UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

FLÁVIA DANIELLE DOS SANTOS

Desenvolvimento de coquetéis enzimáticos customizados para a hidrólise de substratos com elevados teores de hemicelulose e lignina

> Lorena 2021

FLÁVIA DANIELLE DOS SANTOS

Desenvolvimento de coquetéis enzimáticos customizados para a hidrólise de substratos com elevados teores de hemicelulose e lignina

> Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Microbiologia Aplicada

Orientador: Prof. Dr. André Luís Ferraz

Versão Original

Lorena 2021 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

> Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado da Escola de Engenharia de Lorena, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

```
Santos, Flávia Danielle dos
Desenvolvimento de coquetéis enzimáticos
customizados para a hidrólise de substratos com
elevados teores de hemicelulose e lignina / Flávia
Danielle dos Santos; orientador André Luis Ferraz -
Versão Original. - Lorena, 2021.
127 p.
```

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2021

1. Cellic ctec2 . 2. Beta-xilosidase. 3. Alfa arabinofuranosidase. 4. Esterases. 5. Hidrólise enzimática. I. Título. II. Ferraz, André Luis, orient.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar força e persistência para continuar, mesmo diante de todas as adversidades. Aos meus pais avós Maria do Carmo e Antônio Francisco, por me criaram com tanto amor e dedicação. Por priorizarem minha educação, me ensinando que toda luta valeria a pena com fé e força de vontade.

Ao meu marido Gustavo, por acreditar em mim e me impulsionar a lutar pelos meus sonhos. E meu filho Antônio, por me ensinar todos os dias sobre o amor e me trazer esperança de um futuro melhor.

Ao meu pai Joaquim e minha madrasta Ângela. Minha mãe Sueli e meu padrasto Rubens. Agradeço também imensamente meus irmãos Jussiê, Ueverton e Augusto, cunhadas Shirley e Cynthia e sobrinhos Ana Beatriz, Francisco e João Paulo. Vocês sempre tiveram na torcida por minhas realizações. Obrigada por todo amor e companheirismo.

Agradeço aos meus sogros Dulce e Ednarque, por cuidarem sempre com tanto carinho de nós. As amigas e irmãs que a vida me deu, Lara, Carla, Débora, Juliana Godinho, Juliana Passos e Bárbara Vilas Boas, por estarem sempre presentes em todos os momentos importantes da minha vida.

Ao meu orientador André Ferraz, por toda paciência, ensinamentos e atenção. A você toda minha admiração e gratidão. Aos membros da banca examinadora e a Prof. Dr. Adriane Milagres e Prof. Dr. Valdeir Arantes pela contribuição com o desenvolvimento do presente trabalho.

Aos amigos do LCM Uirajá, Ângela, Fernanda, Otto e Ana. E também os companheiros dos laboratórios vizinhos, Lucas, Yummi, Caio, Braz e Bárbara. Obrigada por fazerem meus dias mais felizes e leves. Ao José Moreira, exemplo de humildade e companheirismo. Jose Cobrinha, Djalma, André e Sandra. A quem sempre pude contar em todos os momentos necessários

A Escola de Engenharia de Lorena e ao PPGBI, por todo acolhimento e por anos tão produtivos e engrandecedores em minha vida. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro durante a realização do presente trabalho.

Dedico este trabalho a memória de meu pai avô Antônio Francisco, obrigada por ter sido o melhor pai que eu poderia ter. Eternamente em meu coração e pensamento.

RESUMO

SANTOS, F. D. **Desenvolvimento de coquetéis enzimáticos customizados para a hidrólise de substratos com elevados teores de hemicelulose e lignina**. 2021. 127 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2021.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver coquetéis enzimáticos para a hidrólise de substratos específicos gerados a partir de bagaço de cana pré-tratado com tecnologias brandas de pré-tratamento (processo sulfito-alcalino e processo biológico com o fungo Ceriporiopsis subvermispora). Inicialmente, os substratos em estudo foram hidrolisados empregando diferentes cargas do complexo enzimático comercial Cellic CTec2 (5, 10 e 20 FPU/g de substrato) de modo a determinar a performance desse coquetel na digestibilidade dos bagaços pré-tratados. Os resultados obtidos demonstraram que maiores conversões de glucana e xilana são obtidas utilizando uma carga de 20 FPU, porém a redução da carga para 10 FPU não acarretou em uma diminuição proporcional na eficiência da hidrólise, sendo essa menor carga empregada nos ensaios subsequentes. Considerando que os substratos em estudo apresentaram quantidades apreciáveis de hemicelulose residual, o efeito da remoção desse componente por meio de um segundo pré-tratamento, empregando ácido diluído, demonstrou ser possível alcançar um aumento de aproximadamente 34% na conversão da celulose em glicose quando a remoção química de hemicelulose foi da ordem de 56%. Para viabilizar a remoção enzimática da hemicelulose, o complexo Cellic CTec2 foi então suplementado com hemicelulases acessórias, visto que a atividade total de xilanase já era elevada. O efeito de β -xilosidase e de α -arabinofuranosidase (ambas em cargas de 1, 3 e 5 mg/g de substrato), bem como a adição conjunta das duas enzimas foi avaliado frente às conversões de grupos arabinosil, além de xilana e glucana. Para o bagaço pré-tratado com sulfito-alcalino, os maiores rendimentos de sacarificação foram obtidos utilizando 1 mg/g de α-arabinofuranosidase, aumentando em 17,5 % a conversão em glucana e 27% a conversão de xilana. Para o bagaço biotratado com C. subvermispora, as maiores eficiências de sacarificação foram alcançadas com a adição de 1 mg/g de β -xilosidase, provendo um aumento de 30% e 27% na conversão em glucana e xilana, respectivamente. Considerando a presença de grupos acetil e ácidos hidroxicinâmicos no substrato biotratado com C. subvermispora, foi avaliada também a suplementação do coquetel Cellic CTec2 com 1 mg/g de acetil xilana esterase e 1 mg/g de feruloil esterase, adicionadas individualmente, onde foi observado extensa remoção de grupos acetil e ácido ferúlico, resultado no aumento de 27% e 21% nos rendimentos de glicose, aplicando acetil xilana esterase e feruloil esterase, respectivamente. Outro importante resultado observado foi em relação a adição de albumina ao complexo Cellic CTec2. Nas baixas doses de adição de albumina (até 2 mg/g de substrato), não houve efeito positivo na sacarificação. Por outro lado, adições de cargas elevadas de albumina (25 e 250 mg/g de substrato) proporcionaram maiores níveis de sacarificação do substrato pré-tratado com sulfito-alcalino. Dessa forma, o presente estudo demonstrou ser possível aumentar os níveis de sacarificação de substratos pré-tratados de forma branda, nos quais ainda havia níveis elevados de hemicelulose e lignina residual, quer pela adição de baixas doses de hemicelulases acessórias ou de doses elevadas de albumina ao meio reacional que continha o preparado comercial Cellic CTec2.

Palavras-chave: Cellic CTec2. β -Xilosidase. α -arabinofuranosidase. Esterases. Hidrólise enzimática.

ABSTRACT

SANTOS, F. D. **Development of customized enzymatic cocktails for the hydrolysis of substrates with high levels of hemicellulose and lignin**. 2021. 127 p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2021.

The present study aimed to develop enzymatic cocktails for enzymatic digestion of mildly pretreated sugarcane bagasse substrates (process alkaline-sulfite and the biological process using the fungus Ceriporiopsis subvermispora). Enzymatic digestion of both pretreated substrates were initially assayed with increasingly loads of the commercial cellulolytic preparation Cellic CTec2 (5, 10 and 20 IU/g substrate). Saccharification levels were maximal at 20 FPU/g substrate; however, decreasing enzyme loads from 20 FPU/g to 10 FPU/g did not result in proportional decrease in saccharification efficiency. Therefore, subsequent assays were performed at 10 FPU/g substrate. Considering that both substrates contained significant amounts of residual hemicellulose, a selective dilute acid treatment was developed to remove hemicellulose and increase saccharification levels. Up to 34% increases in saccharification efficiency was associated with 56% hemicellulose removal after the acid treatment. Enzymatic removal of hemicellulose was attempted by using accessory hemicelulases, once the Cellic CTec2 complex already presented high total xylanase levels. β -xylosidase (1, 3 and 5 mg/g of substrate) and α -arabinofuranosidase (1, 3 and 5 mg/g of substrate) were added to the reaction media. For alkaline-sulfite pretreated substrate, 1 mg/g of α -arabinofuranosidase increased saccharification efficiency by 17.5% and 27% for glucan and xylan conversion, respectively. For the biologically pretreated substrate, 1 mg/g of β xylosidase provided the highest increases in saccharification efficiency, achieving 30% and 27% for glucan and xylan conversions, respectively. Considering the occurrence of acetyl and hydroxycinnamic acids groups in the biologically pretreated substrate, 1 mg/g acetyl xylan esterases and 1 mg/g feruloyl esterases were also assayed, providing extensive removal of acetyl and ferulic acid groups, which resulted in 27% and 21% increases of glucan conversion by using acetyl xylan esterase and feruloyl esterase, respectively. Another important result was associated with the use of albumin in the reaction media. For low albumin dosages (up to 2 mg/g substrate), saccharification efficiencies were unaffected. However, high albumin dosages (25 and 250 mg/g substrate) resulted in increased saccharification efficiencies. In summary, the present study demonstrated that it is possible to improve the hydrolysis of mildly pretreated sugarcane bagasse by using either, additional low dosages of accessory hemicellulases or high albumin dosages in the reaction media based on the use of the commercial Cellic CTec2 commercial preparation.

Keywords: Cellic CTec2. β -Xylosidase. α -arabinofuranosidase. Esterases. Enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das ligações de hidrogênio supramolecular da celulose
Figura 2 - Associação de cadeias celulósicas formando a fibrila elementar (A) e a organização dessas fibrilas, formando as microfibrilas (B)20
Figura 3 - Ligações encontradas em xilanas isolados de paredes celulares de gramíneas21
Figura 4 - Estrutura hipotética representando as ligações presentes na molécula de lignina.
Figura 5 - Comparação da glicose recuperável do bagaço da cana-de-açúcar após pré- tratamentos com fungos da podridão branca e tecnologias físico-químicas27
Figura 6 - Mecanismo proposto de ação das enzimas do complexo celulolítico30
Figura 7 - Representação da hidrólise enzimática da celulose por enzimas hidrolíticas e não hidrolíticas
Figura 8 - Tipos de enzimas e locais de clivagem da hemicelulose
Figura 9 - A desacetilação da posição 2 em β -D-xilopiranosídeo por uma enzima acetil xilana esterase tipo serina de <i>T</i> . <i>reesei</i> (CE5)
Figura 10 - Limitantes da hidrólise enzimática da celulose: inibição pelo produto (1); adsorção improdutiva na celulose (2); diminuição da acessibilidade das enzimas pelas hemiceluloses (3) e pela lignina (4); adsorção improdutiva na lignina e inativação das enzimas
Figura 11 - Ilustração obtida da simulação de 2-glucuronoarabinoxilanas adsorvidos na face hidrofílica (110) da celulose, mostrando a configuração estendida da cadeia42
Figura 12 - Diagrama esquemático mostrando as possíveis ligações cruzadas entre lignina e polissacarídeos. a) ligação éster direta; b) ligação éter direta; c) ácido hidroxicinâmico esterificado a polissacarídeos; d) ácido hidroxicinâmico esterificado à lignina; e) ácido hidroxicinâmico eterificado à lignina; f) ponte de ácido ferúlico éster-éter; g) ponte di-éster de ácido dihidro diferúlico; h) ponte di-éster-éter de ácido dihidro diferúlico43
Figura 13 - Posições de grupos acetilas presentes em arabinoglucuronoxilana44
Figura 14 - Acetilação de 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo e acetilação ou feruloilação de 4-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo tornando suas ligações glicosídicas resistentes a ação enzimática de β -xilosidases e α -L-arabinofuranosidases respectivamente44
Figura 15 - Comparação dos rendimentos de hidrólise enzimática obtidos com Cellic CTec suplementado com xilanases e α -arabinofuranosidase para a hidrólise de palha de trigo pré tratado por explosão a vapor em condições moderadas (210°C a 2,5 min) e severas (220°C a 2,5 min)
Figura 16 - Conversão de celulose em glicose, hemicelulose em xilose e arabinose do bagaço sulfito alcalino (números I, II e III respectivamente) e <i>C. subvermispora</i> (números IV, V e VI respectivamente) empregando diferentes cargas de Cellic CTec2 (5, 10 e 20 FPU/g de substrato)
Figura 17 - Conversão de possíveis polissacarídeos adicionais gerados durante a hidrólise dos substratos pré-tratados com sulfito alcalino e <i>C. subvermispora</i> com Cellic CTec2, no tempo final de reação (72h)

Figura 20 - Conversão de celulose em glicose, hemicelulose em xilose e arabinose do bagaço sulfito alcalino (números I, II e III respectivamente) e *C. subvermispora* (números IV, V e VI respectivamente) empregando 10FPU/g de substrato de Cellic CTec2 suplementado com diferentes cargas α -arabinofuranosidase (mg enzima/ g de substrato). 87

Figura 23 - Conversão de celulose em glicose, hemicelulose em xilose e arabinose do bagaço sulfito alcalino (números I, II e III respectivamente) e *C. subvermispora* (números IV, V e VI respectivamente) empregando 10FPU/g de substrato de Cellic CTec2 suplementado com diferentes cargas de albumina (mg/ g de substrato)......102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito de diferentes pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos
Tabela 2 - Desafios e soluções propostas no processo de hidrólise de biomassa recalcitrante.
Tabela 3 - Estudos sobre hidrólise enzimática de diferentes substratos lignocelulósicos pré- tratados
Tabela 4 - Características das enzimas purificadas comerciais usadas no presente trabalho(Dados fornecidos pelo fabricante)
Tabela 5 - Composição química, características estruturais da hemicelulose e balanço demassa para remoção de componentes associados a pré-tratamentos brandos do bagaço decana-de-açúcar
Tabela 6 - Atividades enzimáticas e conteúdo de proteína da enzima comercial Cellic CTec 2.
Tabela 7 - Atividades de enzimas hidrolíticas presentes no meio reacional preparado a partirdo complexo comercial Cellic CTec2 e expressos em atividade enzimática por g de substratolignocelulósico
Tabela 8 - Hidrólise enzimática dos bagaços de cana pré-tratados com sulfito alcalino e <i>C. subvermispora.</i> Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação para o coquetel comercial Cellic CTec2
Tabela 9 - Rendimento de sólidos pré-tratados, composição química e balanço de massaspara os componentes do bagaço de cana-de-açúcar previamente tratado com sulfito alcalinosubmetido a um segundo tratamento com ácido sulfúrico diluído.75
Tabela 10 - Rendimento de sólidos pré-tratados, composição química e balanço de massas para os componentes do bagaço de cana-de-açúcar biotratado com <i>C. subvermispora</i> submetido a um segundo tratamento com ácido sulfúrico diluído
Tabela 11 - Dados de velocidade inicial de reação para a enzima comercial Cellic CTec2utilizando como substrato bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino e posteriormentecom ácido sulfúrico
Tabela 12 - Dados de velocidade inicial de reação para a enzima comercial Cellic CTec2utilizando como substrato bagaço de cana pré-tratado com <i>C. subvermispora</i> com ácidosulfúrico.79
Tabela 13 - Hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino. Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação para a mistura de enzimas comerciais Cellic CTec2 com diferentes cargas de β -xilosidase
Tabela 14 - Hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com <i>C. subvermispora</i> . Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação para a mistura de enzimas comerciais Cellic CTec2 com diferentes cargas de β -xilosidase
Tabela 15 - Hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino. Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de

Tabela 21 - Remoção de ácido ferúlico durante a hidrólise do bagaço biotratado com CellicCTec2 suplementado com feruloil esterase em 72 horas de reação......97

1 INTRODUÇÃO15	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA1	8
2.1 Bagaço de cana-de-açúcar1	8
2.2 Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica2	2
2.3 Hidrólise enzimática de polissacarídeos2	9
2.3.1 Celulases	9
2.3.2 Hemicelulases	2
2.3.2.1 Xilanases	3
2.3.2.2 β-xilosidase	4
2.3.2.3 α-L-arabinofuranosidases	5
2.3.2.4 Acetil xilana esterase	6
2.3.2.5 Feruloil esterase	7
2.4 Fatores limitantes da hidrólise	9
2.5 Otimização de coquetéis enzimáticos com base nos substratos lignocelulósicos4	5
CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA I	£
EMBASAMENTO TEÓRICO5	1
4 OBJETIVOS	3
5 MATERIAIS E MÉTODOS	4
5.1 Enzimas	1
5.2 Substratos	5
5.2.1 Bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino em condições brandas (5% de Na ₂ SO	3,
2,5% de NaOH)5	5
5.2.2 Biodegradação do bagaço de cana com fungo de degradação branca5	5
5.3 Remoção seletiva de hemicelulose utilizando ácido sulfúrico diluído5	6
5.4 Ensaios de hidrólise enzimática das amostras de bagaços de cana pré-tratados5	6
5.4.1 Digestibilidade dos bagaços de cana pré-tratado em condições brandas empregando	0
diferentes cargas enzimáticas de Cellic CTec25	7
5.4.2 Suplementação do coquetel Cellic CTec2 com diferentes concentrações de β-xilosidas	e
e α-L-arabinofuranosidase para a hidrólise dos bagaços de cana pré-tratado em condiçõe	S
brandas5	7
5.4.3 Suplementação do coquetel Cellic CTec2 com feruloil esterase e acetil xilana esteras	e
para a hidrólise do bagaço biotratado com <i>C. subvermispora</i> 5	8
5.4.4 Efeito da adição de albumina do soro bovino (BSA) nos ensaios de hidrólise5	8

SUMÁRIO

5.5 METÓDOS ANALÍTICOS59
5.5.1 Determinação da composição química dos substrates
5.5.2 Determinação de ácidos hidroxicinâmicos
5.5.3 Determinação de atividades enzimáticas60
5.5.4 Determinação de proteínas
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO64
6.1 Características dos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados por tecnologias brandas de
pré tratamento64
6.2 Caracterização das atividades de enzimas hidrolíticas presentes no complexo commercial
Cellic CTec2
6.3 Performance do coquetel comercial Cellic CTec2 na hidrólise dos bagaços de cana pré-
tratados em condições brandas68
6.3.2 Remoção seletiva de hemicelulose dos substratos pré-tratados utilizando ácido
diluído74
6.3.3 Efeito da adição de enzimas acessórias ao extrato comercial Cellic CTec279
6.3.3.1 Efeito da adição de β -xilosidase (GH 43) de Selelomonas ruminantium ao complexo
Cellic CTec2 para a hidrólise de substratos pré-tratados em condições brandas80
6.3.3.2 Efeito da adição de α -arabinofuranosidase (GH51) de Aspergillus niger ao complexo
Cellic CTec2 para a hidrólise de substratos pré-tratados em condições brandas
6.3.3.3 Efeito da adição conjunta de β -xilosidases e α -arabinofuranosidase90
6.3.3.4 Efeito da adição de feruloil esterase Clostridium thermocellum (CE1) e acetil xilana
esterase Orpinomyces sp. (CE6) ao coquetel Cellic CTec2 para a hidrólise do bagaço
biotratado com fungo de decomposição branca C. subvermispora94
6.3.3.5 Efeito da adição de altas concentrações de albumina do soro bovino (BSA) ao
coquetel Cellic CTec2 para a hidrólise de substratos pré-tratados em condições brandas99
7 CONCLUSÕES106
REFERÊNCIAS108

1 INTRODUÇÃO

No cenário energético mundial, o Brasil vem se destacando como referência na produção sustentável e eficiente de etanol, utilizando a cana-de-açúcar como matéria-prima. Um dos subprodutos gerados na atividade sucroenergética é o bagaço de cana, composto essencialmente por celulose, hemicelulose e lignina. Trata-se de um subproduto adequado como fonte de polissacarídeos passíveis de uso em processos de bioconversão (CARPIO; SOUZA, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Com base no conceito de biorrefinarias, o aproveitamento do bagaço de cana para produzir diversos compostos de interesse comercial, incluindo etanol de segunda geração, pode contribuir para agregar valor à cadeia produtiva do setor sucroenergético (LOH *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2019). Apesar de promissora, a utilização do bagaço de cana como matéria-prima enfrenta algumas limitações devido à complexidade estrutural da parede celular das células que o compõem. A presença de lignina e hemicelulose encapsulando a celulose na parede celular secundária corresponde a origem básica da recalcitrância desse e de outros materiais lignocelulósicos (MATEI *et al.*, 2020; MILÃO *et al.*, 2021). Esta recalcitrância restringe o acesso das enzimas hidrolíticas à molécula de celulose e assim sua conversão em monômeros fermentescíveis. Portanto, uma etapa de pré-tratamento torna-se imprescindível de modo a remover mesmo que parcialmente tais componentes (LI; ZHENG, 2017; ALCÁNTARA *et al.*, 2016).

A hidrólise eficiente da celulose requer a ação sinérgica de três principais tipos de enzimas hidrolíticas: endoglucanases, celobiohidrolases I/II e β -glicosidases. Enzimas e proteínas auxiliares que atuam na desestruturação da celulose cristalina, tais como as swoleninas e as monoxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), também tem se mostrado relevantes para o processo completo de hidrólise (BUSSAMRA; FREITAS; CARVALHO, 2015; CHAMPREDA *et al.*, 2019). Uma das barreiras conhecidas ao processo de hidrólise da celulose decorre da presença de hemicelulose restringindo o acesso das celulases a celulose, de forma que a suplementação de preparados enzimáticos com hemicelulases pode ser uma estratégia útil para promover a degradação desse polímero e alcançar rendimentos elevados de sacarificação (GOLDBECK *et al.*, 2016). Além disso, a adição de albumina e surfactantes aos meios reacionais também desponta como uma estratégia de modo a superar o efeito negativo da lignina na hidrólise enzimática, por meio do bloqueio de sítios hidrofóbicos deste polímero, minimizando a adsorção improdutiva das enzimas com o substrato (SAINI *et al.*, 2016; AGRAWAL *et al.*, 2021).

As hemicelulases podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal ou enzimas de ação nas cadeias laterais da hemicelulose. As endo-1,4-β-D-xilanases (EC 3.2.1.8) são responsáveis pela hidrólise de ligações xilosídicas β -D-(1-4) dentro da cadeia principal de xilana, gerando xilo-oligossacarídeos de comprimentos variados (MORGAN et al., 2017). As enzimas 1,4-β-D-xilosidases (EC 3.2.1.37) são responsáveis por converter xilo-oligossacarídeos liberados pela ação das endoxilanases em monossacarídeos de xilose, (CARVALHO et al., 2013; MOREIRA; FERREIRA FILHO, 2016). Feruloil/p-cumaril esterases (3.1.1.73), são responsáveis por remover cadeias laterais de ácido ferúlico e cumárico. Acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72), clivam ligações éster carboxílicas da cadeia liberando álcool e acetato como produtos e as α-L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) catalisam a hidrólise de ligações arabinofuranosídicas dos terminais não redutores de polissacarídeos arabinofuranosídicos, como arabinoxilanos, arabinanas e outros (BRAGA et al., 2014; VÁRNAI et al., 2014). Em suma, tais enzimas promovem a desconstrução da hemicelulose aumentando a acessibilidade das enzimas hidrolíticas a celulose durante a conversão de biomassa. A utilização de tais enzimas em coquetéis enzimáticos torna-se atrativa principalmente quando se considera as tecnologias de pré-tratamento que conservam parte apreciável da fração hemicelulósica no material pré-tratado (GOLDBECK et al., 2016; NEUMULLER et al., 2014a; GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BOM, 2010).

O processo de hidrólise enzimática ainda é um dos gargalos econômicos das biorrefinarias, pois requer cargas elevadas de enzimas para contornar os efeitos de ligações improdutivas com o substrato, baixa acessibilidade a celulose e inibição pelo próprio produto da hidrólise (NEUMÜLLER *et al.*, 2014b; LI; ZHENG, 2017). Uma possível estratégia para viabilizar tal processo seria a obtenção de coquetéis enzimáticos otimizados, envolvendo diferentes classes de celulases e hemicelulases. Possivelmente, isto pode impactar na redução dos custos do processo de hidrólise, uma vez que misturas mais eficientes poderiam ser aplicadas à substratos gerados por meio de pré-tratamentos brandos e menos custosos.

Nesse sentido, diversos trabalhos com ênfase em otimizar coquetéis enzimáticos explorando a sinergia entre as enzimas do complexo hidrolítico são descritos na literatura, demonstrando melhora significativa nas taxas de hidrólises, quando misturas enzimáticas são desenhadas com base nas características do substrato (DELABONA *et al.*, 2013; BRAGA *et al.*, 2014; VARNAI *et al.*, 2014; GOLDBECK *et al.*, 2016; BUSSAMRA; FREITAS; COSTA, 2015; LAOTHANACHAREON *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2016).

Nesse sentido, o presente trabalho propõe o estudo de formulações de coquetéis enzimáticos que possam melhorar a hidrólise de substratos específicos, cuja composição

química seja conhecida em detalhes. Se propõe avaliar a eficiência da hidrólise dessas formulações em dois diferentes substratos, tomando como base uma mistura de enzimas comercias de elevada performance, como é o caso da mistura Cellic CTec2. A busca por enzimas adicionais a este coquetel enzimático foi desenvolvida em decorrência do conhecimento das características dos substratos e teve como objetivo aumentar a eficiência da hidrólise, eliminando eventualmente a necessidade de tecnologias severas de pré-tratamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O cultivo comercial de cana-de-açúcar (*saccharum spp*.) contribui de forma significativa na economia de muitos países, sendo uma das principais matérias-primas empregadas para a fabricação de sacarose e etanol no mundo (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Nesse cenário, o Brasil se destaca devido à grande disponibilidade de cultivares de cana-de açúcar e às condições ambientais favoráveis para o cultivo desta planta, sendo responsável por cerca de 40% da produção mundial, fato que reflete a importância do agronegócio brasileiro (MILÃO *et al.*, 2021).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2020), na safra 2019/20 estimou-se uma produção de 615,98 milhões de toneladas em colmos de cana-deaçúcar, produzidos e destinados ao setor sucroenergético (redução de 0,7% em relação à safra 2018/19). Conforme levantamento realizado em dezembro de 2020, para a safra brasileira de cana-de-açúcar, na temporada 2020/21, estima-se um incremento na produção de 3,5% em relação à safra anterior, com 665,1 milhões de toneladas de cana de açúcar a ser colhidas nesse período. Com a crescente demanda de açúcar e etanol para consumo interno e exportação, um aumento de 68% na produção de cana-de-açúcar no país é esperado até o ano de 2050. Para cada tonelada de cana-de-açúcar in natura processada, estima-se a geração de cerca de 140 Kg de bagaço (base seca) (KHAIRE *et al.*, 2021). Estes valores fazem com que o bagaço seja um dos resíduo agroindustrial, de natureza lignocelulósica, mais abundante no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

A destinação mais comum para o bagaço de cana é a produção de energia pela sua queima, garantindo suficiência energética para as usinas sucroalcooleiras e geração de excedentes de energia elétrica que podem ser comercializados pela interligação do sistema produtivo com a rede de distribuição de energia (MILÃO *et al.*, 2021). No entanto, este resíduo pode ser utilizado em outras aplicações, tais como produção de papel e celulose, placas de fibras de bagaço, alimentação animal e produção de furfural (HUGHES *et al.*, 2020). Com os avanços na biotecnologia e o surgimento do conceito de biorrefinaria, que envolve o processamento sustentável de biomassa em um espectro de produtos comercializáveis (alimentos, rações, materiais, químicos) e/ou energia (combustíveis, eletricidade, calor) (IEA BIOENERGY, 2010), expandiram-se as possibilidades de uso do

bagaço na produção de etanol de segunda geração, sendo este vantajoso no ponto de vista econômico (CARVALHO *et al.*, 2020; MANOCHIO *et al.*, 2017).

O bagaço de cana é composto essencialmente por celulose, hemicelulose e lignina. O conteúdo e a distribuição desses componentes varia de acordo com o cultivar, tipo de solo, condições climáticas, maturação e sazonalidade, técnicas de colheita e o manuseio empregado (JIANG *et al.*, 2019). Em geral, estes componentes representam cerca de 90% da massa seca do material. Os 10% restantes consistem em extrativos e cinzas (LOH *et al.*, 2013; SCARCELLA *et al.*, 2021).

A celulose é o polímero orgânico mais abundante da natureza, sendo o principal elemento estrutural da parede celular vegetal (38-50%). Tal composto na forma nativa, é denominada Celulose I, sendo caracterizada como um polissacarídeo homogêneo, anfifílico e de alta massa molar, constituído por monômeros de β -D-glicose unidos linearmente por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) (JIANG *et al.*, 2019; NAGARAJAN *et al.*, 2017).

Os monômeros de glicose adotam conformação mais estável na forma de cadeira com os grupos hidroxilas na posição equatorial. Tal conformação favorece a interação entre as cadeias dispostas lateralmente por meio de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (Figura 1). Adicionalmente, a presença de hidrogênios axiais fornece regiões com características hidrofóbicas suscetíveis a interações de Van der Waal, importantes na estabilização da estrutura de celulose. Tais interações promovem um arranjo paralelo e organizado entre as cadeias de celulose formando uma estrutura conhecida como fibrila elementar (Figura 2a), constituída por 24 a 36 moléculas de celulose (ARANTES; SADDLER, 2010; HORN *et al.*, 2012).



Figura 1- Representação das ligações de hidrogênio supramolecular da celulose.

Fonte: Adaptado de Santos et al. (2012).

Figura 2 - Associação de cadeias celulósicas formando a fibrila elementar (A) e a organização dessas fibrilas, formando as microfibrilas (B).



Fonte: Adaptado de Horn et al. (2012).

Um segundo nível organizacional é formado pela associação entre as fibrilas elementares, formando uma estrutura supramolecular chamada de microfibrila (Figura 2b). As microfibrilas caracterizam-se por possuírem regiões predominantemente ordenadas (regiões cristalinas) e menos ordenadas (regiões amorfas). A cristalinidade da celulose confere a esta molécula características como rigidez e insolubilidade em água e na maioria dos solventes orgânicos. Em contrapartida, as regiões amorfas conferem elasticidade e flexibilidade à parede celular, essenciais ao crescimento celular (ARANTES; SADDLER, 2010). O grau de polimerização da celulose contida na parede celular dos vegetais é da ordem de 7000 a 15000 (FENGEL; WEGENER, 1989).

As hemiceluloses são polímeros com diferentes graus de ramificações, representando 15 a 35% da biomassa vegetal (JIANG *et al.*, 2019). Dentre os monômeros de açúcares que dão origem à cadeia principal destacam-se: pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose) e ácidos urônicos (α -D-glucurônico, α -D-4-Ometilgalacturônico, α -D-galacturônicos e 4-O-metilglucurônico), variando de acordo com a espécie. Outros açúcares como α -L-ramnose e α -L-fucose também podem estar presentes em pequenas quantidades. Além disso, grupos hidroxílicos dos açúcares podem ser encontrados parcialmente substituídos por grupos acetilas (GÍRIO *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2019). Devido a presença de grupos pendentes ligados a cadeia principal, as hemiceluloses não formam estruturas cristalinas como a celulose e são mais sensíveis aos tratamentos químicos, térmicos e enzimáticos, além de possuírem baixo grau de polimerização (50 a 300 monômeros) em relação à celulose. Tais características tornam as hemiceluloses mais fáceis de serem extraídas do complexo lignocelulósico para aplicação em biorrefinarias (MOREIRA; FERREIRA FILHO, 2016; CHADHA; RAI; MAHAJAN, 2019).

As xilanas são as principais hemiceluloses da parede celular de gramíneas. No bagaço de cana-de-açúcar, a principal hemicelulose encontrada é a 4-O metilglucuronoarabinoxilana formada pela ligação dos grupos pendentes L-arabinose e 4-O-metilglucurônico à cadeia principal de xilana (ligações β-1-4-glicosídicas entre resíduos de D-xiloses). Grupos acetila também ocorrem na forma de ésteres nos grupos OH ligados aos carbonos 2 e/ou 3 da xilose e correspondem de 1 a 3% da biomassa seca (KHAIRE *et al.*, 2021). Adicionalmente, ácidos hidroxicinâmicos (ferúlico e cumárico) também são encontrados ligados à arabinose (ácido ferúlico) e a lignina (ácido cumárico), sendo o ácido ferúlico responsável por formar ligações covalentes entre a hemicelulose e a lignina. A hemicelulose pode recobrir fibrilas de celulose, enquanto a lignina constitui uma barreira física e química que reveste e protege tanto a celulose como a hemicelulose (FENGEL; WEGENER, 1989; VÁRNAI *et al.*, 2014; MILÃO *et al.*, 2021). A Figura 3 representa a estrutura de xilana de gramínea, evidenciando os monômeros e as suas ligações.



Figura 3- Ligações encontradas em xilanas isolados de paredes celulares de gramíneas.

Fonte: Adaptado de Dood e Cann (2009).

A lignina é uma molécula amorfa e irregular, representando de 15 a 30% da biomassa seca, sendo responsável pela impermeabilização da parede celular das plantas tornando-as recalcitrantes para utilização em biorrefinarias (JIANG *et al.*, 2019).

A lignina deriva principalmente de três álcoois cinamílicos (álcool p-cumárico, coniferílico e sinapílico) que por meio da polimerização radicalar originam a macromolécula complexa que se conhece (AGRAWAL *et al.*, 2021).

Diferentes ligações são encontradas entre as unidades estruturais da lignina, sendo a ligação mais comum à do tipo β -O-4, uma ligação éter entre o carbono β da cadeia alquílica e o oxigiênio, originalmente fenólico, ligado ao carbono 4 do anel aromático. Outras ligações éter comumente encontradas são α -O-4 e 5-O-4, além das ligações carbono-carbono β -5, β - β , 5-5, e β -1 (LI; PU; RAGAUSKAS, 2016; SHENG *et al.*, 2021). A Figura 4 representa uma estrutura hipotética de lignina mostrando os diferentes tipos de ligações possíveis entre as suas unidades estruturais.





Fonte: Adaptado de Li, Pu e Ragauskas (2016).

2.2 PRÉ-TRATAMENTOS DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A redução da recalcitrância da biomassa lignocelulósica é primordial para obtenção de produtos químicos em processos desenvolvidos em biorrefinarias. Tratamentos prévios desse material visam o rompimento e/ou fracionamento da parede celular (barreira física),

diminuem a cristalinidade da celulose e aumentam a porosidade e área superficial, tornandoos acessíveis a ação de enzimas (SEIDL; GOULART, 2016; SINGH *et al.*, 2019).

A escolha do pré-tratamento adequado da biomassa lignocelulósica é de suma importância para se alçar rendimentos elevados de sacarificação, utilizando cargas enzimáticas mais baixas. Além disso, é imprescindível que métodos de pré-tratamentos disponham de tecnologia industrial adequada e testada, apresentem baixo custo operacional, baixa degradação e perda de celulose, baixa formação de subprodutos inibitórios para subsequente fermentação, recuperação da lignina e baixa formação de resíduos tóxicos ao meio ambiente (ALCÁNTARA *et al.*, 2016; MATEI *et al.*, 2021). Diversos métodos de pré-tratamentos são descritos na literatura, dentre os quais destacam-se: físicos (redução mecânica), físico-químicos (explosão a vapor e hidrotérmico), químicos (ácidos, bases, solventes orgânicos, sulfitos alcalinos) e biológicos (fungos de podridão branca), bem como a combinações desses diferentes métodos (SINGH *et al.*, 2019).

Os pré-tratamentos químicos são amplamente empregados devido sua elevada eficiência, e os reagentes químicos comumente utilizados incluem diferentes ácidos e/ou bases. Para alcançar maiores rendimentos, estes podem ser realizados em conjunto com tratamentos físicos e físico-químicos (ZHANG; PEI; WANG, 2016; RAMOS *et al.*, 2020).

O pré-tratamento utilizando ácidos pode ser realizado empregando ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido clorídrico (HCl), ácido fosfórico (H₃PO₄) ou ácido nítrico (HNO₃). No entanto, ácido sulfúrico é o pré-tratamento ácido mais empregado para lignocelulósicos devido a sua alta eficiência e relativo baixo custo (GONZALES; SIVAGURUNATHAN; KIM, 2016). Este método de pré-tratamento promove a solubilização da fração hemicelulósica da biomassa, tornando a celulose mais acessível a ação enzimática (BEHERA *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2020).

Diferentes condições de pré-tratamento (concentração de ácidos, temperatura, tempo de pré-tratamento) podem ser previamente estabelecidas de modo a obter melhores rendimentos. A utilização de ácido diluído em condições reacionais otimizadas para cada material lignocelulósico específico, corresponde a um processo efetivo com um custo/benefício atraente, promovendo a remoção da hemicelulose e minimizando a formação de inibidores (JONSSON; MARTÍN, 2016; PERRONE *et al.*, 2021).

Embora o pré-tratamento com ácido diluído remova de forma eficiente a hemicelulose, sua aplicação em condições severas de temperatura e longos tempos de residência podem ser requeridas com base nas características do substrato lignocelulósico a

ser tratado. Nessas condições, reações secundárias podem gerar subprodutos de forma mais pronunciada (MATHEW *et al.*, 2016; SHENG *et al.*, 2021).

O pré-tratamento alcalino emprega como principais reagentes o hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH) ou hidróxido de cálcio (CaOH₂) (PARK; KIM, 2012; SHENG *et al.*, 2021). Os principais efeitos do tratamento alcalino na estrutura recalcitrante de lignocelulósicos baseia-se na deslignificação, remoção de grupos acetilas e ésteres de ácidos ferúlico e cumárico (PRAJAPATI *et al.*, 2021; CARVALHO; QUEIROZ; COLODETTE, 2016). Além disso, o álcali promove o intumescimento das microfibrilas de celulose e rompimento das interações intra e intermoleculares, de modo que a cristalinidade da celulose pode decrescer, além de promover um aumento na área superficial e porosidade da parede celular (PARK; KIM, 2012; SHENG *et al.*, 2021).

Os pré-tratamentos alcalinos podem ser conduzidos em condições amenas de temperatura e pressão e não exigem reatores complexos por não utilizarem reagentes corrosivos (KIM, J.S; LEE; KIM, T.H., 2016). As principais desvantagens inerentes a estes métodos advém de tempo longos de pré-tratamento (horas a dias), a necessidade de neutralização da biomassa pré-tratada, a solubilização parcial da hemicelulose e o custo elevado dos reagentes (MOOD *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2020).

Embora muitos métodos de pré-tratamento venham sendo desenvolvidos, há crescente necessidade de alternativas que disponha de tecnologias industriais para aplicação em larga escala e promovam extrações seletivas de componentes não celulósicos (lignina e hemicelulose) (AGRAWAL *et al.*, 2021). Os processos quimiotermomecânicos apresentam-se como uma vertente interessante, pois são amplamente empregados na indústria de papel e celulose para a obtenção de polpas de alto rendimento. Dessa forma, equipamentos utilizados na fabricação de celulose podem ser, a princípio, adaptados para emprego no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (MENDES *et al.*, 2018).

Nosso próprio grupo de pesquisas tem desenvolvido processos de pré-tratamento que promovem a remoção parcial de lignina e hemicelulose. Trata-se do pré-tratamento quimiotermomecânico que emprega sulfito alcalino em condições relativamente brandas, permitindo a obtenção de rendimento de sólidos elevados (LAURITO-FRIEND *et al.*, 2015; (MENDES *et al.*, 2018; REINOSO *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2019).

Quando o processo de pré-tratamento é combinado com o uso de reagentes sulfito/alcalino, a lignina sofre sulfonação, o que pode dar origem a lignosulfonados solúveis em água ou fragmentos de lignina residual com características hidrofílicas. Essa alteração na hidrofobicidade da lignina pode ocasionar o inchamento da fibra através da retenção de

água. As condições alcalinas também ocasionam a remoção de hemiceluloses de baixa massa molar, permanecendo no material pré-tratado a celulose e as hemiceluloses mais resistentes, com parte da lignina (ZHU *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2011; PAZ-CEDENO *et al.*, 2021). No entanto, quando o pré-tratamento é desenvolvido com baixas cargas de reagente, o material pré-tratado ainda apresenta recalcitrância considerável para poder ser hidrolisado de forma eficiente pelos coquetéis enzimáticos disponibilizados atualmente no mercado.

Um trabalho realizado por Mendes *et al.* (2011) demonstrou que o uso de condições amenas de tratamento alcalino (NaOH) e sulfito alcalino (NaOH/Na₂SO₃) promove a remoção de 33% e de 53% da lignina inicial, e de 13% e 29% da hemicelulose, respectivamente. Já o rendimento de sacarificação alcançado foi da ordem de 85% na hidrólise do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino, conversão maior do que o 50% alcançado na hidrólise do substrato pré-tratado somente em condições alcalinas. Em relação à morfologia dos materiais pré-tratados, Mendes *et al.* (2015) demonstraram que o tratamento sulfito alcalino promoveu mudanças morfológicas na estrutura de híbridos de cana-de-açúcar. Os resultados obtidos indicaram que parte da lignina superficial das fibras pode ser removida durante o pré-tratamento, enquanto as hemiceluloses da superfície foram expostas ou deslocalizadas. Esta informação pode ser útil para a concepção de diferentes misturas de enzimas a serem utilizadas após pré-tratamentos para hidrolisar polissacarídeos a monômeros

Comparado com o processo ácido, o pré-tratamento sulfito alcalino causa menor solubilização dos polissacarídeos e gera uma polpa rica em hemicelulose devido à dissolução principalmente da lignina (LAURITO FRIEND *et al.*, 2015). Embora os polissacarídeos sejam relativamente resistentes na presença de íons hidróxido, parte da perda de rendimento do pré-tratamento alcalino está relacionada à perda de hemicelulose, justamente porque este componente está mais exposto na estrutura da biomassa e não é cristalino (FENGEL; WEGENER, 1989; MENDES *et al.*, 2015; PAZ-CEDENO *et al.*, 2021).

O uso de agentes químicos e condições de operação severas empregados nos métodos descritos de pré-tratamento são fatores que devem ser minimizados de modo a garantir menores danos ambientais e baixos gasto de energia. Como método alternativo, pré-tratamentos biológicos, com foco em enzimas produzidas por micro-organismos, fungos e bactérias vem sendo estudados (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016; AGRAWAL *et al.*, 2021).

Os fungos de decomposição branca são os agentes biológicos mais comumente empregados para biotratamento de lignocelulósicos, devido à capacidade desses microrganismos em degradar seletivamente lignina e/ou hemicelulose, aumentando a digestibilidade desses substratos. A degradação da lignina é realizada por peroxidases e oxidases, representadas principalmente por lacases, Manganês peroxidases (MnP) e lignina peroxidases (LiPs), que atuam através da geração de radicais livres e formação de compostos de baixa estabilidade, que sofrem uma variedade de reações de clivagem espontânea e se tornam susceptíveis ao metabolismo intracelular do fungo (FERRAZ, 2004; MATEI *et al.,* 2020; MACHADO; FERRAZ, 2017).

O potencial dos fungos de decomposição branca e parda no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foi estudado pelo nosso próprio grupo de pesquisa empregando três diferentes basidiomicetos: *Laetiporus sulphureus* (decomposição parda), *Pleurotus ostreatus* (decomposição branca) e *Ceriporiopsis subvermispora* (decomposição branca seletiva) (MACHADO; FERRAZ, 2017). Os biotratamentos foram conduzidos por períodos de 7 a 60 dias. Os resultados obtidos demonstraram uma degradação preferencial de glucana e xilana, além de baixa remoção de lignina ao utilizar *L. sulphureus*. Em contrapartida, degradação de todos os componentes do bagaço de cana foi observado empregando *P. ostreatus*, com perdas de glucana, xilana e lignina de 8,4, 15,7 e 11,1%, respectivamente. Em relação ao biotratamento com *C. subversmipora*, foi obtido remoção de 47 e 48% de hemicelulose e lignina respectivamente, e perda de glucana de 17%, no tempo máximo de cultivo (60 dias). A hidrólise desse substrato biotratado alcançou conversão de celulose de 54%, contra somente 23% no material original. Mesmo com o consumo de parte da fração celulósica pelo fungo *C. subvermispora*, a aplicação do biotratamento gerou mais glicose disponível do que o bagaço de cana in natura

Dessa forma, fica evidente o potencial dos fungos de podridão branca seletiva para aplicação em pré-tratamentos de biomassa, devido a preservação de maior parte das cadeias de celulose e remoção eficiente dos componentes responsáveis pela recalcitrância natural das amostras de bagaço de cana-de-açúcar (lignina e hemicelulose). Em contraste, os fungos de podridão parda e podridão branca não seletiva, além de degradar uma parte das cadeias de celulose facilmente disponíveis, preservam quantidade apreciáveis de lignina e hemicelulose, de forma que os substratos biotratados por esses microrganismos ainda permanecem recalcitrantes para posterior hidrólise enzimática (MACHADO; FERRAZ, 2017).

Apesar de promissor, o pré-tratamento biológico ainda apresenta algumas desvantagens que impossibilita sua aplicação industrial, dentre elas destacam-se: baixa eficiência de pré-tratamento quanto a sacarificação do substrato gerado se comparado a

outras tecnologias (Figura 5), necessidade do controle minucioso do crescimento dos microorganismos e longos tempos de residência (60 dias). Além disso, há a possibilidade de os microrganismos consumirem polissacarídeos que seriam destinados às etapas posteriores de conversão, acarretando perda de rendimento (SINGH *et al.*, 2014; SEIDL; GOULART, 2016; MATEI *et al.*, 2020 ; MACHADO; FERRAZ, 2017). No entanto, o biotratamento dos materiais lignocelulósicos por basidiomicetos se apresenta como uma via possível de prétratamento para etapas subsequentes de hidrólise enzimática, pois pode ser realizado em condições amenas de reação, sem a utilização de insumos químicos.

Figura 5 - Comparação da glicose recuperável do bagaço da cana-de-açúcar após pré - tratamentos com fungos da podridão branca e tecnologias físico-químicas.



Fonte: Adaptado de Machado e Ferraz (2017).

A Tabela 1 sumariza os diferentes pré-tratamentos e as respectivas mudanças causadas à biomassa lignocelulósica, assim como as principais vantagens e desvantagens de cada método. Cada procedimento difere em relação ao mecanismo de ação que induz modificações químicas ou físicas na estrutura vegetal (MOOD *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2019; RAMOS *et al.*, 2020).

Dré-	Efeitos					
tratamentos		Celulose	Hemicelulose	Lignina	Vantagem	Desvantagem
Físico	Moinho de bolas	Diminuição da cristalinidade	Não remove	Não remove	Redução da cristalinidade	Alto consumo de energia
	Ácido diluído	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Condições médias, altas produção de xilose	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e formação de inibidores da fermentação.
	Alcalino	Inchação significativa	Considerável solubilidade	Considerável solubilização, >50%	Remoção efetiva de ésteres	Reagente caro, recuperação alcalina
Químico	Organosolv	Considerável inchação	Significativo, quase completa	Significativo, pode ser quase completa	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação	Recuperação de solvente cara
	Sulfito alcalino	Baixa degradação	Remoção Parcial	Remoção parcial	Aumento da área superficial	Reagentes com elevada toxicidade
	Ozonólise	Baixa despolimerização	Pequena solubilização	Solubilização acima de 70%	Efetiva deslignificação em condições suaves	Os solventes precisam ser recuperados, alto custo
Físico- químico	Explosão a vapor	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem	Degradação da xilana como produto inibitório
Biológico	Biológico	20-30% de despolimerização	Acima de 40% de solubilização	Acima 50% de deslignificação	Baixo requerimento de energia, efetiva deslignificação	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise

Tabela 1 - Efeito de diferentes pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos.

Fonte: Santos et al. (2012); Jiang et al. (2019); Ramos et al. (2020).

2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE POLISSACARÍDEOS

A hidrólise da celulose em glicose por via enzimática ocorre pela ação sinérgica de diferentes enzimas celulolíticas, produzidas por microrganismos tais como bactérias e fungos, sendo os fungos filamentosos amplamente empregados para esta finalidade. Dentre os fungos usados para a produção de celulases, *Trichoderma reesei* é um dos mais eficientes e produtivos já reportados. Os fungos produzem uma gama muito grande de enzimas e as atividades são moduladas dependendo do meio e das condições de cultivo (CHAMPREDA *et al.*, 2019).

2.3.1 Celulases

A degradação eficiente da celulose ocorre pela ação sinérgica de três principais celulases, que clivam ligações glicosídicas β -1 \rightarrow 4 pela adição de uma molécula de água. As endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4), hidrolisam internamente a região amorfa da celulose, atuando nas ligações glicosídicas e reduzindo o grau de polimerização da celulose. As exo-1,4- β -D-glucanases ou celobiohidrolases (CBH) (EC 3.2.1.91), classificadas em dois tipos: CBH I que hidrolisam preferencialmente as extremidades redutoras da celulose e CBH II, que agem na extremidade não-redutoras, ambas resultando na formação de celobiose. Finalmente, as 1,4- β -D-glicosidases ou celobiases (EC 3.2.1.21), responsáveis pela hidrólise da celobiose e outros oligossacarídeos pequenos em moléculas de glicose (BUSSAMRA; FREITAS; COSTA, 2015; CHAMPREDA *et al.*, 2019). O mecanismo de ação dos três grupos de enzimas pode ser melhor compreendido com base na Figura 6.

A hidrólise da celulose depende da adsorção das enzimas celulolíticas na superfície insolúvel e altamente ordenada da celulose. O processo tem início com o afrouxamento da estrutura ordenada da microfibrila devido ao enfraquecimento das ligações de hidrogênios, expondo as cadeias de celulose a ação enzimática, em um fenômeno denominado amorfogênese (Figura 6a) (ARANTES; SADDLER, 2010). A adsorção das enzimas é auxiliada pela presença de domínios não catalíticos presentes na estrutura enzimática (CBMs "carbohydrate-binding modules"). Esse domínio, pode fazer parte tanto nas exoglucanases quanto nas endoglucanases, modulando a atividade específica das enzimas principalmente em substratos insolúveis, como a celulose cristalina. Em contrapartida, para substratos solúveis, a ausência dessas estruturas não afeta a atividade enzimática (HORN *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2019).

Posteriormente ao fenômeno de amorfogênese, a hidrólise primária da celulose ocorre pela ação sinérgica de endo e exo-glucanases na superfície dos substratos sólidos, promovendo a fragmentação do polímero celulósico em oligossacarídeos solúveis (grau de polimerização até 6), sendo o principal produto dessa etapa a celobiose. Este processo é lento e caracteriza-se como etapa limitante de todo processo de hidrólise da celulose (Figura 6b, c) (ARANTES; SADDLER, 2010). A hidrólise secundária envolve a hidrólise de celobiose em glicose pelas β -glicosidases (Figura 6d), sendo tais enzimas requeridas em concentrações ideais para esta finalidade, de modo a evitar a inibição das enzimas celobiohidrolases e endoglucanases pelo seu próprio produto da hidrólise (celobiose) (SINGH *et al.*, 2019).





Fonte: adaptado de Arantes e Saddler (2010).

As β-glicosidases também são reportadas por sofrerem inibição por seu produto de hidrólise, neste caso a glicose. Estes mecanismos de inibição, são um dos principais limitantes da sacarificação enzimática de lignocelulósicos em meios reacionais com elevado

teor de biomassa e podem ser minimizados utilizando preparados enzimáticos contendo quantidades ideais de endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidases. Dessa forma, a ação conjunta dessas enzimas acarreta rendimento superior em relação os rendimentos individuais, efeito conhecido como sinergismo (ZHANG; LYND, 2004; DA SILVA *et al.*, 2016).

Dependendo da composição da biomassa a ser hidrolisada, proteínas auxiliares como as expansinas, swoleninas e mono-oxigenases líticas de polissacarídeos dependentes de cobre (do inglês "copper dependent lytic polysaccharide monooxygenases -LPMOs) também se fazem necessárias como aditivos a coquetéis enzimáticos com a finalidade de otimizar a hidrólise de substratos lignocelulósicos pré-tratados (FRANDSEN *et al.*, 2021). As expansinas e swoleninas interrompem ligações não covalentes, como as pontes de hidrogênio, na "interface" da celulose e hemicelulose, induzindo o relaxamento da parede celular, ao passo que as LPMOs (AA9), originalmente classificadas como glicosil hidrolases da família 61 (GH61), são capazes de oxidar ligações glicosídicas auxiliando assim a desconstrução inicial da celulose (ADSUL *et al.*, 2020; VAN DYK; PLETSCHKE, 2012). Em geral, o tratamento com tais enzimas auxiliares diminui a cristalinidade das partículas do substrato, aumentando a área disponível para a adsorção das celulases (Figura 7) (FRANDSEN *et al.*, 2021).





Fonte: adaptado de Silveira et al. (2014).

Diversas empresas têm focado seus estudos no desenvolvimento de coquetéis enzimáticos eficazes para aplicação em bioenergia. Coquetéis como Cellic CTec2 e Celluclast 1,5, ambos desenvolvidos pela empresa Novozymes®, são obtidos a partir de celulases provenientes de fungos e suplementados com outras atividades, produzidas em sistemas recombinantes, de modo a se obter formulações otimizadas cada vez mais eficientes (RODRIGUES *et al.*, 2015; ADSUL *et al.*, 2020).

O complexo enzimático Celluclast 1,5, derivado de uma cepa de *Trichoderma reesei*, contém atividades elevadas de endoglucanases e celobiohidrolases, porém baixa atividade de β -glicosidases. De modo a evitar inibição por produtos, Celluclast é comumente utilizado em conjunto com a preparação comercial Novozymes® 188, derivada de *Aspergillus niger*, basicamente composta de β -glicosidase (CHAMPREDA *et al.*, 2019). O complexo celulolítico Cellic CTec2, foi desenvolvido contendo altos níveis de β -glicosidases, hemicelulases, dentre outras proteínas como LPMOs. Todavia, tais coquetéis comerciais podem não ser efetivos para a hidrólise de todos os substratos lignocelulósicos disponíveis. Portanto, o desenvolvimento de preparações enzimáticas cada vez mais eficientes, passíveis de serem utilizados na hidrólise de uma ampla gama substratos com estruturas e composição diferentes vem sendo continuamente alvo de estudos (ADSUL *et al.*, 2020).

Rodrigues *et al.* (2015) demonstraram que o coquetel Cellic CTec2, numa mesma carga de proteína (10 FPU/g de celulose), apresentou eficiência 40% maior em relação ao complexo Celluclast 1,5 na hidrólise de palha de trigo submetida a pré-tratamento hidrotérmico. Mesmo após a suplementação de Celluclast 1,5 (10 FPU /g) com 20 UI de β-glicosidase (Novozyme 188), Cellic CTec2 apresentou melhor desempenho na sacarificação da palha de trigo pré-tratada (conversão de celulose 17,5% maior). Os autores concluíram que embora cargas de enzimas semelhantes (expressas em FPU) tenham sido usadas, Cellic CTec2 demonstrou ser mais eficiente na hidrólise da palha de trigo pré-tratada. No entanto, ensaios de adsorção/dessorção realizados por Rodrigues *et al.* (2015) mostraram que embora Cellic CTec2 seja uma formulação mais eficaz, as enzimas celulolíticas presentes nesse coquetel possuem maior afinidade pela lignina, sendo mais sensíveis à desativação por adsorção improdutiva quando comparado a Celluclast 1,5.

2.3.2 Hemicelulases

Anterior ao problema causado pela cristalinidade da celulose, a acessibilidade das celulases ao substrato é limitada devido à presença de componentes como a hemicelulose e

a lignina (HU; ARANTES; SADDLER, 2011; MATEI *et al.*, 2020). Dessa forma, a adição de hemicelulases a preparados enzimáticos contendo celulases pode aumentar a eficiência da hidrólise, visto que facilita o acesso das enzimas à celulose.

A hemicelulose é composta por uma maior diversidade de açúcares e outros substituintes em sua estrutura, existindo assim uma ampla variedade de hemicelulases (Figura 8). Tais enzimas são classificadas de acordo com sua ação, e podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal: endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8) e 1,4- β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37) e enzimas que agem nas cadeias laterais: α -D-galactosidases (EC 3.2.1.22), acetil-xilana esterases (EC 3.1.1.72), ferúlico/p-cumárico esterases (3.1.1.73), α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) e α -glucuronidases (EC 3.2.1.139) (CHADHA; RAI; MAHAJAN, 2019).

Figura 8 - Tipos de enzimas e locais de clivagem da hemicelulose.



Fonte: Adaptado de Carvalho et al. (2013).

2.3.2.1 Xilanases

As endo-1-4- β -xilanases são as principais enzimas envolvidas na hidrólise da xilana e são classificadas como glicosil-hidrolases, responsáveis pela hidrólise de ligações xilosídicas β -D-(1-4) dentro da cadeia principal de xilana, gerando xilo-oligossacarídeos de massa molar variável, principalmente a xilobiose (YANG *et al.*, 2020). Muitos microrganismos produtores de xilanase são cultivados e/ou isolados de resíduos agroindustriais como farelo de arroz, farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar, sendo os microrganismos produtores mais comuns, isolados nesses três substratos: *Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Penicillium chrysogenum, Penicillium corylophilum, Penicillium funiculosum, Penicillium oxalicum e Trichoderma harzianum* (CARVALHO *et al.*, 2020).

São reportadas diferentes famílias de endo-1-4-β-xilanases, classificadas nas famílias 5, 8, 10, 11 e 43 das glicosil hidrolases. As enzimas pertencentes as famílias 10 e 11 contam com a maior parte dos maiores estudos elucidados sobre seus mecanismos de ação (MORGAN *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2020). As xilanases classificadas nas famílias 10 e 11 diferem entre si de acordo com suas propriedades físico-químicas (massa molar e ponto isoelétrico), bem como na sua ação sobre os polissacarídeos e xilo-oligossacarídeos (YANG *et al.*, 2020). A família GH10, geralmente apresentam alta massa molar o peso molecular (>30 kDa) e baixo ponto isoelétrico (ácido) comparado com as xilanases da família GH 11 que comumente apresentam baixa massa molar e pI básico (CHADHA; RAI; MAHAJAN, 2019).

Ambas as famílias utilizam o mesmo mecanismo catalítico de duplo deslocamento com retenção da configuração anomérica, que envolvem dois resíduos de glutamato altamente conservado no sítio ativo, um deles atuando como doador de prótons e o outro como um nucleófilo (JUTURU; WU, 2012; YANG *et al.*, 2020). A ação das endo-xilanases nos materiais lignocelulósicos é limitada pelo número de substituições de unidades xilopiranosil. Membros da GH10 são capazes de clivar as ligações glicosídicas na cadeia principal da xilana próximas dos substituintes de ácido 4-O-metil-glucurônico, α -L-arabinofuranose e grupamento acetil. Em contrapartida, as endoxilanases da família GH 11 exibem maior afinidade por cadeias de xilanas sem tais substituintes (BIELY *et al.*, 1997; CHADHA; RAI; MAHAJAN, 2019; YANG *et al.*, 2020).

2.3.2.2 β -xilosidase

As enzimas 1,4- β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37) são responsáveis por converter xilooligossacarídeos liberados pela ação das endoxilanases em monossacarídeos de xilose, a partir dos terminais não redutores. Estudos indicam que xilo-oligossacarídeos são inibidores competitivos de algumas celulases e xilanases, de forma que a suplementação com β -

34
xilosidase é crucial de modo a evitar a inibição por xilo-oligossacarídeos (CARVALHO *et al.*, 2013; MOREIRA; FERREIRA FILHO, 2016).

As β -xilosidases foram identificadas em vários microrganismos, incluindo fungos filamentosos e bactérias, e são comumente classificadas em 5 famílias de glicosil hidrolase, com base na similaridade da sequência de aminoácidos (GH 3, 39, 43, 52 e 54) (CHADHA; RAI; MAHAJAN, 2019). As enzimas pertencentes à família GH43 são caracterizadas como enzimas bifuncionais, pois apresentam função dupla de β -D-xilosidase e α -L-arabinofuranosidase devido à semelhança conformacional entre a xilopiranose e a arabinofuranose. A maioria das famílias de β -xilosidases realizam hidrólise com retenção da configuração do carbono anomérico, com exceção das GH 43 (mecanismo de inversão) (JORDAN *et al.*, 2007 a,b).

As constantes de especificidade para xilo-oligossacarídeos com diferentes comprimentos foram determinadas para a β -xilosidase GH43 de *S. ruminantium,* demonstrando uma preferência dessa enzima por hidrolisar xilobiose em xilose, diminuindo a especificidade por substratos com o aumento da cadeia de xilo-oligossacarídeos (LAGAERT *et al.*, 2014).

As β -xilosidase são capazes de mediar reações de transglicosilação, que é a capacidade de formar novas ligações glicosídicas, originando mais cadeias de oligossacarídeos. As β -xilosidases pertencentes a família 39 e 52 foram relatadas com atividade de transglicosilação utilizando preferencialmente xilobiose e xilotriose como substrato (LAGAERT *et al.*, 2014; MUZARD *et al.*, 2009). No entanto, as β -xilosidases de *S. ruminantium* da família GH43 não apresentam função de transglicosilação, mesmo em concentrações elevadas de substratos (xilose, xilobiose e xilotriose) (LAGAERT *et al.*, 2014; JORDAN *et al.*, 2007a).

2.3.2.3 α-L-arabinofuranosidases

As α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) comumente denominadas hidrolases de α -L-arabinofuranosídeos, são enzimas que hidrolisam as ligações α -1,2-, α -1,3-, e α -1,5- existentes entre os α -Larabinofuranosídeos e a cadeia principal de polissacarídeos como, α -L-arabinanas, arabinoxilana e arabinogalactanas (WILKENS *et al.*, 2017). Assim, com base nas similaridades nas sequências de seus aminoácidos e no mecanismo de ação, as α -L-arabinofuranosidases podem ser encontradas em seis famílias de glicosil hidrolases: GH 2, GH 3, GH43, GH51, GH54 e GH62 (LAGAERT *et al.*, 2014).

Com base em sua especificidade de substrato, as α -L-arabinofuranosidases são agrupados em três tipos (A, B e C). Os α -L-arabinofuranosidases do tipo A atuam preferencialmente nos arabino-oligossacarídeos, enquanto as enzimas do tipo B atuam tanto em arabino-oligossacarídeos como em polímeros ramificados (todos os polímeros). Ambos os tipos A e B mostram atividade em *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo. Em contraste, α -L-arabinofuranosidases do tipo C degradam especificamente as ligações arabinosídicas dentro das arabinoxilanas (TU *et al.*, 2019).

As enzimas pertencentes à família GH51 de Aspergillus awamori, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger, Chrysosporium lucknowense e Penicillium chrysogenum foram descritas como ativas em arabinoxilanas, arabino-oligossacarídeos e arabinanas ramificadas (TU *et al.*, 2019). Assim como outras glicosil hidrolases, as α -L-arabinofuranosidases podem mediar a clivagem da ligação glicosídica por dois principais mecanismos, retenção total ou inversão da configuração anomérica. As enzimas pertencentes a família 51 agem hidrolisando as ligações α -1,2 e α -1,3 entre arabinose e xilose da cadeia central de polissacarídeos, e atuam pelo mecanismo de retenção da configuração anomérica, sendo os resíduos catalíticos ácido/base, dois glutamatos (LAGAERT *et al.*, 2014).

2.3.2.4 Acetil xilana esterase

Acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72) são enzimas que hidrolisam ligações éster dos grupos O-acetil ligados a polímeros como acetilglucuronoxilana (CHADHA; RAI; MAHAJAN, 2019). A maioria das xilanas são acetiladas nas posições 2-O e 3-O nos resíduos de xilose e a ação dessas enzimas na cadeia principal de xilana leva à criação de sítios mais propensos à ação das endoxilanases e β - xilosidases (BIELY *et al.*, 2013; KAMESHWAR; QIN, 2018). Acetil xilana esterases pertencem à família das Carboidratos esterases, e são classificadas em 8 diferentes famílias (CE 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 16) definidas no banco de dados CAZy (KAMESHWAR; QIN, 2018).

Estudos relacionados a especificidade posicional de acetil xilana esterases indicaram que essas enzimas podem promover a desacetilação em ambas as posições 2 e 3 em derivados monoacetil de 4-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo. Esta "não especificidade" posicional foi atribuída à formação de dois complexos produtivos que diferem na orientação de 180° do substrato. No entanto, a maioria das acetil xilana esterases exibem uma forte preferência pela desacetilação da posição 2 em substratos acetilados (BIELY *et al.*, 2011; PUCHART *et al.*, 2020). A acetil xilana esterase de *Orpinomyces sp.* pertence à Família 6 das Carboidrato

esterases (CE6) e são relatadas como esterases capazes de promover a desacetilação em substratos mono acetilados nas posições 2 e 3 bem como em substratos duplamente acetilados (2,3-di-O-acetil-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo) (BIELY, 2012; NEUMÜLLER *et al.*, 2015).

A ação das acetil xilana esterases advém de dois possíveis mecanismos de reação, sendo o mais comum a desacetilação catalisada pela tríade catalítica serina, histidina e asparagina, análoga à ação da lipase clássica e serina protease. Esse mecanismo engloba a maioria das famílias acetil xilana esterases, dentre elas a CE6 de *Orpinomyces sp* utilizada no presente no trabalho, onde é realizada a desacetilação da posição 2 de um β -D-xilopiranosídeo por meio da transferência do grupo acetil para uma hidroxila da serina, formando um intermediário tetraédrico instável, conforme demonstrado na Figura 9. A liberação de álcool e do polissacarídeo desacetilado é seguido por hidrólise desse intermediário. Para as enzimas agrupadas na família CE4, o mecanismo de reação envolve a tríade catalítica Histidina-Histidina-Asparagina, sendo essas enzimas dependentes de metal para sua efetiva ação catalítica (BIELY *et al.*, 2012).

Figura 9 - A desacetilação da posição 2 em β -D-xilopiranosídeo por uma enzima acetil xilana esterase tipo serina de *T*. *reesei* (CE5).



Fonte: Adaptado de Biely (2012).

2.3.2.5 Feruloil esterase

As enzimas feruloil esterases (EC 3.1.1.73), também denominadas cinamoil esterases ou ácido cinâmico hidrolases, são uma subclasse de carboxil esterases com capacidade de catalisar a hidrólise da ligação éster entre ácidos hidroxicinâmicos e resíduos de açúcar de um polissacarídeo da parede celular vegetal encontrados em bactérias, fungos e plantas, com diversas aplicações biotecnológicas (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Diferentes sistemas de classificação foram propostos para as feruloil esterases. De acordo com Crespin *et al.* (2004), as feruloil esterases podem ser classificadas em quatro tipos: A, B, C e D, com base em alinhamentos múltiplos de sequências peptídicas. O tipo A, mostra preferência por fenólicos contendo metoxi (-O-CH3) substituições, especialmente em posição meta, como ocorre em ácidos ferúlico e sinápico. As enzimas do tipo B demonstram preferência por substratos contendo uma ou duas substituições de hidroxilas, como encontradas nos ácidos p-cumárico e cafeico. Já as feruloil esterases dos tipos C e D exibem uma grande especificidade sobre os ésteres sintéticos de ácidos hidroxicinâmicos (ácidos ferúlico, p-cumárico, cafeico e sinápico) diferenciando apenas na habilidade para liberar dímeros de ácido ferúlico (GOPALAN *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Com o sequenciamento genômico de novas feruloil esterases em fungos e bactérias, e ensaios de especificidade das enzimas em substratos naturais ou sintéticos, o sistema de classificação formulado por Crespin tornou-se limitado em sua capacidade de refletir a ampla especificidade de substrato e diversidade enzimática, evidenciando que as variadas feruloil esterases caracterizadas não podiam ser categorizados neste sistema ABCD (DILOKPIMOL *et al.*, 2016). Nesse sentido, novo sistema de classificação baseado na sequência de aminoácidos dessas enzimas foi projetado, dividindo as feruloil esterases em 13 subfamílias, baseado em relações filogenéticas, homologias de sequências e especificidade por substratos (UNDERLIN *et al.*, 2020). De acordo com esta classificação, apenas feruloil esterases das subfamílias 5 e 6 foram classificadas como pertencentes a família 1 de carboidrato esterase CE1 na base de dados CAZy, divididas atualmente em cinco subfamílias (DILOKPIMOL *et al.*, 2016).

As feruloil esterases classificadas na família 1 de carboidrato esterase CE1 possuem estrutura do tipo α,β -hidrolases, constituídas por uma região central de folhas- β flanqueadas por 8 α -hélices. A tríade catalítica é composta por uma serina, histidina e um ácido carboxílico (ácido aspártico ou ácido glutâmico), sendo a reação catalisada por feruloil esterases semelhante ao mecanismo relatado para as serinas proteases, lipases e outras esterases, com a formação de um intermediário acil-enzima (URAJI *et al.*, 2018). Recentemente, algumas enzimas CE1 identificadas em estudos de metagenômica foram previstas para conter um módulo de ligação a carboidratos da família 48 (CBM48), domínios não catalítico presentes em enzimas de ação ao amido (HOLCK *et al.*, 2019).

A feruloil esterase de *Clostridium thermocellum* encontra-se no celulossoma desse microrganismo, sendo os domínios de feruloil esterase componentes das xilanases multimodulares 10A e 10B. Essas enzimas são relatadas como bifuncionais, com atividades feruloil esterase e xilanase e foram caracterizadas com melhores atividades em pH 4 -7 e temperaturas entre 50 - 60° C (BLUM *et al.*, 2000).

2.4 FATORES LIMITANTES DA HIDRÓLISE

A hidrólise de biomassa lignocelulósica em monômeros fermentescíveis possui algumas limitações relacionadas principalmente as características do substrato (concentração do material, recalcitrância da biomassa, grau de cristalinidade de celulose, acessibilidade da celulase, área superficial e porosidade) e ao mecanismo de ação das enzimas hidrolíticas (condições reacionais, inibição por produto, inibição por produtos derivados do pré-tratamento e adsorção improdutiva das enzimas) (Figura 10) (SCARCELLA *et al.*, 2021; RAMOS *et al.*, 2020; JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

A carga de sólidos empregado na hidrólise se destaca como um importante fator para garantir viabilidade econômica do processo e altos rendimentos, visto que alto teor de sólidos traduz consequentemente em maiores concentrações de açúcares monoméricos, ideal para aplicação em biorrefinaria (MODENBACH; NOKES, 2013). Todavia, conforme relatado por Da Silva *et al.*, (2016), concentrações elevadas de sólidos (acima de 10%) limitam a transferência de massa no meio reacional devido ao aumento da viscosidade, acarretando queda de eficiência da hidrólise. Além disso, a carga de enzima empregada também é crucial em relação ao custo e formação de produtos da hidrólise. Baixas concentrações enzimáticas tornam a inibição de enzimas celulolíticas por produtos mais proeminentes, reduzindo a eficiência na sacarificação do material. No entanto, a utilização cargas elevadas ocasiona em um aumento expressivo no custo total do processo, tornando-o inviável para aplicação industrial (AGRAWAL *et al.*, 2021).

Figura 10 - Limitantes da hidrólise enzimática da celulose: inibição pelo produto (1); adsorção improdutiva na celulose (2); diminuição da acessibilidade das enzimas pelas hemiceluloses (3) e pela lignina (4); adsorção improdutiva na lignina e inativação das enzimas.



Fonte: Adaptado de Jørgensen, Kristensen e Felby (2007).

As condições operacionais, como a temperatura e o pH são fatores relevantes para obter ótimo desempenho das enzimas hidrolíticas. A temperatura de operação típica para hidrólise de celulose varia entre 40 e 55 °C e pH varia de 4,5 a 5,5, sendo tais enzimas são suscetíveis à degradação após exposição a elevadas temperaturas e altas velocidades de agitação (FENILA; SHASTRI, 2016).

A cristalinidade da celulose afeta diretamente sua conversão em glicose. As regiões cristalinas por serem mais compactas, dificultam o acesso das enzimas hidrolíticas, diferentemente das regiões amorfas, onde o acesso das enzimas é menos restrito e a hidrólise é mais eficaz (ARANTES; SADDLER, 2010; RAMOS *et al.*, 2020). Além disso, volume de poros e área superficial também apresentam grande influência na hidrólise do material lignocelulósico. Geralmente, substratos com baixo grau de cristalinidade da celulose, elevada área superficial e volume de poros, acarretam maior adsorção das celulases, levando a altas taxas de hidrólise de celulose (MENG; RAGAUSKAS, 2014; AGRAWAL *et al.*, 2021)

A recalcitrância do material lignocelulósico também é uma das principais barreiras a ação de enzimas hidrolíticas. Isso tem sido confirmado por muitos trabalhos, nos quais a remoção da lignina e hemicelulose aumentou consideravelmente os níveis de hidrólise da celulose (BRIENZO *et al.*,2017; GONZALES; SIVAGURUNATHAN; KIM, 2016; HEGGSET; SYVERUD; ØYAAS, 2016; SIQUEIRA *et al.*, 2011; RAMOS *et al.*, 2020).

A presença de lignina caracteriza um dos maiores obstáculos a hidrólise enzimática de lignocelulósicos por ser ligar as celuloses, reduzindo a quantidade de enzimas disponíveis para atuar na hidrólise da fibra celulósica (MATEI *et al.*, 2020). A interação enzima-lignina ocorre predominantemente por interações hidrofóbicas, devido à presença de anéis aromáticos em sua estrutura e cerca de 60 a 70% das enzimas podem ficar aderidas neste polímero ao final da hidrólise (RAHIKAINEN *et al.*, 2013a,b). Dependendo do pré-tratamento empregado, modificações químicas na lignina podem alterar sua afinidade por proteínas, resultando no aumento de hidroxilas fenólicas e consequentemente promovendo aumento na capacidade adsortiva da lignina residual (RAHIKAINEN *et al.*, 2013a; SHENG *et al.*, 2021). Todavia, pré-tratamentos que ocasionam no aumento da hidrofilicidade da lignina podem ser utilizados visando diminuir adsorções improdutivas das celulases (NAKAGAME *et al.*, 2011; PAREEK; GILLGREN; JÖNSSON, 2013; RAMOS *et al.*, 2020).

Algumas propriedades das enzimas como a hidrofobicidade também desempenha importante papel na adsorção improdutiva de celulases na lignina. Rahikainen *et al.* (2013a) demonstraram que domínios de ligação a carboidratos também desempenham um papel significativo na adsorção improdutiva de enzimas na superfície da lignina devido á presença de três resíduos de tirosina alinhados (Y5, Y31, Y32), importantes para o pareamento de anéis da interação CBM-celulose, além disso, o contato prolongado das celulases com lignina acarretou desnaturação irreversível das enzimas, especialmente em temperaturas elevadas (SANTOS *et al.*, 2019).

Diferentes técnicas são reportadas visando superar os efeitos negativos da lignina, tais como a adição de coadjuvantes no meio reacional: proteínas (albumina, por exemplo), surfactantes não iônicos (Tween 20, por exemplo) e polímeros (polietileno glicol, por exemplo), sendo estes compostos responsáveis por bloquear sítios hidrofóbicos da lignina e minimizar a adsorção improdutiva (SANTOS *et al.*, 2019; AGRAWAL *et al.*, 2021). Além disso, CBMs com diferentes afinidades de adsorção também podem ser projetadas de modo a reduzir a inativação enzimática (VÁRNAI SIIKA-AHO; VIIKARI, 2013; FENILA; SHASTRI, 2016).

Assim como a lignificação da biomassa lignocelulósica, a presença de hemicelulose na parede celular secundária também é considerada um dos fatores mais impactantes na acessibilidade à celulose, pois estas atuam como uma barreira física dificultando a hidrólise enzimática pelo fato de estarem envolvendo as microfibrilas de celulose (LEU; ZHU, 2013; RAMOS *et al.*, 2020). Estudos realizados por Meng *et al.* (2015) demostraram uma correlação na remoção de xilana (17 % para 0 %) com maiores quantidades de corante Direct Orange adsorvidas na superfície da celulose, indicando aumento de acessibilidade.

Na parede celular dos materiais lignocelulósicos, as hemiceluloses se encontram entre as microfibrilas de celulose, e interagem entre si por ligações de hidrogênio, podendo também interagir com a lignina por ligações covalentes (Figura 11 e 12). A interação da hemicelulose com a celulose impede que as moléculas de celulose de fibras paralelas e adjacentes se colapsem, mas também formam uma rede de difícil acesso a celulases durante a hidrólise (FENGEL; WEGENER, 1989; BUSSE-WICHER *et al.*, 2016 a,b).





Fonte: Adaptado de Busse-Wicher et al, (2016b).

A presença de ácidos hidroxicinâmicos (ferúlico e *p*-cumárico) na estrutura lignocelulósica também confere uma importante limitação à hidrólise enzimática da celulose. É descrito para o bagaço de cana-de-açúcar, que o ácido p-cumárico se encontra presente na forma de éster, acilando γ -OH da cadeia lateral da lignina, predominantemente nas unidades S. Em relação ao ácido ferúlico, é relatado que este é ligado por ligações ésteres à posição O-5 de resíduos arabinofuranosil das xilanas, e podem formar ligações cruzadas com lignina (através de ligações éter) (DEL RÍO *et al.*, 2015). Além disso, pode haver nas

ramificações com ácido ferúlico, a formação de diferulatos, ligando duas cadeias de hemicelulose covalentemente, formando uma barreira que restringe o acesso das enzimas as microfibrilas de celulose (LAN; STONE, 1994; DEL RÍO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2020). A Figura 12 ilustra as principais ligações cruzadas propostas entre lignina e polissacarídeos.

Figura 12 - Diagrama esquemático mostrando as possíveis ligações cruzadas entre lignina e polissacarídeos. a) ligação éster direta; b) ligação éter direta; c) ácido hidroxicinâmico esterificado a polissacarídeos; d) ácido hidroxicinâmico esterificado à lignina; e) ácido hidroxicinâmico eterificado à lignina; f) ponte de ácido ferúlico éster-éter; g) ponte di-éster de ácido dihidro diferúlico; h) ponte di-éster-éter de ácido dihidro diferúlico



Fonte: Adaptado de Lan e Stone (1994).

A presença de grupos acetila presentes na cadeia principal da xilana (Figura 13) também está associada como um limitante importante da degradação efetiva de hemicelulose (KAMESHWAR; QIN, 2018). Evidências experimentais são fornecidas para β -xilosidase e α -L-arabinofuranosidase onde foi evidenciado que tanto a mono-acetilação como a mono-feruloilação de 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo e 4-nitrofenil- α -L arabinofuranosídeo em qualquer um dos três grupos hidroxil disponíveis, torna os glicosídeos resistentes à ação dessas enzimas (Figura 14) (BIELY *et al.*, 2011; BIELY, 2012). Dessa forma, a desacetilação da cadeia de xilana expõe os sítios de ligação para ação das enzimas do complexo hemicelulolítico, permitindo assim a hidrólise completa da hemicelulose (PUCHART; KROGH; BIELY, 2019).



Figura 13 - Posições de grupos acetilas presentes em arabinoglucuronoxilana.

Fonte: Adaptado de Biely (2012).

Figura 14 - Acetilação de 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo e acetilação ou feruloilação de 4nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo tornando suas ligações glicosídicas resistentes a ação enzimática de β -xilosidases e α -L-arabinofuranosidases respectivamente.



Substratos resistentes a ação de α-L-arabinofuranosidases

Fonte: Adaptado de Biely (2012).

Em suma, adequar coquetéis comerciais com enzimas que promovem a desramificação da hemicelulose pode acarretar indiretamente no aumento da acessibilidade da celulose, devido a maior ação de xilanases a cadeia principal de xilanas e rompimento de ligações lignina-hemicelulose. O sistema xilanolítico completo age de forma sequencial e cada enzima atua em determinadas ligações na estrutura lignocelulósica, liberando um grupo

da cadeia principal, facilitando a atividade da próxima enzima (GOLDBECK *et al.*, 2016; BRAR *et al.*, 2020).

Com base nos principais fatores limitantes da hidrólise de celulose anteriormente citados e uma ampla pesquisa bibliográfica, diferentes estratégias podem ser sugeridas para superar os desafios na hidrólise enzimática de lignocelulósicos, principalmente quando considera as tecnologias de pré-tratamento que conservam parte apreciável da fração hemicelulósica no material pré-tratado, diminuindo a necessidade de utilizar metodologias mais severas de pré-tratamento para alcançar ótimos rendimentos de sacarificação (Tabela 2).

Desafios	Soluções	Referências
Inibição por produtos (celobiose)	Suplementação adicional com β-glicosidases	Van Dyk e Pletschke (2012) Agrawal <i>et al.</i> (2021)
Inibição por xilo- oligossacarídeos	Suplementação adicional com β-xilosidase	Moreira e ferreira filho (2016) Agrawal <i>et al.</i> (2021)
Adsorção improdutiva e desativação enzimática	Adição de proteínas não catalíticas (BSA), surfactantes e/ou deslignificação.	Santos <i>et al.</i> (2019) Ding <i>et al.</i> (2019)
Presença de ácidos hidroxicinâmicos (ferúlico e Cumárico)	Suplementação adicional com feruloil esterase para rompimento de ligações lignina-carboidrato	Oliveira <i>et al.</i> (2020) Siqueira <i>et al.</i> (2011)
Acessibilidade limitada a celulose pela presença de hemicelulose	Adição de β-xilosidase, α- arabinofuranosidase e acetil xilana esterase a preparados comerciais para hidrólise efetiva da hemicelulose.	Varnai <i>et al.</i> (2014) Debalona <i>et al.</i> (2013) Kameshwar e Qin (2018)
Baixa concentração de sólidos e alto custo das enzimas	Otimização de coquetéis enzimáticos baseados nas características dos substratos	Fenila e Shastri (2016) Agrawal <i>et al.</i> (2021)

Tabela 2 - Desafios e soluções propostas no processo de hidrólise de biomassa recalcitrante.

Fonte: Arquivo próprio

2.5 OTIMIZAÇÃO DE COQUETÉIS ENZIMÁTICOS COM BASE NOS SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

O desenvolvimento de coquetéis enzimáticos baseados nas características dos materiais lignocelulósicos despontam como uma vertente viável e eficiente para aumentar a glicose liberada após a hidrólise. O principal objetivo ao desenhar novas misturas consiste em obter elevados rendimentos de conversão da celulose utilizando baixa carga enzimática, explorando a sinergia entre as enzimas do complexo hidrolítico (SCARCELLA *et al.*, 2021).

Nesse contexto, muitos estudos de otimização com base no sinergismo entre as enzimas têm sido relatados na literatura. Dentre eles Bussamra, Freitas e Costa (2015) estudaram a formulação de coquetéis enzimáticos otimizados para a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente a 190 °C. Foram utilizadas enzimas de fonte comercial bem como de cultivos microbianos (*Trichoderma reesei e Escherichia coli* geneticamente modificada), seguidas de purificação. A mistura enzimática otimizada, compreendida da fração *T. reesei* (80%), endoglucanase (10%) e β -glicosidase (10%), foi capaz de converter 68% da celulose contida, enquanto os coquetéis comerciais Cellic CTec2 e Celluclast 1,5 converteram 70% e 50%, respectivamente, sob as mesmas condições de operação.

Um dos desafios encontrados para a formulação de coquetéis enzimáticos otimizados é a obtenção de enzimas purificadas em quantidades suficientes para os ensaios. Com os avanços da biologia molecular, a expressão heteróloga dessas proteínas em diferentes microrganismos tornou-se uma estratégia promissora para obter quantidades apreciáveis dessas enzimas para aplicação em processos de sacarificação de lignocelulósicos (ADSUL *et al.*, 2020; SCARCELLA *et al.*, 2021).

Laothanachareon *et al.* (2015) avaliaram o efeito da adição de três enzimas recombinantes ao complexo de celulases comercial (Accellerase 1500) para a hidrólise de palha de arroz pré-tratada com hidróxido de sódio. As enzimas avaliadas consistiam em α -L-arabinofuranosidase, pectina esterase, e endo-xilanase, provenientes de *Aspergillus aculeatus* e expressas em *Pichia pastoris*. Por um planejamento experimental foram obtidas as melhores proporções enzimáticas para alcance de maiores taxas de hidrólise. A mistura otimizada promoveu um aumento de 47,3% na conversão do substrato em glicose quando comparado ao desempenho da hidrólise apenas com o complexo de celulases comercial.

Considerando a recalcitrância da biomassa como um dos fatores mais relevantes que limitam a acessibilidade das celulases à fibra de celulose, a utilização de enzimas para remoção de grupos pendentes para romper a ligações entre a hemicelulose e lignina vem sendo amplamente estudado.

Várnai *et al.* (2014) avaliaram o potencial das enzimas acetil esterase e três feruloil esterases na diminuição da recalcitrância de lignocelulósicos. Os efeitos dessas enzimas foram estudados em diferentes frações de híbridos de cana-de-açúcar (cultura de referência e clones com baixos teores de lignina desenvolvidos na Escola de Engenharia de Lorena – USP). Os resultados obtidos demonstraram que a presença de acetil esterases na mistura enzimática melhoram a eficiência da hidrólise de xilanas e consequentemente aumenta o rendimento de sacarificação da celulose. Os dados obtidos sugerem que a presença de acetil esterases na mistura enzimática para poderem ser convertidas de forma eficiente à xilose. Em contrapartida, apesar da extensa liberação de ácidos hidroxicinâmicos pelas feruloil esterases, estas promoveram apenas moderadamente melhorias no acesso enzimático a celulose nesses substratos.

Estudos mais detalhados acerca da suplementação de coquetéis enzimáticos com enzimas xilanolíticas e o efeito sobre a sacarificação de celulose foram desenvolvidos por Golbbeck *et al.* (2016). Os autores avaliaram o efeito da suplementação de celulases comerciais (Accellerase 1500) com seis hemicelulases na hidrólise de diferentes amostras de bagaço de cana. Os substratos analisados foram: bagaço de cana in natura, bagaço prétratado com ácido fosfórico diluído e bagaço de cana pré-tratado com ácido acético/peróxido de hidrogênio. O melhor resultado alcançado foi suplementando o coquetel Accellerase 1500 com endo-1,4-xilanases (GH11) e feruloil esterase para hidrólise do bagaço de cana prétratado com ácido acético/peróxido de hidrogênio, acarretando um aumento de 24% na conversão de celulose a açúcares monoméricos.

É importante ressaltar, que o principal obstáculo inerente a eficiência esperada desses coquetéis advém do tipo e características estruturais dos substratos utilizados. Substratos que diferem nos teores de lignina e hemicelulose podem requerer a suplementação com diferentes enzimas acessórias, bem como a proporção entre elas, de forma a garantir altas conversões de sacarificação. O desempenho de misturas enzimáticas em diferentes substratos foi avaliado por Song *et al.* (2016). Os autores estudaram o efeito sinérgico de celulases e xilanases na hidrólise dos substratos naturais, espiga de milho, caule de milho e palha de arroz. Os resultados obtidos indicaram que misturas contendo celulases e xilanases promoveram aumento significativo na conversão de celulose em glicose para os três substratos quando comparado ao uso somente de celulases (aumento de 43,9%, 48,5%, e

40,2% respectivamente). Adicionalmente, análises morfológicas dos substratos realizadas pelos autores demonstraram que a adição de xilanases alterou a estrutura física dos substratos, aumentando a porosidade desses materiais e tornando a celulose mais acessível à ação das celulases.

Delabona *et al.* (2013) alcançaram resultados satisfatórios ao suplementar o extrato fúngico de *Trichoderma harzianum* com pectinases e α -L-arabinofuranosidases, após verificar que essas estavam presentes em concentrações muito baixas nesse extrato. Os autores utilizaram como substrato, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, alcançando um aumento de 116% na eficiência de hidrólise após empregar o extrato de *T. harzianum* com as atividades enzimáticas complementares. Os resultados positivos foram correlacionados com a remoção dos resíduos de arabinose da cadeia de xilana, bem como a remoção da fração de pectina remanescentes no material pré-tratado, o que promoveria maior acessibilidade das celulases as cadeias de celulose.

Esforços vem sendo realizados a fim alcançar rendimentos elevados de hidrólise em substratos obtidos em condições brandas de pré-tratamento. Nesse contexto, pode ser citado o trabalho realizado por Alvira, Negro e Ballesteros (2011), onde os autores avaliaram a suplementação do coquetel Cellic CTec2 com xilanases e α-arabinofuranosidase para a hidrólise de palha de trigo pré tratado por explosão a vapor em condições moderadas (210°C a 2,5 min) e severas (220°C a 2,5 min). Comparando ambos os bagaços pré-tratados observou-se que quando se utiliza a preparação não suplementada (apenas Cellic CTec2 a 5 FPU/g), melhores rendimentos de hidrólise foi alcançado para substrato pré-tratado em condições severas 220 C, rendimento 7% maior ao obtidos para o substrato em condições moderadas (210°C). No entanto, após a suplementação de Cellic CTec2 com as enzimas acessórias em conjunto, os resultados foram promissores, demonstrando maior digestibilidade do substrato pré-tratado em condições severas (cerca de 54%) em comparação com o substrato pré-tratado em condições severas (cerca de 50%) (Figura 15).

Esse interessante resultado demonstra o potencial das enzimas hemicelulolíticas em melhorar rendimentos de hidrólise de substratos pré-tratados em condições brandas, sendo possível alcançar por meio da suplementação de coquetéis comerciais, conversões equivalentes aos obtidos em substratos pré-tratados severamente. Conforme reportado por Banerjee, Scott-Craig e Walton (2010) os coquetéis comerciais disponíveis são comumente desenvolvidos com base em substratos pré-tratados com ácidos. Diante disso, tais complexos comerciais podem não se mostrar efetivos para sacarificação de substratos pré-tratados por métodos que não reduzem substancialmente os conteúdos de hemicelulose (VAN DYK; PLETSCHKE, 2012).

Figura 15. Comparação dos rendimentos de hidrólise enzimática obtidos com Cellic CTec suplementado com xilanases e α -arabinofuranosidase para a hidrólise de palha de trigo pré tratado por explosão a vapor em condições moderadas (210°C a 2,5 min) e severas (220°C a 2,5 min).



Fonte: Adaptado de Alvira, Negro e Ballesteros (2011).

Em suma, a maioria dos estudos sobre hidrólise de substratos lignocelulósicos concentrou-se na obtenção de combinações de enzimas e suas proporções adequadas na mistura que levam a um aumento no rendimento de hidrólise. A Tabela 3 sumariza alguns desses estudos, demonstrando as misturas enzimáticas utilizadas e a melhora nos rendimentos obtidos.

Substratos/pré- tratamento	Enzima base	Enzimas suplementares	Efeito nos rendimentos de hidrólise após a suplementação	Referências
Bagaço de cana/ pré- tratamento sulfito alcalino	Celulase de Trichoderma reesei	Extrato bruto de Laetiporus sulphureus	Aumento de 5 e 6% na conversão de glucana e xilana respectivamente	Valadares et al. (2016)
Palha de trigo/ pré- tratamento alcalino	Celluclast 1,5 L	LPMO AA9 recombinante e xilanase GH10 de <i>Gloeophyllum trabeum</i>	Aumento de 40 e 57% na conversão de glucana e xilana respectivamente.	Sanhueza <i>et al.</i> (2018)
Palha de trigo/ pré- tratamento alcalino	Accellerase 1500	Arabinofuranosidase recombinante (GH62) Pectina esterase recombinante (CE8) Xilanase recombinante (GH10)	Aumento de 47,3% na hidrólise de glucana	Laothanachareon <i>et al.</i> (2015)
Bagaço de cana/ pré- tratamento hidrotérmico	Celluclast 1,5 L	Extrato bruto de Aspergillus oryzae P21C3	Aumento de 36% na hidrólise de glucana	Braga <i>et al.</i> (2014)
Palha de arroz/ pré- tratamento com NH4OH	Celulase de Trichoderma reesei	Extrato bruto de Humicola insolens	Aumento de 16% na hidrólise de glucana	Kogo <i>et al.</i> (2017)

Tabela 3 - Estudos sobre hidrólise enzimática de diferentes substratos lignocelulósicos pré-tratados.

Fonte: Adaptado de Champreda et al. (2019).

CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E EMBASAMENTO TEÓRICO

Diversos estudos ressaltam a importância de conhecer as características dos materiais lignocelulósicos para uma efetiva hidrólise enzimática (ALCÁNTARA *et al.*, 2016; ARANTES; SADDLER, 2010; BRIENZO *et al.*, 2017; MENG; RAGAUSKAS, 2014). Fica evidente que a biomassa submetida a distintas severidades de pré-tratamentos apresenta teores de lignina e hemicelulose residuais variados, sendo que tais componentes consistem em uma barreira limitante ao acesso das celulases à celulose. Além disso, a presença de lignina acarreta adsorções improdutivas de celulases, restringindo a disponibilidade das enzimas, o que é crucial para degradação da porção polissacarídica (LI; ZHENG, 2017).

O alto custo da rota enzimática para conversão de biomassa em açúcares fermentescíveis advém do processo de produção das enzimas e altas dosagens enzimáticas necessárias para a sacarificação (ADSUL *et al.*, 2020; FENILA; SHASTRI, 2016). A obtenção de coquetéis enzimáticos otimizados possibilita o uso de altas cargas de sólidos nas reações e a redução da carga enzimática necessária, sendo que tais condições, individualmente ou em conjunto podem alavancar as biorrefinarias.

Para a formulação de novos preparados enzimáticos é essencial conhecer a contribuição de cada enzima, sendo os ensaios em que se possa controlar sua presença em uma mistura a maneira apropriada de se determinar a real contribuição de uma determinada proteína (ADSUL *et al.*, 2020). As endoglucanases, celobiohidrolases I/II e β - glicosidases são enzimas essenciais e formam a base do coquetel enzimático. Outras enzimas e proteínas acessórias (hemicelulases, esterases, peroxidases, swoleninas e LPMOs) também tem sido reportadas como importantes para o sucesso da hidrólise, portanto, o conhecimento do efeito de concentração e de sinergismo destas enzimas também deve ser considerado (MENG; RAGAUSKAS, 2014; ARANTES; SADDLER, 2010; GAO *et al.*, 2010).

Diversos trabalhos com foco em desenvolver coquetéis enzimáticos baseados nas características dos materiais lignocelulósicos vem sendo abordados na literatura. Dentre os trabalhos previamente apresentados e discutidos, o estudo realizado por Golbbeck *et al.* (2016) mostrou uma abordagem similar à pretendida na execução do presente estudo. Como anteriormente apresentado, Golbbeck *et al.* (2016) avaliaram adição de seis hemicelulases no coquetel comercial Accellerase®1500, e o efeito das formulações obtidas na sacarificação do bagaço de cana submetido a diferentes pré-tratamento. A estratégia desenvolvida pelos autores foi bem-sucedida para desenvolver uma mistura enzimática mais eficiente, revelando

ainda que misturas de hemicelulases com múltiplas atividades podem ser menos efetivas do que o esperado.

Com base na pesquisa bibliográfica realizada pode-se concluir que o desenho de coquetéis enzimáticos para a hidrólise de substratos específicos desponta como uma abordagem importante, tendo como objetivo a avaliação do efeito sinérgico dessa mistura na hidrólise de substratos submetido a diferentes severidades de pré-tratamento. Possivelmente, isto pode impactar na redução dos custos do processo de hidrólise, visto que cargas menores de enzimas seriam adicionadas à reação de hidrólise ou ainda misturas mais eficientes poderiam ser aplicadas a substratos gerados por pré-tratamentos brando.

4 **OBJETIVOS**

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver coquetéis enzimáticos para a hidrólise de substratos específicos gerados a partir de bagaço de cana pré-tratado utilizando tecnologias brandas de pré-tratamento. Os objetivos específicos compreendem:

- Avaliar a digestibilidade de substratos preparados por pré-tratamentos brandos empregando uma mistura de enzimas comercias de elevada performance (Cellic CTec2).
- Determinar o grau máximo de hidrólise enzimática da celulose possível de ser alcançado com a remoção seletiva de hemicelulose.
- Determinar o efeito da adição individual e conjunta de enzimas com ação na cadeia principal de xilana (β-xilosidase) e seus substituintes (α-L-arabinofuranosidase), que consistem em impedimentos a efetiva hidrólise de celulose em substratos com quantidades apreciáveis de hemicelulose.
- Determinar o efeito da adição de feruloil esterase e acetil xilana esterase ao coquetel Cellic CTec2, visando avaliar a possibilidade de remover ésteres de ácidos hidroxicinâmicos, bem como grupos acetila, em substratos em que estes substituintes resistem ao pré-tratamento.
- Suplementação do coquetel Cellic CTec2 com proteína não catalítica (albumina do soro bovino) e a influência na digestibilidade de substratos ricos em lignina.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ENZIMAS

As enzimas purificadas e proteínas comerciais empregadas no presente trabalho corresponderam a:

a) Complexo celulolítico Cellic CTec2 (Novozymes);

b) β-xilosidase (exo-1,4-B-D-xilosidase – EC 3.2.1.37; Megazyme/E-BXSEBP),

c) α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55; Megazyme/E-AFASE),

d) feruloil esterase (EC 3.1.1.73; Megazymes/ E-FAEZCT)

e) acetil xilana esterase (EC 3.1.1.72; Megazyme/ E-AXEAO-1KU).

f) albumina do soro bovino (BSA-Inlab).

A Tabela 4 indica as características físico-químicas das enzimas, comercializadas pela Megazyme.

Tabela 4 - Características das enzimas purificadas comerciais usadas no presente trabalho (Dados fornecidos pelo fabricante).

Enzima	Microrganism o produtor	PI	Massa molar (kD)	Concentraçã o de proteína (mg/ml)	pH e Temperat ura ótimos	Atividade Especifica U/mg proteína
β-Xilosidase (GH43)	Selelomonas ruminantium	4,4	61,9	5,2*	pH 5 a 50°C	118
α-L- Arabinofuranosidase (GH 51)	Aspergillus Niger	< 3,0	62	8,4*	pH 4 a 40°C	32
Feruloil esterase (CE1)	Clostridium thermocellum	6,8	29	16,5*	pH 4-7 a 50-60°C	0,5
Acetil xilana esterase(CE6)	Orpinomyces sp.	5,6	34	9,15*	pH 7 a 40°C	>36

* Fonte: Arquivo próprio.

As atividades específicas das enzimas β -Xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, Feruloil esterase e Acetil xilana esterase foram medidas nos substratos 4-nitrofenil- β -Dxilopiranosídeo, 4-nitrofenil- α -arabinofuranosídeo, ferulato de etila e acetato de 4-nitrofenil, respectivamente. Todas as enzimas estão dissolvidas em sulfato de amônio e azida sódica, e foram armazenadas a 4 °C.

5.2.1 Bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino em condições brandas (5% de Na₂SO₃ e 2,5% de NaOH)

Um dos substratos para a sacarificação enzimática foi o bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermomecânico com sulfito alcalino em condições brandas, desenvolvido pelo nosso próprio de pesquisa, conforme metodologia descrita por Laurito Friend et al. (2015). Para o pré-tratamento, 600 g de bagaço de cana em base seca foram acondicionados em um reator de aço inoxidável. O reator foi fechado com tampa de nylon e submetido ao vácuo por 30 minutos através de uma entrada específica ligada à tampa do reator. Após este tempo, o licor de pré-tratamento foi deslocado para o interior do reator e a impregnação à vácuo foi continuada por 15 minutos. O licor em questão correspondeu a 6 L de água contendo sulfito de sódio e hidróxido de sódio suficientes para uma carga de 5% de Na₂SO₃ e 2,5% de NaOH expressos com base na massa de bagaço seco. A digestão da biomassa foi feita a 120 °C por 2 h, seguido de lavagem com água e centrifugação até atingir uma consistência de 30% (p/p). A água liberada durante a centrifugação foi coletada e usada para diluir a biomassa na próxima etapa de desfibramento em refinador de discos. O material lavado foi suspenso em água até um volume final de 25 litros (2% consistência) e refinado em um refinador de discos REGMED MD-300 (REGMED Brasil) com um espaço entre os discos de 0,1 mm e um consumo de energia de 250 Wh.

5.2.2 Biodegradação do bagaço de cana com fungo de degradação branca *Ceriporiopsis subvermispora*

O substrato biotratado foi desenvolvido pelo nosso próprio de pesquisa, conforme metodologia descrita por Machado e Ferraz (2017). Foi utilizado para tal, a espécie de fungo degradador de madeira *Ceriporiopsis subvermispora*, com padrão de degradação branca, obtida junto ao Forest Products Laboratory (Madison, WI, EUA) e catalogada sob o número SS-3 (AKHTAR *et al.*, 1998). Para o biotratamento, 25 g do material (base seca) contidos em Erlenmeyers de 2L foram mantidos imersos em cerca de 1 L de água destilada por 16 h. O excesso de água foi drenado e o material resultante foi autoclavado a 121 °C por 15 min. Duas etapas de autoclavagem foram realizadas com um intervalo de 24 horas entre elas. Este

procedimento de duas autoclavagens visou eliminar eventuais esporos cuja dormência possa ter sido quebrada na primeira etapa.

O bagaço contido nos Erlenmeyers de 2L foi inoculado com uma suspensão de micélio equivalente a uma carga de inóculo de 500 mg de micélio por quilograma de bagaço (ambos em base seca) e suplementado com milhocina na razão de 5 g/kg (ambos em base seca). O cultivo foi mantido estático a 27 ± 2 °C e realizado em triplicata, por um período de 60 dias. Após esse período, o bagaço foi macerado em um liquidificador contendo 400 mL de água por 15 min. Após a maceração, os sólidos foram filtrados em funil de Buchner com uma malha sintética de 200 mesh. Os sólidos retidos foram secos ao ar e então pesados. Uma alíquota foi utilizada para a determinação de umidade e as massas secas iniciais e finais foram empregadas para cálculo do rendimento do processo.

5.3 REMOÇÃO SELETIVA DE HEMICELULOSE UTILIZANDO ÁCIDO SULFÚRICO DILUÍDO

Amostras de bagaços pré-tratados (item 5.2.1 e 5.2.2) foram submetidos a um tratamento subsequente empregando ácido sulfúrico diluído para obter um material com baixos teores de hemicelulose. Para isso, diferentes concentrações de H₂SO₄ (5, 10 e 15% expressos em base de bagaço pré-tratado seco, m/m) foram adicionadas a 2 g bagaço pré-tratado numa razão sólido/líquido de 1:10 (p/v). Os pré-tratamentos foram conduzidos a 121°C por 120 min. Depois da etapa de cozimento, os bagaços foram filtrados e lavados até atingir pH 5. As amostras de bagaço obtidas foram secas a temperatura ambiente até atingir cerca de 10% de umidade e armazenadas em sacos plásticos para posteriores ensaios de hidrólise enzimática.

5.4 ENSAIOS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS AMOSTRAS DE BAGAÇOS DE CANA PRÉ-TRATADOS

Todos os experimentos de hidrólise enzimática do presente trabalho foram realizados em pequena escala, em tubos Eppendorff de 2 mL com consistência de 2% de substrato. Uma massa de 20 mg em base seca de bagaço de cana moído foi suspensa num volume final de reação de 1,0 mL de solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e 0,01 % de azida sódica, contendo a mistura de enzimas. Os experimentos foram realizados sob agitação de 120 rpm e a 45°C por 72 h. Durante o processo de sacarificação, as reações foram amostradas

em intervalos de 4, 8, 24, 48 e 72 h. Para isso, os tubos foram retirados do agitador, imersos em banho de gelo/água e centrifugados a 3400 g a 10 °C por 15 min. Após a centrifugação, 20 μ L de sobrenadante foi retirado e posteriormente foi adicionado 20 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 10 % (m/v) para a precipitação das proteínas. A mistura foi diluída em 360 μ L de água e guardadas congeladas para análise posterior de glicose, xilose e arabinose por HPLC. Para a análise em HPLC foi utilizada uma coluna BIORAD AMINEX HPX – 87H, com H₂SO₄ 5 mM como fase móvel e fluxo de 0,6 mL por minuto. Um detector de índice de refração foi utilizado a uma temperatura controlada de 35°C (Waters, modelo 2414). A concentração de carboidratos (glicose, xilose e arabinose) foi determinada através da calibração com padrões, de grau analítico, secos sob pentóxido de fósforo e vácuo. As condições descritas nesta seção foram utilizadas em todas as hidrólises enzimáticas realizadas neste trabalho (5.4.1 a 5.4.4)

5.4.1 Digestibilidade dos bagaços de cana pré-tratado em condições brandas empregando diferentes cargas enzimáticas de Cellic CTec2

Os ensaios da digestibilidade dos substratos em estudo foram conduzidos empregando três cargas enzimáticas de Cellic CTec2: carga alta (20 FPU/g de substrato); carga média (10 FPU/g de substrato) e carga baixa (5 FPU/g de substrato) em um tempo total de reação de 72h. A possível formação de xilo-oligossacarídeos durante a hidrólise enzimática foi avaliada, submetendo o sobrenadante recuperado após 72 h de reação à hidrólise ácida com 5% de H₂SO₄, mantidos em autoclave a 121°C por 1 h. Após o resfriamento da amostra, o pH dos hidrolisados ácidos foi ajustado a pH 5 e as amostras então centrifugadas e filtradas em filtros C18 Sep-Pak®e filtro de 0,22 µm de poro para análise das concentrações de carboidratos quantificados por CLAE.

5.4.2 Suplementação do coquetel Cellic CTec2 com diferentes concentrações de βxilosidase e α-L-arabinofuranosidase para a hidrólise dos bagaços de cana pré-tratado em condições brandas

Para avaliar o efeito da adição das enzimas β -xilosidase e α -L-arabinofuranosidase sobre a hidrólise do bagaço de cana, foram realizados ensaios suplementando o preparado comercial Cellic CTec2 (carga média de 10 FPU/g substrato) com diferentes concentrações dessas enzimas (1, 3 e 5 mg/g de substrato). O efeito da adição conjunta das enzimas em estudo foi avaliado por ensaios suplementando o preparado comercial Cellic CTec2 (carga de 10 FPU/g substrato) com 1 mg/g de cada enzima acessória, perfazendo um total de 2 mg de proteínas.

5.4.3 Suplementação do coquetel Cellic CTec2 com feruloil esterase e acetil xilana esterase para a hidrólise do bagaço biotratado com *C. subvermispora*

O efeito aditivo da enzima feruloil esterase sobre a hidrólise do bagaço de cana biotratado, foi analisado suplementando o preparado comercial Cellic CTec2 (carga média de 10 FPU/g substrato) com 1 mg de enzima/g de substrato e a quantificação dos ácidos hidroxicinâmicos liberados após a hidrólise foi realizado conforme metodologia descrita no item (5.5.2). Considerando as condições de pH ótimos diferentes para celulases (pH 4.8) e a enzima acetil xilana esterase (pH 7.0), os ensaios de hidrólise suplementando o coquetel Cellic CTec2 com essa enzima (1 mg/g), foram realizados em duas etapas distintas. Em uma primeira etapa de reação, a hidrólise foi conduzida a pH 7 por 24 horas para efetiva ação da enzima acetil xilana esterase. Após esse período, o pH da reação foi ajustado para 4.8 de modo a otimizar a ação das celulases, e a reação foi conduzida nesse pH até o tempo final de 72 horas.

5.4.4 Efeito da adição de albumina do soro bovino (BSA) nos ensaios de hidrólise

Foram conduzidos ensaios de hidrólise utilizando albumina do soro bovino (BSA) em conjunto com o coquetel Cellic CTec2 para determinar a influência da concentração de proteínas na hidrólise da celulose e hemicelulose. Para tal, diferentes concentrações de BSA (1, 2, 25 e 250 mg de proteína /g de substrato) foram adicionados ao tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e 0,01% de azida sódica e as amostras foram condicionadas por 24 h antes da adição das celulases, com a finalidade de bloquear os sítios de adsorção improdutiva na lignina. Todos os experimentos foram realizados com o preparado comercial Cellic CTec2 a uma carga fixa de 10 FPU/ g substrato.

5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.5.1 Determinação da composição química dos substratos

As amostras, secas ao ar, foram hidrolisadas com ácido para caracterização química (FERRAZ *et al.*, 2000). As amostras foram hidrolisadas com ácido sulfúrico 72% (p / p) a 30°C por 60 minutos (300 mg de amostra e 3 mL de ácido sulfúrico). Posteriormente foram adicionados 79 mL de água e a mistura foi autoclavada a 121°C / 1 atm por 60 minutos. A mistura autoclavada foi filtrada em filtros de vidro sinterizado de porosidade número 3 (previamente secos em estufa a 105°C por 1 hora e meia, e pesados). O material retido foi lavado, com 2 porções de 5 mL de água, e seco em estufa a 100°C até que atingisse massa constante para determinação gravimétrica de lignina insolúvel. O filtrado foi avolumado para 200 mL e uma fração analisada em espectrofotômetro UV-visível a 205 nm para determinação de lignina solúvel (considerando a absortividade da lignina solúvel igual a 105 $L.g^{-1}.cm^{-1}$). A fração solúvel foi ainda filtrada em SepPack C18 e a determinação do teor de açúcares monoméricos e ácido acético foi realizada em HPLC, utilizando-se uma coluna BIORAD AMINEX HPX – 87H, com H₂SO₄ 5 mM a 0,6 mL/min como eluente e detecção por índice de refração (Waters, modelo 2414) a uma temperatura controlada de 35°C.

5.5.2 Determinação de ácidos hidroxicinâmicos

O teor de ácidos fenólicos ou hidroxicinâmicos totais (ácido p-cumárico e ácido ferúlico) do bagaço biotratado foi determinado. A reação foi realizada com 200 mg de massa seca (m.s.) da amostra, 16 ml de NaOH 4 mol L⁻¹ e 2 mg de antraquinona em reatores (100 ml) de aço inoxidável por 2 horas a 170°C. A mistura obtida foi resfriada, acidificada com HCl 6 mol L⁻¹ até atingir pH 2, e o volume foi ajustado para 100 ml com água destilada. A solução foi estocada a 4°C por 16 horas e posteriormente filtrada em membrana de nitrocelulose de 0,45 μ m (GRABBER *et al.*, 2000). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Para quantificação dos ácidos hidroxicinâmicos, as amostras foram analisadas em cromatografia AKTA (GE) utilizando uma coluna Hypersil (Thermo-Scientific), com uma fase móvel composta por acetonitrila: água (1:4) e 1% de ácido acético. O fluxo utilizado foi de 0,8 ml/min e os ácidos hidroxicinâmicos foram detectados por detector UV empregando um comprimento de onda de 315 nm.

5.5.3 Determinação de atividades enzimáticas

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

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

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

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

$$CMCase = \frac{0,185}{\text{Concentração de enzima para a liberação de 0,5 mg de AR}} (UI/ml)$$
(1)

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

Atividade de Celobiohidrolases (Avicelase) foi determinada seguindo a técnica descrita por Wood & Bhat (1988) que consiste em conduzir a hidrólise de uma suspensão de celulose microcristalina (Avicel) com o extrato enzimático. A quantidade de açúcares redutores formada foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959). Um volume de 0,5 mL de Cellic CTec2 foi misturado com 0,5 mL de suspensão de Avicel 1,0% (Fluka Biochemika 11365), em tampão acetato de sódio pH 4,8. Essa reação foi incubada a 50°C durante os tempos de 30, 45, e 60 minutos, sendo interrompida com a adição de 1,5 mL de DNS. Uma amostra controle de reação para cada tempo foi feita com 0,5 mL de tampão misturado com 0,5 mL de suspensão de Avicel, para determinar a concentração de açúcares redutores existente na mistura contendo somente Avicel. Após a adição de DNS as amostras foram fervidas e centrifugadas por 5 minutos a 15000 g. As absorbâncias do sobrenadante foram lidas a 540 µm e um gráfico foi construído com os teores de açúcares redutores versus tempo de reação. O teor de açúcares redutores foi determinado contra curva de calibração de glicose.

<u>A atividade de endo-1,4- β -glucanase (CMCase)</u> foi medida a partir da conversão de carboximetilcelulose (CMC) em oligossacarídeos com maior número de extremidades redutoras, seguindo a metodologia proposta por Ghose (1987), que emprega uma conversão fixa de 2% do substrato em 30 minutos de reação. A carboximetilcelulose empregada foi de média viscosidade e grau de substituição 0,7 (SIGMA C5013).

Na determinação da atividade, diluições seriadas foram preparadas a partir do coquetel Cellic CTec2, sendo que duas dessas diluições proporcionaram a formação de açúcares redutores acima e abaixo de 0,5 mg. A mistura reacional consistia em: 0,5 mL de solução de carboximetilcelulose 2% (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8, e 0,5 mL de extrato enzimático. A reação foi condicionada em banho a 50°C por 30 minutos. Após esse tempo, a reação foi interrompida com a adição de 3,0 mL de DNS, seguindo-se de fervura da mistura 74 por 5 minutos. Os controles da reação consistiram em amostra onde o reagente de DNS foi adicionado antes do extrato enzimático. Foi adicionado então 20 mL de água destilada e a mistura agitada para obtenção de uma solução homogênea. A leitura da absorbância foi feita a 540 nm.

Os valores de absorbância foram convertidos em massa de açúcares redutores através da curva de calibração baseada em glicose e os dados obtidos usados para construir um gráfico relacionando as diluições da enzima com a quantidade de açúcar redutor formado. A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que proporcionaria a formação de 0,5 mg de açúcares redutores. O valor de 0,185 foi dividido

por esse valor de diluição e o resultado obtido foi definido como atividade de CMCase em UI.mL⁻¹ (equação 2).

$$CMCase = \frac{0.185}{\text{Concentração de enzima para a liberação de 0,5 mg de AR}} (UI/ml^{-1})$$
(2)

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

<u>A atividade de β - xilosidase</u> descrita por Tan, Mayers e Saddler (1987) é similar ao modo de determinação mencionando para β –glicosidase, mudando apenas o substrato de ação enzimática, que passa a ser 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX) (SIGMA).

<u>A atividade α -L-arabinofuranosidase</u> foi determinada utilizando p-nitrofenil- α -Lrabinofuranosideo (pNPA). O método consiste em acompanhar a reação de 90 µL de pNPA (5mM, preparado em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8), com 10 µL das enzimas (CTec 2, α - arabinofuranosidase e β -xilosidase) a 50°C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 100 uL de bicarbonato de sódio 10 %. O ensaio controle foi realizado com a adição do bicarbonato de sódio antes da enzima. O p-nitrofenol liberado pela a ação das enzimas foi determinado pela leitura de absorbância a 410 nm (TAN; MAYERS; SADDLER, 1987), os valores foram convertidos com curva analítica (5 a 25 µmol/mL).

<u>A atividade de xilanase</u> foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Bailey, Biely e Poutanen (1992). Um volume de 0,1 mL de Cellic CTec2 foi adicionado a, 0,9 mL de solução de xilana de birchwood 1,0% (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5, sendo a mistura incubada a 50°C durante diferentes tempos para obtenção da cinética de reação. A reação foi finalizada pela adição de 1,5 mL de DNS e os tubos foram fervidos por 5 minutos. O controle foi feito adicionando o DNS antes do extrato enzimático. A leitura da absorbância da mistura reacional foi realizada a 540 ηm e os valores obtidos convertidos em concentração de xilose através da curva de calibração de xilose.

5.5.4 Determinação de proteínas

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

- Reagente A: 20 g de Na₂CO₃ e 4 g de NaOH, dissolvidos em água destilada até atingir o volume final de 1000 mL;

Reagente B1: 1 g de CuSO₄.5H₂O dissolvido em água destilada, volume final 100 mL;

- Reagente B2: 2 g de tartarato de sódio e potássio dissolvido em água destilada, volume final 100 mL;

- Reagente C: misturaram-se 1 mL do reagente B1, 1 mL do reagente B2 e 100 mL do reagente A, nessa ordem.

- Reagente Fenol (1 N) foi preparado a partir da diluição (1:2) do reagente Folin Ciocalteou (SIGMA).

Primeiramente, foram misturados 1,0 mL de complexo enzimático (Cellic CTec2) a 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para precipitação das proteínas. A mistura foi mantida a 4°C por 60 minutos. Após esse tempo, a mistura foi centrifugada por 30 minutos a 3.400 g e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspendido em 1 mL de Reagente A. Um volume de 0,5 mL dessa solução foi misturado à 5 mL do Reagente C. Depois de 10 minutos, adicionou-se 0,5 mL do Reagente de Fenol, seguida de agitação vigorosa. Após 30 minutos, a leitura foi feita em espectrofotômetro a 750 nm. Uma curva de calibração foi construída a partir de soluções com concentrações conhecidas de Albumina de Soro Bovino (valores entre 0,05 – 1,0 mg. mL⁻¹ de BSA) que foram submetidas ao mesmo procedimento descrito acima, sendo que os valores de absorbância obtidos foram correlacionados com a concentração de proteínas presente nas amostras.

64

6 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

6.1 CARACTERÍSTICAS DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS POR TECNOLOGIAS BRANDAS DE PRÉ TRATAMENTO

Como substratos para a sacarificação enzimática foram utilizados dois bagaços de cana pré-tratados, ambos obtidos por processos de pré tratamentos brandos. Um dos substratos foi obtido utilizando o pré-tratamento quimiotermomecânico com sulfito alcalino empregando cargas baixas de Na₂SO₃ (5%) e de NaOH 2,5% (expressos com base na massa de bagaço seco) (LAURITO FRIEND et al., 2015). O segundo substrato foi obtido pelo método de pré-tratamento biológico, conforme metodologia descrita por Machado e Ferraz (2017). Foi utilizado para tal, a espécie de fungo degradador de madeira Ceriporiopsis subvermispora, com padrão de degradação branca, obtida junto ao Forest Products Laboratory (Madison, WI, EUA) e catalogada sob o número SS-3 (AKHTAR et al., 1998). A determinação da composição química dos substratos foi realizada conforme metodologia descrita por FERRAZ et al., (2000). O rendimento de sólidos pré-tratados, a composição química das amostras e o balanço de massas para cada um dos componentes dos bagaços de cana-de-açúcar estão descritos na Tabela 5. Ambos os pré-tratamentos descritos visa remover parcialmente a lignina e a hemicelulose do material de modo a aumentar a acessibilidade das enzimas hidrolíticas à celulose. Em relação ao pré-tratamento sulfito alcalino, a remoção de lignina e hemicelulose alcançou 26% e 20%, respectivamente. O prétratamento também promoveu a remoção de 31% dos grupos arabinosil e 92% dos grupos acetila presentes na hemicelulose. Outra característica de suma importância observada é a baixa degradação da celulose, sendo que a perda de celulose verificada foi de apenas 6%. Conforme demonstrado por Mendes et al. (2011), o pré-tratamento em questão promove a sulfonação da lignina facilitando a sua dissolução e a consequente deslignificação do material pré-tratado. Além disso, a presença de álcali acarreta dissolução parcial de hemicelulose.

Para o bagaço biotratado com *C. subvermispora*, o balanço de massa indica percentuais elevados de remoção de lignina e hemicelulose (55% e 45% respectivamente), contudo a remoção dos grupos substituintes arabinosil e acetil pelo biotratamento foram menores comparados com o bagaço sulfito alcalino (59% e 48% respectivamente), demonstrando a ocorrência de uma xilana residual parcialmente substituída nesse material.

Comparando ambos os substratos, é notável uma maior remoção de xilana e lignina no bagaço pré tratado com *C. subvermispora*. No entanto, também foi observada perda expressiva de glucana (17%) o que não ocorreu no processo de pré-tratamento com sulfito alcalino. As diferenças nas perdas de glucanas pode estar associada com o consumo da glucana de mais fácil acesso pelo fungo durante o metabolismo degradativo da lignina (SUN *et al.*, 2011; WAN; LI, 2012). Contudo, com base na composição química dos materiais prétratados demonstrados na Tabela 5, é possível antecipar que ambos os substratos devem apresentar recalcitrância considerável frente a hidrólise enzimática, visto que as remoções de lignina e hemicelulose foram parciais. De fato, um dos objetivos do presente trabalho é avaliar quanto é possível avançar nas misturas de enzimas para se conseguir hidrolisar substratos ainda recalcitrantes, decorrentes do emprego de processos brandos de prétratamento.

Os dois substratos mencionados anteriormente também foram submetidos a um processo de pós-tratamento com ácido diluído que visou remover a hemicelulose ainda residual de forma seletiva. A composição química dos materiais gerados também está indicada na Tabela 5, porém estes resultados estão discutidos no item 6.3.2.

Tabela 5 - Composição química, características estruturais da hemicelulose e balanço de massa para remoção de componentes associados a pré-tratamentos brandos do bagaço de cana-de-*açúcar*.

Amostras de bagaços de cana in natura (original) e pré-tratadas		Composição da amostra (g/100g de amostra)				Rend de sólidos (%)	Balanço de massas de componentes (g/100g de bagaço sulfito alcalino)				
	Glucana		Hemicelulose		Lignina	-	Glucana		Hemicelulose		Lignina
		Xilana	Arabinosil	Acetil	-			Xilana	Arabinosil	Acetil	_
In natura Sulfito alcalino	42 ± 2	21.4 ± 0.6	1.9 ± 0.2	2.7 ± 0.2	24.0 ± 0.1	100	42.0	21.4	1.9	2.7	24.0
In natura Biológico (**)	40.5 ± 0.4	21.9 ± 0.2	1.7 ± 0.1	3.1 ± 0.4	20.7 ± 0.8	100	40.5	21.9	1.7	3.1	20.7
Sulfito alcalino (SA)	45.8 ± 0.2	20.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	0.2 ± 0.1	21.2 ± 0.4	83.2	38.1	17.1	1.3	0.2	17.6
SA + ácido diluído (5%)	58 ± 2	11.9 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.1	25.0 ± 0.3	61.6	35.9	7.3	0.2	0.2	15.4
Biológico (B) (**)	51.5 ± 0.4	17.4 ± 0.2	1.0 ± 0.1	2.4 ± 0.1	15.9 ± 0.4	67.9	35.0	11.8	0.7	1.6	10.8
B + ácido diluído (5%)	55 ± 1	11.6 ± 0.6	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	19.8 ± 0.3	51.9	28.8	6.0	0.1	0.2	10.3
			Razão	molar			Componentes removidos após pré-tratamento (%				nto (%)
			Ara/Xil	Ace/Xil	-		Glucana	icana Hemicelulose			Lignina
								Xilana	Arabinosil	Acetil	-
Sulfito alcalino (SA)			0.08	0.03			6	22	22	95	15
SA + ácido diluído (5%)			0.03	0.08			11	67	89	94	26
Biológico (B) (**)			0.06	0.42			17	45	64	40	55
B + ácido diluído (5%)			0.02	0.08			31	72	95	94	57

Fonte: Arquivo próprio

6.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS PRESENTES NO COMPLEXO COMERCIAL CELLIC CTEC2

A caracterização das atividades de celulases e hemicelulases presentes no coquetel enzimático Cellic CTec2 foi realizada para uma melhor compreensão da composição de enzimas nos experimentos de hidrólise dos bagaços de cana pré-tratados e os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 6.

Tabela 6 - Atividades enzimáticas e conteúdo de proteína da enzima comercial Cellic CTec 2.

Proteína	FPAse	β-gli	CMcase	CBH	Xil	β-xilo	α-arab
(mg/mL)	(UI. mL ⁻¹)	(UI. mg ⁻¹)					
191±2	131±4	55,4 ±0,1	20,2±0,2	1,7±0,4	77,6±0,1	0,26±0,1	0,36±0,6

 β -Gli, CMcase, CBH, Xil, β -xil e α -arab referem-se as atividades (UI. mg⁻¹de proteína) das enzimas β -glicosidases, endoglucanases, celobiohidrolases, xilanases, β -xilosidases e α -arabinofuranosidases, respectivamente.

Fonte: Arquivo próprio.

As atividades hidrolíticas presentes nos ensaios de hidrólise dos substratos em estudo realizados com 3 cargas iniciais de enzimas fixadas com base na atividade total em papel de filtro (FPU) estão indicadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Atividades de enzimas hidrolíticas presentes no meio reacional preparado a partir do complexo comercial Cellic CTec2 e expressos em atividade enzimática por g de substrato lignocelulósico.

Carga enzimática (FPU/g de substrato)	Proteína (mg. g ⁻¹)	β-gli (UI. g ⁻¹)	CMcase (UI. g ⁻¹)	CBH (UI. g ⁻¹)	β-xilo (UI. g ⁻¹)	Xil (UI. g ⁻¹)	α-arab (UI. g ⁻¹)
5	7,5	415	151,5	12,5	2	583	2,7
10	15	830	303	25	4	1164	5,4
20	30	1660	606	50	8	2328	10,8

 β -Gli, CMcase, CBH, Xil, β -xil e α -arab referem-se as atividades das enzimas β -glicosidases, endoglucanases, celobiohidrolases, xilanases, β -xilosidases e α -arabinofuranosidases, respectivamente.

Fonte: Arquivo próprio.

Existe uma grande diferença na literatura de metodologias para determinação de atividades enzimáticas, e uma ampla faixa encontrada para as mesmas enzimas, sendo que para o complexo Cellic CTec2 são reportadas atividades de celulase total (FPAse) variando de 120 a 230 FPU/mL (YANG *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2015).

Os dados obtidos na Tabela 6 foram similares ao reportado Sun *et al.* (2015) onde os autores obtiveram celulases totais de 137 FPU/ml e concentração de proteína de 193 mg/ml.

Está relatado na literatura que o complexo enzimático Cellic CTec2 também apresenta uma alta atividade de xilanases e β -glicosidase, característica que faz com que sua utilização seja importante para a hidrólise da hemicelulose e para minimizar a inibição da celobiohidrolase pelo acúmulo de celobiose (DA SILVA *et al.*, 2016). O complexo Cellic CTec2 demonstrou atividade específica da xilanase seis vezes maior do que o reportado para o complexo *T. reesei* Celluclast (SUN *et al.*, 2015; BERLIN *et al.*, 2007). Todavia, baixa atividade de β -xilosidase (0,28 U mg⁻¹) (SUN *et al.*, 2015) e α -L-arabinofuranosidase (0,18 Umg⁻¹) (ALVIRA; NEGRO; BALLESTEROS, 2011) também foram relatadas para esse coquetel enzimático.

6.3 PERFORMANCE DO COQUETEL COMERCIAL CELLIC CTEC2 NA HIDRÓLISE DOS BAGAÇOS DE CANA PRÉ-TRATADOS EM CONDIÇÕES BRANDAS

A digestibilidade de substratos lignocelulósicos pode ser avaliada medindo rendimentos de hidrólise de celulose e hemicelulose utilizando diferentes cargas enzimáticas. Essa abordagem experimental foi utilizada para verificar a acessibilidade da celulose dos bagaços submetidos a dois diferentes pré-tratamentos em condições brandas. A Figura 16 apresenta a conversão de celulose em glicose e hemicelulose em xilose e arabinose durante a hidrólise enzimática dos bagaços pré tratados com sulfito alcalino e com fungo de decomposição branca *C. subvermispora*, empregando três cargas enzimáticas de Cellic CTec2: carga alta (20 FPU/g de substrato); carga média (10 FPU/g de substrato) e carga baixa (5 FPU/g de substrato) em um tempo total de reação de 72h. Os valores de eficiência de conversão dos polissacarídeos, e as velocidades iniciais de hidrólise verificadas para às três cargas enzimáticas estão compiladas na Tabela 8.

Figura 16 - Conversão de celulose em glicose, hemicelulose em xilose e arabinose do bagaço sulfito alcalino (números I, II e III respectivamente) e *C. subvermispora* (números IV, V e VI respectivamente) empregando diferentes cargas de Cellic CTec2 (5, 10 e 20 FPU/g de substrato.



Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 8 - Hidrólise enzimática dos bagaços de cana pré-tratados com sulfito alcalino e *C. subvermispora*. Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação para o coquetel comercial Cellic CTec2.

Sulfito alcalino								
Carga enzimática (FPU/g de substrato)	Conversão	em glicose	Conversão) em xilose	Conversão em arabinose			
	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)		
5	3,5±0,3	38±1,5	2,0±0,2	37±1,3	1,5±0,3	24±0,3		
10	4,0±0,4	42±1,6	3,0±0,3	43±1,2	2,4±0,2	31±0,9		
20	6,0±0,3	47±1,2	5,0±0,2	50±1,9	3,8±0,1	38±0,5		

C. subvermispora

Carga enzimática	Conversão em glicose		Conversão	o em xilose	conversão em arabinose	
(FPU/g de substrato)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)
5	3,0±0,1	36±1,7	2,5±0,2	22±1,4	2,4±0,4	15±0,4
10	4,5±0,3	37±0,4	3,5±0,3	23±0,5	2,5±0,2	16±0,3
20	6,7±0,5	43±2,0	4,8±0,3	28±0,6	2,3±0,3	16±0,9

Fonte: Arquivo próprio.

Os resultados indicados na Figura 16 demonstram que os maiores níveis de sacarificação tanto de celulose em glicose quanto da hemicelulose em xilose e arabinose foram alcançados empregando carga enzimática de 20 FPU, com base no tempo máximo de hidrólise de 72h (Tabela 8). Porém, com a redução da carga enzimática de 20 FPU para 10 FPU, as conversões dos polissacarídeos não diminuíram proporcionalmente à metade, sendo observado um decréscimo na conversão de glucana de 11 e 14%, e xilana de 14 e 17% para os bagaços pré tratados com sulfito alcalino e *C. subvermispora* respectivamente. Considerando a carga empregada de 5 FPU/g , para o bagaço sulfito alcalino, houve um decréscimo na conversão dos polissacarídeos em relação a cargas maiores, com um declínio
de 20 e 10% na conversão de glucana e 26 e 13% na conversão de xilana em comparação com as cargas enzimáticas de 20 e 10 FPU/g, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado para a arabinose, com uma de queda de 22 e 37% na liberação desse açúcar com a redução progressiva na carga de Cellic CTec2. Para o bagaço pré tratado com *C*. *Subvermispora* rendimentos similares de hidrólises de glucana, xilana e arabinosil foram obtidos para as cargas de 10 e 5 FPU/g de substrato.

Comparando ambos os substratos em estudo, foi verificado que o bagaço pré-tratado por sulfito alcalino apresentou digestibilidade de glucana ligeiramente superior à do bagaço biotratado, mesmo o pré-tratamento biológico sendo mais efetivo na remoção de lignina e xilana (Tabela 5). Uma possível explicação decorre das características estruturais adquiridas pelos substratos após os pré-tratamentos. Em relação ao pré-tratamento sulfito alcalino, a maior digestibilidade dos sólidos pode ser resultado não apenas na remoção de lignina e xilana, mas também devido a menor hidrofobicidade da lignina, ocasionando inchamento da fibra através da retenção de água. Além disso, a ocorrência de lignina sulfonada residual pode promover uma diminuição na adsorção improdutiva das enzimas (SIQUEIRA *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2011).

Em contraste ao descrito anteriormente, onde os níveis de conversão de glucana foram semelhantes em ambos os substratos, a conversão máxima de xilana em xilose da amostra biotratada foi significativamente menor (28%) do que os valores observados para o material pré-tratado com sulfito alcalino (53%). Este resultado interessante sugere que diferentes estruturas de xilanas presentes nos sólidos pré-tratados podem estar afetando sua conversão em xilose pelo coquetel enzimático Cellic CTec2. É descrito que a conversão enzimática de xilana pode ser restringida pela presença de substituintes, tais como grupos acetil, feruloil, arabinosil e glucuronolil (VAN DYK; PLETSCHKE, 2012). As razões molares de arabinosil/xilana (Ara/Xil) foram semelhantes em ambos os substratos, correspondendo a 0,08 e 0,06 para os bagaços sulfito alcalino e biotratado respectivamente (Tabela 5). Em contraste, as razões molares acetil/xilana (Ace/Xil) foram significativamente menores no substrato sulfito alcalino (0,03) comparado com a amostra biotratada (0,42), decorrente de uma desacetilação intensa promovida pelo pré-tratamento químico. Este padrão de desacetilação e de desrramificação da hemicelulose pelo pré-tratamento sulfito alcalino corresponde ao reportado por Mesquita, Ferraz e Aguiar (2016). Por conseguinte, após os pré-tratamentos com sulfito alcalino, a hemicelulose fica menos substituída, sendo mais facilmente hidrolisada, por endoxilanases (VAN DYK; PLETSCHKE, 2012). Com base no exposto, os dados sugerem que alto grau de acetilação de xilana residual na amostra biotratada pode estar associado aos baixos níveis de conversão de xilana em xilose a partir desse substrato.

Outro resultado importante da digestão dos substratos estudados com Cellic CTec2 surge da arabinose liberada a partir da hemicelulose (Figura 15 III e VI). A conversão dos grupos laterais arabinosil em arabinose foi menor que a conversão de xilana em xilose em ambos os substratos, com razões de conversão Ara/Xil inferiores a 1,0 (0,73 e 0,57, para o substrato sulfito alcalino e biotratado, respectivamente). Estes dados sugerem a presença de xilanas residuais enriquecidas em grupos laterais (arabinosil) em ambos os substratos após a hidrólise com o complexo Cellic CTec2.

Dessa forma, considerando que a remoção de xilana durante a hidrólise enzimática é crítica não apenas para produzir monossacarídeos de xilose, mas também para facilitar a hidrólise de glucana, a remoção da hemicelulose desses substratos pode ser uma maneira de melhorar a digestibilidade da celulose em substratos submetidos a pré-tratamentos brandos (VARNAI *et al.*, 2011).

Curiosamente, para o bagaço pré-tratado por C. subvermispora, a hidrólise de glucana obtida foi menor quando comparado com a hidrólise desse substrato com Celluclast 1,5 suplementado com β-glicosidases, no qual a conversão de glucana encontrado foi de 54% (MACHADO; FERRAZ, 2017). O complexo celulolítico Cellic CTec2 foi desenvolvido contendo altos níveis de β-glicosidases, hemicelulases, dentre outras proteínas como LPMOs (Cellic CTec2 – NOVOZYMES, 2010). É relatado que esse preparado comercial apresenta eficiência até 40% maior em relação ao complexo Celluclast 1,5, considerando uma mesma carga enzimática de 10 FPU/g de celulose (RODRIGUES et al., 2015). No entanto, os resultados encontrados no presente trabalho podem estar relacionados com a estrutura da celulose após o pré tratamento com C. subvermispora, que acarreta uma celulose parcialmente oxidada, facilitando a ação das celobiohidrolases sem necessidade da ação oxidativa das LPMOs. As LPMOs são capazes de oxidar ligações glicosídicas auxiliando assim a desconstrução inicial da celulose, o que diminuiu a necessidade de cargas elevadas de celobiohidrolases para uma hidrólise efetiva (VAN DYK; PLETSCHKE, 2012; SUN et al., 2015). Dessa forma, nesse substrato em específico, a menor carga proporcional de celobiohidrolases presente no coquetel Cellic CTec2 devido à presença de LPMOs pode ter configurado em menores rendimentos de hidrólise.

Outro parâmetro importante avaliado em reações de hidrólise é a velocidade inicial, calculada neste trabalho como a conversão em açúcares obtidos nas primeiras quatro horas de reação enzimática (Tabela 8). A velocidade inicial indica uma condição em que a

quantidade de produtos formados ainda não deve ser suficiente para promover inibição das enzimas, de forma que tais enzimas se encontram mais disponíveis no meio reacional para agir na sacarificação do substrato. Tal fato corrobora com os dados de velocidade inicial disposto na Tabela 8, em que os ensaios com maiores cargas enzimáticas acarretaram valores superiores de velocidade inicial. Todavia, esse acréscimo não ocorreu de forma proporcional, visto que a medida que a concentração de enzima foi duas vezes maior, a velocidade inicial não necessariamente aumentou na mesma proporção. Uma possível explicação para tal resultado pode estar relacionada com características dos substratos em estudo. Devido ao elevado teor de hemicelulose e lignina residual destes substratos, deve haver pouca celulose disponível (acessível) para ligação das enzimas, de forma que mesmo com concentrações elevadas de enzimas no meio reacional, ao ocorrer a saturação dos sítios disponíveis para ligação, o excesso de enzimas no meio não é traduzido em maiores taxas de hidrólise.

O comportamento cinético de conversões enzimáticas da celulose e hemicelulose ilustrados na Figura 16 demonstra que independente da carga de Cellic CTec2 empregada, a reação atinge um valor máximo de hidrólise entre 24 e 48 horas, fato provavelmente relacionado com as mudanças na composição do substrato e ao enriquecimento em lignina. Para reforçar os resultados obtidos pode ser citado o trabalho Mendes *et al.* (2011) em que os autores mostraram que a adição de mais enzima após a conversão atingir um patamar não produziu um aumento na conversão de celulose ou hemicelulose, sugerindo que essa queda na eficiência de sacarificação pode ser explicada devido ao material digerido se tornar progressivamente mais recalcitrante.

Para verificar se possíveis efeitos inibitórios por xilo-oligossacarídeos poderia ser um limitante a hidrólise enzimática dos substratos em estudos com Cellic CTec2, os sobrenadantes recuperados após 72 h de hidrólise enzimática (a 10 FPU / g de substrato) foram aquecidos com ácido diluído (5%) para converter quaisquer oligossacarídeos solúveis formados durante a hidrólise em monossacarídeos adicionais. Os dados ilustrados na Figura 17 demonstram percentuais similares de glicose, xilose e arabinose antes e após o tratamento da fração líquida com ácido diluído, sugerindo que nenhum monossacarídeo adicional foi produzido. Portanto, fica evidente que a conversão limitada de glucana e xilana pelo complexo enzimático Cellic CTec2 pode não estar associada ao acúmulo de xilooligossacarídeos solúveis no meio reacional, e a inibição enzimática de celulases e xilanases por xilo-oligossacarídeos não foi um dos fatores limitante da hidrólise. Figura 17 - Conversão de possíveis polissacarídeos adicionais gerados durante a hidrólise dos substratos pré-tratados com sulfito alcalino (A) e *C. subvermispora* (B) com Cellic CTec2, no tempo final de reação (72h).



Fonte: Arquivo próprio.

6.3.2 Remoção seletiva de hemicelulose dos substratos pré-tratados utilizando ácido diluído

Os substratos utilizados no presente estudo apresentam quantidades apreciáveis de hemicelulose residual, sendo este composto um dos obstáculos para o acesso das enzimas celulolíticas à celulose (HU; ARANTES; SADDLER, 2011). Diante disso, o efeito da remoção de hemicelulose na sacarificação do bagaço de cana foi avaliado de modo a obter o máximo de rendimento de hidrólise possível de ser alcançado com a remoção desse componente.

Para a remoção seletiva de frações de hemicelulose nos bagaços de cana, os substratos previamente tratados com sulfito alcalino e *C. subvermispora* foram submetidos a um segundo método de pré-tratamento empregando diferentes concentrações de ácido sulfúrico (2,5 a 15% m/m). A composição química dos bagaços de cana-de-açúcar submetidos a diferentes severidades de pré-tratamento ácido está descrita na Tabela 9 e 10.

Amostra Rendimento		Composição da amostra (g/100g de amostra)			Balanço de massas de componentes (g/100g de bagaço sulfito alcalino)				
	(,0)	Lignina	Hemicelulose	Glucana	Lignina	Hemicelulose	Glucana		
Sulfito alcalino	100	21±0,4	Xilana 20,5±0,1 Arab 1,6±0,1 Acetil 0,2±0,1	48,5±0,2	21,2	Xilana 20,5 Arab 1,6 Acetil 0,2	48,5		
Ácido 5%	74	25±0,3	Xilana 11,9±0,3 Arab 0,2±0,0 Acetil 0,3±0,0	58,3±2,4	21,2±0,2	Xilana 8,8 Arab 0,15 Acetil 0,2	43,5		
Ácido 10%	69	25,5±0,8	Xilana 9,7±0,3 Arab 0,2±0,0 Acetil 0,3±0,0	57,9±1,6	17,6±0,6	Xilana 6,6 Arab 0,1 Acetil 0,2	40,0		
Ácido 15%	66	25,7±0,1	Xilana 8,4 ±0,3 Arab 0,2±0,0 Acetil 0,3±0,0	60,4±2,8	16,9±0,1	Xilana 5,54 Arab 0,1 Acetil 0,2	39,8		

Tabela 9 - Rendimento de sólidos pré-tratados, composição química e balanço de massas para os componentes do bagaço de cana-de-açúcar previamente tratado com sulfito alcalino submetido a um segundo tratamento com ácido sulfúrico diluído.

*Rendimento: g de material pré-tratado /100g de bagaço.

Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 10 - Rendimento de sólidos pré-tratados, composição química e balanço de massas para os componentes do bagaço de cana-de-açúcar biotratado com *C. subvermispora* submetido a um segundo tratamento com ácido sulfúrico diluído.

Amostra	Rendimento	Composição da amostra (g/100g de amostra)			Balanço de massas de componentes (g/100g de bagaço biológico)		
	(,,,,)	Lignina	Hemicelulose	Glucana	Lignina	Hemicelulose	Glucana
C. Subvermispora	100	15,9±0,4	Xilana 17,4±0,2 Arab 1 ±0,1 Acetil 2,4±0,1	51,5±0,4	10,8	Xilana 11,8 Arab 0,7 Acetil 1,7	35,0
Ácido 5%	51,9	19,8±0,3	Xilana 11,6 ±0,6 Arab 0,2 ± 0,1 Acetil 0,3 ±0,1	55±1,0	10,5	Xilana 6 Arab 0,1 Acetil 0,2	28,8
Ácido 10%	48,4	21,5±0,3	Xilana 8,9 ± 0,1 Arab 0,2 ± 0,1 Acetil 0,2±0,1	61,4±0,6	10,4	Xilana 4,3 Arab 0,1 Acetil 0,2	30,2
Ácido 15%	46,4	20,3±0,3	Xilana 6,8±0,5 Arab 0,2±0,0 Acetil 0,2±0,1	60,1±0,5	±	Xilana 3,1 Arab 0,1 Acetil 0,1	27,8

Fonte: Arquivo próprio.

Segundo os dados apresentados na Tabela 9 e 10, é possível observar uma redução considerável nos teores de hemicelulose em todas as amostras submetidas ao tratamento ácido. Para o bagaço sulfito alcalino (Tabela 9), a remoção de hemicelulose alcançou 72,3% utilizando 15% de ácido, seguido do bagaço tratado com 10% (remoção de 67%), e 5% (remoção de 56%). Para o bagaço biotratado (Tabela 10), a solubilização da hemicelulose alcançada foi de 72%, 75% e 82% após tratamento com 5, 10 e 15% de ácido respectivamente. Em relação aos grupos laterais acetil e arabinosil, não foi detectado a presença desses componentes em nenhuma das amostras pré-tratadas com ácido. Os resultados obtidos corroboram com diversos estudos reportados na literatura, onde é demonstrado que o principal efeito provocado por esse método de pré-tratamento é a remoção da hemicelulose presente no material lignocelulósico (BEHERA *et al.*, 2014; GONZALES; SIVAGURUNATHAN; KIM, 2016; SANTOS *et al.*, 2012).

Contrastando com as remoções de hemicelulose, os teores percentuais de lignina e celulose aumentaram nas amostras após o tratamento ácido, comportamento que pode ser relacionado com a remoção significativa da fração hemicelulósica, enriquecendo as amostras pré-tratadas em celulose e lignina. Apesar do enriquecimento percentual de celulose, uma perda deste polissacarídeo foi observada após tratamento ácido, sendo que essa perda variou entre 9 e 17% para o bagaço sulfito alcalino, e 31 a 45% para o bagaço biotratado, aumentando com a severidade do pré-tratamento. Além disso, baixos rendimentos de sólidos (46,4 - 74%) foram obtidos, relacionado principalmente com a remoção de hemicelulose.

No caso da amostra biotratada, mesmo a menor concentração de ácido removeu 31% de glucana, sugerindo que o glucana contida nessa amostra é mais suscetível à hidrólise ácida, provavelmente devido a despolimerização da celulose que ocorre durante a etapa de biodegradação, conforme já demonstrado em culturas de *C. subversmispora* (GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2003).

Com base nos resultados descritos, as amostras pré-tratadas com 5% (m/m) de ácido sulfúrico foram selecionadas para utilização nos ensaios de hidrólise devido ao maior rendimento de sólido obtido, em conjunto com uma menor perda de celulose. A Figura 18 demonstra os valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação.

Os dados obtidos para o bagaço sulfito alcalino (Figura 18 I) demonstram um aumento considerável nos rendimentos de conversão de celulose do bagaço tratado com ácido em relação aos valores determinados para o bagaço tratado apenas com sulfito alcalino. Considerando a conversão máxima atingida em 72 horas de hidrólise, os resultados obtidos demonstram que o aumento no rendimento da sacarificação enzimática não foi afetado pelas diferenças de cargas enzimáticas utilizadas, sendo alcançado aumento de 34% na conversão da celulose em glicose para todas as condições de hidrólise (5, 10 ou 20 FPU/g). Contudo, a velocidade inicial de conversão da celulose foi maior ao se utilizar maiores cargas enzimáticas, devido a maior disponibilidade de enzimas hidrolíticas livres no meio reacional (Tabela 11). Além disso, comparativamente aos dados obtidos para o bagaço submetido apenas ao pré-tratamento sulfito alcalino (Tabela 8), as velocidades iniciais assim como a hidrólise da celulose aumentaram após o tratamento com ácido, provavelmente devido a maior acessibilidade das enzimas hidrolíticas a celulose após a remoção de xilana do substrato.

A hidrólise de xilana residual também foi avaliada no substrato sulfito alcalino submetido ao pré-tratamento ácido (Figura 18 II) demonstrando uma conversão desse componente de 65, 68 e 76% para cargas de 5, 10 e 20 FPU respectivamente. Visto que após o pré-tratamento ácido apenas uma pequena fração desse polissacarídeo encontrava-se presente no substrato para ser hidrolisado, o elevado rendimento de sacarificação da xilana residual também pode estar relacionado a remoção dos grupos laterais acetil e arabinosil, tornando-a mais acessível para ligação de xilanases.

Contrastando com os resultados encontrados para o substrato sulfito alcalino, o substrato biotratado com *C. subsvermispora* apresentou quase a mesma digestibilidade antes e depois do tratamento ácido (Figura 18 III e IV), o que pode ser explicado pela remoção expressiva de celulose (31%) durante a reação em meio ácido, tornando o substrato ainda recalcitrante devido ao provável enriquecimento do material com celulose cristalina e lignina (Tabela 10). Em relação á hidrólise de xilana residual, um ligeiro aumento na hidrólise desse polissacarídeo foi obtido apenas em cargas maiores de enzimas (20 FPU/g), possivelmente correlacionado com o aumento da carga enzimática no meio reacional e a remoção de grupos laterais após o tratamento ácido, tornando a xilana residual menos substituídas, portanto, mais acessível à ação enzimática.

Figura 18 - Conversão de glucana e de xilana do bagaço sulfito alcalino (números I e II, respectivamente) e *C. subvermispora* (números III e IV, respectivamente), antes do tratamento ácido (curva em preto) e após tratamento ácido (curva em vermelho).



Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 11 - Dados de velocidade inicial de reação para a enzima comercial Cellic CTec2 utilizando como substrato bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino e posteriormente com ácido sulfúrico.

Carga	Conversão c	elulose	Conversão xilana		
enzimatica (FPU/g substrato)	Velocidade inicial (%.h ⁻¹)	Após 72h (%)	Velocidade inicial (%.h ⁻¹)	Após 72h (%)	
5	5±0,2	58,3±1,5	4±0,5	65,3±3,0	
10	7±0,5	66,4±1,5	7±0,5	68,5±0,6	
20	10±0,5	71,5±2,5	10±0,4	75,5±3,5	

Fonte: Arquivo próprio.

Carga	Conversão	celulose	Conversão xilana		
enzimatica (FPU/g substrato)	Velocidade inicial (%.h ⁻¹)	Após 72h (%)	Velocidade inicial (%.h ⁻¹)	Após 72h (%)	
5	2,5±0,2	25,0±1,0	2,5±0,1	17,4±1,2	
10	4,5±0,4	31,2±1,0	4,0±0,4	20,2±1,5	
20	6,0±0,4	43,4±1,2	5,5±0,3	32,3±1,0	

Tabela 12 - Dados de velocidade inicial de reação para a enzima comercial Cellic CTec2 utilizando como substrato bagaço de cana pré-tratado com *C. subvermispora* com ácido sulfúrico.

Fonte: Arquivo próprio.

Dessa forma, os resultados apresentados nesta sessão justificam o interesse em avaliar a adição de hemicelulases a coquetéis enzimáticos visto que a remoção de hemicelulose pode afetar positivamente o processo de sacarificação do bagaço de cana. Adicionalmente, a remoção de xilanas pela rota enzimática se mostra vantajosa, pois não acarreta perda expressiva de glucanas conforme é observado pelo tratamento químico com ácido diluído.

6.3.3 Efeito da adição de enzimas acessórias ao extrato comercial Cellic CTec2

As enzimas β -xilosidases, α -L-arabinofuranosidases e endo-xilanases apresentam ação sinérgica na degradação da xilana. As endoxilanases geram oligossacarídeos em que as β-xilosidases atuar, enquanto а atividade desramificadora das podem α-Larabinofuranosidases removem a arabinose ligadas a cadeia central, o que facilita o progresso das endo-xilanases da família 11 e β-xilosidases (SHARMA et al., 2016). Vários trabalhos têm descrito a ação heterosinérgica entre α -arabinofuranosidases e as enzimas β xilosidases e endo-xilanases, que clivam a cadeia principal, melhorando a hidrólise dos substratos (DELABONA et al., 2013; MARTINS et al., 2018; CINTRA et al., 2017; CINTRA et al., 2020).

Com base no exposto, e considerando o perfil de atividade enzimática do complexo Cellic CTec2 referenciado no item 6.2 (alta atividades de xilanases e baixa atividades de β xilosidases e α -arabinofuranosidases), a suplementação do complexo Cellic CTec2 com β xilosidases e α -arabinofuranosidases desponta como uma estratégia promissora de modo a promover a despolimerização efetiva da hemicelulose, visando melhorar a conversão dos polissacarídeos dos bagaços pré-tratados em condições brandas. Além disso, também foi avaliado o efeito da adição de esterases (feruloil esterase e acetil xilana esterase) ao coquetel Cellic CTec 2, e o emprego dessa mistura na hidrólise do substrato biotratado, visto que este pré-tratamento não promoveu a remoção eficiente de ésteres de ácidos hidroxicinâmicos e grupos acetila, também considerados limitantes à hidrólise enzimática da hemicelulose.

Para facilitar a compreensão, os resultados foram divididos da seguinte forma:

- Efeito da adição de β-xilosidase (GH 43) de *Selelomonas ruminantium* ao complexo
 Cellic CTec2 para a hidrólise de substratos pré-tratados em condições brandas;
- Efeito da adição de α-arabinofuranosidase (GH51) de *Aspergillus niger* ao complexo Cellic CTec2 para a hidrólise de substratos pré-tratados em condições brandas;
- Efeito da adição conjunta de β-xilosidases e α-arabinofuranosidase ao complexo Cellic CTec2;
- Efeito da adição de feruloil esterase (CEI) e acetil xilana esterase (CE6) ao coquetel Cellic CTec2 para a hidrólise do bagaço biotratado com fungo de decomposição branca *C. subvermispora*.
- Efeito da adição de albumina do soro bovino (BSA) ao coquetel Cellic CTec2 para avaliação do efeito da concentração de proteínas no meio reacional.

Com o intuito de avaliar o efeito da concentração das enzimas hidrolíticas na sacarificação do bagaço, foram realizados ensaios empregando uma carga fixa de Cellic CTec2 de 10 FPU/g suplementada com as enzimas acessórias em diferentes concentrações: β -xilosidase (1, 3 e 5 mg/g de substrato) e α -arabinofuranosidase (1, 3 e 5 mg/g de substrato).

6.3.3.1 Efeito da adição de β-xilosidase (GH 43) de Selelomonas ruminantium ao complexoCellic CTec2 para a hidrólise de substratos pré-tratados em condições brandas

Os resultados obtidos para a conversão de celulose e hemicelulose após a suplementação do coquetel comercial Cellic CTec2 com β -xilosidase é demonstrado na Figura 19. Os valores de eficiência de conversão da celulose e da hemicelulose, e as velocidades iniciais de hidrólise verificadas estão compiladas na Tabela 13.

Considerando a hipótese de que o aumento nos rendimentos de hidrólise da celulose ou hemicelulose ocorreria em função do aumento da carga proteica no meio reacional ao invés da ação catalítica das enzimas testadas, foram realizados ensaios suplementados com 1 e 2 mg/g de albumina ao complexo comercial Cellic CTec2, e os resultados obtidos serão discutidos separadamente no item 6.3.3.3, demonstrando que o efeito catalítico das enzimas é o mais importante para prover rendimentos otimizados de hidrólise.

Com bases nos dados ilustrados na Figura 19 (I e IV), eficiências equivalentes de sacarificação da celulose foram evidenciadas para todos os ensaios com suplementação de β -xilosidase, sendo que a adição de quaisquer concentrações dessa enzima promoveram o aumento de 16% na conversão de glucana no bagaço sulfito alcalino e 30% na hidrólise de glucana no substrato biotratado, em comparação com os controles. Para o bagaço sulfito alcalino, o mesmo comportamento foi observado nas velocidades iniciais de hidrólise, onde a adição de quantidades mínimas de β -xilosidase (1 mg/g) promoveram um acréscimo de duas vezes nas velocidades de conversão da celulose, o mesmo resultado obtido para as concentrações de 3 e 5 mg/g de enzima (Tabela 13). Curiosamente para o substrato biotratado, a adição β -xilosidase em qualquer carga não impactou em maiores velocidades iniciais de reação, mesmo o que o efeito positivo acerca da adição dessa enzima tenha sido mais pronunciado nesse substrato (Tabela 14).

Comparando as diferentes cargas de β -xilosidase utilizadas, devido aos rendimentos finais similares para às três concentrações testadas em ambos os substratos, fica evidente que a adição de 1 mg/g de β -xilosidade é o suficiente para produzir o efeito máximo acerca da suplementação do coquetel Cellic CTec2 com essa enzima acessória. Outro fator observado foi que as conversões enzimáticas dos polissacarídeos alcançaram um patamar entre 24-48 h de reação independente da carga enzimática utilizada, demonstrando que o aumento nas concentrações das enzimas adicionadas ao coquetel não necessariamente traduz em tempos mais curtos de reação.

Figura 19 - Conversão de celulose em glicose, hemicelulose em xilose e arabinose do bagaço sulfito alcalino (números I, II e III respectivamente) e *C. subvermispora* (números IV, V e VI respectivamente) empregando 10FPU/g de substrato de Cellic CTec2 suplementado com diferentes cargas de β -xilosidases.



Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 13 - Hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino. Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação para a mistura de enzimas comerciais Cellic CTec2 com diferentes cargas de β -xilosidase.

Carga enzimática	Conversão em Glicose		Conversão em Xilose		Conversão em arabinose	
(mg/g substrato)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)
Controle	4,0±0,3	42,3±1,5	2,5±0,3	39,7±1,2	2,5±0,3	31,4,±1,0
1	7,0±0,4	50,1±1,5	6,5±0,3	48,5±2,0	4,0±0,7	38,1±0,8
3	7,0±0,1	50,3±0,5	7,0±0,4	$50,2\pm 0,5$	4,0±0,5	39,3±0,8
5	7,0±0,8	48,6±1,0	6,5±0,4	49,2±1,5	4,5±0,5	40,2±1,5

*Controle: 10FPU Cellic CTec2 sem adição de enzima acessória. Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 14 - Hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com *C. subvermispora*: Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação para a mistura de enzimas comerciais Cellic CTec2 com diferentes cargas de β -xilosidase.

Carga enzimática	Conversão em Glicose		Conversão em Xilose		Conversão em arabinose	
(mg/g substrato)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)
Controle	4,5 ±0,3	37,6±0,4	3,5±0,3	23,1±0,5	2,6±0,3	15,1±0,3
1	5,5±0,2	48,2±1,0	4,8±0,4	30,3±1,0	3,2±0,3	19,2±1,1
3	5,0±0,2	45,3±1,7	4,5±0,2	28,4±1,8	2,5±0,3	18,3±0,3
5	5,2±0,3	47,4±0,6	4,5±0,2	27,5±1,3	3,1±0,1	19,1±0,6

Fonte: Arquivo próprio.

Com bases nos resultados obtidos fica evidente que a suplementação do coquetel Cellic CTec2 com β -xilosidase produz um efeito positivo sobre a sacarificação da celulose e hemicelulose em ambos os bagaços pré-tratados. Um dos possíveis mecanismos que produziu tal efeito pode ser relacionado a ação sinérgica entre xilanases e β -xilosidases. As β -xilosidases são responsáveis por converter xilo-oligossacarídeos liberados pela ação das xilanases em monômeros de xilose, sendo estes xilo-oligossacarídeos reportados como inibidores competitivos de algumas celulases e xilanases.

Conforme apresentado no item 6.3.2, a digestibilidade limitada dos bagaços prétratados empregando Cellic CTec2 não está associada ao acúmulo de xilo-oligossacarídeos solúveis no meio reacional, considerando amostra obtidas em 72 horas de hidrólise. Todavia, não é possível garantir que não houve formação de tais compostos nos tempos iniciais de hidrólise (4-24h), e que estes, mesmo sendo progressivamente hidrolisados no decorrer do tempo, não tenham acometido em prejuízos nos rendimentos finais de sacarificação de glucana e xilana. Dessa forma, a adição de β -xilosidase a formulações enzimáticas pode ser uma abordagem promissora para evitar a inibição por xilo-oligossacarídeos em quaisquer etapas da hidrólise de lignocelulósicos (CARVALHO *et al.*, 2013; MOREIRA; FERREIRA FILHO, 2016).

Zhang e Viikari (2012) avaliaram os efeitos de xilo-oligossacarídeos (XOS) e xilose nas atividades hidrolíticas de endoglucanase (*Thermoascus aurantiacus*), celobiohidrolase CBHI (*T. aurantiacus*), e de celobiohidrolase CBHII (*Trichoderma reesei*). Xilose e xilo-oligossacarídeos de diferentes graus de polimerização foram adicionados a avicel e nanocelulose durante a hidrólise enzimática, e após a adição de XOS, foi observado uma diminuição na quantidade de celobiose formada pela ação de CBHI (0,78 e 1,37 mg/mL para 0,59 e 1,23 mg/mL para avicel e nanocelulose respectivamente). Em relação à ação hidrolítica de CBHII, observou-se que o conteúdo de celobiose liberado por essa enzima foi reduzido pela metade após a adição de XOS. Os resultados revelaram que a forte inibição da celulase por XOS pode ser atribuída ao inibidor efeito de XOS sobre as enzimas celobiohidrolases. Os resultados indicam a necessidade de hidrolisar totalmente xilo-oligossacarídeos para obter uma melhor eficiência na hidrólise da celulose.

A ação sequencial da β -xilosidase sobre os xilo-oligossacarídeos gerados a partir da ação da xilanase, é essencial para aumentar a eficiência de hidrólise da xilana, visto que esses oligossacarídeos podem inibir a atividade da xilanase, caracterizando uma inibição por produto. Diversos estudos demonstram que a inibição da xilanase por xilo-oligossacarídeos é uma etapa limitante para a hidrólise de xilana e a β -xilosidase é necessária para gerar xilose como produto final, garantindo a atividade eficiente da xilanase (MARTINS *et al.*, 2018; CHADHA; RAI; MAHAJAN, 2019). Considerando que a hidrólise da xilana também é importante para aumentar a acessibilidade das celulases à celulose, a suplementação de β -xilosidase em misturas enzimáticas comerciais poderia melhorar a liberação de xilose, aprimorando indiretamente a eficiência da hidrólise da celulose.

Apesar de o complexo comercial Cellic CTec2 ser caracterizado por diversos autores como uma mistura enzimática com elevada atividade de xilanases (SUN *et al.*, 2015; ADSUL *et al.*, 2020) os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a eficiência de hidrólise da hemicelulose pode não estar baseada exclusivamente no valor desta atividade enzimática. Esta suposição mostra-se válida, visto que a adição de β -xilosidase acarretou um aumento no rendimento de sacarificação de xilana para todas as concentrações de enzimas utilizadas (Figura 19 II e V) (aumento de 20% para o bagaço sulfito alcalino e 27% para o bagaço biotratado), provavelmente devido ao maior grau de sinergia entre tais enzimas na mistura obtida.

Outro fato observado, foi o aumento em 22% na remoção de arabinosil após adição de β -xilosidade em ambos os bagaços pré-tratados (figura 19 III e VI). A família GH 43 basicamente é composta por enzimas bifuncionais que apresentam atividade β -xilosidase e α -L-arabinofuranosidase, e essa informação pode ser confirmado medindo a atividade dessa enzima em pNP- α -L-Arabinofuranosídeos, no qual foi encontrado atividade específica de 18 UI/mg. Há evidências de que essa bifuncionalidade deve-se principalmente à similaridade espacial entre os resíduos de D-xilopiranose e L-arabinofuranose, de tal forma que as ligações glicosídicas e grupos hidroxila destes resíduos podem ser sobrepostos para ocupar posições semelhantes no sítio ativo da enzima (JORDAN; LI, 2007).

Os resultados obtidos no presente estudo estão em conformidade com vários trabalhos reportados na literatura, que correlacionam maiores taxas de hidrólise de xilana ao suplementar preparado comerciais com hemicelulases, com rendimentos otimizados de sacarificação de glucanas em substratos lignocelulósicos (GAO *et al.*, 2010; ALVIRA; NEGRO; BALLESTERO, 2011; DELABONA *et al.*, 2013; CINTRA *et al.*, 2020). Cintra *et al.* (2017) realizaram a suplementação do coquetel comercial Accellerase 1500 com uma β -xilosidase (GH43) de *Humicola grisea var. Thermoidea* e a aplicação na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor. Foi obtido um aumento de 29% na liberação de glicose a partir desse substrato, o que mostrou a capacidade das β - xilosidase de melhorar indiretamente a digestibilidade de celulose por meio da hidrólise aumentada de xilana.

Outro interessante estudo sobre o efeito positivo de hemicelulases adicionadas a preparados comercias foi publicado por Várnai *et al.* (2011). Os autores avaliaram o impacto da hidrólise de xilana nos rendimentos de conversão da celulose, utilizando madeira macia pré-tratada. Ao realizar a suplementação de coquetéis comerciais com enzimas xilanolíticas e mananolíticas purificadas, foi obtido um aumento de até 25% no rendimento de conversão

da celulose devido à remoção da hemicelulose. Considerando que a celulose e hemiceluloses estão associadas fisicamente, os autores sugeriram que a remoção de hemicelulose acarretou diminuição da recalcitrância do material hidrolisado, tornando o substrato mais acessível à ação das celulases.

6.3.3.2 Efeito da adição de α-arabinofuranosidase (GH51) de *Aspergillus niger* ao complexoCellic CTec2 para a hidrólise de substratos pré-tratados em condições brandas

Os resultados obtidos para a conversão de celulose e hemicelulose após a suplementação do coquetel comercial Cellic CTec2 com α -arabinofuranosidase é demonstrado na Figura 20. Os valores de eficiência de conversão da celulose e hemicelulose, e as velocidades iniciais de hidrólise verificadas para as preparações enzimáticas estão demonstradas na Tabela 15 e 16.

Avaliando as diferentes cargas enzimáticas utilizadas, observa-se que 1 mg/g de α arabinofuranosidase foi o suficiente para se obter o melhor rendimento de hidrólise após a adição dessa enzima ao coquetel Cellic CTec2, promovendo um aumento de 17,5 e 8% na conversão de celulose para o bagaço sulfito alcalino e substrato biotratado respectivamente, em comparação com os controles (Figura 20 I e II). Em relação à hidrólise de hemicelulose, os resultados alcançados foram promissores, demonstrando um acréscimo máximo de açúcares liberados também aplicando cargas mínimas, com um aumento de 24 e 14% no conteúdo de xilose (Figura 20 III e IV) e 35 e 21% na arabinose (Figura 20 V e VI) no hidrolisado obtido após 72h de reação do bagaço sulfito alcalino e substrato biotratado respectivamente.

Comparando as diferentes cargas de enzimas acessórias utilizadas na sacarificação do bagaço sulfito alcalino, foi verificado que o aumento na concentração de α -arabinofuranosidases de 1 mg/g para 5 mg/g, promoveu um ligeiro decréscimo nos rendimentos de hidrólise e velocidades iniciais, sendo observado um declínio de 8, 15 e 8% na conversão de glucana, xilana e arabinosil respectivamente (Tabela 15). Conforme reportado por Van Dyk e Pletschke (2012), o aumento na carga enzimática pode ocasionar em competição entre as enzimas por sítios de ligação, reduzindo a taxa de hidrólise. Dessa forma, uma maior interação proteína – proteína (entre arabinofuranosidases e as demais enzimas xilanolíticas), ou proteína - substrato (entre arabinofuranosidases e a xilana), pode ter se tornado um empecilho para ligação, principalmente de xilanases, ao substrato a ser hidrolisado.

Figura 20 - Conversão de celulose em glicose, hemicelulose em xilose e arabinose do bagaço sulfito alcalino (números I, II e III respectivamente) e *C. subvermispora* (números IV, V e VI respectivamente) empregando 10FPU/g de substrato de Cellic CTec2 suplementado com diferentes cargas α -arabinofuranosidase (mg enzima/ g de substrato).



Fonte: Arquivo próprio.

Carga	Conversão em Glicose		Conversão em Xilose		Conversão em arabinose		
(mg/g substrato)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	
Controle	4,0±0,3	42,2±1,6	2,3±0,3	39,1±1,2	2,4±0,3	31,0±1,0	
1	7,5±0,4	51,3 ± 2,0	4,7±0,4	52,2±1,3	7,8±0,3	49,2±2,3	
3	6,5±0,3	51,4±1,8	5,3±0,3	47,3 ± 2,2	7,2 ± 0,2	46,3±0,1	
5	6,5±0,2	47,0±0,3	6,2±0,4	44,1±0,7	5,8±0,2	45,1±1,4	

Tabela 15 - Hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino. Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação para a mistura de enzimas comerciais Cellic CTec2 com diferentes cargas de α -arabinofuranosidase

*Controle: 10FPU Cellic CTec2 sem adição de enzima acessória Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 16 - Hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com *C. subvermispora*. Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação para a mistura de enzimas comerciais Cellic CTec2 com diferentes cargas de α -arabinofuranosidase.

Carga	Conversão em Glicose		Conversão em Xilose		Conversão em arabinose	
(mg/g substrato)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)
Controle	4,5±0,3	37,2±0,4	3,5±0,3	24,2±0,4	2,5±0,3	15,3±0,3
1	4,6±0,5	40,1±1,0	3,4±0,3	26,2±0,9	3,0±0,1	19,2±1,1
3	4,4±0,1	40,2±1,7	3,2±0,1	26,4±1,7	2,5±0,1	19,1±0,3
5	5,3±0,6	41,0+0,6	3,4±0,5	27,1±1,3	3,1±0,1	19,0±0,6

Fonte: Arquivo próprio.

Diversos fatores podem estar relacionados com o aumento obtido nas conversões dos polissacarídeos nos substratos em estudo após a suplementação de Cellic CTec2 com α -arabinofuranosidase. Uma das possíveis hipóteses a ser considerada é o aumento no grau de sinergia entre as enzimas presentes na mistura. Diversos estudos reportam um aumento na atividade de enzimas xilanolíticas com a remoção de grupos pendentes ligados a cadeia principal de xilana. Essa explicação se apoia no fato de ramificações presentes na cadeia de

xilana consistirem em um impedimento estérico imposto a enzimas hidrolíticas para a despolimerização de glucana e xilana (CARVALHO *et al.*, 2017; CINTRA *et al.*, 2020).

Uma das maiores desvantagens relacionado a aplicação de coquetéis comerciais na hidrólise de lignocelulósicos, advém da falta de informação fornecida pelos fabricantes, quanto as características das enzimas nessas misturas (microrganismo produtor, atividades específicas). Dessa forma, é necessário anterior ao seu uso, estabelecer as atividades enzimáticas e a necessidade da adição de mais enzimas para suplementar as atividades já presentes, de modo a obter combinações otimizadas para hidrolisar substratos específicos (VAN DYK; PLETSCHKE, 2012; SUN et al., 2015). Apesar de constatado alta atividade de xilanases no coquetel Cellic CTec2 (Tabela 6), as proporções entre as diferentes famílias de xilanases com diferentes especificidades não é conhecida. As Xilanases da família 11 tem um grande sítio ativo e preferem clivar cadeias principais sem substituintes, enquanto as xilanases da família 10 tem um sítio ativo menor e são capazes de clivar cadeias principais perto de substituintes (VARDAKOU et al., 2004; YANG et al., 2020). Deste modo a família 10 de xilanases geralmente não requer remoção dos substituintes para agir, porém, a presença de alto conteúdo de GH11 em preparados comerciais, torna imprescindível a ação de enzimas de desramificação a xilana para garantir alto desempenho dessa enzima (VAN DYK; PLETSCHKE, 2012).

Um dos estudos que ressalta o efeito sinérgico entre xilanases e α arabinofuranosidase foram publicados por Zhu *et al.* (2015). Nesse estudo, os autores demonstraram que a adição de α -arabinofuranosidase em enzimas comerciais para hidrólise de palha de trigo acarretou um aumento de 21% no desempenho de xilanases na hidrólise de xilanas, visto que foram removidas moléculas de arabinose, responsáveis por bloquear o acesso das enzimas xilanolíticas às ligações β -1-4-glicosídicas da cadeia principal de xilana.

Outro importante estudo a ser citado a fim elucidar os efeitos positivos da adição de α -arabinofuranosidase a coquetéis comerciais foi realizado por Cintra *et al.* (2020). Os autores utilizaram 3 diferentes enzimas hemicelulolíticas (Xilanase, β -xilosidase e α -arabinofuranosidase), adicionadas ao coquetel acellerase 1500 para a hidrólise do bagaço pré-tratado por explosão a vapor, e observaram por um planejamento experimental que a enzima α -arabinofuranosidase promoveu o efeito mais significativo na sacarificação do substrato em estudo. No entanto, assim como no presente trabalho, um aumento na quantidade de α -arabinofuranosidase durante a hidrólise dos polissacarídeos. Além disso, os autores sugeriram que um dos prováveis mecanismos de ação das α -arabinofuranosidase que

acarreta melhores rendimentos de hidrólise advém do fato que essas enzimas cooperam removendo os sítios de ligação entre lignina-carboidrato. Como tal, α -arabinofuranosidases seriam particularmente importantes porque os resíduos de arabinosil na estrutura da xilana são conhecidos por serem covalentemente ligados ao ácido ferúlico e lignina, sendo parcialmente responsáveis pela formação do complexo lignina-carboidrato. Dessa forma as α -arabinofuranosidase quebram essas ligações, liberando fragmentos de lignina de sua associação com arabinoglucuronoxilanos, facilitando a ação de outras enzimas como as xilanases.

6.3.3.3 Efeito da adição conjunta de β -xilosidases e α -arabinofuranosidase

Com base nos resultados anteriormente apresentados, visto que a adição individual de quantidades mínimas de β -xilosidases (1 mg/g) e de α -arabinofuranosidase (1 mg/g) ao complexo comercial Cellic CTec2 acarretou maiores rendimentos de hidrólise de celulose e hemicelulose em ambos os substratos estudados, foram realizados ensaios suplementando o coquetel Cellic CTec2 com ambas as enzimas acessórias (perfazendo um total de 2 mg de proteínas), de modo a avaliar se a adição conjunta proveria rendimentos ainda maiores de sacarificação. Além disso, para verificar se haveria uma melhora no rendimento de hidrólise da celulose em função do aumento de carga proteica no meio reacional, ou devido a maior atividade catalítica das enzimas testadas, foi feito ensaios com complexo comercial Cellic CTec2 suplementado com 1 e 2 mg/g de albumina.

Os resultados obtidos para a conversão de celulose e hemicelulose após a suplementação do coquetel comercial Cellic CTec2 com ambas as enzimas α -arabinofuranosidase e β -xilosidase individualmente, em conjunto e albumina é demonstrado na Figura 21. Os valores de eficiência de conversão da celulose e hemicelulose, e as velocidades iniciais de hidrólise verificadas estão sumarizadas na Tabela 17 e 18.

Figura 21 - Conversão de celulose em glicose, hemicelulose em xilose e arabinose do bagaço sulfito alcalino (números I, II e III respectivamente) e *C. subvermispora* (números IV, V e VI respectivamente) empregando 10FPU/g de substrato de Cellic CTec2 suplementado com 1mg/g de α -arabinofuranosidase (α -arab), 1 mg/g de β -xilosidase (β -xilo) e enzimas em conjunto (1 mg/g α -arab + 1 mg/g β - xilo). Barras cinza indicam experimentos de hidrólise dos controles realizados com Cellic CTec2 sozinho e corrigido com albumina a 1 e 2 mg / g de substrato, respectivamente. Letras diferentes indicam que os valores médios diferem no nível de confiança de 0,05.



Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 17 - Hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino. Valore
de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados d
velocidade inicial de reação para a mistura de enzimas comerciais Cellic CTec
suplementado com β -xilosidase e α -arabinofuranosidase.

	Conversão em Glicose		Conversão em Xilose		Conversão em arabinose	
Ensaio	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)
Controle	3,7±0,3	42,2±1,6	2,3±0,3	39,2±1,2	2,4±0,3	31,1±0,9
Albumina 1 mg/g	4,5±0,5	41,0 ±2,2	4,15±0,5	42,3±2,2	4,3±0,5	28,3±1,6
Albumina 2 mg/g	7,8±0,2	46,3±0,5	9,6±0,3	41,1±0,5	9,3±0,4	30,5±0,8
Conjunto 2 mg/g	7,1±0,4	46,1±1,3	6,7±0,3	43,3±1,8	8,3±0,5	45,2±2,0

*Controle: 10FPU Cellic CTec2 sem adição de enzima acessória

*2 mg/g de substrato: 1mg/g de β -xilosidase + 1 mg/g de α -arabinofuranosidase.

Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 18 - Hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com *C. subvermispora*. Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação para a mistura de enzimas comerciais Cellic CTec2 suplementado com β -xilosidase e α -arabinofuranosidase.

	Conversão em Glicose		Conve Xi	ersão em ilose	Conversão em arabinose	
Ensaio	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)
Controle	4,5±0,3	37,2±0,4	3,5±0,3	24,0±0,4	2,5±0,3	15,2±0,3
Albumina 1 mg/g	3,0±0,1	37,3±1,5	2,7±0,2	22,2 ± 0,1	3,0±0,5	16,3±1,4
Albumina 2 mg/g	3,8±0,6	37,1±1,3	3,3±0,2	24,3±0,4	2,1±0,3	17,3±0,4
Conjunto 2 mg/g	5,2±0,6	44,3±1,2	4,6±0,4	31,4±1,2	3,3±0,4	21,1±0,5

Fonte: Arquivo próprio.

A suplementação do coquetel comercial Cellic CTec2 com albumina foi realizada objetivando avaliar o efeito de proteínas no meio reacional. Considerando a presença de quantidades elevadas de lignina nos substratos em estudo, uma das possíveis hipótese a ser investigada relaciona com o bloqueio dos sítios de adsorção da lignina pela adição de mais

proteínas no meio, diminuindo adsorções improdutivas de celulases e aumentando a hidrólise desse polímero nos substratos. Comparando às duas concentrações de albumina utilizadas, observou-se que a adição de 1 e 2 mg/g ao complexo Cellic CTec2 não afetou a hidrólise de celulose e hemicelulose em nenhum dos substratos estudados. Os dados obtidos sugerem que a maior liberação de açúcares a partir dos substratos foi resultado da ação catalítica das enzimas testadas ao invés de apenas maiores concentrações de proteínas adicionadas ao meio reacional.

Analisando os dados obtidos para o bagaço sulfito alcalino, observou-se que a adição das enzimas em conjunto acarretou um ligeiro aumento de 9% na liberação de glicose, 10% em xilose e 31% em arabinose, no tempo final de reação de 72h quando comparado com os ensaios controle (apenas Cellic CTec2) (Figura 21 A e B). No entanto, comparativamente com a adição individual tanto de α -arabinofuranosidases quanto β -xilosidases, houve um decréscimo de 10% na digestibilidade de glucana nesse substrato, acompanhado também de redução da hidrólise em xilose e arabinose. Considerando o fato que múltiplas atividades enzimáticas podem ser menos efetivas na hidrólise de substratos lignocelulósicos devido à competição entre as enzimas por sítios de ligação, a bifuncionalidade das enzimas GH 43 deve ser considerada, pois, isso pode resultar em enzimas competindo pelos mesmos sítios de ligações devido a uma sobreposição de funções (VAN DYK; PLETSCHKE., 2012). Para exemplificar essa suposição podemos citar o estudo de Boisset et al. (2001), em que os autores avaliaram a sinergia entre duas celobiohidrolases e uma endoglucanase. Uma das celobiohidrolases também exibiu alguma atividade de endoglucanase e quando esta celobiohidrolase foi usada em conjunto com a endoglucanase, a atividade foi afetada e a sinergia foi menor. Eles concluíram ser resultado da ação competitiva das duas enzimas nos mesmos locais de ação.

Para o bagaço biotratado, é notável um melhor desempenho da ação aditiva de β xilosidade no coquetel Cellic CTec2, quando esta é aplicada individualmente, promovendo conversões de glucana de 48%, comparado a ação conjunta das enzimas (44%) ou a ação individual da α -arabinofuranosidase (40%). Em relação à hidrólise de xilose e arabinosil desempenhos similares foram observados utilizando β - xilosidase individualmente ou em conjunto com α -arabinofuranosidase.

Estudos reportados na literatura, demonstram que a adição simultânea de diferentes enzimas em preparados comerciais, não traduz necessariamente em maiores graus de sinergia dessas enzimas no meio reacional (GOLDBECK *et al.*, 2016; BUSSAMRA *et al.*, 2015). Além disso, variadas atividades hemicelulolíticas adicionadas a coquetéis

enzimáticos pode aumentar a produção de xilo-oligossacarídeos, acarretando inibição por produto. Nesse sentido pode ser citado o trabalho desenvolvido por Goldbeck *et al.* (2014) onde os autores realizaram o estudo dos efeitos combinatórios de cinco enzimas hemicelulolíticas (GH11, GH54, GH10, GH51 e GH43) na hidrólise do bagaço de cana prétratado com ácido acético glacial e peróxido de hidrogênio. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que a adição conjunta de endo-1,4-xilanase GH11, β - xilosidase GH43 e α - 1 -arabinofuranosidase GH51 na hidrólise do bagaço pré-tratado foi a condição que mais favoreceu a produção de xilo-oligossacarídeos (xilobiose e xilotriose).

Dessa forma, conforme os resultados obtidos, fica evidente que para ambos os substratos, foi possível melhorar a hidrólise de celulose e hemicelulose com a adição α arabinofuranosidase e β -xilosidade individualmente, em relação ao controle usando apenas
Cellic CTec2. No entanto, a utilização de Cellic CTec2 suplementado com enzimas
acessórias em conjunto não demonstrou efeito aditivo ou sinérgico, atingindo rendimentos
de sacarificação similares ou inferiores ao obtido com a ação individual das enzimas,
descartando a possibilidade de que para melhorar a digestibilidade dos substratos em estudo,
é necessário a adição de diferentes atividades enzimáticas ao coquetel comercial Cellic
CTec2 simultaneamente.

6.3.3.4 Efeito da adição de feruloil esterase *Clostridium thermocellum* (CE1) e acetil xilana esterase *Orpinomyces* sp. (CE6) ao coquetel Cellic CTec2 para a hidrólise do bagaço biotratado com fungo de decomposição branca *C. subvermispora*

O grau de substituição de xilanas também é indicado como um limitante a hidrólise enzimática desse componente, pois representam um impedimento estérico a ação das enzimas hidrolíticas (BIELY *et al.*, 2012; SISTA KAMESHWAR; QIN, 2018). Nesse sentido, é desejado que o pré-tratamento modifique a hemicelulose de forma a facilitar sua despolimerização. Tem sido reportado que pré-tratamento sulfito alcalino consegue saponificar o substituinte acetil do bagaço de cana-de-açúcar, e manter o substituinte arabinosil. Como os ácidos ferúlicos estão ligados à arabinose através de um radical acila, estes também são quebrados em álcali, tornando a solubilidade da arabinoxilana dependente somente das arabinoses que ramificam o polímero (MENDES *et al.*, 2011; MESQUITA, AGUIAR; FERRAZ, 2016; PUCHART; KROGH; BIELY, 2019). Em contrapartida, o biotratamento ainda mantém quantidades apreciáveis desses substituintes (Tabela 19), de forma que a suplementação de preparados comerciais com atividades complementares para

a remoção dos grupos acetil e feruloil da xilana pode ser uma estratégia eficaz para promover maiores rendimentos de hidrólise desse polissacarídeo.

Com base no exposto, foi realizado a suplementação do coquetel Cellic CTec2 com enzimas atuantes em grupos pendentes ligados a cadeia de xilana, como o ácido ferúlico e grupos acetila. Os resultados obtidos para a conversão de celulose e hemicelulose após a suplementação do coquetel comercial Cellic CTec2 com feruloil esterases e acetil xilana esterase é demonstrado na Figura 21. Os valores de eficiência de conversão da celulose e hemicelulose, e as velocidades iniciais de hidrólise verificadas para as preparações enzimáticas estão demonstradas na Tabela 20.

Tabela 19 - Composição de grupos acetil e ácidos hidroxicinâmicos do bagaço biotratado com *C. subvermispora*

Composição do bagaço biotratado	Grupos acetila (%)	Ácido ferúlico (%)	Ácido cumárico (%)	Total de ácido hidroxicinâmicos (%)
(g/100g de amostra)	$3,1 \pm 0.4$	0,9±0,1	3,2±0,4	4,0±0,5
	•			

Fonte: Arquivo próprio.

Os resultados ilustrados na Figura 22 demonstram o potencial de ambas as enzimas acessórias em melhorar de forma significativa a hidrólise dos polissacarídeos do bagaço biotratado, com um aumento de 27 e 21% na conversão de glucana com a adição de 1mg/g de acetil xilana esterase e 1mg/g feruloil esterase, respectivamente (Figura 22 I). Tal resultado pode estar associado com o aumento na acessibilidade da celulose após a adição de tais enzimas ao coquetel Cellic CTec2. Em relação a acetil xilana esterase, esse aumento na acessibilidade das celulases as cadeias de celulose pode ser relacionado com o aumento em 28% na hidrólise de xilana (Figura 22II), devido a uma maior remoção dos substituintes arabinosil (aumento de 39%) e acetil (aumento de 40%) (Figura 22 III e IV), de forma que a hemicelulose menos substituída foi mais facilmente hidrolisada por xilanases

Para a enzima feruloil esterase, foi obtido um aumento na conversão em xilose, arabinose e acetil (acréscimo de 12,5, 15,5 e 12,5%, respectivamente), quando comparado com o controle usando apenas Cellic CTec2. Todavia, maiores rendimentos de conversão de glucana pode não estar associado somente a maiores rendimentos de hidrólise de hemicelulose, mas também no afrouxamento na estrutura reticulada do substrato, devido ao rompimento de ligação cruzada entre cadeias adjacentes de hemicelulose e entre

hemicelulose e lignina com a remoção de ácido ferúlico e cumárico, acarretando aumento do acesso das celulases a celulose (Tabela 21).

Figura 22 - Conversão de celulose em glicose (I) e hemicelulose em xilose (I), arabinose (III) e acetil (IV), do bagaço biotratado com *C. subvermispora* empregando 10FPU/g de substrato de Cellic CTec2 suplementado individualmente com 1mg/g de feruloil esterase e 1mg/g acetil xilana esterase.



Fonte: Arquivo próprio.

	Conversão em Glicose		Conversão em Xilose		Conversão em arabinose		Conversão em Acetil	
Ensaio	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)
Controle	1,0±0,1	30,2±1,4	1,4±0,2	21,2±1,0	1,0±0,1	11,2±1,5	2,2±0,3	14,2±1,1
1 mg/g Feruloil esterase	2,4±0,2	38,3±2,4	1,9±0,2	24,3±0,5	1,3±0,3	13,2±0,7	2,5±0,3	16,1±2,0
1 mg/g Acetil xilana esterase	4,0±0,2	41,2±0,4	4,0±0,3	29,1±0,7	3,0±0,2	18,3±2,6	4,0±0,3	23,1±1,0

Tabela 20 - Hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com *C. subvermispora*. Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação para a mistura de enzimas comerciais Cellic CTec2 suplementado com feruloil esterase e acetil xilana esterase.

*Controle: 10FPU Cellic CTec2 sem adição de enzima acessória Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 21 - Remoção de ácido ferúlico durante a hidrólise do bagaço biotratado com Cellic CTec2 suplementado com feruloil esterase em 72 horas de reação.

Ensaios	Ácido ferúlico hidrolisado (%)	Ácido cumárico hidrolisado (%)	Total de ácido hidroxicinâmicos hidrolisado (%)
Cellic CTec2	1,2±0,0	2,8±0,2	4,0±0,0
1mg/g feruloil esterase	9,5±0,0	9,0±0,0	18,5±0,0
Fonto: A raujuo próprio			

Fonte: Arquivo próprio.

A remoção de ácidos hidroxicinâmicos no bagaço biotratado foi analisado (Tabela 21), demonstrando um aumento de 87% na liberação de ésteres de ácido ferúlico após a suplementação de Cellic CTec2 com feruloil esterase, com base em um tempo de reação de 72 horas (Figura 21). Outra importante observação advém do aumento na hidrólise de ésteres de ácido cumárico após a suplementação de Cellic CTec2 com feruloil esterase (aumento de 31%). Vale ressaltar que o teor de ésteres de ácido cumárico no bagaço biotratato é significativamente maior do que os de ácido ferúlico (4 vezes maior). Conforme reportado por Del Río *et al.*, (2015) o ácido cumárico se encontra predominantemente ligado a lignina na estrutura do bagaço de cana, e os dados obtidos podem sugerir que uma pequena parcela de ésteres de ácido cumárico ligados à hemicelulose foram hidrolisados pelas feruloil

esterases (9% de ácido cumárico hidrolisado), e que os ésteres de ácido cumárico ligados à lignina não seriam reconhecidos por essa enzima.

Damásio *et al.* (2013), avaliaram o desempenho de uma feruloil esterase de *Aspergillus clavatus* na hidrólise de arabinoxilana de trigo e bagaço de cana, utilizando como padrão comparativo dados da remoção de ácidos hidroxicinâmicos por hidrólise alcalina, reportado como um método eficaz na hidrólise de ligações éster da biomassa vegetal. Os resultados obtidos demonstraram que a liberação de ácido cumárico alcançou 85% (arabinoxilana de trigo), sendo a liberação desse ácido no bagaço de cana menos efetiva, atingindo 7% após 15 h de tratamento. Em relação ao ácido ferúlico, a feruloil esterase foi capaz de liberar duas vezes mais conteúdo desse ácido no substrato arabinoxilana de trigo, diferentemente dos dados obtidos para o bagaço de cana, onde a feruloil esterase foi capaz de promover a hidrólise de 37% de ácido ferúlico, 63% menor comparado ao tratamento alcalino. Os autores relacionaram o menor desempenho da feruloil esterase de *Aspergillus clavatus* no bagaço da cana-de-açúcar com a baixa solubilidade desse substrato lignocelulósico.

Vários estudos reportados na literatura demonstraram que as feruloil esterases apresentam sinergia com hemicelulases e celulases, facilitando a degradação de polissacarídeos complexos presentes na parede celular (SELIG *et al.*, 2008; GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BOM, 2010; WU *et al.*, 2017; MÄKELÄ *et al.*, 2018).

Wu *et al.* (2017) avaliaram a sinergia entre feruloil esterases (100UI) e uma xilanase GH11 (0 a 1000 UI), ambas clonadas de *Aspergillus niger* e expressas em *Pichia pastoris,* na hidrólise de farelo de trigo para a coprodução de ácido ferúlico e xilo-oligossacarídeos. Os autores observaram um aumento de 17 para 70% na conversão de ácido ferúlico, conforme a atividade de xilanase aumentou de 0 para 300 U. Além disso, os rendimentos de xilo-oligossacarídeos obtidos foram duas vezes maiores comparado a ação individual das xilanases. Braga *et al.* (2014) realizaram a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (hidrotérmico) com coquetel comercial Celluclast 1,5 suplementado com 30% (v/v) de complexo enzimático bruto de *Aspergillus oryzae* P21C3, constituído principalmente por enzimas feruloil esterases (47,02 UI.L⁻¹) e xilanases (74,85 UI.mL⁻¹). A adição do extrato enzimático ao coquetel comercial melhorou de forma significativa a hidrólise dos polissacarídeos, proporcionando um aumento de 36% na liberação de glicose e 54% na liberação de xilose.

Por decorarem a cadeia principal de xilana, diversos estudos reportados na literatura demonstram que além dos ácidos ferúlicos e cumáricos, os radicais acetila também

interferem na ação de enzimas hidrolíticas em substratos lignocelulósicos. Selig *et al.* (2009) demonstraram que amostras de palha de milho, submetidas a pré-tratamentos que mantém quantidades apreciáveis de grupos acetil foram mais resistentes à hidrólise por xilanases. Todavia, a combinação dessa enzima com acetil xilana esterase foi capaz de melhorar significativamente as conversões de xilana e glucana. Adicionalmente os autores observaram que a clivagem de um grupo acetil permite a liberação enzimática de três moléculas de xilose adicionais, dados obtidos para a palha de milho pré-tratada com explosão de vapor de sulfito 170 °C.

Seling *et al.* (2008) relataram melhora significativa na despolimerização de celulose de palha de milho (pré-tratamento hidrotérmico) pela celobiohidrolase I (Cel7A) de *Trichoderma reesei* após a adição de xilanase, acetil xilana esterase e feruloil esterase (aumento de 84% na conversão de glucana), sugerindo que a hidrólise de grupos acetil e das ligações éster de ácido ferúlico, permite a Cel7A maior acesso às microfibrilas de celulose. Os dados obtidos demonstraram ainda maior desempenho das xilanases quando essa enzima é combinada com esterases (em conjunto ou individualmente), aumentando em 2 vezes a conversão de xilana. Esses dados reforçam a ideia de que a hidrólise de xilana pela xilanase é facilitada por enzimas de desramificação, e as ligações do ácido ferúlico com hemicelulose e lignina, bem como a presença de substituintes acetil na estrutura da xilana, são responsáveis por ocluir as microfibrilas de celulose e limitar a acessibilidade das celulases. Dessa forma a remoção desses substituintes por esterases tem o efeito de criar sítios na estrutura polissacarídica adequados para ligação produtiva de enzimas xilanolíticas e celulolíticas (BIELY, 2012).

6.3.3.5 Efeito da adição de altas concentrações de albumina do soro bovino (BSA) ao coquetel Cellic CTec2 para a hidrólise de substratos pré-tratados em condições brandas

Vários estudos descritos na literatura, demonstram que o uso de aditivos, como surfactantes (tween 20, Tween 80), ou proteínas não catalíticas (albumina de soro bovino (BSA) podem aumentar rendimentos de hidrólise de lignocelulósicos devido ao bloqueio dos sítios de adsorção da lignina, diminuindo adsorções improdutivas de celulases e promovendo maior estabilidade da atividade enzimática no meio reacional (JIN *et al.*, 2016; BRETHAUER *et al.*, 2011; DOS SANTOS *et al.*, 2019; AGRAWAL *et al.*, 2021). Nesse sentido, a suplementação do coquetel comercial Cellic CTec2 com albumina foi realizada em diferentes concentrações (1,2, 25 e 250 mg/g de substrato). Os resultados obtidos para a

conversão de celulose e hemicelulose na ausência e presença dessa proteína estão demonstrados na Figura 23 e sumarizadas nas Tabelas 22 e 23.

Conforme demonstrado anteriormente (item 6.3.3.3), a adição de 1 e 2 mg/g ao complexo Cellic CTec2 foi pouco efetiva na digestibilidade de glucana em ambos os substratos. No entanto, para o bagaço sulfito alcalino, ao utilizar 25 mg/g de albumina, houve um aumento de 25% nos rendimentos de hidrólise de celulose em glicose, assim como nas velocidades iniciais, quando comparado com o ensaio na ausência dessa proteína (Figura 23 I). Um importante fato observado foi que ao elevar a concentração de 25 para 250 mg/g houve um decréscimo de 11,5% na conversão de celulose, provavelmente causado pela elevada concentração de albumina no meio reacional (10 vezes maior), o que pode ter dificultado a ação das celulases devida maior interação proteína-celulase e proteína-celulose (DOS SANTOS *et al.*, 2019; AGRAWAL *et al.*, 2021).

Em relação àhidrólise de hemicelulose no bagaço sulfito alcalino, foi visto que a adição de 25 mg/g e 250 mg/g de albumina apresentaram efeito similares na conversão desse polissacarídeo em xilose e arabinose, sendo obtido um aumento de 25% e 34% na liberação desses açúcares respectivamente (Figura 23 III e V). Curiosamente, maiores velocidades iniciais foram verificadas utilizando 2 mg/g de proteína, sem, contudo, proporcionar valores de rendimento finais elevados (Tabela 22).

Analisando os dados obtidos para o bagaço biotratado, em contraste com o observado para o bagaço sulfito alcalino, não foi obtido maiores rendimentos de hidrólise de polissacarídeos para nenhuma concentração de albumina adicionada ao coquetel CTec 2 (Figura 23 II, IV e VI) fato possivelmente correlacionado com as diferenças estruturais dos substratos ocasionados pelos pré-tratamentos. Guerra, Mendonça e Ferraz (2003) observaram redução no grau de polimerização de α -celulose extraída de *Pinus taeda* biodegradada por *C. subvermispora* em tempos de cultivos de 30-90 dias, o que explicaria maior acessibilidade das cadeias de celulose no substrato utilizado no presente trabalho (biotratado por 60 dias). Além disso, o biotratamento em comparação ao método químico (sulfito alcalino) promoveu uma remoção 2 vezes maior no conteúdo de xilana, 3 vezes maior de arabinosil e 4 vezes maior no conteúdo de lignina (Tabela 5).

Dessa forma, supõe-se que tais fatos em conjunto podem prover maior acessibilidade a celulose no substrato biotratado de forma que os efeitos negativos correlacionados a presença de lignina nesse substrato podem não ter sido tão expressivo comparado aos efeitos promovidos na hidrólise do bagaço sulfito alcalino.

Figura 23 - Conversão de celulose em glicose, hemicelulose em xilose e arabinose do bagaço sulfito alcalino (números I, II e III respectivamente) e *C. subvermispora* (números IV, V e VI respectivamente) empregando 10FPU/g de substrato de Cellic CTec2 suplementado com diferentes cargas de albumina (mg/ g de substrato).



Fonte: Arquivo próprio.

Carga	Conversão em Glicose		Conversão em Xilose		Conversão em arabinose	
enzimatica (mg/g substrato)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)
Controle	3,7±0,3	42,3±1,6	2,3±0,3	39,3±1,2	2,4±0,3	31,3±0,9
1	4,5±0,5	41,3±2,2	4,1±0,5	42,5±2,2	4,3±0,5	28,4±1,6
2	7,8±0,2	46,1±0,5	9,6±0,3	41,3±0,5	9,3±0,4	30,5±0,8
25	9,4±0,1	56,3±0,8	6,9±0,2	55,4±1,0	6,8±0,3	49,3±1,2
250	7,1±0,2	50,2±0,1	5,1±0,3	53,3±2,4	5,1±0,2	49,4±2,3

Tabela 22 - Hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino. Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação para a mistura de enzimas comerciais Cellic CTec2 suplementado com diferentes concentrações de albumina.

Controle: 10 FPU Cellic CTec2 sem adição de albumina Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 23 - Hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com *C. subvermispora*. Valores de eficiência de conversão enzimática de polissacarídeos após 72 horas de reação e dados de velocidade inicial de reação para a mistura de enzimas comerciais CTec 2 suplementado com diferentes concentrações de albumina.

Carga	Conversão em Glicose		Conversão em Xilose		Conversão em arabinose	
enzimatica (mg/g substrato)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)	Vel inicial (%.h ⁻¹)	Após 72 h (%)
Controle	4,5±0,3	37,2±0,4	3,5±0,3	23,3±0,4	2,5±0,2	15,2±0,3
1	3,0±0,1	36,3±1,5	2,7±0,2	22,0±0,1	3,0±0,5	16,3±1,4
2	3,8±0,1	37,4±1,3	3,3±0,2	24,0±0,4	2,1±0,3	17,4±0,4
25	3,4±0,3	39,2±2,1	3,2±0,3	27,3±0,9	1,9±0,2	16,2±0,7
250	3,4±0,2	37,3±0,5	3,3±0,1	23,2±1,3	2,0±0,2	19,1±1,5

Fonte: Arquivo próprio.

De modo a compreender o papel que a lignina pode desempenhar na ligação improdutiva das enzimas ou na restrição do acesso dessas à celulose, Kumar et al. (2012) realizaram ensaios adicionando BSA antes da hidrólise enzimática do abeto de Douglas prétratado a vapor (contendo 42% de lignina). Foi evidenciado pelos autores que em altas cargas de enzimas Celluclast 1.5L (200 FPU/g), a adição anterior de BSA teve pouco efeito na hidrólise dos polissacarídeos, considerando tempo de reação de 72 horas. No entanto, em baixas cargas de enzimas (5 FPU /g), a adição anterior de BSA ao abeto de Douglas prétratado aumentou a extensão da hidrólise substancialmente, visto que cerca de 66% da celulose foi hidrolisada após 72 h, em comparação com apenas 16% sem adição anterior de BSA. Outro interessante estudo realizado pelos autores, demonstrou que quando BSA foi adicionado ao abeto de Douglas pré-tratado a vapor submetido a diferentes níveis de deslignificação com clorito de sódio (amostras geradas com teores de lignina de 38, 30, 22 e 11%), o aumento quase linear na hidrólise da celulose foi correlacionado com o decréscimo nos conteúdos de lignina nos substratos gerados, de forma que a adição prévia de BSA foi menos significativa em amostras com percentuais de lignina reduzidos (11%). No entanto, para os substratos com alto teor de lignina (38%), a adição anterior de BSA teve um efeito significativo, resultando em maiores taxas de hidrólise (KUMAR et al., 2012).

Dessa forma, supõe-se que para os substratos com menor acessibilidade à celulose (Sulfito alcalino), o efeito das interações não produtivas das celulases com a lignina é mais intenso, de forma que a adição de BSA pode contornar em partes essa limitação imposta pela lignina. Porém, quando a acessibilidade à celulose é maior (biotratado), mesmo com a lignina presente em concentrações relativamente altas, ela exerce um papel significantemente menor em impedir a efetividade da hidrólise enzimática como adsorvente não produtivo, posto que a fração de celulose amorfa deve estar prontamente acessível para a adsorção enzimática.

Diversos estudos são reportados na literatura demonstrando o efeito da adição de albumina a preparados enzimáticos para a hidrólise de biomassa lignocelulósica. Efeitos positivos e negativos correlaciona-se com a suplementação dessa proteína, dependendo do complexo enzimático utilizado e das características dos substratos em estudo (DING *et al.*, 2019; MÉNDEZ ARIAS *et al.*, 2017; ROCHA-MARTIN *et al.*, 2017; YANG; WYMAN, 2006; KUMAR *et al.*, 2012)

Rocha–Martín *et al.* (2017) demonstraram em que a adição de albumina ao complexo enzimático de *Myceliophthora thermophila*, para hidrólise de palha de milho e palha de cana-de-açúcar (pré-tratados por explosão a vapor) afetou negativamente a hidrólise de

ambos os substratos mesmo em baixas concentrações. A redução da liberação de glicose foi cerca de 15% durante a hidrólise de palha de milho e no caso da hidrólise da palha de canade-açúcar, a liberação de glicose e xilose foi reduzida em 5% e 10%, respectivamente. Embora demonstrada baixa capacidade adsortiva de BSA à celulose microcristalina Avicel, à adsorção de BSA na glucana poderia ser um dos motivos da diminuição dos rendimentos de conversão de polissacarídeos em determinados substratos, especialmente aqueles amplamente deslignificados. Adsorvida à cadeia de glucana, BSA formaria uma espécie de "camada protetora", a qual impediria fisicamente a interação das celulases com o substrato (YANG; WYMAN, 2006).

De modo a elucidar os possíveis efeitos promovidos pelo uso de albumina na hidrólise de lignocelulósicos, alguns trabalhos podem ser citados onde demonstram que a presença dessa proteína não catalítica pode promover a estabilização das enzimas melhorando ainda mais seu desempenho na hidrólise. Palonen et al. (2004) realizaram um estudo sobre o comportamento de adsorção de exoglucanase CBH I e verificaram que na presença de BSA essa enzima liga-se em menor grau à lignina, acarretando aumento de 55% no conteúdo de enzima livre no meio reacional. Brethauer et al. (2011) demonstraram que a adição de BSA resultou em maiores rendimentos de sacarificação da glucana presente na palha de milho pré-tratada com ácido diluído (aumento de 40%). Além disso, a BSA também pareceu reduzir a desativação das enzimas exoglucanases, citada por Reese e Mandels (1980) como o componente menos estável do sistema de celulases. A agitação da palha de milho pré-tratada com BSA antes da reação também facilitou a descristalização e a redução do tamanho das partículas do substrato, aumentando sua digestibilidade (BRETHAUER et al., 2011). Kim et al. (1982) concluíram em seus estudos que as celulases podem sofrer desativação ao estarem expostas na interface ar-líquido ou por criação de bolhas de ar no meio reacional. De forma que a adição de BSA pode diminuir a concentração de celulase na interface ar-líquido, impedindo a desativação e protegendo as enzimas contra altas forças de cisalhamento.

Com base nos resultados apresentados e em uma ampla pesquisa bibliográfica, podese concluir que para o substrato sulfito alcalino, o fenômeno de adsorção improdutiva pode estar sendo uma das maiores limitações para alcançar elevados rendimentos de sacarificação, de forma que a adição dessa proteína em concentrações ideais (25 mg/g) pode promover além do bloqueio dos sítios de adsorção da lignina, maior estabilidade das celulases no meio reacional. A albumina sérica bovina caracteriza-se por possuir grandes quantidades de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos em sua superfície, o que contribui para uma maior afinidade com a lignina (SAMMOND *et al.*, 2014).

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como enfoque avaliar o efeito da suplementação do coquetel comercial Cellic CTec2 com diferentes enzimas e proteínas acessórias na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratados em condições brandas. Com base nos dados obtidos neste trabalho, concluiu-se que:

- Foi possível melhorar a hidrólise dos substratos em estudo com a adição de hemicelulases ao preparado comercial Cellic CTec2. Para o bagaço sulfito alcalino, melhores rendimentos de sacarificação foi obtido utilizando 1 mg/g de α-arabinofuranosidase, aumentando em 17,5% a conversão em glucana e 27% a conversão de xilana. Para o bagaço biotrado com *C. subvermispora*, melhores resultados foram alcançados suplementando com 1 mg/g de β-xilosidase o coquetel Cellic CTec2, provendo um aumento de 30 e 27% na conversão em glucana e xilana respectivamente. Os resultados indicaram que um excesso destas enzimas não necessariamente favorece a conversão a monossacarídeos.
- A utilização de Cellic CTec2 suplementado com enzimas acessórias simultaneamente não forneceu maiores rendimentos de hidrólise da celulose e hemicelulose quando comparados com os ensaios com a adição individual de tais enzimas. Tal fato demonstra que adicionar várias enzimas em conjunto a preparados enzimáticos não traduz necessariamente em maiores rendimentos de sacarificação
- Para todos os ensaios com o coquetel comercial suplementado com enzimas acessórias individualmente ou em conjunto, foram verificadas velocidades iniciais de hidrólise superiores quando comparado ao controle (apenas enzima Cellic CTec2), provavelmente devido ao maior conteúdo de enzimas disponíveis no meio reacional.
- A adição de feruloil esterase e acetil xilana esterase ao coquetel Cellic CTec2 para a hidrólise do substrato biotratado, promoveu a remoção de ésteres de ácidos hidroxicinâmicos e grupos acetila resistentes ao pré-tratamento, acarretando aumento do acesso das celulases a celulose e rendimentos de hidrólise até 27% maior.
- Além do alto conteúdo de hemicelulose, o substrato em questão também se caracteriza com elevado conteúdo de lignina. O fenômeno de adsorção improdutiva pode ser um fator que promove grande limitação a hidrólise enzimática para o substrato sulfito alcalino, visto que a adição de albumina para bloquear sítios de

106
adsorção de celulases em lignina acarretou maiores velocidades iniciais e rendimentos elevados de sacarificação dos polissacarídeos.

REFERÊNCIAS

ADSUL, M.; SANDHU, S.K.; SINGHANIA, R.R.; GUPTA, R.; PURI, S.K.; MATHUR, A. Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 133, p. 109442, 2020.

AGRAWAL, R.; VERMA, A.; RANI, R.; VARJANI, S.; DI, C.; KUMAR, A. Bioresource Technology Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 332, p. 125042, 2021.

AKHTAR, M.; BLANCHETE, R.A.; MYERS, G.; KIRK, T.K. An overview of biomechanical pulping research. In: YOUNG, R.R; AKHTAR, M. Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. New York: John Wiley and Sons, 1998. p. 309-383

ALCÁNTARA, M.Á.B.; DOBRUCHOWSKA, J.; AZADI, P.; GARCÍA, B.D.; MOLINA-HEREDIA, F.P.; REYES-SOSA, F.M. Recalcitrant carbohydrates after enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 207, 2016.

ALVIRA, P.; NEGRO, M.J.; BALLESTEROS, M. Effect of endoxylanase and α -Larabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4552–4558, 2011.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4, p. 1-11, 2010.

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

BANERJEE, G.; SCOTT-CRAIG, J.S.; WALTON, J.D. Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. **Bioenergy Research**, v. 3, p. 82–92, 2010.

BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. Renewable and Sustainable **Energy Reviews**, v. 36, p. 91–106, 2014.

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

BIELY, P.; MASTIHUBOVÁ, M.; TENKANEN, M.; EYZAGUIRRE, J.; LI, X.; VRSANSKÁ, M. Action of xylan deacetylating enzymes on monoacetyl derivatives of 4nitrophenyl glycosides of β -D-xylopyranose and α -l-arabinofuranose. **Journal of Biotechnology**, v. 151, n. 1, p. 137–142, 2011.

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

BIELY, P. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1575–1588, 2012.

BIELY, P.; CZISZÁROVÁ, M.; UHLIARIKOVÁ, I.; AGGER, J.W.; LI, X.L.; EIJSINK,
V.G.H.; WESTERENG, B. Mode of action of acetylxylan esterases on acetyl glucuronoxylan and acetylated oligosaccharides generated by a GH10 endoxylanase.
Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj, v. 1830, p. 5075–5086, 2013.

BLUM, D.L.; KATAEVA, I.A.; LI, X.L.; LJUNGDAHL, L.G. Feruloyl esterase activity of the Clostridium thermocellum cellulosome can be attributed to previously unknown domains of XynY and XynZ. Journal of Bacteriology, v. 182, n. 5, p. 1346–1351, 2000.

BOISSET, C; PETREQUIN, C; CHANZY, H; HENRISSAT, B; SCHULEIN, M. Optimized mixtures of recombinant Humicola insolens cellulases for the biodegradation of crystalline cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**., v. 72, p.339–45, 2001

BRAGA, C.M.P.; DELABONA, P.S.; LIMA, D.J.S.; PAIXÃO, D.A.A.; PRADELLA, J.G.C.; FARINAS, C.S. Addition of feruloyl esterase and xylanase produced on-site improves sugarcane bagasse hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 316–324, 2014.

110

BRAR, K.K.; ESPIRITO SANTO, M.C.; PELLEGRINI, V.O.A.; DE AZEVEDO, E.R.; GUIMARAES, F.E.C.; POLIKARPOV, I.; CHADHA, B.S. Enhanced hydrolysis of hydrothermally and autohydrolytically treated sugarcane bagasse and understanding the structural changes leading to improved saccharification. **Biomass and Bioenergy**, v. 139, p. 105639, 2020

BRETHAUER, S.; STUDER, M.H.; YANG, B.; WYMAN, C.E. The effect of bovine serum albumin on batch and continuous enzymatic cellulose hydrolysis mixed by stirring or shaking. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6295–6298, 2011.

BRIENZO, M.; FIKIZOLO, S.; BENJAMIN, Y.; TYHODA, L. In fl uence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples. **Renewable Energy**, v. 104, p. 271–280, 2017.

BUSSAMRA, B.; FREITAS, S.; CARVALHO, A. Bioresource Technology Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 173–181, 2015.

BUSSE-WICHER, M.; GRANTHAM, N.J.; LYCZAKOWSKI, J.J.; NIKOLOVSKI, N.; DUPREE, P. Xylan decoration patterns and the plant secondary cell wall molecular architecture. **Biochemical Society transactions**, v. 44, n. 1, p. 74–8, 2016a.

BUSSE-WICHER, M.; LI, A.; SILVEIRA, R.L.; PEREIRA, C.S.; TRYFONA, T.; GOMES, T.C.F.; SKAF, M.S.; DUPREE, P. Evolution of Xylan Substitution Patterns in Gymnosperms and Angiosperms : Implications for Xylan Interaction with Cellulose. **Plant Physiology**. v. 171, p. 2418–2431, 2016b.

CARPIO, L.G.T.; SOUZA, S.F. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions. **Renewable Energy,** v. 111, p. 771–780, 2017.

CARVALHO, A.F.A; OLIVA NETO, P.; DA SILVA, D.F.; PASTORE, G.M. Xylooligosaccharides from lignocellulosic materials : Chemical structure , health bene fi ts and production by chemical and enzymatic hydrolysis**. Food Research International**, v. 51, p. 75–85, 2013. CARVALHO, A.F.A.; FIGUEIREDO, F.C.; CAMPIONI, T.S.; PASTORE, G.M.; DE OLIVA NETO, P. Improvement of some chemical and biological methods for the efficient production of xylanases, xylooligosaccharides and lignocellulose from sugar cane bagasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 143, p. 105851, 2020.

CARVALHO, D.M.; QUEIROZ, J.H.; COLODETTE, J.L. Assessment of alkaline pretreatment for the production of bioethanol from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. Industrial Crops and Products. v. 94, p. 932–941, 2016.

CHADHA, B.S.; RAI, R.; MAHAJAN, C. Hemicellulases for lignocellulosics-based bioeconomy. 2nd ed. (Amritsar): Elsevier Inc., 2019. p. 427-445

CHAMPREDA, V.; MHUANTONG, W.; LEKAKARN, H.; BUNTERNGSOOK, B.; KANOKRATANA, P.; ZHAO, X.; ZHANG, F.; INOUE, H.; FUJII, T, EURWILAICHITR, L. Designing cellulolytic enzyme systems for biorefinery: From nature to application. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 128, n. 6, p. 637–654, 2019

CHIARAMONTI, D.; PRUSSI, M.; FERRERO, S.; ORIANI, L.; OTTONELLO, P.; TORRE, P.; CHERCHI, F. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 25–35, 2012.

CINTRA, L.C.; DA COSTA, I.C.; DE OLIVEIRA, I.C.M.; FERNANDES, A.G.; FARIA, S.P.; JESUÍNO, R.S.A.; RAVANAL, M.C.; EYZAGUIRRE, J., RAMOS, L.P., FARIA, F. P.; ULHOA, C.J. The boosting effect of recombinant hemicellulases on the enzymatic hydrolysis of steam treated sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 133, p. 109447, 2020.

CINTRA, L.C.; FERNANDES, A.G.; DE OLIVEIRA, I.C.M.; SIQUEIRA, S.J.L.; COSTA, I. G.O., COLUSSI, F., JESUÍNO, R.S.A.; ULHOA, C.J.; FARIA., F.P. Characterization of a recombinant xylose tolerant β -xylosidase from Humicola grisea var. thermoidea and its use in sugarcane bagasse hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 262–271, 2017.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, Brasília, DF, 2021.

CREPIN, V.F.; FAULDS, C.B.; CONNERTON, I.F. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 6, p. 647–652, 2004.

DA SILVA, A.S.; SOUZA, M.F.; BALLESTEROSC, I.; MANZANARESC, P.; BALLESTEROSC, M.; BONA, E.P.S.E.P.S. High-solids content enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse using a laboratory-made enzyme blend and commercial preparations. **Process Biochemistry** v. 51, p. 1561–1567, 2016.

DAMÁSIO, A.R.L.; BRAGA, C.M.P.; BRENELLI, L. B.; CITADINI, A.P.; MANDELLI, F.; COTA, J.; ALMEIDA, R.F.; SALVADOR, V.H.; PAIXÃO, D.A.A.; SEGATO, F.; MERCADANTE, A.Z.; NETO, M.O.; DOS SANTOS, W.D.; SQUINA, F. M. Biomass-tobio-products application of feruloyl esterase from Aspergillus clavatus. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 15, p. 6759–6767, 2013.

DEL RÍO, J. C.; LINO, A. G.; COLODETTE, J. L; LIMA, C. F.; GUTIERREZ, A.; MARTÍNES, A. T.; LU, F.; RALPH, J.; RENCORET, J.. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 322–338, 2015.

DELABONA, P.S.; COTA, J.; HOFFMAM, Z. B.; *et al.*, Understanding the cellulolytic system of Trichoderma harzianum P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α -L-arabinofuranosidase. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 500–7, 2013.

DILOKPIMOL, A.; MÄKELÄ, M.R.; AGUILAR-PONTES, M.V.; GELBERI, I.B.; HILDENS, K.S.; VRIES, R.P. Diversity of fungal feruloyl esterases: updated phylogenetic classification, properties, and industrial applications. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2016.

DING, D.; LI, P.; ZHANG, X.; RAMASWAMY, S.; XU, F. Synergy of hemicelluloses removal and bovine serum albumin blocking of lignin for enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 231–236, 2019.

DOOD, D.; CANN, I.K.O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Glob Change Biol Bioenergy**, v. 18, p. 2–17, 2009

DOS SANTOS, A.C.; XIMENES, E.; KIM, Y.; LADISCH, M.R. Lignin–Enzyme enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, n. 30, p. 1458–1480, 2019.

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

FENILA, F.; SHASTRI, Y. Optimal control of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Resource-Efficient Technologies,** v. 2, p. 96–104, 2016.

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

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

FRANDSEN, K.E.H.; HAON, M.; GRISEL, S.; HENRISSAT, B.; LO LEGGIO, L.; BERRIN, J.-G. Identification of the molecular determinants driving the substrate specificity of fungal lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). Journal of Biological Chemistry, v. 296, p. 100086, 2021.

GAO, D.; CHUNDAWAT, S.P.S.; KRISHNAN, C.; BALAN, V.; DALE, B.E. Mixture optimization of six core glycosyl hydrolases for maximizing saccharification of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2770–2781, 2010.

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

GÍRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GOLDBECK, R.; DAMÁSIO, A.R.L.; GONÇALVES, T.A.; MACHADO, C. B.; PAIXÃO, D.A.A.; WOLF, L.D.; MANDELLI, F.; ROCHA, G.J.M.; RULLER, R.; SQUINA, F.M.

Development of hemicellulolytic enzyme mixtures for plant biomass deconstruction on target biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 20, p. 8513–8525, 2014.

GOLDBECK, R.; GONÇALVES, T.A.; DAMÁSIO, A.R.L.; BRENELLI, L.B.; WOLF, L.D.; PAIXÃO, D.A.A.; ROCHA, G.J.M.; SQUINA, F.M. Effect of hemicellulolytic enzymes to improve sugarcane bagasse saccharification and xylooligosaccharides production. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 131, p. 36–46, 2016.

GONZALES, R.R.; SIVAGURUNATHAN, P.; KIM, S.H. Effect of severity on dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass and the following hydrogen fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 46, p. 21678–21684, 2016.

GOPALAN, N.; RODRÍGUEZ-DURAN, L.V.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; NAMPOOTHIRI, K.M.. Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: A versatile enzyme for biorefining of biomass. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 534–544, 2015

GOTTSCHALK, L.M.F.; OLIVEIRA, R.A.; BOM, E.P.D. Cellulases, xylanases, βglucosidase and ferulic acid esterase produced byTrichoderma and Aspergillus act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, p. 72–78, 2010.

GRABBER, J.H.; RALPH, J.; HATFIELD, R.D. Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 6106–6113, 2000.

GUERRA A.; MENDONÇA R.; FERRAZ A. Molecular weight distribution of wood components extracted from Pinus taeda biotreated by Ceriporiopsis subvermispora. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 12-18, 2003.

HEGGSET, E.B.; SYVERUD, K.; ØYAAS, K. Novel pretreatment pathways for dissolution of lignocellulosic biomass based on ionic liquid and low temperature alkaline treatment. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 194–200, 2016.

HOLCK, J.; FREDSLUND, F., MØLLER, M.S.; BRASK, J.; KROGH, K.B.R.M.; LANGE, L.; WELNER, D.H.; SVENSSON, B.; MEYER, A.S.; WILKENS, C.A carbohydrate-

binding family 48 module enables feruloyl esterase action on polymeric arabinoxylan. **Journal of Biological Chemistry,** v, 294, p. 17339–17353, 2019.

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

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

HUGHES, N.; MUTRAN, V. M.; TOMEI, J.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C.; OLLER DO NASCIMENTO, C.A. Strength in diversity? Past dynamics and future drivers affecting demand for sugar, ethanol, biogas and bioelectricity from Brazil's sugarcane sector. **Biomass and Bioenergy**, v. 141, p. 105676, 2020.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA). Sustainable Production of Second-Generation Biofuels. p. 221. 2010.

JIANG, Y.; LV, Y.; WU, R.; SUI, Y.; CHEN, C.; XIN, F.; ZHOU, J.; DONG, W.; JIANG, M. Current status and perspectives on biobutanol production using lignocellulosic feedstocks. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100245, 2019.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory byproducts and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 2016.

JORDAN, D.B.; LI, X.L.; DUNLAP, C.A.; WHITEHEAD, T.R.; COTTA, M.A. β-D-Xylosidase from Selenomonas ruminantium of glycoside hydrolase family 43. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 137-140, n. 1-12, p. 93-104, 2007a.

JORDAN, D.B.; LI, . X.L.; DUNLAP, C.A.; WHITEHEAD, T.R, COTTA M. A. Structurefunction relationships of a catalytically efficient β-Dxylosidase. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 141, n. 1, p. 51–76, 2007b.

JORDAN, D.B.; LI, X.L. Variation in relative substrate specificity of bifunctional β -d-xylosidase/ α -l-arabinofuranosidase by single-site mutations: Roles of substrate distortion and recognition. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1774, n. 9, p. 1192–1198, 2007.

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

JUTURU, V.; WU, J.C. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, p.1219–1227, 2012.

KHAIRE, K. C.; SHARMA, K.; THAKUR, A.; MOHOLKAR, V. S.; GOYAL, A. Extraction and characterization of xylan from sugarcane tops as a potential commercial substrate. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2021.

KIM, J.S.; LEE, Y.Y.; KIM, T.H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42–48, 2016.

KIM, M. H.; LEE, S. B.; RYU, D. D. Y.; REESE, E. T. Surface deactivation of cellulase and its prevention. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, n. 2, p. 99–103, 1982.

KIM, Y.; KREKE, T.; HENDRICKSON, R.; PARENTI, J.; LADISCH, M.R. Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 30–38, 2013.

KOGO, T.; YOSHIDA, Y.; KOGANEI, K.; MATSUMOTO, H.; WATANABE, T.; OGIHARA, J.; KASUMI, T. Production of rice straw hydrolysis enzymes by the fungi Trichoderma reesei and Humicola insolens using rice straw as a carbon source. **Bioresource Technology**, v. 233, p. 67–73, 2017.

KUMAR, L.; ARANTES, V.; CHANDRA, R.; SADDLER, J. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 201–208, 2012.

LAGAERT, S.; POLLET, A.; COURTIN, C.M.; VOLCKAERT, G. β-Xylosidases and α-L-arabinofuranosidases: Accessory enzymes for arabinoxylan degradation. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 316–332, 2014.

LAM, T.B.; STONE, B.A. Covalent Cross-Links in the Cell Wall. **Plant Physiology**, v. 104, p. 315–320, 1994.

LAOTHANACHAREON, T.; BUNTERNGSOOK, B.; SUWANNARANGSEE, S.; EURWILAICHITR, L.; CHAMPREDA, V. Synergistic action of recombinant accessory hemicellulolytic and pectinolytic enzymes to Trichoderma reesei cellulase on rice straw degradation. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 682–690, 2015.

LAURITO-FRIEND, D.F.; MENDES, F.M.; REINOSO, F.M.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Sugarcane hybrids with original low lignin contents and high field productivity are useful to reach high glucose yields from bagasse. **Biomass Bioenergy** v. 75, p. 65–74, 2015.

LEU, S.Y.; ZHU, J.Y. Substrate-related factors affecting enzymatic saccharification of lignocelluloses: our recent understanding. **Bioenergy Research**, v. 6, p. 405-415, 2013.

LI, M.; PU, Y.; RAGAUSKAS, A.J. Current Understanding of the Correlation of Lignin Structure with Biomass Recalcitrance. **Frontiers in Chemistry**, v. 4, p. 1–8, 2016.

LI, X.; ZHENG, Y. Lignin-enzyme interaction: Mechanism, mitigation approach, modeling, and research prospects. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 4, p. 466–489, 2017.

LONG, L.; ZHAO, H.; DING, D.; XU, M.; DING, S. Heterologous expression of two Aspergillus niger feruloyl esterases in Trichoderma reesei for the production of ferulic acid from wheat bran. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 5, p. 593–601, 2018.

MACHADO, A.S.; FERRAZ, A. Biological pretreatment of sugarcane bagasse with basidiomycetes producing varied patterns of biodegradation. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 17–22, 2017.

MÄKELÄ, M. R.; DILOKPIMOL, A.; KOSKELA, S.M.; KUUSKERI, J.; VRIES, R.P.; HILDEN, K. Characterization of a feruloyl esterase from Aspergillus terreus facilitates the division of fungal enzymes from Carbohydrate Esterase family 1 of the carbohydrate-active enzymes (CAZy) database. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 869–880, 2018.

MANOCHIO, C.; ANDRADE, B. R.; RODRIGUEZ, R.P.; MORAES, B.S. Ethanol from biomass: A comparative overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 743–755, 2017.

MARTINS, M.P.; VENTORIM, R.Z.; COURA, R.R.; MAITAN-ALFENAS, G.P.; ALFENAS, R.F.; GUIMARÃES, V.M. The β-xylosidase from Ceratocystis fimbriata RM35

improves the saccharification of sugarcane bagasse. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 291–298, 2018.

MATEI, J.C.; SOARES, M.; BONATO, A.C.H.; DE FREITAS, M.P.A.; HELM, C.V.; MAROLDI, W.V.; MAGALHÃES, W.L.E.; HAMINIUK, C.W.I.; MACIEL, G. M. Enzymatic delignification of sugar cane bagasse and rice husks and its effect in saccharification. **Renewable Energy** v. 157, p. 987–997, 2020.

MATHEW, A. K.; PARAMESHWARAN, B.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. An evaluation of dilute acid and ammonia fiber explosion pretreatment for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 13–20, 2016.

MENDES, F. M.; HEIKKILÄ, E.; FONSECA, M. B.; MILAGRES, A. M. F.; FERRAZ, A.; FARDIM, P. Topochemical characterization of sugar cane pretreated with alkaline sulfite. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 60–67, 2015.

MENDES, F. M.; VASCONCELOS, M. H.; DIAS, M. O. S.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F.; SANTOS, J. C.; JESUS, C. D. F.; WATANABE, M. D. B.; JUNQUEIRA, T. L.; BONOMI, A. Alkaline sulfite pretreatment for integrated first and second generation ethanol production: A techno-economic assessment of sugarcane hybrids. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 314–321, 2018.

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

MÉNDEZ ARIAS, J.; OLIVEIRA, A. M.;, MODESTO, L. F. A.; DE CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Addition of surfactants and non-hydrolytic proteins and their influence on enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, p. 593–603, 2017.

MENG, X.; WELLS, T.; SUN, Q.; HUANG, F.; RAGAUSKAS, A. Insights into the effect of dilute acid, hot water or alkaline pretreatment on the cellulose accessible surface area and the overall porosity of Populus. Green Chemistry, v. 17, p. 4239-4246, 2015.

MENG, X.; RAGAUSKAS, A. J. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 150–158, 2014.

MESQUITA, J. F.; FERRAZ, A.; AGUIAR, A. Alkaline-sulfite pretreatment and use of surfactants during enzymatic hydrolysis to enhance ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 3, p. 441–448, 2016.

MILÃO, R.F.D.; ARAÚJO, O.Q.F.; MEDEIROS, J.L. Sugarcane-based ethanol biorefineries with bioenergy production from bagasse: thermodynamic, economic, and emissions assessments, Waste Biorefinery, p. 125-158, 2021.

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

MODENBACH, A.A.; NOKES, S.E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings. A review. **Biomass and bioenergy**, v. 6, p. 526-544, 2013.

MOOD, S.H.; GOLFESHAN, A.H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G.S.; NAJAFI, G.H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol; a comprehensive review on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p.76–93, 2013.

MOREIRA, L.R.S.; FERREIRA FILHO, E.X. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5205–5214, 2016.

MORGAN, N. K.; WALLACE, A.; BEDFORD, M. R.; CHOCT, M. Efficiency of xylanases from families 10 and 11 in production of xylo-oligosaccharides from wheat arabinoxylans. **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 290–296, 2017.

NAGARAJAN, S.; SKILLEN, N.C.; IRVINE, J.T.S.; LAWTON, L.A.; ROBERTSON, P.K.J. Cellulose II as bioethanol feedstock and its advantages over native cellulose. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, p. 182–192, 2017.

NAKAGAME, S.; CHANDRA, R.P.; KADLA, J.F.; SADDLER, J.N. Enhancing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by increasing the carboxylic acid content of the associated lignin. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 3, p. 538–548, 2011.

NEUMÜLLER, K.G.; DE SOUZA, A.C.; VAN RIJN, J.H.J.; POSTREEKSTRAT, H.; GRUPPEN, H.; SCHOLS, H. A. sitional preferences of acetyl esterases from different CE families towards acetylated 4-O-methyl glucuronic acid-substituted xylo-oligosaccharides. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2015.

NEUMÜLLER, K.G.; STREEKSTRA, H.; GRUPPEN, H; SCHOLS, H.A. Trichoderma longibrachiatum acetyl xylan esterase 1 enhances hemicellulolytic preparations to degrade corn silage polysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 163, p. 64–73, 2014a.

NEUMÜLLER, K.G.; STREEKSTRA, H.; SCHOLS, H.A.; GRUPPEN, H. Synergistic action of enzyme preparations towards recalcitrant corn silage polysaccharides. **Biomass** and bioenergy, v. 6 0, p. 88-97, 2014b.

OLIVEIRA, D.M.; MOTA, T.R.; SALATTA, F.V.; DE ALMEIDA, G.H.G.; OLHER, V.G.A.; OLIVEIRA, M.A.S.; MARCHIOSI, R.; FERRARESE-FILHO, O.; DOS SANTOS, W.D. Feruloyl esterase activity and its role in regulating the feruloylation of maize cell walls. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 156, p. 49–54, 2020.

OLIVEIRA, D.M.; MOTA, T.R.; OLIVA, B.; SEGATO, F.; MARCHIOSI, R.; FERRARESE-FILHO, O.; FAULDS, C.B.; DOS SANTOS, W.D. Feruloyl esterases: Biocatalysts to overcome biomass recalcitrance and for the production of bioactive compounds. **Bioresource Technology**, v. 278, p. 408–423, 2019.

PALONEN, H. Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. VTT Technical Research Centre of Finland, 2004.

PAREEK, N.; GILLGREN, T.; JONSSON, L.J. Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicelluloses. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 70–77, 2013.

PARK, Y.C.; KIM, J.S. Comparison of various alkaline pretreatment methods of lignocellulosic biomass. **Energy**, v. 47, n. 1, p. 31–35, 2012.

PAZ-CEDENO, F.R.; HENARES, L.R.; SOLORZANO-CHAVEZ, E.G.; SCONTRI, M.; PICHELI, F.P.; ROLD, I..U.M.; MONTI, R.; OLIVEIRA, S.C.; MASATIN, F. Evaluation of the effects of different chemical pretreatments in sugarcane bagasse on the response of enzymatic hydrolysis in batch systems subject to high mass loads. **Renewable Energy**, v. 165, p. 1–13, 2021.

PERRONE, O.M.; MORETTI, M.M.S.; BORDIGNON, S.E.; PEREIRA, J.C.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; BOSCOLO, M. Improving cellulosic ethanol production using ozonolysis and acid as a sugarcane biomass pretreatment in mild conditions. **Bioresource Technology Reports,** v. 13, p. 100628, 2021.

PRAJAPATI, B.P.; JANA, U.K.; SURYAWANSHI, R.K.; KANGO, N. Sugarcane bagasse saccharification using Aspergillus tubingensis enzymatic cocktail for 2G bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 152, p. 653–663, 2020.

PUCHART, V.; GJERMANSEN, M.; MASTIHUBOVÁ, M.; MØRKEBERG KROGH, K.B.R.; BIELY, P. Positional specificity of Flavobacterium johnsoniae acetylxylan esterase and acetyl group migration on xylan main chain. **Carbohydrate Polymers**, v. 232, p. 115783, 2020.

PUCHART, V.; MØRKEBERG KROGH, K.B.R.; BIELY, P. Glucuronoxylan 3-Oacetylated on uronic acid-substituted xylopyranosyl residues and its hydrolysis by GH10, GH11 and GH30 endoxylanases. **Carbohydrate Polymers**, v. 205, p. 217–224, 2019.

RABEMANOLONTSOA, H.; SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 83–91, 2016.

RAHIKAINEN, J.L.; EVANS, J.D.; MIKANDER, S.; KALLIOLA, A.; PURANEN, T.; TAMMINEN, T.; MARJAMAA, K.; KRUUS, K. Cellulase-lignin interactions. The role of carbohydrate-binding module and pH in non-productive binding. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 5, p. 315–321, 2013a.

RAHIKAINEN, J.L.; MARTIN-SAMPEDRO, R.; HEIKKINEN, H.; ROVIO, S.; MARJAMAA, K.; TAMMINEN, T.; ROJAS, O.J.; KRUUS, K. Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: The effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 270–278, 2013b.

122

RAMOS, L.P.; SILVA, L; BALLEM, A.C.; PITARELO, A.P.; CHIARELLO, L.M.; SILVEIRA, M.H.L. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 195–202, 2015.

RAMOS, L.P.; SUOTA, M.J.; FOCKINK, D.H.; PAVANELI, G.; SILVA, T.A.; LUKASIK, R.M. Enzymes and biomass pretreatment, p. 61 – 100, 2020.

REINOSO, F.A.M.; RENCORET, J.; GUTIÉRREZ, A.; MILAGRES, A.M.F.; DEL RIO, J. C.; FERRAZ, A. Fate of p-hydroxycinnamates and structural characteristics of residual hemicelluloses and lignin during alkaline-sulfite chemithermomechanical pretreatment of sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2018.

ROCHA-MARTÍN, J.; MARTINEZ-BERNAL, C.; PÉREZ-COBAS, Y.; REYES-SOSA, F. M.; GARCÍA, B.D. Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 48–56, 2017.

RODRIGUES, A.C.; HAVEN, M.Ø.; LINDEDAM, J.; FELBY, C.; GAMA, M. Cellic ® Cellic CTec2 : Saccharification / fermentation of wheat straw , solid – liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 80, p. 70–77, 2015.

SAINI, J.K.; PATEL, A.K.; ADSUL, M.; SINGHANIA, R.R. Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass. **Renewable Energy**, v. 98, p. 29–42, 2016.

SAMMOND, D.W.; YARBROUGH, J. M.; MANSFIELD, E.; BOMBLE, Y.J.; HOBDEY, S. E.; DECKER, S. R.; TAYLOR, L. E.; RESCH, M. G.; BOZELL, J. J.; HIMMEL, M. E. Predicting enzyme adsorption to lignin films by calculating enzyme surface hydrophobicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 30, p. 20960–20969, 2014.

SANHUEZA, C.; CARVAJAL, G.; SOTO-AGUILAR, J.; LIENQUEO, M.E.; SALAZAR, O. The effect of a lytic polysaccharide monooxygenase and a xylanase from Gloeophyllum trabeum on the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues using a commercial cellulase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.113, p. 75–82, 2018.

SANTOS, F.A; QUEIRÓZ, J.H.; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A; GUIMARÃES, V.M. Potencial da palha de cana-de-aucar para produção de etanol. **Quimica nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SANTOS, M.P.; REINOSO, F.A.M.; TÁVILLA, V.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. On-site produced and commercially available alkali-active xylanases compared for xylan extraction from sugarcane bagasse. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, p. 101081, 2019.

SCARCELLA, A.S.A.; PASIN, T.M.; OLIVEIRA, T.B; DE LUCAS, R,C.; FERREIRA-NOZAWA, M.S.; FREITAS, E.N.; VICI, A.C.; BUCKERIDGE, M.S.; MICHELIN, M.; POLIZELI, M.L.T.M. Saccharification of different sugarcane bagasse varieties by enzymatic cocktails produced by Mycothermus thermophilus and Trichoderma reesei RP698 cultures in agro-industrial residues. **Energy**, v. 226, p. 120360, 2021.

SEIDL, P.R.; GOULART, A.K. Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 2, p. 48–53, 2016.

SELIG, M.J.; ADNEY, W.S.; HIMMEL, M.E.; DECKER, S.R. The impact of cell wall acetylation on corn stover hydrolysis by cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 711–722, 2009.

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

SHARMA, M.; MAHAJAN, C.; BHATTI, M. S.; CHADHA, B. S. Profiling and production of hemicellulases by thermophilic fungus Malbranchea flava and the role of xylanases in improved bioconversion of pretreated lignocellulosics to ethanol. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016.

SHENG, Y.; LAM, S.S.; WU, Y.; GE, S.; WU, J.; CAI, L.; HUANG, Z.; LE, Q.; VAN, SONNE, C.; XIA, C. Enzymatic conversion of pretreated lignocellulosic biomass: A review on influence of structural changes of lignin. **Bioresource Technology**, v. 324, p. 124631, 2021.

124

SILVEIRA, M.H L.; SIIKA-AHO, M.; KRUUS, K.; GARRIDA, L.M.; RAMOS, L.P. The essential role of plant cell wall degrading enzymes in the success of biorefineries: current status and future challenges. **Biofuels in Brazil**, p. 151-172, 2014.

SINGH, A.; RODRÍGUEZ JASSO, R.M.; GONZALEZ-GLORIA, K.D.; ROSALES, M.; BELMARES CERDA, R.; AGUILAR, C.N.; SINGHANIA, R.R.; RUIZ, H.A. The enzyme biorefinery platform for advanced biofuels production. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100257, 2019.

SINGH, R.; SHUKLA, A.; TIWARI, S.; SRIVASTAVA, M. A review on deligni fi cation of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p. 713–728, 2014.

SIQUEIRA, G.; ARANTES, V.; SADDLER, J.N.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F Limitation of cellulose accessibility and unproductive binding of cellulases by pretreated sugarcane bagasse lignin. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, n. 1, p. 176, 2017.

SIQUEIRA, G.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W.; KOCH, G.; FERRAZ, A. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnology for Biofuels**, p. 2–10, 2011.

SISTA KAMESHWAR, A.K.; QIN, W. Understanding the structural and functional properties of carbohydrate esterases with a special focus on hemicellulose deacetylating acetyl xylan esterases. **Mycology**, v. 9, n. 4, p. 273–295, 2018.

SONG, H.; GAO, Y.; YANG, Y.; XIAO, W.; LIU, S.; XIA, W.; LIU, Z.; YI, L.; JIANG, Z. Bioresource Technology Synergistic effect of cellulase and xylanase during hydrolysis of natural lignocellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 710–715, 2016.

SUN, F.F.; HONG, J.; HU, J.; SADDLER, J.N.; FANG, X.; ZHANG, Z.; SHEN, S. Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 79–80, p. 42–48, 2015.

SUN, F.H.; LI, J.; YUAN, Y.X; YAN, Z.Y.; LIU, X.F. Effect of biological pretreatment with Trametes hirsuta yj9 on enzymatic hydrolysis of corn stover. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 7, p. 931–938, 2011.

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

TU, T.; LI, X.; MENG, K.; BAI, Y.; WANG, Y.; WANG, Z.; YAO, B.; LUO, H. A GH51 α-l-arabinofuranosidase from Talaromyces leycettanus strain JCM12802 that selectively drives synergistic lignocellulose hydrolysis. **Microbial. Cell Factories**, v. 18, p. 1–12, 2019.

UNDERLIN, E.N.; FROMMHAGEN, M.; DILOKPIMOL, A.; VAN ERVEN, G.; DE VRIES, R.P.; KABEL, M.A. Feruloyl Esterases for Biorefineries: Subfamily Classified Specificity for Natural Substrates. **Front. Bioeng. Biotechnol**, v. 8, p. 1–17, 2020

URAJI, M.; TAMURA, H.; MIZOHATA, E.; ARIMA, J.; WAN, K.; OGAWA, K.; INOUE, T.; HATANAKA, T. Loop of Streptomyces feruloyl esterase plays an important role in the enzyme's catalyzing the release of ferulic acid from biomass. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 3, p. 1–13, 2018.

VALADARES, F.; GONÇALVES, T.A.; GONÇALVES, D.S.P.O.; SEGATO, F.; ROMANEL, E.; MILAGRES, A.M.F.; SQUINA, F.M.; FERRAZ, A.. Exploring glycoside hydrolases and accessory proteins from wood decay fungi to enhance sugarcane bagasse saccharification. **Biotechnology. Biofuels,** v. 9, p. 1–12, 2016.

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

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

VÁRNAI, A.; COSTA, T.H.; FAULDS, C.B.; MILAGRES, A.M.F.; SIIKA-AHO, M.; FERRAZ, A. Effects of enzymatic removal of plant cell wall acylation (acetylation, p-coumaroylation, and feruloylation) on accessibility of cellulose and xylan in natural (non-pretreated) sugar cane fractions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 153, 2014.

VÁRNAI, A.; HUIKKO, L.; PERE, J.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. **Bioresource Technology**, n. 102, v. 19, p. 9096–9104, 2011.

VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Carbohydrate-binding modules (CBMs) revisited: reduced amount of water counterbalances the need for CBMs. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 30, 2013.

WAN, C.; LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1447–1457, 2012.

WILKENS, C.; ANDERSEN, S.; DUMON, C.; BERRIN, J.G.; SVENSSON, B. GH62 arabinofuranosidases: Structure, function and applications. **Biotechnology. Advances**, v. 35, p. 792–804, 2017.

WU, H.; LI, H.; XUE, Y.; LUO, G.; GAN, L.; LIU, J.; MAO, L.; LONG, M. High efficiency co-production of ferulic acid and xylooligosaccharides from wheat bran by recombinant xylanase and feruloyl esterase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 120, p 41–48, 2017.

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

YANG, J., MA, T., SHANG-GUAN, F., HAN, Z. Improving the catalytic activity of thermostable xylanase from Thermotoga maritima via mutagenesis of non-catalytic residues at glycone subsites. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 139, p. 109579, 2020.

YANG, J.; KIM, J.E.; KIM, H.E.; YU, J.H.; CHA, Y.L.; KIM, K.H. Enhanced enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated empty fruit bunches at high solids loadings by the synergism of hemicellulase and polyethylene glycol. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 211–216, 2017.

ZHANG, J.; VIIKARI, L. Bioresource Technology Xylo-oligosaccharides are competitive inhibitors of cellobiohydrolase I from Thermoascus aurantiacus. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 286–291, 2012.

ZHANG, K.; PEI, Z.; WANG, D. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 21–33, 2016.

ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Toward agragated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 797-824, 2004.

ZHU, J.Y.; PAN, X.J.; WANG, G.S.; GLEISNER, R. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. **Bioresource technology**, v. 100, n. 8, p. 2411–8, 2009.