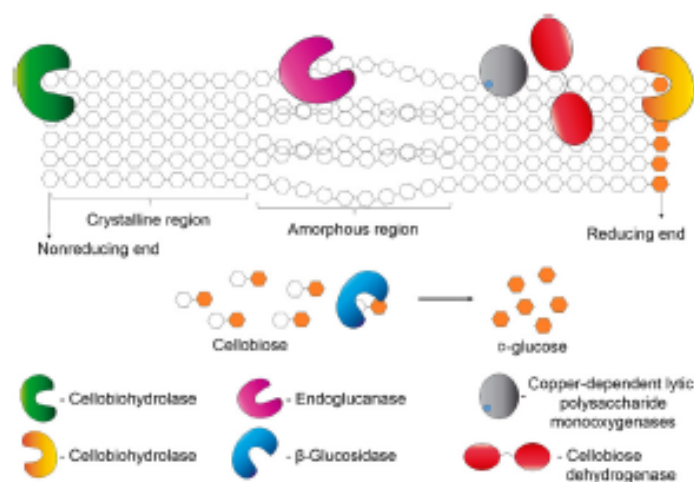


FIGURE 9.2 Cellulose hydrolysis by enzymatic action.

Two CAZy glycosyl hydrolase families (GH) compose the *cellobiohydrolases* group. GH6 (EC 3.2.1.91) and GH7 (EC 3.2.1.176) hydrolyze  $\beta$ -1,4-glycoside bonds in cellulosic nonreducing and reducing ends, respectively, and release cellobiose. Many *Aspergillus* strains secrete cellobiohydrolases such as *Aspergillus ficuum*, which secretes two GH6 cellobiohydrolases (CBHI and CBHII) (Hayashida et al., 1988). Two GH7 cellobiohydrolases, CbhA and CbhB, were isolated from *A. niger* (Gielkens et al., 1999). In addition, some *Aspergillus* strains are hosts for other fungi cellobiohydrolases, such as *Aspergillus niveus* Cbh-1 and CelD, expressed as client proteins in *Aspergillus nidulans* (Segato et al., 2012).

*Endoglucanases* (EC 3.2.1.4) hydrolyze  $\beta$ -1,4-glycoside bonds intramolecular in amorphous cellulose. These enzymes are part of 13 CAZy families, however, only four of these are present in *Aspergillus*: GH5, GH7, GH12, and GH45 (Yennamalli et al., 2013; Segato et al., 2014). *Aspergillus* endoglucanases have constantly been investigated, such as in *Aspergillus fumigatus* (Parry et al., 1983), *A. niger* (Hasper et al., 2002; Quay et al., 2011), and *A. terreus* (Elshafei et al., 2009; Narra et al., 2014).

$\beta$ -Glucosidases (EC 3.2.1.21) are enzymes that hydrolyze cellobiose and cellodextrins releasing monomeric glucose. They are included in GH1 and GH3 CAZy families.  $\beta$ -Glucosidases are key catalysts in lignocellulosic biomass degradation, because they release glucose, which is easily converted into ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* fermentation. The most-studied *Aspergillus*  $\beta$ -glucosidases are *A. niger*  $\beta$ -glucosidases (Watanabe et al., 1992; Peshin and Mathur, 1999; Vaithanomsat et al., 2011; Gong et al., 2014). However, there are some works with other *Aspergillus*  $\beta$ -glucosidases including *Aspergillus kawachii* (Iwashita et al., 1999), *Aspergillus aculeatus* (Kuwaguchi et al., 1996), *A. terreus* (Giraldo et al., 2014), and *A. fumigatus* (Das et al., 2015).

In addition to those cellulases, there are accessory enzymes to the cellulolytic system. *Copper-dependent hemicellulosic polysaccharide monooxygenases* (LPMO) are included in GH61 CAZy family and Auxiliary Activity Family 9 (AA9). These enzymes enhance the cellulolytic activity because they cleave cellulose by C-1, C-4, and C-6 carbon oxidation in lignocellulosic hydrolysis (Wu et al., 2013). Segato et al. (2014) described some *Aspergillus* that possess LPMO genes, such as *Aspergillus clavatus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, and *A. terreus*.

*Cellobiose dehydrogenase* (CDH) (EC 1.1.99.18) is another accessory enzyme class. One to three CDH genes are present in *Aspergillus* sp. *A. niger* has one, whereas *A. nidulans* have two, and *A. oryzae* have three CDH genes (Segato et al., 2014). In the presence of an electron acceptor (eg, ferricyanide and cytochrome c), CDH oxidizes cellobiose to cellobiolactone. CDH may increase cellulose degradation by coupling the cellobiose oxidation to reductive LPMO activation (Phillips et al., 2011).

### Structure and Degradation of Hemicellulose

In contrast to cellulose, hemicellulose is a heteropolymer formed by linear and branched chains. This polysaccharide is composed by some monosaccharides units such as D-xylose, D-mannose, D-glucose, L-arabinose, D-galactose, D-glucuronic acid, and D-galacturonic acid (Polizeli et al., 2005). Thus, the hydrolysis of the hemicellulose to sugar monomers only occurs through the action of several enzymes that work in cooperation or synergism (Fig. 9.3). Xylan, a polymer primarily composed of D-xylose, is the main hemicellulose class. Nevertheless, hemicelluloses further include mannans, glucomannans, xyloglucans, arabinans, and galactans.

The most important xylan-degrading enzymes are *endo- $\beta$ -1,4-xylanase* (EC 3.2.1.8) and  *$\beta$ -D-xylosidase* (EC 3.2.1.37). *Endo- $\beta$ -1,4-xylanases* cleave internal glycosidic linkages of xylan backbone decreasing the polymerization substrate degree, releasing xylose, and mainly xylooligosaccharides. *Aspergillus* *endo- $\beta$ -1,4-xylanase* are grouped in GH10 and GH11 families, though a few bacterial xylanases and one *T. reesei* are included in GH5 family (Giallardo et al., 2010; Segato et al., 2014).

Xylanases are produced by many *Aspergillus* species, such as *A. fumigatus*, *A. niveus*, *A. niger*, and *A. ochraceus* (Betini et al., 2009; Peixoto-Nogueira et al., 2009). Both xylanase families (GH10 and GH11) are present in *Aspergillus* genomes, for example, GH10 and GH11 xylanase genes from *Aspergillus versicolor* (Jeya et al., 2009) and GH11 *A. niveus* xylanase (XAN) expressed in *A. nidulans* (Damásio et al., 2011).

*$\beta$ -D-xylosidases*, belonging to GH3 and GH43 families, hydrolyze  $\beta$ -1,4-D-xyloxylooligosaccharides, and xylobiose from the nonreducing end releasing xylose. According to the analysis of *Aspergillus* xylosidase sequences, most of these enzymes belong to the GH3 family, while GH43 xylosidases are less common (De Vries and Visser, 2001; Segato et al., 2014).  $\beta$ -D-xylosidases were isolated, for example, from *A. versicolor* (Andrade et al., 2004; Somera et al., 2009), *A. oryzae* (Kirikyali et al., 2014), and *A. terreus* (Sharma et al., 2014) among others.

Several studies demonstrate *Aspergillus* sp. secrete both *endo- $\beta$ -1,4-xylanases* and  *$\beta$ -D-xylosidases* in the same culture, such as *Aspergillus phoenicis* (Rizzatti et al., 2004), *Aspergillus terricola* (Michelin et al., 2011), *A. ochraceus* (Michelin et al., 2012c), and *A. niger* (Michelin et al., 2013).

L-Arabinoses contained in heteropolysaccharides are hydrolyzed by *arabinanases* (EC 3.2.1.99) and *arabinofuranosidases* (EC 3.2.1.55). Arabinanases hydrolyze  $\alpha$ -1,5-arabinofuranosidic bonds releasing arabinose or arabinol oligomers (Carapito et al., 2009). Arabinofuranosidases hydrolyze  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3-, and  $\alpha$ -1,5-L-arabinofuranosidic bonds in the substrate as arabinoxylan and L-arabinan from nonreducing end residues (Saha, 2000). *Aspergillus* arabinanases belong to GH43 and GH93 families and



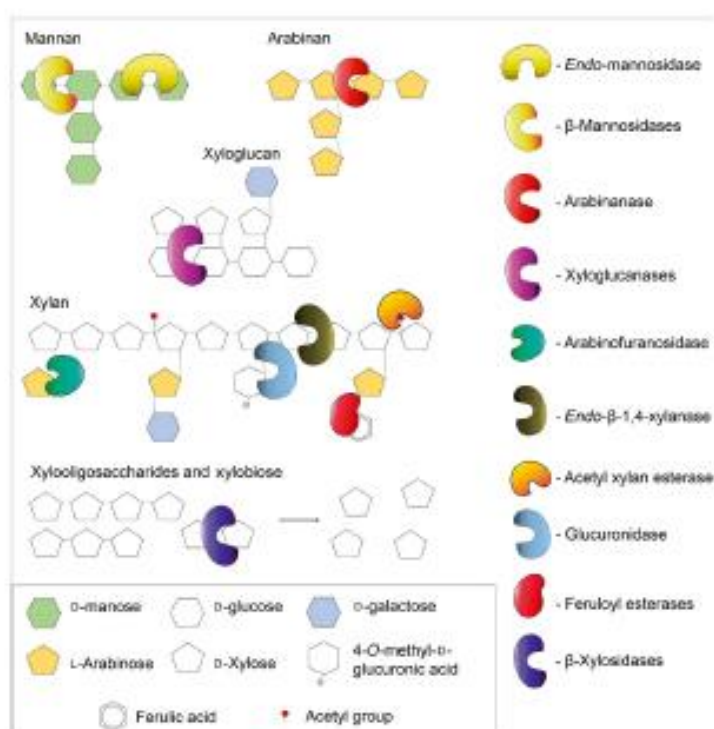


FIGURE 9.3 Hemicellulose hydrolysis by enzymatic action.

$\alpha$ -L-arabinofuranosidase into GH51, GH54, and GH62 groups (Segato et al., 2014). Arabinanase and arabinofuranosidase were isolated from *A. niger* and expressed in *A. nidulans* (Damásio et al., 2012a,b).

Glucuronic acid is another existing residue in hemicellulose. It composes glucuronans—formed by glucuronic acid only—and glucuronoglycan—formed by glucuronic acid and other sugars as side chains (Ovođov, 1975). Glucuronic acid is hydrolyzed by  $\beta$ -glucuronidases (EC 3.2.1.31) and xylan  $\alpha$ -1,2-glucuronidases (EC 3.2.1.131). *Aspergilli*  $\beta$ -glucuronidases are included in GH2 and GH79, whereas xylan  $\alpha$ -1,2-glucuronidases are found in GH67 and GH115 families (Segato et al., 2014). Despite a few recent studies about these enzymes in *Aspergillus* sp., one can find such studies about  $\beta$ -glucuronidase from *A. niger* (Haq et al., 2005) and *A. terreus* (Haroon et al., 2012).

Xyloglucan endo- $\beta$ -1,4-glucanases (EC 3.2.1.151) hydrolyze xyloglucan backbone. Xyloglucan is formed by a backbone chain of  $\beta$ -1,4-glucan linked to xylosyl side chains at O-6 position of glycosyl residues (De Vries and Visser,

2001; Dick-Pérez et al., 2011). This saccharide is associated with cellulose microfibril. Xyloglucanases are included in GH5, GH12, GH16, and GH74 families. An example of GH12 xyloglucanases is one isolated from *A. niger* and expressed in *Escherichia coli* (Furtado et al., 2015).

Another hemicellulose is mannan, a linear polysaccharide composed by D-mannose or glucose and mannose combination with galactosyl side groups. Mannan is deconstructed by the action of endo-1,4- $\beta$ -mannosidase (EC 3.2.1.78) and  $\beta$ -mannosidases (EC 3.2.1.25). Endo-1,4- $\beta$ -mannosidase, included in GH26 CAZy family, randomly hydrolyzes linkages in the backbone of mannans, glucomannans, and galactomannans.  $\beta$ -Mannosidases (GH2 and GH5) hydrolyze mannan from the nonreducing end. Endo- $\beta$ -mannanases are reported, for example, in *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus* (Alsarrani, 2011), *A. nidulans* (Rosengren et al., 2014), and *A. niger* (Do et al., 2009).

In addition to the enzymes previously described, accessory enzymes are necessary to hydrolyze functional groups attached to D-xylopyranoside backbone. Accessory

enzymes are included in CAZy carbohydrate esterase family (CE) and one of these enzymes is the *acetyl xylan esterase* (EC 3.1.1.72). This biocatalyst removes *O*-acetyl substituents from the C-2 and/or C-3 position of xylose residues in acetyl xylan (Biely et al., 2011).

*Feruloyl esterases* or ferulic acid esterases (EC 3.1.1.73) cleave ester linkages between the arabinose side chains and ferulic acid present in hemicellulose (Crepin et al., 2004). Ferulate ester groups form crosslinks between hemicellulose and lignin (Abokitse et al., 2010).

In *Aspergilli*, acetyl xylan esterase is included in CE1, CE3, CE5, and CE16 families and feruloyl esterase into CE1 (Segato et al., 2014). Acetyl xylan esterase is studied in *Aspergillus ficuum* (Park, 2011) and *A. niger* (Koutaniemi et al., 2013). On the other hand, feruloyl esterase has been studied in several *Aspergillus* strains, including *Aspergillus awamori* (Gottschalk et al., 2013), *A. clavatus* (Dumásio et al., 2013a), *A. flavus* (Zhang et al., 2013), and *A. ussuri* (Gong et al., 2013; Yin et al., 2015).

Although *Aspergilli* are generally excellent cell factories for the production of several enzymes in large scale, some species may produce toxins. Moreover, many of these fungi require complex and expensive means of crops and generate enzymatic extracts with many contaminating proteins, which make purification difficult. These factors make cloning genes encoding enzymes of some *Aspergilli* in expression systems using organisms considered GRAS (Generally Recognized as Safe) preferable. Expression systems may use less expensive culture media and allow better control in the production of client proteins through the use of specific inducers (depending on the vector used). Furthermore, through genetic engineering, it is possible to produce, for example, enzymes fused to a poly-His tail, which facilitates the purification of this protein, and also produce two or more fused enzymes known as chimeras.

Table 9.1 summarizes some intrinsic and kinetic properties of *Aspergilli* enzymes able to degrade lignocellulosic materials for the production of second-generation ethanol in a biorefinery. The studied strains were isolated during SISBIOTA BRAZIL project, coordinate by Dr. Maria de Lourdes T. M. Polizeli, one of the authors of this chapter. This project was based on the study of filamentous fungi isolated from soil, decomposing materials, humus, and plants, from biomes of all regions in Brazil, such as Amazon (Northern Region); Pantanal; Cerrado of Mato Grosso do Sul, Mato Grosso and from Federal District (Central West Region); regions of Sergipe and Bahia (Northeast Region); forests and parks from São Paulo and Rio de Janeiro (Southeast Region), and forests and parks from Paraná (South Region).

Many fungi studied in this project are novel isolates with little available literature concerning  $\beta$ -1,4-xylanase;  $\beta$ -*D*-xylosidase; *endo*- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase;  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase; xyloglucanase; *endo*- $\beta$ -1,4-glucanase; *exo*-glucanase; and  $\beta$ -glucosidase, as *A. niveus*, *A. phoenicis*,

*A. ochraceus*, *A. caespitosus*, etc. As described in Table 9.1, all wild types of isolated fungi synthesized the xylanolytic system, except *A. versicolor*, another *Aspergilli* produced *endo*- $\beta$ -1,4-xylanase with molecular masses varying from 17.7 to 32kDa and optima of temperature and pH in the range of 50–70°C and 3.5–8.0, respectively.  $\beta$ -*D*-xylosidases were studied from *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. phoenicis*, *A. terricola*, and *A. versicolor*, presenting molecular masses of 59–137kDa and optima of temperature and pH in the range of 40–90°C and 3.5–6.0, respectively. Cellulolytic enzymes from *Aspergillus japonicus* have been studied and presented optima of temperature and pH of 50–55°C and 4.0, respectively. On the other hand,  $\beta$ -glucosidase of this fungus had a molecular mass of 114kDa, temperatures between 60°C to 65°C and pH 4.0.

Fibrolytic enzymes of several *Aspergilli*, but mainly *A. niveus*, were expressed in *A. nidulans* as referenced in Table 9.1. Among heterologous enzymes, xylanases, arabinofuranosidases, arabinanase, and cellobiohydrolase may be cited. However, the gene of a xyloglucanase was expressed in *E. coli*, forming a chimera, which consisted of the fusion of xyloglucan-specific CBM44 with xyloglucanase GH12 from *A. niveus*. This enzyme showed molecular mass of 56kDa and optima of temperature and pH as 60°C and 5.5, respectively.

## PERSPECTIVES AND CONCLUDING REMARKS

There are many different routes to improve processes for the production of cellulosic biofuels. *Aspergillus* sp. have several enzymes that deconstruct lignocellulosic biomass, nevertheless, the achievement of the complete hydrolysis of this material requires the action of several factors. Primarily, the sugarcane family is made up of approximately 30 different varieties and hybrids which are sensitive to the soil type, climate, irrigation, fertilizers, disease control, insects, and harvest period.

The difficulty in the effective use of lignocellulosic materials in microbiological processes is hampered by two major obstacles: the crystalline structure of cellulose, highly resistant to hydrolysis, and lignin–cellulose combination, which forms a physical barrier to enzymatic or microbiological access to the substrate (De Souza et al., 2013).

Due to cellulose being resistant to enzymatic attack while protected by a matrix of lignin and hemicellulose, lignocellulosic material must be pretreated. The pretreatment consists of subjecting the lignocellulosic material to a set of operations in order to promote the breakdown of the bonds linking the macrostructures. Such operations are responsible for the adequacy of raw materials such as bagasse from sugarcane, to the processing conditions by the microorganisms (Maeda et al., 2013). There are various types of pretreatments of sugarcane straw and bagasse (for

**TABLE 9.1** Enzymes of the Xylanolytic, Cellulolytic, and Pectinolytic Complex Produced by Wild and Recombinant *Aspergilli* Strains

Microorganism	Enzyme	kDa	Substrate	Temperature (°C)	pH	$v_{max}$ (U/mg protein)	$k_m$ (mg/ml)	References
<b>Wild type</b>								
<i>A. caespitosus</i>	Xylanase	27	Birchwood xylan	50–55	6.5–7.0	1679	2.5	Sandrim et al. (2005)
	Xylanase	17.7	Birchwood xylan	50–55	5.5–6.5	113	3.9	
<i>A. flavus</i>	Xylanase	N.R.	Birchwood xylan	60	5.0	N.R.		Gulmarles et al. (2013a)
<i>A. fumigatus</i>	Xylanase	N.R.	Birchwood xylan	70	5.0–5.5	N.R.		Polixco-Nogueira et al. (2009)
<i>A. japonicus</i>	Cellulase	N.R.	CM-cellulose	50–55	4.0	N.R.		Iacchini et al. (2011)
	Xylanase	N.R.	Birchwood xylan	60	4.0	N.R.		
	$\beta$ -Glucosidase	114	<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	60–65	4.5	24	1.4	
var. <i>arvalensis</i>	Xylanase	N.R.	Xylan	55	5.0	N.R.		Gulmarles et al. (2013b)
<i>A. niger</i>	Xylanase	N.R.	Birchwood xylan	60	5.0	N.R.		Gulmarles et al. (2013a)
	Xylanase	N.R.	Oat-spelt xylan	65	5.5–6.0	N.R.		Bealini et al. (2009)
	Xylanase	N.R.	Birchwood xylan	60	5.5	N.R.		Michelin et al. (2013)
	$\beta$ -Xylosidase	N.R.	<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside	70	4.0	N.R.		
	$\beta$ -Xylosidase	100	<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside	75	5.5	N.R.	0.654 <sup>a</sup>	Benassi et al. (2013)
<i>A. niveus</i>	Xylanase	N.R.	Birchwood xylan	60–65	4.5–5.0	N.R.		Polixco-Nogueira et al. (2009)
	Xylanase	N.R.	Oat-spelt xylan	55–65	5.0–5.5	N.R.		Bealini et al. (2009)
	Pectin lyase	N.R.	Pectin	55	8.5	N.R.		Maller et al. (2012)
	Polygalacturonase	102.6	Sodium polypectate	50	4.0–6.5	230	6.7	Maller et al. (2013)
	Polygalacturonase	N.R.	Polygalacturonic acid sodium	55	3.0–4.5	N.R.		Maller et al. (2011)
<i>A. ochraceus</i>	Xylanase	N.R.	Oat-spelt xylan	65	5.0	N.R.		Bealini et al. (2009)
	Xylanase	N.R.	Birchwood xylan	60	6.0	N.R.		Michelin et al. (2012a)
	$\beta$ -Xylosidase	N.R.	<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside	70	4.5	N.R.		
	Xylanase	28	Birchwood xylan	60	6.0	285.8	2.7	Michelin et al. (2014)
	Xylanase	25		60	6.0	107.3	3.8	
	Xylanase	32		60	3.5–8.0	227.3	7.6	
	$\beta$ -Xylosidase	137	<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside	70	3.5–5.5	39	0.66 <sup>a</sup>	Michelin et al. (2012b)
Xylanase	N.R.	Birchwood xylan	65	5.0	N.R.		Michelin et al. (2010)	

<i>A. phoenicis</i>	Xylanase	N.R.	Birchwood xylan	50	4.0	N.R.		Rizzeal et al. (2008)
	$\beta$ -Xylosidase	N.R.	<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside	85–90	3.5–5.5	N.R.		Rizzeal et al. (2004)
	Xylanase	N.R.	Birchwood xylan	50–55	3.5–5.5			
	$\beta$ -Xylosidase	132	<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside	75	4.0–4.5	920.75	2.36 <sup>a</sup>	Rizzeal et al. (2001)
<i>A. amicola</i>	Xylanase	N.R.	Birchwood xylan	50–60	6.5	N.R.		Michellin et al. (2010)
	Xylanase	N.R.	Birchwood xylan	60	6.5	N.R.		Michellin et al. (2011)
	$\beta$ -Xylosidase	N.R.	<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside	70	4.0	N.R.		
<i>A. versicolor</i>	$\beta$ -Xylosidase	123; 67; 60	<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside	40	6.0	815	0.31 <sup>a</sup>	Somera et al. (2009)
	$\beta$ -Xylosidase	98; 77; 59	<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside	45	5.5	1060	0.16 <sup>a</sup>	
	$\beta$ -Xylosidase	60	<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside	40	6.0	922	0.32 <sup>a</sup>	Andrade et al. (2004)
	$\beta$ -Xylosidase	100	<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside	45	5.5	1346	0.19 <sup>a</sup>	
<b>Recombinant <i>A. nidulans</i></b>								
<i>A. nivosus</i>	Arabinofuranosidase	88.6	<i>p</i> -Nitrophenyl- $\alpha$ -D-arabinopyranoside	70	4.0–5.0	59.53	N.R.	Damásio et al. (2012a)
	Xylanase	36	Wheat arabinoxylan	N.R.				Damásio et al. (2013b)
	Arabinofuranosidase	89.5	Wheat arabinoxylan	N.R.				
	Xylanase	31.3	Birchwood xylan	65	5.0	N.R.		Damásio et al. (2011)
	Xyloglucanase	23.5	Xyloglucan from tamarind	60	6.0	43.5	0.85	Damásio et al. (2012b)
	Cellobiohydrolase		<i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobioside			26.20	18 <sup>a</sup>	Sogajo et al. (2012)
	Arabinanase	34	Debranched arabinan	70	4.0–7.0	263.8	4.9	Damásio et al. (2012c)
<i>Maitbranchia pulchella</i>	Xylanase	49	Birchwood xylan	80	5.0–5.5	82	4.6	Ribeiro et al. (2014)
<b>Recombinant <i>E. coli</i></b>								
<i>A. nivosus</i>	Xyloglucanase <sup>b</sup>	56	Xyloglucan	60	5.5	10.58	1.3	Funado et al. (2015)

N.R., Not reported.

<sup>a</sup>mM

<sup>b</sup>Chimera: fusion of the xyloglucan-specific CBMH4 with xyloglucanase GH12 from *A. nivosus*.



revision, see Michelin et al., 2012a,b, 2014) that make the cellulosic/hemicellulosic materials available for subsequent enzymatic hydrolysis and obtaining of reducing sugars, as glucose, xylose, and arabinose, which can be fermented by yeast up to ethanol. Thus, to achieve second-generation ethanol, it is necessary not only to have yeasts capable of fermenting glucose, but also C-5 sugars.

The types of pretreatment depend on the material used and the purpose of using lignocellulosic fractions. The pretreatment used should be chemical and energetically efficient, and several criteria must be considered, such as avoiding the size reduction of biomass particles, preserving the hemicellulose fraction, preventing degradation or loss of carbohydrates, as well as the formation of inhibitory compounds to the growth of microorganisms during fermentation and so, minimizing production costs.

Acids and steam employment may be used as pretreatments of sugarcane. Acid hydrolysis of cellulose has the disadvantage of requiring the use of high temperatures and pressure, leading to carbohydrate losses and, in addition, producing toxic molecules for fermentation by microorganisms (Maeda et al., 2013). Problems related to corrosion of equipment are related to this bioprocess.

Currently, the methods that have proven to be most suitable are the physical treatments, for instance, for sugarcane bagasses untreated and treated with flow-through-liquid hot water (LHW) (170–207°C and 204–250 mL/min) in a fixed-bed reactor were structurally analyzed in field emission gun scanning electron microscopy (FEG-SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Results were based on the lignin changes obtained, and showed an increase in the plant cell wall porosity and lignin migration across the plant cell wall (Reddy et al., 2015).

In addition to the pretreatment of sugarcane byproducts, in order to perform the industrial process of the second-generation ethanol, the fibrolytic enzyme production should be taken into consideration to minimize the financial costs and make the process commercially acceptable. The price of the enzymatic production is the actual bottleneck of second-generation ethanol because the complete hydrolysis of biomass depends on the synergistic action of multiple distinct enzymes, especially cellulases and hemicellulases. The development of enzymatic cocktails in order to obtain fermentable sugars is crucial. This process involves choosing microorganisms efficient in enzyme production, mainly fungi, such as those from *Aspergillus* genus.

The large biodiversity of the world combined with conventional prospecting techniques or, new approaches as metagenomics, allows screening of wild types of microorganisms aiming to identify the best producers of enzymatic systems. Brazil, India, and tropical countries have great global diversity and a large stock of microorganism genes capable of producing enzymes that attack the cell wall. Filamentous fungi, in contrast to bacteria and yeast, have

interesting properties concerning the enzymatic secretion to the liquid medium (Polizeli, 2009). Filamentous fungi, such as *Aspergilli*, have become one of the most desirable microorganisms in research aiming at the enzymatic hydrolysis of cellulose on an industrial scale. However, various alternatives of genetic manipulation, such as site-directed mutations, and homologous and heterologous recombination involving fungus–fungus, fungus–bacteria, or fungus–yeast are being described, leading to the development of hyper-producer microbial strains constituting innovative processes in the achievement of hyperenzymes for use in industrial purposes, with an emphasis on biorefinery (Damásio et al., 2011; Ribeiro et al., 2014; Segato et al., 2014).

Furthermore, the addition of thermotolerant enzymes from thermophilic fungi in enzymatic cocktails is interesting due to the wide range of temperatures used in industrial processes. In addition, these enzymes must be highly resistant to a large pH range. This implies versatility of the hydrolysis process, and hence more significant results, at lower costs, are reached. Taking into account all commercially available cocktails, mainly the ones with optimum temperatures ranging between 50°C and 55°C, and pH around 6.0 can make the hydrolysis process limited to the optimum conditions of the enzymes.

In order to improve the yield of bioethanol, the use of a reactor for enzyme production is important as well as the type used. Michelin et al. (2011) reached higher levels of xylanase and  $\beta$ -xylosidase produced by *A. terreicola* in bioreactors of the stirred tank and airlift. However, there is a controversy concerning the use of stirred tank (STR (stirred tank reactor)), due to mycelial damage caused by shear forces with a consequent decrease in enzyme production (Kim et al. 1997). Fenice et al. (2003) reported that the production of laccase and Mn-peroxidase were tightly affected by impeller speed STR. Siedenberg et al. (1997) observed that the xylanase levels decreased with increasing stirring speed. Then, enzyme production by filamentous fungi can be affected by shear stress, which is related to the rate of stirring. The high viscosity and the Newtonian behavior of filamentous fungal broths often require the use of high agitation rates to provide adequate mixing and oxygen transfer. Mycelial damage limits the possible range of stirring speed values and, consequently, the volumetric biomass and productivity of the enzyme in culture (Chipeta et al., 2008).

Currently, two second-generation ethanol production plants are operating in Brazil, the Bioflex 1 from GranBio with a capacity of production around 82 million liters of ethanol per year and RAIZEN Group launched a new plant in October 2014. It is expected to produce around 40 million liters more of cellulosic ethanol (2G) than it already produces ([http://raizen.com/energia-do-futuro-tecnologia-em-energia-renovavel/etanol-de-segunda-geracao?utm\\_source=LinkedIn&utm\\_medium=Post&utm\\_campaign=29\\_07\\_2015](http://raizen.com/energia-do-futuro-tecnologia-em-energia-renovavel/etanol-de-segunda-geracao?utm_source=LinkedIn&utm_medium=Post&utm_campaign=29_07_2015)). In turn,



the major international players in cellulosic ethanol are Novozymes, INEOS Bio, KIOR, Petrobrás, Dupont, Abengoa, and POET.

Although bioethanol production offers many benefits, it still needs more investment and research, taking into account the aspects of preparation of raw materials, more profitable fermentation, and more technologies for the processing of sugarcane waste. All this, combined and optimized, can lead to more economical and viable production of bioethanol.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), National System for Research on Biodiversity (Sisbiota-Brasil, CNPq 563260/2010-6/FAPESP nº 2010/52322-3) and CNPq process 406838/2013-5 for grants for our researches. M.L.T.M. Polizeli, MG Pereira, and AC Vici are Research Fellows of CNPq. The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

- Abarca, M.L., Accenzi, F., Cano, J., Cabanes, F.J., 2004. Taxonomy and significance of black *Aspergilli*. *Antonie van Leeuwenhoek* 86, 33–49.
- Abokine, K., Wu, M., Bergeron, H., Grasse, S., Lau, P.K., 2010. Thermostable feruloyl esterase for the bioproduction of ferulic acid from triticale bran. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 195–203.
- Alaarnani, A.Q., 2011. Production of mannan-degrading enzyme by *Aspergillus niger*. *J. Taibah University Sci.* 5, 1–6.
- Alvira, P., Torrado-Peja, E., Ballarín, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851–4861.
- Andrade, S.D.V., Polizeli, M.L.T.M., Terezi, H.F., Jorge, J.A.L., 2004. Effect of carbon source on the biochemical properties of  $\beta$ -xylosidases produced by *Aspergillus versicolor*. *Process Biochem.* 39, 1931–1938.
- Baker, S.E., Thykaer, J., Adney, W.S., Brittin, T.S., Brackman, F.J., D'haeseleer, P., et al., 2008. Fungal genome sequencing and bioenergy. *Fungal Biol. Rev.* 22, 1–5.
- Bernazi, V.M., Da Silva, T.M., Passola, B.C., Guisan, J.M., Mateo, C., Lima, M.S., et al., 2013. Immobilization and biochemical properties of a beta-xylosidase activated by glucosylxylese from *Aspergillus niger* USP-67 with transxylosylation activity. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 89, 93–101.
- Bennett, J.W., 2010. An overview of the genus *Aspergillus*. In: Machida, M., Gomi, K. (Eds.), *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press, Norfolk.
- Betini, J.H.A., Michelin, M., Pinato-Nogueira, S.C., Jorge, J.A., Terezi, H.F., Polizeli, M.L.T.M., 2009. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 32, 819–824.
- Biely, P., Mastihubova, M., Tenkanen, M., Eyzaguirre, J., Li, X.L., Vrsarova, M., 2011. Action of xylan deacetylating enzymes on monoacetyl derivatives of 4-nitrophenyl glycosides of beta-D-xylopyranose and alpha-L-arabinofuranose. *J. Biotechnol.* 151, 137–142.
- Carapin, R., Imberty, A., Jelich, J.-M., Byrne, S.C., Tam, P.-H., Lowary, T.L., et al., 2009. Molecular basis of arabinobio-hydrolase activity in phytopathogenic fungi: crystal structure and catalytic mechanism of *Fusarium graminearum* gh93 exo- $\alpha$ -L-arabinanase. *J. Biol. Chem.* 284, 12285–12296.
- Carrasco, J.E., Sáiz, M., Navarro, A., Soriano, P., Sáez, F., Martínez, J.M., 1994. Effects of dilute acid and steam explosion pretreatments on the cellulose structure and kinetics of cellulosic fraction hydrolysis by dilute acids in lignocellulosic materials. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 45–46, 23–34.
- Chipeta, Z.A., Du Preez, J.C., Christopher, L., 2008. Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 587–594.
- Crepin, V.F., Fialdo, C.B., Conserston, L.F., 2004. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 647–652.
- Damásio, A.R.L., Silva, T.M., Almeida, F.B.D., Squina, F.M., Ribeiro, D.A., Leme, A.F.P., et al., 2011. Heterologous expression of an *Aspergillus niger* xylanase GH11 in *Aspergillus nidulans* and its characterization and application. *Process Biochem.* 46, 1236–1242.
- Damásio, A.R.L., Passola, B.C., Mateo, C., Segato, F., Prade, R.A., Guisan, J.M., et al., 2012a. Immobilization of a recombinant endo-1,5-arabinanase secreted by *Aspergillus nidulans* strain A773. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 77, 39–45.
- Damásio, A.R.L., Passola, B.C., Segato, F., Prade, R.A., Guisan, J.M., Polizeli, M.L.T.M., 2012b. Improvement of fungal arabinofuranosidase thermal stability by reversible immobilization. *Process Biochem.* 47, 2411–2417.
- Damásio, A.R.L., Ribeiro, L.F.C., Ribeiro, L.F., Furtado, G.P., Segato, F., Almeida, F.B.R., et al., 2012c. Functional characterization and oligomerization of a recombinant xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase (GH12) from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta-Proteins and Proteomics* 1824, 461–467.
- Damásio, A.R.L., Braga, C.M.P., Brenelli, L.B., Citadini, A.P., Mandelli, F., Cota, J., et al., 2013a. Biomass-to-bio-products application of feruloyl esterase from *Aspergillus clavatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 6759–6767.
- Damásio, A.R.L., Passola, B.C., Da Silva, T.M., Guimarães, L.H.S., Jorge, J.A., Guisan, J.M., et al., 2013b. Co-immobilization of fungal endo-xylanase and alpha-L-arabinofuranosidase in glyoxyl agarose for improved hydrolysis of arabinoxylan. *J. Biochem.* 154, 275–280.
- Das, A., Paul, T., Ghosh, P., Halder, S.K., Das Mohapatra, P.K., Pati, B.R., et al., 2015. Kinetic study of a glucose tolerant beta-glucosidase from *Aspergillus fumigatus* ABK9 entrapped into alginate beads. *Waste Biomass Valorization* 6, 53–61.
- De Souza, A.P., Leite, D.C.C., Patahül, S., Hahn, M.G., Backeridge, M.S., 2013. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. *Bioenergy Res.* 6, 564–579.
- De Vries, R.P., Vasser, J., 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 497–522.
- Dias, M.O.S., Junqueira, T.L., Cavalett, O., Pavanello, L.G., Cariba, M.P., Jesus, C.D.F., et al., 2013. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. *Appl. Energy* 109, 72–78.
- Dick-Pérez, M., Zhang, Y., Hayes, J., Salazar, A., Zabolina, O.A., Hong, M., 2011. Structure and interactions of plant cell-wall polysaccharides

## 138 SECTION | V Applications

- by two- and three-dimensional magic-angle-spinning solid-state NMR. *Biochemistry* 50, 989–1000.
- Do, B.C., Dang, T.T., Berrin, J.G., Haltrich, D., Ts, K.A., Sigwalt, J.C., et al., 2009. Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Aspergillus niger* BK01. *Microb. Cell Factory* 8, 59.
- Ehbafe, A.M., Hassan, M.M., Haroon, B.M., Abdel-Fatah, O.M., Atta, H.M., Othman, A.M., 2009. Purification and properties of an endo-glucanase of *Aspergillus terreus* DSM 826. *J. Basic Microbiol.* 49, 426–432.
- Fachini, F.D.A., Vici, A.C., Reis, V.R.A., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Reis, R.A., et al., 2011. Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* C13 using agro-industrial residues with potential application as additives in animal food. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 34, 347–355.
- Favice, M., Serrani, G.G., Federici, F., D'Annibale, A., 2003. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Passar glaucus* on olive mill wastewater-based media. *J. Biotechnol.* 100, 77–85.
- Fiedler, M.R.M., Nitsche, B.M., Wanka, F., Meyer, V., 2013. *Aspergillus*: a cell factory with unlimited prospects. In: Gupta, V.K., Schmoll, M., Masat, M.A., Maki, M., Tsuchi, M.G. (Eds.), *Applications of Microbial Engineering* CRC Press, Boca Raton.
- Furtado, G., Santos, C., Cardozo, R., Ribeiro, L., De Moraes, L.B., Damasio, A.L., et al., 2015. Enhanced xyloglucan-specific endo- $\beta$ -1,4-glucanase efficiency in an engineered CBM44-XggA chimera. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 5095–5107.
- Gallardo, O., Fernandez-Fernandez, M., Valls, C., Valenzuela, S.V., Rencoret, M.B., Vidal, T., et al., 2010. Characterization of a family GH5 xylanase with activity on neutral oligosaccharides and evaluation as a pulp bleaching aid. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6290–6294.
- Geiser, D.M., Samson, R.A., Varga, J., Rokas, A., Witak, S.M., 2008. A review of molecular phylogenetics in *Aspergillus* and prospects for a robust genus-wide phylogeny. In: Varga, K., Samson, R.A. (Eds.), *Aspergillus in the Genomic Era* Academic Publishers, Wageningen.
- Gielkens, M.M.C., Dekkers, E., Visser, J., De Graaff, L.H., 1999. Two cellobiohydrolase-encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XlnR for their expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4340–4345.
- Giraldo, M., Gonçalves, H., Ferrás, R.D., Jorge, J., Guimarães, L., 2014. Characterization of the co-purified invertase and  $\beta$ -glucosidase of a multifunctional extract from *Aspergillus terreus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 1501–1510.
- Grassmann, E., Vukas, P., Pachón, E.R., 2015. Comparative techno-economic assessment and LCA of selected integrated sugarcane-based biorefineries. *Bioresour. Technol.* 196, 364–375.
- Gong, Y.-Y., Yin, X., Zhang, H.-M., Wu, M.-C., Tang, C.-D., Wang, J.-Q., et al., 2013. Cloning, expression of a feruloyl esterase from *Aspergillus oryzae* H001 and its applicability in generating ferulic acid from wheat bran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 1433–1441.
- Gong, G.H., Zhong, Z.M., Liu, H., Wang, L., Diao, J.S., Wang, P., et al., 2014. Purification and characterization of a beta-glucosidase from *Aspergillus niger* and its application in the hydrolysis of geniposide to genipin. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 788–794.
- Gottechalk, L.M.F., De Sousa Paredon, R., Teófilo, R.S.S., Da Silva, A.S.A., Da Silva Bon, E.P., 2013. Efficient production of lignocellulosic enzymes xylanase,  $\beta$ -xylosidase, ferulic acid esterase and  $\beta$ -glucosidase by the mutant strain *Aspergillus oryzae* 2B.361 U2/1. *Braz. J. Microbiol.* 44, 569–576.
- Guillén, D., Sánchez, S., Rodríguez-Sanjoa, R., 2010. Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1241–1249.
- Guimarães, N.C.D.A., Sorgatto, M., Peixoto-Nogueira, S.D.C., Botini, J.H.A., Zanolo, F.F., Marques, M.R., et al., 2013a. Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate. *SpringerPlus* 2, 380.
- Guimarães, N.C.D.A., Sorgatto, M., Peixoto-Nogueira, S.D.C., Botini, J.H.A., Zanolo, F.F., Marques, M.R., et al., 2013b. Xylanase production from *Aspergillus japonicus* var *aculeatus*: production using agroindustrial residues and biobleaching effect on pulp. *J. Biocatal. Biotransform.* 2, 1–6.
- Haroon, M.H., Pemanatne, S.R., Choudhry, M.I., Dharmaratne, H.R.W., 2012. A new  $\beta$ -glucuronidase inhibiting butyrolactone from the marine endophytic fungus *Aspergillus terreus*. *Nat. Prod. Res.* 27, 1060–1066.
- Haep, A.A., Dekkers, E., Van Mil, M., Van De Vondervoert, P.J.L., De Graaff, L.H., 2002. EglC, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1556–1560.
- Haque, M.A., Kotaka, T., Tsunemitsu, Y., 2005. Mode of action of  $\beta$ -glucuronidase from *Aspergillus niger* on the sugar chains of arabinogalactan-protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 2170–2177.
- Hayashida, S., Mo, K., Hasegawa, A., 1988. Production and characteristics of avicel-digesting and non-avicel-digesting cellobiohydrolases from *Aspergillus ficusae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1523–1529.
- Himmel, M.E., Ding, S.-Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., et al., 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315, 804–807.
- Iwahata, K., Nagahara, T., Kimura, H., Takano, M., Shimoi, H., Ito, K., 1999. The *eglA* gene of *Aspergillus kawachi* encodes both extracellular and cell wall-bound beta-glucuronidases. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5546–5553.
- Jaya, M., Thiagarajan, S., Lee, J.-K., Gunasekaran, P., 2009. Identification of new GH 10 and GH 11 xylanase genes from *Aspergillus versicolor* MKU3 by genome-walking PCR. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 14, 13–19.
- Kawaguchi, T., Inoki, T., Tsunemitsu, S., Samitani, J., Ueda, M., Ooi, T., et al., 1996. Cloning and sequencing of the cDNA encoding beta-glucuronidase 1 from *Aspergillus aculeatus*. *Gene* 173, 287–288.
- Kim, S.W., Kang, S.W., Lee, J.S., 1997. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. *Bioresour. Technol.* 59, 63–67.
- Kirikyali, N., Wood, J., Connerton, I.F., 2014. Characterization of a recombinant beta-xylosidase (*xylA*) from *Aspergillus oryzae* expressed in *Pichia pastoris*. *AMB Express* 4, 68.
- Kustaniemi, S., Van Gool, M.P., Juvonen, M., Jokela, J., Hirv, S.W., Scholz, H.A., et al., 2013. Distinct roles of carbohydrate esterase family CE16 acetyl esterases and polymer-acting acetyl xylan esterases in xylan deacetylation. *J. Biotechnol.* 168, 684–692.
- Leal, M.R.L.V., Galvão, M.V., Scapeure, F.V., Soares, J.E.A., Walter, A., Oliveira, C.O.F., 2013. Sugarcane straw availability, quality, recovery and energy use: a literature review. *Biomass Bioenergy* 53, 11–19.
- Lin, J.S., Ming-Ya, T., John, F.F., 1987. Fractal analysis of cotton cellulose as characterized by small-angle x-ray scattering. *The Structures of Cellulose*. American Chemical Society.
- Maeda, R.N., Barcelos, C.A., Anna, L.M.M.S., Pereira, N., 2013. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application

- in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. *J. Biotechnol.* 163, 38–44.
- Muller, A., Damasio, A.R.L., Silva, T.M.D., Jorge, J.A., Terezi, H.F., Polizeli, M.L.T.M., 2011. Biotechnological potential of agro-industrial wastes as a carbon source to fermentable polygalacturonase production in *Aspergillus niger*. *Enzyme Res.* 2011, 6.
- Muller, A., Silva, T.M., Damasio, A.R.L., Ruiz, V.R.A., Jorge, J.A., Polizeli, M.L.T.M., 2012. Production of pectin lyase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentations using agro-industrial residues as carbon sources. *Int. Res. J. Microbiol.* 3, 29–35.
- Muller, A., Da Silva, T.M., Damasio, A.R.D., Hirata, I.Y., Jorge, J.A., Terezi, H.F., et al., 2013. Functional properties of a manganese-activated *exo*-polygalacturonase produced by a thermotolerant fungus *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol. (Praha)* 58, 615–621.
- McNeil, M., Darvell, A.G., Fry, S.C., Albersheim, P., 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 625–663.
- Meyer, V., 2008. Genetic engineering of filamentous fungi—progress, obstacles and future trends. *Biotechnol. Adv.* 26, 177–185.
- Micheli, P.A. 1729. *Nova plantarum genera ivata Torrensfortii methodum disposita*, Florence.
- Michelin, M., Peixoto-Nogueira, S.C., Botini, J.H.A., Da Silva, T.M., Jorge, J.A., Terezi, H.F., et al., 2010. Production and properties of xylanases from *Aspergillus terreicola* Marchal and *Aspergillus ochraceus* and their use in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 33, 813–821.
- Michelin, M., Polizeli, M.L.T.M., Silva, D.D., Ruzene, D., Vicente, A., Jorge, J., et al., 2011. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus terreicola* in stirred tank and airlift tower loop bioreactors. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1979–1984.
- Michelin, M., Peixoto-Nogueira, S.C., Silva, T.M., Jorge, J.A., Terezi, H.F., Teisiera, J.A., et al., 2012a. A novel xylan degrading beta-D-xylanase: purification and biochemical characterization. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 3179–3186.
- Michelin, M., Polizeli, M.L.T.M., Ruzene, D., Silva, D., Vicente, A., Jorge, J., et al., 2012b. Xylanase and beta-xylanase production by *Aspergillus ochraceus*: new perspectives for the application of wheat straw autohydrolysis liquor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 336–347.
- Michelin, M., Polizeli, M.L.T.M., Ruzene, D.S., Silva, D.P., Ruiz, H.A., Vicente, A.A., et al., 2012c. Production of xylanase and beta-xylanase from autohydrolysis liquor of corn cob using two fungal strains. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35, 1185–1192.
- Michelin, M., De Oliveira Mota, A.M., Polizeli, M.L.T.M., Da Silva, D.P., Vicente, A.A., Teisiera, J.A., 2013. Influence of volumetric oxygen transfer coefficient (k<sub>La</sub>) on xylanase batch production by *Aspergillus niger* van Tieghem in stirred tank and internal-loop airlift bioreactors. *Biochem. Eng. J.* 80, 19–26.
- Michelin, M., Silva, T.M., Jorge, J.A., Polizeli, M.L.T.M., 2014. Purification and biochemical properties of multiple xylanases from *Aspergillus ochraceus* tolerant to Hg<sup>2+</sup> ion and a wide range of pH. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174, 206–220.
- Michelin, M., Ruiz, H.A., Silva, D.P., Ruzene, D.S., Teisiera, J.A., Polizeli, M.L.T.M., 2015. Cellulose from lignocellulosic waste. In: Ramawat, K.G., Mérillon, J.M. (Eds.), *Polysaccharides—Bioactivity and Biotechnology* Springer International Publishing, Basel.
- Nara, M., Dixit, G., Divcha, J., Kumar, K., Madanwar, D., Shah, A.R., 2014. Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 88, 150–161.
- Noorin, P., Mahakarncharukul, W., Varga, J., Friisvad, J.C., Samson, R.A., 2008. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1727–1734.
- Olempaka-Boor, Z.S., Merker, R.I., Ditt, M.D., Dinovi, M.J., 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 45, 144–158.
- Oliveira, F.M.V., Pinheiro, L.O., Sousa-Maiz, A.M., Martin, C., Genealves, A.R., Rocha, G.J.M., 2013. Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. *Bioresour. Technol.* 130, 168–173.
- Osoler, Y.S., 1975. Structural chemistry of plant glycomonoglycans. *Pure Appl. Chem.* 42, 351–369.
- Park, S.-M., 2011. Acetyl xylan esterase of *Aspergillus ficusae* catalyzed the synthesis of peracetic acid from ethyl acetate and hydrogen peroxide. *J. Biosci. Bioeng.* 112, 473–475.
- Pary, J.B., Stewart, J.C., Heptinstall, J., 1983. Purification of the major endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Biochem. J.* 213, 437–444.
- Peixoto-Nogueira, S.D., Michelin, M., Botini, J.H.A., Jorge, J.A., Terezi, H.F., Polizeli, M.L.T.M., 2009. Production of xylanase by *Aspergillus* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 149–155.
- Pereira, S.C., Machado, L., Machado, C.M.M., Farinas, C.S., 2015. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Biofuels* 8, 44.
- Perrone, G., Susca, A., Corzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Friisvad, J.C., et al., 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Stud. Mycol.* 59, 53–66.
- Perrone, G., Varga, J., Susca, A., Friisvad, J.C., Stea, G., Kocube, S., et al., 2008. *Aspergillus anasarum* sp. nov., an uniserial black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1032–1039.
- Peshin, A., Mathur, J.M.S., 1999. Purification and characterization of beta-glucosidase from *Aspergillus niger* strain 322. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 401–404.
- Phillips, C.M., Beeson, W.T., Cate, J.H., Marlett, M.A., 2011. Cellulose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monoxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. *ACS. Chem. Biol.* 6, 1399–1406.
- Polizeli, M.L.T.M., 2009. Properties and commercial applications of xylanases from fungi. In: Rai, M. (Ed.), *Advances in Fungal Biotechnology* IK International Publishing House, New Delhi, Bangalore.
- Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terezi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 577–591.
- Quay, D.H.X., Bakar, F.D.A., Raba, A., Said, M., Iliya, R.M., Mahadi, N.M., et al., 2011. Overexpression, purification and characterization of the *Aspergillus niger* endoglucanase, EglA, in *Pichia pastoris*. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 2101–2111.
- Roddy, P., Lakha, P., Reynolds, W., Kirsch, C., 2015. Structural characterization of pretreated solids from flow-through liquid hot water treatment of sugarcane bagasse in a fixed-bed reactor. *Bioresour. Technol.* 183, 259–261.
- Rozendo, C.A., De Lima, M.A., Mariani, P., Deazavedo, E.R., Garcia, W., Polikarpov, I., 2011. Chemical and morphological characterization of



## 140 SECTION | V Applications


- sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnol. Biofuels*. 4, 1–18.
- Ribeiro, L.F.C., De Lucas, R.C., Vitorique, G.L., Ribeiro, L.F., Ward, R.J., Rubio, M.V., et al., 2014. A novel thermostable xylanase GH10 from *Mutibranchia pulchella* expressed in *Aspergillus nidulans* with potential applications in biotechnology. *Biotechnol. Biofuels*. 7.
- Rizzatti, A.C.S., Jorge, J.A., Torenzi, H.F., Rechia, C.G.V., Polizeli, M.L.T.M., 2001. Purification and properties of a thermostable extracellular beta-D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26, 156–160.
- Rizzatti, A.C.S., Sandrin, V.C., Jorge, J.A., Torenzi, H.F., Polizeli, M.L.T.M., 2004. Influence of temperature on the properties of the xylanolytic enzymes of the thermotolerant fungus *Aspergillus phoenicis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 88–93.
- Rizzatti, A.C.S., Freitas, F.Z., Bertolini, M.C., Peixoto-Nogueira, S.C., Torenzi, H.F., Jorge, J.A., et al., 2008. Regulation of xylanase in *Aspergillus phoenicis*: a physiological and molecular approach. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 237–244.
- Rosengran, A., Reddy, S., Sjöberg, J., Aurelius, O., Logan, D., Kolenová, K., et al., 2014. An *Aspergillus nidulans* beta-mannanase with high transglycosylation capacity revealed through comparative studies within glycosylase family 5. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 10091–10104.
- Saha, B.C., 2000. *alpha*-1-Arabinofuranosidase: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18, 403–423.
- Sarason, R.A., Houbaker, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Frank, J.M., Friisvad, J.C., 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud. Mycol.* 50, 45–61.
- Sarason, R.A., Vinagie, C.M., Houbaker, J., Hong, S.B., Habka, V., Klaassen, C.H.W., et al., 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 78, 141–173.
- Sandrin, V.C., Rizzatti, A.C.S., Torenzi, H.F., Jorge, J.A., Milagres, A.M.F., Polizeli, M.L.T.M., 2005. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. *Process Biochem.* 40, 1823–1828.
- Santos, M.F.R.F., Benschivov, S., Costa, M.A.P.G., 2011. Iniciativa para o uso da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias: a plataforma socioquímica no mundo e no Brasil. *Economia & Energia Ano XV* Nº 82.
- Segato, F., Damasio, A.R.L., Goncalves, T.A., Murakami, M.T., Squina, F.M., Polizeli, M.L.T.M., et al., 2012. Two structurally discrete GH7-cellulohydrolases compete for the same cellulosic substrate fiber. *Biotechnol. Biofuels*. 5, 21.
- Segato, F., Damasio, A.R.L., De Lucas, R.C., Squina, F.M., Prade, R.A., 2014. Genomics review of holocellulose deconstruction by *Aspergilli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 588–613.
- Serra, R., Cabanes, F.J., Perrone, G., Castella, G., Venancio, A., Mule, G., et al., 2006. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. *Mycologia* 98, 295–306.
- Sharma, R., Kocher, G.S., Bhargal, R.S., Oberoi, H.S., 2014. Cellulolytic and xylanolytic enzymes from thermophilic *Aspergillus terreus* RWY. *J. Basic Microbiol.* 54, 1367–1377.
- Siedenberg, D., Gerlach, S.R., Czwalinna, A., Schagerl, K., Giuseppe, M.L.F., Hunik, J., 1997. Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on complex medium in stirred tank and airlift tower loop reactors. *J. Biotechnol.* 56, 205–216.
- Silva, T.M., Pamela, B.C., Da Silva, J.C.R., Lima, M.S., Jorge, J.A., Guzman, J.M., et al., 2014. Immobilization and high stability of an extracellular beta-glucosidase from *Aspergillus japonicus* by ionic interactions. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 104, 95–100.
- Somera, A., Pereira, M., Souza Guimarães, L., Polizeli, M.L.T.M., Torenzi, H., Melo Furtado, R., et al., 2009. Effect of glycosylation on the biochemical properties of beta-xylosidases from *Aspergillus versicolor*. *J. Microbiol.* 47, 270–276.
- Sorek, N., Yeats, T.H., Szemerczyei, H., Youngs, H., Somerville, C.R., 2014. The implications of lignocellulosic biomass chemical composition for the production of advanced biofuels. *BioScience*. 64 (3), 192–201.
- Vaihanomaa, P., Songpin, M., Malapant, T., Kowagi, A., Thanapase, W., Meri, Y., 2011. Production of beta-glucosidase from a newly isolated *Aspergillus* species using response surface methodology. *Int. J. Microbiol.* 2011, 9.
- Watanabe, T., Sato, T., Yoshioka, S., Kurohiji, T., Kawahara, M., 1992. Purification and properties of *Aspergillus niger* beta-glucosidase. *Eur. J. Biochem.* 209, 651–659.
- Wu, M., Beckham, G.T., Larsen, A.M., Ishida, T., Kim, S., Payne, C.M., et al., 2013. Crystal structure and computational characterization of the lytic polysaccharide monooxygenase GH61D from the Basidiomycota fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 288, 12828–12839.
- Yennamilli, R.M., Rader, A.J., Kenny, A.J., Wolf, J.D., Sen, T.Z., 2013. Endoglucanase: insights into thermostability for biofuel applications. *Biotechnol. Biofuels*. 6.
- Yin, X., Hu, D., Li, J.-F., He, Y., Zhu, T.-D., Wu, M.-C., 2015. Contribution of disulfide bridges to the thermostability of a type A feruloyl esterase from *Aspergillus oryzae*. *PLoS ONE*. 10, e0126864.
- Zhang, S.-B., Zhai, H.-C., Wang, L., Yu, G.-H., 2013. Expression, purification and characterization of a feruloyl esterase A from *Aspergillus flavus*. *Protein Expr. Purif.* 92, 36–40.

# APÊNDICE II

---

Sonil Nanda • Dai-Viet N. Vo •  
Prakash Kumar Sarangi  
Editors

# Biorefinery of Alternative Resources: Targeting Green Fuels and Platform Chemicals

 Springer



## Bioconversion of Agro-industrial Residues to Second-Generation Bioethanol

# 2

Thiago Machado Pasin, Paula Zaghetto de Almeida, Ana Sílvia de Almeida Scarcella, Juliana da Conceição Infante, and Maria de Lourdes de Teixeira de Moraes Polizeli

### Abstract

Bioenergy is the term used for energy produced from lignocellulosic biomass. Most of the residues produced from agricultural and industrial activities present high levels of lignocellulose. They are mostly formed by rigid structures mainly containing hemicellulose and cellulose intermixed by lignin. These macromolecules are linked by covalent and hydrogen bonds, thus forming a complex architecture, which give a great resistance to their hydrolysis. This hampers the subsequent production of fermentable sugars and their fermentation to produce second-generation bioethanol. The technologies to obtain second-generation bioethanol, independent of the plant source, involve the hydrolysis of polysaccharides from the biomass in order to generate sugars that can be fermented by yeasts. This chapter addresses the importance of biomass for the production of green fuels. In this chapter, the potential of different lignocellulosic biomasses, especially the agricultural crop residues, is described. The composition of the main molecules forming the cell wall of different plants is provided. The enzymes that are involved in the deconstruction of plant cell walls as well as the release of fermentable sugars are discussed. The pretreatment and fermentation of biomass for the second-generation ethanol production by yeasts are described. Some

T. M. Pasin · P. Z. de Almeida · A. S. de Almeida Scarcella · J. da Conceição Infante · M. L. T. M. Polizeli (✉)

Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

e-mail: polizeli@frcrp.usp.br

© Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2020

S. Nanda et al. (eds.), *Biorefinery of Alternative Resources: Targeting Green Fuels and Platform Chemicals*, [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1804-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1804-1_2)

23

challenges concerning the technologies are considered, but, on the other hand, some alternatives are also pointed out.

#### Keywords

Agro-industrial residues · Second-generation bioethanol · Biorefinery · Green fuels · Enzymes · Saccharification

## 2.1 Introduction

Biomass refers to any matter of plant origin, which can be processed to provide more elaborate bioenergetic and chemical forms suitable for end use. Around the world, more than 146 billion tons of residues are annually available, but only a portion (up to 100 million) of it is being used for energy and biofuel production (Ayres 2014). The rest of these residues is usually burnt or left behind, which may lead to the worsening of the greenhouse effect. A few of the most biomass-producing countries in the world are Brazil, China, Indonesia, Russia, and the USA (Table 2.1).

Food, fiber, or wood production generates biomass, which could be useful for energy production using mature technologies. Currently, the final biomass energy produced is 50 EJ totaling 14% of the final energy used in the world, but it has a potential to be increased up to 150 EJ by 2035. A total supply of 38–45% is estimated to be originated from waste and residues from agriculture and the remaining supply would be shared by the energy crops, forestry, and residual products (IRENA 2014). According to the World Bioenergy Association (WBA 2014), the estimated potential of residues from agriculture in order to produce energy varies between 17 and 128 EJ. There is a high potential of using residues from agriculture, especially in Asia and the Americas because of the different crops highly produced in these regions. There is an enormous potential for exploiting the use of biomass in order to produce larger quantities of products with high value.

**Table 2.1** Comparative production of crops in different countries

Crop	Country	Production (million tons/year)	References
Barley	Russia	20.4	Worldatlas & Graphic Maps (2017)
Coffee	Brazil	2.8	FAS (2018a)
Cotton	China	5.9	FAS (2018b)
Maize	USA	370.5	FAO (2017)
Oil palm	Indonesia	40.5	Iskandar et al. (2018)
Potato	China	99.0	FAO (2019)
Rice	China	210.1	Muthayya et al. (2014)
Soybean	USA	119.5	FAO (2017)
Sugarcane	Brazil	758.5	FAO (2017)
Wheat	China	134.4	Worldatlas & Graphic Maps (2019)



Due to the various possible sources of lignocellulosic biomass, this chapter is focused on describing the structure and characteristics of its major components, such as cellulose, hemicellulose, pectin, and lignin present in the primary and secondary cell walls. The resins, fatty acids, phenols, tannins, nitrogenous compounds, and mineral salts, e.g., calcium, potassium, and magnesium on a smaller scale, can also be found, which depends on the plant species (Neureiter et al. 2002). Subsequently, the chapter presents a description of different biomass sources that can be used for the production of bioenergy, followed by the major enzymatic systems that can degrade plant cell walls and their mechanism of action on biomass, especially in sugarcane, for the production of second-generation bioethanol.

## 2.2 Composition of Lignocellulosic Biomass

Cellulose (23–50 wt% of the dry matter of lignocellulosic biomass) is a linear homopolymer containing up to 15,000 units of  $\beta$ -D-glucose bound by  $\beta$ -1,4-glycosidic linkages (Nanda et al. 2015). It has reducing and nonreducing ends, and it is extremely resistant to degradation (Michelin et al. 2013). The strength of cellulose is due to many hydroxyl groups on the glucose structure that contribute to the formation of massive intramolecular bonds (linkages among glucose units of the same molecule) and intermolecular hydrogen bonds (among glucose units of adjacent molecules), which are responsible for stiffness. The intramolecular bonds are responsible for the formation of fibrils, which are highly ordered structures. According to the degree of organization of the bonds between the cellulose chains, the structure can be crystalline (highly ordered) or amorphous (less ordered). The amorphous regions can absorb water more easily and are more susceptible to enzymatic action.

Hemicellulose is a heteropolysaccharide (15–45 wt% of dry lignocellulosic material) with branched chains of monosaccharides, mainly including aldopentoses (xylose and arabinose) and aldohexoses (glucose, mannose, and galactose). This macromolecule also contains deoxyhexoses and acids, such as  $\beta$ -D-galacturonic acid, D-4-O-methylglucuronic acid, and  $\beta$ -D-glucuronic acid (Polizeli et al. 2005). The variety of bonds and branching, as well as the presence of different monomeric units, contributes to the complexity of the hemicellulosic structure and its different conformations. Unlike cellulose, hemicellulose has low molecular mass (100–200 glycosidic units) and does not contain crystalline regions, which makes it easier to hydrolyze in non-drastic conditions (Polizeli et al. 2005).

There are different types of hemicellulose, such as arabinoxylan, acetylglucuronoxylan, arabinan, arabinogalactan, xylan, galactomannan, xyloglucan, galactoglucomannan, and glucomannan. Hemicellulose is classified according to its sugar chain composition. Thus, the term hemicellulose does not denote a defined chemical compound, rather, a set of polymeric components present in fibrous plants where each component has different properties. The major hemicellulose constituent is the xylan, which is a xylose  $\beta$ -1,4-polymer with several branched residues (Polizeli et al. 2005). The fermentation of pentoses is not yet as developed as the

processes involving glucose. Mannan is the second most abundant component of the hemicellulosic fraction being widely found in woods (gymnosperms), tubers, seeds, and grains in different compositions structure and complexity. The main chain of mannan consists of mannose residues bound by  $\beta$ -1,4-linkages or a combination of mannose and glucose residues associated by a same type linkage. In addition, the major chain of mannan may have side chains attached to  $\alpha$ -1,6-galactose residues (De Marco et al. 2015).

Pectins are heterogeneous polysaccharides, which form the middle lamella being the largest component inside it. These polysaccharides are adhesive materials in the extracellular portion found in the higher plant cells located in the primary walls. The structure consists of axial bonds with acid units of  $\alpha$ -1,4-D-galacturonic and contains molecules of galactose, arabinose, xylose, and L-rhamnose as the side chains (Polizeli et al. 2013).

The biochemical structure of lignin (10–30 wt% of dry lignocellulosic material) cannot be related to sugar molecules, and it is not suitable for bioconversion or fermentative routes. However, this fraction plays a key role in the success of hydrolysis technology, since it blocks the access to cellulose. The structure of lignin has a three-dimensional polymeric structure formed by *p*-propylphenol units with methoxy substituent on the aromatic ring joined by ether bonds that crosslink each other. This macromolecule is originated through sinapyl, coumaric, and coniferyl alcohols.

---

## 2.3 Commonly Available Agricultural Crop Residues In the World

### 2.3.1 Barley and Coffee Residues

Barley (*Hordeum vulgare*) is one of the main cereal sources produced in the world for humans and livestock consumption. Every year, an area of around 50 million hectares is harvested, being the fourth major cereal produced in the world. The most abundant staple crops cultivated in the world are wheat (~200 million hectares), rice (~170 million hectares), and maize (~145 million hectares). Russia, Australia, Ukraine, and Canada are the major barley-producing countries (WAP 2019). Barley and beer residues are similar to other lignocellulosic materials being composed of cellulose, hemicellulose, and lignin. It is reported that the percentage of cellulose and hemicellulose in such materials is high (Table 2.2), which can be hydrolyzed and fermented aiming the production of biofuels and biochemicals.

The coffee tree is a plant of permanent culture that belongs to the Rubiaceae family and to the genus *Coffea* such as *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. Around 8.9 million tons of coffee are produced over an area of approximately 10.6 million hectares (FAO 2018). The major coffee producers in the world are Brazil, Vietnam, and Colombia (Al-Abdulkader et al. 2018). One ton of bark is generated per each ton of beans of coffee that are processed (Saenger et al. 2001). The coffee pulp is the main residue originated in the wet processing of the mature coffee,

**Table 2.2** Cellulose, hemicellulose, and lignin composition of some of the most widely found lignocellulosic feedstocks in the world

Residues	Cellulose (wt%)	Hemicellulose (wt%)	Lignin (wt%)	References
Barley bagasse	23.0	32.7	24.4	Tamanini and Haully (2004)
Coffee husks	22.7	14.7	12.4	Souza et al. (2001)
Cotton straw	40.7	10.5	15.4	Silanikove et al. (1988)
Corn cob	31.7	34.7	20.3	Tamanini and Haully (2004)
Oil palm fiber	41.9	29.5	30.0	Sudiyani et al. (2013)
Potato peels	55.2	11.7	14.2	Lenihan et al. (2010)
Rice straw	38.0	27.0	8.0	Santos et al. (2012)
Soybean fibrous	16.0	23.0	28.0	Heck et al. (2002)
Sugarcane bagasse	43.0	26.0	22.0	Rocha et al. (2011)
Wheat straw	35.0	24.0	25.0	Zhu et al. (2005)

representing approximately 40 wt% of the dry weight of the coffee bean, which is rich in cellulose and hemicellulose (Table 2.2), proteins, minerals, and appreciable amounts of tannins, caffeine, and potassium. Currently all these raw materials could be used in developed processes to generate value-added and bulk chemicals products such as active secondary metabolites, unicellular proteins, enzymes, and organic acids (Pandey et al. 2000). Another alternative is the use of these wastes for bioenergy production.

### 2.3.2 Sugarcane, Malze, Rice, and Wheat Residues

Sugarcane, maize, rice, and wheat residues generate most of the lignocellulosic residues in the world (Saini et al. 2015). One of the most famous plant being used nowadays is the sugarcane (*Saccharum* spp.). It is a C4 crop that has been used for a long time in the sugar production, but currently bioethanol and electricity have become the most famous value-added energy products generated through bioconversion and burning, respectively (Cotrim et al. 2018). The total harvested area for sugarcane in the world is estimated to be around 26.7 million hectares and the major producers are Brazil, India, and China. After the processing of the sugarcane, large quantities of bagasse are generated what presents good amounts of cellulose and hemicellulose. These factors make it an interesting, renewable, and cheap resource to produce biochemicals and biofuels (Bhatia and Paliwal 2011).

There are several varieties of commercial sugarcane in the world. In Brazil, the SP80-3280 variety is one of the most studied. The composition of the cell wall of SP80-3280 variety sugarcane is reported having fundamental importance for understanding the enzymes necessary for its saccharification (De Souza et al. 2013). In recent years, the search for sugarcane with high levels of sugars for first-generation

bioethanol and the accumulation of biomass for second-generation bioethanol production have increased. This sugarcane is known as *energy cane*, which presents the particularity of having a higher fiber content, being distributed in the fractions of lignin, cellulose, and hemicellulose. The *energy cane* comes from genetic improvements of the sugarcane (*Saccharum spontaneum*) to increase the energy availability and adaptation to different cultivation environments (Tew and Cobill 2008).

Maize (*Zea mays*) is a well-known cereal being considered the main input in animal protein production, in human nutrition, and also in the biofuel production. The total area harvested each year in the world is estimated to be around 145 million hectares and the major maize producers in the world are the USA, China, and Brazil (FAO 2018). From Table 2.2 it can be inferred that the maize residues have small amounts of lignin, which makes it interesting for the use in the bioenergy and in the production of chemicals.

Rice consists of two main species such as *Oryza glaberrima* and *Oryza sativa*. It is a plant of the grass family and is among the products intended for human consumption, being second in importance, only behind wheat. In some parts of the world, especially in Asia, rice is staple food crop (CONAB 2018). It is harvested from over 163 million hectares in more than 100 countries (Laborte et al. 2017). The major rice producers are China, India, and Indonesia (FAO 2018). During the rice cultivation, huge amounts of rice straw are generated along with leaf blades, stems, leaf sheaths, and husks as the leftovers. These residues are one of the largest lignocellulosic wastes in the world. Among the most rice straw producers is Asia which alone generates 667.6 million tons of rice straw that consists of 91.3% of the global rice production (Saini et al. 2015). This residue is also an important source with similar contents of hemicellulose, lignin, and cellulose when compared with other organic residues, which could be better used for the production of biofuels and biochemicals.

Wheat is considered a staple food and cereal in all over the world (Shewry 2009; Balkovič et al. 2014). The common wheat, *Triticum aestivum*, is the most widely grown in the world, over an arable land about 220.4 million hectares (FAO 2018). During the wheat harvesting process, straw is generated at a rate of 2.5–7.5 tons/hectare annually under rigorous farming conditions. Cellulose, hemicelluloses, and lignin make up the most part of the agricultural residues in a similar rate. However, wheat straw presents pectin and proteins, whereas rice straw has silica within its tissues (Sarkar et al. 2012).

### 2.3.3 Cotton

Cotton is a staple fiber found across the world. It belongs to the genus *Gossypium* within the Malvaceae family. Cellulose is the main component of the cotton bolls. It is estimated that 25 million tons of cotton are annually produced in the world over an area that estimates about 2.5% of the total arable land at a global scale. The cotton cultivation area in the world is accounted around 33.6 million hectares per year and the major cotton producers are China, India, and the USA (Daisy et al.



2018). After harvesting the cotton, huge amounts of residues are left in the field, such as side branches, stalks, bolls, seeds with adhering cotton lint, leaves, etc. (Huang et al. 2012). The total amount of residues (e.g., cotton straw, cotton sticks, cotton wood) generated from the cotton harvesting can range from 5 to 7 tons/hectare. The quality of these materials that are generated from the cotton harvesting presents a high variability as commonly observed in crop wastes. However, these residues are also important sources of lignin, cellulose, and hemicellulose as shown in Table 2.2.

#### 2.3.4 Oil Palm Residues

Oil palm is a vegetable oil extracted from the mesocarp of *Elaeis guineensis*. Palm oil is a common cooking ingredient in Brazil, Africa, and Asia. Oil palm trees present a highly efficient land use with a large yield when compared with other crops used for oil extraction. It is estimated that a total harvested area of about 17 million hectares of mature oil palm plantation produces a total of 62.6 million tons of oil palm per year. The major oil palm producers are Indonesia, Malaysia, and Nigeria (EPOA 2018). Europe is the major importer of oil palm for using it as a precursor for biodiesel production (Soeriaatmadja and Leong 2018). In addition to its massive potentials for biodiesel production, all the oil palm residues generated after the oil extraction could also be used to produce the bioethanol since it is composed of cellulose, hemicellulose, and lignin (Table 2.2).

#### 2.3.5 Potato Residues

Potato (*Solanum tuberosum*) is a staple food crop cultivated in most countries across the world. Potatoes are considered the fifth largest crop for human consumption after wheat, rice, maize, and barley. In 2016, the total world potato production and harvested area were estimated at 376 million tons and 19 million hectares, respectively (FAO 2018). The three largest potato producers in the world are China, India, and Russia. Potato processing industry generates massive amounts of organic wastes. It is estimated that one quarter of the total weight of potato is obtained as wastes from the food processing plants. These wastes can be used, for example, as a carbon source for yeast during alcohol fermentation to produce bioethanol. The potato peel waste contains adequate amount of starch, hemicellulose, cellulose, lignin (Table 2.2), and residual carbohydrates, which make potato peel a suitable feedstock for ethanol production (Ojewumi et al. 2018).

#### 2.3.6 Soybean Residues

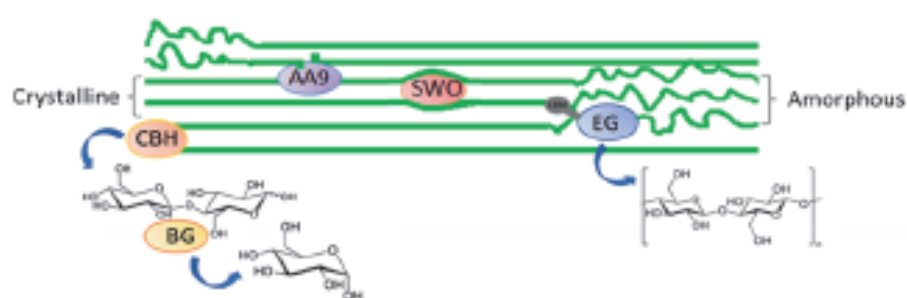
The soybean (*Glycine max*) is known to be widely cultivated because of its comestible bean that presents several different uses. The worldwide soybean

production was estimated around 337 million tons in 2017–2018 (WASDE 2018). The major producers of soybean in the world are the USA, Brazil, and Argentina. Based on the global production, it is possible to affirm that these three countries are responsible by approximately 85% of the total soybean production (FAO 2015). During the recovery of the protein from the soybean seeds, large amounts of residues are generated. The residues generated are composed of 16 wt% cellulose and 23 wt% hemicellulose (Table 2.2). Previous studies have estimated that approximately 10,000 tons per year of these by-products are generated and only a small portion is used for animal feeding, while the rest is mainly disposed in the environment (Heck et al. 2002).

## 2.4 Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Residues

### 2.4.1 Cellulases

Cellulases are glycosyl hydrolases that act in the cleavage of cellulose and can be classified into endoglucanases (EG), exoglucanases (CBH), and  $\beta$ -glucosidases (BG) (Payne et al. 2015; Wei and McDonald 2016). Some cellulases are organized in complexes called cellulosomes. These structures are produced by anaerobic bacteria (Artzi et al. 2017) and fungi (Haitjema et al. 2017) as a strategy to improve the hydrolysis efficiency. They are composed of a complex scaffolding as structural subunit and various enzymatic subunits. Many cellulases and hemicellulases are attached to structures called carbohydrate binding module (CBM). These structures have the property to attach the enzyme to the substrate. CBMs are not necessary to the hydrolytic function and there is no evidence that they improve the action of cellulases (Várnai et al. 2014).



**Fig. 2.1** Cellulase action on cellulose crystalline and crystal structure. Endoglucanase (EG) in blue at the amorphous region with a CBM attached to the crystalline region releasing smaller cellulose chains. Cellobiohydrolase (CBH) in orange is attached to the crystalline terminal releasing cellobiose.  $\beta$ -Glucosidase (BG) in yellow cleaves the cellobiose to glucose. Auxiliary activity 9 enzyme (AA9) in purple acts on the crystalline region leaving a rupture in the cellulose chain. Swollenin (SWO) in pink acts between the cellulose chains resulting in a less crystalline structure

Endo- $\beta$ -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4) hydrolyze the glycosidic bonds mainly at the amorphous regions of cellulose (Fig. 2.1). They are distributed along 16 out of 134 glycoside hydrolase (GH) families and are characterized by shorter loops. Thus, this feature enables the active site fissures to reach accessible sites of cellulose chain. The endoglucanases act in the interior of cellulose, resulting in long-chain oligomers. When compared with other cellulases, they have a faster dissociation rate and show the best cellulose liquefaction results, thus decreasing the chain length and consequently the viscosity (Badiyan et al. 2012; Boyce and Walsh 2015; Juturu and Wu 2014).

Exoglucanases or cellobiohydrolases act in the end of crystalline cellulose chains to release cellobiose (Fig. 2.1). They act efficiently in cellulose hydrolysis and are divided into EC 3.2.1.91 (acting in the nonreducing ends) and EC 3.2.1.176 (acting in the reducing ends). These enzymes have long loops usually forming tunnels around the catalytic residues; thus the substrate is directed along these tunnels to encounter the active site (Obeng et al. 2017; Wilson and Kostylev 2012).

$\beta$ -Glucosidases (BGs, EC 3.2.1.21) break down cellobiose to glucose (Fig. 2.1). Several  $\beta$ -glucosidases are also able to catalyze the reverse reaction by transglycosylation in which glucose molecules are transferred to another glucose molecule or cellobiose to yield different oligosaccharides.  $\beta$ -Glucosidases are susceptible to product inhibition, especially at high-biomass conditions. Thus, it is one of the biggest bottlenecks for the total cellulose conversion to glucose. The addition of large amounts of  $\beta$ -glucosidases in enzymatic cocktails has the extra goal to reduce the product inhibition exhibited by cellobiose on cellobiohydrolases and endoglucanases (Andrić et al. 2010; Singhania et al. 2013).

The most reported cause to product inhibition on fungal  $\beta$ -glucosidases is via competitive inhibition, but it is also described as one of the noncompetitive and mixed mechanisms. The majority of  $\beta$ -glucosidases belong to the 1 and 3 GH families, but they are also found in families 5, 9, and 30. The enzymes belonging to family GH1 are 10 to 1000-fold more tolerant to glucose when compared to GH3  $\beta$ -glucosidases. The structural analysis shows that glucose tolerance is strongly correlated with active site accessibility (Andrić et al. 2010; De Giuseppe et al. 2014; Singhania et al. 2013).

#### 2.4.2 Auxiliary Activity 9 Enzyme and Swollenin Protein

Auxiliary activity 9 (AA9) enzyme is a fungal lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO), a copper-dependent enzyme that is added to the most commercial cocktails. AA9 boost the action of cellulases in lignocellulosic material hydrolysis. It promotes the oxidative cleavage of glycosidic bounds of C1 or C4, thus disturbing cellulose crystallinity and giving access to canonical cellulases, consequently improving the overall hydrolysis yield (Fig. 2.1). The oxidation promoted by LPMO is dependent on an electron donor, e.g., ascorbic acid, cellobiose dehydrogenase, and lignin or photocatalytic systems. The oxidation occurs only in the presence of

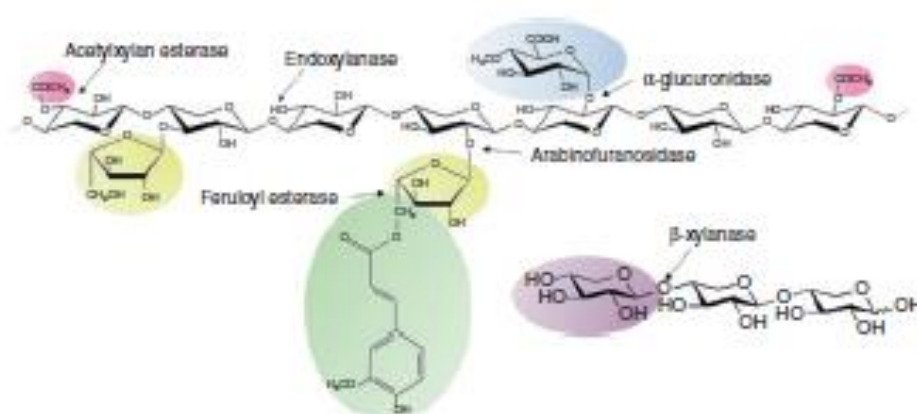
O<sub>2</sub> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as the co-substrate (Bertini et al. 2018; Möllers et al. 2017; Müller et al. 2018; Walton and Davies 2016).

Swollenins (SWOs) are nonenzymatic proteins with high homology to plant expansins. This class of proteins has the property to cause deagglomeration of crystalline cellulose. SWOs act in the breakage of hydrogen bonds between the cellulose chains, thus loosening the structure, increasing the accessibility of canonical cellulases and enzymatic hydrolysis (Fig. 2.1). SWOs can also disrupt hemicellulose, promoting a better solubilization and acting synergistically with hemicellulases (Cosgrove 2000; Gourlay et al. 2013; Kang et al. 2013; Kim et al. 2014; Santos et al. 2017).

### 2.4.3 Hemicellulases

Hemicellulases are classified as the class of enzymes responsible for depolymerizing the hemicellulose. In order to achieve the complete degradation of hemicelluloses, the action of several enzymes belonging to GH families is important. The most significant enzymes of these complex are discussed as follows (Polizeli et al. 2005; Saha 2003).

Xylan, a xylose  $\beta$ -1,4-polymer, is a major constituent of hemicellulose. For the degradation of xylan, two main enzymes are necessary, namely, endo- $\beta$ -1,4-xylanase and  $\beta$ -1,4-xylosidase (Fig. 2.2). Endo- $\beta$ -1,4-xylanases (EC 3.2.18) or endoxylanases catalyze the hydrolysis of xylan to xylooligosaccharides. This enzyme acts in the internal backbone of xylan promoting the



**Fig. 2.2** Simplified structures of hemicelluloses with ramifications and the enzymes that act in their hydrolysis. Acetyl substitutions cleaved by acetyl xylan esterase are shown in pink. Arabinan removed from xylan chain by arabinofuranosidase is shown in yellow. Ferulic acid detached to arabinan by feruloyl esterase is shown in green. 4-*O*-Methyl- $\alpha$ -glucuronic acid removed by  $\alpha$ -glucuronidase is shown in blue. The nonreductive end of an oligosaccharide cleaved by  $\beta$ -xylanase to obtain xylose monomers is shown in purple. The xylan backbone cleaved in the interior regions by endoxylanase releasing xylooligosaccharides is shown by the non-highlighted region



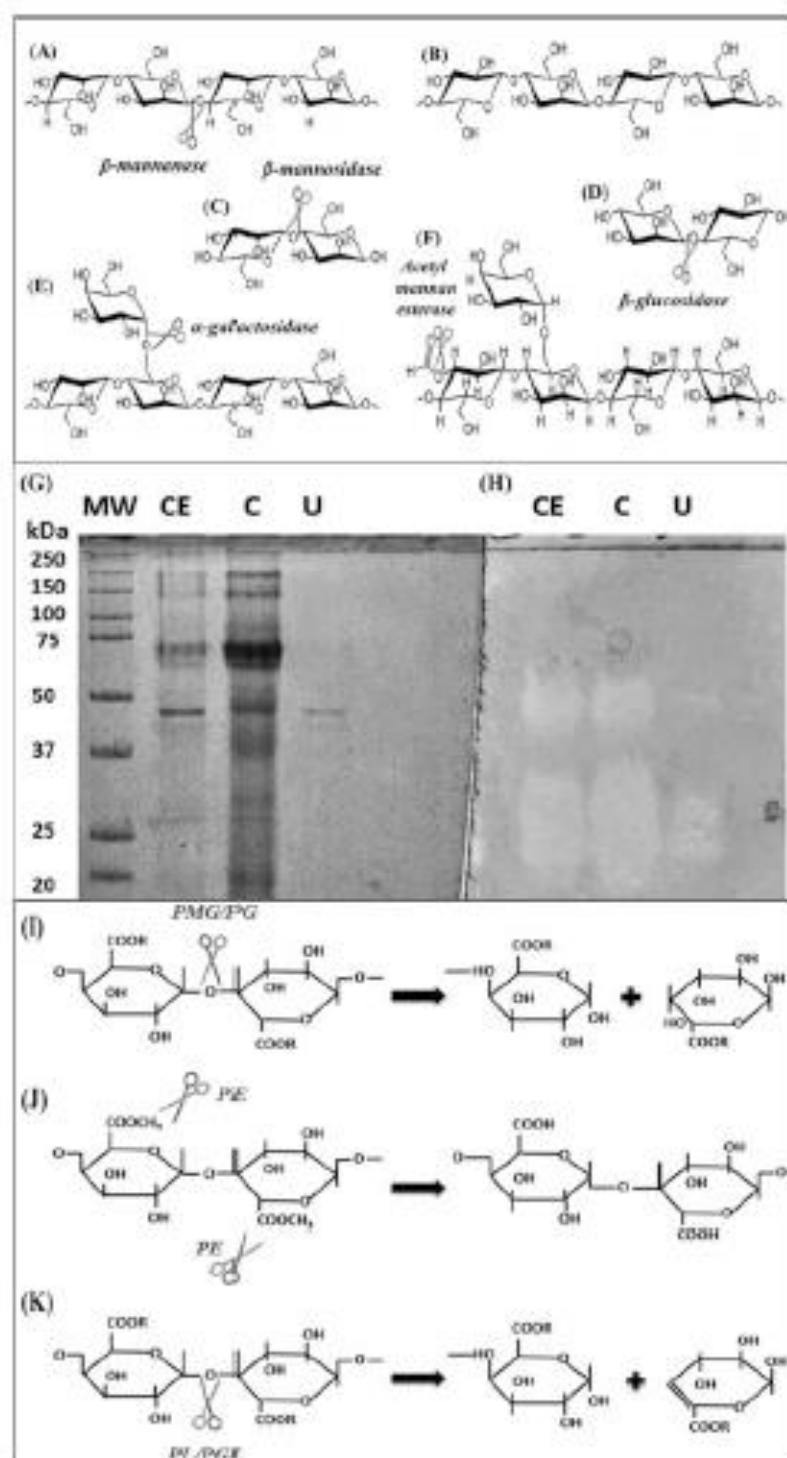
hydrolysis of  $\beta$ -1,4-glycosidic linkages. Exo- $\beta$ -1,4-xylosidase (EC 3.2.1.37) or  $\beta$ -1,4-xylosidase acts in the nonreducing ends of xylan structure or xylooligosaccharides including xylobiose, thus releasing D-xylose monomers (Burlacu et al. 2016; Heinen et al. 2018; Polizeli et al. 2005).

The removal of the ramifications attached to xylan chain is promoted by a complex of enzymes. The most important enzymes are  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -glucuronidase, acetyl xylan esterase, and feruloyl esterase (Fig. 2.2).  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) or arabinofuranosidase cleaves the nonreductive end of the arabinan in the positions O-2 or O-3 releasing oligomers (Juturu and Wu 2013).  $\alpha$ -Glucuronidase (EC 3.2.1.139) hydrolyses the 1-2-glycosidic bond between xylan and the side chain of 4-O-methyl-D-glucuronic acid, thus releasing glucuronic acid (Shallom and Shoham 2003). Acetyl xylan esterase (EC3.1.1.72) removes the acetyl substitutions attached on xylose releasing acetic acid (Tenkanen et al. 1992). Feruloyl esterase (EC3.1.1.73) or feruloyl xylan esterase hydrolyses the ester bond between ferulic acid and arabinose (Dilokpimol et al. 2016).

The mannan-degrading enzymes are  $\beta$ -mannosidase (EC 3.2.1.25),  $\beta$ -mannanase (EC 3.2.1.78), and  $\beta$ -glucosidase (3.2.1.21). There are also additional enzymes such as  $\alpha$ -galactosidase (EC 3.2.1.22) and acetyl mannan esterase (EC 3.1.1.6) required to remove side-chain substituents, thus creating more sites for enzymatic hydrolysis (Fig. 2.3a–f) (Moreira and Filho 2008). According the Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZy), the mannanases are classified into GH families 5, 26, and 113 (Cantarel et al. 2009; Cruz 2013). These GH families have double-displacement mechanism holding anomeric configuration (De Marco et al. 2015).

The complete hydrolysis of the mannan chain demands the synergy of exo-acting and endo-acting hydrolases together with accessory enzymes to reach complete hydrolysis. The heterosynergy is the synergistic action between main-chain and side-chain enzymes ( $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ -galactosidase) and homosynergy between two main-chain enzymes ( $\beta$ -mannosidase and  $\beta$ -mannanase) or between two side-chain enzymes (acetyl mannan esterase and  $\alpha$ -galactosidase) reported in the degradation of mannan (Moreira and Filho 2008).

It is possible to visualize the presence and the size of the  $\beta$ -mannanase following the molecular markers using the technique of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and zymography. Multiple bands stained for  $\beta$ -mannanase activity (Fig. 2.3g, h) can be detected using these techniques, which migrate at molecular masses ranging from 20 to 50 kDa. The variety of forms is usually described for hemicellulases from bacteria and fungi as the result of posttranslational modifications and differential messenger RNA (mRNA) processing. These mannanases can be isozymes, allozymes, and products of different alleles in the same gene or same molecules with different posttranscriptional modifications (De Marco et al. 2015).



**Fig. 2.3** Structures of mannans and pectins. Zymography of mannanase activity. (a) Mannan, (b) glucomannan, (c) galactomannan, and (d) galactoglucomannan. The mannan is hydrolyzed by

#### 2.4.4 Pectin-Degrading Enzyme System

Pectinases (EC 3.2.1.15) are a set of complex enzymes that degrade pectin in plant cell wall (Fig. 2.3i–k). Pectin-degrading enzymes are capable of degrading pectic substances per de-esterification (esterases) or depolymerization (lyases and hydrolases) reactions (Tariq and Latif 2012) and include polygalacturonases (PGs), pectinesterases (PEs), pectate lyases (PGLs), and pectin lyases (PLs) (Ahlawat et al. 2009; Polizeli et al. 2013). Polygalacturonases (PGs) are hydrolases, which cleave  $\alpha$ -1,4-glycosidic linkage in homopolygalacturon backbone. They are classified into GH family 28 according to the Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZy) classification.

Endopolygalacturonases (EC 3.2.1.15) randomly attack the  $\alpha$ -1,4-glycosidic bonds of the polysaccharide chain, thus releasing galacturonic acid oligomers. On the other hand, exopolygalacturonase type I (EC 3.2.1.67) acts in the nonreducing end and the *n*-galacturonic acid is hydrolyzed. Di-galacturonate is released as a result of the action of exopolygalacturonase type II (EC 3.2.1.82) in the nonreducing end of polygalacturonic acid (Khan et al. 2013). Pectinesterases (EC 3.1.1.11) are esterases that catalyze the methoxyl group of pectin forming pectic acid (Amin et al. 2017). Endopectin lyases (EC 4.2.2.10) accomplish trans-elimination reaction of pectin. Endopectate lyases (EC 4.2.2.2) and exopectate lyases (EC 4.2.2.9) cleave internal and nonreducing end of  $\alpha$ -1,4-polygalacturonic acid, respectively, via  $\beta$ -elimination reaction (Yang et al. 2018).

#### 2.4.5 Delignifying Enzymes

Delignifying enzymes are used for biomass pretreatment to remove lignin prior to bioconversion of biomass. As the lignin is removed or ruptured, the hemicellulose and cellulose fibrils become exposed. Thus, the glycoside hydrolases can have a better access to the substrate. In addition, the delignifying enzymes can remove some inhibitors (mainly phenolics), which interfere in the fermentation process (Kudanga and Roes-Hill 2014).

The most important delignifying enzymes are the laccases (EC1.10.3.2). They are multi-copper enzymes crucial to lignin degradation and the removal of phenolics. They can be divided into different enzyme families according to Sirim et al.

---

**Fig. 2.3** (continued)  $\beta$ -mannanase, while  $\alpha$ -galactosidase releases galactose and acetyl mannan esterase releases acetyl groups. The mannanose and glucomannanose are hydrolyzed by (c)  $\beta$ -mannosidase and (d)  $\beta$ -glucosidase, to generate the monosaccharides mannose and glucose. SDS-PAGE (12%) and zymography of mannanase activity in crude extract, stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 (g) and 0.1% Congo red (h). Molecular weight (MW), crude extract (CE) of soybean husk, crude extract concentrated (C) tenfold 30,000 NMWC in the concentration system QuixStand Benchtop (GE Healthcare), crude extract ultrafiltered (U) obtained by the same system as above. (i) R = H (PG) and CH<sub>3</sub> (PMG); (j) PE and (k) R = H (PGL) and CH<sub>3</sub> (PL). The scissors indicate the pectinases acting on the pectic substrates. Polygalacturonase (PG), polymethylgalacturonase (PMG), pectinesterase (PE), pectate lyase (PGL), and pectin lyase (PL)

#### 2.4.4 Pectin-Degrading Enzyme System

Pectinases (EC 3.2.1.15) are a set of complex enzymes that degrade pectin in plant cell wall (Fig. 2.3i–k). Pectin-degrading enzymes are capable of degrading pectic substances per de-esterification (esterases) or depolymerization (lyases and hydrolases) reactions (Tariq and Latif 2012) and include polygalacturonases (PGs), pectinesterases (PEs), pectate lyases (PGLs), and pectin lyases (PLs) (Ahlawat et al. 2009; Polizeli et al. 2013). Polygalacturonases (PGs) are hydrolases, which cleave  $\alpha$ -1,4-glycosidic linkage in homopolygalacturon backbone. They are classified into GH family 28 according to the Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZy) classification.

Endopolygalacturonases (EC 3.2.1.15) randomly attack the  $\alpha$ -1,4-glycosidic bonds of the polysaccharide chain, thus releasing galacturonic acid oligomers. On the other hand, exopolygalacturonase type I (EC 3.2.1.67) acts in the nonreducing end and the D-galacturonic acid is hydrolyzed. Di-galacturonate is released as a result of the action of exopolygalacturonase type II (EC 3.2.1.82) in the nonreducing end of polygalacturonic acid (Khan et al. 2013). Pectinesterases (EC 3.1.1.11) are esterases that catalyze the methoxyl group of pectin forming pectic acid (Amin et al. 2017). Endopectin lyases (EC 4.2.2.10) accomplish trans-elimination reaction of pectin. Endopectate lyases (EC 4.2.2.2) and exopectate lyases (EC 4.2.2.9) cleave internal and nonreducing end of  $\alpha$ -1,4-polygalacturonic acid, respectively, via  $\beta$ -elimination reaction (Yang et al. 2018).

#### 2.4.5 Delignifying Enzymes

Delignifying enzymes are used for biomass pretreatment to remove lignin prior to bioconversion of biomass. As the lignin is removed or ruptured, the hemicellulose and cellulose fibrils become exposed. Thus, the glycoside hydrolases can have a better access to the substrate. In addition, the delignifying enzymes can remove some inhibitors (mainly phenolics), which interfere in the fermentation process (Kudanga and Roes-Hill 2014).

The most important delignifying enzymes are the laccases (EC1.10.3.2). They are multi-copper enzymes crucial to lignin degradation and the removal of phenolics. They can be divided into different enzyme families according to Sirim et al.



**Fig. 2.3** (continued)  $\beta$ -mannanase, while  $\alpha$ -galactosidase releases galactose and acetyl mannan esterase releases acetyl groups. The mannobiose and glucomannobiose are hydrolyzed by (c)  $\beta$ -mannosidase and (d)  $\beta$ -glucosidase, to generate the monosaccharides mannose and glucose. SDS-PAGE (12%) and zymography of mannanase activity in crude extract, stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 (g) and 0.1% Congo red (h). Molecular weight (MW), crude extract (CE) of soybean husk, crude extract concentrated (C) tenfold 30,000 NMWC in the concentration system QuixStand Benchtop (GE Healthcare), crude extract ultrafiltered (U) obtained by the same system as above. (i) R – H (PG) and CH3 (PMG); (j) PE and (k) R – H (PGL) and CH3 (PL). The scissors indicate the pectinases acting on the pectic substrates. Polygalacturonase (PG), polymethylgalacturonase (PMG), pectinesterase (PE), pectate lyase (PGL), and pectin lyase (PL)

**Table 2.3** Classification of laccase families, sequences, and structures

Superfamily	Homologous families	Proteins	Structures
A (Basidiomycete)	4	201	13
B (Ascomycete)	6	421	6
C (Insect)	8	168	0
G (Plant)	5	333	0

Reference: Sirim et al. (2011)

(2011) as shown in Table 2.3. Laccases act by promoting the oxidation of one electron in a wide variety of substrates, notably the lignin phenylpropanoids (Mate and Alcalde 2017). Other important enzymes are the heme-peroxidases. They catalyze hydrogen peroxide-dependent oxidative degradation of lignin of phenolic (as manganese peroxidase-EC1.11.1.13) and in the non-phenolics (as lignin peroxidase-EC1.11.1.14) substrates (Plácido and Capareda 2015).

## 2.5 Bioconversion of Biomass to Second-Generation Bioethanol

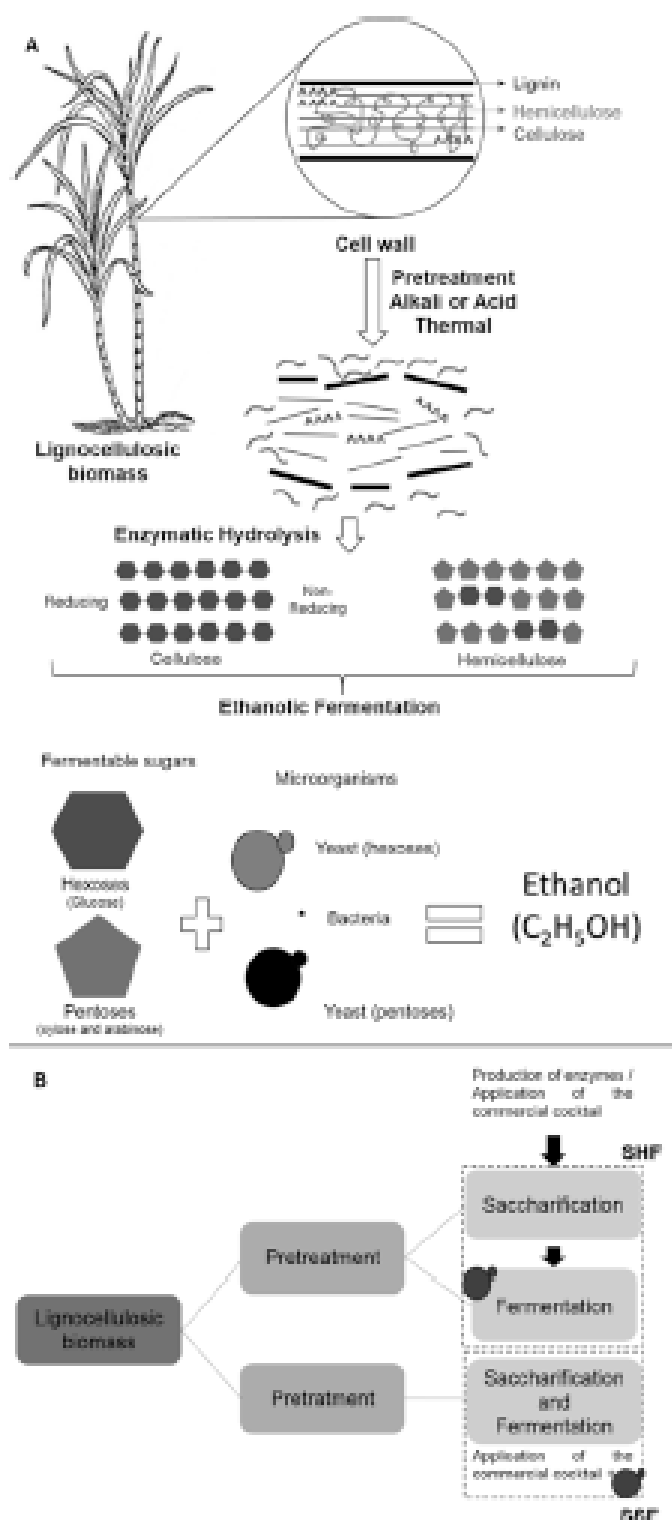
Among several alternative biomasses described in this chapter, the production of bioethanol from sugarcane (*Saccharum* spp.) is very advantageous. Sugarcane is rich in sucrose and allows the fermentation of this sugar by microorganisms resulting in first-generation (1G) bioethanol. On the other hand, the resulting lignocellulosic biomass (bagasse) can be used to produce second-generation (2G) bioethanol. To improve each step of the 2G ethanol production, it is necessary to know the composition of lignocellulosic residues.

Although the main targets for 2G ethanol production are sugarcane in Brazil (Polizeli et al. 2011, 2016, 2017) and corn in the USA (Li et al. 2018), there are studies reporting other biomasses, which were previously described in this chapter such as barley (Yang et al. 2015) and coffee (Nguyen et al. 2019). The key elements in the production of 2G bioethanol from sugarcane bagasse are shown in Fig. 2.4 and discussed below.

## 2.6 Pretreatment of Lignocellulosic Biomass

Pretreatment of biomass may contribute to enhance the cell wall hydrolysis. It alters the chemical composition and physical structure of the substrates, since it aims to separate the carbohydrates from the lignin matrix. This process of separation benefits the enzymatic access to the cellulose and hemicellulose. The presence of lignin allows the unproductive binding and inactivation of the cellulases, thus making the high 2G ethanol yield practically impossible (Srinorakutara et al. 2013).

Some effects of the pretreatments are (a) breakage of the lignin structure and its connection with cellulose and hemicellulose, (b) improvement in the access of cellulases to



**Fig. 2.4** Scheme of the 2G bioethanol production process including pretreatment and bioconversion of lignocellulosic biomass

cellulose due to the removal of hemicellulose and lignin, and (c) decrease in the degree of polymerization of cellulose and its crystallinity (van Dyk and Pletschke 2012; Nanda et al. 2014). According to Buckeridge et al. (2019), this step makes it possible to break down several covalent bonds between lignin and cellulose or hemicellulose, thus making the lignocellulosic biomass more accessible to the enzymatic attack.

There are broad ranges of pretreatments available, such as acidic, basic, or thermal. The acid pretreatment consists of the use of concentrated or diluted acids, associated with temperatures above 120 °C to decrease the rigidity of lignocellulosic biomass and increase the accessibility to the cellulose. In this type of pretreatment, hemicellulose is removed. The alkaline pretreatment removes lignin from the biomass and causes less damage to the sugars. Thermal pretreatment, also known as autohydrolysis, uses water, high temperature, and high pressure to break the lignocellulosic matrix (Michelin et al. 2014; Polizeli et al. 2015).

Each of these pretreatments has a different peculiarity, causing different chemical modifications as mentioned above. During pretreatment of the cellulosic residues, inhibitory compounds may be formed, such as furfural, hydroxymethylfurfural (HMF), phenolic compounds, and organic acids. These compounds have an impact on the action of hydrolytic enzymes, as well as on the microorganisms involved in the fermentative process (Srinorakutara et al. 2013; van Dyk and Pletschke 2012).

The surfactants are used as additives in order to avoid the adsorption of enzymes to their substrate in an unproductive way and to enhance the hydrolysis. The surface active agents are used in the bioconversion in the following ways: (a) during pretreatment, (b) during enzymatic saccharification, and (c) for the recycling of enzymes after plant cell wall degradation (Giese et al. 2012; van Dyk and Pletschke 2012).

---

## 2.7 Obtaining an Enzymatic Consortium

In order to achieve a sustainable 2G bioethanol production, the key to increase the efficiency of the saccharification is the thorough understanding of the plant cell wall structure since enzymatic degradation of lignocellulosic biomass is required to yield most of the fermentable sugars. According to Buckeridge and de Souza (2014), plant cell walls show regions of polymers that relate with other polymer chains, such as xyloglucan and cellulose. The interaction among the macromolecules of cell walls of biomass makes its total hydrolysis impossible for endoglucanases to attack glycosidic bonds of cellulose. Moreover, there is a need for the formulation of efficient enzymatic cocktails with enzymes with endo/exo characters as well as branching and debranching feature. The synergism between the enzymes responsible for cell wall hydrolysis considers that the structure of the polysaccharides present in the lignocellulosic biomass may play an important role in the kinetic hydrolysis properties (Mohanram et al. 2013; De Souza et al. 2013; Buckeridge and de Souza 2014).

De Souza et al. (2013) proposed a theoretical scheme composed of the enzymes necessary for the saccharification of the cell wall of sugarcane, which included hemicellulases, cellulases,  $\beta$ -galactosidases, lichenases, and other accessory enzymes.

Commercial enzymatic cocktails available for the depolymerization of lignocellulosic materials are loosely defined as a complex mixture containing about 80–200 proteins, including hemicellulases, cellulases, and accessory enzymes (Mohanram et al. 2013). To improve the performance of enzyme cocktails, it took years of bio-prospecting studies, optimization of strains through genetic engineering for the production of enzymes, and development of pretreatment strategies since these are the major technical challenges in an efficient 2G ethanol production process.

The enzymes act in synergy for substrate degradation for ethanol production. van Dyk and Pletschke (2012) as well as Li et al. (2014) have demonstrated that the understanding of synergism is of fundamental importance to clarify the mechanism of the action of the enzymes alone and the interaction between them. The enzymatic saccharification is beneficial when compared to other methods because it is a more specific and cleaner process besides the reduction of the formation of inhibitory compounds. During the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass, oligosaccharides, disaccharides, and monomers are formed. They cause the inhibition of  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -xylosidase associated with the saccharification as previously mentioned in this chapter. High concentrations of these sugars may have an impact on the hydrolytic efficiency of the lignocellulosic residue (van Dyk and Pletschke 2012).

For the bioconversion of lignocellulosic residue to fermentable sugars, it is necessary to decrease the cost of enzymes, in addition to studies aiming to enhance the efficiency of the enzymes used in the cell wall hydrolysis. In this way, an effective tool to reduce the cost of the various hydrolytic enzymes would be their immobilization. This process leads to an economy in the process of producing biofuels besides allowing the recovery and reuse of the enzymes (Borges et al. 2014; Maitan-Alfenas et al. 2015).

---

## 2.8 Fermentation for the Production of Second-Generation Bioethanol

Alcoholic fermentation consists of the transformation of the sugars from the hydrolysate into ethanol, CO<sub>2</sub>, and energy due to the catalytic action of the yeast or bacteria. There are two modes of operations for bioethanol production of lignocellulosic biomass, namely, separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SSF) (Fig. 2.4b). Efforts at process integration are still constrained by obstacles. There is a need of industrial microorganisms capable to assimilate pentoses and hexoses as well as the control in the formation and elimination of inhibitory compounds resulting from the whole process. Another factor that must be studied is the standardization of the ideal conditions for the integration of two or more processes to be simultaneously performed in a single bioreactor (Ramos et al. 2015).

The pentoses are fermented by yeasts of the genus *Candida*, *Komagataella*, and *Meyerozyma*, but studies with these yeasts are still limited. The hexoses are assimilated by yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, which have high fermentative efficiency.



This efficiency is due to the rapid growth of yeasts as well as the ability to metabolize sugars. In addition, they have the ability to produce and consume ethanol and are tolerant to high concentrations of this compound and resistant to low levels of oxygen. Another bacterial producer of bioethanol, *Zymomonas mobilis*, has shown promising results for the large-scale production of bioethanol.

---

## 2.9 Conclusions

The dependence on nonrenewable and highly polluting energy sources has led to seek alternative fuel sources. Clean energy has the advantage to lower CO<sub>2</sub> emissions, providing energy capable of reducing the production of greenhouse gases, maintaining environmental sustainability, mitigating climate change, and stimulating the global economy. Thus, the growing demand for biofuels has motivated the use of biological materials, specifically photosynthetic organisms, as the raw materials.

It is known that billions of tons of plant-based residues are obtained across the world. However, only a small fraction of this organic waste is used for bioenergy and bioproducts. Lignocellulosic biomass is mainly constituted by a polysaccharide-lignin complex with varied composition depending on the plant variety. The deconstruction of this intricate complex is one of the main bottlenecks in the conversion of biomass to biofuels. The development of novel technologies is necessary to make the hydrolysis and saccharification economically viable. Genetic modifications of plants resulting in a vegetal with increased content of biodegradable and fermentable saccharides are some of the perspectives. Another focus in plants is to increase the fiber content, as the *energy cane*, considering 2G ethanol production from sugarcane.

Another problem confronted with 2G ethanol production is the biochemical structure of the lignin because it blocks the access to cellulose. Various pretreatments of biomass alter the chemical/physical structure of the plant cell walls, thus separating the polysaccharides from lignin and allowing better enzymatic access to cellulose, hemicellulose, and pectin. One of the problems of such pretreatments is the formation of inhibitory compounds as furfural, hydroxymethylfurfural, phenolic compounds, and organic acids, which inhibit enzymatic action and microbial activity during bioconversion. Hydrothermal pretreatment and steam explosion are alternative strategies to acid, alkaline, and other pretreatments. Delignifying enzymes may contribute as a biomass pretreatment for bioethanol production since the removal of lignin exposes hemicellulose and cellulose fibrils, and consequently, glycoside hydrolase can have better access to the substrates.

In all cases, it is important to have an in-depth and detailed knowledge of the structure of the biomass cell constituents and how they interact aiming at the production of fermentable sugars. Immunofluorescence techniques using antibodies against the macromolecules of the biomass cell wall have given excellent know-how, and a glycolic code of sugarcane walls has also been reported in the literature.

Enzymatic saccharification of raw or pretreated biomass for the liberation of fermentable sugars by yeast is advantageous when compared to the chemical methods because of being a selective, cleaner, and less energy-intensive process, which produces less amounts of inhibitory biological compounds. For this purpose, commercial enzyme cocktails obtained from recombinant microorganisms, such as bacteria and filamentous fungi, are used. Enzymatic hydrolysis process is largely successful in many cases, but problems, such as the viability of the strain, mycotoxins, contamination, genetic instability, reproducibility, inhibition of the enzyme by end products, and other molecular complications, have been reported. Some proposed alternatives include bioprospecting studies of mesophilic and thermophilic strains and optimization of strains through genetic engineering for the production and thermostabilization of enzymes.

Efficient enzymatic cocktails include the cellulases, hemicellulases, pectinases, ligninases, and, accessory enzymes and proteins, such as auxiliary activity 9 and swollenin. Synergism is expected between the hydrolytic enzymes, auxiliary activity enzymes, and swollenins because they can act together favoring the oxidative cleavage of glycosidic bonds and deagglomeration of crystalline cellulose, thus giving access to cellulases and facilitating enzymatic hydrolysis. Besides, the debranching of hemicellulose is favored by the use of enzymatic cocktail. The addition of ligninolytic enzymes in the cocktail helps in removing some phenolic compounds that may interfere in the final fermentation process. Usually, the combinatory action of enzymes reverts to higher levels of fermentable sugars. Thus, the understanding of the synergic mechanisms between the hydrolytic enzymes is fundamental to improve the saccharification process.

A perturbing factor for large-scale bioconversion studies, which still needs attention, is the high cost of commercial hydrolytic enzymes. An alternative could be the immobilization or co-immobilization of the enzymes. This process sometimes results in enzymatic hyperactivation and allows various reuses of the biocatalysts (enzyme and support). Furthermore, as may be concluded, various studies must be developed aiming to achieve the total success of the lignocellulosic biomass conversion in fermentable sugars. Besides, it is a clean process with many advantages that need recognition.

**Acknowledgments** The Laboratory of Microbiology and Cell Biology of Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil, has been supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2014/50884-5 and 2018/07522-6). Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli is a research fellow of Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 301963/2017-7). Thiago Machado Pasin, Paula Zaghetto de Almeida, Ana Sílvia de Almeida Scarcella, and Juliana da Conceição Infante are recipients of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Finance Code 001) scholarship. We thank Mariana Cereia for the language review of the chapter.

## References

- Ahluwat S, Dhiman SS, Battan R, Mandhan RP, Sharma J (2009) Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochem* 44:521–526
- Al-Abdulkader AM, Al-Namazi AA, AlTurki TA, Al-Khuraish MM, Al-Dakhil AI (2018) Optimizing coffee cultivation and its impact on economic growth and export earnings of the producing countries: The case of Saudi Arabia. *Saudi J Biol Sci* 25:776–782
- Amin F, Bhatti HN, Bilal M, Asgher M (2017) Improvement of activity, thermo-stability and fruit juice clarification characteristics of fungal exo-polygalacturonase. *Int J Biol Macromol* 95:974–984
- Andrić P, Meyer AS, Jensen PA, Dam-Johansen K (2010) Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnol Adv* 28:308–324
- Artzi L, Bayer EA, Morats S (2017) Cellulosomes: Bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides. *Nat Rev Microbiol* 15:83–95
- Ayres RU (2014) Economic growth. In: *Bubble Economy: Is Sustainable Growth Possible?* MIT Press, Cambridge, Massachusetts; London, England, pp 277–306
- Badieyan S, Bevan DR, Zhang C (2012) Study and design of stability in GH5 cellulases. *Biotechnol Bioeng* 109:31–44
- Balkovit J, Velde van der M, Skalský R, Xiong W, Folberth C, Khabarov N, Smirnov A, Mueller ND, Obersteiner M (2014) Global wheat production potentials and management flexibility under the representative concentration pathways. *Glob Planet Chang* 122:107–121
- Bertini L, Lambreght M, Fantucci P, De Gioia L, Borsari M, Sola M, Bortolotti CA, Bruschi M (2018) Catalytic mechanism of fungal lytic polysaccharide monoxygenases investigated by first-principles calculations. *Inorg Chem* 57:86–97
- Bhatia L, Paliwal S (2011) Ethanol production potential of *Pachysolen tannophilus* from sugarcane bagasse. *Int J Biotechnol Bioeng Res* 2:271–276
- Borges DG, Baraldo Junior A, Farinas CS, de Lima Camargo Giordano R, Tardioli PW (2014) Enhanced saccharification of sugarcane bagasse using soluble cellulase supplemented with immobilized  $\beta$ -glucosidase. *Bioresour Technol* 167:206–213
- Boyce A, Walsh G (2015) Characterisation of a novel thermostable endoglucanase from *Alicyclobacillus vulcanalis* of potential application in bioethanol production. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:7515–7525
- Buckeridge MS, De Souza AP (2014) Breaking the “glycomic code” of cell wall polysaccharides may improve second-generation bioenergy production from biomass. *BioEnergy Res* 7:1065–1073
- Buckeridge MS, Grandis A, Tavares EQP (2019) Disassembling the glycomic code of sugarcane cell walls to improve second-generation bioethanol production. In: Ray R, Ramachandran R (eds) *Bioethanol production from food crops*. Elsevier, Amsterdam, pp 31–43
- Burlacu A, Cornea CP, Israel-roming F (2016) Microbial xylanase: a review. *Sci Bull XX*:335–342
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37:233–238
- CONAB (2018) Companhia Nacional de Abastecimento—National Supply Company, 2018. <http://www.conab.gov.br>.
- Cosgrove DJ (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407:321–326
- Cotrim CA, Soares JSM, Kobe B, Menossi M (2018) Crystal structure and insights into the oligomeric state of UDP-glucose pyrophosphorylase from sugarcane. *PLoS One* 13:1–13
- Cruz AF (2013) Mannan-degrading enzyme system. In: *Fungal enzymes*. CRC Press, Boca Raton, pp 233–257

- Daisy M, Rajendran K, Amanullah MM (2018) Effect on microbial population, quality parameters and green fodder yield of leguminous crops under Bt cotton intercropping system. *Int J Curr Microbiol App Sci* 7:332–337
- De Giuseppe PO, Souza TDACB, Souza FHM, Zanphorlin LM, Machado CB, Ward RJ, Jorge JA, Furriel RDP, Murakami MT (2014) Structural basis for glucose tolerance in GH1  $\beta$ -glucosidases. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 70:1631–1639
- De Marco JCI, De Souza Neto GP, Castro CFS, Michelin M, Polizeli MLTM, Ferreira Filho EX (2015) Partial purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -mannanase from *Aspergillus foetidus*. *Appl Sci* 5:881–893
- De Souza AP, Leite DCC, Pattathil S, Hahn MG, Buckeridge MS (2013) Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. *Bioenergy Res* 6:564–579
- Dilokpimol A, Mäkelä MR, Aguilar-Pontes MV, Benoit-Gelber I, Hildén KS, De Vries RP (2016) Diversity of fungal feruloyl esterases: Updated phylogenetic classification, properties, and industrial applications. *Biotechnol Biofuel* 9:231
- EPOA (2018) European Palm Oil Alliance. <https://www.palmoilandfood.eu/en/palm-oil-production>
- FAO (2015) Soybeans, Production/Crops/World. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- FAO (2017) Food and Agriculture Organization of the United Nations. [http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries\\_by\\_commodity](http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity)
- FAO (2018) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- FAO (2019) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#search/potato>
- FAS (2018a) Foreign Agricultural Service—Department of Agriculture of the United States. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf>
- FAS (2018b) Foreign Agricultural Service—Department of Agriculture of the United States. <https://www.fas.usda.gov/data/china-cotton-and-products-annual-2>
- Giese EC, Pierozzi M, Dussán KJ, Chandel AK, Da Silva SS (2012) Enzymatic saccharification of acid-alkali pretreated sugarcane bagasse using commercial enzyme preparations. *J Chem Technol Biotechnol* 88:1266–1272
- Gourlay K, Hu J, Arantes V, Andberg M, Saloheimo M, Penttilä M, Saddler J (2013) Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. *Bioresour Technol* 142:498–503
- Haitjema CH, Gilmore SP, Henske JK, Solomon KV, De Groot R, Kuo A, Mondo SJ, Salamov AA, Labutti K, Zhao Z, Chiniquy J, Barry K, Brewer HM, Purvine SO, Wright AT, Hainaut M, Boxma B, van Alen T, Hackstein JHP, Henrissat B, Baker SE, Grigoriev IV, O'Malley MA (2017) A parts list for fungal cellulosomes revealed by comparative genomics. *Nat Microbiol* 2:1–8
- Heck JX, Hertz PF, Ayub MAZ (2002) Cellulase and xylanase production by isolated amazon Bacillus strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Braz J Microbiol* 33:213–218
- Heinen PR, Bauermeister A, Ribeiro LF, Messias JM, Almeida PZ, Moraes LAB, Vargas-rechia CG, De Oliveira AHC, Ward RJ, Filho EXP, Kadowaki MK, Jorge JA, Polizeli MLTM (2018) GH11 xylanase from *Aspergillus tamarii* Kita: Purification by one-step chromatography and xylooligosaccharides hydrolysis monitored in real-time by mass spectrometry. *Int J Biol Macromol* 108:291–299
- Huang W, Bai Z, Hoefel D, Hu Q, Lv X, Zhuang G, Xu S, Qi H, Zhang H (2012) Effects of cotton straw amendment on soil fertility and microbial communities. *Front Environ Sci Eng* 6:336–349
- IRENA (2014) Remap 2030 Global Bioenergy Supply and Demand Projections
- Iskandar MJ, Baharum A, Anuar FH, Othaman R (2018) Palm oil industry in South East Asia and the effluent treatment technology—a review. *Environ Technol Innov* 9:169–185

- Juturu V, Wu JC (2013) Insight into microbial hemicellulases other than xylanases: a review. *J Chem Technol Biotechnol* 88:353–363
- Juturu V, Wu JC (2014) Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renew Sustain Energy Rev* 33:188–203
- Kang K, Wang S, Lai G, Liu G, Xing M (2013) Characterization of a novel swollenin from *Penicillium oxalicum* in facilitating enzymatic saccharification of cellulose. *BMC Biotechnol* 13:42
- Khan M, Nakkeeran E, Umesh-Kumar S (2013) Potential application of pectinase in developing functional foods. *Annu Rev Food Sci Technol* 4:21–34
- Kim U, Lee HJ, Choi L-G, Kim KH (2014) Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:8469–8480
- Kudanga T, Roes-Hill M (2014) Laccase applications in biofuels production: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:6525–6542
- Laborte AG, Gutierrez MA, Balanza JG, Saito K, Zwart SJ, Boschetti M, Murty MVR, Villano L, Aunario JK, Reinke R, Koo J, Hijmans RJ, Nelson A (2017) RiceAtlas, a spatial database of global rice calendars and production. *Nat Sci Data* 4:170074
- Lenihan P, Orozco A, O'Neill E, Ahmad MNM, Rooney DW, Walker GM (2010) Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chem Eng J* 156:395–403
- Li J, Zhou P, Liu H, Xiong C, Lin J, Xiao W, Gong Y, Liu Z (2014) Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies. *Bioresour Technol* 155:258–265
- Li YH, Zhang XY, Zhang F, Peng LC, Zhang DB, Kondo A, Bai FW, Zhao XQ (2018) Optimization of cellulolytic enzyme components through engineering *Trichoderma reesei* and on-site fermentation using the soluble inducer for cellulosic ethanol production from corn stover. *Biotechnol Biofuels* 11:49
- Maitan-Alfenas GP, Visser EM, Guimarães VM (2015) Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Curr Opin Food Sci* 1:44–49
- Mate DM, Alcalde M (2017) Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microb Biotechnol* 10:1457–1467
- Michelin M, Polizeli MLTM, Ruzene DS, Silva DP, Teixeira JA (2013) Application of lignocellulosic residues in the production of cellulase and hemicellulases from fungi. In: Polizeli MLTM, Rai M (eds) *Fungal enzymes*. CRC Press, Boca Raton, pp 31–64
- Michelin M, Ruiz HA, Silva DP, Ruzene DS, Teixeira JA, Polizeli MLTM (2014) Cellulose from lignocellulosic waste. In: Gopal K, Mérrillon RJ-M (eds) *Polysaccharides*. Springer International Publishing, Basel, Switzerland, pp 1–33
- Mohanram S, Amat D, Choudhary J, Arora A, Nain L (2013) Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. *Sust Chem Process* 1:15
- Møllers KB, Mikkelsen H, Simonsen TL, Cannella D, Johansen KS, Bjerrum MJ, Felby C (2017) On the formation and role of reactive oxygen species in light-driven LPMO oxidation of phosphoric acid swollen cellulose. *Carbohydr Res* 448:182–186
- Moreira LRS, Filho EXF (2008) An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:165–178
- Muller G, Chylenski P, Bissaro B, Hijsink VGH, Horn SJ (2018) Biotechnology for biofuels the impact of hydrogen peroxide supply on LPMO activity and overall saccharification efficiency of a commercial cellulase cocktail. *Biotechnol Biofuels* 11:209
- Muthayya S, Sugimoto JD, Montgomery S, Maberly GF (2014) An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Ann NY Acad Sci* 1324:7–14
- Nanda S, Mohammad J, Reddy SN, Kozinski JA, Dalai AK (2014) Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels. *Biomass Convers Bioref* 4:157–191
- Nanda S, Maley J, Kozinski JA, Dalai AK (2015) Physico-chemical evolution in lignocellulosic feedstocks during hydrothermal pretreatment and delignification. *J Biobased Mater Bioenerg* 9:295–308
- Neureiter M, Danner H, Thomasser C, Saidi B, Braun R (2002) Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. *Appl Biochem Biotechnol* 98:49–58

- Nguyen QA, Cho EJ, Lee D-S, Bae H-J (2019) Development of an advanced integrative process to create valuable biosugars including manno-oligosaccharides and mannose from spent coffee grounds. *Bioresour Technol* 272:209–216
- Obeng EM, Adam SNN, Budiman C, Ongkudon CM, Maas R, Jose J (2017) Lignocellulases: a review of emerging and developing enzymes, systems, and practices. *Bioresour Bioprocess* 4:16
- Ojewumi ME, Job AI, Taiwo OS, Obanla OM, Ayoola AA, Ojewumi EO, Oyeniyi EA (2018) Bio-conversion of sweet potato peel waste to bio-ethanol using *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Pharm Phytopharm Res* 8:46–54
- Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT (2000) Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 74:69–80
- Payne CM, Knott BC, Mayes HB, Hansson H, Himmel ME, Sandgren M, Stahlberg J, Beckham GT (2015) Fungal Cellulases. *Chem Rev* 115:1308–1448
- Plácido J, Capareda S (2015) Lignolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production. *Bioresour Bioprocess* 2:23
- Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:577–591
- Polizeli MLTM, Corrêa ECP, Polizeli AM, Jorge JA (2011) Hydrolases from microorganisms used for degradation of plant cell wall and bioenergy. In: Buckeridge MS, Goldman GH (eds) *Routes to Cellulosic Ethanol*. Springer, New York, NY, pp 115–134
- Polizeli MLTM, Damásio ARL, Maller A, Cabral H, Polizeli AM, Rai M (2013) Pectinases produced by microorganisms: properties and applications. In: Polizeli MLTM, Rai M (eds) *Fungal enzymes*. CRC, Boca Raton, pp 327–351
- Polizeli MLTM, Peralta RM, Bracht A, Michelin M, Somera AF (2015) Enzymes prospection from fungi and biomass pretreatment for biorefinery application. In: Silva RN (ed) *Mycology: current and future developments*. Bentham Science Publishers, Sharjah, pp 57–81
- Polizeli MLTM, Vici AC, Scarcella ASA, Cereia M, Pereira MG (2016) Enzyme system from *Aspergillus* in current industrial uses and future applications in the production of second-generation ethanol. In: Gupta VK (ed) *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Aspergillus system properties and applications*. Elsevier, Amsterdam, pp 127–140
- Polizeli MLTM, Somera AF, de Lucas RC, Nozawa MSF, Michelin M (2017) Enzymes involved in the biodegradation of sugarcane biomass: challenges and perspectives. In: Buckeridge MS, De Souza AP (eds) *Advances of basic science for second generation bioethanol from sugarcane*. Springer International Publishing, New York, NY, pp 55–79
- Ramos LP, da Silva L, Ballem AC, Pitarello AP, Chiarello LM, Silveira MHL (2015) Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. *Bioresour Technol* 175:195–202
- Rocha GJM, Gonçalves AR, Oliveira BR, Olivares EG, Rossell CEV (2011) Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. *Ind Crop Prod* 35:274–279
- Saenger M, Hartge EU, Werther J, Ogada T, Singi Z (2001) Combustion of coffee husks. *Renew Energy* 23:103–121
- Saha BC (2003) Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:279–291
- Saini JK, Saini R, Tewari I (2015) Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *Biotech* 5:337–353
- Santos FA, De Queiróz JH, Colodette JL, Fernandes SA, Guimarães VM, Rezende ST (2012) Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quim Nova* 35:1004–1010
- Santos CA, Filho JAF, Donovan AO, Gupta VK, Tushy MG, Souza AP (2017) Production of a recombinant swollenin from *Trichoderma harzianum* in *Escherichia coli* and its potential synergistic role in biomass degradation. *Microb Cell Factories* 16:83–93
- Sarkar N, Ghosh SK, Bannerjee S, Aikat K (2012) Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renew Energy* 37:19–27

- Shallom D, Shoham Y (2003) Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol* 6:219–228
- Shewry PR (2009) Wheat. *J Exp Bot* 60:1537–1553
- Silanikove N, Danai O, Levanon D (1988) Composted cotton straw silage as a substrate for *Pleurotus* sp. cultivation. *Biol Wastes* 25:219–226
- Singhania RR, Patel AK, Sukumaran RK, Larroche C, Pandey A (2013) Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresour Technol* 127:500–507
- Sirim D, Wagner F, Wang L, Schmid RD, Pleiss J (2011) The laccase engineering database: a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases. *Database* 2011:1–7
- Soeriatmadja W, Leong T (2018) European ban on palm oil in biofuels upsets Jakarta, KL. *Straitstimes*. 2018 Available at <https://www.straitstimes.com/asia/se-asia/european-ban-on-palm-oil-in-biofuels-upsets-jakarta-kl>. Accessed 20 Aug 2010
- Souza AL, Garcia R, Pereira OG, Cecon PR, de C Valadares-Filho S, Paulino MF (2001) Composição química - bromatológica da casca de café tratada com amônia anidra e sulfeto de sódio. *Rev Bras Zootec* 30:983–991
- Srinorakutara T, Suttikul S, Boonwithya N (2013) Effect of different pretreatment methods on enzymatic saccharification and ethanol production from sugarcane shoots and leaves. *J Food Sci Eng* 3:309–316
- Sudiyani Y, Styarini D, Triwahyuni E, Sudiyarmanto, Sembiring KC, Aristiawan Y, Abimanyu H, Han MH (2013) Utilization of biomass waste empty fruit bunch fiber of palm oil for bioethanol production using pilot—Scale unit. *Energy Procedia* 32:31–38
- Tamanini C, Haully MC (2004) Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Semin Ciências Agrárias* 25:315–330
- Tariq A, Latif Z (2012) Isolation and biochemical characterization of bacterial isolates producing different levels of polygalacturonases from various sources. *Afr J Microbiol Res* 6:7259–7264
- Tenkanen M, Puls J, Poutanen K (1992) Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. *Enzym Microb Technol* 14:566–574
- Tew T, Cobill RM (2008) Genetic improvement of sugarcane (*Saccharum* spp.) as an energy crop. In: Vermerris W (ed) *Genetic improvement of bioenergy crops*. Springer, Gainesville, FL, pp 249–272
- van Dyk JS, Pletschke BI (2012) A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol Adv* 30:1458–1480
- Várnai A, Mikelt MR, Djajadi DT, Rahikainen J, Hatakka A, Viikari L (2014) Carbohydrate-binding modules of fungal cellulases: occurrence in nature, function, and relevance in industrial biomass conversion. *Adv Appl Microbiol* 88:103–165
- Walton PH, Davies GJ (2016) On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monoxygenases. *Curr Opin Chem Biol* 31:195–207
- WAP, World Agricultural Production (2019). <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>
- WASDE, World Agricultural Supply and Demand Estimates (2018). [https://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/Secretary\\_Briefing.pdf](https://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/Secretary_Briefing.pdf)
- WBA, World Bioenergy Association (2014) Global Bioenergy Statistics. <http://oe.worldbioenergy.org/content/wba-gbs>
- Wei L, Mcdonald AG (2016) A review on grafting of biofibers for biocomposites. *Materials (Basel)* 9:303–325
- Wilson DB, Kostylev M (2012) Cellulase processivity. *Methods Mol Biol* 908:93–99
- Worldatlas & Graphic Maps (2017) The leading barley producing countries in the World. <https://www.worldatlas.com/articles/the-leading-barley-producing-countries-in-the-world.html>
- Worldatlas & Graphic Maps (2019) Top wheat producing countries. <https://www.worldatlas.com/articles/top-wheat-producing-countries.html>

- Yang M, Kuitinen S, Zhang J, Vepsäläinen J, Keintinen M, Pappinen A (2015) Co-fermentation of hemicellulose and starch from barley straw and grain for efficient pentoses utilization in acetone–butanol–ethanol production. *Bioresour Technol* 179:128–135
- Yang Y, Zhang Y, Li B, Yang X, Dong Y, Qiu D (2018) A *Verticillium dahliae* pectate lyase induces plant immune responses and contributes to virulence. *Front Plant Sci* 9:1–15
- Zhu SD, Wu Y, Yu Z, Liao J, Zhang Y (2005) Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymatic hydrolysis. *Process Biochem* 40:3082–3086