

ROSILENE SOUZA RODRIGUES

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E
HEMICELULASES DO FUNGO DA PODRIDÃO-BRANCA *Pycnoporus*
sanguineus PF-2**

Tese apresentada a Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R696p
2014
Rodrigues, Rosilene Souza, 1983-
Produção, purificação e caracterização de celulases e
hemicelulases do fungo da podridão branca *Pycnoporus
sanguineus* PF-2 / Rosilene Souza Rodrigues. – Viçosa, MG,
2014.
xi,146f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sebastião Tavares de Rezende.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Biocombustíveis. 2. Biomassas lignocelulósicas. 3.
Pycnoporus sanguineus. 4. *Chrysoportha cubensis*.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em
Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 665.776

ROSILENE SOUZA RODRIGUES

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E
HEMICELULASES DO FUNGO DA PODRIDÃO-BRANCA *Pycnoporus
sanguineus* PF-2**

Tese apresentada a Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 20 de fevereiro de 2014.

Valéria Monteze Guimarães
(Coorientadora)

Monique Renon Eller

Wendel Batista da Silveira

Larissa Mattos Trevizano

Sebastião Tavares de Rezende
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu amado Deus, que com seu amor incondicional e sua imensa graça tem me dado forças para enfrentar todos os obstáculos da vida e tem sempre me guiado nos melhores caminhos.

À minha Mãe Arlete e ao meu Pai José, por tudo o que fizeram por mim, me permitindo chegar até aqui.

Aos meus irmãos Luciano e Sirlene, pela amizade, pelo incentivo e pela presença constante em minha vida.

Aos meus sobrinhos Davi e Lucas, que foram verdadeiros anjos em minha vida, me proporcionando muitos momentos de felicidade e descontração, mesmo nos momentos difíceis e de certa tristeza.

Ao meu noivo Felipe, por todo seu amor, companheirismo e compreensão. Por ser meu exemplo de coragem, força e determinação.

Ao meu orientador Prof. Sebastião Tavares de Rezende, pelos ensinamentos, pela paciência e amizade durante toda a minha trajetória na pós-graduação.

A minha co-orientadora Prof.^a Valéria Monteze Guimarães pelos conselhos, conhecimentos, amizade e por me incentivar a melhorar sempre.

Aos professores Wendel Batista da Silveira, Monique Renon Eller e Larissa Mattos Trevizano, pela participação na banca e pelas correções e sugestões que contribuíram muito para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao professor Humberto Josué de Oliveira Ramos pela contribuição com as análises de espectrometria de massa.

Ao professor José Ivo Ribeiro Júnior e Luiz Alexandre Peternelli pela contribuição com as análises estatísticas.

Aos Profs. Domício do Nascimento Jr., Márcio Henrique Pereira Barbosa e José Lívio Gomide, por terem gentilmente cedido às biomassas utilizadas neste trabalho.

Ao professor Jorge Luiz Colodette e ao José Mauricio Lino por realizarem a análise química dos bagaços de cana utilizados neste trabalho.

Ao estagiário e aluno de iniciação científica Gabriel Cabral Barros por ter contribuído com a realização deste trabalho.

Aos amigos Lílian Fialho, Tiago Leal e Evan Visser pela construtiva troca de experiências e conhecimentos, além da ajuda na execução de algumas análises.

Aos amigos do Laboratório de Análises Bioquímicas e Laboratório de Tecnologia Bioquímica pela convivência e aprendizado diários.

Ao secretário da Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, Eduardo Monteiro, por todas as orientações, pela sua eficiência e boa vontade em nos ajudar.

A todos os funcionários e colegas do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, pela boa convivência.

A todos os professores do curso de Bioquímica e do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, pelos conhecimentos a mim transmitidos.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, pela oportunidade concedida para a realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro aos projetos.

BIOGRAFIA

ROSILENE SOUZA RODRIGUES, filha de José Rodrigues Leocádio e Arlete Souza Leocádio, nasceu em Ipatinga, Minas Gerais, no dia 12 de julho de 1983. Fez o ensino fundamental no Colégio Municipal Altina Olívia Gonçalves e o ensino médio no Colégio São Francisco Xavier, em Ipatinga, concluindo-os em novembro de 2001.

Em janeiro de 2007, graduou-se como Bacharel em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Durante o período de graduação fez iniciação científica no Laboratório de Celulose e Papel.

Em abril de 2009 defendeu a dissertação de mestrado em Bioquímica Agrícola na Universidade Federal de Viçosa.

Iniciou o Programa de doutorado em Bioquímica Agrícola em agosto de 2009, na Universidade Federal de Viçosa. Submetendo-se à defesa de tese em 20 de fevereiro de 2014.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. Introdução Geral.....	1
2. Objetivos Gerais.....	4
Capítulo 1 – Revisão de literatura.....	5
1. Panorama energético.....	6
2. Etanol: o principal biocombustível do mercado.....	9
3. Biomassa lignocelulósica: fonte de bioenergia.....	14
4. A natureza química da biomassa lignocelulósica.....	15
4.1. Celulose.....	16
4.2. Hemicelulose.....	17
4.3. Lignina.....	19
5. Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica.....	20
5.1. Celulases.....	20
5.2. Hemicelulases.....	24
6. Produção de etanol de biomassa lignocelulósica.....	24
6.1. Pré-tratamentos.....	25
6.2. Sacarificação enzimática.....	29
6.3. Fermentação.....	32
7. Produção de enzimas.....	34
8. Basideomicetos causadores da podridão-branca.....	37
9. Referências bibliográficas.....	39
Capítulo 2 - Otimização da produção de celulasas e xilanase pelo fungo da podridão-branca <i>Pycnoporus sanguineus</i> PF-2 e sua aplicação na sacarificação do bagaço de cana.....	48
RESUMO.....	49
1. Introdução.....	50
2. Materiais e métodos.....	51
2.1. Materiais.....	51
2.2. Microrganismo e condições de cultivo.....	51

2.3. Ensaio enzimáticos.....	52
2.4. Seleção da fonte de carbono e de nitrogênio.....	52
2.5. Otimização do processo fermentativo.....	53
2.5.1. <i>Screening</i> dos fatores.....	53
2.5.2. Delineamento composto central rotacional (DCCR).....	55
2.5.3. Análises estatísticas.....	56
2.6. Caracterização bioquímica das enzimas.....	57
2.7. Sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.....	57
3. Resultados e discussões.....	58
3.1. Seleção da fonte de carbono e nitrogênio.....	58
3.2. Otimização do processo fermentativo.....	62
3.2.1. Delineamento fatorial fracionado.....	62
3.2.2. Delineamento composto central rotacional (DCCR).....	63
3.3. Caracterização bioquímica das enzimas.....	66
3.4. Sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.....	71
4. Conclusões.....	74
5. Referências bibliográficas.....	75

Capítulo 3 - Estratégias para a obtenção de coquetéis enzimáticos para sacarificação de biomassa: fermentação em estado sólido, fermentação submersa e sinergismo.....80

RESUMO.....	81
1. Introdução.....	82
2. Materiais e métodos.....	84
2.1. Materiais.....	84
2.2. Microrganismo e preparo do inóculo.....	85
2.3. Condições de cultivo.....	85
2.3.1. Fermentação em estado sólido (FES).....	85
2.3.2. Fermentação submersa (FS).....	86
2.4. Ensaio enzimáticos.....	86
2.5. Determinação de proteína.....	88
2.6. Preparo dos coquetéis enzimáticos e análise de sinergismo.....	88
2.7. Hidrólise enzimática do bagaço de cana.....	89
3. Resultados e discussões.....	90

3.1. Produção das enzimas em FES e em FS.....	90
3.2. Formulação dos coquetéis enzimáticos e análise de sinergismo.....	94
3.3. Aplicação do coquetel enzimático.....	98
4. Conclusões.....	102
5. Referências bibliográficas.....	103

Capítulo 4 - Purificação, caracterização e modo de ação do complexo celulásico produzido pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* PF-2.....108

RESUMO.....	109
1. Introdução.....	110
2. Materiais e métodos.....	112
2.1. Materiais.....	112
2.2. Microrganismo, condições do cultivo e produção enzimática.....	112
2.3. Ensaio enzimáticos.....	112
2.4. Determinação de proteínas.....	113
2.5. Purificação do complexo CMCcase.....	113
2.6. Análises por SDS-PAGE, gel nativo e zimograma.....	114
2.7. Digestão das proteínas e identificação por espectrometria de massas (MS).....	114
2.8. Efeito do pH e temperatura.....	116
2.9. Estudos cinéticos.....	116
2.10. Efeito de íons e agentes redutores.....	116
2.11. Especificidade por substratos.....	117
2.12. Hidrólise do CMC.....	117
3. Resultados e discussões.....	118
3.1. Purificação do complexo CMCcase.....	118
3.2. Análise de espectrometria de massa.....	123
3.3. Efeito do pH e temperatura.....	125
3.4. Efeito de íons e outros reagentes.....	129
3.5. Especificidade por substratos.....	132
3.6. Parâmetros cinéticos.....	135
3.7. Hidrólise do CMC.....	135
4. Conclusões.....	137
5. Referências bibliográficas.....	138
CONCLUSÕES GERAIS.....	145

RESUMO

RODRIGUES, Rosilene Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Produção, purificação e caracterização de celulases e hemicelulases do fungo da podridão-branca *Pycnoporus sanguineus* PF-2.** Orientador: Sebastião Tavares de Rezende. Coorientadores: Valéria Monteze Guimarães e Luciano Gomes Fietto.

Neste trabalho, o processo de produção de celulases e hemicelulases pelo fungo da podridão-branca *Pycnoporus sanguineus* PF-2 visando a sua aplicação na sacarificação do bagaço de cana foi estudada. Inicialmente, o meio de cultura para a produção de celulases e xilanase foi otimizado a partir das metodologias Fatorial Fracionado 2⁵⁻¹ (resolução V) seguido por um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Para a máxima produção de endoglicanase (16,42 U/mL), FPase (0,38 U/mL) e xilanase (111,03 U/mL), os valores ótimos para os fatores concentração de forrageira, concentração de peptona e concentração de ZnSO₄ foram 4 % (m/v), 2 % (m/v) e 12,5 mg/L, respectivamente. Já os valores ótimos para o tempo de cultivo foi 186,1 h para endoglicanase, 180 h para FPase e 185,1 h para xilanase. Para atividade celobiase, a máxima produção (0,35 U/mL) ocorreu quando os fatores concentração de forrageira, concentração de peptona e tempo de cultivo foram 4 % (m/v), 2 % (m/v) e 60 h. As atividades de endoglicanase, celobiase e xilanase produzidas apresentaram máximas atividades entre 55 e 65 °C e em pH entre 4,0 e 5,5. Endoglicanase e xilanase retiveram mais de 50 % de atividade residual após 13 h de incubação a 60 °C. O extrato bruto otimizado foi aplicado na sacarificação do bagaço de cana, convertendo 17,4 % da celulose em glicose após 76 h. Em sequência, a fim de se obter maiores rendimentos na hidrólise do bagaço de cana, o extrato enzimático de *P. sanguineus*, produzido em fermentação submersa (FS), e o extrato enzimático de *C. cubensis*, produzido em fermentação em estado sólido (FES), foram misturados em diferentes proporções e avaliados quanto à ocorrência de sinergismos entre as enzimas presentes nestes extratos. Os coquetéis produzidos a partir de uma simples mistura dos extratos enzimáticos destes fungos não apresentaram nenhum efeito sinérgico positivo. Contudo, quando esta mistura foi realizada de forma não convencional, ou seja, durante a extração enzimática das enzimas produzidas na FES, observou-se grandes efeitos sinérgicos sobre as atividades das enzimas FPase, exoglicanase, celobiase, β-glicosidase, xilanase, β-

xilosidase e α -arabinofuranosidase. Os aumentos obtidos nas atividades enzimáticas destas enzimas foram de 52,2 %, 9,2 %, 62 %, 26,5 %, 12,2 %, 56,2 % e 18,4 %, respectivamente. O coquetel produzido a partir desta mistura não convencional dos extratos enzimáticos de *P. sanguineus* e *C. cubensis* foi aplicado na sacarificação do bagaço de cana e altos rendimentos de conversão de glicana e xilana foram alcançados. Quando utilizou-se uma carga enzimática de 10 FPU/g, foram obtidos rendimentos de 85 % e 95% de conversão de glicana e xilana, respectivamente. Já quando uma carga de 5 FPU/g foi utilizada, os rendimentos foram de 68 % e 85 % para conversão de glicana e xilana, respectivamente. Por fim, um novo complexo celulásico, CMCCase, produzido pelo fungo *P. sanguineus*, foi purificado e caracterizado cinético e bioquimicamente. O complexo CMCCase purificado é composto por duas endoglicanases, sendo uma pertencente a família GH10 e outra com homologia parcial às proteínas TLs (Thaumatinas-like) e ainda sem classificação; além de duas celobiohidrolases, GH6 e GH7. A endoglicanase GH10 possui massa molecular de 35,9 kDa. A endoglicanase sem classificação e a celobiohidrolase GH6 possuem massas moleculares de 42 kDa, já a celobiohidrolase GH7 possui massa molecular de 52,7 kDa. O complexo CMCCase foi bastante termoestável, com temperatura ótima de atividade a 70°C, e apresentando meia-vida de 57,2 h a 50°C. Além disso, apresentou altas atividades em uma ampla faixa de pH (3,5-5,5) e temperatura (50-75°C). Os valores de K_M e V_{max} foram de 45,72 mg/mL e 7 μ mol/min, respectivamente. Foi verificado que os íons metálicos Fe^{3+} , Ag^{3+} , Hg^{2+} e Cu^{2+} e os reagentes SDS, furfural, HMF e ácido acético apresentam efeito inibitório sobre a atividade enzimática do complexo CMCCase. Foi observado também que complexo CMCCase possui maior especificidade pelo substrato *barley*- β -glicano e pelas hemiceluloses xilana *birchwood* e *locust bean gum*, apresentando também altas atividades sobre estes substrato. Além disso, o complexo CMCCase foi aplicado na hidrólise do CMC e verificou-se uma grande formação de glicose e celobiose com o decorrer do tempo, sugerindo uma clivagem assimétrica dos oligossacarídeos maiores produzidos, ou seja, o complexo CMCCase cliva preferencialmente em regiões mais externas dos oligossacarídeos maiores.

ABSTRACT

RODRIGUES, Rosilene Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Production, purification and characterization of cellulases and hemicellulases from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus* PF-2.** Adviser: Sebastião Tavares de Rezende. Co-Advisers: Valerie Monteze Guimarães and Luciano Gomes Fietto.

In this work, the process of cellulases and hemicellulases production by white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus* PF- 2 targeting its application in sugarcane bagasse saccharification was evaluated. Initially, the culture medium for the production of cellulase and xylanase was optimized using methods of Fractional Factorial 2^{5-1} (Resolution V) followed by a Rotational Central Composite Design (RCCD). For maximum production of endoglucanase (16.42 U/mL), FPase (0.38 U/ml) and xylanase (111,03 U/ml), the optimum values for the factors forage concentration, peptone concentration and $ZnSO_4$ concentration were 4 % (w/v), 2 % (w/v) and 12.5 mg/L, respectively. The optimal values for the cultivation time were 186.1 h for endoglucanase, 180 h for FPase and 185.1 h for xylanase. For cellobiase activity, the highest yield (0.35 U/ml) comes when the forage concentration, concentration peptone and cultivation time were 4 % (w/v), 2 % (w/v) and 60 h. The endoglucanase, cellobiase and xylanase activities produced presented maximal activity between 55 and 65°C and pH between 4.0 and 5.5. Endoglucanase and xylanase retained more than 50 % of residual activity after 13 h of incubation at 60°C. The optimized crude extract was applied to the sugarcane bagasse saccharification, converting 17.4 % of cellulose into glucose after 76 h. Following, in order to obtain higher yields in the hydrolysis of sugarcane bagasse, the enzymatic extract of *P. sanguineus* produced in Submerged Fermentation (SF) and enzyme extract of *C. cubensis* produced in Solid State Fermentation (SSF) were blended in different proportions and evaluated in relation to the appearance of synergism between the enzymes present in these extracts. The cocktails made from a simple enzymatic extracts mixture of these fungi showed no positive synergistic effect. However, when this mixture was carried out in an unconventional way, i.e., during the enzymatic extraction of enzymes produced in the FES, we observed large synergistic effects on the activities of enzymes FPase, exoglicanase, cellobiase, β -

glucosidase, xylanase, β -xylosidase and α -arabinofuranosidase. The increases obtained in the enzymes activities were 52.2 %, 9.2 %, 62 %, 26.5 %, 12.2 %, 56.2 % and 18.4 %, respectively. The cocktail produced from this unconventional mixture of *P. sanguineus* and *C. cubensis* enzymatic extracts was applied to the sugarcane bagasse saccharification and high conversion yields of glucan and xylan were achieved. When used an enzymatic load of 10 FPU/g, conversion yields of 85 % and 95 % for glucan and xylan, respectively, were obtained. When an enzymatic load was 5 FPU/g, the conversion yields were 68 % and 85 % for glucan and xylan, respectively. Also, a new cellulosic complex CMCCase produced by the *P. sanguineus* fungus was purified and characterized kinetically and biochemically. The purified CMCCase complex consists of two endoglucanases, one GH10 (EG1) and another with partial homology to TLs proteins and unrated (EG2), and two cellobiohydrolases, GH6 and GH7. The EG1 endoglucanase has a molecular mass of 35.9 kDa, the EG2 endoglucanase and the GH6 cellobiohydrolase have molecular masses of 42 kDa, and the cellobiohydrolase GH7 has molecular mass of 52.7 kDa. The CMCCase complex was very thermostable, with optimal temperature of activity at 70 °C and half-life of 57.2 h at 50 °C. Furthermore, showed high activities in a broad range of pH (3.5-5.5) and temperature (50-75°C). The values of K_M and V_{max} were 45.72 mg/ml and 7 μ mol/min, respectively. It was found that the metallic ions Fe^{3+} , Ag^{3+} , Hg^{2+} and Cu^{2+} and the reagents SDS, furfural, HMF and acetic acid have inhibitory effect on the enzymatic activity of the CMCCase complex. It was also observed that the CMCCase complex has high specificity for the barley- β -glucan substrate and the birchwood xylan and locust bean gum hemicelluloses, also showing high activity on this substrate. Furthermore, the CMCCase complex was applied to the hydrolysis of CMC and a large glucose and cellobiose formation was observed during the time, suggesting an asymmetric cleavage of the larger oligosaccharides produced, in other words, the CMCCase complex cleaves preferentially at the outer regions of the larger oligosaccharides chain.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os incessantes aumentos no preço do petróleo, as perspectivas de esgotamento das reservas, os riscos geopolíticos decorrentes da dependência do petróleo de países politicamente instáveis e os compromissos mais sólidos com a questão ambiental fizeram renascer a atenção nas fontes alternativas de energia. Neste contexto, a busca por fontes renováveis de energia e de alternativas ao uso do petróleo está mobilizando internacionalmente setores acadêmicos, industriais, sociais e governamentais com ênfase no desenvolvimento de processos biotecnológicos de menor impacto ambiental.

O Brasil foi um dos países pioneiros na produção de biocombustíveis. Na década de 70, a fim de diminuir a dependência política e econômica dos países produtores de petróleo, o Brasil iniciou um programa para substituir a gasolina por etanol. Neste programa, denominado Proálcool, a cana de açúcar foi a matéria-prima escolhida, e como consequência, estudos agrícolas e tecnológicos foram altamente intensificados, levando o Brasil a uma posição favorável na produção deste biocombustível.

Contudo, deve-se notar que, atualmente, apenas uma parte da cana de açúcar é utilizada para a produção de bioenergia, já que um terço da planta é utilizado para a produção de etanol, um terço é o bagaço, que é queimado para a produção de eletricidade e o restante, palha e folhas, é deixado no campo, onde é decomposto por microrganismo e utilizado como adubo. Assim, para atender ao aumento da demanda e ampliar a produção de etanol, sem aumentar a área de cultivo, é necessário o desenvolvimento de tecnologias que utilizam a biomassa lignocelulósica residual, as quais representam dois terços da cana de açúcar (bagaço e a palha). As principais vantagens do uso da biomassa na produção de etanol são que estes resíduos são de baixo custo e sua produção não compete por terras férteis para a produção de alimentos, uma vez que permite maior rendimento de etanol por hectare de terra plantada.

Assim, o grande desafio dos pesquisadores para as próximas décadas será a criação de uma tecnologia para a produção de etanol de biomassas lignocelulósicas (etanol de segunda geração) que seja competitivo economicamente com o etanol produzido atualmente no mercado. Entretanto, existe uma barreira a ser superada na viabilização da produção deste novo bioetanol que é a quebra da estrutura rígida e

cristalina da parede vegetal da biomassa lignocelulósica. De forma geral, a produção do etanol de segunda geração pode ser dividida em três etapas cruciais: (1) o pré-tratamento, que consiste na aplicação de tratamentos físicos e químicos com o objetivo de diminuir o teor de lignina e, assim, diminuir a cristalinidade do complexo lignocelulósico, tornando a celulose mais acessível à sacarificação; (2) a sacarificação enzimática, na qual ocorre a despolimerização da celulose por enzimas hidrolíticas para produzir açúcares livres; (3) fermentação, na qual a glicose resultante é transformada em etanol por microrganismos fermentadores.

Entretanto, em todas estas etapas ainda existem grandes gargalos tecnológicos que precisam ser superados para tornar o processo de produção do etanol de segunda geração viável, entre eles estão a geração de inibidores da fermentação durante a etapa de pré-tratamentos físico-químicos e o problema da inibição da hidrólise enzimática pelos produtos finais da reação, glicose e celobiose, que aliado ao alto preço das enzimas comerciais utilizadas interfere diretamente na inviabilidade financeira do processo. Além disso, a falta de um microrganismo que fermenta eficientemente tanto a glicose quanto a xilose e que tenha alguma tolerância aos inibidores presentes no meio reacional diminui o rendimento final em etanol. Diversos estudos estão sendo realizados incessantemente no sentido de superar estes gargalos e a perspectiva é que já nas próximas décadas o etanol de segunda geração seja produzido comercialmente.

Com relação à sacarificação enzimática, várias pesquisas se voltam ao descobrimento de novas celulasas e hemicelulasas com alta eficiência hidrolítica, estáveis e que tenham baixo custo. Para esta proposta várias estratégias podem ser utilizadas, como por exemplo, estudos com novos organismos produtores de enzimas lignocelulolíticas, avaliação de diferentes sistemas de cultivo, avaliação de coquetéis enzimáticos que contenham todas as atividades necessárias com uma composição de proteínas pré-definida, estudos com reciclagem de enzimas, utilização de resíduos agropecuários como fontes de carbono para a produção das enzimas, entre outras. Esta última estratégia pode reduzir e os custos de produção destas enzimas e, além disso, estudos recentes já demonstraram a importância da composição das biomassas residuais na indução das enzimas lignocelulolíticas pelos microrganismos.

Atualmente, as preparações comerciais de celulasas são produzidas principalmente pelos fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*; entretanto, apesar de diversos estudos voltados para estes gêneros ou para outros

ascomicetos, o uso destes extratos enzimáticos ainda onera bastante o processo de sacarificação enzimática. Os fungos basidiomicetos da podridão branca são eficientes decompositores de biomassas lignocelulósicas devido a sua capacidade em sintetizar inúmeras enzimas hidrolíticas importantes, como celulases, hemicelulases, lacases, manganês peroxidases, entre outras. Estes fungos já são muito conhecidos na literatura por produzir eficientes enzimas lignolíticas para a aplicação no branqueamento de polpas de madeira para a produção de papel. Entretanto, ainda existem poucos trabalhos que avaliam o seu potencial em produzir celulases e hemicelulases para aplicação na sacarificação da biomassa lignocelulósica para produção de etanol, o que seria uma proposta bastante interessante, já que são reconhecidos quanto ao seu potencial em produzir enzimas lignolíticas e que a remoção da lignina do complexo lignocelulósico facilita o acesso das celulases e hemicelulases, aumentando o rendimento da sacarificação.

Visando contribuir com a resolução de alguns dos problemas encontrados na etapa da sacarificação enzimática, neste trabalho foram realizados estudos de otimização da produção de celulases e hemicelulases pelo fungo basidiomiceto da podridão branca *Pycnoporus sanguineus* PF-2, além de uma caracterização cinético-bioquímica de um complexo celulásico produzido pelo fungo. Para finalizar, coquetéis enzimáticos contendo diferentes misturas dos extratos enzimáticos produzidos pelos fungos *Pycnoporus sanguineus* e *Chrysosporthe cubensis* foram analisados quanto ao seu potencial de atuarem sinergisticamente na hidrólise do bagaço de cana.

2. OBJETIVOS GERAIS

- Otimizar as condições de cultivo do fungo *Pycnoporus sanguineus* PF-2 para a produção de celulases e hemicelulases.
- Realizar a sacarificação do bagaço de cana utilizando o extrato otimizado do fungo.
- Purificar e caracterizar bioquímica e cineticamente um complexo celulásico produzido pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* PF-2 e estudar o seu modo de ação sobre o substrato carboximetilcelulose (CMC).
- Produzir coquetéis enzimáticos contendo diferentes misturas dos extratos produzidos pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* PF-2 e *Chrysosporthe cubensis* LPF-1, crescidos em diferentes sistemas de cultivo; e analisar a existência ou não de sinergismo entre as celulases e hemicelulases destes diferentes extratos.
- Avaliar o potencial destes coquetéis enzimáticos na sacarificação do bagaço de cana.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

1. PANORAMA ENERGÉTICO

A demanda projetada de energia no mundo aumentará 1,7% ao ano, de 2000 a 2030, quando alcançará 15,3 bilhões de toneladas equivalentes de petróleo (TEP, ou toe, na sigla internacional, em inglês) por ano, de acordo com o cenário base traçado pelo Instituto Internacional de Economia (MUSSA, 2003). Contraposto a essa realidade observamos as instabilidades políticas e sociais dos países produtores de petróleo, cujas reservas, dentro de algumas décadas, entrarão em depleção (GOLDEMBERG, 2004). Aliado a isto, a crescente preocupação com a preservação do meio ambiente, que tem sofrido um aumento do nível de poluentes, notadamente pelo gás carbônico (CO₂), em parte pela contribuição das emissões pelos motores movidos a combustíveis fósseis. Sabe-se que este gás é o maior responsável pelo efeito estufa e, conseqüentemente, pelo aquecimento global.

Foi perante este contexto que aconteceram várias conferências mundiais, como a Rio-92, Convenção do Clima, Convenção das Partes – COP, Rio +10, Conferência Mundial sobre Energias Renováveis, entre outras. Os temas principais destas conferências foram sempre o meio ambiente e o desenvolvimento, sendo que seus principais objetivos foram introduzir metas concretas de sustentabilidade e deixar explícito a necessidade de investimentos financeiros para se buscar o desenvolvimento sustentável (GUARDABASSI, 2006).

Durante a Terceira Convenção das Partes (COP 3), foi adotado o Protocolo de Quioto, o qual se constitui de um tratado internacional com compromissos mais rígidos para a redução da emissão dos gases que provocam o efeito estufa, considerados, de acordo com a maioria das investigações científicas, como causa do aquecimento global (UNITED NATIONS KYOTO PROTOCOL, 1997). A redução das emissões deverá acontecer em várias atividades econômicas. O protocolo estimula os países signatários a cooperarem entre si, através de algumas ações básicas, tais como: reformar os setores de energia e transportes; promover o uso de fontes energéticas renováveis; eliminar mecanismos financeiros e de mercado inapropriados aos fins da Convenção; limitar as emissões de metano no gerenciamento de resíduos e dos sistemas energéticos; e, proteger florestas e outros sumidouros de carbono.

No ano de 2004, foi realizada a Conferência Mundial sobre Energias Renováveis, em Bonn (Alemanha). Esta conferência teve por objetivo definir o caminho a ser seguido para expandir o uso de energias renováveis. Os 154 países participantes ratificaram a importância da utilização das energias renováveis como forma de garantir o desenvolvimento sustentável, aumentar o acesso a energia principalmente pelos pobres, reduzir as emissões de gases de efeito estufa e a poluição do ar (INTERNATIONAL CONFERENCE FOR RENEWABLE ENERGIES, 2004).

Pode-se constatar que a questão das energias renováveis e do desenvolvimento sustentável tem sido tema recorrente e uma preocupação internacional. Como definido pela Declaração de Brundtland (1987) os sistemas sustentáveis são aqueles capazes de “satisfazer as necessidades das gerações atuais sem comprometer as futuras, atendendo ao equilíbrio social e ecológico, bem como às necessidades dos mais pobres”; entretanto a dificuldade em determinar a sustentabilidade de um sistema energético é enorme e depende não apenas do recurso energético propriamente dito e sua origem, mas também da maneira como é empregado.

Neste contexto, as energias renováveis devem ser consideradas como uma grande oportunidade para redução das emissões de gases de efeito estufa e dos impactos ambientais associados, bem como para a geração de energia em comunidades isoladas, contribuindo para a melhoria das condições sócio-econômicas dessas regiões (GUARDABASSI, 2006). Assim, o emprego de energias renováveis implica vantagens em diversas áreas, tais como:

- ✓ Aumento da diversificação da matriz energética de um país e a redução da sua dependência de combustíveis fósseis. Desta maneira não se fica tão vulnerável às oscilações dos preços do petróleo e às instabilidades políticas dos países produtores (COELHO, 2005).
- ✓ Redução dos gastos com importação de petróleo. No Brasil, com a implementação do Programa do Álcool o país economizou, entre 1975 e 2002, US\$ 52,1 bilhões em divisas (GOLDEMBERG et al., 2003).
- ✓ É uma das maneiras de reduzir a emissão de gases de efeito estufa, além de auxiliar na redução dos impactos ambientais locais, regionais e globais. A biomassa sustentável, bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo, apresenta

balanço nulo de emissões, pois as emissões resultantes da queima do bagaço são absorvidas e fixadas pela planta durante o seu crescimento.

- ✓ A geração de empregos diretos e indiretos, o que promove um ciclo virtuoso de aumento dos níveis de consumo e qualidade de vida, inclusão social, geração de mais atividades econômicas, fortalecimento da indústria local, promoção do desenvolvimento regional e a redução do êxodo rural (GOLDEMBERG, 2002).

A Figura 1 apresenta a evolução do consumo de energia primária no mundo, desde meados do século XIX, quando a Revolução Industrial deu início ao consumo dos combustíveis fósseis, e propõe um cenário para o ano 2100, no qual as energias renováveis serão as maiores responsáveis pelo suprimento das necessidades energéticas.

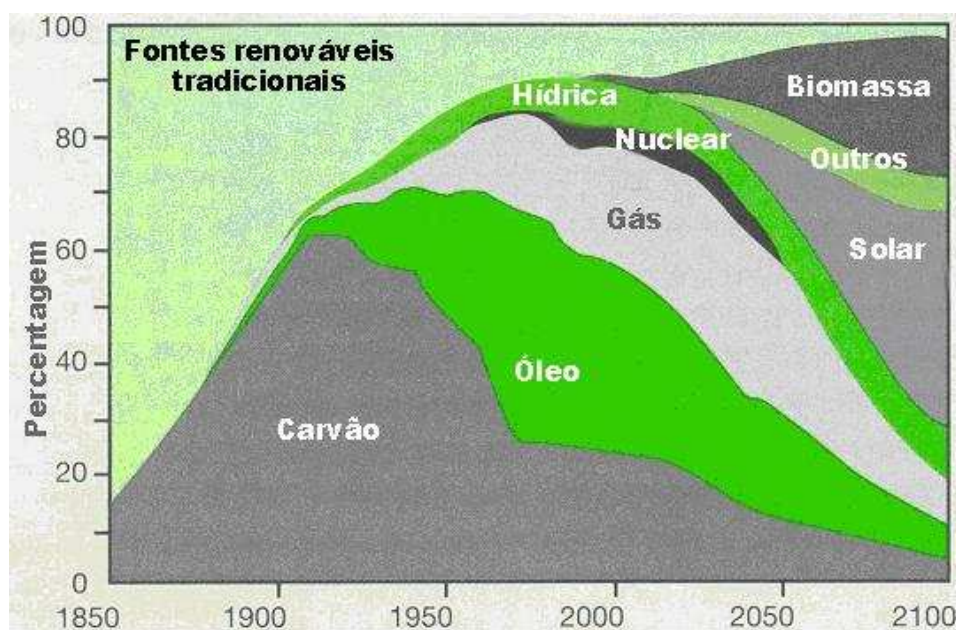


Figura 1 - Evolução da Demanda Mundial de Energia entre 1850 – 2100.

Fonte: UNDP; UNDESA; WEC (2000).

As principais barreiras existentes para a maior utilização das energias renováveis são de ordem econômica, pois as tecnologias empregadas são novas, ainda em desenvolvimento e por isso têm custo de implantação muito alto. Contudo, para que esta barreira possa ser superada é preciso suporte governamental e

investimentos em tecnologia, para que possam alcançar ganhos de escala e se tornem economicamente competitivas (GOLDEMBERG et al., 2008).

2. ETANOL: O PRINCIPAL BIOCOMBUSTÍVEL DO MERCADO

A produção de biocombustíveis foi insignificante até o fim da década de 1970. De fato, o etanol era, até esse período, utilizado essencialmente como insumo para as indústrias de bebidas e alguns segmentos da indústria química, cabendo ressaltar que grande parte era proveniente do gás natural. O biodiesel era, em termos práticos, inexistente. A totalidade da produção mundial de etanol – quase todo destinado, como foi dito, a usos não energéticos – equivalia a menos de um milésimo da extração de petróleo (BNDES, 2009).

O panorama descrito mudou sensivelmente com a implantação pelo governo brasileiro, em 1975, do Programa Nacional do Álcool – Proálcool. O programa foi motivado, principalmente, pela grande elevação dos preços do petróleo e desdobrou-se em duas etapas, que correspondem, aproximadamente, aos dois choques de oferta ocorridos. A primeira, que estabelecia a adição de álcool à gasolina, estendeu-se de 1975 a 1979, enquanto a segunda, orientada para veículos exclusivamente a álcool, foi de 1979 até a segunda metade da década de 1980. Após um período de estagnação de cerca de 15 anos – motivada, essencialmente, pela queda dos preços do petróleo –, a produção mundial de etanol voltou a crescer acentuadamente (BNDES, 2009). Segundo VON BRAUN (2008) dois fatores principais explicam esse crescimento: (1) a partir de 2003, a legislação de diversos estados norte-americanos determinou que o éter metil-terbutílico – MTBE, aditivo à gasolina que causava problemas ambientais, fosse substituído pelo etanol; e (2) o Brasil introduziu, igualmente em 2003, os veículos com motor flexível. A Figura 2 mostra a evolução da produção de etanol no mundo e permite ver com nitidez as três etapas mencionadas.

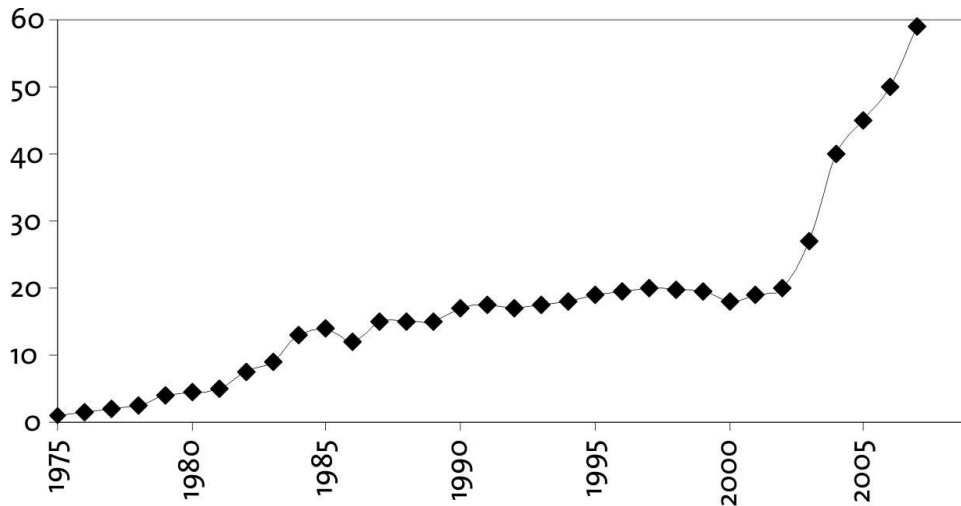


Figura 2 - Produção mundial de etanol (em bilhões de litros) (BNDES, 2009).

Mais recentemente, a percepção do risco de catástrofes climáticas provocadas pelo aquecimento global implicou grande aumento na demanda por biocombustíveis. Tal aumento se manifesta, principalmente, pela introdução ou aumento de metas de utilização de combustíveis de origem orgânica em numerosos países. O acordo implementado pela *PEA, Policy Energy Act*, seguida pela *EISA, Energy Independence and Security Act*, almejam que em 2022 obtenha-se cerca de 36 bilhões de galões de bioetanol por ano (LIMAYEM & RICKE, 2012), bem como a União Européia almeja o uso de 10% de biocombustíveis de segunda geração no setor de transporte em 2020 (PORZIO et al., 2012).

Qualquer que seja sua origem – biomassa ou processos petroquímicos e carboquímicos, o etanol é um combustível, ou seja, libera significativas quantidades de calor ao se queimar, apresentando um maior valor de octanagem (medida da qualidade do combustível). Além disso, o etanol apresenta maior velocidade de inflamação e maior temperatura de vaporização. Essas propriedades conferem ao etanol maior taxa de compressão e menor tempo de combustão, o que leva a uma maior eficiência teórica em relação à gasolina em um motor de combustão interna. Já as desvantagens do etanol em relação à gasolina incluem menor densidade de energia, maior corrosividade, baixa luminosidade de chama, menor pressão de vapor (dificultando a ligação em clima frio) e miscibilidade com água (BALAT et al., 2008).

O principal uso do etanol é como combustível líquido, misturado à gasolina ou usado como insumo na fabricação de aditivo à gasolina (o ETBE, derivado do

petróleo, tem sido proibido pelo risco de contaminação de águas subterrâneas). O uso como combustível (na proporção de 20 % a 100 %) é praticamente exclusivo do Brasil e dos Estados Unidos, enquanto o uso como aditivo (2 % a 10 %) ocorre nos EUA, Europa, Índia e China, entre outros países (USDA, 2006).

O Brasil e os Estados Unidos produzem o etanol a partir de cana-de-açúcar e milho, respectivamente, sendo os maiores produtores mundiais e juntos respondem por 89 % da produção global. Em 2008, a produção brasileira encerrou em 22,5 bilhões de litros de etanol, contra 34 bilhões de litros produzidos pelos EUA, que ocupou a primeira posição no ranking de produção mundial de etanol, seguido então do Brasil, União Européia (UE) (2,8 bilhões) e China (1,89 bilhões) (MAPA, 2010; RFA, 2010). Segundo o MAPA (2013), na safra de 2012/2013 foram produzidos 22,84 bilhões de litros de etanol.

A Tabela 1 aponta os avanços na produção de etanol para os próximos anos, indicando que no período de 2020/2021 serão produzidos 65,3 bilhões de litros de etanol, sendo 49,6 bilhões de litros voltados para o consumo interno e 15,7 bilhões de litros destinados à exportação (UNICA, COGEN, 2009).

Tabela 1 - Perspectivas para a produção de etanol.

	2008/2009	2015/2016	2020/2021
Produção de cana de açúcar (milhões de toneladas)	562	829	1.038
Etanol (bilhões de litros)	27,0	46,9	65,3
Consumo interno	22,0	34,6	49,6
Excedente para exportação	4,8	12,3	15,7

Com as perspectivas do aumento da produção de bioetanol de primeira geração no Brasil, a área de cultivo de cana-de-açúcar deverá ser expandida para atender à crescente demanda nacional e internacional. Porém, outra questão que preocupa a humanidade é a dicotomia disponibilidade de terras para o cultivo de alimentos e a produção de biocombustíveis. Diversas discussões sobre a utilização de terras agricultáveis para a produção de biocombustíveis e os impactos que serão

gerados na disponibilidade futura de alimentos, tendo em vista o crescimento da população mundial, têm sido realizadas. Nesse sentido, as biomassas residuais, de natureza lignocelulósica, assumem um papel indispensável para a solução deste problema. Resíduos agrícolas e agroindustriais, que antes eram utilizados como adubo, combustível de caldeiras ou ficavam ao relento gerando impactos ambientais, hoje apresentam uma fonte de oportunidades inestimável para a produção de biocombustíveis e outros compostos de extensa faixa de valores (SCHLITTLER & PEREIRA Jr., 2008).

A produção prevista de resíduos agrícolas dos cultivos de milho, arroz, cana-de-açúcar e trigo, para o ano de 2013, serão de 271,3 milhões de toneladas, dos quais 81,4 milhões de toneladas estarão disponíveis. Destes poderão ser obtidos cerca de 20 bilhões de litros de etanol. Somente a palha de cana-de-açúcar fornecerá em torno de 10 bilhões de litros, sendo capaz de suprir o déficit e, juntamente com o bagaço de cana disponível, de gerar excedentes que poderiam ser direcionados à exportação (EMERICK, 2006).

Estas matérias-primas provenientes de sobras e resíduos de produtos naturais (como o sabugo e a palha do milho, o bagaço, as pontas e as palhas da cana-de-açúcar) e o conceito de biorrefinaria emergem como fundamentais para a expressiva ampliação pretendida da produção de etanol, que hoje esbarraria em limitações para expansão da área plantada, seja por competir com a produção de alimentos, seja pelo nível de seus preços relativos frente ao petróleo e aos próprios alimentos. É justamente por disputar matéria-prima e depender das cotações de preços do açúcar (no caso da cana) e dos alimentos (no caso do amido dos cereais), que ainda não foi possível o desenvolvimento de um mercado estável para o etanol. Nos EUA, por exemplo, os impactos do etanol já são sentidos no preço no mercado futuro do milho, que saltou de US\$ 2,51 por *bushel*, no contrato de setembro de 2006, para US\$ 3,26, em setembro de 2008 (BNDES, 2007).

Logo, de forma paralela, a conjugação de trabalhos científicos com as iniciativas estatal e privada deu como resultado a instalação de uma quantidade considerável de plantas de produção, em diferentes estágios de desenvolvimento nos EUA e na Europa, principalmente (SIMS et al., 2010). Assim, perspectivas norte-americanas mais otimistas afirmam que em 2022 serão produzidos aproximadamente 60 bilhões de litros de biocombustíveis celulósicos ou de segunda geração, como pode ser visualizado na Figura 3 (VERENIUM, 2008). De acordo com esta Figura, a

produção de biocombustíveis de segunda geração apresentará o maior crescimento quando comparada com o bioetanol de milho, de primeira geração.

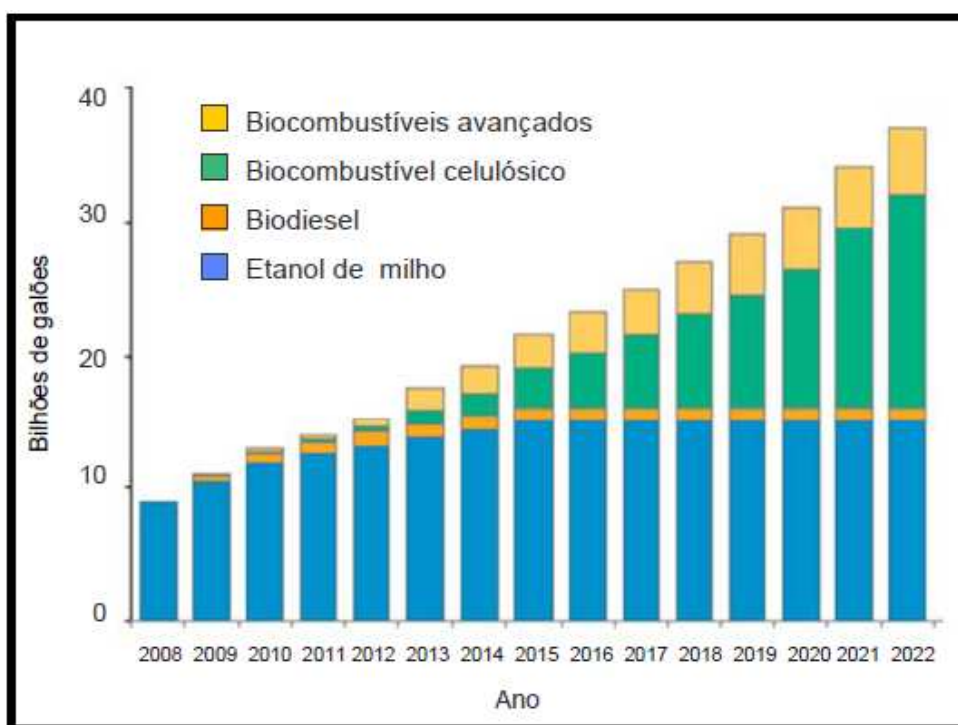


Figura 3 - Perspectivas da produção de biocombustíveis.

No contexto nacional, apesar do menor financiamento para o desenvolvimento tecnológico da produção de etanol de 2ª geração, pode-se dizer que o modelo brasileiro de hidrólise enzimática integrada a uma usina sucroalcooleira apresenta maiores vantagens competitivas (SEABRA et al., 2010). A reutilização de resíduos e a otimização de recursos naturais e energéticos são fatores diretamente refletidos na economia do produto representando uma alternativa tecnológica sustentável e uma oportunidade de desenvolvimento com a abordagem dos principais obstáculos tecnológicos adequados as oportunidades oferecidas pela realidade brasileira (CERQUEIRA LEITE et al., 2009).

Assim, com esta tendência industrial na adoção de tecnologias mais limpas para a redução da poluição ambiental, a implementação do aproveitamento biotecnológico de biomassa implica vantagens nos aspectos ambientais, sociais e econômicos, podendo ser considerado como um importante fator de viabilização do desenvolvimento sustentável.

3. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA: FONTE DE BIOENERGIA

A única fonte renovável de carbono grande o suficiente para substituir parcialmente os combustíveis fósseis é a biomassa. Materiais lignocelulósicos são particularmente atraentes neste contexto devido ao seu relativo baixo custo e disponibilidade local (LYND et al., 2002). Em geral, as biomassas lignocelulósicas podem ser divididas em cinco grupos: (1) resíduos agroindustriais (bagaço de cana, palha de milho, palha de trigo, sorgo, entre outros); (2) madeiras; (3) resíduos de celulose (papéis de jornal, papéis de reciclagem); (4) biomassas herbáceas (alfafa, brachiaria, entre outras plantas forrageiras); (5) resíduos sólidos industriais e municipais (BALAT et al., 2008).

Devido à grande disponibilidade de resíduos agrícolas, este pode ser considerado uma excelente fonte de biomassa para a produção de etanol de segunda geração. Atualmente, os resíduos mais promissores para serem empregados em bioprocessos são o bagaço de cana, palha de arroz, de milho e de trigo, provenientes da América do Sul, Ásia, Estados Unidos e Europa, respectivamente (KADAM & MCMILLAN, 2003; CHENG et al., 2008). Segundo SARKAR et al. (2012), a Ásia gera cerca de 667,6 milhões de toneladas de palha de arroz e 145,2 milhões de toneladas de palha de trigo, enquanto que a América produz 140,86 milhões de toneladas de palha de milho.

Embora alguns destes resíduos sejam utilizados como ração animal, combustíveis domésticos ou mesmo para co-geração de energia, grande parte ainda é inutilizada, constituindo-se em excedentes. Adicionalmente, muitos países da Europa Ocidental proíbem a queima no campo, menos de 1 % de palha de milho é recolhida para o processamento industrial, bem como cerca de 5 % é utilizado como alimento e forragem para animais. No entanto, nos Estados Unidos, mais de 90 % de palha de milho é deixada nos campos (BANERJEE, 2010).

O bagaço de cana, o principal resíduo lignocelulósico no Brasil é um material fibroso obtido após a extração do suco de cana no processo de produção de açúcar e etanol. Atualmente, as usinas de açúcar geram aproximadamente 270-280 kg de bagaço por tonelada de cana-de-açúcar, sendo a produção anual de bagaço de cana de cana no Brasil de 186 milhões de toneladas (SOCCOI et al., 2010; CARDONA et al., 2010). Cerca de 92 % deste resíduo é utilizado para a produção de energia elétrica a partir de sua queima nas usinas sucroalcooleiras. Contudo, se os 8 % restantes fossem convertidos

em etanol de segunda geração, poderia-se esperar um adicional de 2200 L por hectare de terra plantada, aumentando o rendimento de etanol por hectare brasileiro de 6000 L para 8200 L (SOCCOL et al., 2010).

4. A NATUREZA QUÍMICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

O termo estrutura lignocelulósica refere-se à parte do vegetal que forma a parede celular (lamela média, paredes primária e secundária), constituída por uma matriz dura e fibrosa. Os compostos lignocelulósicos são formados por microfibrilas de celulose inseridos em uma matriz de hemicelulose, pectina, lignina e uma pequena quantidade de proteínas estruturais. A Figura 4 apresenta a composição da parede celular de biomassa lignocelulósica.

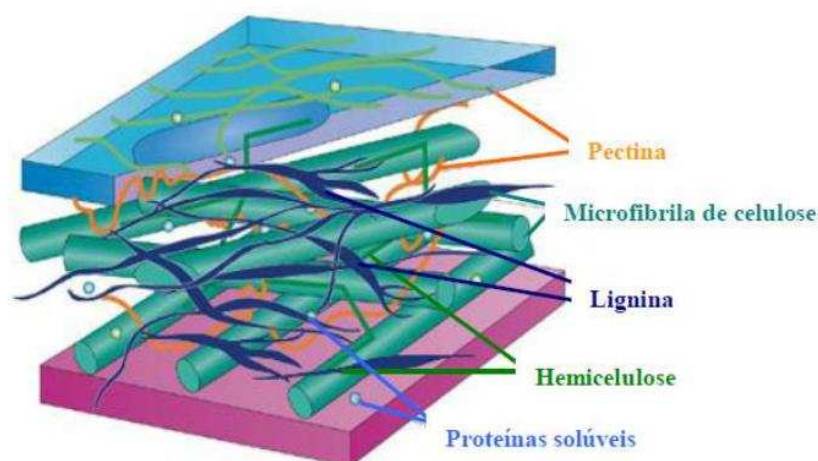


Figura 4 - Composição da parede celular de biomassa lignocelulósica (adaptado de SCHLITTLER & PEREIRA Jr., 2008).

Como pode ser visualizada na Figura 4, a celulose e a hemicelulose são predominantes nestes biopolímeros e representam fontes em potencial de açúcares passíveis de serem fermentados. A Tabela 2 mostra a composição química parcial de diferentes biomassas lignocelulósicas.

Tabela 2 - Composição química parcial de algumas biomassas lignocelulósicas.

Biomassas Lignocelulósicas	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
Farelo de cevada	23	32,7	24,4	Cruz et al., 2000
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3	Cruz et al., 2000
Bagaço de cana	40,19	26,42	25,15	Neureiter et al., 2002
Palha de arroz	43,5	22	17,2	Mussato; Roberto, 2002
Palha de trigo	33,81	31,83	20,12	Cândido; Silva, 2002
Casca de aveia	30,51	28,63	23,09	Felipe et al., 2003
Palha de sorgo	34	44	20	Herrera et al., 2004
Hardwoods stems	40-55	24-40	18-25	Sun, 2002
Softwood stems	45-50	25-35	25-35	Sun, 2002
Forrageiras	45	31,4	12	Sun, 2002
Bambusa Vulgaris	59,5	22,8	19,7	Barrichello; Foelkel, 2000

(COUTO et al., 2004).

4.1. Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo linear formado de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$. As cadeias de celulose agregam-se formando fibrilas e apresentam pontes de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila intra e intercadeias, o que resulta na cristalinidade da celulose (Figura 5). Essas regiões cristalinas, nas quais as cadeias estão ordenadas paralelamente, são separadas por regiões menos ordenadas, conhecidas como amorfas (GALDEANO, 2001). Na região cristalina, as fibras têm maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação (absorção de solvente) que na região amorfa, onde a fibra possui sua maior flexibilidade (VÁSQUEZ et al., 2007).

O índice de cristalinidade e o grau de polimerização são propriedades importantes para a classificação dos polímeros celulósicos. O grau de polimerização informa a frequência relativa de ligações glicosídicas internas e terminais, disponíveis para atuação de celulasas. Pode ser definido com base no número médio de monômeros e no peso médio do polímero, assim como inferido a partir de sua viscosidade. Já o índice de cristalinidade está associado à reatividade do substrato e pode ser quantificado pelo método de difração de raios X (D'ALMEIDA, 1988).

Estas características, juntamente com o envoltório de lignina, conferem à macromolécula celulose grande resistência à hidrólise, o que representa um grande desafio para a utilização dos materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas, como a produção de etanol de segunda geração (ARANTES & SADDLER, 2010).

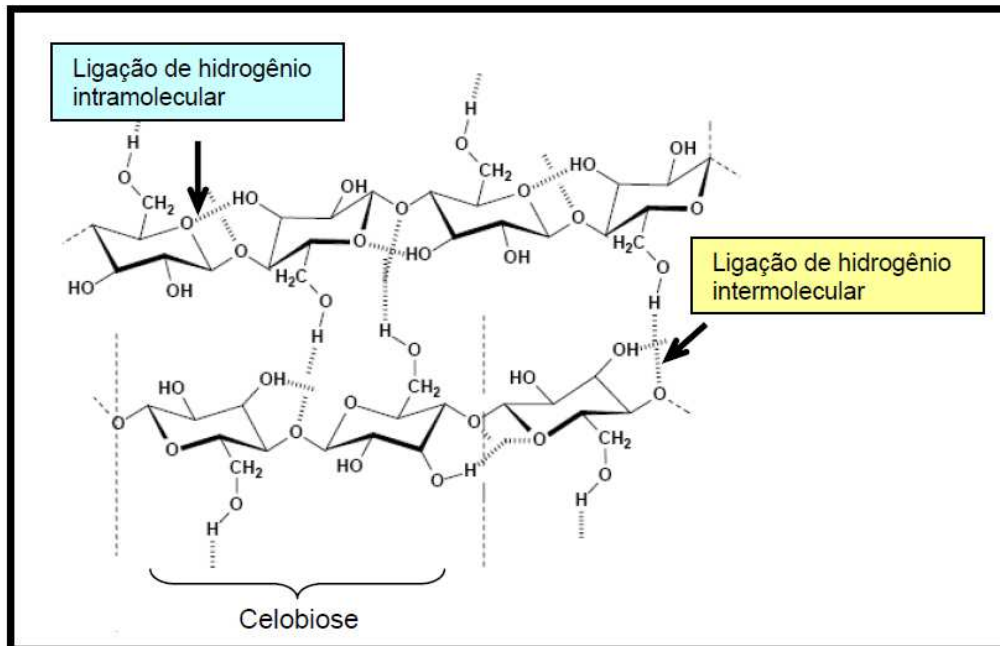


Figura 5 - Estrutura química da celulose (MORAIS, 2005).

4.2. Hemicelulose

As hemiceluloses (xilanas, arabinanas, arabinoxilanas, mananas e galactomananas) são polissacarídeos de baixa massa molecular, apresentando entre 100 e 200 unidades glicosídicas. Consistem em cadeias ramificadas de açúcares, cujas as unidades incluem principalmente aldopentoses, como D-xilose e L-arabinose, e aldo-hexoses, como D-glicose, D-manose e D-galactose. Contém também acetatos e substituintes como, L-arabinofuranosila, ácido D-glicurônico, ácido D-galactourônico e ácido α -D-4-O-metilglicurônico, na cadeia principal ou nas ramificações. A variedade de ligações e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (Figura 6). Diferentemente da celulose, a estrutura hemicelulósica não contém regiões cristalinas e é, portanto, mais susceptível à hidrólise química sob condições mais brandas. A hemicelulose está intimamente associada à celulose na estrutura da parede celular e estabelece ligação entre a celulose e a lignina (BON et al., 2008).

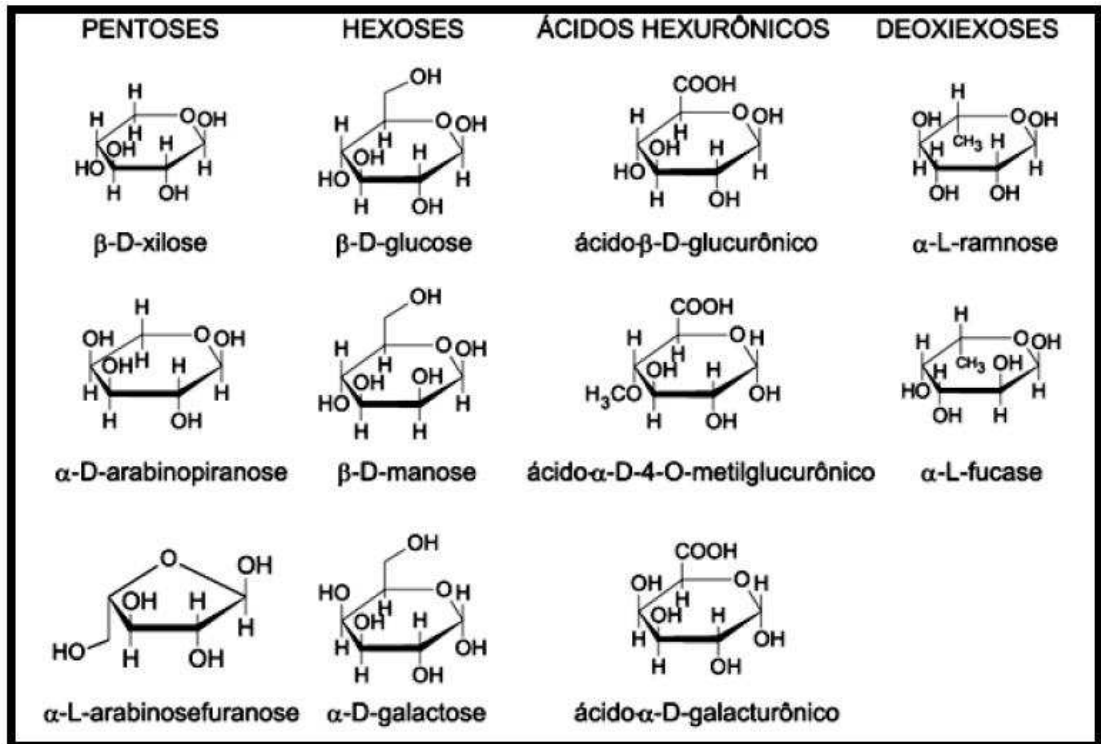


Figura 6 - Componentes da fração hemicelulose de biomassas (MORAIS, 2005).

A xilana é a principal hemicelulose presente na parede celular das plantas, sendo, após a celulose, o polímero mais abundante encontrado na natureza. Este heteropolissacarídeo é formado por uma cadeia principal de resíduos de D-xilopirranose unidos por ligações do tipo β-1,4 contendo cadeias laterais nas posições 2 e 3 de resíduos de α-L-arabinofuranose, ácido D-glucurônico ou grupamento acetil. Considerando o tipo de ramificação presente na cadeia central, as xilanas podem ser denominadas de arabinoxilanas, glucuronoxilanas, arabinoglucuronoxilanas e glucuronoarabinoxilanas (COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993). Nas angiospermas (madeira dura ou “hardwood”) a xilana representa de 15 a 30% do peso seco da planta e encontra-se na forma de glucuronoxilana, já nas gimnospermas (madeira mole ou “softwood”) representa de 5 a 10 % da biomassa seca. Nas gramíneas e madeira mole ou “softwood” encontra-se na forma de arabinoglucuronoxilana, representando 5 a 10 % de biomassa seca da planta. Nos cereais são encontradas na forma de arabinoxilanas e representam de 0,15 a 30 % da biomassa. (Tabela 3) (COLLINS et al, 2005).

Tabela 3 – Estrutura dos diferentes tipos de xilana.

Tipo de Polissacarídeo	Origem Biológica	Biomassa Seca (%)	Representação Esquemática
Glucuronoxilana	Madeira dura	15 - 30	
Arabinoglucuronoxilana	Gramíneas, cereais e madeira mole	05-10	
Arabinoxilana	Cereais	0,15-30	
Glucuronoarabinoxilana	Gramíneas e cereais	15-30	
Homoxilana	Algas	-	

▼: grupamento acetil; ●: ácido glucurônico; ●: D-xilose; ○: arabinofuranose; ◆: ácido ferúlico (Fonte: Girio et al, 2010).

4.3. Lignina

A estrutura bioquímica da fração lignina não está relacionada a moléculas simples de açúcar, não sendo pretendida por isso, para a produção de bioetanol por rotas fermentativas. Essa fração, no entanto, desempenha um papel fundamental para o sucesso da tecnologia de hidrólise, uma vez que dificulta o acesso à celulose. Ela, juntamente com a hemicelulose e a pectina, preenche os espaços entre as fibras de celulose, além de atuar como material ligante entre os componentes da parede celular (FERRAZ, 2001).

A lignina é uma macromolécula vegetal que apresenta forma tridimensional e é formada por unidades de *p*-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático, unidas por ligações do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si. Esta macromolécula é formada pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool trans-para-cumárico, álcool-trans-coniferílico e álcool-trans-sinapílico, também chamados de monolignóis (Figura 7) (SUHAS et al, 2007).

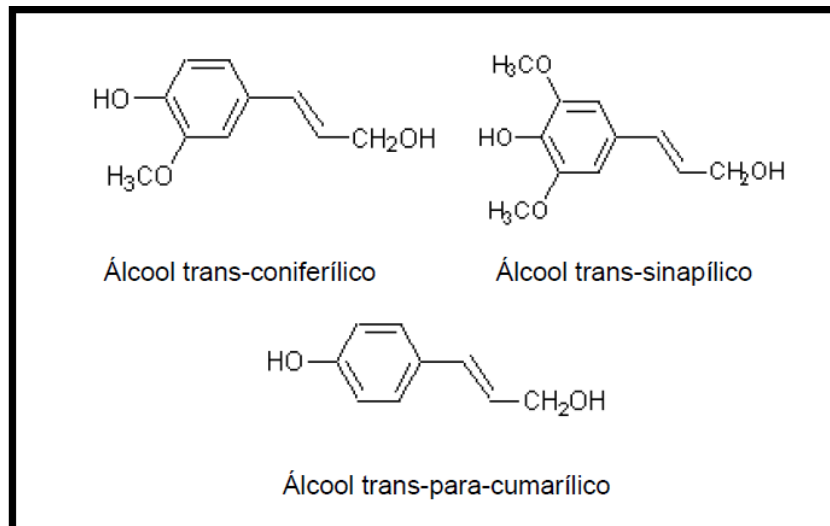


Figura 7 - Precursores primários da lignina (SUHAS et al, 2007).

A estrutura tridimensional da lignina é desconhecida tanto nas plantas *hardwoods* quanto nas *softwoods*, entretanto, já se sabe que a composição desta molécula nestas plantas é diferente. Além disso, sabe-se que as plantas lenhosas e mais velhas contêm maiores níveis de lignina depositada na parede celular, o que resulta em uma maior rigidez e resistência, já que a parede celular das plantas tornam-se, assim, mais impermeáveis à água e protegidas contra os efeitos de possíveis patógenos (SUHAS et al, 2007).

5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Vários microrganismos produzem enzimas envolvidas na degradação da fração de celulose e hemicelulose da biomassa vegetal. As celulasas e hemicelulasas representam um grupo de enzimas responsáveis pela hidrólise destes polissacarídeos e podem ser produzidas por diversos microrganismos, em sua maioria por bactérias e fungos, desempenhando um papel importante na biosfera e participando do ciclo do carbono através da reciclagem da celulose e da hemicelulose.

5.1. Celulasas

A hidrólise enzimática da celulose em açúcares solúveis é um processo que envolve múltiplas enzimas denominadas de celulasas, as quais são altamente específicas. Os três maiores grupos de celulasas que estão envolvidas no processo de

hidrólise são: (1) endoglicanases (EG, endo-1,4-D-glicanohidrolase, ou EC 3.2.1.4) que atacam regiões de baixa cristalinidade nas fibras de celulose criando cadeias terminais redutoras e não-redutoras livres; (2) exoglicanases ou celobiohidrolases (CBH, 1,4- β -D-glicano-celobiohidrolase, ou EC 3.2.1.91) que degradam a cadeia terminal livre formando unidades de celobiose; (3) β -glicosidase (celobiase ou EC 3.2.1.21) que hidrolisa a celobiose para produzir glicose. Em adição aos três maiores grupos de enzimas celulases, existe também um número de enzimas auxiliares que atacam as hemiceluloses, como as glicouronidase, acetilesterase, xilanase, β -xilosidase, galactomanase, acetilesterase e manase (SUN & CHENG, 2002).

Os diferentes organismos celulolíticos têm evoluído para produzir um arranjo de celulases que, por meio de diferentes modos de ação e especificidade de substrato, permitem explorar substratos bastante heterogêneos. Por exemplo, o fungo *Trichoderma reesei* produz quatro endoglicanases e duas celobiohidrolases (CBHI e CBHII). As CBHI e CBHII de *Trichoderma reesei* são imunologicamente distintas, analisadas por anticorpos policlonais. As unidades de celobiose repetitivas da celulose ocorrem em duas formas estequiométricas diferentes, levando a hipótese que existem duas formas estereoespecíficas de endoglicanases. Esta multiplicidade de formas de celulases fúngicas poderia ser provocada por uma glicosilação diferencial ou proteólise parcial. Além disso, a partir da clonagem gênica, sabe-se que existe um número limitado de genes de celulase. Logo, a multiplicidade desta enzima deve ser, em grande parte, por modificações pós-traducionais (DUFF & MURRAY, 1996).

O exato mecanismo da hidrólise da celulose não é conhecido, embora diversos possíveis modelos tenham sido propostos. Entretanto, sabe-se que as celulases atuam de maneira corporativa e/ou sinérgica, ou seja, uma ação em conjunto para que o rendimento das celulases quando atuam simultaneamente seja melhor do que a soma dos rendimentos individuais. São conhecidas pelo menos três formas de sinergia, são elas (SILVA, 2010):

- **Sinergia endo-exo:** as endoglucanases atuam nas regiões amorfas, liberando terminais redutores e não redutores, nos quais atuarão as CBHs do tipo I e do tipo II, respectivamente.

- **Sinergia exo-exo:** as CBHs I e CBHs II atuam simultaneamente nos terminais redutores e não redutores liberados pelas endoglucanases.

- **Sinergia exo-BG e endo-BG:** as exoglucanases e endoglucanases liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos da β -glicosidase.

A Figura 8 esquematiza a ação dessas enzimas sobre celulose.

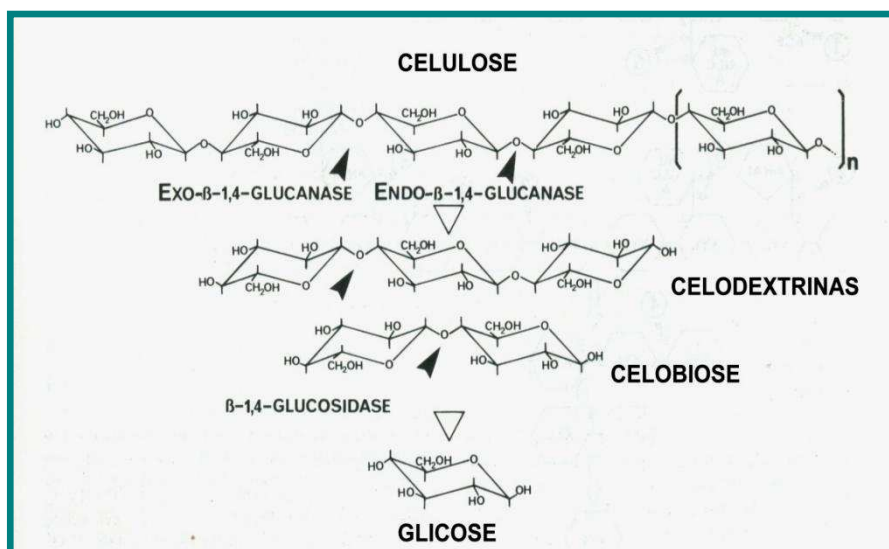


Figura 8 - Enzimas envolvidas na hidrólise da celulose (SUN & CHENG, 2002).

A maior parte das enzimas envolvidas na hidrólise de carboidratos são proteínas modulares, constituídas por um módulo catalítico e por um módulo de ligação a carboidratos (*Carbohydrate-binding modules* - CBMs). A função destes módulos é promover uma melhor interação entre o substrato e o módulo catalítico da enzima, assegurando a orientação correta entre ambos (CANILHA et al., 2010). Segundo GRAY e colaboradores (2006), as CBMs são divididas em famílias que possuem seqüências de aminoácidos e estruturas similares. Assim, sutis diferenças na estrutura das CBMs podem levar a modificações na especificidade do ligante. Durante a sua ligação a superfície cristalina da celulose, as CBMs expõem os seus domínios catalíticos para o substrato específico e aumentam a eficiência catalítica. Em adição, tem sido proposto que as CBMs podem ser capazes de romper a estrutura dos polissacarídeos e, assim, aumentar a taxa de hidrólise. Entretanto, quando o substrato é um material lignificado (CANILHA et al., 2010), a lignina pode promover intensa adsorção inespecífica das enzimas utilizadas para a hidrólise da celulose e/ou da hemicelulose. A fração de celulases e hemicelulases tornadas improdutivas devido a esta adsorção podem chegar a 70 % do total adicionado. Isto inclusive impede a reciclagem das enzimas, uma estratégia que tem um grande impacto na viabilidade econômica do processo. Para superar esta limitação, outras proteínas (albumina, por exemplo), surfactantes não iônicos (Tween 20, por

exemplo) ou polímeros (polietilenoglicol, por exemplo) têm sido adicionados à mistura reacional com a finalidade de minimizar adsorções indesejáveis.

Muitos fatores podem afetar a hidrólise enzimática da celulose, como por exemplo, a concentração de substrato, a atividade da celulase e as condições da reação (temperatura, pH, bem como outros parâmetros). A Figura 9 apresenta uma visão simplificada dos principais mecanismos que limitam a hidrólise enzimática da celulose. Logo, a compreensão destes mecanismos tem permitido o desenvolvimento progressivo de estratégias para superar as limitações. Assim, para melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise, é necessário à otimização do processo, reforçando a atividade das celulases (SUN & CHENG, 2002).

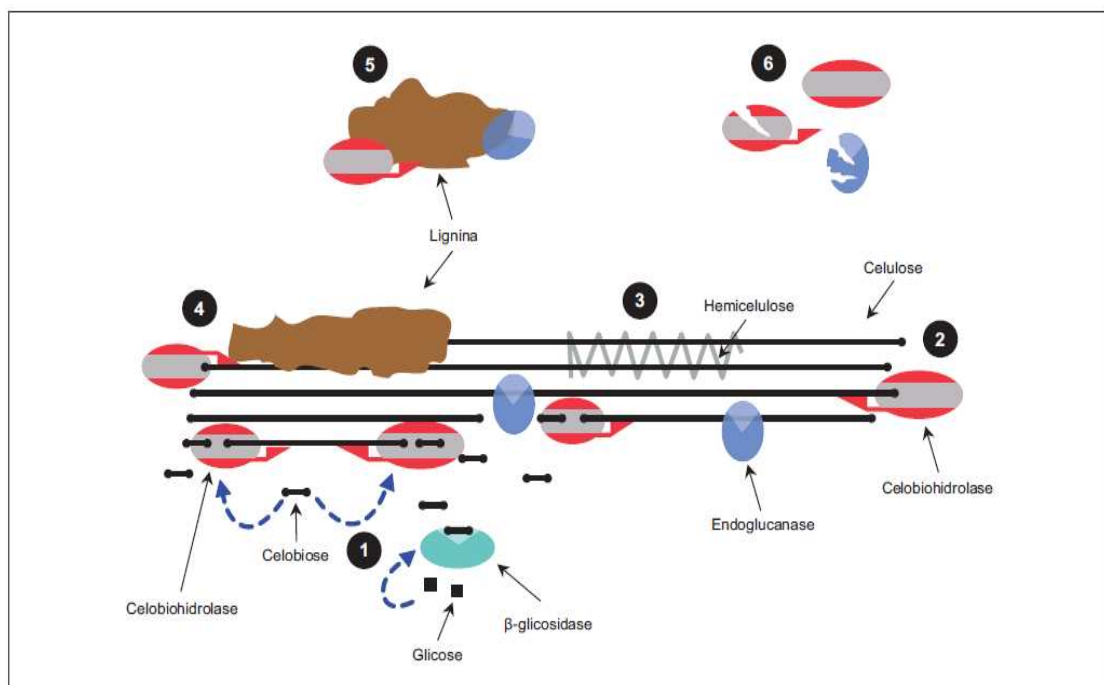


Figura 9 - Visão simplificada dos principais mecanismos que limitam a hidrólise enzimática da celulose. 1) Inibição da β-glicosidase e da celobiohidrolase pelos produtos (glucose e celobiose, respectivamente); 2) Adsorção improdutivo da celobiohidrolase à celulose; 3) Obstrução do acesso das celulases à celulose pela hemicelulose; 4) Obstrução do acesso das celulases à celulose pela lignina; 5) Adsorção inespecífica das enzimas à lignina; 6) Perda da atividade enzimática (CANILHA et al., 2010).

5.2. Hemicelulases

A característica heteropolissacarídica das hemiceluloses torna complexo o mecanismo de ataque enzimático. Das enzimas conhecidas, as endoxilanases (EC 3.2.1.8) são as mais estudadas. Para degradação da xilana serão necessárias basicamente seis enzimas diferentes. As endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8) hidrolisam aleatoriamente o esqueleto de xilana, enquanto as β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37) produzem os monômeros de xilose a partir da hidrólise das extremidades não redutoras de xilo-oligossacarídeos e da xilobiose (COLLINS et al, 2005).

A remoção das cadeias laterais deste polímero requer a enzima específica para o tipo de grupo a ser hidrolisado. As enzimas necessárias para esta hidrólise são α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -D-glicuronidasas (EC 3.2.1.139), acetilxilana esterases (EC 3.1.1.72), ácido ferúlico esterases (EC 3.1.1.73), p -ácido cumárico esterases (EC 3.1.1.-) e α -galactosidasas (EC 3.2.1.22) (JEFFRIES, 1994). A Figura 10 ilustra o polímero e as enzimas que atuam para sua degradação.

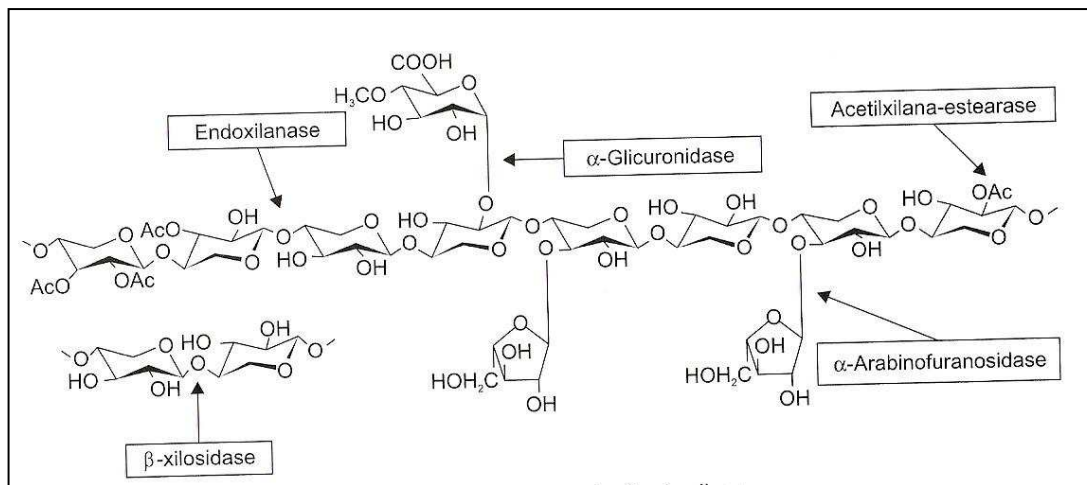


Figura 10 - Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana (COLLINS et al, 2005).

6. PRODUÇÃO DE ETANOL DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Tanto para a produção de etanol de primeira geração, a partir de cana-de-açúcar, quanto de segunda geração, a partir de biomassas de composição lignocelulósica, a via fermentativa é a via mais importante para a obtenção do álcool etílico no Brasil. Um dos fatores que torna a produção de bioetanol por fermentação

a forma mais econômica de sua obtenção, é o grande número de matérias-primas naturais e residuais existentes em todo país (PEREIRA Jr. et al., 2008).

O processo biológico convencional para converter os materiais lignocelulósicos em etanol requer: (1) um pré-tratamento para quebrar a estrutura da lignina e hemicelulose e, assim, liberar uma celulose mais acessível à sacarificação; (2) despolimerização da celulose para produzir açúcares livres; (3) fermentação da glicose resultante para produzir etanol; e (4) Separação do etanol produzido (LEE, 1997).

O principal desafio para a conversão da biomassa em etanol é o passo do pré-tratamento. Devido à estrutura complexa das biomassas lignocelulósicas, o pré-tratamento é requerido para a sua degradação, remoção da lignina, uma parcial ou total hidrólise da hemicelulose e uma diminuição da estrutura cristalina da celulose. Posteriormente, a celulose deve ser hidrolisada, sendo que a forma mais satisfatória para se fazer isto é a partir da hidrólise enzimática para obter glicose livre que é transformada em etanol por processos microbiológicos. Dependendo do microrganismo usado, as pentoses liberadas durante a hidrólise da hemicelulose também podem ser convertidas em etanol. Conseqüentemente, as tecnologias envolvidas nestes processos são mais complexas levando a um alto custo de produção de etanol comparando-se com a cana-de-açúcar, milho ou beterraba. Entretanto, o fato que muitos materiais lignocelulósicos são co-produtos de atividades agrícolas, resíduos industriais ou resíduos domésticos, eles oferecem uma enorme possibilidade de produção do combustível etanol em larga escala (CARDONA & SÁNCHEZ, 2007).

6.1. Pré-tratamentos

A biomassa lignocelulósica é altamente recalcitrante para degradação enzimática. Várias características da biomassa “*in natura*” levam a esta característica, como a presença da lignina, o grau de cristalinidade e polimerização dos carboidratos presentes na parede celular. Ainda não é conhecida qual a característica da lignina que está diretamente relacionada com a recalcitrância da biomassa, mas vários trabalhos indicam que a quantidade de ferulato ligada à lignina tem um grande impacto na recalcitrância, assim como a sua composição e o grau de ligação éster entre a lignina e a hemicelulose (VAN DYK & PLETSCHE, 2012).

Então, o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é crucial para a hidrólise enzimática destes substratos. Assim, um grande número de tratamentos termoquímicos tem sido desenvolvido para diminuir esta recalcitrância destes materiais e, assim, melhorar a digestibilidade da mesma. O pré-tratamento tem como objetivo romper a parede celular da planta e melhorar o acesso enzimático aos polissacarídeos. Vários estudos têm mostrado uma direta correlação entre a remoção de lignina e hemicelulose e a digestibilidade da celulose (GRAY et al., 2006). Assim, o pré-tratamento é requerido para modificar a estrutura da biomassa lignocelulósica, tornando a celulose mais acessível às enzimas que convertem os polímeros de carboidratos em açúcares fermentáveis, como apresentado na Figura 11. Um pré-tratamento eficiente, pode substancialmente reduzir o requerimento de enzimas no processo de sacarificação da celulose e, conseqüentemente, reduzir os custos de produção (MOSIER et al., 2005).

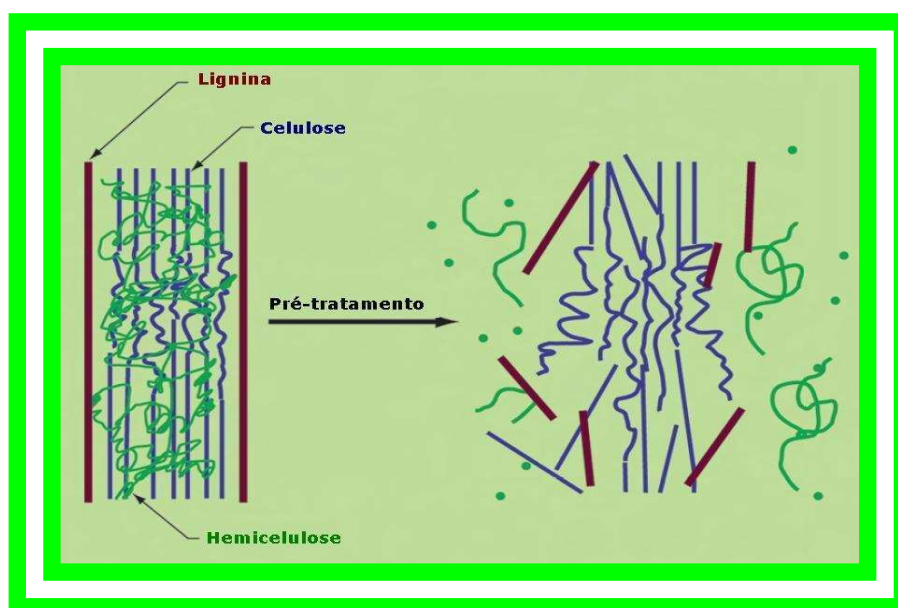


Figura 11 - Metas esquematizadas do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (adaptado de MOSIER et al., 2005).

Vários processos físicos, físico-químicos, químicos e biológicos têm sido usados para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Os pré-tratamentos físicos são aqueles caracterizados pela fragmentação do material através de uma ação mecânica, seja por trituração, moagem ou esfarelamento, sendo que esta fragmentação não altera sua composição química. Os tratamentos físico-químicos

consistem na submissão do material a altas temperaturas, catalisados ou não, por agentes químicos. Caracterizam-se pelas condições drásticas de temperatura que são utilizadas (SCHLITTLER & PEREIRA Jr, 2008). Os pré-tratamentos químicos variam de muito ácido para bastante alcalino, tendo assim, diferentes efeitos nos principais componentes da biomassa. Por exemplo, o pré-tratamento ácido hidrolisa a fração de hemicelulose, já os pré-tratamentos alcalinos têm mais efeito na estrutura da lignina. Os pré-tratamentos químicos também afetam a composição do açúcar no hidrolisado, por exemplo, o tratamento ácido pode resultar em altas concentrações de furfurais na fase líquida, sendo que os alcalinos podem resultar em altas concentrações de ferulato e acetatos no hidrolisado. Estes compostos presentes no meio podem ter efeitos deletérios nos microrganismos fermentativos (GRAY et al., 2006).

Assim, os pré-tratamentos ideais têm que alcançar as seguintes exigências: (1) melhorar a formação de açúcares ou a habilidade subsequente destes açúcares sofrerem hidrólise enzimática; (2) evitar a degradação ou perda de carboidrato; (3) evitar a formação de inibidores para os processos subsequentes de hidrólise e fermentação; e (4) ser viável economicamente (SUN & CHENG, 2002). Os principais pré-tratamentos com potencial aplicação industrial são citados a seguir:

- *Organosolv*: os processos organosolv usam somente uma mistura de solventes orgânicos ou aquoso-orgânicos, podendo se adicionar um catalisador alcalino ou ácido, os quais rompem as ligações internas da hemicelulose e da lignina. Os principais solventes orgânicos usados são acetona, metanol, etanol, glicol etileno, glicol trietileno e álcool tetrahidrofurfuril. Quando usada como tecnologia de pré-tratamento, o processo organosolv gera três frações separadas: a lignina seca, a hemicelulose aquosa e uma relativa fração de celulose pura (DUFF & MURRAY, 1996).

- *Explosão a vapor ou auto-hidrólise*: os resíduos lignocelulósicos são aquecidos em alta pressão e temperatura. Durante este tratamento, o vapor d'água penetra nos resíduos e inicia uma reação de auto-hidrólise, onde os ácidos orgânicos inicialmente formados dos grupos acetila presentes nos resíduos catalisam a hidrólise principalmente da hemicelulose. Depois de um tempo de reação específica, os resíduos sofrem uma decomposição explosiva. Logo, o pré-tratamento explosão a vapor é uma reação de auto-hidrólise química que remove hemicelulose, e, em menor quantidade, a lignina (DUFF & MURRAY, 1996).

- *Explosão por amônia (AFEX)*: é um processo semelhante ao anterior, com a diferença que este utiliza uma solução amoniacal, com o objetivo de aumentar a taxa de hidrólise (SCHLITTLER & PEREIRA Jr., 2008).

- *Explosão por CO₂*: funciona da mesma maneira que o processo com amônia, contudo, o dióxido de carbono é o agente catalizador da hidrólise, o qual em solução forma o ácido carbônico (SCHLITTLER & PEREIRA Jr., 2008).

- *Hidrólise alcalina*: o mecanismo de hidrólise alcalina ocorre devido a uma saponificação das ligações ester cruzadas intermolecular entre hemiceluloses e outros componentes, por exemplo, entre hemiceluloses e lignina. A porosidade dos materiais lignocelulósicos aumenta com a remoção destas ligações cruzadas. O tratamento com NaOH diluído causam um inchamento, levando a um aumento na área da superfície interna, uma diminuição no grau de polimerização, uma diminuição da cristalinidade, uma separação da ligação estrutural entre lignina e carboidratos e um rompimento da estrutura da lignina (SUN & CHENG, 2002).

- *Hidrólise ácida*: consiste na hidrólise da fração hemicelulósica, que é mais susceptível ao tratamento ácido, sendo que as frações de celulose e lignina permanecem inalteradas. Soluções ácidas de H₂SO₄; HCl; HNO₃ e H₃PO₄ são comumente empregados como catalisadores nestes processos (AGUILAR et al., 2002). Os ácidos liberam prótons que atuam nas ligações glicosídicas entre os monômeros de açúcar nas cadeias poliméricas. O rompimento destas ligações libera uma série de compostos, principalmente açúcares como xilose, glicose e arabinose. São liberados também produtos indesejáveis para o processo fermentativo tais como furfural, proveniente da degradação de pentoses e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) oriundo da desidratação de hexoses, havendo ainda formação de ácido fórmico pela degradação de compostos derivados do furano (furfural ou 5-HMF) e de ácido levulínico produzido a partir da degradação de 5-HMF. São gerados ainda ácidos acéticos provenientes dos grupos acetil, compostos não estruturais correspondentes à fração extrativa e produtos de degradação da lignina (fenóis e outros compostos aromáticos) e metais pesados como cromo, cobre, ferro e níquel provenientes da corrosão dos equipamentos de hidrólise. Uma vez presentes no hidrolisado, estes compostos são inibidores do metabolismo microbiano (TAMANINI & HAULY, 2004).

- *Ozonólise*: o ozônio é utilizado neste processo para extrair a lignina do complexo, deixando-a mais acessível ao ataque enzimático (MOSIER et al., 2005).

- *Deslignificação oxidativa*: este é um processo enzimático, onde peroxidases são utilizadas para degradar a lignina em presença de H₂O₂, aumentando a susceptibilidade das fibras para uma posterior hidrólise (SCHLITTLER & PEREIRA Jr., 2008).

6.2. Sacarificação enzimática

Comparando ao emprego da hidrólise ácida, o uso de enzimas hemicelulolíticas para a sacarificação da biomassa é vantajoso porque a reação é específica e não gera compostos tóxicos à fermentação. A hidrólise é conduzida em condições mais amenas de pH e temperatura (na faixa de 45-50°C e pH entre 4-5) e por isto uma menor quantidade de energia é requisitada no processo. Durante a hidrólise enzimática também se observa que os equipamentos utilizados no processo (tanques, tubulações) sofrem menos danos quando comparados ao uso de processos químicos que usam ácidos concentrados. O etanol produzido de um mosto obtido por hidrólise enzimática é de melhor qualidade, contendo menos agentes corrosivos (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Contudo, apesar das inúmeras vantagens, o alto custo das enzimas envolvidas neste processo é um dos maiores obstáculos para a produção em escala industrial do etanol de segunda geração a partir desta metodologia. Logo, vários estudos estão sendo realizados com o intuito de diminuir os custos de produção destas enzimas. Isto pode ser feito, por exemplo, a partir de um *screening* de novos microrganismos produtores de celulasas e hemicelulasas, além do uso de substratos de baixo custo para induzir a produção destas enzimas. Outra maneira de diminuir os custos da sacarificação enzimática é a partir da otimização desta etapa, ou seja, encontrar o melhor coquetel enzimático para um dado substrato e as melhores condições de hidrólise (temperatura, pH, agitação, carga de sólidos e enzimas). Desta forma, ocorrerá uma hidrólise com maior eficiência e, portanto, menores quantidades de enzimas serão requeridas.

Entretanto, produzir coquetéis enzimáticos eficientes para a sacarificação da biomassa lignocelulósica tem sido um grande desafio para as pesquisas recentes em etanol de segunda geração. A eficiência hidrolítica de um coquetel é dependente das

propriedades individuais das enzimas (estabilidade térmica e em pH, possibilidade de inibição das mesmas pelos seus produtos, ligação produtiva e improdutiva à celulose) e também da interação entre elas, já que a sacarificação enzimática da biomassa depende da atuação sinérgica das celulasas e hemicelulasas. Portanto, além da alta atividade hidrolítica, é muito importante também levar em consideração a dosagem e composição das diferentes enzimas presentes nos coquetéis (VAN DYK & PLETSCHKE, 2012).

Até o momento a comunidade científica ainda não chegou a uma conclusão sobre qual a proporção ideal das enzimas para a hidrólise da biomassa lignocelulósica. Além do complexo sinérgico entre as enzimas, essa indefinição também se deve a adequação do coquetel a uma determinada biomassa e ao tipo de pré-tratamento ao qual ela foi submetida. Como as biomassas têm distintas composições, a proporção de enzimas utilizadas para a sua hidrólise também deve ser diferentes (ALMEIDA, 2013).

Muitos estudos recentes têm mostrado que, além das celulasas, a presença de outras enzimas acessórias é muito importante para a formulação de um bom coquetel enzimático. Dentre estas enzimas estão as hemicelulasas, que podem atuar sobre a hemicelulose residual e contribuir para uma hidrólise mais eficiente da biomassa. Além disso, alguns trabalhos tem demonstrado que as hemicelulasas também podem atuar sinérgicamente com as celulasas, aumentando a eficiência da hidrólise da biomassa (BERLIN et al., 2007). Contudo, a determinação de quais hemicelulasas devem ser utilizadas na suplementação dos coquetéis é dependente da composição da biomassa.

A eficiência da sacarificação enzimática também pode ser influenciada pela inibição das endoglicanases e exoglicanases pelos produtos finais de hidrólise, a celobiose e glicose (DUFF & MURRAY, 1996). Este fato, entretanto, pode ser amenizado pela suplementação de β -glicosidase ao coquetel enzimático ou então promovendo as etapas de sacarificação e fermentação simultaneamente, processo conhecido como SSF (OLOFSSON, 2008). Nesse processo, a presença da levedura juntamente com o complexo enzimático celulolítico reduz o acúmulo de açúcares dentro do reator, evitando, então, a inibição das enzimas e, conseqüentemente, aumentando a taxa de sacarificação e o rendimento final (BALLESTEROS et al., 2004). Entretanto, a desvantagem do SSF é devido à necessidade de conduzir a hidrólise enzimática dentro da faixa ótima do microrganismo fermentador. Em

relação a este aspecto, estudos têm sido realizados no sentido de produzir celulases que atuem em valores de pH e temperatura próximos daqueles ótimos para o processo fermentativo (SILVA, 2010).

Outro fator limitante da hidrólise enzimática é o conteúdo de lignina presente na biomassa, a qual reduz, por diversos motivos, a eficiência das enzimas celulases e hemicelulases, são eles: a lignina ligada aos carboidratos forma uma barreira física que limita a acessibilidade das enzimas ao seu substrato; as celulases podem ficar adsorvidas na lignina e diminuir a eficiência da hidrólise do substrato; a lignina pode também inibir diretamente as enzimas hidrolíticas; a lignina residual pode bloquear o progresso das celulases pela cadeia de celulose; e por fim, alguns pesquisadores indicam que não apenas a presença da lignina, mas também o tipo e distribuição da mesma pode influenciar a hidrólise enzimática da biomassa (VAN DYK & PLETSCHKE, 2012). Por estes diversos motivos a etapa de pré-tratamento é crucial para uma eficiente hidrólise enzimática.

É importante ressaltar também que o estabelecimento de tecnologias para sacarificação enzimática não depende somente de pesquisas do ponto de vista aplicado. Inúmeras lacunas sobre os mecanismos sinérgicos de ação das celulases precisam ser preenchidas para que estas enzimas possam ser bioquimicamente melhoradas e utilizadas de forma mais eficiente em processos biotecnológicos. Dentre as pesquisas básicas atualmente desenvolvidas com celulases destacam-se aquelas que estudam os mecanismos de ligação das celulases ao seu substrato, a importância e a função dos módulos de ligação a carboidratos (MLC) para o processo de hidrólise, o processo de montagem do complexo multiprotéico denominado celulosomo, muito comum em bactérias e também encontrado recentemente em estudos com fungos, além de estudos de caracterização tanto cinético quanto bioquímico das enzimas envolvidas no processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica (FALKOSKI et al., 2012).

Assim, o desenvolvimento de estudos para produção, expressão, aplicação e compreensão do modo de ação de celulases de diferentes microrganismos são imprescindíveis para a implantação do processo de produção de bioetanol lignocelulósico.

6.3. Fermentação

A fermentação alcoólica é um processo biológico em que matérias orgânicas são convertidas por microrganismos em compostos simples. Estes compostos simples são então fermentados pelos microrganismos para produzir etanol e CO₂. Vários estudos e revisões têm sido publicados, relatando a produção de microrganismos que fazem fermentação alcoólica. Assim, várias bactérias, leveduras e fungos usados para a produção de etanol estão sendo reportados (LIN & TANAKA, 2006).

Os microrganismos mais comumente usados para produzir etanol a partir de amido hidrolisado e da sacarose são as leveduras, principalmente a *Saccharomyces cerevisiae*, que pode produzir etanol em altas concentrações. As leveduras têm a flexibilidade de crescer em um meio contendo açúcares simples, como a glicose, e em meio contendo dissacarídeos sacarose.

Os açúcares derivados da biomassa lignocelulósica são uma mistura de hexose (principalmente glicose) e pentoses (principalmente xilose) e a maioria das linhagens de *S. cerevisiae* não são capazes de metabolizar xilose. Logo, várias pesquisas têm sido feitas com o propósito de aumentar o rendimento da fermentação etanólica derivadas deste açúcar. Um modo de fazer isto seria adicionar nas leveduras e em outros etanologênicos naturais uma rota metabólica adicional para fermentar pentose por métodos da engenharia genética. Além disso, os hidrolisados derivados da biomassa tendem a ter inibidores da fermentação (ácido acético, furfural, etc.), os quais devem ser removidos quando estão em altas concentrações ou, então, requerer o desenvolvimento de cepas resistentes a estes inibidores (GRAY et al., 2006).

Os microrganismos encontrados que fermentam xilose são geralmente bactérias, leveduras e fungos filamentosos. As bactérias anaeróbicas fermentam pentoses, mas elas são inibidas precocemente com baixas concentrações de açúcar e etanol. A levedura que fermenta naturalmente a xilose, como a *Pichia stipitis* CBS 6054, fermenta a xilose em etanol com um rendimento e produtividade razoáveis, entretanto estas cepas de levedura são altamente inibidas pelos compostos gerados durante o pré-tratamento e hidrólise dos materiais lignocelulósicos (HAHN-HÄGERDAL et al., 2004). Os fungos filamentosos podem tolerar estes inibidores, mas o processo de fermentação etanólica é muito lento para serem usados em processos comerciais competitivos. Logo, muitos esforços têm sido feitos para obter

cepas recombinantes de bactérias e leveduras que podem ser usados na fermentação industrial de materiais lignocelulósicos (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Assim como muitos microrganismos, a *S. cerevisiae* metaboliza glicose pela rota de Embden-Meyerhof (EM). Sendo que a rota de Entner-Doudoroff (ED) é um meio adicional de consumo de glicose em muitas bactérias, como a *Zymomonas*. O alto rendimento e produtividade observados pelas *Zymomonas* são consequências da sua fisiologia única. *Zymomonas* é o único microrganismo que metaboliza glicose anaerobicamente usando a rota ED que contrapõe a rota EM ou glicolítica (MATTHEW et al., 2005).

O metabolismo da glicose via ED rende um mol de ATP por mol de glicose, enquanto as leveduras metabolizam glicose anaerobicamente via glicólise (EM) e obtém dois mols de ATP por mol de glicose. Logo, o uso da rota ED pela *Zymomonas* é o grande motivo da sua importância industrial, já que o baixo rendimento de energia na rota força a bactéria a manter altas taxas de conversão de glicose em etanol em um esforço para manter seu crescimento. Além disso, a *Zymomonas* apresenta uma outra característica importante como fermentar glicose em quantidades equimolares de etanol e CO₂, assim, o substrato glicose não é perdido, como ocorre com as leveduras, as quais também produzem co-produtos como glicerol e outros alcoóis superiores (DUFF & MURRAY, 1996). Entretanto, devido a sua robustez, a levedura *S. cerevisiae* ainda é preferida pelas indústrias para a produção de etanol. Todas as enzimas envolvidas na fermentação são expressas constitutivamente, sendo que as enzimas fermentativas compreendem mais que 50% da quantidade de proteínas total da célula (LIN & TANAKA, 2006).

A biotransformação da celulose em etanol também pode ser conduzida por várias bactérias anaeróbicas termofílicas, como a *Clostridium thermocellum*, tão bem como em alguns fungos filamentosos, incluindo *Monilia* sp., *Neurospora crassa*, *Neurospora* sp., *Zygosaccharomyces rouxii*, *Aspergillus* sp., *Trichoderma viride* e *Paecilomyces* sp. Entretanto, estudos mostram que os processos de fermentação que utilizam estes microrganismos são muito lentos (3-12 dias) com um baixo rendimento (0,8-60 g/L de etanol). Isto ocorre porque estes microrganismos possuem uma baixa resistência para altas concentrações de álcool etílico. Outra desvantagem destes microrganismos (principalmente no caso das bactérias fermentativas) é que eles produzem vários co-produtos, principalmente ácido acético e lático (LIN & TANAKA, 2006).

7. PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Tanto bactérias quanto fungos podem produzir celulasas e hemicelulasas para a hidrólise de resíduos lignocelulósicos, sendo que estes microrganismos podem ser aeróbios ou anaeróbios, mesofílicos ou termofílicos. As bactérias que podem produzir celulasas são: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Termomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* e *Streptomyces* (SUN & CHENG, 2002). Ainda que as bactérias celulolíticas, principalmente as anaeróbias, produzam celulasas com alta atividade específica, elas possuem baixas taxas de multiplicação e não produzem altos títulos de enzimas. Por isso, muitas pesquisas para a produção de celulasas comerciais têm priorizado os fungos (DUFF & MURRAY, 1996).

O cultivo de fungos para produção de enzimas é altamente vantajoso por diversos fatores dentre os quais pode-se destacar: alta produção de enzimas, secreção eficiente de enzimas (que facilita a recuperação destas enzimas para posterior uso) e capacidade de crescer e produzir enzimas em uma variada gama de substratos orgânicos, como resíduos agrícolas (ELISASHVILI et al., 2008). Atualmente, a produção industrial de celulasas utilizam várias espécies fúngicas, principalmente os gêneros *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Humicola sp.* e *Fusarium sp.* O setor comercial destas enzimas é dominado internacionalmente pelas empresas Genencor e Novozymes, esta última com uma fábrica no Brasil, Curitiba, a Novozymes Latin America Ltda. Somente no contexto nacional, a comercialização de preparados celulásicos movimentou até setembro de 2010, USD 1M, com a exportação de 23 toneladas e a importação de 67 toneladas de preparados celulásicos, provenientes da União Européia e norte-americanos (ZÚÑIGA, 2010).

Fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* são os mais utilizados para a produção de celulasas para aplicação industrial, já que seu extrato enzimático possui altos títulos de endoglicanase e exoglicanase, entretanto, este fungo não produz de forma significativa a enzima β -glicosidase, a qual é crucial para evitar os efeitos de inibição enzimática produzido pela celobiose. Para contornar este problema, muitos estudos suplementam o extrato enzimático produzido pelo *T. reesei* com β -glicosidases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*, o qual produz grandes quantidades desta enzima (MOHANRAM et al., 2013).

Além disso, os extratos de celulases comerciais atualmente encontrados no mercado possuem baixas quantidades de enzimas acesssórias, o que limita a eficiência da hidrólise dos materiais lignocelulósicos. Assim, para se obter uma alta eficiência hidrolítica, é necessário a utilização de grandes quantidades de celulases, o que onera e muito o processo de produção de etanol de segunda geração, tornando inviável a sua produção em grande escala. De acordo com dados obtidos pela empresa Novozyme, uma quantidade de enzimas cerca de 40 a 100 vezes superior é necessária para se produzir uma equivalente quantidade de etanol a partir de biomassa, comparando-se com a produção de bioetanol a partir de amido de milho (KARBOUNE et al., 2008).

Diante disso, várias pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de aumentar a produção de celulases e reduzir o custo de produção das enzimas. Estas pesquisas estão enfatizando, principalmente, estudos de *screening* de novos organismos produtores de celulases bem como a avaliação de diferentes sistemas de cultivo e utilização de fontes de carbono que induzem eficientemente a produção das enzimas e que sejam de baixo custo.

Recentemente, resíduos lignocelulósicos têm sido muito utilizados por pesquisadores para a indução da produção de diferentes celulases e hemicelulases por diversos fungos, sendo que, cada substrato pode induzir de forma diferente a produção de complexos enzimáticos, já que eles apresentam diferenças quanto ao conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina (SANCHÉS, 2009; QUIROZ et al., 2010). Além disso, vários trabalhos de otimização do meio de cultura e das condições do crescimento do fungo estão sendo realizados com o intuito de maximizar a produção das enzimas hemicelulolíticas (KATAPODIS et al., 2007; LEVIN et al., 2008; DESWAL et al., 2011; WANG et al., 2012).

As duas principais estratégias utilizadas para a produção de celulases e hemicelulases por microrganismos são a fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS). O principal parâmetro que diferencia esses dois tipos de processos é o teor de água presente no meio reacional. Na FES há ausência ou quase ausência de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se complexada com a matriz sólida de substrato ou como uma fina camada absorvida pela superfície das partículas. Em geral, nesses processos o teor de umidade varia entre 30-85% e a atividade de água típica vai de 0,40-0,90, mimetizando condições encontradas na natureza (CASTRO & PEREIRA Jr., 2010). As FES podem ser vantajosas por

promoverem a obtenção de extratos altamente concentrados, alta estabilidade de produtos, baixa repressão catabólica, cultivo de microrganismos em substratos insolúveis e menor demanda por esterilidade devido a baixa atividade de água neste tipo de sistema de cultivo (HOLKER et al., 2004). Além disso, vários estudos indicam que a produção de celulases por FES pode ter um custo de 10-100 vezes menor do que aquela por FS (ALMEIDA, 2013).

Embora a FS apresente algumas desvantagens em relação à FES, processos envolvendo limitações no teor de água livre no sistema são evitados quando se objetiva a geração de muitos produtos, especialmente em escalas maiores, onde são requeridos biorreatores (CASTRO & PEREIRA Jr., 2010). Fungos, bactérias e leveduras têm sido cultivados em FES, entretanto existe uma dificuldade na adaptação do microrganismo às condições do FES que são mais árduas do que aquelas da FS, as quais pode-se citar as dificuldades com a acessibilidade ao substrato, a oxigenação do meio de cultura e transferência de solutos (ALMEIDA, 2013). Na última década, diversos autores propuseram geometrias e formas de condução e controle, bem como modelos para descrever os fenômenos envolvidos nesses processos, que, em geral, auxiliam no seu desempenho, mas não contornam completamente as limitações que a FES apresenta (CASTRO & PEREIRA Jr., 2010).

Assim, a obtenção de preparados com alta atividade celulolítica vai depender tanto do microrganismo utilizado quanto do processo de produção das enzimas. Além disso, o formulado celulolítico ideal pode ser obtido pelo cocultivo de linhagens superprodutoras dos principais tipos de celulases (WEN et al., 2005); pela produção isolada de celulases e posterior mistura dos extratos purificados, em proporções pré-otimizadas (LI et al., 2005) ou ainda pela incorporação controlada de genes de celulases em organismos hospedeiros (SRIVASTAVA et al., 1999). No que se refere à melhora no processo, torna-se relevante também o aproveitamento e o reciclo das enzimas no reator de hidrólise (ZÚÑIGA, 2010).

Deve-se ressaltar ainda que estudos de sequenciamento do genoma de microrganismos celulolíticos são de extrema importância, visto que proporcionam informações importantes sobre como estes microrganismos degradam a celulose e permitiram também a identificação de novas seqüências que codificam celulases. Utilizando-se técnicas apropriadas de engenharia genética, múltiplas cópias desses genes podem ser reintroduzidas nos genomas destes fungos obtendo-se assim microrganismos com alta capacidade para superexpressar essas enzimas. Além disso,

técnicas de engenharia de proteínas como a evolução dirigida e o desenho racional de proteínas podem ser aplicadas para o desenvolvimento de celulasas mais termoestáveis e cataliticamente mais eficientes para serem utilizadas em processos de hidrólise da celulose cristalina.

8. BASIDEOMICETOS CAUSADORES DA PODRIDÃO BRANCA

Atualmente, as preparações comerciais de celulasas são produzidas principalmente pelos fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*; entretanto, o uso destes extratos enzimáticos ainda onera bastante o processo de sacarificação enzimática para a produção do bioetanol de lignocelulósicos em larga escala. Contudo, ao contrário dos fungos ascomicetos, os basidiomicetos de podridão-branca são microrganismos especializados na degradação da madeira devido a sua capacidade em sintetizar inúmeras enzimas hidrolíticas importantes, como celulasas, hemicelulasas, além de uma rede oxidativa de enzimas extracelular lignolíticas, como lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidase. Estas enzimas atuam em conjunto na degradação dos componentes da biomassa em compostos de baixo peso molecular que podem ser assimilados pelos fungos (FALKOSKI et al., 2012).

Os fungos basidiomicetos da podridão-branca já são muito conhecidos na literatura por produzir eficientes enzimas lignolíticas para a aplicação no branqueamento de polpas de madeira para a produção de papel. Entretanto, é surpreendente que ainda existem poucos trabalhos que avaliam o seu potencial em produzir celulasas e hemicelulasas para aplicação na sacarificação da biomassa lignocelulósica para produção de etanol, o que seria uma proposta bastante interessante, visto que estes fungos são excelentes quanto ao seu potencial em produzir enzimas lignolíticas e que a remoção da lignina do complexo lignocelulósico facilita o acesso das celulasas e hemicelulasas, aumentando o rendimento da sacarificação.

Além de serem muito utilizadas no biobranqueamento da polpa de madeira para a produção de papel, as enzimas produzidas pelos fungos da podridão-branca também são aplicados na produção de aromas naturais e na biorremediação de organopoluentes, xenobióticos e outros contaminantes industriais (LOMASCOLO et al., 2011).

Até o final da última década, a maioria das pesquisas realizada com fungos de podridão branca focalizaram principalmente no estudo de suas enzimas oxidativas. Contudo, apenas recentemente atividades lignocelulolíticas destes fungos têm sido caracterizadas, sendo que alguns deles mostram enzimas celulolíticas robustas e resistentes a altas temperaturas ou a valores extremos de pH, valores muitas vezes compatíveis para a aplicação industrial (QUEIROZ-CASTAÑEDA et al., 2011). Além disso, em trabalhos realizados por ELISASHIVILI et al. (2009) foram feitas avaliações da produtividade de celulasas e hemicelulasas de basidiomicetos como *Trametes versicolor*, *Cerrena maxima*, *Coriolopsis polyzona* e *Pleorotus ostreatus* em cultivos com diferentes fontes de carbono. Os autores obtiveram valores de atividade para celulasas e hemicelulasas comparáveis àqueles obtidos por outros autores que utilizaram em seus trabalhos os fungos *Trichoderma reesei* (ELISASHIVILI et al., 2008), *A. niger* (HOLKER et al., 2004) e *Penicillium echinulatum* (PEDERSEN et al., 2009) evidenciando assim o potencial dos fungos basidiomicetos na produção de enzimas que podem ser utilizadas para sacarificação de biomassa visando à produção de bioetanol.

Entre os fungos da podridão-branca, o grupo poliporóides, incluindo o gênero *Pycnoporus*, são um dos mais representativos da ordem dos homobasidiomicetos saprófitos que atuam na decomposição da madeira, tendo um alto potencial lignocelulolítico reconhecido. Devido às suas características fisiológicas e biotecnológicas, os fungos do gênero *Pycnoporus* são facilmente cultiváveis em laboratórios e em escalas de plantas piloto. Altos rendimentos de biomassa podem ser obtidos utilizando diferentes carboidratos como substratos, como por exemplo, amido, extrato de malte, maltose, metil-celulose, sacarose, glicose, entre outros. Além disso, estes fungos são frequentemente resistentes à variação de pH e temperatura e são capazes de produzir biomassa rapidamente. Estas propriedades são excelentes para a sua aplicação industrial (LOMASCOLO et al., 2011).

Várias espécies do gênero *Pycnoporus* têm sido utilizadas para produzir várias enzimas de interesse industrial, incluindo as hidrolases xilanases e β -glicosidases, invertase e α -amilase (ROHR et al., 2013). Entretanto, a maioria dos estudos é voltada para a produção de lacases, já que estes são excelentes produtores desta enzima.

Assim, diante da necessidade de prospectar novos microrganismos que sejam eficientes produtores de celulasas e hemicelulasas para aplicação na sacarificação da

biomassa lignocelulósica, os fungos da podridão-branca mostram-se promissores; além disso, existem poucos trabalhos com esta finalidade na literatura, deixando uma lacuna a ser preenchida.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**. 5: 309-318, 2002.

ALMEIDA, M.N. **Complexo celulolítico e hemicelulolítico do fungo endofítico *Fusarium verticillioides* e sua aplicação para sacarificação do bagaço de cana**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, 2013.

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, 2010. Disponível em: www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/4. Acesso em Dezembro de 2012.

BALLESTEROS, M.; OLIVA, J.M.; NEGRO, M.J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**. 39: 1843–1848, 2004.

BALAT M, BALAT H, OZ C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**. 34: 551-573, 2008.

BANERJEE, S; MUDLIAR, S.; SEN, R.; GIRI, B.; SATPUTE, D.; CHAKRABARTI, T.; *et al.* Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**. 4: 77-93, 2010.

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

BNDES - Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. **Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias**. Rio de Janeiro, n. 25,p. 5-38, 2007.

BNDES - Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. **O etanol de segunda geração: limites e oportunidades**. Rio de Janeiro, n. 32, p. 117-156, 2009.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT (Portugal), 2008.

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, nº44, 2010.

CARDONA, C. A., SÁNCHEZ, O. J., Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**. 98: 2415-2457, 2007.

CARDONA CA, QUINTERO JA, PAZ IC. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**. 101: 4754-4766, 2010.

CASTRO, M.A., PEREIRA Jr. N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**. 33: 181-188, 2010.

CERQUEIRA LEITE, R.C., LEAL, M.R.L.V.L., CORTEZ, L.A.B., GRIFFIN, W.M., SCANDIFFIO, M.I.G. Can Brazil replace 5% of the 2015 gasoline world demand with ethanol? **Energy**. 34: 655-661, 2009.

COELHO, S.T. Biofuels - Advantages and Trade Barriers - Background Paper to the Expert Meeting for Sectoral Trade Review of Developing Country Participation in New and Dynamic Sectors Session on Biofuels - Genebra, Fevereiro, 2005.

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

COUGHLAN, M.P., HAZIEWOOD, G.P. β -1,4-xylan degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnology Applied Biochemistry**. 17: 259-289, 1993.

COUTO, L. C., COUTO, L., Watzlawick, L. F., CÂMARA, D. Vias de valorização energética da biomassa. **Biomassa & Energia**. 1: 71-92, 2004.

CHENG, K. K.; CAI, B. Y.; ZHANG, J. A.; LING, H. Z.; ZHOU, Y. J.; GE, J. P.; *et al.* Sugarcane bagasse hemicelluloses hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**. 38: 105–109, 2008.

D'ALMEIDA, M.L.O. **Composição química dos materiais lignocelulósicos**. In: Celulose e Papel, Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica, Brasil, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. - IPT-, 2ª Edição, v. 1, Capítulo III, p. 45-106, 1988.

DESWAL, D., KHASA, Y.P., KUHAD, R.C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**. 102: 6065–6072, 2011.

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

ELISASHVILI, V., KACHLISHVILI, E., PENNINGCKX, M. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 35: 1531-1538, 2008.

ELISASHVILI, V., KACHLISHVILI, E., TSIKLARI, N., METREVELI, E., KHARDZIANI, T., AGATHOS, S.N. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 25: 331-339, 2009.

EMERICK, R.P. **Avaliação do potencial nacional de geração de resíduos agrícolas para a produção de etanol**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

FALKOSKI, D.L., GUIMARÃES, V.M., ALMEIDA, M.N., ALFENAS, A.C., COLODETTE, J.L., de REZENDE, S.T. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 166: 1586-1603, 2012.

FERRAZ, A. Aplicações da biotecnologia na produção de papel e celulose. In: LIMA, U. A. (Coord.). **Biotecnologia Industrial**. 3: 465-484, 2001.

GALDEANO, M. C. **Caracterização e aplicação de casca de aveia modificada por tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino associado à extrusão.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.

GIRIO, F.M., FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L.C., MARQUES, S., BOGEL-TUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology.** 101: 4775-4800, 2010.

GOLDEMBERG, J. **“Brazilian Energy Initiative”** World Summit On Sustainable Development, Joanesburgo, África do Sul. Setembro, 2002.

GOLDEMBERG J. Ethanol learning curve- the Brazilian experience. **Biomass and Bioenergy.** 26: 301-304, 2003.

GOLDEMBERG, J. The Case for Energy Renewables. In: **International Conference for Renewable Energies.** Bonn. Thematic Background Paper, Alemanha, 2004.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy.** 36: 2086-2097, 2008.

GRAY, K.A., ZHAO, L., EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology.** 10: 141–146, 2006.

GUARDABASSI, P. M. **Sustentabilidade da biomassa como fonte de energia perspectivas para países em desenvolvimento.** 123 p. Dissertação (Mestrado – Programa Interunidades de Pós-Graduação em Energia) – EP / FEA / IEE / IF da Universidade de São Paulo, 2006.

HAHN-HÄGERDAL, B., PAMMENT, N. Microbial pentose metabolism. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 113–116, 1207–1209, 2004.

HAHN-HÄGERDAL, B., GALBE, M., GORWA-GRAUSLUND, G., LIDÉN, ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **TRENDS in Biotechnology.** v. 24, n. 12, 2006.

HOLKER, U., HÖFER, M., LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 64: 175-186, 2004.

INTERNATIONAL CONFERENCE FOR RENEWABLE ENERGIES
Political Declaration. Bonn, 4 de junho de 2004. Disponível em:
www.renewables2004.de/pdf/Political_declaration_final.pdf. Acesso em: Junho de
2013.

JEFFRIES T.W. Biochemistry of Microbial Degradation-Biodegradation of
lignin and hemicelluloses. **Kluwer Academic Publishers**. 233-277, 1994.

KARBOUNE S., GERAERT P.A., KERMASHA S. Characterization of
selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *Penicillium
funiculosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56: 903-909, 2008.

KATAPODIS, P., CHRISTAKOPOULOU, V., KEKOS, D.,
CHRISTAKOPOULOS, P. Optimization of xylanase production by *Chaetomium
thermophilum* in wheat straw using response surface methodology. **Biochemical
Engineering Journal**. 35: 136–141, 2007.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal
of Biotechnology**. 56: 1–24, 1997.

LEVIN, L., HERRMAN, C., PAPINUTTI, V.L. Optimization of
lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-
state fermentation using response surface methodology. **Biochemical Engineering
Journal**. 39: 207–214, 2008.

LI, X.L.; DIEN, B.S; COTTA, M.A.; WU, Y.V. and SAHA, B.C. Profile of
enzyme production by *Trichoderma reesei* grown on corn fiber fractions. **Applied
Biochemistry and Biotechnology**. 121: 321-334, 2005.

LIMAYEM, A.; RICKE, S.C.; Lignocellulosic biomass for bioethanol
production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in
Energy and Combustion Science**. doi:10.1016/j.pecs.2012.03.002, 2012.

LIN, Y., TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current
state and prospects. **Appl Microbiol Biotechnol**. 69: 627–642, 2006.

LOMASCOLO, A., UZAN-BOUKHRIS, E., HERPOËL-GIMBERT, I.,
SIGOILLOT, J-C., LESAGE-MEESSEN, L. Peculiarities of *Pycnoporus* species for
application in biotechnology. **Appl Microbiol Biotechnol**. 92: 1129-1149, 2011.

LOUETTE, A. (2007). **Gestão do conhecimento: compêndio para a sustentabilidade: ferramentas de gestão de responsabilidade socioambiental**. 1ª ed. Ed. Antakarana Cultura, Arte e Ciência, São Paulo. Disponível em: www.compendiosustentabilidade.com.br. Acesso em novembro de 2010.

LYND LR, WEIMER PJ, VAN ZYL WH, PRETORIUS IS. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 66: 506-577, 2002.

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2010. Secretaria de Produção e Agroenergia. Departamento da cana-de-açúcar e Agroenergia. Produção brasileira de etanol. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em novembro de 2010.

MAPA - Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Produção e Agroenergia. Departamento da cana-de-açúcar e Agroenergia. Produção Brasileira de Cana-de-açúcar, Açúcar e Etanol, 2013.

MATTHEW, H., ASHLEY, O., BRIAN, K., ALISA, E., BENJAMIN, J. S. Wine making 101. Disponível em: <http://www.arches.uga.edu/matthaas/strains.htm>, 2005.

MONovel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. **Sustainable Chemical Processes**. 1:15, 2013. MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; MELO, D.C. Chemical analysis of *Pinus oocarpa* wood PARTE I – quantification of macromolecular components and volatile extractives. **Revista Árvore**. 29: 461-470, 2005.

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

MUSSA, M. A Global Growth Rebound: how strong for how long? **Institute for International Economics**, September 9, 2003.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**. 1:7, 2008.

PEDERSEN, M., HOLLENSTED, M., LANGE, L., ANDERSEN, B. Screening for cellulose and hemicellulose degrading enzymes from the fungal genus *Ulocladium*. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 63: 484-489, 2009.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. In Series on Biotechnology, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, 45 p, 2008.

PORZIO, G. F., *et al.* Modelling lignocellulosic bioethanol from poplar: estimation of the level of processintegration, yield and potential for co-products. **Journal of Cleaner Production**.doi:10.1016/j.jclepro, 2012.

QUIROZ-CASTANEDA, R.E., PEREZ-MEIA, N., MARTINEZ-ANAYA, C., ACOSTA-URDAPILLETA, L., FOLCH-MALLOL, J. Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the Basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. **Biodegradation**. 1-8, 2011.

RFA – Renewable Fuels Association. (2010). 2008 World fuel ethanol production. Disponível em: <http://www.ethanolrfa.org>. Acesso em Novembro de 2010.

ROHR, C.O., LEVIN, L.N., MENTABERRY, A.N., WIRTH, S.A. A first insight into *Pycnoporus sanguineus* BAFC 2126 transcriptome. . **PLoS ONE**. 8(12): e81033. doi:10.1371/journal.pone.0081033, 2013.

SANCHÉZ, C. Lignocellulosic Residues: Biodegradation and Bioconversion by Fungi. **Biotechnology Advances**. 27: 185–194, ISSN 0734-9750, 2009.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**. 37: 19-27, 2012.

SCHLITTLER, L.A.F.S.; PEREIRA Jr., N. Produção de etanol de biomassa lignocelulósicos: pré-tratamento e estratégias de processamento. **Revista da rede de ensino ITC**. Ano II, n° 6, setembro de 2008.

SEABRA, J.E.A., TAO, L., CHUM, H.L., MACEDO, I.C. A Techno-economic evaluation of the effects of centralized cellulosic ethanol and co-products

refinery options with sugarcane mill clustering. **Biomass and Bioenergy**. 34: 1065-1078, 2010.

SILVA, N.L.C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. Dissertação: Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

SIMS, R.E.H., MABEE, W., SADDLER, J.N., TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**. 101: 1570-1580, 2010.

SOCCOL C.R., VANDENBERGHE L.P.dS., MEDEIROS A.B.P., KARP S.G., BUCKERIDGE M., RAMOS L.P. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**. 101: 4820-4825, 2010.

SRIVASTAVA, K.K., VERMA, P.K., SRIVASTAVA, R. A recombinant cellulolytic *Escherichia coli*: Cloning of the cellulase gene and characterization of a bifunctional cellulase. **Biotechnology Letters**. 21: 293, 1999.

SUHAS P.J.M., CARROTT M.M.L., CARROTT R. Lignin – from natural adsorbent to activated carbon: A review. **Bioresource Technology**. 98: 2301–2312, 2007.

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

TAMANINI, C., HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol Agro-industrial residues in biotechnological production of xylitol. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 315-330, out./dez. 2004.

UNDP, UNDESA, WEC. **World Energy Assessment**. ISBN 9211261260. Nova Iorque, 2000.

UNICA - União da indústria de cana-de-açúcar. <http://www.unica.com.br>. Acessado em dezembro de 2010.

UNITED NATIONS KYOTO PROTOCOL, 1997. Disponível em: <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpeng.pdf>. Acesso em: Novembro de 2010.

USDA. “**Bioenergy, US Department of Agriculture, Office of Energy Policy and New Uses**”. Apresentação feita na “Renewable Resources and Biorefineries Conference”, York, UK, set. 6-8, 2006.

WANG, W., YUAN, T., WANG, K., CUI, B., DAI, Y. Statistical optimization of cellulase production by the brown rot fungi, *Fomitopsis palustris*, and its application in the enzymatic hydrolysis of LHW-pretreated woody biomass. **Process Biochemistry**. 47: 2552–2556, 2012.

WEN, Z., LIAO, W., CHEN, S. Production of cellulase/beta-glucosidase by the mixed fungi culture of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 93: 121-124, 2005.

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**. 30: 1458-1480, 2012.

VÁSQUEZ, M.P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA Jr., M.B.; PEREIRA Jr., N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 12: 137-140, 2007.

VERENIUM – The nature of energy. (2008). Energy independence and security act of 2007 (EISA). Disponível em www.verenium.com. Acesso em dezembro de 2010.

VON BRAUN, J. **Food prices, biofuels and climate change**. Apresentação em PowerPoint, fev. 2008.

ZÚÑIGA, U.F.R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para a produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. Tese de doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASE PELO FUNGO DA PODRIDÃO BRANCA *Pycnoporus* *sanguineus* PF-2 E SUA APLICAÇÃO NA SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA

CAPÍTULO 2 – OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASE PELO FUNGO DA PODRIDÃO BRANCA *Pycnoporus sanguineus* PF-2 E SUA APLICAÇÃO NA SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA

RESUMO

A biomassa lignocelulósica pode ser convertida em açúcares fermentáveis visando à produção de etanol de segunda geração. Contudo, a produção das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas envolvidas na sacarificação da biomassa é de alto custo e inviabiliza a produção em larga escala deste biocombustível. Logo, a produção de celulases e xilanase de *P. sanguineus* foi otimizada a partir das metodologias estatísticas fatorial fracionado 2^{5-1} (resolução V) seguido por um delineamento composto central rotacional (DCCR). Após as etapas de otimização verificou-se aumentos nas atividades das enzimas endoglicanase, celobiase, FPase e xilanase, os quais foram de 3,2, 19,5, 4,1 e 17,2 vezes, respectivamente. Para a máxima produção de endoglicanase (16,42 U/mL), FPase (0,38 U/mL) e xilanase (111,03 U/mL), os valores ótimos para os fatores concentração de forrageira, concentração de peptona e concentração de $ZnSO_4$ foram 4 % (m/v), 2 % (m/v) e 12,5 mg/L, respectivamente. Já os valores ótimos para o tempo de cultivo foram 186,1 h para endoglicanase, 180 h para FPase e 185,1 h para xilanase. Para atividade celobiase, a máxima produção (0,35 U/mL) ocorreu quando os fatores concentração de forrageira, concentração de peptona e tempo de cultivo foram 4 % (m/v), 2 % (m/v) e 60 h. As atividades celulolíticas (endoglicanase e celobiase) e xilanolíticas produzidas foram parcialmente caracterizadas em relação à temperatura e pH, apresentando máximas atividades entre 55 e 65°C e em pH entre 4,0 e 5,5. Endoglicanase e xilanase retiveram mais de 50 % de atividade residual após 13 h de incubação a 60°C. Esta alta termoestabilidade torna a sua aplicação promissora em vários processos biotecnológicos. Por fim, o extrato bruto otimizado foi aplicado na sacarificação do bagaço de cana, convertendo 17,4 % da celulose em glicose após 76 h. Contudo, uma maior eficiência de hidrólise foi alcançada (25,5 %) quando extrato bruto foi suplementado com celobiase comercial na proporção de 10:5 (FPase:celobiase).

Palavras chaves: otimização, celulases, xilanase, *Pycnoporus*, sacarificação.

1. INTRODUÇÃO

A celulose, que atualmente está sendo referida como moeda biológica, pode ser convertida em açúcares monoméricos, os quais servem de matéria-prima para diversos produtos úteis como o etanol, ácido lático, metano, hidrogênio, entre outros. A consciência do esgotamento das fontes de combustíveis fósseis e do crescente aumento da poluição do ar e, conseqüentemente, do efeito estufa, causado principalmente pela combustão incompleta deste tipo de combustível, serve de estímulo para governos e indústrias da iniciativa privada, apoiarem pesquisas que visam à obtenção de etanol por meio da conversão de biomassa (WANG et al., 2012).

A conversão biotecnológica da celulose em açúcares fermentáveis requer uma combinação de enzimas celulases que atuam sinergicamente, como a endo- β -1,4-glicanases (EC 3.2.1.4), exoglicanases (celobiohidrolases EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (ZHANG et al., 2012). Além disso, enzimas hemicelulolíticas como as xilanases (E.C.3.2.1.8), mananases (E.C. 3.2.1.78), β -xilosidases (E.C. 3.2.1.37), β -manosidases (E.C. 3.2.1.25), α -arabinofuranosidase (E.C. 3.2.1.55) e α -galactosidases (E.C. 3.2.1.22), também empregam um papel importante no processo de sacarificação da celulose. Estas enzimas removem fragmentos de hemicelulose que revestem as fibras de celulose, aumentando a acessibilidade das celulases e, conseqüentemente, aumentam a eficiência da hidrólise da celulose (JUHASZ et al., 2005; BERLIN et al., 2007).

O custo das enzimas é considerado o principal impedimento para utilização a nível industrial da hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica. Para hidrolisar eficientemente a celulose, grandes quantidades de celulases são necessárias, o que, por sua vez, aumenta, e muito, o custo do processo. Diante disto, pesquisas têm concentrado esforços para redução dos custos das enzimas a partir de “screening” de organismos produtores destas enzimas; melhoramento dos organismos e das enzimas para adequar seu uso às condições industriais e estudos relacionados à sua produção, como escolha de substratos e condições de cultivo dos microrganismos (CHANDRA et al.; 2007; ELISASHVILI et al., 2008; FALKOSKI et al., 2013; MOHANRAM et al., 2013).

As preparações comerciais de celulases são produzidas principalmente pelos fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*; além disso, a maioria

dos estudos sobre celulases fúngicas também estão voltadas para estes gêneros ou para outros ascomicetos. No entanto, ao contrário dos ascomicetos, os basidiomicetos são organismos especializados na degradação da madeira e, portanto, também secretam enzimas hidrolíticas relevantes (celulases, hemicelulases e lacases). Contudo, a utilização de extratos enzimáticos produzidos por estes fungos são ainda pouco estudados em processos de sacarificação de biomassa.

Neste trabalho, o fungo basidiomiceto de podridão-branca *Pycnoporus sanguineus* PF-2 foi escolhido devido a sua alta capacidade de produzir celulases em meio líquido, conforme apresentado em trabalhos preliminares (FALKOSKI et al., 2012). Com o objetivo de otimizar a produção de celulases e xilanase por este fungo, foi utilizada a metodologia estatística de superfície de resposta. Em adição, a eficácia do complexo enzimático produzido pelo *P. sanguineus* foi verificada a partir da hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com hidróxido de sódio.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Os substratos xilana *birchwood*, carboximetilcelulose (CMC) e celobiose foram obtidos da *Sigma Chemical Company* (St. Louis, MO, USA). As amostras de biomassas lignocelulósicos capim elefante, palha e bagaço de cana-de-açúcar, sabugo e palha de milho e a forrageira (*Panicum maximum*) foram obtidos em unidades experimentais da UFV. Estas amostras foram secadas em estufa a 105 °C e moídas. Já o farelo de trigo foi comprado no comércio local. Os demais reagentes necessários à execução deste trabalho apresentaram procedência e grau de pureza analítico.

2.2. Microrganismo e condições do cultivo

O fungo *Pycnoporus sanguineus* PF-2 foi isolado da madeira em decomposição e gentilmente cedido pelo Laboratório de Patologia Florestal e Genética de Interação Planta Patógeno da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. O fungo foi repicado rotineiramente em meio BDA (Batata Dextrose Agar) e incubado a 28 °C. Em todos os experimentos realizados, foram utilizados cinco discos miceliais (7,0 mm de diâmetro) extraídos de placas previamente incubadas por sete dias para inocular 50 mL do meio de cultivo presente em frasco *Erlenmayer* de

250 mL. Posteriormente, os frascos foram incubados a 28 °C sob agitação de 180 rpm durante sete dias. Após este tempo, as amostras foram filtradas e então centrifugadas sob refrigeração (4 °C) a 10000×g por 20 min e o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático.

2.3. Ensaio enzimáticos

Os ensaios para a determinação das atividades das celulases FPase e endoglicanase foram adaptados de GHOSE (1987). A atividade de FPase foi determinada utilizando papel de filtro *Whatman* nº 1 (1 x 5 cm) como substrato, o volume total da reação foi de 1,5 mL e o tempo de incubação foi de 60 min. A atividade de endoglicanase foi determinada utilizando CMC como substrato (concentração final de 1 % m/v) em um volume total de 1 mL por 30 min. Já para a atividade de xilanase foi utilizada a xilana *birchwood* como substrato (concentração final de 1 % m/v) em um volume de 1 mL por 15 min. A concentração dos açúcares liberados durante os ensaios enzimáticos foram determinadas utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), utilizando curva padrão de glicose (0,11 – 1,11 µmol).

A atividade da celobiase foi determinada utilizando a celobiose como substrato (concentração final de 6 mM) em um volume de ensaio de 0,5 mL e um tempo de incubação de 30 min. A glicose liberada durante o ensaio foi quantificada utilizando o kit analítico comercial Glicose Monoreagente K08, o qual se baseia nas enzimas glicose oxidase e peroxidase (*Quibasa Basic Chemical*, Belo Horizonte, MG, Brasil).

Todos os ensaios enzimáticos foram feitos em tampão acetado de sódio, 50 mM, pH 5, a 50 °C e foram realizados em triplicata. Os valores dos desvios padrões relativos aos ensaios enzimáticos foram menores que 5 %. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol do produto, glicose ou xilose, por minuto sob as condições do ensaio.

2.4. Seleção da fonte de carbono e de nitrogênio

Com o intuito de determinar qual a melhor fonte de carbono e de nitrogênio para a indução das enzimas FPase, endoglicanase, celobiase e xilanase, o fungo foi cultivado em fermentação submersa e o meio de cultivo utilizado foi: 50 mg/L de

KCl, 0,5 g/L de MgSO₄, 18 mg/L de FeSO₄.7H₂O, 1,5 g/L de KH₂PO₄, 0,25 g/L de CuSO₄, 1 g/L de CaCl₂, 10 mg/L de ZnSO₄, 1 % (m/v) da fonte de nitrogênio (peptona, extrato de levedura, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄ ou NH₄NO₃) e 1,5 % da fonte de carbono (forrageira, bagaço de cana, palha de cana, sabugo de milho, palha de milho, capim elefante ou farelo de trigo). O pH do meio foi ajustado para 4,0.

2.5. Otimização do processo fermentativo

Para otimizar as condições de produção das celulases e xilanase, foi adotada a metodologia de superfície de resposta. As variáveis dependentes selecionadas para este estudo foram as atividades de FPase, endoglicanase, celobiase e xilanase, todas expressas em U.mL⁻¹. Os experimentos foram conduzidos em fermentação submersa e a composição do meio mineral padrão utilizado em todos experimentos de otimização foram: 50 mg/L de KCl, 0,5 g/L de MgSO₄, 18 mg/L de FeSO₄.7H₂O, 1,5 g/L de KH₂PO₄, 0,25 g/L de CuSO₄, 1 g/L de CaCl₂, além da fonte de carbono e nitrogênio previamente selecionadas. O pH do meio foi sempre ajustado para 4,0. Já a concentração dos fatores analisados (variáveis independentes) variou de acordo com cada delineamento experimental.

2.5.1. Screening dos fatores

Para a triagem inicial dos fatores que afetam a produção das enzimas, utilizou-se o delineamento fatorial fracionado 2⁵⁻¹ (resolução V), o qual gerou um total de 16 tratamentos. Neste estudo, os efeitos principais e os efeitos de interação dupla dos fatores concentração de forrageira (C), concentração de peptona (N), concentração de ZnSO₄ (Zn), concentração de KH₂PO₄ (K) e o tempo de incubação (T) sobre a produção de FPase, endoglicanase, celobiase e xilanase (variáveis dependentes) foram analisados. Os níveis dos fatores foram: concentração de forrageira, 4 e 8 % (m/v); concentração de peptona, 2 e 4 % (m/v); concentração de ZnSO₄, 10 e 30 (mg/L) e concentração de KH₂PO₄, 1 e 3 (g/L) e tempo de incubação, 72 e 168 (horas) (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores reais e valores codificados (entre parênteses) para o fatorial fracionado e as respostas correspondentes.

Ordem	Fatores					Respostas			
	Forrageira (%)	Peptona (%)	ZnSO ₄ (mg/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	Tempo (h)	Endoglucanase (U/mL)	Celobiase (U/mL)	FPase (U/mL)	Xilanase (U/mL)
1	4 (-1)	2 (-1)	10 (-1)	1 (-1)	168 (+1)	12,15	0,20	0,16	31,41
2	8 (+1)	2 (-1)	10 (-1)	1 (-1)	72 (-1)	1,45	0,25	0,03	9,14
3	4 (-1)	4 (+1)	10 (-1)	1 (-1)	72 (-1)	0,47	0,23	0,04	7,84
4	8 (+1)	4 (+1)	10 (-1)	1 (-1)	168 (+1)	2,67	0,27	0,05	11,90
5	4 (-1)	2 (-1)	30 (+1)	1 (-1)	72 (-1)	1,72	0,26	0,04	10,42
6	8 (+1)	2 (-1)	30 (+1)	1 (-1)	168 (+1)	11,03	0,18	0,14	30,08
7	4 (-1)	4 (+1)	30 (+1)	1 (-1)	168 (+1)	2,83	0,28	0,05	11,33
8	8 (+1)	4 (+1)	30 (+1)	1 (-1)	72 (-1)	0,56	0,25	0,02	7,93
9	4 (-1)	2 (-1)	10 (-1)	3 (+1)	72 (-1)	6,25	0,27	0,02	7,52
10	8 (+1)	2 (-1)	10 (-1)	3 (+1)	168 (+1)	10,02	0,20	0,11	26,22
11	4 (-1)	4 (+1)	10 (-1)	3 (+1)	168 (+1)	3,00	0,30	0,05	12,64
12	8 (+1)	4 (+1)	10 (-1)	3 (+1)	72 (-1)	0,58	0,24	0,04	8,26
13	4 (-1)	2 (-1)	30 (+1)	3 (+1)	168 (+1)	5,89	0,15	0,08	20,21
14	8 (+1)	2 (-1)	30 (+1)	3 (+1)	72 (-1)	0,53	0,22	0,02	9,17
15	4 (-1)	4 (+1)	30 (+1)	3 (+1)	72 (-1)	0,58	0,26	0,02	7,34
16	8 (+1)	4 (+1)	30 (+1)	3 (+1)	168 (+1)	4,04	0,28	0,06	12,98

A análise de variância (ANOVA) do teste *F* foi realizada inicialmente para avaliar se houve algum fator com um efeito diferente de zero. Posteriormente foi realizado o teste *t* para determinar quais coeficientes foram diferentes de zero a 5 % de probabilidade. Nesta análise os efeitos das interações de terceira, quarta e quinta ordem foram utilizados como efeitos residuais. Os efeitos foram calculados de acordo com as Equações 1 e 2.

$$E_m = m_+ + m_- \quad (\text{Equação 1})$$

$$E_i = \frac{(m_{++} + m_{--}) - (m_{+-} + m_{-+})}{2} \quad (\text{Equação 2})$$

onde: E_m é o efeito principal, E_i é o efeito da interação, m_+ é a média dos valores da variável dependente no maior nível do fator, m_- é a média dos valores da variável dependente no menor nível do fator, m_{++} é a média dos valores da variável dependente no maior nível dos dois fatores, m_{--} é a média dos valores da variável dependente no menor nível dos dois fatores, m_{+-} é a média dos valores da variável dependentes no maior nível do fator 1 e no menor nível do fator 2, m_{-+} é a média dos valores da variável dependente no menor nível do fator 1 e no maior nível do fator 2.

Este delineamento fatorial realizado inicialmente permite a seleção das variáveis estatisticamente significativas para a produção das enzimas de acordo com o teste *t* aplicado aos coeficientes de regressão com um nível de 95 % de confiança.

2.5.2. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Foi realizado um DCCR com os fatores que afetaram significativamente a produção de endoglicanase. Devido a dificuldade de otimizar todas as atividades enzimáticas simultaneamente, a atividade desta enzima foi sempre priorizada neste trabalho. Logo, os níveis estudados no fatorial fracionado foram agora modificados com o intuito de aumentar a atividade de endoglicanase.

O uso deste delineamento teve como objetivo obter um modelo de segunda ordem que prediz a produção enzimática (variável dependente) em função das variáveis estudadas (variáveis independentes). Neste experimento utilizaram-se os pontos fatoriais (-1 e +1), pontos axiais (-1,68 e +1,68) e os pontos centrais (0). O ponto central foi repetido sete vezes para estimar o erro experimental e foram definidos pela seguinte combinação: concentração de forrageira, 2-6 % (m/v); concentração de peptona, 1-3 % (m/v); concentração de ZnSO₄, 5-20 mg/L; tempo, 120-240 h. Todas as variações dos níveis dos fatores foram avaliados estatisticamente pelo teste *t*.

Os dados obtidos do DCCR (Tabela 2) foram utilizados para ajustar um modelo polinomial quadrático ou modelo de superfície de resposta de segunda ordem, o qual pode ser representado pela seguinte equação:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_{12} + \beta_{22} X_{22} + \beta_{33} X_{32} + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \varepsilon \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

- X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis referentes aos fatores;
- β_0 é uma constante, o ponto de interseção;
- β_1 , β_2 , β_3 são referentes aos efeitos lineares dos fatores;
- β_{11} , β_{22} , β_{33} são referentes aos efeitos quadráticos dos fatores;
- β_{12} , β_{13} , β_{23} são referentes aos efeitos de interação dupla dos fatores;
- ε é o erro experimental.

Tabela 2- Valores reais e valores codificados (em parênteses) para o DCCR e as respostas observadas (obs.) e previstas (pred.) correspondentes.

Ordem	Fatores				Atividades (U/mL)							
	Forrageira (%)	Peptona (%)	ZnSO ₄ (mg/L)	Tempo (h)	Endoglicanase		Celobiase		FPase		Xilanase	
					Obs.	Pred.	Obs.	Pred.	Obs.	Pred.	Obs.	Pred.
1	2 (-1)	1 (-1)	5 (-1)	120 (-1)	3,74	2,1	0,14	0,1	0,09	0,05	19,69	24,89
2	6 (+1)	1 (-1)	5 (-1)	120 (-1)	8,86	7,71	0,19	0,19	0,20	0,19	37,49	41,11
3	2 (-1)	3 (+1)	5 (-1)	120 (-1)	4,35	4,22	0,16	0,19	0,10	0,082	24,04	26,71
4	6 (+1)	3 (+1)	5 (-1)	120 (-1)	5,93	5,95	0,16	0,18	0,17	0,17	29,17	26,52
5	2 (-1)	1 (-1)	20 (+1)	120 (-1)	4,21	2,65	0,13	0,13	0,11	0,09	19,11	26,63
6	6 (+1)	1 (-1)	20 (+1)	120 (-1)	11,12	9,57	0,21	0,24	0,24	0,20	40,75	41,84
7	2 (-1)	3 (+1)	20 (+1)	120 (-1)	4,52	3,64	0,20	0,22	0,11	0,11	22,37	24,24
8	6 (+1)	3 (+1)	20 (+1)	120 (-1)	6,72	6,68	0,20	0,23	0,13	0,17	25,05	23,04
9	2 (-1)	1 (-1)	5 (-1)	240 (+1)	4,26	3,52	0,14	0,11	0,09	0,07	20,32	30,9
10	6 (+1)	1 (-1)	5 (-1)	240 (+1)	9,17	9,06	0,22	0,21	0,21	0,20	45,49	49,25
11	2 (-1)	3 (+1)	5 (-1)	240 (+1)	5,12	5,68	0,28	0,25	0,06	0,1	28,51	33,052
12	6 (+1)	3 (+1)	5 (-1)	240 (+1)	6,56	7,34	0,28	0,26	0,14	0,18	33,93	34,99
13	2 (-1)	1 (-1)	20 (+1)	240 (+1)	4,69	3,68	0,14	0,13	0,08	0,07	25,06	33,34
14	6 (+1)	1 (-1)	20 (+1)	240 (+1)	11,19	10,53	0,30	0,26	0,13	0,17	44,77	50,68
15	2 (-1)	3 (+1)	20 (+1)	240 (+1)	4,33	4,7	0,29	0,27	0,07	0,09	26,32	31,28
16	6 (+1)	3 (+1)	20 (+1)	240 (+1)	7,01	7,67	0,26	0,30	0,09	0,13	31,77	32,2
17	0 (-2)	2 (0)	12,5 (0)	180 (0)	1,13	1,75	0,01	0,04	0,01	0,04	38,04	32,33
18	8 (+2)	2 (0)	12,5 (0)	180 (0)	10,19	10,33	0,19	0,16	0,27	0,22	47,99	49,48
19	4 (0)	0 (-2)	12,5 (0)	180 (0)	3,78	5,1	0,01	0,06	0,05	0,09	43,32	47,44
20	4 (0)	4 (+2)	12,5 (0)	180 (0)	5,93	4,37	0,24	0,20	0,17	0,09	29,12	30,78
21	4 (0)	2 (0)	-2,5 (-2)	180 (0)	7,30	7,62	0,21	0,24	0,18	0,19	43,37	36,08
22	4 (0)	2 (0)	27,5 (+2)	180 (0)	7,06	8,51	0,33	0,31	0,22	0,19	41,96	35,035
23	4 (0)	2 (0)	12,5 (0)	60 (-2)	2,05	3,63	0,33	0,27	0,07	0,12	11,07	9,51
24	4 (0)	2 (0)	12,5 (0)	300 (+2)	6,86	6,04	0,30	0,35	0,17	0,1	27,35	24,69
25	4 (0)	2 (0)	12,5 (0)	180 (0)	16,01	16,39	0,28	0,34	0,34	0,37	113,88	110,88
26	4 (0)	2 (0)	12,5 (0)	180 (0)	16,30	16,39	0,33	0,34	0,38	0,37	113,88	110,88
27	4 (0)	2 (0)	12,5 (0)	180 (0)	16,37	16,39	0,37	0,34	0,39	0,37	107,75	110,88
28	4 (0)	2 (0)	12,5 (0)	180 (0)	17,14	16,39	0,34	0,34	0,37	0,37	107,44	110,88
29	4 (0)	2 (0)	12,5 (0)	180 (0)	16,05	16,39	0,36	0,34	0,41	0,37	112,81	110,88
30	4 (0)	2 (0)	12,5 (0)	180 (0)	16,61	16,39	0,33	0,34	0,37	0,37	107,57	110,88
31	4 (0)	2 (0)	12,5 (0)	180 (0)	16,24	16,39	0,34	0,34	0,37	0,37	112,84	110,88

2.5.3. Análises estatísticas

As matrizes dos dados codificadas, os cálculos estatísticos e a regressão dos dados, assim como os gráficos de superfícies de resposta, foram realizados no *software* estatístico MINITAB 14.

2.6. Caracterização bioquímica das enzimas

Efeito do pH e temperatura: as atividades das enzimas foram determinadas com o pH variando de 3,0-8,0 utilizando o tampão ácido cítrico/fosfato de sódio (McIlvaine, 1921) e temperaturas entre 20 e 80 °C.

Análise da termoestabilidade: amostras das enzimas foram pré-incubadas por diferentes períodos de tempo na temperatura de 60 °C. A estabilidade térmica das enzimas foi avaliada mensurando-se a atividade residual de acordo com os ensaios padrões.

Os resultados das análises são apresentados como média \pm desvio padrão de três medições. Os valores de meia-vida das enzimas foram calculados pelo ajuste dos dados obtidos nos experimentos de termoestabilidade a uma equação exponencial utilizando o *software Curve Expert 1.3*.

2.7. Sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar

O extrato otimizado de *P. sanguineus* PF-2 foi utilizado como fonte de enzimas para a hidrólise do bagaço de cana. Este extrato também foi suplementado com diferentes proporções de celobiase comercial (Novozyme 188) para verificar possíveis efeitos inibitórios sobre as atividades das celulases.

Previamente, 25 g de biomassa seca e moída foram pré-tratadas com uma solução de hidróxido de sódio 1 % (m/v), sendo a carga de sólidos final de 10 % (m/v). Os tratamentos foram realizados em duplicata em autoclave por 60 min a 121 °C. A fração sólida resultante foi lavada cuidadosamente com água destilada, filtrada, colocada em recipiente hermético e então armazenada a -20 °C. A composição química do bagaço de cana pré-tratado e não tratado foi determinada utilizando-se o método de lignina Klason modificado do método padrão TAPPI T222 om-98 (TAPPI, 1999).

A sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado foi realizada em frascos contendo 50 mL dos extratos enzimáticos diluídos apropriadamente em tampão acetato 100 mM, pH 4,0. O extrato enzimático otimizado do *P. sanguineus* PF-2 foi utilizado em todos os experimentos de sacarificação, contudo, o mesmo foi previamente concentrado 10 vezes a partir do sistema de ultrafiltração Amicon (Millipore Co. – Billerica, MA, USA) e utilizando o filtro de membrana YM-10 (Cut-off Mr 10.000 Da). Foram realizadas quatro sacarificações com cargas

enzimáticas diferentes, sendo a primeira (sacarificação 1) contendo apenas o extrato otimizado do *P. sanguineus* PF-2, com uma carga de 10 U de FPase. Já nas demais sacarificações, foi utilizado o extrato otimizado, com a mesma carga enzimática, mas suplementado com diferentes quantidades de celobiase comercial: 5 U (sacarificação 2), 10 U (sacarificação 3) e 20 U (sacarificação 4). Para evitar possíveis contaminações, foi adicionado ao meio azida sódica e tetraciclina nas concentrações de 10 mM e 1 mg/mL, respectivamente. Em todas as reações de sacarificação, a carga de sólidos final foi de 2 % (m/v). Por fim, os frascos foram acondicionados em um agitador orbital, a 50 °C e 150 rpm por 120 h. Amostras de 0,5 mL foram periodicamente retiradas da mistura de reação e imediatamente colocadas em banho fervente para a completa desnaturação das enzimas. Posteriormente, as mesmas foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min e o sobrenadante foi estocado a -20 °C para as análises posteriores. Todas as reações de sacarificação foram realizadas em duplicata.

As amostras resultantes das reações de sacarificação foram analisadas em HPLC utilizando-se um cromatógrafo da marca Shimadzu, série 10A, equipado com a coluna Aminex HPX87P (300 x 7,8 mm) e com detectores de índice de refração. A fase móvel utilizada foi água em um fluxo de 0,6 mL/min, a 80 °C. A taxa de conversão dos produtos liberados foi calculada de acordo com a equação 4.

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{\text{Glicose} \left(\frac{g}{L}\right) \times 0,9 \times 100}{\text{Glicana inicial} \left(\frac{g}{L}\right)} \quad (\text{Equação 4})$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção da fonte de carbono e nitrogênio

As necessidades nutricionais dos microrganismos são diversas, uma vez que estes apresentam diferenças inerentes na sua capacidade de absorver componentes externos e sintetizar os constituintes celulares a partir de nutrientes simples. A demanda por água, fontes de energia, carbono, nitrogênio são comuns a todos os microrganismos. Logo, para os estudos de otimização do meio de cultivo para a produção de celulasas e xilanase pelo fungo *P. sanguineus* PF-2, foram realizados

previamente testes de qual seria a melhor fonte de carbono e nitrogênio para a produção destas enzimas e os resultados estão apresentados na Figura 1.

Várias biomassas foram testadas como fonte de carbono para a indução das atividades enzimáticas de endoglicanase, celobiase, FPase e xilanase. A forrageira (FG) foi a fonte de carbono que mais eficientemente induziu um aumento nas atividades enzimáticas de endoglicanase, xilanase e FPase. Já a atividade de celobiase foi mais induzida quando se utilizou o farelo de trigo como fonte de carbono (Figura 1A). Assim, para favorecer a produção da maioria das enzimas, a forrageira foi a fonte de carbono escolhida para ser utilizada nas próximas etapas deste trabalho.

Estudos mostram que dependendo da composição da fonte de carbono utilizada, cada fungo pode induzir de forma diferenciada a produção das enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico (ADAV et al., 2012; RAKOTOARIVONINA et al., 2012), por isso é muito importante testar várias fontes de carbono com diferentes composições lignocelulósicas para a produção destas enzimas. Além disso, é importante que estas fontes de carbono sejam de baixo custo, pois um dos grandes obstáculos para a produção de etanol de segunda geração é o alto custo das celulasas e hemicelulasas envolvidas na hidrólise da biomassa, o que está diretamente relacionado com o preço do meio de cultivo utilizado na produção destas enzimas. Atualmente, o custo das enzimas comerciais utilizadas na hidrólise representa 24 % do custo final do bietanol, tornando o processo oneroso, o que inviabiliza sua produção em escala industrial (SINGHANIA et al., 2010).

As forrageiras, de modo geral, possuem um alto teor de carboidratos, aproximadamente 45 % de celulose e 31 % de hemicelulose, valores comparáveis aos de outras biomassas residuais como o bagaço de cana e o sabugo de milho. Contudo, o seu diferencial está na porcentagem de lignina, em torno de 12 %, valor bem inferior aos encontrados na maioria das biomassas lignocelulósicas (COUTO et al., 2004). O baixo teor de lignina é uma característica desejável para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, pois este componente na matriz lignocelulósica dificulta o acesso das enzimas aos carboidratos. Além disso, a lignina pode promover uma intensa adsorção inespecífica das enzimas que irão hidrolisar a celulose e a hemicelulose, diminuindo a rendimento da sacarificação (CANILHA et al., 2010).

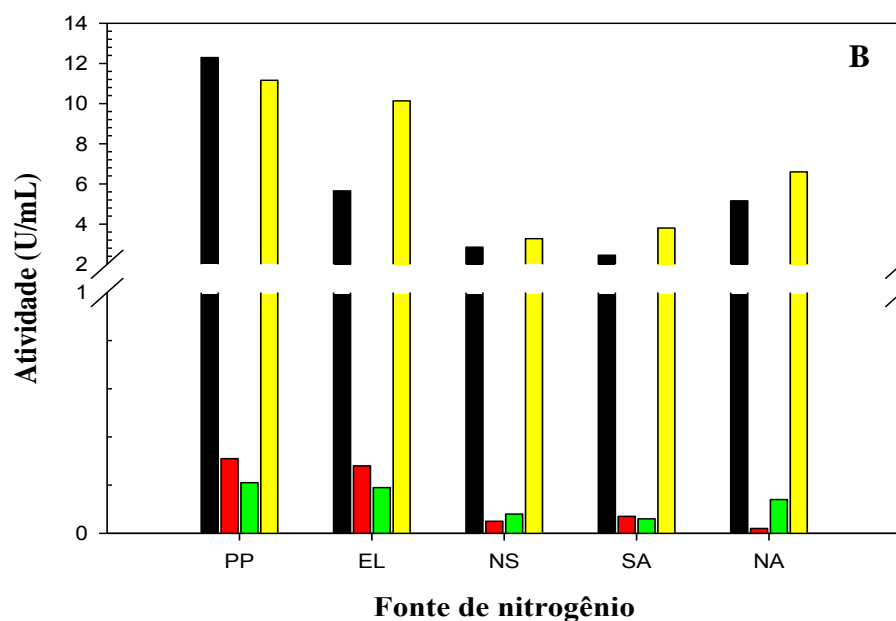
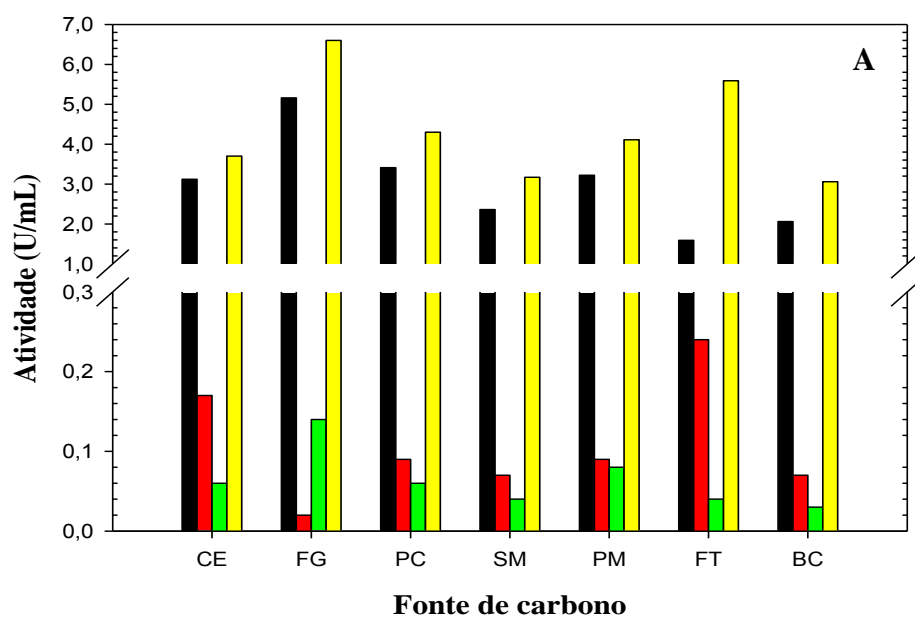


Figura 1 – Efeito de diferentes fontes de carbono (A) e de nitrogênio (B) sobre a atividade enzimática de endoglucanase (■), celobiase (■), FPase (■) e xilanase (■). Fontes de carbono: CE, capim elefante; FG, forrageira; PC, palha de cana; SM, sabugo de milho; PM, palha de milho; FT, farelo de trigo; BC, bagaço de cana. Fontes de nitrogênio: PP, peptona; EL, extrato de levedura; NS, NaNO₃; SA, (NH₄)₂SO₄; NA, NH₄NO₃.

Assim como as gramíneas do tipo cana-de-açúcar, as forrageiras se desenvolvem bem nos trópicos e subtropicais e possuem uma alta eficiência fotossintética (plantas C4), isto é, alta capacidade de transformação da energia solar em biomassa, sem requerer muita água e outros nutrientes. No Brasil, as forrageiras são comumente utilizadas para alimentação animal. Produtores têm uma vasta experiência na produção e transporte de milhões de toneladas de forrageiras a cada ano (ANDERSON et al., 2010), as quais são habitualmente vendidas a um preço muito baixo para empresas de ração animal (SUN e CHENG, 2005). Logo, utilizar este tipo de biomassa lignocelulósica como fonte de carbono para a produção das celulases e hemicelulases é uma estratégia interessante para reduzir o custo de produção das enzimas, visto que estas fontes existem em grandes quantidades e possuem um custo muito reduzido, quando comparado com substratos sintéticos por exemplo (HIDENO et al., 2011). Além disso, os fungos de podridão branca, como o *Pycnoporus sanguineus*, atuam na natureza decompondo a madeira, sendo reconhecidos por sua grande habilidade em degradar todos os componentes da matriz lignocelulósica presentes neste substrato natural, já que secretam uma variedade de enzimas lignolíticas e hemicelulolíticas (TEOH & MASHITAH, 2010).

O nitrogênio também é um constituinte essencial às células, uma vez que é necessário à formação de aminoácidos e ácidos nucleicos. Seu teor na célula pode atingir até 15 % em massa seca (GUOWEIA et al., 2011). Os microrganismos em geral apresentam grande diversidade na assimilação de fontes de nitrogênio. Para testar qual a melhor fonte de nitrogênio na indução das atividades das celulases e xilanases, foram utilizadas duas fontes orgânicas, peptona e extrato de levedura, e três fontes inorgânicas, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NH_4NO_3 . As fontes de nitrogênio orgânicas apresentaram melhores resultados para todas as atividades analisadas, contudo, a peptona foi relativamente melhor no que se refere à atividade de endoglicanase, por isso, a peptona foi a fonte de nitrogênio utilizada nos próximos experimentos de otimização da produção enzimática (Figura 1B).

3.2. Otimização do processo fermentativo

3.2.1. Delineamento fatorial fracionado

Os fatores estudados e os seus respectivos níveis, além dos resultados das atividades enzimáticas das celulases e da xilanase obtidos no delineamento fatorial fracionado estão apresentados na Tabela 1. Neste experimento foi possível analisar quais fatores afetam significativamente a produção das enzimas tanto de forma isolada (efeitos principais ou primários) quanto de forma combinada com outros fatores (efeitos secundários).

Tanto a concentração de nitrogênio quanto o tempo de cultivo do processo fermentativo afetaram a produção das atividades de endoglicanase, FPase e xilanase. Contudo, estes fatores apresentaram efeitos opostos, sendo o nitrogênio um efeito negativo e o tempo um efeito positivo. Já para a atividade de celobiase, o nitrogênio teve um efeito positivo e o tempo isoladamente não afetou a atividade desta enzima, mas a interação dos fatores concentração de nitrogênio e tempo de cultivo apresentou um efeito positivo (Tabela 3). Com base nestes resultados e enfatizando a produção da maioria das enzimas, os níveis da concentração de nitrogênio e do tempo de cultivo foram modificados para 1-3 % (m/v) e 120-240 h, respectivamente, para o DCCR.

Além da concentração de nitrogênio e do tempo de cultivo, as interações C*Zn e N*Zn afetaram positivamente a produção da endoglicanase. Assim, como os efeitos de interação foram positivos e levando-se em consideração o efeito negativo da concentração de nitrogênio, conclui-se que deve-se diminuir os valores dos níveis dos fatores concentração de carbono e ZnSO₄ (Tabela 3). Logo, no DCCR os níveis da concentração de carbono e ZnSO₄ foram modificados para 2-6 % (m/v) e 5-20 mg/L, respectivamente.

É importante salientar que todas as análises apresentaram coeficiente de determinação (R^2) maiores que 99 %, mostrando que houve excelente correlação entre os dados.

Tabela 3 – Efeitos principais e de interação dupla observados no fatorial fracionado para a concentração da fonte de carbono (C), concentração da fonte de nitrogênio (N), concentração de ZnSO₄ (Zn), concentração de KH₂PO₄ (K) e tempo (T) sobre as atividades das celulases e da xilanase. Valores correspondentes às unidades codificadas.

Fatores	Efeitos			
	Endoglicanase	Celobiase	FPase	Xilanase
C	-0,313	-0,007	0,0009	0,871
N	-4,35*	0,045*	-0,034*	-7,996*
Zn	-1,237	-0,011	-0,011	-0,683
K	-0,308	0,0004	-0,017	-1,965
T	5*	-0,016	0,057*	11,141*
C*N	0,553	-0,0023	-0,00009	-0,39
C*Zn	1,599*	0,0005	0,011	1,843
C*K	0,176	-0,001	0,017	1,359
C*T	1,163	0,0065	0,002	0,525
N*Zn	1,561*	0,016	0,003	0,42
N*K	0,727	0,012	0,018	2,518
N*T	-2,41*	0,055*	-0,036*	-6,774*
Zn*K	-0,966	-0,017	-0,0005	-0,552
Zn*T	0,102	-0,011	0,001	-1,207
K*T	-1,246	0,0006	-0,009	-1,204

*Efeitos significativos a 5 % de probabilidade (valores).

3.2.2. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Os fatores concentração de carbono, concentração de nitrogênio, concentração de ZnSO₄ e o tempo de cultivo foram analisados no DCCR. Os valores dos níveis dos fatores e os resultados das atividades enzimáticas das celulases e da xilanase obtidos neste delineamento estão apresentados na Tabela 2.

A partir da análise de regressão foram obtidos os modelos de segunda ordem (Eq. 4-7, Tabela 4) para as respostas atividade de endoglicanase, celobiase, FPase e xilanase como uma função dos parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Como os t valores para as regressões foram altamente significativos ($p < 0,05$) e houve uma boa correlação entre os dados, já que obteve-se altos coeficientes de determinação (R^2), o modelos encontrados são considerados adequados e, portanto, foram utilizados para prever as respostas em função dos fatores e para gerar os gráficos de superfície de resposta. Além disso, os valores preditos foram confirmados pelos dados experimentais obtidos.

Tabela 4 – Equações de segunda ordem obtidas para as atividades das enzimas.

Atividade (U/mL)	Regressão	R ² (%)	
Endoglicanase	$Y=16,39+2,14C-0,97CN-2,59C^2-2,91N^2-2,08Zn^2-2,89T^2$	95,0	Eq.4
Celobiase	$Y=0,34+0,034C+0,03N-0,025CN-0,059C^2-0,051N^2$	88,1	Eq.5
FPase	$Y=0,38+0,047C-0,061C^2-0,071N^2-0,046Zn^2-0,066T^2$	91,6	Eq.6
Xilanase	$Y=110,88+4,29C-4,16N+3,79T-17,49C^2-17,94N^2-18,83Zn^2-23,45T^2$	96,6	Eq.7

C: Concentração de forrageira; N: concentração de nitrogênio; Zn: concentração de ZnSO₄; T: tempo de cultivo. Todos os coeficientes de regressão dos fatores foram estatisticamente significativos de acordo com o teste *t* (*p* < 0,05). Foram utilizados os dados codificados.

A maior atividade de endoglicanase obtida foi de 17,14 U/mL encontrada no tratamento 28, um dos pontos centrais do DCCR. Os pontos centrais (tratamento 25-31) apresentaram pouca variação, indicando boa reprodutibilidade dos dados experimentais (Tabela 2). Apesar de a concentração de forrageira não ter tido efeito significativo no delineamento fatorial fracionado de forma isolada, no DCCR este fator apresentou um grande efeito positivo. Isto ocorreu porque, no DCCR, os níveis do fator concentração de forrageira foram deslocados para valores inferiores àqueles estudados no fatorial fracionado, o que fez com que este fator tivesse este efeito positivo no DCCR. Este resultado sugere que é necessário um valor mínimo da concentração de fonte de carbono para a produção de endoglicanase. Resultados similares foram encontrados para a atividade de FPase, celobiase e xilanase.

A interação entre concentração de forrageira e concentração de peptona foi significativa na indução da produção da endoglicanase e da celobiase, apresentando um efeito negativo. Assim, para aumentar a atividade destas enzimas, deve-se aumentar a concentração de forrageira e diminuir a concentração de peptona (Figura 3).

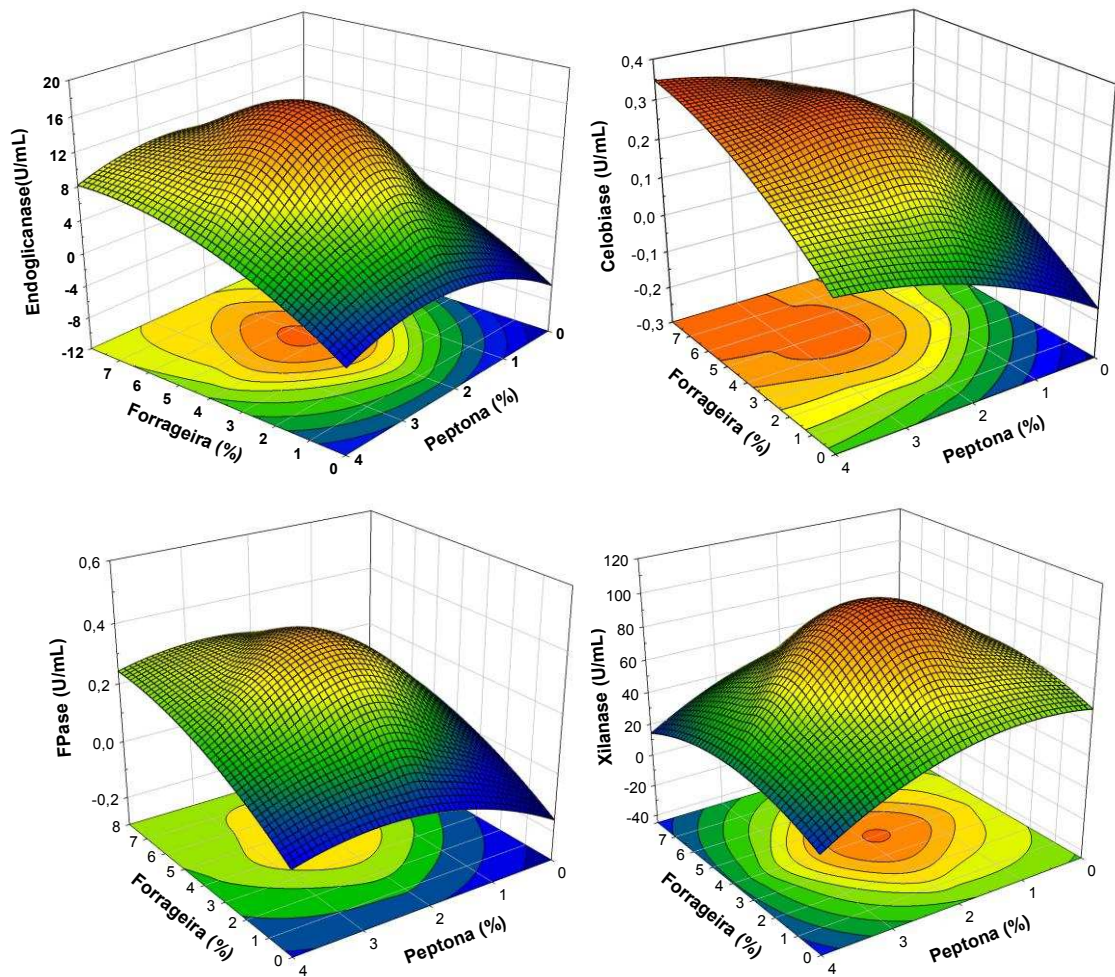


Figura 3 – Gráficos de superfície de resposta das atividades enzimáticas produzidas pelo fungo *P. sanguineus* em relação aos fatores concentração de forrageira e concentração de peptona.

Para todos os fatores analisados, o efeito quadrático foi significativo, indicando a existência de um ponto de máxima atividade para as respostas atividade de endoglicanase, FPase e xilanase. Já para a atividade de celobiase somente o efeito quadrático dos fatores concentração de forrageira e concentração de peptona foram significativos.

Tanto no delineamento fatorial quanto no DCCR, os fatores concentração de $ZnSO_4$ e tempo de cultivo não apresentaram efeito significativo sobre a produção de celobiase. Logo, para maximizar a produção desta enzima os valores da concentração de $ZnSO_4$ e o tempo de cultivo devem ser fixados no menor nível. Desta forma, o $ZnSO_4$ não deve ser adicionado ao meio de cultura, já que o menor nível foi zero.

Assim, para a máxima atividade de celobiase (0,35 U/mL) os valores ótimos para os fatores concentração de forrageira, concentração de peptona e tempo de cultivo foram 4 % (m/v), 2 % (m/v) e 60 h.

Para a máxima atividade de endoglicanase (16,42 U/mL), FPase (0,38 U/mL) e xilanase (111,03 U/mL), os valores ótimos para os fatores concentração de forrageira, concentração de peptona e concentração de ZnSO₄ foram 4 % (m/v), 2 % (m/v) e 12,5 mg/L, respectivamente. Já os valores ótimos para o tempo de cultivo foram 186,1 h para endoglicanase, 180 h para FPase e 185,1 h para xilanase. Todos estes valores de atividades teóricos foram bastante semelhantes aos encontrados experimentalmente neste trabalho, validando assim os modelos matemáticos encontrados (Tabela 4).

Considerando os testes iniciais como parte do estudo de otimização da produção das celulasas e xilanases, verifica-se que todo o processo foi bastante eficiente, visto que houve expressivos aumentos na atividade destas enzimas, os quais foram de 3,2, 17,2, 4,1 e 19,5 para as atividades de endoglicanase, xilanase, FPase e celobiase, respectivamente.

3.3. Caracterização bioquímica das enzimas

O fungo *P. sanguineus* PF-2 foi cultivado nas condições ótimas para a indução da atividade de endoglicanase e o extrato enzimático obtido foi parcialmente caracterizado para verificar se o mesmo pode ser aplicado de forma eficaz em processos de sacarificação de biomassas lignocelulósicas. Os resultados do efeito da temperatura e do pH sobre as atividades de endoglicanase, xilanase e celobiase estão mostrados na Figura 4.

As celulasas e a hemicelulase apresentaram, de forma geral, maiores atividades em temperaturas compreendidas entre 45 °C e 65 °C e em valores de pH mais ácidos, entre 4,0 e 5,5. Além disso, todas as enzimas foram sensíveis a altos valores de pH, principalmente a celobiase, que perdeu totalmente sua atividade em pH acima de 6,5. Esta enzima, juntamente com a xilanase, também foi sensível a valores de pH muito baixos (pH menores que 4,0).

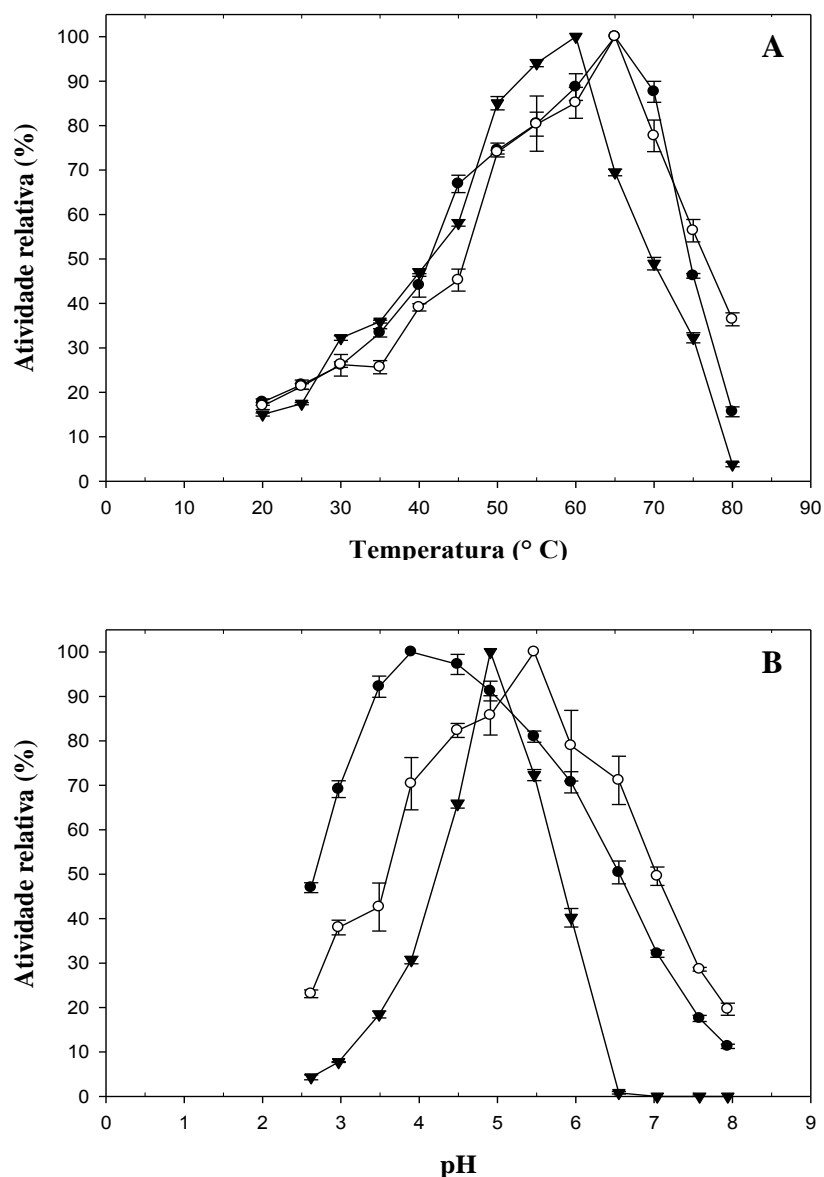


Figura 4 - Efeito da temperatura (A) e do pH (B) sobre a atividade das enzimas endoglicanase (●), xilanase (○) e celobiase (▼) do fungo *Pycnoporus sanguineus* PF-2 crescido em forrageira como fonte de carbono.

O pH onde se obteve a maior atividade de celobiase foi 5,0. Contudo, nos valores de pH de 4,5 e 5,5, a enzima ainda reteve 65 e 70% da sua atividade inicial. A partir do pH 6,5, a enzima perdeu totalmente sua atividade, mostrando sua alta instabilidade em meios alcalinos, o que as tornam inviáveis em processos industriais que utilizam estas condições, como por exemplo em indústrias têxteis (MENON e RAO, 2012). O pH ótimo para a atividade de endoglicanase foi 4,0, contudo em

valores de pH 3,5; 4,5 e 5,0, a atividade de endoglicanase ainda reteve níveis superiores a 90 % de atividade. SAHA (2003) encontrou valores de pH ótimos para a endoglicanase do fungo *Mucor circinelloides* crescido em lactose e celobiose, com máxima atividade encontrada em uma faixa de pH entre 4,0 e 6,0. Já a xilanase apresentou maior atividade no pH 5,5, com a enzima retendo aproximadamente 80 % de atividade na faixa de pH de 4,5 a 6,0 (Figura 4B). Assim, de forma geral, o perfil da atividade das celulases e xilanase de *P. sanguineus* em diferentes valores de pH foi bastante semelhante aos dos complexos celulolíticos de outros fungos reportados na literatura (BALDRIAN et al., 2008; KARBOUNE et al., 2008; de CASTRO et al., 2010).

A endoglicanase e a xilanase apresentaram maiores atividades na temperatura de 65 °C. Entretanto, ambas mantiveram aproximadamente 70 % de sua atividade em uma faixa de temperatura que varia entre 50 a 70 °C (Figura 4A), mostrando que podem ser aplicadas em diferentes bioprocessos, já que possuem alta atividade em diferentes temperaturas. Além disso, estas enzimas apresentaram temperaturas ótimas superiores às observadas em outros trabalhos (SAHA, 2003; ALMEIDA et al., 2009).

Já para a enzima celobiase, a temperatura ótima foi de 60 °C, porém também apresentou altas atividades nas temperaturas 50 e 55 °C (85 e 94 %, respectivamente) (Figura 4A). As celulases e a xilanase de *P. sanguineus* PF-2 apresentaram também atividades consideráveis em temperaturas próximas a 40 °C (mais de 40 % de atividade residual), possibilitando o uso do extrato enzimático deste fungo em processos de sacarificação de biomassas onde se empregam o sistema de sacarificação e fermentação simultaneamente (*SSF – Simultaneous Saccharification Fermentation*), já que a temperatura utilizada na sacarificação é próxima da temperatura ótima de alguns microrganismos fermentadores termofílicos utilizados neste tipo de processo (temperaturas entre 40-45 °C). A vantagem observada neste processo é a diminuição dos efeitos inibitórios causados pelos produtos finais da hidrólise da celulose e, conseqüentemente, são requeridas menores cargas enzimáticas (BALLESTEROS et al., 2004; PARK et al., 2010). Contudo, levando-se em consideração as condições ótimas das celulases e xilanases produzidas por *P. sanguineus*, as condições ideais para a aplicação deste extrato enzimático seria sistemas de hidrólise e fermentação separados (*SHF – Separated Hydrolysis*

Fermentation), onde a temperatura de hidrólise geralmente empregada é de 50 °C (FAGA et al., 2010).

Logo, as celulasas e xilanasas de *P. sanguineus* PF-2 mostraram-se características acídicas, as quais são desejáveis para os processos de bioconversão da celulose, onde se utiliza o pré-tratamento ácido da biomassa lignocelulósica. Além disso, como todas as enzimas celulolíticas presentes neste extrato enzimático possuem valores de temperaturas e pH ótimos próximos aos apresentados pelas enzimas do *Trichoderma reesei*, aproximadamente 50 °C e 5,0 respectivamente (SINGHANIA, 2010), podendo ser utilizado como parte de um *cocktail* enzimático.

Em termos biotecnológicos, é de substancial importância um estudo sobre a estabilidade térmica das enzimas. Vários processos industriais frequentemente são comprometidos pela inativação dessas macromoléculas após certo tempo, influenciando no rendimento final do produto desejado. Logo, neste trabalho também avaliou-se a estabilidade das enzimas endoglicanase, celobiase e xilanase a 60 °C, sendo os resultados apresentados na Tabela 5. Os $t_{1/2}$ encontrados para as enzimas endoglicanase, xilanase e celobiase foram 15, 14,6 e 3,1 h, respectivamente. Esse parâmetro representa o tempo necessário para que a enzima perca 50 % da sua atividade inicial.

Tabela 5 – Estabilidade térmica das enzimas após pré-incubação a 60 °C.

Tempo de incubação (h)	Atividade residual (%)		
	Endoglicanase	Xilanase	Celobiase
0	100±0,6	100±1,3	100±0,8
0,5	89,95±2,7	81,00±1,8	84,63±2,8
1	85,96±1,9	75,88±1,7	74,23±0,9
2	79,49±0,9	73,14±1,1	60,19±0,7
4	74,08±2,1	69,72±1,6	47,46±1,1
8	63,56±2,8	60,13±1,9	31,37±1,3
13	54,24±0,7	52,41±1,5	18,71±0,4
24	36,32±1,2	39,09±0,7	16,91±0,2
48	20,10±0,8	24,15±1,1	13,45±0,4

A endoglicanase e a xilanase obtiveram decaimentos semelhantes em suas atividades durante o intervalo de tempo de pré-incubação. Após oito horas, estas enzimas ainda apresentaram 63,56 e 60,13 % de atividade residual, respectivamente (Tabela 5). Como observado, essas enzimas apresentaram $t_{1/2}$ consideráveis,

conservando 50 % da sua atividade residual durante um intervalo de tempo significativo, aproximadamente 15 h. Essa característica pode ser importante para a produção de bioetanol, já que com $t_{1/2}$ elevados estas enzimas seriam mais resistentes aos longos tempos de incubação na hidrólise dos carboidratos, resultando em uma porcentagem de conversão maior. Em diversos estudos de sacarificação de biomassas estão sendo utilizados tempos de reação entre 24 – 72 h (SANTOS et al., 2010; YAMASHITA et al., 2010; FALKOSKI et al., 2012). Nos estudos de GAO et. al (2008), a endoglicanase obtida a partir de *Aspergillus terreus* M11 reteve 65 % da sua atividade inicial após ser incubada a 70 °C por seis horas. Já a xilanase produzida por *Aspergillus foetidus* cultivado com 1 % de xilana birchwood também apresentou resultados bastante inferiores aos encontrados neste trabalho, pois manteve apenas 36 % da sua atividade inicial após pré-incubada por três horas a 50 °C (SHAH & MADAMWAR, 2005).

A celobiase, por sua vez, apresentou um baixo $t_{1/2}$ a 60 °C, o que não é interessante do ponto de vista industrial, já que esta enzima é uma das últimas a atuar no processo de sacarificação de biomassas lignocelulósicas. Após quatro horas de incubação, reteve apenas 47,46 % e com oito horas sua atividade residual já era próxima de 31,37 %, a qual foi decrescendo gradativamente até às 48 h, tempo no qual se observou uma atividade desprezível (Tabela 5). Assim, para possível aplicação deste extrato enzimático no processo de produção de bioetanol, seria interessante a suplementação de outras celobiasas, fato bastante comum em estudos de sacarificação de biomassa lignocelulósicas, visto que esta enzima é essencial para diminuir o efeito inibitório causado pela celobiose às outras enzimas envolvidas no processo (DUFF & MURRAY, 1996). Assim, além de estar em quantidade significativa, a celobiase deve também ser estável na temperatura do processo. Outra forma de aumentar a estabilidade desta enzima no meio reacional seria a partir da sua imobilização em suportes sólidos, o que traria a vantagem de possível reutilização desta enzima na sua aplicação industrial. Além disso, estudos de melhoramento enzimático podem ser realizados, a fim de aumentar a estabilidade térmica desta enzima, utilizando, por exemplo, técnicas de mutação sítio dirigida.

3.4. Sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar

Para avaliar a desempenho do extrato otimizado produzido pelo fungo *P. sanguineus* PF-2, o bagaço de cana, pré-tratado com NaOH 1 % (m/v), foi utilizado como substrato nos experimentos de sacarificação devido ao seu grande potencial para ser utilizado como matéria-prima lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração no Brasil. A Tabela 6 apresenta os resultados da composição química do bagaço de cana pré-tratado e não tratado. O objetivo do pré-tratamento alcalino foi remover a lignina da biomassa e conseqüentemente reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais lignocelulósicos, o que facilita o acesso das enzimas hidrolíticas na subseqüente sacarificação da biomassa (KUMAR et al., 2009). Verifica-se que o pré-tratamento realizado foi efetivo na remoção da lignina presente no bagaço de cana, a qual foi de 82,5 %.

Tabela 6 – Composição química do bagaço de cana pré-tratado com NaOH 1 % (m/v). Os valores são indicados como porcentagem de matéria seca.

Composição química (%)						
Amostras	Glicanas	Xilanas	Galactanas	Mananas	Arabnanas	Lignina
Não tratado	45,4 ± 0,3	21,7 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,1	1,8 ± 0,0	22,0 ± 0,4
Pré-tratado	51,5 ± 1,3	27,9 ± 0,3	n.d.*	n.d.*	2,8 ± 0,1	8,1 ± 0,3

* não detectados.

Posteriormente, o extrato otimizado do *P. sanguineus* e o extrato otimizado de *P. sanguineus* suplementado com celobiase comercial, Novozymes 188, nas proporções FPase:celobiase de 10:5, 10:10 e 10:20, foram aplicados na sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com NaOH 1 % (m/v). Como já citado anteriormente, a utilização de suplementações de celobiase é muito comum em extratos que apresentam baixa atividade de celobiase, como é o caso do extrato enzimático produzido pelo *P. sanguineus* PF-2, pois evitam o acúmulo de celobiose no meio reacional, diminuindo os efeitos de inibição enzimática por este produto. ZHAO e XIA (2009) obtiveram o dobro de produção de etanol quando sacarificaram palha de milho com extrato enzimático de *T. reesei* suplementado com extrato enzimático de *A. niger* rico em celobiase. Os resultados da porcentagem de glicose liberada após 76 h de reação estão apresentados na Figura 5.

O extrato enzimático do *P. sanguineus*, quando utilizado de forma isolada, converteu 17,4 % da biomassa em glicose após 76 h de reação. Entretanto, quando o mesmo extrato foi suplementado com celobiase comercial na proporção de 10:5, 10:10 e 10:20 (FPase:celobiase), a conversão aumentou para 25,5 %, 22,2 % e 21,3 %, respectivamente (Figura 5). Com a suplementação de celobiase ao extrato enzimático de *P. sanguineus* houve aumento no rendimento de hidrólise de aproximadamente 1,5 vezes. Contudo os aumentos na suplementação não influenciou o rendimento da hidrólise do bagaço de cana, sendo a maior eficiência encontrada no menor valor de suplementação, com proporção de FPase:celobiase de 10:5. FALKOSKI et al. (2012) encontraram um valor de conversão do bagaço de cana pré-tratado com NaOH 1 % (m/v) em glicose muito semelhante ao encontrado neste trabalho (22,6 %), utilizando o extrato enzimático produzido por *P. sanguineus* crescido em sabugo de milho como fonte de carbono.

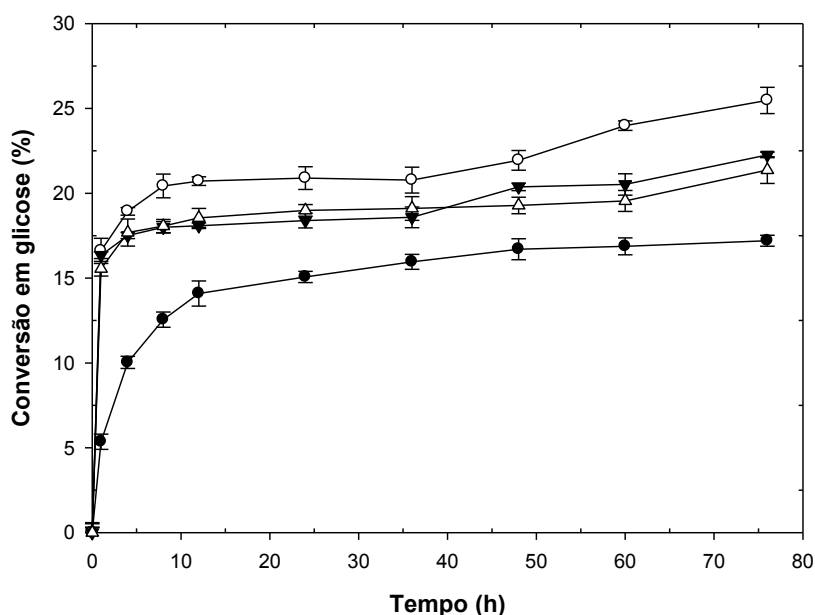


Figura 5 - Produção de glicose em diferentes períodos de tempo na sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com NaOH 1 % (m/v) utilizando o extrato otimizado de *P. sanguineus* PF-2 e o extrato otimizado de *P. sanguineus* PF-2 suplementado com celobiase comercial. (●) Extrato *P. sanguineus*; (○) extrato *P. sanguineus* + celobiase (10:5); (▼) extrato *P. sanguineus* + celobiase (10:10); (Δ) extrato *P. sanguineus* + celobiase (10:20).

Este aumento observado na eficiência de hidrólise proporcionado pela suplementação de celobiase ocorreu porque esta enzima, em quantidade adequada, não permite o acúmulo de celobiose no decorrer da reação e, conseqüentemente, a inibição das endoglicanases e exoglicanases. Fato este que não ocorreu quando se utilizou somente o extrato enzimático de *P. sanguineus*, onde houve um significativo acúmulo de celobiose nas 10 primeiras horas da sacarificação do bagaço de cana (Figura 6). Além disso, a suplementação com celobiase, justamente por não permitir o acúmulo de celobiose, aumentou a velocidade da hidrólise do bagaço de cana, onde já na primeira hora da hidrólise houve um aumento considerável no rendimento de conversão da biomassa em glicose (Figura 5).

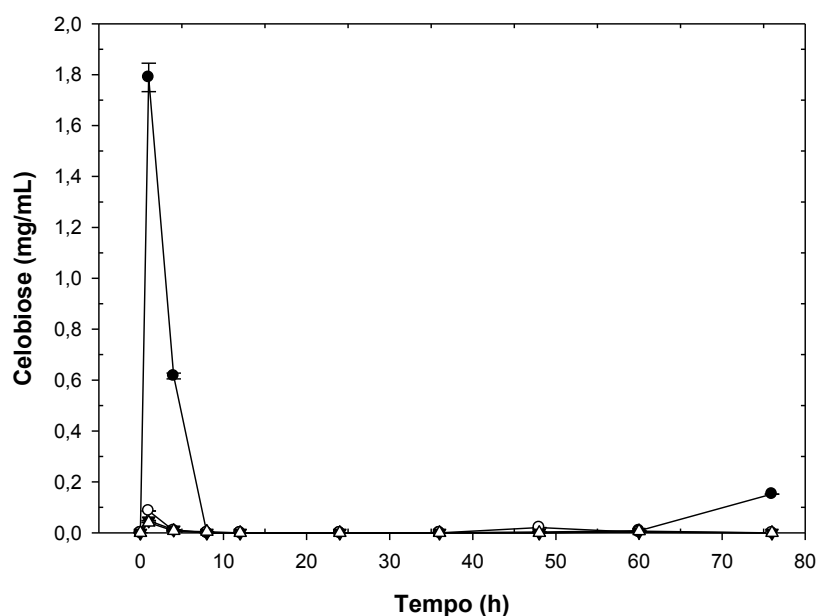


Figura 6 – Formação de celobiose durante a sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com NaOH 1 % (m/v) utilizando o extrato otimizado de *P. sanguineus* PF-2 e o extrato otimizado de *P. sanguineus* PF-2 suplementado com celobiase comercial. (●) Extrato *P. sanguineus*; (○) extrato *P. sanguineus* + celobiase (10:5); (▼) extrato *P. sanguineus* + celobiase (10:10); (Δ) extrato *P. sanguineus* + celobiase (10:20).

A suplementação com celobiase no extrato enzimático de *P. sanguineus* corrigiu a baixa atividade desta enzima no meio reacional, levando a um aumento de 47 % no rendimento final em glicose. Contudo, o máximo rendimento alcançado, ocorrido na sacarificação com suplementação de celobiase na proporção 10:5, ainda

não foi um valor expressivo, visando a sua aplicação em processos de bioconversão de biomassas lignocelulósicas. Este fato pode ser explicado pelo baixo conteúdo de outras enzimas essenciais na hidrólise da biomassa, como a exoglicanase. A atividade desta enzima no extrato concentrado 10 vezes foi de apenas 1,68 U/mL (dado não mostrado).

Muitos trabalhos reportam a importância das enzimas acessórias, como as hemicelulases e pectinases, no processo de hidrólise de biomassa lignocelulósica (SELIG et al., 2008; JUODEIKIENE et al., 2011; ALVIRA et al., 2011; HU et al., 2013). Assim, a possível falta destas enzimas no complexo enzimático produzido por *P. sanguineus* também pode explicar a baixa eficiência de conversão da biomassa em glicose. Contudo, a suplementação de extratos enzimáticos ricos em enzimas acessórias de outros microrganismos, levando-se em consideração a composição química do bagaço pré-tratado, pode resultar em altas taxas de conversão, visto que o complexo enzimático produzido por *P. sanguineus* possui características adequadas para a aplicação em processos de sacarificação da biomassa. Além disso, muitos estudos ainda devem ser realizados com o intuito de um melhorar o balanceamento enzimático e de conseguir efeitos sinérgicos satisfatórios no extrato enzimático do fungo *P. sanguineus* PF-2.

4. CONCLUSÕES

Neste estudo, a concentração de forrageira, concentração de peptona, concentração de sulfato de zinco e o tempo de cultivo de *P. sanguineus* para a produção de FPase, endoglicanase, celobiase e xilanase foram otimizadas, obtendo-se aumentos nas atividades de 4,1, 3,2, 19,5 e 17,2 vezes, respectivamente. Estas enzimas foram então caracterizadas em relação à temperatura e pH, apresentando, de forma geral, maiores atividades em temperaturas entre 45 – 65 °C e em valores de alta termoestabilidade, com $t_{1/2}$ de 15 e 14,6 h, respectivamente. Já o $t_{1/2}$ da celobiase foi de 3,1 h. O potencial do extrato otimizado produzido por *P. sanguineus* em hidrolizar o bagaço de cana pré-tratado com solução alcalina foi avaliado. O maior rendimento de conversão em glicose obtido foi de 25,5 %, quando utilizou-se suplementação com celobiase comercial na proporção de 10:5 (FPase : celobiase). Logo, o extrato enzimático produzido por *P. sanguineus* mostrou características compatíveis com o processo de sacarificação de biomassas lignocelulósicas, contudo,

maiores estudos ainda devem ser realizados visando maiores rendimentos de conversão.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAV, S.S., RAVINDRAN, A., SZE, S.K. Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* on different lignocellulosic biomass. **Journal of proteomics**. 75:1493-1504, 2012.

ALMEIDA, Maíra Nicolau, Caracterização de celulases e hemicelulases dos fungos *Acremonium zeae* e *Acremonium* sp. *Dissertação: Programa de Pós-graduação em Bioquímica agrícola*. Universidade Federal de Viçosa, 2009.

ALVIRA, P., NEGRO, M.J., BALLESTEROS, M. Effect of endoxylanase and α -L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. **Bioresource Technology**. 102: 4552–4558, 2011.

ANDERSON, W.F., DIEN, B.S., BRANDON, S.K., PETERSON, J.D. Assessment of Bermuda grass and bunch grasses as feedstock for conversion to ethanol. **Appl. Biochem. Biotechnol**. 145 (1): 13–21, 2010.

BALDRIAN, P., VALASKOVA, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**. 32: 501-521, 2008.

BALLESTEROS, M., OLIVA, J. M., NEGRO, M. J., MANZANARES, P., BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**. 39: 1843-1848, 2004.

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

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, nº44, 2010.

CHANDRA, M.S., VISWANATH, B., REDDY, B.R. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. **Indian Journal of Microbiology**. 47: 323-328, 2007.

COUTO, L. C., COUTO, L., Watzlawick, L. F., CÂMARA, D. Vias de valorização energética da biomassa. **Biomassa & Energia**. 1: 71-92, 2004.

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

ELISASHVILI, V., KACHLISHVILI, E., PENNINGCKX, M. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 35: 1531-1538, 2008.

FAGA, B. A., WILKINS, M. R., BANAT, I. M. Ethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of switchgrass using *Saccharomyces cerevisiae* D5A and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains. **Bioresource Technology**. 101: 2273-2279, 2010.

FALKOSKI, D.L., GUIMARÃES, V.M., ALMEIDA, M.N., ALFENAS, A.C., COLODETTE, J.L., de REZENDE, S.T. *Chrysosporthe cubensis*: a new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology** 2013.

FALKOSKI, D.L., GUIMARÃES, V.M., ALMEIDA, M.N., ALFENAS, A.C., COLODETTE, J.L., de REZENDE, S.T. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 166: 1586-1603, 2012.

GAO J, WENG H, ZHU D, YUAN M, GUAN F, Xi Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**. 99: 7623-7629, 2008.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**. 59: 257 – 268, 1987.

GUOWEIA, S., MAN, H., SHIKAI, W., HE, C. Effect of some factors on Production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. **Procedia Environmental Sciences**. 8: 357-361, 2011.

HIDENO, A., INOUE, H., TSUKAHARA, K., YANO, S., FANG, X., ENDO, T., et al. Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**. 48: 162-168, 2011.

HU, J., ARANTES, V., PRIBOWO, A., SADDLER, J.N. The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a “cellulase mixture” but is highly substrate specific. **Biotechnology for Biofuels**. 6:112, 2013.

JUHASZ, T., SZENGYEL, Z., RECZEY, K., SIIKA-AHO, M., VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**. 40: 3519-3525, 2005.

JUODEIKIENE, G., BASINSKIENE, L., VIDMANTIENE, D., MAKARAVICIUS, T., BARTKIENE, E., SCHOLS, H. The use of β -xylanase for increasing the efficiency of biocatalytic conversion of crop residues to bioethanol. **Catalysis Today**. 167: 113–121, 2011.

KARBOUNE, S., GERAERT, P-A., KERMASHA, S. Characterization of selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *Penicillium funiculosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56: 903-909, 2008.

KUMAR, P., BARRETT, D.M., DELWICHE, M.J., STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**. 48: 3713-3729, 2009.

MCILVAINE, T. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**.49: 183-186, 1921.

MENON, V. and RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**. 1-29, 2012.

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

MONovel perspectives for evolving enzyme cocktailsfor lignocellulose hydrolysis in biorefineries. **Sustainable Chemical Processes**. 1:15, 2013.

PARK, I., KIM, I., KANG, K., SOHN, H., RHEE, I., JIN, I., JANG, H. Cellulose ethanol production from waste newsprint by simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. **Process Biochemistry**. 45: 487-492, 2010.

RAKOTOARIVONINA, H., HERMANT, B., MONTHE, N., RÉMOND, C. The hemicellulolytic enzyme arsenal of *Thermobacillus xylanilyticus* depends on the composition of biomass used for growth. **Microbial Cell Factories**.11:159-170, 2012.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v.30, p.271-291, 2003.

SANTOS, V. T. O., ESTEVES, P. J., MILAGRES, A. M. F., CARVALHO, W. Characterization of commercial cellulases and their use in the saccharification of a sugarcane bagasse sample pretreated with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 1-10, 2010.

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**. 99: 4997–5005, 2008.

SHAH, A. R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochemistry**. 40: 1763-1771, 2005.

SINGHANIA, R.R., SUKUMARAM, R.K., PATEL, A.K., LARROCHE, C., PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**. 46: 541-549, 2010.

SUN, Y., CHENG, J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**. 96: 1599–1606, 2005.

TEOH, Y.P. and MASHITAH, M.D. Cellulase production by *Pycnoporus sanguineus* on oil palm residues through pretreatment and optimization study. **Journal of Applied Sciences**. 10 (12): 1036-1043, 2010.

TAPPI. **Technical Association of the Pulp and Paper Industry**. Tappi Standard Methods (T-222 om-98). Atlanta, 1999.

WANG, W., YUAN, T., WANG, K., CUI, B., DAI, Y. Statistical optimization of cellulase production by the brown rot fungi, *Fomitopsis palustris*, and its application in the enzymatic hydrolysis of LHW-pretreated woody biomass. **Process Biochemistry**. 47: 2552–2556, 2012.

YAMASHITA, Y., SASAKI, C., NAKAMURA, Y. Effective enzyme saccharification and ethanol production from Japanese cedar using various pretreatment methods. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 110: 79-86, 2010.

ZHANG, Z., DONALDSON, A.A., MA, X. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. **Biotechnology Advance**. 30: 913-919, 2012.

ZHAO, J., XIA, L. Simultaneous saccharification and fermentation of alkaline-pretreated corn stover to ethanol using a recombinant yeast strain. **Fuel Processing Technology**. 90: 1193-1197, 2009.

CAPÍTULO 3

ESTRATÉGIAS PARA A OBTENÇÃO DE COQUETÉIS ENZIMÁTICOS PARA SACARIFICAÇÃO DE BIOMASSA: FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO, FERMENTAÇÃO SUBMERSA E SINERGISMO

CAPÍTULO 3 – ESTRATÉGIAS PARA A OBTENÇÃO DE COQUETÉIS ENZIMÁTICOS PARA SACARIFICAÇÃO DE BIOMASSA: FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO, FERMENTAÇÃO SUBMERSA E SINERGISMO

RESUMO

Produzir coquetéis eficientes para a sacarificação da biomassa lignocelulósica tem sido um grande desafio para os pesquisadores, já que a determinação da proporção ideal das enzimas depende de vários fatores, como a composição da biomassa a ser sacarificada e um maior conhecimento dos complexos efeitos sinérgicos que ocorrem entre as celulasas e hemicelulasas. Neste trabalho, vários coquetéis enzimáticos foram produzidos a partir de diferentes misturas, em diferentes proporções, dos extratos brutos produzidos por *P. sanguineus*, quando cultivado em fermentação submersa, e *C. cubensis*, quando cultivado em fermentação em estado sólido. Os coquetéis produzidos a partir de uma simples mistura dos extratos enzimáticos destes fungos não apresentaram nenhum efeito sinérgico positivo. Contudo, quando esta mistura foi realizada de forma não convencional, ocorrendo em uma das etapas de produção enzimática da fermentação em estado sólido, observou-se grandes efeitos sinérgicos sobre as atividades das enzimas FPase, exoglicanase, celobiase, β -glicosidase, xilanase, β -xilosidase e α -arabinofuranosidase, as quais aumentaram 52,2 %, 9,2 %, 62 %, 26,5 %, 12,2 %, 56,2 % e 18,4 %, respectivamente. Por fim, o coquetel produzido a partir desta mistura não convencional foi aplicado na sacarificação do bagaço de cana e altos rendimentos de conversão de glicana e xilana foram alcançados, de até 85 % e 95 %, respectivamente. Todos os rendimentos de conversão obtidos com este coquetel enzimático produzido foram maiores que os obtidos com o coquetel enzimático comercial, indicando que este novo coquetel produzido tem um grande potencial para ser aplicado na hidrólise de biomassas lignocelulósicas.

Palavras chaves: Sinergismo, celulasas, hemicelulasas, *Pycnoporus*, *Chrysoporthe*.

1. INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é a matéria-prima renovável mais abundante e de baixo custo que existe na natureza, sendo, portanto, extensamente estudada para a produção do etanol de segunda geração (LEE et al., 2008). A produção de bioetanol a partir de biomassa atende a vários requisitos de sustentabilidade. No aspecto ambiental promove a mitigação do carbono e gera um menor nível de emissões de gases de efeito estufa. Os impactos socioeconômicos positivos estão relacionados com a geração de empregos rurais, diversificação da matriz energética, aumento da exportação e a possibilidade de complementar a demanda energética mundial. Diante deste atual cenário, o etanol de segunda geração tem sido considerado uns dos mais promissores para substituir o combustível fóssil e muitos estudos estão sendo realizados com o intuito de tornar a sua produção viável em nível industrial (GOLDEMBERG, 2007; MACEDO et al., 2008; OMETTO e ROMA, 2010 e SARKAR et al., 2012).

A hidrólise da estrutura lignocelulósica é um dos passos necessários para a conversão bioquímica dos carboidratos presentes nesta biomassa em etanol. As celulasas são um grupo de enzimas capazes de atuarem nesta estrutura lignocelulósica promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalizadores altamente específicos que atuam sinergisticamente para a liberação dos açúcares que podem ser convertidos a etanol (CASTRO & PEREIRA Jr, 2010). O uso de enzimas para promover a sacarificação da biomassa é particularmente vantajoso porque ele reduz a formação de compostos tóxicos, utiliza condições amenas de pH e temperatura para sua realização, permite a obtenção de um etanol de melhor qualidade e apresenta um menor custo no tratamento da água utilizada no processo (HAHN-HAGERDAL et al., 2006; JEGANNATHAN et al., 2009).

Contudo, um dos grandes gargalos na produção de etanol de segunda geração é o alto custo das celulasas envolvidas na hidrólise da biomassa, a qual é extremamente recalcitrante necessitando de grandes quantidades de enzimas para a sua eficiente hidrólise. Este fato inviabiliza a produção do etanol em escala industrial. Além disso, a alta complexidade e a variedade das biomassas passíveis de serem utilizadas na produção de etanol também pode ser um problema, pois um coquetel enzimático eficiente para a hidrólise de uma biomassa pode não ser tão

eficiente para a hidrólise de outros materiais lignocelulósicos (JEGANNATHAN et al., 2009).

Para a completa degradação da celulose é necessário à ação sinérgica de três enzimas: endoglicanases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (EC 3.2.1.176) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (VAN DYK & PLETSCHKE, 2012). Além das celulases, existe também um grande grupo auxiliar de enzimas que podem atuar sobre a hemicelulose e contribuir para uma hidrólise mais eficiente da biomassa. Dentre estas enzimas, conhecidas como hemicelulases, podemos destacar as glucoronidasases, acetilesterases, xilanases, β -xilosidases, galactomananases, α -arabinofuranosidases, α -galactosidases e glucomananases (DUFF & MURRAY, 1996).

Alguns trabalhos têm demonstrado que as hemicelulases podem atuar sinergisticamente com as celulases, aumentando a eficiência da hidrólise da celulose (BERLIN et al., 2007; HU et al., 2011). Além disso, ao hidrolisar a hemicelulose, as hemicelulases promovem a formação de espaços sobre a fibra de celulose, facilitando o acesso das celulases. De forma análoga às hemicelulases, outras enzimas que também atuam sobre a biomassa lignocelulósica podem funcionar como enzimas acessórias, facilitando o acesso das celulases sobre as fibras de celulose, como por exemplo, enzimas lignolíticas e pectinases (VAN DYK & PLETSCHKE, 2012).

Até o momento a comunidade científica ainda não chegou a uma conclusão sobre qual a proporção ideal das enzimas para a hidrólise da biomassa lignocelulósica. Além do complexo sinergismo entre as enzimas, essa indefinição também se deve a adequação do coquetel a uma determinada biomassa e ao tipo de pré-tratamento ao qual ela foi submetida. O formulado celulolítico ideal pode ser obtido pelo cocultivo de linhagens superprodutoras dos principais tipos de celulases (WEN et al., 2005); pela produção isolada de celulases e posterior mistura dos extratos purificados em proporções pré-otimizadas (LEVINE et al., 2011) ou ainda pela incorporação controlada de genes de celulases em organismos hospedeiros (SRIVASTAVA et al., 1999).

Além da composição da biomassa, utilizada como fonte de carbono, as diferentes condições de cultivo também podem resultar em diferenças no crescimento do fungo, e conseqüentemente afetar o coquetel enzimático produzido. A influência do pH e da temperatura, dos nutrientes do meio e do tipo de cultivo, além da adição de outras culturas tem sido extensamente estudados (CUNHA et al., 2012). As duas principais estratégias utilizadas para a produção de celulases e

hemicelulases por microrganismos são a fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS), sendo que cada um destes métodos tem suas vantagens e desvantagens, além disso, cada fungo pode crescer de forma diferenciada nos diferentes cultivos. (HOLKER et al., 2004). Assim, a obtenção de preparados com alta atividade celulolítica vai depender tanto do microrganismo utilizado quanto do processo de produção das enzimas.

Neste trabalho dois fungos, *Pycnoporus sanguineus* e *Chrysoporthe cubensis*, foram estudados quanto a sua eficiência em produzir celulases e hemicelulases tanto em FES quanto em FS a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas. Estudos prévios mostram que o *P. sanguineus* é um bom produtor de endoglicanases e enzimas lignolíticas, as quais podem atuar como enzimas acessórias. Já o fungo *C. cubensis* é um bom produtor de exoglicanases e enzimas acessórias, principalmente hemicelulases (FALKOSKI et al., 2012; FALKOSKI et al., 2013). Como os perfis enzimáticos destes fungos se complementam, os extratos produzidos por eles foram estudados de maneira combinada, utilizando tanto a FES quanto a FS, na hidrólise do bagaço de cana visando analisar possíveis efeitos sinérgicos entre estes dois extratos enzimáticos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Os substratos xilana *birchwood*, carboximetilcelulose (CMC), celobiose, ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ NPGli); ρ -nitrofenil- α -D-arabinofunósídeo (ρ NPAra), ρ -nitrofenil- β -D-celobiosídeo (ρ NPCB), ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (ρ NPXil), 2,2'-azino-bis-[3-etiltiazolina-6-sulfonato] (ABTS) e também os reagentes químicos utilizados na preparação dos meios de cultivo foram obtidos da *Sigma Chemical Company* (St. Louis, MO). As biomassas lignocelulósicas capim elefante, palha e bagaço de cana-de-açúcar, sabugo e palha de milho, bambu, forragem de eucalipto, polpa kraft e a forrageira *Andropogon guayanus* foram obtidos em unidades experimentais da Universidade Federal de Viçosa, secadas em estufa a 105 °C e moídas para serem utilizadas neste trabalho. Já o farelo de trigo foi comprado no comércio local. Todos os outros reagentes utilizados neste estudo possuíam grau analítico.

2.2. Microrganismo e preparo do inoculo

Os fungos *Pycnoporus sanguineus* PF-2 e *Chrysoporthe cubensis* LPF-1 foram isolados de plantações de eucalipto localizadas em Belo Oriente e Viçosa, respectivamente, ambas as cidades localizadas no estado de Minas Gerais, Brasil. As cepas de ambos os fungos foram isoladas e purificadas como previamente descrito por GUIMARÃES et al. (2010) e DE ALONSO et al. (2007) e pertencem à coleção micológica do Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta Patógeno, localizado na Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil.

Os fungos foram repicados rotineiramente em meio BDA (Batata Dextrose Agar) e incubados a 28 °C. Os inóculos foram preparados pelo crescimento das cepas em fermentação submersa (FS) em frascos *Erlenmayer* de 250 mL contendo 100 mL do meio com seguinte composição de nutrientes, em g/L: 10,0 de glicose, 1,0 de NH₄NO₃, 1,0 de KH₂PO₄, 0,5 de MgSO₄ e 2,0 de extrato de levedura. Todos os frascos contendo o meio de cultivo foram inoculados com 10 discos miceliais (retirados das placas de BDA que continham as cepas com tempo de incubação de 5 dias) e incubados em agitador rotatório por 7 dias a 150 rpm e 28 °C. As culturas obtidas foram assepticamente homogeneizadas com o auxílio do Polytron® e imediatamente utilizadas como inóculo tanto nas culturas em FS quanto na FES.

2.3. Condições de cultivo

Inicialmente, os fungos *P. sanguineus* e *C. cubensis* foram analisados quanto às suas capacidades de produzirem celulases e hemicelulases a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas. A forma do cultivo dos fungos também foi estudada e tanto a FS quanto a FES foram utilizadas para o crescimento dos fungos.

2.3.1. Fermentação em estado sólido (FES)

A FES foi realizada utilizando as biomassas capim elefante, palha e bagaço de cana-de-açúcar, sabugo e palha de milho, bambu, forragem de eucalipto, polpa *kraft* e a forrageira *Andropogon guyanus* como fonte de carbono. As fermentações foram feitas em frascos *Erlenmayer* (125 mL) contendo 5 g (peso seco) da biomassa umedecida com 12 mL do meio de cultura (70 % de umidade final) contendo a seguinte composição, em g/L: NH₄NO₃, 1,0; KH₂PO₄, 1,5; MgSO₄, 0,5; CuSO₄, 0,25

e peptona, 2,5. Além disso, MnCl_2 ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$), H_3BO_3 ($0,075 \text{ mg L}^{-1}$), Na_2MoO_4 ($0,02 \text{ mg L}^{-1}$), FeCl_3 ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) e ZnSO_4 ($3,5 \text{ mg L}^{-1}$) também foram adicionados ao meio como elementos traços. Os frascos contendo os meios foram autoclavados a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min e então inoculados com 3 mL do inóculo, preparado como descrito anteriormente. Os frascos foram incubados por 7 dias em câmara de crescimento a $28 \text{ }^\circ\text{C}$. As enzimas secretadas durante a FES foram extraídas com tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 5, na proporção 10:1 (tampão:biomassa seca) sob agitação de 150 rpm por 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram filtradas e centrifugadas a $15000 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi estocado à -4°C para as posteriores análises enzimáticas. Todas as fermentações foram feitas em triplicata.

2.3.2. Fermentação submersa (FS)

A FS foi realizada utilizando as biomassas capim elefante, palha e bagaço de cana-de-açúcar, sabugo e palha de milho, bambu, forragem de eucalipto, polpa kraft e a forrageira *Andropogon guayanus* como fontes de carbono. As fermentações foram feitas em frascos *Erlenmayer* (125 mL) contendo 50 mL do meio de cultura que apresentava a seguinte composição, em g/L: NH_4NO_3 , 1,0; KH_2PO_4 , 1,5; MgSO_4 , 0,5; CuSO_4 , 0,25; peptona, 2,5; fonte de carbono, 15. Além disso, MnCl_2 ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$), H_3BO_3 ($0,075 \text{ mg L}^{-1}$), Na_2MoO_4 ($0,02 \text{ mg L}^{-1}$), FeCl_3 ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) e ZnSO_4 ($3,5 \text{ mg L}^{-1}$) também foram adicionados ao meio como elementos traços. Os frascos contendo os meios foram autoclavados a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min e então inoculados com 3 mL do inóculo, preparado como descrito anteriormente. Os frascos foram incubados em um *shaker* orbital a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150 rpm por 7 dias. O extrato líquido obtido foi filtrado e centrifugado a $15000 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi estocado à -4°C para as posteriores análises enzimáticas. Todas as fermentações foram feitas em triplicata.

2.4. Ensaio enzimáticos

Os ensaios para a determinação das atividades das celulases FPase e endoglicanase foram adaptados de GHOSE (1987). A atividade de FPase foi determinada utilizando papel de filtro *Whatman* nº 1 (1 x 5 cm) como substrato, o volume total da reação foi de 1,5 mL e o tempo de incubação foi de 60 min. A

atividade de endoglicanase foi determinada utilizando CMC como substrato (concentração final de 1 %) em um volume total de 1 mL por 30 min. Já para a atividade de xilanase foi utilizado a xilana *birchwood* como substrato (concentração final de 1 %) em um volume de 1 mL por 15 min. A concentração dos açúcares liberados durante os ensaios enzimáticos foram determinadas utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), utilizando curva padrão de glicose (0,11 – 1,11 μmol).

A atividade da celobiase foi determinada utilizando a celobiose como substrato (concentração final de 6 mM) em um volume de ensaio de 0,5 mL e um tempo de incubação de 30 min. A glicose liberada durante o ensaio foi quantificada utilizando o kit analítico comercial Glicose Monoreagente K08, o qual se baseia nas enzimas glicose oxidase e peroxidase (*Quibasa Basic Chemical*, Belo Horizonte, MG, Brasil).

Para as atividades de exoglicanase, β -glicosidase, β -xilosidase e α -arabinofuranosidase foram utilizados os substratos sintéticos ρ NPCB, ρ NPGli, ρ NPXil e ρ NPAra, respectivamente. Para a realização dos ensaios foram utilizados 100 μL da solução de enzimas diluída apropriadamente, 125 μL da solução do substrato (para uma concentração final de 1 mM) e 275 μL de tampão. A mistura de reação foi incubada por 30 min. Após este tempo, a reação foi finalizada pela adição de 0,5 mL de carbonato de sódio (0,5 M). As absorbâncias das reações foram mensuradas a 410 nm e a quantidade de ρ -nitrofenol liberada foi estimada a partir de uma curva padrão.

A atividade de lacase foi determinada pelo monitoramento da oxidação do ABTS em uma reação contendo 100 μL da solução de enzimas diluída apropriadamente, 100 μL da solução do substrato (para uma concentração final de 1 mM) e 800 μL de tampão. A mistura reacional foi incubada a 50°C por 15 min e, posteriormente, os valores de absorbância foram imediatamente mensurados em 420 nm. A quantidade do ABTS oxidado produzido foi calculada utilizando-se o valor do seu coeficiente de extinção molar ($3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e a equação de Lambert-Beer.

Todos os ensaios enzimáticos foram feitos em tampão acetado de sódio, 50 mM, pH 5, a 50 °C e foram realizados em triplicata. Todos os desvios padrões relativos foram menores que 5 %. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μmol do produto correspondente

(glicose, xilose, p-nitrofenol e ABTS oxidado) por minuto sob as condições do ensaio.

2.5. Determinação de proteína

A concentração de proteína nos extratos enzimáticos foi determinada pelo método de ligação ao *Coomassie-Blue* utilizando como padrão a proteína albumina sérica bovina (BRADFORD, 1976).

2.6. Preparo dos coquetéis enzimáticos e análise de sinergismo

Os coquetéis enzimáticos foram obtidos pela mistura dos extratos produzidos por *P. sanguineus* (resultante da FS) e *C. cubensis* (resultante da FES) em diferentes proporções: 30:70, 50:50 e 70:30. Além dos coquetéis produzidos pela mistura convencional de dois extratos enzimáticos diferentes, foi produzido também um coquetel a partir de uma mistura não convencional, onde o extrato líquido resultante da FS, produzido pelo fungo *P. sanguineus*, foi utilizado para extrair as enzimas produzidas por *C. cubensis* durante a FES. Assim, nesta etapa, não foi utilizado o tampão acetato de sódio na extração das enzimas na FES, como descrito no item 2.3.1 deste trabalho, e sim o extrato líquido produzido por *P. sanguineus* durante a FS. Desta forma uma nova mistura foi realizada, com uma proporção enzimática de 1:1.

Todos os coquetéis produzidos, além dos extratos individuais de *P. sanguineus* e *C. cubensis*, foram concentrados 10 vezes. Para isto, utilizou-se o sistema de ultrafiltração Amicon (Millipore Co. – Billerica, MA, USA) e o filtro de membrana YM-10 (Cut-off Mr 10.000 Da). As atividades de FPase, endoglicanase, exoglicanase, celobiase, xilanase, β -glicosidase, xilanase, β -xilosidase, α -arabinofuranosidase e lacase foram mensuradas em todos os coquetéis produzidos e também nos extratos individuais de ambos os fungos.

Para investigar a presença de sinergismo entre as atividades enzimáticas presentes nos coquetéis produzidos, as atividades teóricas foram calculadas a partir da Equação 1. O valor teórico encontrado foi comparado com a atividade obtida experimentalmente e o sinergismo foi expresso como uma porcentagem da atividade teórica.

$$\text{Atividade teórica} = (\text{fração percentual de } C. \text{ cubensis} \times \text{atividade de } C. \text{ cubensis}) + (\text{fração percentual de } P. \text{ sanguineus} \times \text{atividade enzimática de } P. \text{ sanguineus}) \quad (\text{Equação 1})$$

2.7. Hidrólise enzimática do bagaço de cana

Previamente aos experimentos de hidrólise, 25 g de biomassa seca e moída foram pré-tratadas com uma solução de hidróxido de sódio 1 % (m/v), sendo a carga de sólidos final de 10 % (m/v). Os tratamentos foram realizados em duplicata em autoclave por 60 min a 121 °C. A fração sólida resultante foi lavada cuidadosamente com água destilada, filtrada, colocada em recipiente hermético e então armazenada a -20 °C. A composição química do bagaço de cana pré-tratado e não tratado foi determinada utilizando-se o método de lignina Klason modificado da TAPPI T222 om-98 (TAPPI, 1999).

Foi analisada a capacidade do coquetel enzimático (que apresentou maior porcentagem de sinergismo) em hidrolisar o bagaço de cana pré-tratado. Para fins de comparação, utilizou-se também um extrato de celulasas comercial (Multifect® CL). A sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado foi realizada em frascos contendo 50 mL do coquetel enzimático diluído apropriadamente em tampão acetato 100 mM, pH 4,0. Foram analisados também duas cargas enzimáticas, de 10 e 5 unidades de FPase por grama de biomassa seca (FPU/g). A carga de sólidos final foi sempre 5 % (m/v). Para evitar possíveis contaminações, foi adicionado ao meio azida sódica e tetraciclina nas concentrações de 10 mM e 1 mg/mL, respectivamente. Por fim, os frascos foram acondicionados em um agitador orbital, a 50 °C e 150 rpm por 150 h. Amostras de 0,5 mL foram periodicamente retiradas da mistura de reação e imediatamente colocadas em banho fervente para a completa desnaturação das enzimas. Posteriormente, as mesmas foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min e o sobrenadante foi estocado a -20 °C para as análises posteriores. Todas as reações de sacarificação foram realizadas em duplicata.

As amostras resultantes das reações de sacarificação foram analisadas em HPLC utilizando-se um cromatógrafo da marca Shimadzu, série 10A, equipado com a coluna Aminex HPX87P (300 x 7,8 mm) e com detectores de índice de refração. A fase móvel utilizada foi água e o fluxo foi de 0,6 mL/min, a 80 °C. A taxa de

conversão dos produtos liberados foi calculada de acordo com a Equação 2 (conversão de glicose) e Equação 3 (conversão de xilose).

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{\text{Glicose } \left(\frac{g}{L}\right) \times 0,90 \times 100}{\text{Glicana inicial } \left(\frac{g}{L}\right)} \quad (\text{Equação 2})$$

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{\text{Xilose } \left(\frac{g}{L}\right) \times 0,88 \times 100}{\text{Xilana inicial } \left(\frac{g}{L}\right)} \quad (\text{Equação 3})$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção das enzimas em FS e em FES

Neste estudo, o potencial dos fungos *P.sanguineus* e *C. cubensis* em produzir celulasas e hemicelulasas para aplicação na hidrólise do bagaço de cana foi analisado. Os fungos foram crescidos tanto em FS quanto em FES empregando diferentes biomassas lignocelulósicas como fontes de carbono. Os resultados obtidos quanto a produção das atividades de FPase, endoglicanase, exoglicanase, celobiase e xilanase estão apresentados nas Figuras 1 e 2.

Os valores de atividades enzimáticas extracelulares produzidas por ambos os fungos estudados variou substancialmente de acordo com as condições de fermentação, principalmente no que se refere à produção de xilanase e endoglicanase. É bastante perceptível que a FES propiciou melhores condições para a produção de xilanase tanto para o *C. cubensis* quanto para o *P. sanguineus*. Uma única exceção é observada quando se utilizou o capim elefante como fonte de carbono para o crescimento do fungo *C. cubensis*, onde a produção de xilanase foi maior em FS. Já para a produção de endoglicanase, o que se observa é justamente o contrário, houve maior produção desta enzima quando se utilizou a FS para a maioria das fontes de carbono utilizadas e para ambos os fungos estudados.

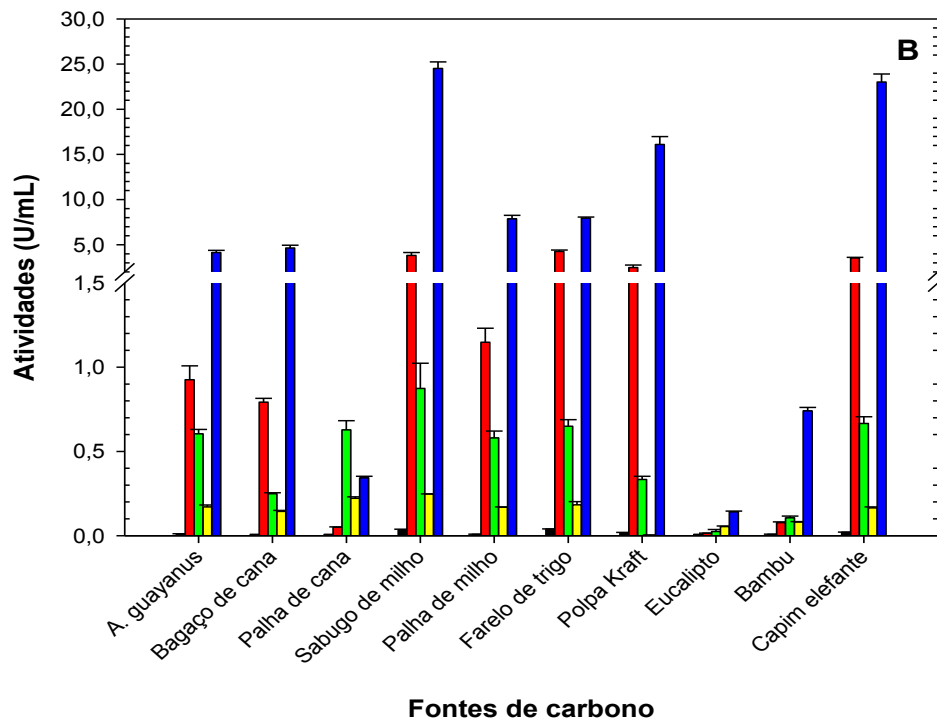
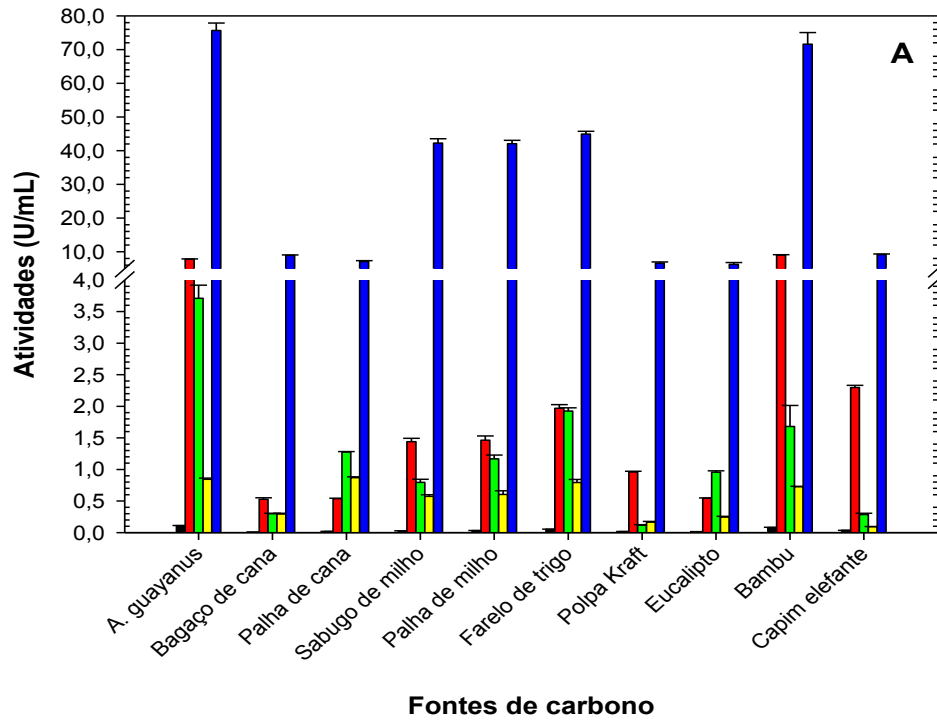


Figura 1 – Atividades celulolíticas e hemicelulolíticas produzidas pelo fungo *Chrysosporthe cubensis* em fermentação em estado sólido (A) e fermentação submersa (B) utilizando diferentes biomassas lignocelulósicas como fontes de carbono. Atividades: (■) FPase; (■) endoglicanase; (■) Exoglicanase; (■) celobiase e (■) xilanase.

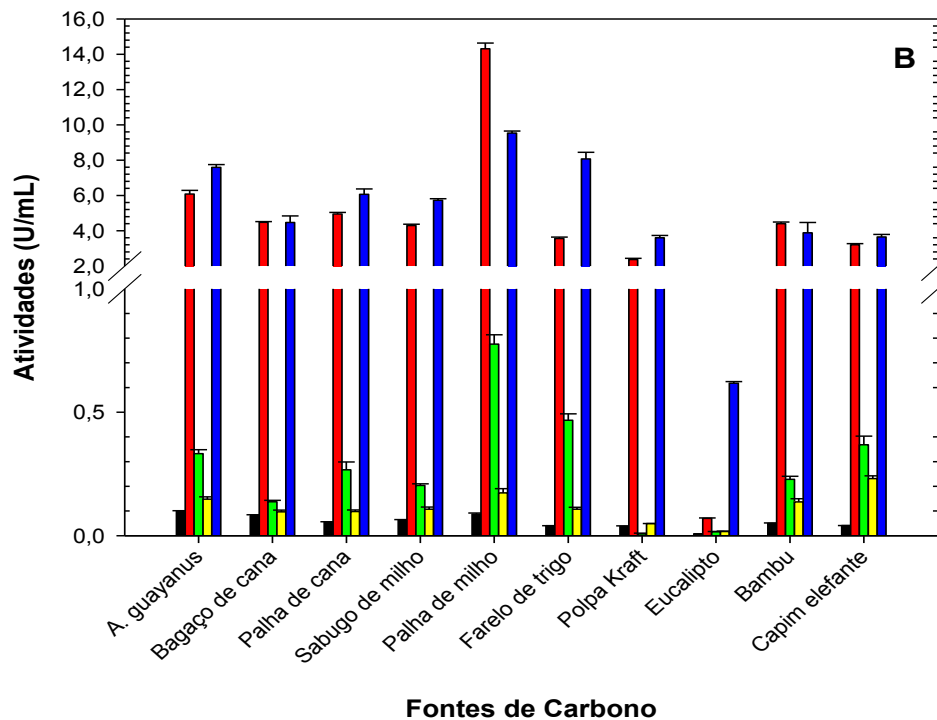
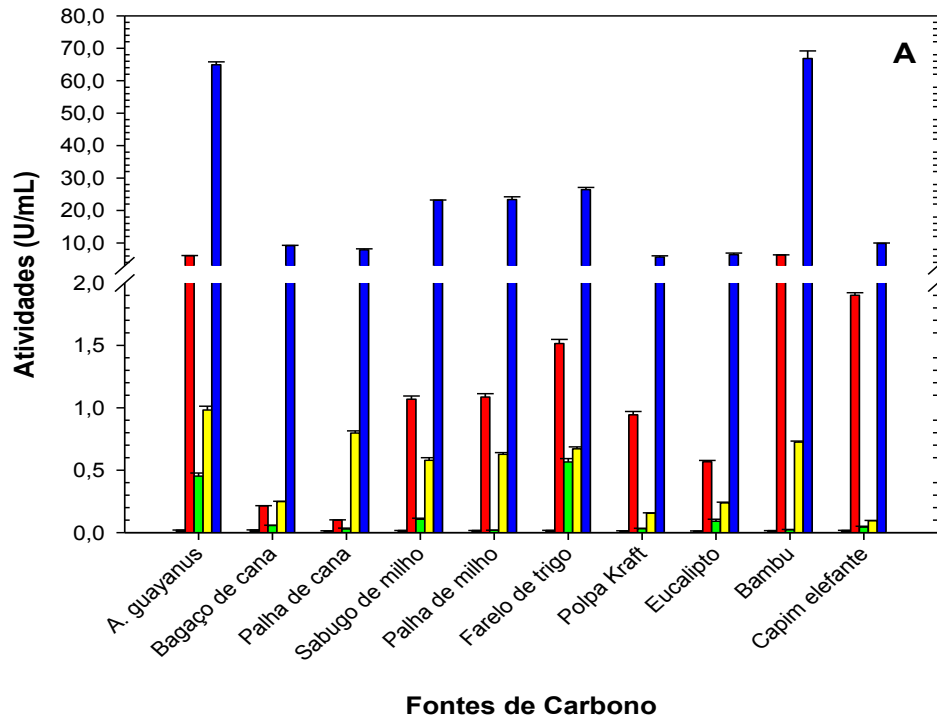


Figura 2 – Atividades celulolíticas e hemicelulolíticas produzidas pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* em fermentação em estado sólido (A) e fermentação submersa (B) utilizando diferentes biomassas lignocelulósicas como fontes de carbono. Atividades: (■) FPase; (■) endoglucanase; (■) Exoglucanase; (■) celobiase e (■) xilanase.

Os maiores títulos de xilanase foram produzidos quando se utilizou a forrageira *A. guayanus* (75,7 U/mL) e o bambu (71,6 U/mL) como fontes de carbono no crescimento do fungo *C. cubensis* em FES. Para endoglicanase, a maior atividade foi produzida pelo fungo *P. sanguineus* em FS e utilizando a palha de milho como fonte de carbono (14,3 U/mL). É notório também que o fungo *C. cubensis* foi superior na produção da exoglicanase quando crescido em FES, sendo a forrageira *A. guayanus* a melhor fonte de carbono para a indução da produção desta enzima (3,7 U/mL). Com relação às atividades de FPase e celobiase, não houve grandes atividades produzidas, sendo que a maior produção encontrada para estas enzimas foi quando se utilizou a forrageira *A. guayanus* (0,11 U/mL) e a palha de cana (0,9 U/mL) como fontes de carbono para o crescimento do fungo *C. cubensis* em FES, respectivamente (Figura 1A).

De forma geral, os fungos *P. sanguineus* e *C. cubensis* foram bom produtores de celulasas e hemicelulasas. Além disso, a variação nas condições de fermentação (FES ou FS) resultou em perfis de produção enzimática diferentes, ou seja, algumas enzimas foram mais propícias para serem produzidas em FES e outras em FS. A maioria dos estudos sobre produção de celulasas e hemicelulasas reportados na literatura utilizam a tecnologia de fermentação submersa para obter as preparações enzimáticas. Entretanto, vários autores têm sugerido que a FES é um método mais apropriado para o cultivo de determinados fungos aeróbicos já que as condições do crescimento são similares ao dos seus habitats naturais (HOLKER et al., 2004, ELISASHVILI et al., 2008; SINGHANIA et al., 2010). Este conhecimento é pertinente, já que o *P. sanguineus* é um basideomiceto conhecido como fungo da podridão branca e atua naturalmente na decomposição da madeira e o *C. cubensis* é um fungo fitopatogênico, logo os dois atuam em condições semelhantes às proporcionadas pela FES e têm habilidade natural de secretar diversas enzimas hidrolíticas para degradar os componentes da parede celular de plantas. Contudo, estes tipos de fungos são ainda pouco estudados para a produção de celulasas e hemicelulasas (LAGAERT et al., 2009).

Outro fator importante a ser considerado é a influência das fontes de carbono na expressão das celulasas e hemicelulasas, a qual está diretamente relacionada com a composição química das mesmas (JUHASZ et al., 2005; ADAV et al., 2012). A complexidade estrutural e o conteúdo de lignina, celulose e hemicelulose são muito

variáveis nas biomassas lignocelulósicas e tem grande influencia na expressão enzimática pelos microrganismos.

Neste estudo, o extrato produzido pelo *C. cubensis* em FES quando se utilizou à forrageira *A. guayanus* como fonte de carbono continha maiores atividades de xilanase e exoglicanase, já o extrato enzimático produzido pelo *P. sanguineus* em FS, quando se utilizou a palha de milho como fonte de carbono, continha maiores atividades de endoglicanase. Como os perfis enzimáticos destes extratos se complementam, com relação às enzimas que atuam na quebra da estrutura lignocelulósica, ambos foram escolhidos para confeccionar os coquetéis enzimáticos visando à aplicação na hidrólise do bagaço de cana.

3.2. Formulação dos coquetéis enzimáticos e análise de sinergismo

Vários coquetéis enzimáticos foram confeccionados a partir da mistura dos extratos produzidos por *P. sanguineus* e *C. cubensis*. Inicialmente estas misturas foram realizadas de forma simples, ou seja, diferentes volumes de cada extrato, previamente concentrados 10 vezes, nas proporções de 70:30, 50:50 e 30:70 (*C. cubensis*:*P. sanguineus*), foram misturados e foram analisados quanto as atividades de FPase, endoglicanase, exoglicanase, celobiase, β -glicosidase, β -xilosidase, α -arabinofuranosidase e lacase. Posteriormente, foi realizada uma mistura não convencional, na qual o extrato líquido produzido por *P. sanguineus* na FS foi utilizado para extrair as enzimas produzidas pelo *C. cubensis* na FES e o coquetel resultante foi também concentrado 10 vezes. Esta mistura foi denominada de MT. Além disso, para fins comparativos, o extrato comercial Multifect[®] também foi analisado neste estudo. Os resultados das atividades enzimáticas obtidas nestes diferentes coquetéis estão apresentados na Tabela 1.

Como já citado neste estudo, o *P. sanguineus* produziu um extrato rico em endoglicanase. Já, o *C. cubensis* produziu um extrato enzimático rico em exoglicanase, celobiase e β -glicosidase. Todas estas enzimas são essenciais na hidrólise da estrutura lignocelulósica. Além das enzimas que atuam na celulose, o *C. cubensis* também produziu quantidades consideráveis das enzimas hemicelulolíticas (xilanase, β -xilosidase e α -arabinofuranosidase), enquanto o *P. sanguineus* produziu grande quantidade da enzima lacase, a qual atua na hidrólise da lignina (Tabela 1). Muitos estudos reportam a importância destas enzimas acessórias na hidrólise de

biomassas lignocelulósicas, pois elas podem atuar sinergisticamente com as celulasas, aumentando a eficiência da hidrólise (SELIG et al., 2008; VAN DYK & PLETSCHE, 2012; HU et al., 2013). A utilização de hemicelulasas, principalmente as xilanases, podem auxiliar hidrolisando a xilana que não foi solubilizada no pré-tratamento, possibilitando um maior acesso das celulasas à celulose. De forma similar, a lacase ao hidrolisar a lignina residual também proporciona uma maior eficiência de hidrólise da celulose. HU et al. (2011) mostraram que quando endoxilanases foram adicionadas a extratos comerciais de celulasas, a cooperação sinérgica não somente aumentou substancialmente a eficiência da hidrólise do sabugo de milho pré-tratado, mas também reduziu drasticamente a quantidade de celulase requerida (aproximadamente 7 vezes) para alcançar níveis de hidrólise razoáveis (>70 %).

Tabela 1 – Atividades enzimáticas dos extratos de *C. cubensis*, *P. sanguineus*, das misturas 70:30, 50:50, 30:70 (*C. cubensis*:*P. sanguineus*), MT e do coquetel comercial Multifect®.

	Amostras						
	<i>C. cubensis</i>	<i>P. sanguineus</i>	70:30	50:50	30:70	MT	Multifect®
Concentração de proteínas (mg/mL)	8,51	11,50	9,14	9,61	9,76	18,08	1982,46
Atividades enzimáticas (U/mL)							
FPase	1,07	1,69	1,21	1,26	1,31	4,2	141,94
Endoglicanase	112,28	132,05	107,52	111,44	118,61	221	2368,25
Exoglicanase	12,94	1,68	8,84	6,92	4,91	15,97	131,82
Celobiase	6,72	2,23	4,74	3,89	3,98	14,5	25,17
β-glicosidase	52,73	7,83	35,42	26,01	24,01	76,6	119,85
Xilanase	536,56	215,09	418,97	326,09	298,26	840,2	562,8
β-xilosidase	3,07	0,26	2,26	1,61	1,23	5,2	n.d.*
α-arabinofuranosidase	2,58	0,63	1,72	1,43	1,14	3,8	n.d.*
Lacase	0,36	5,57	2,30	3,78	4,48	3,22	n.d.*

* n.d.: não detectado.

A montagem de um coquetel enzimático ideal não é uma tarefa fácil, pois deve-se levar em consideração o complexo sinergismo entre as enzimas e a melhor adequação do coquetel a uma determinada biomassa e ao tipo de pré-tratamento ao qual ela foi submetida (RAKOTOARIVONINA et al., 2012). Logo, a escolha das

enzimas acessórias que devem ser suplementadas em um extrato enzimático dependerá da composição da biomassa após passar por determinado pré-tratamento. Diante destes conhecimentos, o fato do *C. cubensis* produzir grandes quantidades de xilanase, β -xilosidase e α -arabinofunasicidase; e do *P. sanguineus* produzir grandes quantidades de lacase, é de grande relevância neste estudo, visto que o bagaço de cana pré-tratado com NaOH 1% (m/v) utilizado continha grandes quantidades de xilanas e resíduos de arabinanas e lignina (Tabela 2).

Sinergia é definida como as interações que ocorrem entre dois ou mais componentes hidrolíticos, produzindo um efeito total maior do que a soma dos efeitos dos componentes individuais (VISSER et al., 2013). Assim, a sinergia entre os extratos enzimáticos de *P. sanguineus* e *C. cubensis* foi avaliada pela comparação das atividades mensuradas (FPase, endoglicanase, exoglicanase, celobiase, β -glicosidase, xilanase, β -xilosidase, α -arabinofuranosidase e lacase) com as atividades teóricas esperadas e o sinergismo foi expresso como uma porcentagem da atividade teórica (Figura 3).

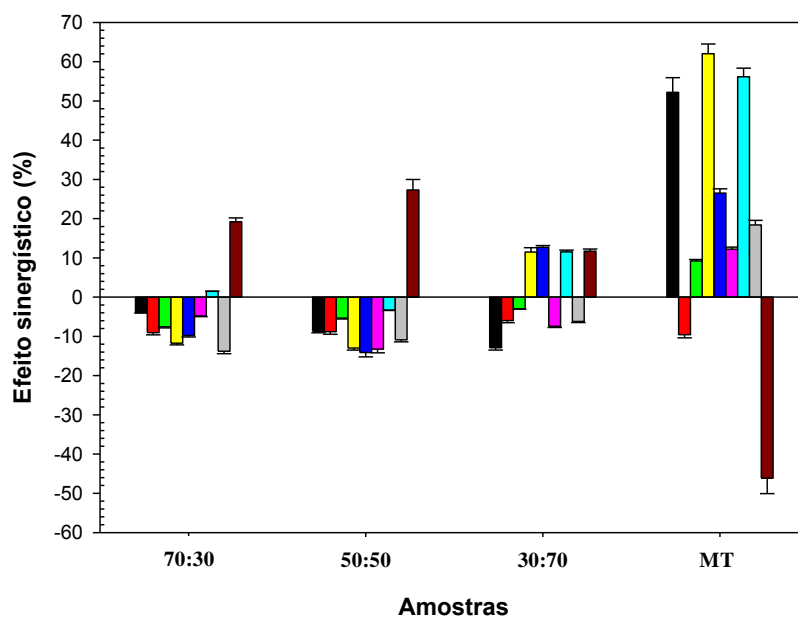


Figura 3 – Efeito sinérgico das atividades enzimáticas presente nos coquetéis produzidos pela mistura dos extratos dos fungos *C. cubensis* e *P. sanguineus* em diferentes proporções (70:30, 50:50 e 30:70) e da MT. Atividades enzimáticas: (■) FPase; (■) endoglicanase; (■) exoglicanase; (■) celobiase; (■) β -glicosidase; (■) xilanase; (■) β -xilosidase, (■) α -arabinofuranosidase e (■) lacase.

O coquetél produzido pela simples mistura dos extratos enzimáticos de *C. cubensis* e *P. sanguineus* na proporção de 70:30 apresentou um efeito sinérgico negativo para praticamente todas as atividades analisadas, as únicas exceções foram para as atividades de β -xilosidase e lacase, a qual apresentou um efeito sinérgico positivo de 1,5 % e 19,2 %, respectivamente. O coquetel resultante da mistura na proporção 50:50 apresentou um grande efeito sinérgico positivo na atividade de lacase, aproximadamente 27 %, enquanto para as outras atividades analisadas todos os efeitos foram negativos. Já a mistura na proporção de 30:70 apresentou resultados sinérgicos positivos para as enzimas celobiase (11,5 %), β -glicosidase (12,7 %), β -xilosidase (1,1 %) e lacase (11,7 %). De forma contrária ao obtido neste trabalho, VISSER e colaboradores (2013) encontraram um grande efeito sinérgico positivo para as atividades de FPase (76 %), endoglicanase (50 %) e xilanase (24 %) quando misturou o extrato enzimático de *C. cubensis* com o extrato de *Penicillium pinophilum* na proporção de 50:50.

Contudo, um resultado completamente diferente foi encontrado quando a mistura dos extratos enzimáticos obtidos de *C. cubensis* e *P. sanguineus* foram misturados de forma não convencional, ou seja, durante a etapa de extração enzimática da FES (MT). Neste coquetel, praticamente todas as enzimas apresentaram grande aumento nas atividades em relação às atividades teóricas esperadas, comprovando a ocorrência de sinérgismo entre os extratos enzimáticos obtidos de *C. cubensis* e *P. sanguineus*. As únicas exceções observadas neste coquetel foram para as atividades de endoglicanase e lacase, as quais apresentaram uma diminuição da atividade de 9,5 % e 46,1 %, respectivamente. Para as enzimas FPase, exoglicanase, celobiase, β -glicosidase, xilanase, β -xilosidase e α -arabinofuranosidase foram observados grandes aumentos nas atividades, os quais foram de 52,2 %, 9,2 %, 62,0 %, 26,5 %, 12,2 %, 56,2 % e 18,4 %, respectivamente (Figura 3).

Vale ressaltar o grande efeito sinérgico ocorrido na atividade de FPase na MT. Contudo, é reconhecido que a celobiase apresenta um importante papel na atividade de FPase, pois impede o acúmulo de celobiose no meio reacional e a inibição das celulasas. Portanto, o grande aumento na atividade de celobiase na amostra MT provavelmente propiciou um grande aumento na atividade de FPase. Além disso, estudos mostram que a adição de enzimas acessórias em extratos comerciais de celulasas propiciaram uma maior atividade de FPase e

consequentemente uma maior hidrólise de biomassas pré-tratadas (HU et al., 2013; HU et al., 2011; CHEN et al, 2010). No presente estudo, também foram observados grandes aumentos nas atividades de β -glicosidase e β -xilosidase, além de significativos aumentos de α -arabinofuranosidase e xilanase (Figura 3).

Contudo, vale lembrar que durante a confecção do coquetel MT não houve adição do tampão acetato de sódio para a extração das enzimas produzidas em FES pelo *C. cubensis*, já que as mesmas foram extraídas utilizando-se o próprio extrato enzimático produzido pelo *P. sanguineus* em FS. Logo, de forma contrária ao ocorrido durante a confecção das misturas nas diferentes proporções, houve uma maior concentração do extrato enzimático produzido. Além disso, a fração porcentual utilizada para os cálculos das atividades teóricas esperadas em MT foi de 100 %.

Muitos estudos em efeitos sinérgicos de enzimas que atuam na hidrólise de biomassas lignocelulósicas são baseados na suplementação de enzimas individuais em extratos enzimáticos produzidos por um determinado microrganismo ou em extratos comerciais de celulasas (ZHANG et al., 2013; HU et al., 2011; CHEN et al, 2010); ou ainda pela mistura de dois extratos enzimáticos em diferentes proporções (VISSER et al, 2013; MAEDA et al., 2011; GOTTSCHALK et al., 2010). Contudo, até o momento, não foi relatado na literatura nenhum estudo onde a mistura de dois extratos enzimáticos produzidos por dois microrganismos diferentes ocorreu em uma das etapas de produção das enzimas. As razões específicas do motivo de ter ocorrido estes grande efeito sinérgico na amostra MT ainda é desconhecido e deve ser ainda estudado mais profundamente.

3.3. Aplicação do coquetel enzimático

Com intuito de verificar a eficiência do coquetel enzimático MT e de confirmar os efeitos sinérgicos encontrados, o mesmo foi aplicado na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado com NaOH 1,0 % (m/v). Para fins comparativos, o extrato comercial de celulasas Multifect® também foi analisado. Neste estudo, o bagaço de cana foi escolhido como substrato para o experimento de hidrólise devido a sua grande disponibilidade e potencial como matéria-prima lignocelulósica no Brasil (CARDONA et al, 2010). As composições do bagaço de cana antes e após o pré-tratamento alcalino estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição química do bagaço de cana pré-tratado com NaOH 1 % (m/v). Os valores são indicados como porcentagem de matéria seca.

Amostras	Composição química (%)					
	Glicanas	Xilanas	Galactanas	Mananas	Arabnanas	Lignina
Não tratado	45,4 ± 0,3	21,7 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,1	1,8 ± 0,0	22,0 ± 0,4
Pré-tratado	51,5 ± 1,3	27,9 ± 0,3	n.d.*	n.d.*	2,8 ± 0,1	8,1 ± 0,3

*Não detectado.

A etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é essencial para o posterior processo da hidrólise enzimática. O pré-tratamento prévio remove hemicelulose e lignina, reduzindo a cristalinidade da celulose e aumentando a porosidade das estruturas lignocelulósicas, facilitando assim o acesso das celulasas ao substrato (ALVIRA et al., 2010). Neste estudo, o pré-tratamento alcalino solubilizou 82,5 % da lignina e 39,67 % da hemicelulose presentes no bagaço de cana. Como pode ser observado na Tabela 2, o bagaço de cana pré-tratado contém ainda uma grande quantidade de xilanas, além de resíduos de arabinanas e lignina. Este fato ressalta a importância da presença de hemicelulases e ligninases no coquetel enzimático que será utilizado na sacarificação desta biomassa. Porém, esta necessidade foi suprida no coquetel MT graças à presença do extrato enzimático produzido por *C. cubenses*, o qual foi um excelente produtor das enzimas xilanase, β -xilosidase, α -arabinofuranosidase e β -glicosidases, e por *P. sanguineus*, o qual produziu quantidades expressivas de lacases (Tabela 1).

A hidrólise do bagaço pré-tratado foi realizada utilizando o extrato MT e o extrato comercial de celulasas Multifect®. Nesta etapa, foram analisadas também duas cargas enzimáticas durante a hidrólise (5 FPU/g e 10 FPU/g). Os rendimentos obtidos na conversão de glicana e xilana estão apresentados na Figura 4. Como esperado, em ambos os extratos utilizados, as conversões em glicose e xilose foram maiores quando se utilizou uma carga enzimática maior, 10 FPU/g. Contudo, esta diferença foi menos acentuada na conversão de xilana, tanto para o coquetel MT quanto para o coquetel da Multifect®, já que os rendimentos obtidos quando se utilizou a carga enzimática de 5 FPU/g (85 % e 11 %, respectivamente) foram próximos dos valores de rendimentos obtidos quando a carga enzimática foi de 10 FPU/g (95 % e 17 %, respectivamente).

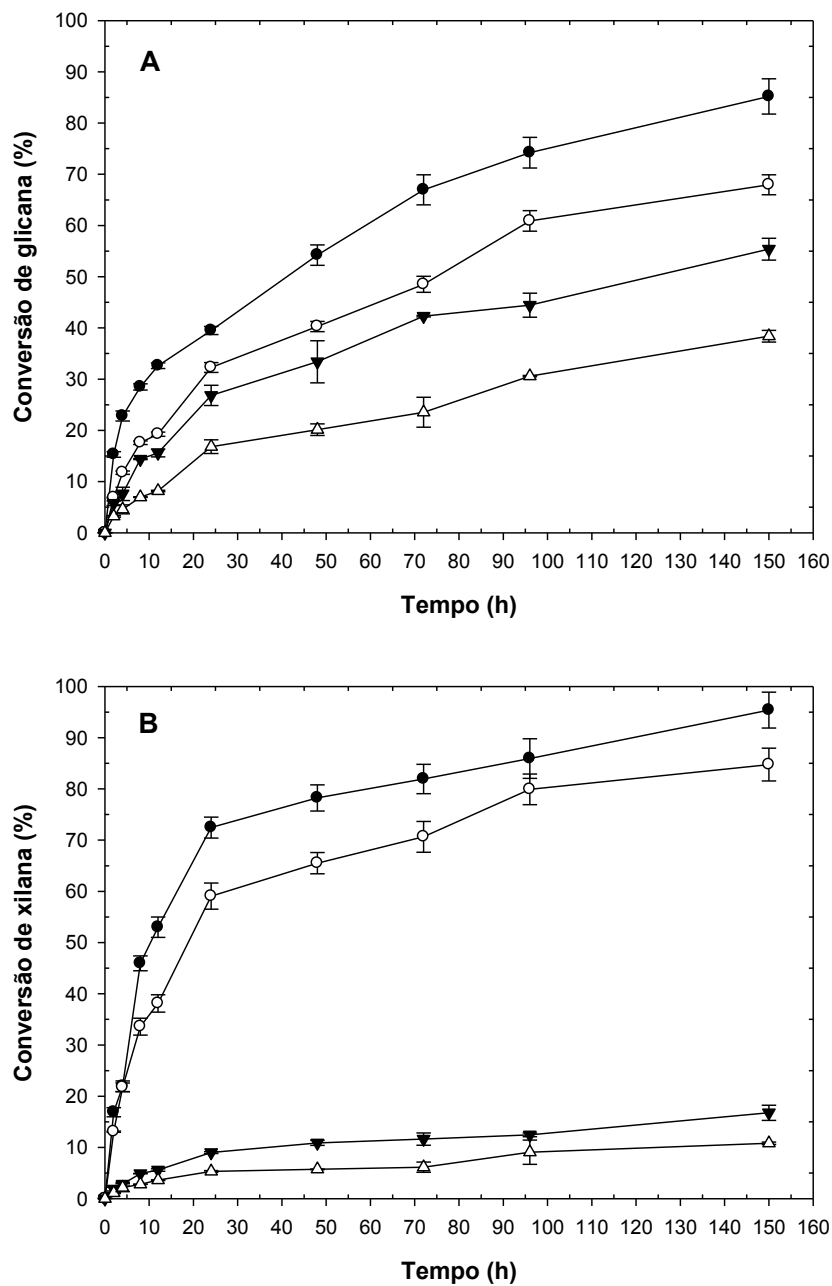


Figura 4 – Conversão de glicana (A) e xilana (B) em diferentes intervalos de tempo na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com NaOH 1 % (m/v) utilizando o coquetel enzimático MT e o extrato comercial de celulases Multifect®. Amostras: (●) coquetel MT com carga enzimática de 10 FPU; (○) coquetel MT com carga enzimática de 5 FPU; (▼) celulases comercial com carga enzimática de 10 FPU e (△) celulases comercial com carga enzimática de 5 FPU.

Para a conversão de glicana, os rendimentos obtidos, quando a carga enzimática foi de 10 FPU/g, foram de aproximadamente 85 % e 55 %, para os coquetéis MT e Multifect®, respectivamente. Já para a carga enzimática de 5 FPU, foram obtidos rendimentos de aproximadamente 68 % e 38 %, para os coquetéis MT e Multifect®, respectivamente (Figura 4).

Os resultados de conversão de glicana e xilana obtidos com o coquetel MT foram bastante satisfatórios, inclusive quando se utilizou uma carga enzimática de 5 FPU/g. Em estudos utilizando um extrato de celulasas comercial suplementado com β -glicosidase, foi necessária a utilização de dois pré-tratamentos sequenciais (explosão a vapor seguido de deslignificação alcalina) para alcançar um rendimento de conversão de glicana de 87 %. Sem o passo de deslignificação, a eficiência de conversão foi limitada a 40 % (WANDERLEY et al., 2013). Além disso, VISSER et al., conseguiu um rendimento de conversão de glicana e xilana de aproximadamente 64 % e 93 %, respectivamente, quando utilizou um coquetel enzimático resultante da mistura, na proporção 50:50, de extratos produzidos por *C. cubensis* e *P. pinophilum*; contudo, neste trabalho foi utilizada uma carga enzimática de 20 FPU/g e uma carga de sólidos de 8 %.

FALKOSKI et al. (2012) e FALKOSKI et al. (2013) analisaram os extratos de *P. sanguineus* PF-2 e *C. cubensis* LPF-1 de forma isolada na sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com NaOH 1% (m/v) e obtiveram uma taxa de conversão de glicose e xilose de 22,6 % e 60,4 % (*P. sanguineus*) e 89 % e 52,7 % (*C. cubensis*), respectivamente. Nestes estudos, os autores utilizaram uma carga enzimática de 10 FPU/g de biomassa e uma carga de sólidos de apenas 2 % (m/v). Comparando os resultados desses autores com os obtidos neste estudo, fica clara a ocorrência de sinergismo no coquetel produzido pela mistura dos dois extratos enzimáticos (*C. cubensis* e *P. sanguineus*), já que os rendimentos de conversão obtidos com a utilização do coquetel MT foram maiores, para esta mesma carga enzimática (10 FPU/g), mesmo utilizando uma carga de sólidos maior (5 % m/v).

Para a hidrólise do bagaço de cana utilizado neste estudo, é notória a superioridade do coquetel MT em relação ao extrato comercial Multifect®, principalmente no que diz respeito à conversão de xilana. A hidrólise com o coquetel MT apresentou aumento na eficiência de hidrólise de xilana de aproximadamente 5,8 e 7,7 vezes em relação ao extrato comercial, utilizando as cargas enzimáticas de 10 FPU/g e 5 FPU/g, respectivamente. Além disso, esta superioridade foi observada

mesmo constatando-se maiores atividades de celulasas na composição do extrato comercial, já que o mesmo foi bastante concentrado, visto a sua grande concentração de proteínas (Tabela 1). Logo, este fato pode ser explicado pela presença de um balanço enzimático ideal do coquetel MT para hidrolizar o bagaço de cana pré-tratado com NaOH 1 % (m/v), a presença das enzimas β -xilosidase, α -arabinofuranosidase e lacase, além da existência de um complexo sinergismo entre as enzimas presentes neste coquetel que resultou em um aumento na eficiência de hidrólise desta biomassa.

Atualmente as celulasas comerciais comumente encontradas no mercado são produzidas por fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*. A busca por extratos enzimáticos produzidos por fungos diferentes daqueles destes gêneros está sendo extensivamente estudados e são uma alternativa para a superação dos enormes entraves relacionados à sacarificação enzimática, como por exemplo, a grande quantidade de enzima requerida e o alto custo das enzimas (GUSAKOV, 2011). Assim, o desenvolvimento de novos coquetéis enzimáticos, mais eficientes e específicos para o bagaço de cana, pode ser um grande avanço para a viabilidade do etanol de segunda geração a partir desta biomassa.

4. CONCLUSÕES

Uma nova maneira de se realizar uma mistura entre dois extratos enzimáticos produzidos pelos fungos *P. sanguineus* e *C. cubensis*, bons produtores de celulasas, hemicelulasas e lacase, crescidos em FS e FES, respectivamente, foi proposta neste estudo. O coquetel resultante (MT) apresentou um balanço enzimático satisfatório para a hidrólise do bagaço de cana pré-tratado com NaOH 1 % (m/v), proporcionado principalmente por efeitos sinérgicos positivos entre várias enzimas. Consequentemente, foram obtidos altos rendimentos de hidrólise de glicana e xilana, utilizando tanto uma carga enzimática de 10 FPU/g (85 % e 95 %, respectivamente) quanto de 5 FPU/g (68 % e 85 %, respectivamente). Logo, o coquetel MT mostrou-se eficaz na hidrólise desta biomassa, sendo promissor para a sua aplicação em processos de produção de etanol de segunda geração.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAV, S.S.; RAVINDRAN, A.; SZE, S.K. Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* on different lignocellulosic biomass. **Journal of Proteomics**. 1493-1504, 2012.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; NEGRO, M.J. Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**. 101: 4851-4861, 2010.

BERLIN, A.; MAXIMENKO, V.; GILKES, N.; SADDLER, J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnol Bioeng**. 97: 287–96, 2007.

Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Anal. Biochem**. 72: 248–254, 1976.

CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**. 101: 4754-4766, 2010.

CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quim. Nova**. 33: 181-188, 2010.

CHEN, M.; QIN, Y.; LIU, Z.; WANG, F.; QU, Y. Isolation and characterization of β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. **Enzyme and Microbial Technology**. 46: 444-449, 2010.

CUNHA, F.M.; ESPERANÇA, M.N.; ZANGIROLAMI, T.C.; BADINO, A.C.; FARINAS, C.S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulose. **Bioresource Technology**. 112: 270-274, 2012.

de ALONSO, S.K.; da SILVA, A.G.; KASUYA, M.C.M.; de BARROS, N.F.; CAVALLAZZI, J.R.P.; BETTUCCI, L.; LUPO, S.; ALFENAS, A.C. Isolation and screening of wood white-rot fungi from *Eucalyptus* spp. forests with potential for use in degradation of stumps and roots. **Revista Árvore**. 31: 145-155, 2007.

DIAS, M.O.S.; ENSINAS, A.V.; NEBRA, S.A.; FILHO, R.M.; ROSSELL, C.E.V.; MACIEL, M.R.W. Production of bioethanol and other bio-based materials

from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. **Chemical Engineering Research and Design**. 87: 1206-1216, 2009.

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

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; PENNINCKX, M. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 35: 1531-1538, 2008.

FALKOSKI, D.L.; GUIMARÃES, V.M.; ALMEIDA, M.N.; ALFENAS, A.C.; COLODETTE, J.L.; de REZENDE, S.T. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 166: 1586-1603, 2012.

FALKOSKI, D.L.; GUIMARAES, V.M.; ALMEIDA, M.N.; ALFENAS, A.C.; COLODETTE, J.L.; de REZENDE, S.T. *Chrysosporthe cubensis*: a new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**. 130: 296–305, 2013.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**. 59: 257 – 268, 1987.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**. 315: 808–810, 2007.

GOTTSCHALK, L.M.F.; OLIVEIRA, R.A.; BOM, E.P.S.. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**. 51: 72-78, 2010.

GUIMARÃES, L.M.S.; de RESENDE, M.D.V.; LAU, D.; ROSSE, L.N.; ALVES, A.A.; ALFENAS, A.C. Genetic control of *Eucalyptus urophylla* and *E. grandis* resistance to canker caused by *Chrysosporthe cubensis*. **Genetics and Molecular Biology**. 33: 525-531, 2010.

GUSAKOV, A.V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in Biotechnology**. 29: 419-425, 2011.

HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDEN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**. 24: 549-556, 2006.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 64: 175-186, 2004.

HU, J.; ARANTES, A.; PRIBOWO, A.; SADDLER, J.N. The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a “cellulase mixture” but is highly substrate specific. **Biotechnology for Biofuels**. 6: 112, 2013.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. 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**. 4: 36, 2011.

JEGANNATHAN, K.R.; CHAN, E-S.; RAVINDRA, P. Harnessing biofuels: A global Renaissance in energy production? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 13: 2163–2168, 2009.

JUHASZ, T.; SZENGYEL, Z.; RECZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**. 40: 3519-3525, 2005.

LAGAERT, S.; BELIËN, T.; VOLCKAERT, G. Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. 20: 1064-1073, 2009.

LEE, J-S.; PARAMESWARAN, B.; LEE, J-P.; PARK, S-C. Recent developments of key technologies on cellulosic ethanol production. **Journal of Scientific & Industrial Research**. 67: 865-873, 2008.

LEVINE, S.E.; FOX, J.M; CLARK, D.S.; BLANCH, H.W. A Mechanistic Model for Rational Design of Optimal Cellulase Mixtures. **Biotechnology and Bioengineering**. 108: 11, 2011.

MACEDO, I.C.; SEABRA, J.E.A.; SILVA, J.E.A.R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, 32: 582-595, 2008.

MAEDA, R.N.; SERPA, V.I.; ROCHA, V.A.L.; MESQUITA, R.A.A.; ANNA, L.M.M.S.; CASTRO, A.M.; DRIEMEIER, C.E.; PEREIRA Jr., N.;

POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**. 46: 1196-1201, 2011.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**. XXX: 1-29, 2012.

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

RAKOTOARIVONINA, H.; HERMANT, B.; MONTHE, N.; REMOND, C. The hemicellulolytic enzyme arsenal of *Thermobacillus xylanilyticus* depends on the composition of biomass used for growth. **Microb. Cell Fact.** 11: 159, 2012.

SARKAR, N.; KUMAR, S.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**. 37: 19-27, 2012.

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**. 99: 4997-5005, 2008.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**. 46: 541-549, 2010.

SRIVASTAVA, Ranjana; KUMAR, G.P.; SRIVASTAVA, K.K. Construction of a recombinant cellulolytic *Escherichia coli*. **Gene**. 164: 185-186, 1999.

OMETTO, A.R.; ROMA, W.N.L. Atmospheric impacts of the life cycle emissions of fuel ethanol in Brazil: based on chemical exergy. **Journal of Cleaner Production**. 18: 71-76, 2010.

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**. 30: 1458-1480, 2012.

VISSER, E.M.; FALKOSKI, D.L.; ALMEIDA, M.N.; MAITAN-ALFENAS, G.P.; GUIMARÃES, V.M. Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. 144: 587–594, 2013.

WANDERLEY, M.C.D.A.; MARTÍN, C.; ROCHA, G.J.D.M.; GOUVEIA, E.R. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**. 128: 448–453, 2013.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. **Bioresource Technology**. 96: 491-499, 2005.

ZHANG, J.; PAKARINEN, A.; VIKARI, L. Synergy between cellulases and pectinases in the hydrolysis of hemp. **Bioresource Technology**. 129: 302–307, 2013.

CAPÍTULO 4

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E MODO DE AÇÃO DO COMPLEXO CELULÁSICO PRODUZIDO PELO FUNGO

Pycnopus sanguineus PF-2

CAPÍTULO 4 – PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E MODO DE AÇÃO DO COMPLEXO CELULÁSICO PRODUZIDO PELO FUNGO *Pycnoporus sanguineus* PF-2

RESUMO

Um novo complexo celulásico, CMCCase, produzido pelo fungo basideomiceto da podridão-branca *P. sanguineus*, foi purificado e caracterizado cinético e bioquimicamente. O complexo CMCCase purificado é composto por duas endoglicanases, sendo uma pertencente a família GH10 e outra com homologia parcial às proteínas TLs (Thaumatinas-like) e ainda sem classificação; além de duas celobiohidrolases, GH6 e GH7. A endoglicanase GH10 possui massa molecular de 35,9 kDa. A endoglicanase sem classificação e a celobiohidrolase GH6 possuem massas moleculares de 42 kDa, já a celobiohidrolase GH7 possui massa molecular de 52,7 kDa. O complexo CMCCase foi bastante termoestável, com temperatura ótima de atividade a 70°C, e apresentando meia-vida de 57,2 h a 50°C. Além disso, apresentou altas atividades em uma ampla faixa de pH (3,5-5,5) e temperatura (50-75°C). Os valores de K_M e V_{max} foram de 45,72 mg/mL e 7 $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectivamente. Foi verificado que os íons metálicos Fe^{3+} , Ag^{3+} , Hg^{2+} e Cu^{2+} e os reagentes SDS, furfural, HMF e ácido acético apresentam efeito inibitório sobre a atividade enzimática do complexo CMCCase. Foi observado também que complexo CMCCase possui maior especificidade pelo substrato *barley*- β -glicano e pelas hemiceluloses xilana *birchwood* e *locust bean gum*, apresentando também altas atividades sobre estes substrato. Além disso, o complexo CMCCase foi aplicado na hidrólise do CMC e verificou-se uma grande formação de glicose e celobiose com o decorrer do tempo, sugerindo uma clivagem assimétrica dos oligossacarídeos maiores produzidos, ou seja, o complexo CMCCase cliva preferencialmente em regiões mais externas dos oligossacarídeos maiores.

Palavras-chaves: complexo celulásico, endoglicanases, celobiohidrolases, purificação.

1. INTRODUÇÃO

As biomassas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza e são constituídas por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, que são unidas entre si por ligações covalentes formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos. Contudo, um grupo de fungos basidiomicetos causadores da podridão branca estão entre os organismos que tem a capacidade de degradar todos os componentes da biomassa, devido a sua capacidade de secretar diversas enzimas hidrolíticas como as celulasas, hemicelulasas e lacases (QUEIROZ-CASTAÑEDA et al., 2011). Atualmente, estas enzimas tem sido foco de diversas pesquisas devido ao grande potencial para a aplicação na produção de bioetanol, o qual está sendo considerado uma das alternativas mais promissoras para a substituição dos combustíveis fósseis.

Celulasas são enzimas capazes de atuarem sobre a celulose, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação da glicose, a qual pode ser convertida a etanol por processos fermentativos. A classificação das celulasas, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grupos: endoglicanases (EC 3.2.1.4), que clivam ligações internas da fibra celulósica; celobiohidrolases (EC 3.2.1.176), que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (ZHANG et al., 2012).

Em algumas bactérias anaeróbicas, as celulasas podem fazer parte de complexos multienzimáticos denominados celulosomas que possuem uma maior eficiência de hidrólise da celulose quando comparado aos sistemas enzimáticos livres, os quais são normalmente produzidos por fungos e bactérias aeróbicas. Contudo, estudos recentes mostram que alguns fungos podem produzir complexos multienzimáticos para degradar a biomassa lignocelulósica, como reportado por OHTSUKI et al. (2005), GONZALEZ-VOGEL et al. (2011) e SILVA et al. (2012).

O uso de enzimas na sacarificação da biomassa é particularmente vantajoso porque ele reduz a formação de compostos tóxicos, exige condições amenas de pH e temperatura para sua realização, permite a obtenção de um etanol de melhor qualidade (menor acidez) e apresenta um menor custo no tratamento da água utilizada no processo (HAHN-HAGERDAL et al, 2006; JEGANNATHAN et al., 2009). Entretanto, apesar das vantagens e das altas taxas de conversão enzimática de

celulose à glicose encontrados na literatura (DALE & MOREIRA, 1982; BEGUIN & AUBERT, 1994; KIM & HONG, 2001), o processo de sacarificação enzimática ainda não é uma tecnologia estabelecida. O principal fator limitante é o alto custo das enzimas comumente encontradas no mercado, o que torna todo o processo inviável financeiramente quando realizado em escala industrial. Além disso, o fato das enzimas serem altamente instáveis e não suportarem longos períodos de armazenamento, a alta complexidade e a variedade de biomassas passíveis de serem utilizadas na produção de etanol gera também um entrave na viabilização deste processo. Por todos estes fatores, o desenvolvimento de estudos para produção, expressão e compreensão do modo de ação das celulasas de diferentes microrganismos são imprescindíveis para a implantação do processo de produção do etanol lignocelulósico.

O fungo *Pycnoporus sanguineus*, um basídeoomiceto causador da podridão branca, já é muito estudado devido a sua grande capacidade em produzir eficientes enzimas lignolíticas para a aplicação na produção do papel (MAI et al., 2004; EUGÊNIO et al., 2010). Entretanto, existem poucos trabalhos na literatura que utilizam este fungo para produção de celulasas e hemicelulasas para aplicação na sacarificação da biomassa lignocelulósica, um fato que gera estranheza, devido a sua grande habilidade natural em degradar todos os componentes da madeira em decomposição. FALKOSKI et al. (2012) produziram celulasas e hemicelulasas a partir deste fungo e aplicou o seu extrato enzimático na sacarificação do bagaço de cana. Estes pesquisadores verificaram o grande potencial do *P. sanguineus* para esta aplicação biotecnológica.

Logo, neste trabalho, foi purificado, caracterizado e analisado o modo de ação de um complexo multienzimático produzido pelo fungo *P. sanguineus*. Este é o primeiro trabalho que purifica e estuda um complexo de celulasas produzido por este fungo. Além disso, estudos deste tipo podem fornecer importantes informações para melhorar a eficiência da hidrólise da celulose em processos de sacarificação da biomassa lignocelulósicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Os substratos carboximetilcelulose, xilana *birchwood*, *locust bean gum*, celobiose, *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*NPGli), *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*NPXil), *p*-nitrofenil- β -D-celobiosídeo (*p*NPCel) foram obtidos da *Sigma Chemical Company* (St. Louis, MO, USA). A forrageira *Panicum maximum* foi obtida em uma forragicultura da Universidade Federal de Viçosa, Brasil. A forrageira foi secada em estufa a 105 °C e moída para ser utilizada como fonte de carbono no crescimento do fungo. Os demais reagentes necessários à execução deste trabalho apresentaram procedência e grau de pureza analítico. As resinas fenil-sepharose e sephacril S-200 foram obtidas da GE Helthcare (Uppsala, Sweden).

2.2. Microrganismo, condições do cultivo e produção enzimática

O fungo *Pycnoporus sanguineus* PF-2 foi isolado da madeira em decomposição e gentilmente cedido pelo Laboratório de Patologia Florestal e Genética de Interação Planta-Patógeno da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. O fungo foi repicado rotineiramente em meio BDA (Batata Dextrose Agar) e incubado a 28 °C. Para a produção enzimática, foram utilizados 50 discos miceliais (7,0 mm de diâmetro) extraídos de placas de Petri previamente incubadas por sete dias para inocular os Erlenmeyers contendo 500 mL do meio de cultivo com a seguinte composição: 10 % (p/v) de forrageira, 5 % (p/v) de peptona bacteriológica, 0,5 g/L de MgSO₄, 18 mg/L de FeSO₄.7H₂O, 1,5 g/L de KH₂PO₄, 10,0 mg/L de CuSO₄, 1,0 g/L de CaCl₂, 10,0 mg/L de ZnSO₄, 50,0 mg/L de KCl e 1,0 μ L/mL de Tween 80. O pH do meio mineral foi ajustado para 4,0. O cultivo dos fungos foi conduzido por 168 horas em um agitador orbital a 28 °C e 180 rpm. Após este período, o meio líquido foi filtrado e imediatamente centrifugado a 15.000 \times g por 20 minutos. O sobrenadante foi congelado a -4 °C e armazenado para os experimentos posteriores de purificação.

2.3. Ensaio enzimáticos

O ensaio para a determinação da atividade CMCase consistiu em um meio reacional contendo 400 μ L de carboximetilcelulose 2 % (m/v) em tampão acetato de

sódio 50 mM, pH 5,0, e 100 µL do extrato enzimático diluído apropriadamente. A reação foi conduzida por 30 minutos a 50 °C ou na temperatura indicada em cada ensaio. Os açúcares redutores formados foram determinados pelo reagente DNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico) (MILLER, 1956) e calculados de acordo com uma curva padrão (0,08 – 1,11 µmol de glicose). Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de glicose equivalente por minuto.

2.4. Determinação da concentração de proteínas

Para os cálculos de atividade específica, o método do ácido bicinonínico (BCA) (SMITH et al, 1985) foi utilizado para determinar as concentrações de proteínas nos extratos. Já os perfis de eluição das proteínas durante as etapas cromatográficas foram estimados pela absorbância das amostras a 280 nm.

2.5. Purificação do complexo CMCCase

O extrato enzimático produzido por *P. sanguineus* em fermentação submersa foi concentrado 10 vezes, utilizando o sistema de ultrafiltração Amicon (Millipore Co. – Billerica, MA, USA) e o filtro de membrana YM-30 com diâmetro de exclusão molecular de 30.000 Da. O extrato concentrado foi submetido a um fracionamento com 20-40 % de (NH₄)₂SO₄ (GREEN & HUGHENS, 1955). As proteínas precipitadas a 40 % de saturação, que continham atividade CMCCase, foram ressuspendidas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, e então passadas em uma coluna HiTrap Phenil-Sepharose (5 mL) equilibrada com 1 mM (NH₄)₂SO₄ em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0. As proteínas foram eluídas a um fluxo de 240 mL/h por 30 min com um gradiente linear de (NH₄)₂SO₄ (1-0) em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0. As frações resultantes que apresentaram atividade CMCCase foram agrupadas em dois *pools*, designados F1 e F2. O *pool* F2 foi novamente concentrado 10 vezes, utilizando o mesmo sistema de ultrafiltração citado acima, e então submetido à HiTrap Sephacryl S-200 (120 mL) equilibrada com tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão em um fluxo de 60 mL/h. Todas as etapas de cromatografia foram realizadas à temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). Novamente, foram observados dois picos com atividade de CMCCase, designados G1 e G2.

2.6. Análises por SDS-PAGE, gel nativo e zimograma

As massas moleculares das enzimas foram estimadas por SDS-PAGE usando um gel de poliacrilamida 12 % (LAEMMLI, 1970). Os marcadores de massa molecular utilizados foram da *Invitrogen Novex®*, *Life Technologies* (Carlsbad, CA, USA). Para testar a hipótese da presença de complexos enzimáticos, a eletroforese foi realizada em gel nativo de poliacrilamida 10 %. A visualização das bandas proteicas foi realizada empregando-se a técnica de coloração por nitrato de prata (BLUM et al., 1987).

Para o zimograma, amostras do *pool* G1 foram aplicadas em um gel SDS-PAGE 12 % e gel nativo 10 % contendo 0,2 % (m/v) de CMC polimerizado juntamente com a matriz. Após a eletroforese, o gel foi dividido em duas partes. Uma das partes, contendo uma amostra do *pool* G1 e o marcador molecular, foi corada com prata. A outra parte do gel contendo somente a amostra do *pool* G1, foi lavada duas vezes por 20 minutos com isopropanol 20 % (v/v) em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, seguido por duas lavagens de 20 min cada, com o mesmo tampão. O gel foi incubado a 50 °C em tampão acetato de sódio por 60 minutos, corado com vermelho congo 0,1 % (m/v) por 15 minutos, e descorado com duas lavagens de 15 min cada, com NaCl 1 M. As atividades de CMCase foram visualizadas no gel como bandas claras. Para aumentar o contraste do gel e as bandas, foi adicionado ao meio 1 mL de ácido acético 5 % (m/v).

2.7. Digestão das proteínas e identificação por espectrometria de massas (MS)

Digestão das proteínas: os *spots* contendo as proteínas foram removidos manualmente do gel SDS-PAGE 12 %, reduzidos por DTT e alquilados por iodoacetamida seguido por digestão com tripsina em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,8, contendo 20 ng/μL de tripsina (Promega). A digestão foi conduzida *overnight* a 37 °C e o sobrenadante foi recolhido em microtubos novos (0,5 mL). Os peptídeos foram extraídos dos *spots* com 30 μL de solução de bicarbonato de amônio 50 mM, seguido de incubação por 10 min com agitação ocasional. Depois dessa etapa, os sobrenadantes foram coletados e transferidos para outros microtubos novos. Essa extração foi realizada por mais duas vezes pela adição de 30 μL de tampão de extração (acetonitrila 50 % (v/v) e TFA 1 % (v/v)) aos tubos contendo as amostras. Os mesmos foram incubados por 10 min com agitação ocasional. O sobrenadante

foi coletado e recolhido em tubos de microcentrífuga. O volume do extrato foi completamente seco por evaporação em *speed-vac*. Os peptídeos tripticos foram solubilizados em 30 μ L de água grau MS (Sigma-Aldrich) contendo ácido fórmico 0,1 % (v/v).

Identificação das proteínas por MS: 10 μ L do digerido tripticamente foram usados para as análises por LC-MS usando um sistema HPLC (Shimadzu, Prominence UFLC), contendo uma coluna capilar C18 5- Å 300 μ M \times 100-mm operando com um fluxo de 3,0 μ L/min. Os peptídeos eluídos foram injetados em um espectrômetro de massas *on-line* micrOTOF-Q (Bruker) usando uma agulha de ionização micro ESI. A fase móvel utilizada para a formação do gradiente foi água com ácido fórmico 0,1 % (v/v) (A) e acetonitrila com ácido fórmico 0,1 % (v/v) (B). O gradiente programado consistiu de 5 % de B por 5 min, aumento linear para 50 % B sobre 35 min, aumento linear para 95 % B sobre 10 min, fluxo constante a 95 % B por 10 min, diminuição para 5 % B por 5 min, seguido por fluxo constante a 5 % B por 5 min. O espectrômetro de massas operou para a faixa de massas entre 300 e 1500 m/z em modo positivo, e os dados foram adquiridos por 70 min em cada corrida LC-MS/MS. A aquisição dos dados por ambos os instrumentos HPLC-MS foram gerenciados por pacote Hystar (Bruker) e os espectros foram processados utilizando-se o *software* Data Analysis Package (Bruker), aplicando-se configurações padrões para proteômica. O espectrômetro de massas operou no modo auto-MSn, com espectros MS2 coletados para maior intensidade de íons em cada espectro completo, excluindo íons de carga simples. O tempo de varredura foi configurado para 0,5 s e os dados de MS2 foram obtidos para um acúmulo de cinco espectros, para permitir a geração e análise de um maior número de íons a cada ciclo MS1-MS2. As listas de picos foram geradas como um formato txt do tipo *mascot generic format* (mgf) pelo *software* Data Analysis (Bruker) e usado para identificação da proteína pelo algoritmo MASCOT (Matrix Science). A quantidade de pesquisas geradas pelo Mascot foi realizada localmente contra o banco de dados de proteínas fúngicas do NCBI usando o *MASCOT DAEMON CLIENT*, com uma tolerância precursora de 0,1 Da para os produtos iônicos, permitindo a oxidação e a desaminação da metionina (NQ) como uma modificação variável, carbamidometilação como uma modificação fixa, uma clivagem perdida, comandar estados 2, 3 e 4, e tripsina como a enzima. As listas de massas de MS2 foram também analisadas por sequenciamento *de novo* computacional utilizando o

algoritmo PepNovo (*proteomics.ucsd.edu*). As *tags* das sequências de peptídeos geradas para cada *spot* proteico foram ranquiadas para scores de qualidade acima de 50 e pesquisadas contra banco de proteínas do NCBI (nr) utilizando o algoritmo MS BLAST (*genetics.bwh.harvard.edu/msblast/*). Proteínas apresentando sequências com similaridade significativa para as *tags* peptídicas pesquisadas foram consideradas como proteínas homólogas às proteínas presentes no gel SDS-PAGE. As etiquetas de sequências sequenciadas e identificadas foram agrupadas para caracterização das sequências da proteína presente no *spot* do gel SDS-PAGE.

2.8. Efeito do pH e temperatura

A influência do pH e da temperatura sobre a atividade do complexo CMCCase foi avaliada utilizando o ensaio padrão descrito no ítem 2.3, variando-se apenas o pH pelo uso das soluções do tampão McIlvaine (pH 2,6- 8,0) e a temperatura do ensaio, a qual variou entre 20 e 90 °C. Para a determinação da termoestabilidade, as frações enzimáticas foram pré-incubadas a 50 °C. Alíquotas foram coletadas em diferentes intervalos de tempo e mantidas sob refrigeração. As atividades residuais foram determinadas utilizando o ensaio enzimático padrão a 70 °C.

2.9. Estudos cinéticos

Os experimentos cinéticos foram realizados a 70 °C e em pH 5,0. A constante de Michaelis-Menten (K_M) e a velocidade máxima da reação (V_{max}) foram calculadas de acordo com a equação de Michaelis-Menten utilizando carboximetilcelulose como substrato (CMC). O *software* utilizado para plotar o gráfico foi o *Curve expert 1.4*. As concentrações do substrato CMC variaram entre 0,15 e 3,9 % (p/v).

2.10. Efeitos de íons e agentes redutores

Os efeitos de íons e agentes redutores sobre o complexo CMCCase foram avaliados. Para isso, realizou-se o ensaio padrão incluindo o componente a ser testado em uma concentração final de 1 mM ou 6 mM em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0.

2.11. Especificidade por substrato

Ensaio enzimáticos foram realizados com diferentes substratos naturais e sintéticos. A reação consistiu de 200 μ L do tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, 50 μ L da solução enzimática e 250 μ L dos substratos.

As hidrólises de *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo, *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo e *p*-nitrofenil- β -D-celobiosídeo foram determinadas usando uma concentração final de substrato de 1 mM, por 30 minutos. A reação foi finalizada usando carbonato de sódio 0,5 M e a quantidade de *p*-nitrofenol formada foi determinada por absorvância em 410 nm.

A hidrólise de CMC (massa molecular de 90000 g/mol e 0,7 grupos carboximetil por unidade de anidroglicose), xilana birchwood e barley- β -glicano foram determinadas utilizando uma concentração final de substrato de 1 % (p/v). A hidrólise do substrato locust bean gum foi medida usando uma concentração final de 0,5 % (p/v). A hidrólise de papel de filtro foi determinada usando papel Whatman n° 1 (1 \times 5 cm). Todos os açúcares redutores formados nessas reações foram determinados utilizando o reagente DNS (MILLER, 1956).

A hidrólise de celobiose foi determinada usando uma concentração final de 6 mM. A reação foi paralisada pela incubação da mistura reacional em banho fervente por 5 min e a glicose liberada foi quantificada através do uso de um Kit comercial analítico baseado em glicose oxidase e peroxidase (Doles, Goiânia, Brasil).

Todas as reações foram conduzidas na temperatura ótima da enzima por 30 minutos. Para cada reação, foi feito um controle com o CMC como substrato utilizando as mesmas condições e concentração de enzima do ensaio. Esse controle foi considerado 100 % de atividade.

2.12. Hidrólise do CMC

A reação de hidrólise do CMC foi realizada com um volume final de 2 mL a partir da adição de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, a enzima na diluição apropriada e o substrato em uma concentração final de 1 %. As enzimas foram padronizadas para uma concentração final de 0,03 U/mL na mistura reacional. A reação foi conduzida a 50 °C por 72 horas e 6 alíquotas de 100 μ L foram retiradas ao longo deste período, sendo colocadas em banho fervente por 10 min e congeladas para análises posteriores. Os produtos foram analisados em um HPLC, Shimadzu

series chromatograph 10A equipado com uma coluna Supelcosil LC-NH₂ (25 cm × 4,6 mm, partículas de 5 µm). A fase móvel foi acetonitrila: água (80:20) em um fluxo de 1 mL/min, a 35 °C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Purificação do complexo CMCase

O extrato bruto produzido pelo fungo *P. sanguineus* sob fermentação submersa foi concentrado 10 vezes e então submetido a um fracionamento com 20-40% de (NH₄)₂SO₄. O precipitado resultante da saturação de 40% de (NH₄)₂SO₄ foi ressuspenso e então submetido a uma cromatografia de interação hidrofóbica, resultando em dois picos com atividade CMCase, designados F1 e F2 (Figura 1). Pelo perfil apresentado, observa-se que o primeiro pico (F1) não aderiu à resina, sendo eluído sem a necessidade do gradiente salino. De forma contrária, o pico F2 começou a ser eluído no final do gradiente salino decrescente, indicando uma forte interação entre a enzima e a coluna. Logo podemos inferir que essas duas frações enzimáticas apresentam características químicas distintas, ou seja, a enzima eluída em F2 foi mais hidrofóbica que F1.

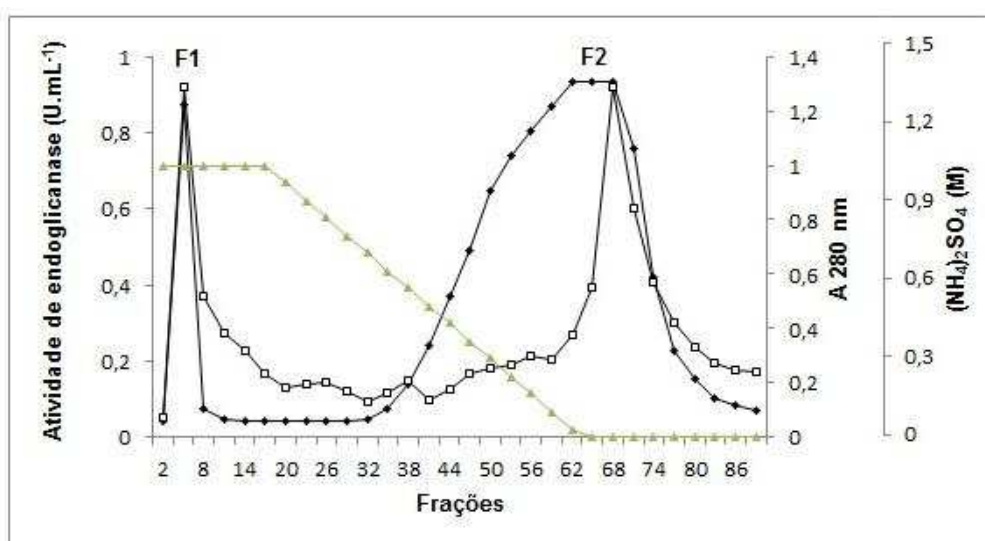


Figura 1 - Cromatografia de interação hidrofóbica do precipitado 20-40 % com sulfato de amônio, previamente concentrado 10 vezes, produzido a partir do extrato enzimático de *Pycnoporus sanguineus*. (◆) Atividade de endoglicanase; (□) Proteína; (▲) (NH₄)₂SO₄ (1-0 M).

As frações correspondentes à F2 foram agrupadas e o *pool* formado foi novamente concentrado dez vezes e posteriormente submetido a uma cromatografia de exclusão molecular. Como apresentado na Figura 2, na cromatografia com Sephacryl S-200 também foram obtidos dois picos de atividade de CMCCase parcialmente sobrepostos, os quais foram denominados G1 e G2. A Tabela 1 apresenta um resumo dos resultados obtidos na purificação.

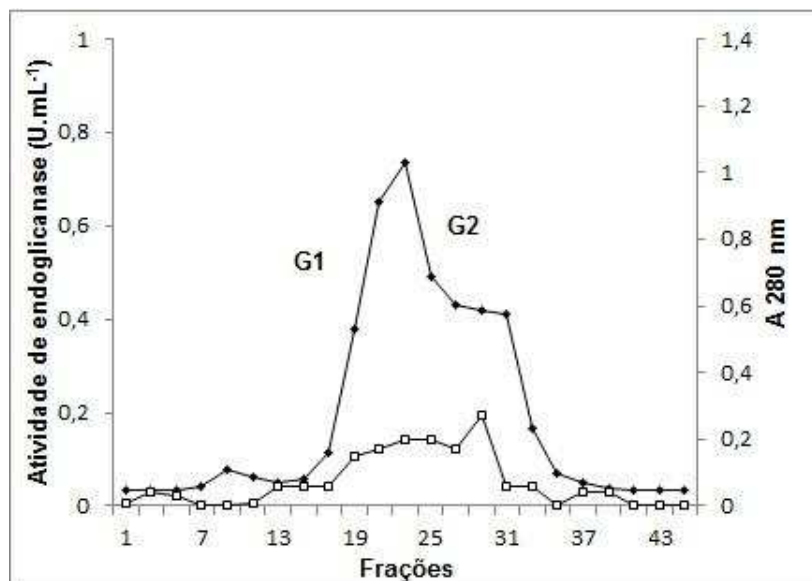


Figura 2 - Cromatografia de exclusão molecular do *pool* F2 de *Pycnoporus sanguineus*. (♦) Atividade de endoglicanase; (□) Proteína.

O rendimento obtido para o *pool* F1, resultante da cromatografia de interação hidrofóbica, foi muito baixo, logo, os próximos passos da purificação ocorreram somente com o *pool* F2, o qual apresentou um aumento no fator de purificação, além de um bom rendimento (Tabela 1).

Durante a cromatografia de exclusão molecular, houve uma diminuição da atividade específica do *pool* G1 em relação ao *pool* F2 aplicado. Este fato provavelmente ocorreu devido a separação do complexo CMCCase de outras celulases no decorrer da purificação, levando a grande perda da atividade, já que as enzimas celulolíticas atuam sinergisticamente. Este fato pode ser justificado também pelos baixos rendimentos obtidos durante a cromatografia de exclusão molecular (Tabela 1). Entretanto, a eficiência do processo de purificação pode ser confirmada pela análise do gel SDS-PAGE (Figura 3). ALMEIDA et al. (2013), ao purificarem

endoglicanases do fungo endofítico *Fusarium verticillioides*, também observaram este fato, sugerindo a grande perda de atividade e o rompimento do sinergismo entre as celulases.

Tabela 1 - Resumo das etapas da purificação do complexo CMCase do fungo *Pycnoporus sanguineus* PF-2.

Etapa da purificação	Atividade (U)	Proteína (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto concentrado	857,6	191,93	4,47	1	100
Fracionamento com (NH ₄) ₂ SO ₄	626,6	124,62	5,03	1,13	73,06
Fenil-Sepharose do precipitado					
F1	22,18	8,78	2,53	0,57	2,59
F2	448,89	16,25	27,63	6,18	52,34
Sephacryl S-200 F2					
G1	29,71	1,44	20,6	4,61	3,46
G2	73,99	2,45	30,25	6,77	8,63

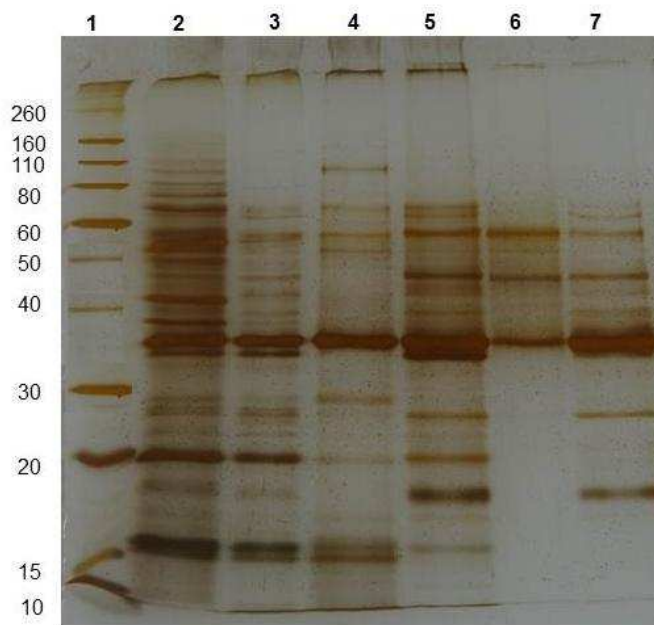


Figura 3 - SDS-PAGE 12 % do processo de purificação do complexo CMCCase de *Pycnoporus sanguineus*. (1) Marcador molecular (Novex[®]) (kDa); (2) extrato bruto; (3) precipitado com sulfato de amônio; (4) F1 após Fenil-Sepharose; (5) F2 após Fenil-Sepharose; (6) G1 após Sephacryl S-200; (7) G2 após Sephacryl S-200.

Após o último passo da purificação, verificou-se ainda várias bandas no *pool* G2, e como o seu rendimento de purificação foi muito baixo, as proteínas presentes neste *pool* não foram analisadas neste trabalho. Contudo, o *pool* G1 apresentou apenas três bandas protéicas com pesos moleculares de 35,9, 42 e 52,7 kDa; sendo escolhido para ser mais profundamente estudado. Um zimograma em condições desnaturantes foi então realizado e verificou-se que as bandas de 35,9 e 42 kDa continham duas endoglicanase, denominadas de EG1 e EG2, respectivamente (Figura 4A). As massas moleculares de endoglicanases de outros fungos têm sido relatadas na literatura na faixa de 27 a 70 kDa (BADAL & SAHA, 2004; COHEN et al., 2005; KARNCHANATAT et al., 2008; ALMEIDA et al., 2013; NARRA et al., 2014).

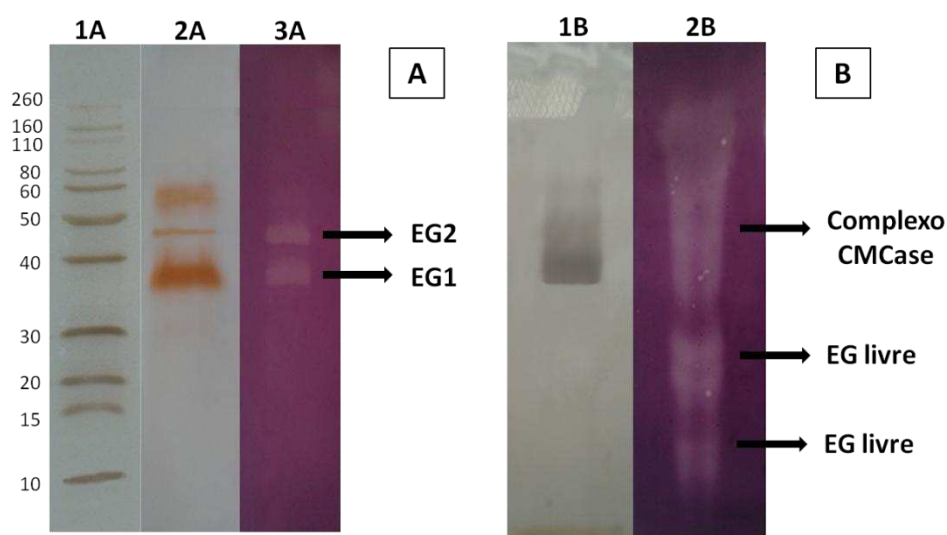


Figura 4 – Perfil de proteínas do *pool* G1 de *Pycnoporus sanguineus* em condições desnaturantes (A) e não desnaturantes (B). Canaletas: (1A) Marcador molecular (Novex[®]) (kDa); (2A) SDS-PAGE 12 % de G1 corado com prata; (3A) Zimograma de G1 realizado em gel SDS-PAGE 12 % contendo 0,2 % (m/v) de CMC; (1B) Gel nativo 10 % corado com prata; (2B) Zimograma realizado com gel nativo 10 % contendo 0,2 % (m/v) de CMC.

A Figura 4B mostra o perfil de proteínas do *pool* G1 em condições não desnaturantes, onde é possível perceber apenas uma única banda de proteínas no gel corado com prata. Já no zimograma é possível detectar três bandas com atividade de endoglicanase. Com isso, pode-se inferir que as três proteínas detectadas no *pool* G1 existem na natureza na forma de um complexo multienzimático, sendo que as bandas

apresentadas no zimograma nativo correspondem às duas formas de endoglicanase presente no *pool* G1 na forma livre além do complexo propriamente dito, já que a relação de expressão das enzimas presentes em complexos pelos microrganismos nem sempre é igual. As bandas menores correspondentes às atividades das endoglicanases na forma livre só foram visualizadas no zimograma devido à alta sensibilidade desta análise. Além disso, a metodologia de coloração com nitrato de prata exige uma quantidade mínima de proteína para revelar as bandas. Logo, este resultado indica que as endoglicanases na forma livre estão em concentração muito baixa na amostra G1 produzida por *P. sanguineus*.

OHTSUKI et al. (2005) verificaram a presença de um grande complexo multienzimático no extrato produzido por *Chaetomium* sp. sob fermentação em estado sólido, o qual continha cinco enzimas xilanolíticas, quatro celulolíticas e oito pectinolíticas. *Trichoderma harzianum* foi capaz de produzir três complexos contendo celulasas e hemicelulasas, onde um dos complexos continha duas celobiohidrolases, uma arabinofuranosidase e uma xilanase (SILVA et al., 2012).

A variedade de enzimas presentes em cada complexo multienzimático pode variar de acordo com o ambiente de crescimento do microrganismo, mas usualmente estas enzimas atuarão em sinergismo e, em alguns casos, ocorre também à presença de proteínas não hidrolíticas que apresentam funções somente na estabilização do complexo (ALI et al, 1995). Em adição, estudos realizados por GONZALEZ-VOGEL et al. (2011) mostram evidências de que a composição enzimática destes complexos depende fortemente da fonte de carbono utilizada no crescimento do fungo. No trabalho citado, quando o fungo *Penicillium purpurogenum* foi crescido em polpa de beterraba, cuja composição é pobre em xilanas, o complexo multienzimático produzido não foi capaz de hidrolizar arabinoxilana; entretanto, quando o mesmo fungo foi crescido em xilana acetilada, o complexo multienzimático produzido foi diferente, sendo agora capaz de hidrolisar arabinoxilana.

A formação de complexos multienzimáticos por bactérias e fungos pode ser bastante vantajosa, já que este tipo de organização pode minimizar a difusão e a perda de produtos e intermediários, aumentando a disponibilidade de substrato (KARBOUNE et al., 2008; WAEONUKUL et al., 2009), além de aumentar o sinergismo entre as enzimas e a estabilidade das mesmas (MUKHOPADHYAY et

al., 2003). Sendo assim, estas propriedades tornam os complexos multienzimáticos uma ferramenta biotecnológica bastante atraente.

3.2. Análise de espectrometria de massa

As bandas obtidas no *pool* G1 foram cortadas do SDS-PAGE e foram analisadas em um espectômetro de massa. As proteínas existentes no complexo CMCCase foram denominadas de EG1 (proteína com 35,9 kDa), EG2 (proteína com 42 kDa) e E3 (proteína com 52,7 kDa). Os peptídeos identificados estão apresentados na Tabela 2.

Após o alinhamento das sequências com outras presentes no banco de dados do GenBank, foi verificado que a banda EG1 continha uma glicosil hidrolase da família 10 (GH10), embora não houvesse similaridade de nenhum dos peptídeos encontrados com sequências presentes em regiões conservadas de endoglicanases de outros fungos presentes no banco de dados, pode-se deduzir que esta GH10 é uma endoglicanase, já que hidrolizou de forma eficiente o CMC presente no gel de poliacrilamida do zimograma (Figura 4A).

A banda EG2 apresentou duas proteínas diferentes, uma celobiohidrolase, glicosil hidrolase da família 6 (GH6), e uma thaumatina-like (TL). As TLs são proteínas de plantas relacionadas com a resposta hipersensitiva em interações planta-patógeno, sendo classificadas como proteínas relatadas à patogênese. Na maioria das plantas, estas proteínas são expressas de forma induzida e possuem diversas atividades como antifúngicas, endoglicanases e quitinases, sendo consideradas estáveis em altas temperaturas e em pHs ácidos (GRENIER et al., 2000). Diversos estudos têm verificado que proteínas de fungos possuem homologia parcial com as TLs de plantas, incluindo β -glicosidases e endoglicanases (GRENIER et al., 2000; NOVOTNÝ et al., 2009; GEIB et al., 2010; SAKAMOTO et al., 2011). Contudo, estas enzimas ainda não são agrupadas em nenhuma das famílias das glicosil hidrolases. SAKAMOTO et al. (2011) purificaram, sequenciaram e caracterizaram uma endoglicanase GLU1 de *Lentinula edodes* com homologia a thaumatina-like, classificando-a em uma nova família de glicosil hidrolase, GH128. Logo, além da celobiohidrolase GH6, possivelmente a banda EG2 também contém uma endoglicanase com homologia parcial a thaumatina-like de plantas. Além disso, o

fato das proteínas presentes em EG2 terem hidrolisado o CMC presente no gel de poliacrilamida reforça este indício.

Tabela 2 – Peptídeos identificados pela análise de espectrometria de massa das proteínas presentes no complexo CMCase.

Bandas	Proteínas	Sequências	Score total
EG1	Glicosil hidrolase da família 10 (<i>Schizophyllum commune</i> H4-8) - GI: 302686354	KLYINDYNLDSVNAKV NELFNEDGTMR WGTASDSNR TLAFQAAR	117
EG2	Celobiohidrolase II (<i>Punctularia strigosozonata</i> HHB-11173 SS5) – Glicosil hidrolase da família 6 - GI: 390597699	KQLVQIVVYDLPDRD RVVAVIEPDSLANLVTNLNVQKC RGTFTFAGGDQIANLAKT	116
	Proteína thaumatina-like (<i>Gloeophyllum trabeum</i> ATCC 11539) - GI:521721367	GPFDSTGFPVGCK YSTAA	132
E3	Celobiohidrolase I (<i>Amanita manicata</i>) - Glicosil hidrolase da família 7 - GI: 345447210	RQQWGDWCNIKG KQLVQIVVYDLPDRD KVPDLGTYLADADSIQKS RVVAVIEPDSLANLVTNLNVQKC KNQEFTFDVDM SKL KLPCGLNGALYFVEMPADGGMTKG R.SVVLDSNWR.W K.DGCDFNSWR.M R.MGDQTFLGPGK.T K.FVTHGPYSTNIGSR.V	148

A banda E3 também contém uma celobiohidrolase, uma glicosil hidrolase da família 7 (GH7), a qual atua processivamente nas extremidades redutoras da cadeia de celulose para produzir celobiose. Esta enzima atua de forma diferente das celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) pertencentes às glicosil hidrolases da família 6

(GH6), as quais atuam nas extremidades não-redutoras da cadeia de celulose (<http://www.cazy.org>).

Dois grupos de enzimas podem ser agrupadas nas GH7, endoglicanase e celobiohidrolase, pois possuem estrutura semelhantes. Ambas são proteínas bimodulares, com um módulo de ligação ao carboidrato da família 1 (CBM) conectada ao domínio catalítico GH7 por um polipeptídeo glicosilado. Contudo, as celobiohidrolases possuem algumas características estruturais singulares que as tornam mais processivas em comparação com as endoglicanases da mesma família (MOMENI et al., 2013). De forma geral, as celobiohidrolases GH7 empregam um mecanismo multipasso para desconstruir a celulose, os quais incluem uma complexação inicial da enzima com o carboidrato via uma iniciação de modo endo ou exo, formação de complexo ativo cataliticamente, hidrólise, expulsão do produto e um deslocamento processivo pela cadeia do carboidrato (CRUYS-BAGGER et al., 2012).

Em vários fungos celulolíticos, como os ascomicetos de podridão mole *Hypocrea jecorina* e o basideomiceto de podridão branca *Phanerochaete chrysosporium*, as principais proteínas produzidas, sob condições que induzem a produção de celulasas, são celobiohidrolases GH7. Além disso, em *H. jecorina*, em estudos com gene *knock-out* de uma celobiohidrolase GH7 (*HjeCel7A*), verificou-se que a presença desta proteína foi um fator limitante para a hidrólise da celulose (ILMÉM et al., 1997).

Neste estudo, evidenciamos a produção de celulasas em complexos multienzimáticos pelo fungo *P. sanguineus*, composto por duas endoglicanases, sendo uma GH10 e a outra sem classificação; e duas celobiohidrolases (GH6 e GH7), com a finalidade de hidrolisar estruturas lignocelulósicas. Entretanto, a forma com que estas proteínas se interagem não foi verificada. A associação entre elas pode ser mediada pelas interações direta de proteína-proteína, assim como por glicosilações (ALMEIDA et al., 2013). Por fim, o complexo CMCCase purificado foi caracterizado cinética e bioquimicamente.

3.3. Efeito do pH e temperatura

A influência do pH e da temperatura sobre as atividades enzimáticas do complexo CMCCase de *P. sanguineus* foi estudada variando o pH de 2,6 a 8,0, a 70

°C; e a temperatura de 20 a 90 °C, em pH 5,0. Os resultados estão apresentados na Figura 5 e 6.

As CMCases mantiveram mais de 80 % da sua atividade máxima entre os pHs 3,5 e 5,5, sendo o ótimo encontrado em 4,5. Na Figura 5 observa-se que estas enzimas perderam sua atividade em pHs superiores a 7,5, suportando melhor condições ácidas. Esta característica confere a elas o título de enzimas acidofílicas (LINDENMUTH & McDONALD, 2011; ZHU et al., 2011). Este resultado é compatível com a maioria das endoglicanases e celobiohidrolases fúngicas encontradas na literatura (PARRY et al., 2002; BADAL & SAHA, 2004; KARNCHANATAT et al., 2008; ALMEIDA et al., 2013; WANG et al., 2013; NARRA et al., 2014).

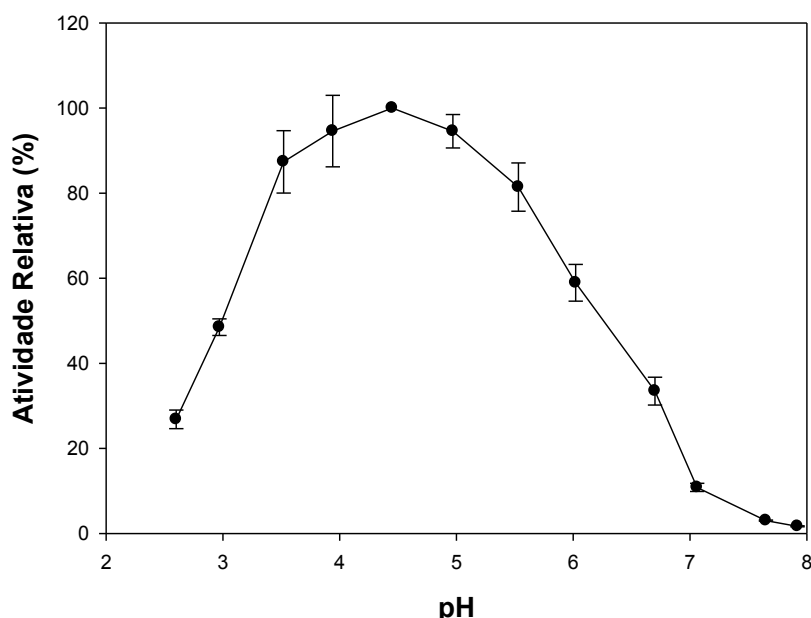


Figura 5 - Efeito do pH sobre as atividades CMCases de *Pycnoporus sanguineus*.

A temperatura ótima encontrada para as atividades de CMCase foi de de 70 °C, sendo que a partir desta temperatura houve uma queda acentuada das atividades. Contudo, entre 50 °C e 70 °C, as enzimas apresentaram mais de 75 % da sua atividade inicial (Figura 6A). Estes resultados indicam que a melhor condição para utilizar este complexo enzimático em processos de sacarificação enzimática seria em sistemas de fermentação e hidrólise separadas, visto que as temperaturas que

forneem as maiores atividades do complexo são muito diferentes das temperaturas ótimas dos microrganismos fermentadores comumente utilizados neste processo.

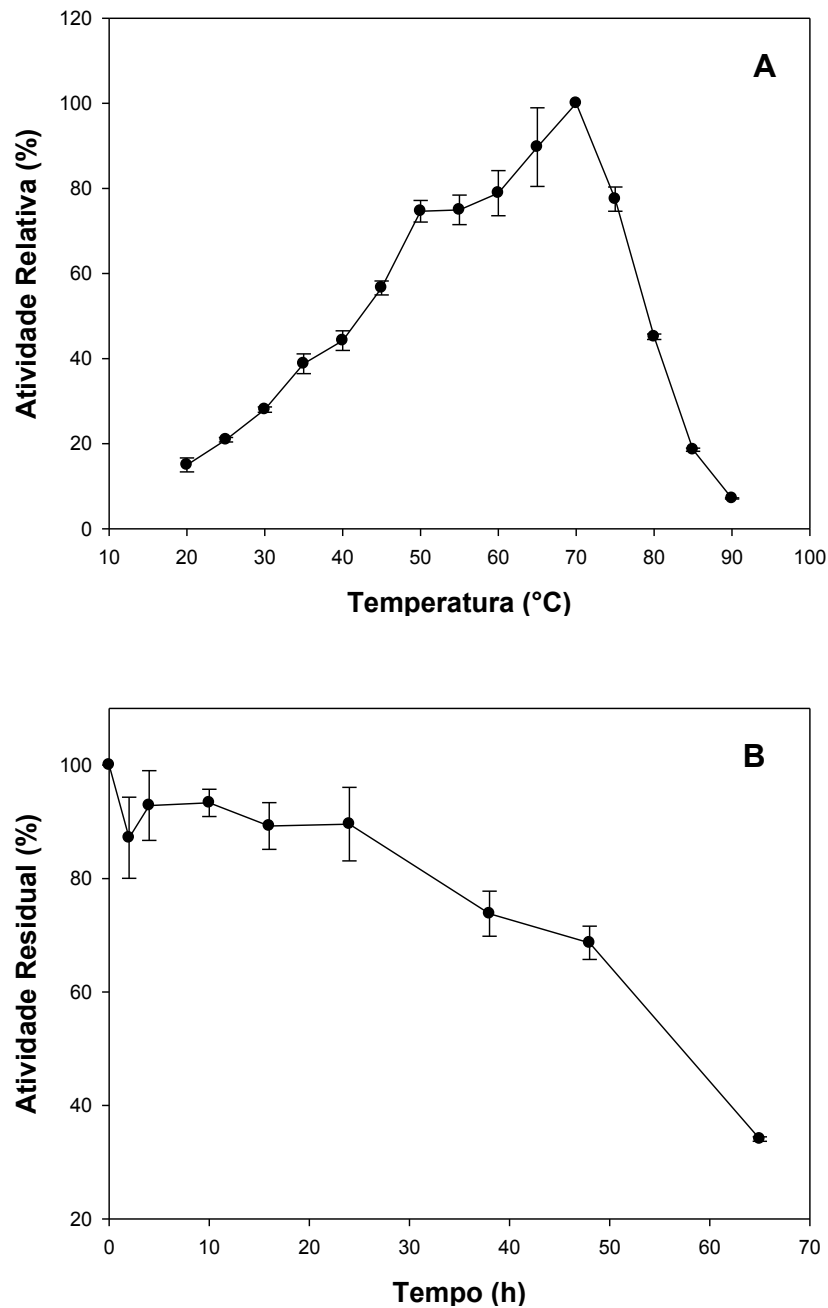


Figura 6 – Efeito da temperatura sobre as atividades CMCases de *Pycnoporus sanguineus*. (A) temperatura ótima; e (B) termoestabilidade a 50 °C.

Dependendo da temperatura ótima, as enzimas podem ser classificadas como mesofílicas (apresentam temperaturas ótimas entre 40 e 60 °C), termofílicas (apresentam temperaturas ótimas entre 60 e 80 °C) e hipertermofílica

(apresentam temperaturas ótimas acima de 80 °C). Muitas endoglicanases de fungos são mesofílicas e a temperatura ótima delas variam entre 50 e 60 °C (LEE et al., 2010). O complexo CMCCase de *P. sanguineus* apresentou atividade ótima em temperatura similares às encontradas para as endoglicanases de fungos termofílicos, o que sugere o alto potencial deste complexo em várias aplicações industriais.

O complexo multienzimático de *P. sanguineus* foi bastante termoestável com 24 h de incubação a 50 °C, perdendo apenas 15 % da sua atividade inicial (Figura 6B). Por meio da construção de uma equação a partir das atividades residuais obtidas, pode-se calcular a meia-vida ($t_{1/2}$) do complexo CMCCase, a qual foi de 57,2 h. Logo, somente após 57,2 h de incubação a 50°C, o complexo CMCCase perde 50 % da sua atividade inicial. Esta alta termoestabilidade pode estar relacionada à associação das enzimas na forma de complexos, fato que minimiza a movimentação e a desestabilização das estruturas proteicas. Este efeito também foi citado por XU et al. (2010) quando comparou os resultados de termoestabilidade do celulosomo de *Clostridium thermocellum* com celulases livres de *Trichoderma* sp. Além disso, valores de termoestabilidade inferiores ao encontrado neste trabalho foram encontrados para endoglicanases e celobiohidrolases puras de outros fungos (SHUYAN et al., 2006; LEE et al., 2010; WANG et al., 2013).

FALKOSKI et al. (2012) também analisaram a termoestabilidade de celulases presentes no extrato bruto de *P. sanguineus* PF-2 e verificaram que as enzimas também foram termoestáveis a 40°C, apresentando atividades residuais de 92,6%, 94,17% e 87,35% para as atividades de endoglicanase, FPase e β -glicosidases após 48 h de incubação. Esta alta termoestabilidade em 40 °C (FALKOSKI et al., 2012) aliado as altas atividades residuais obtidas nesta temperatura (Figura 6A) justifica o uso do coquetel enzimático produzido por *P. sanguineus* em processos de sacarificação e fermentação simultâneos (*SSF – Simultaneous Saccharification Fermentation*), onde a temperatura utilizada na sacarificação é próxima da temperatura ótima de alguns microrganismos fermentadores termofílicos utilizados neste tipo de processo (temperaturas entre 40-45 °C). A vantagem observada neste processo é a diminuição dos efeitos inibitórios causados pelos produtos finais da hidrólise da celulose e, conseqüentemente, são requeridas menores cargas enzimáticas (BALLESTEROS et al., 2004; PARK et al., 2010).

Em processos de sacarificação enzimática de biomassas lignocelulósicas, o fator termoestabilidade das enzimas envolvidas na hidrólise é de suma importância,

visto que este processo requer longos tempos de reação para obter altos rendimentos de conversão em glicose. Logo, o complexo multienzimático produzido por *P. sanguineus* possui características adequadas para ser aplicado neste tipo de processo.

3.4. Efeito de íons e outros reagentes

O ensaio de atividade CMCase foi realizado na presença de íons e outros reagentes na concentração de 1 e 6 mM (Tabela 3 e 4), a 70 °C e pH 5,0. Nenhum dos íons testados promoveu aumento das atividades do complexo CMCase, com exceção do íon K⁺, o qual gerou um pequeno aumento (Tabela 3). De forma contrária ao encontrado neste trabalho, o íon K⁺ apresentou um efeito negativo na atividade de endoglicanases em trabalhos realizados por HEYDA et al. (2009), os quais sugeriram um efeito *salting out*, o que levaria a uma desestabilização da proteína.

Tabela 3 – Atividade relativa (%) das enzimas do complexo CMCase de *Pycnoporus sanguineus* na presença de diferentes íons.

Íons	1 mM	6 mM	Íons	1 mM	6 mM
Controle	100 ± 0,8	100 ± 1,1	ZnSO ₄	101,6 ± 4,0	99,3 ± 2,9
CaCl ₂	95,6 ± 2,6	102,3 ± 4,0	ZnCl ₂	102,4 ± 6,8	89,2 ± 3,7
CaCO ₃	87,0 ± 1,7	77,0 ± 3,3	KCl	93,5 ± 3,7	92,0 ± 2,7
MnSO ₄	90,0 ± 5,7	42,4 ± 2,5	KI	101,7 ± 2,3	108,4 ± 3,2
MnCl ₂	76,9 ± 3,5	98,0 ± 3,7	AlCl ₃	88,4 ± 8,6	100,0 ± 4,2
NaF	86,9 ± 4,8	90,7 ± 3,7	AgNO ₃	68,8 ± 2,1	22,2 ± 2,3
NaCl	104,6 ± 4,4	98,1 ± 5,3	FeCl ₃	77,7 ± 0,7	74,7 ± 3,4
NaNO ₃	85,5 ± 6,0	87,6 ± 5,5	(NH ₄) ₂ SO ₄	92,1 ± 4,2	87,4 ± 2,0
Na ₂ SO ₄	95,0 ± 3,3	89,6 ± 3,0	CuSO ₄	65,3 ± 8,2	25,4 ± 1,9
MgCl ₂	81,3 ± 1,3	106,7 ± 5,6	HgCl ₂	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
MgSO ₄	100,9 ± 4,3	96,8 ± 5,1	CoCl ₂	96,9 ± 6,5	79,7 ± 5,9

O valor de 100 % foi considerado para a atividade enzimática na ausência de íons. Os demais valores de atividade relativa foram calculados em função deste.

Por outro lado, vários íons afetaram negativamente as atividades, sendo que os íons Mn²⁺ (na concentração de 6 mM), Ag³⁺, Cu²⁺ e Hg²⁺ afetaram de forma drástica as atividades das enzimas do complexo CMCase, onde se observou uma total

perda das atividades na presença do íon Hg^{2+} . Os íons metálicos Cu^{4+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} e Ag^{3+} são frequentemente relacionados com grandes perdas de atividade de celulasas. Este efeito inibitório geralmente está associado com a presença de, pelo menos, um grupo sulfidríla e/ou carboxila; e grupos imidazol e amino de histidina no sítio ativo. A oxidação destes grupos pelos cátions metálicos desestabiliza o dobramento conformacional das enzimas, a partir de interações químicas em posições irregulares da proteína. (KARNCHANATAT et al., 2008; LEE et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013; WANG et al., 2013; NARRA et al., 2014). Além disso, o íon Ca^{2+} também gerou uma perda nas atividades do complexo CMCCase. Este fato não é muito usual, visto que este cátion pode interagir com os resíduos de aminoácidos carregados negativamente, como o aspartato e glutamato, resultando em uma estabilização da enzima (KUMARI et al., 2010; NARRA et al., 2014). Os outros íons testados neste trabalho apresentaram pouca ou nenhuma influência sobre as atividades presentes no complexo CMCCase de *P. sanguineus*.

Todos os reagentes testados neste trabalho afetaram a atividade do complexo CMCCase, em menor ou em maior extensão. A única exceção observada ocorreu com a uréia, a qual não afetou as atividades enzimáticas (Tabela 4). A uréia é considerada um agente desnaturante de proteínas, apresentando um efeito osmótico sobre as proteínas, pois ao interagir com o esqueleto polipeptídico, ocorre um deslocamento da água presente na primeira camada de hidratação. Contudo, este efeito não foi verificado neste trabalho, ou seja, nas concentrações testadas, a uréia não apresentou nenhum efeito desnaturante sobre as enzimas presentes no complexo CMCCase. Um resultado semelhante foi observado por ALMEIDA et al. (2013), os quais purificaram e caracterizaram um complexo multienzimático composto por celulasas e uma xilanase.

O SDS, um surfactante aniônico que atua como um detergente desnaturante, provocou uma redução drástica na atividade do complexo CMCCase nas duas concentrações testadas. Na concentração final de 6 mM, apenas 16,6 % da atividade foi mantida. LIU et al. (2011), purificando endoglicanases clonadas de *Aspergillus fumigatus*, obteve resultados semelhantes com SDS na concentração de 1mM. Entretanto, os outros agentes surfactantes analisados, Tween-20 e glicerol, não apresentaram grande influência sobre a atividade do complexo. Estes surfactantes não aniônicos podem atuar na estabilização de proteínas, sendo este efeito bastante

conhecido. Além disso, segundo LEE e colaboradores (2011), é muito comum o uso destes detergentes em extratos proteicos a fim de se evitar a agregação de proteínas.

Tabela 4 – Atividade relativa (%) das enzimas do complexo CMCCase de *Pycnoporus sanguineus* na presença de diferentes reagentes.

Reagentes	1 mM	6 mM
Controle	100 ± 0,8	100 ± 1,1
SDS	44,0 ± 2,6	16,6 ± 1,5
Tween-20	86,0 ± 2,7	91,5 ± 2,4
DTT	86,7 ± 6,7	70,6 ± 6,1
BME	87,1 ± 4,0	92,6 ± 5,2
EDTA	87,0 ± 3,1	86,1 ± 2,4
Uréia	95,4 ± 4,5	97,8 ± 5,8
Furfural	60,3 ± 4,1	63,5 ± 2,2
HMF	69,7 ± 2,9	47,0 ± 3,7
Ácido acético	87,7 ± 3,3	68,6 ± 3,0
Azida	81,2 ± 1,9	84,6 ± 4,7
Etanol	91,8 ± 1,9	86,4 ± 3,8
Glicerol	86,6 ± 2,6	98,6 ± 2,4

O valor de 100 % foi considerado para a atividade enzimática na ausência de íons. Os demais valores de atividade relativa foram calculados em função deste. EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético; BME: β-mercaptoetanol; DTT: ditioneitol; SDS: dodecil sulfato de sódio; HMF: hidroximetilfurfural.

Levando-se em consideração a aplicação biotecnológica do complexo multienzimático, produzido por *P. sanguineus*, na hidrólise de biomassas lignocelulósicas, é de fundamental importância analisar os efeitos dos compostos como furfural, hidroximetil furfural (HMF) e ácido acético sobre as atividades enzimáticas, visto que estes compostos são resultantes da desidratação de pentoses, hexoses e de grupos acetil, respectivamente, durante o pré-tratamento ácido destas biomassas (JÖNSSON et al., 2013). Contudo, verificamos neste trabalho grande redução na atividade do complexo CMCCase na presença destes compostos, o que nos

leva a concluir a incompatibilidade do uso deste complexo enzimático em biomassas previamente tratadas com ácido, a menos que haja um passo de detoxicação, com a remoção destes compostos, antes do processo de sacarificação da biomassa. Logo, outros tipos de pré-tratamentos são indicados, como os pré-tratamentos básicos, explosão a vapor ou com outros solventes orgânicos, por exemplo.

Os agentes redutores DTT e BME foram pouco expressivos sobre a atividade de CMCase, o que sugere baixo conteúdo ou ausência de pontes dissulfeto presentes no sítio ativo das enzimas. Resultados semelhantes também ocorreram com endoglicanases de *Daldinia eschscholzii* (KARNCHANATAT et al., 2008) e *Aspergillus terreus* (NARRA et al., 2014). A presença do agente quelante EDTA também não afetou expressivamente a atividade de CMCase, havendo apenas uma diminuição de aproximadamente 15 % da sua atividade. Contudo, esta pequena redução na atividade CMCase pode sugerir a existência de metaloproteínas neste complexo, entretanto, ou a concentração utilizada foi insuficiente para quelar todos os íons metálicos presentes ou estes íons não apresentam grande importância para a atividade enzimática. O efeito de inibição por este quelante foi observado em complexos multienzimáticos de celulases e hemicelulases de *Fusarium verticillioides* (ALMEIDA et al., 2013) e em endoglicanases livres de *Bacillus* sp. (LI & YU, 2012), *Fervidobacterium nodosum* (WANG et al., 2010), e *Penicillium purpurogenum* (LEE et al., 2010).

3.5. Especificidade por substratos

A classificação mais simples das glicosil hidrolases (GH) é com base nas suas especificidades por substrato. Tal classificação se baseia nas recomendações da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), sendo expressa em números para cada enzima. As hidrolases *O*-glicosídicas são expressas com o código EC 3.2.1.X, onde X representa a especificidade por substrato, e, em alguns casos, X representa também mecanismos moleculares ou clivagem de algum tipo de ligação, por exemplo, β -1,4 ou β -1,3. A vantagem deste sistema de classificação é a sua simplicidade, sendo extensamente aplicada, constituindo um padrão na classificação das GH. Contudo, o maior problema encontrado nesta classificação é o fato de que muitas enzimas possuem especificidade por uma ampla variedade de substratos. Este fato é comumente observado em GH que atuam sobre

polissacarídeos complexos encontrados na natureza (HENRISSAT & DAVIES, 1997). Neste trabalho, a especificidade das enzimas presentes no complexo CMCase de *P. sanguineus* por diferentes substratos solúveis e insolúveis foi avaliada e como resultados verificou-se justamente especificidades por vários substratos diferentes (Tabela 5).

Tabela 5 – Especificidade por substratos do complexo CMCase de *Pycnoporus sanguineus*.

Substrato	Atividade relativa (%)
CMC	100,0 ± 0,8
<i>Barley-β-glicano</i>	200,8 ± 4,6
Filtro de papel	n.d
<i>Xilana birchwood</i>	75,8 ± 0,6
<i>Locust bean gum</i>	51,6 ± 0,9
Celobiose	0,2 ± 0,0
pNP-β-D-Celobiosídeo	5,9 ± 0,4
pNP-β-D-Glicopiranosídeo	1,1 ± 0,0
pNP-β-D-Xilopiranosídeo	n.d

O valor de 100 % foi considerado para a atividade enzimática na ausência de íons. Os demais valores de atividade relativa foram calculados em função deste.

O complexo CMCase apresentou maiores atividades sobre o substrato *barley-β-glicano*, apresentando um aumento na atividade de quase 100 % quando comparado à atividade contra o substrato CMC (Tabela 5). O substrato *barley-β-glicano* é um polímero de glicose formado a partir de ligações β-1,3 e β-1,4 as quais ocorrem randômicamente no polímero. Resultados similares foram observados por WANG et al. (2013), ALMEIDA et al. (2013) e PARRY et al. (2002). Estes resultados indicam que as endoglicanses e/ou as celobiohidrolases presentes neste complexo podem clivar tanto ligações β-1,3 quanto β-1,4. Logo, é fato que a atividade do complexo CMCase não se limita apenas a substratos celulósicos.

Quando se trata de substrato insolúvel, como a celulose cristalina, presente no papel de filtro, nenhuma atividade foi detectada neste estudo. Esse resultado pode ser atribuído à dificuldade espacial encontrada por um complexo multienzimático em

acessar as cadeias de celulose em um arranjo mais rígido. De forma contrária, enzimas livres têm uma maior facilidade para hidrolisar papel de filtro (KARNCHANATAT et al., 2008; LIU et al., 2011).

As enzimas presentes no complexo CMCcase foram capazes de hidrolisar substratos hemicelulósicos como a xilana *birchwood*, uma glicuranoxilana, e o *locust bean gum*, uma galactomanana, de forma significativa. Já é difundido na literatura que algumas endoglicanases podem apresentar atividades de endoxilanase e que esta característica parece estar relacionada com determinadas famílias de GH (VINCKEN et al., 1997; KARNCHANATAT et al., 2008; LEE et al., 2010; WARNER et al., 2011). Endoglicanases das famílias GH5 e GH6 apresentaram atividades sobre galactomanas e xilanas (VLASENKO et al., 2010). Resultados similares também foram observados por ALMEIDA et al. (2013). Estes autores sugerem que esta atividade sobre galactomanas por endoglicanases pode estar atribuída a uma homologia estrutural entre as endoglicanases e as mananases de determinadas famílias e por uma relativa flexibilidade da estrutura do sítio ativo das enzimas (VLASENKO et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013). Além disso, nos estudos de caracterização do complexo CMCcase foi utilizado a fração G1 e nesta fração pode estar presente alguma xilanase não detectada no gel SDS PAGE 12%, assim, mesmo em quantidades mínimas, pode ter apresentado alta atividade sobre as hemiceluloses testadas.

A celobiose, um dissacarídeo de glicose (β -1,4), quando utilizada como substrato, induziu cerca de 0,2 % da atividade do complexo CMCcase comparada à obtida na hidrólise do CMC, indicando a baixa especificidade destas enzimas por este substrato. GUPTA et al. (2012) e LEE et al. (2010) não detectaram atividades de endoglicanases sobre celobiose em baixas concentrações. Além disso, o substrato sintético pNP- β -D-Xilopiranosídeo não foi hidrolisado pelo complexo CMCcase. Contudo, quando utilizou-se os substratos pNP- β -D-Glicopiranosídeo e pNP- β -D-Celobiosídeo, o complexo CMCcase apresentou 1,1 % e 5,9 % da atividade encontrada na presença de CMC, respectivamente, as quais podem ser atribuídas à celobiohidrolase (GH7) presente no complexo CMCcase. Celobiohidrolase de *Neocallimastix patriciarum* J11 também foi capaz de hidrolisar estes substratos (WANG et al., 2013).

3.6. Parâmetros cinéticos

A constante de Michaelis (K_M) e a velocidade máxima (V_{max}) do complexo CMCCase de *P. sanguineus* foram determinadas utilizando o CMC como substrato (Figura 7).

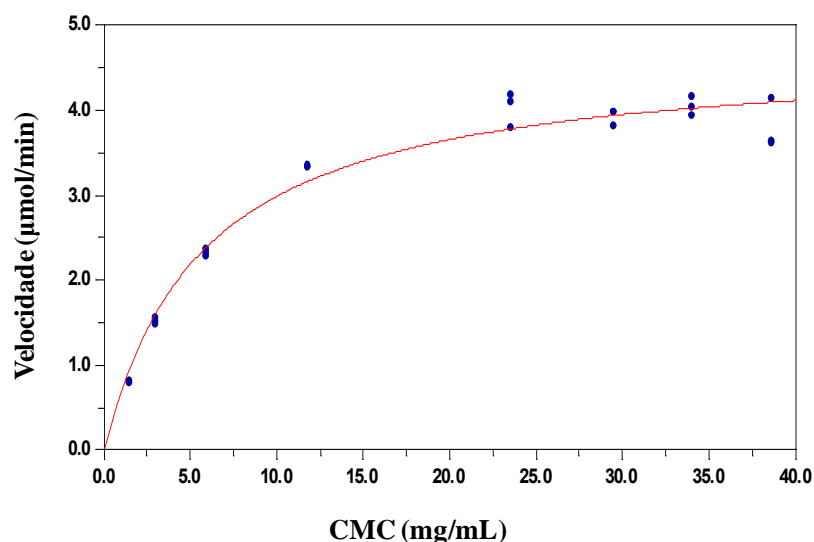


Figura 7 - Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise de carboximetilcelulose pelo complexo CMCCase de *Pycnoporus sanguineus*, a 70 °C e pH 5,0.

De acordo com o gráfico apresentado na Figura 8, observa-se que o complexo enzimático purificado segue a cinética de Michaelis-Menten. O complexo CMCCase apresentou um K_M de 5,72 mg/mL. Esta constante equivale à concentração do substrato na metade da velocidade máxima (V_{max}), parâmetro o qual foi calculado em 4,7 $\mu\text{mol}/\text{min}$. O K_M pode variar muito de acordo com a enzima e mesmo para substratos diferentes de uma mesma enzima. ALMEIDA et al. (2013), caracterizando cineticamente um complexo multienzimático de *Fusarium verticillioides*, composto por duas endoglicanases, uma celobiohidrolase e uma xilanase, utilizando o CMC como substrato, encontrou um K_M de 10,25 mg/mL, muito superior ao encontrado neste trabalho.

3.7. Hidrólise do CMC

Na tentativa de elucidar o modo de ação do complexo CMCCase de *P. sanguineus*, a hidrólise do CMC por este complexo foi realizada e os resultados

mostram uma mistura de glicose (G1), celobiose (G2), celotriose (G3), celotetraose (G4) e celopentaose (G5) sendo produzidos durante as 72 h de hidrólise (Figura 8).

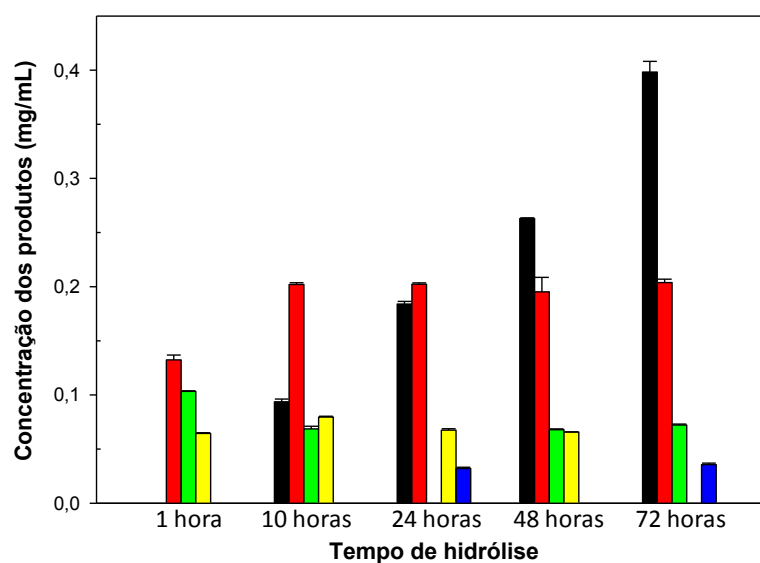


Figura 8 – Hidrólise de carboximetilcelulose pelo complexo CMCCase de *P. sanguineus* a 50 °C. (■) Glicose, (■) celobiose, (■) celotriose, (■) celotetraose e (■) celopentaose.

Na primeira hora da reação, a hidrólise do CMC pelas enzimas presentes no complexo CMCCase produziu apenas os oligossacarídeos G4, G3 e G2. Estes oligossacarídeos são normalmente os produtos gerados pela ação de endoglicanases e celobiohidrolases. Contudo, com o decorrer do tempo de hidrólise, verificou-se uma grande produção de G1. Este fato foi inesperado visto que o complexo CMCCase apresentou uma baixa especificidade pela celobiose (Tabela 5). Entretanto, resultados semelhantes foram encontrados na literatura em estudos com endoglicanases e a explicação para este fato é a clivagem de oligossacarídeos maiores em regiões mais externas produzindo uma mistura de celobiose e glicose (BIELY et al., 1991; KARNCHANATAT et al., 2008; WARNER et al., 2011). Esta clivagem mais assimétrica realizada por determinadas endoglicanases sugere uma preferência de ligação em extremidades redutoras pelos subsítios presentes nos sítios catalíticos das enzimas (WARNER et al, 2010; WARNER et al., 2011). É importante lembrar que neste estudo foi verificado que as endoglicanases estão complexadas à celobiohidrolase, o que explicaria esta ligação das endoglicanases apenas em regiões

mais externas da cadeia de CMC, já que somente assim todas as enzimas presentes no complexo poderiam atuar de forma mais eficiente.

Além disso, o fato de ter havido pouca formação de G5 reforça os indícios de uma ação em regiões mais próxima da extremidade da cadeia de CMC pelas endoglicanases. Contudo, pode ter ocorrido também pouco acúmulo de G5, ao invés de pouca formação e esta hipótese pode estar relacionada com a sua rápida hidrólise pelo complexo CMCCase, indicando uma alta eficiência deste complexo em hidrolisar este substrato.

Depois da glicose e da celobiose, os produtos mais formados pelo complexo CMCCase foram G3 e G4. Contudo, como estes produtos são também utilizados como substratos pelas enzimas, em determinados tempos (24 h e 72 h) houve uma total eliminação destes produtos no meio reacional.

4. CONCLUSÕES

Um complexo multienzimático, CMCCase, contendo duas endoglicanases, sendo uma GH10 (EG1) e outra com homologia parcial às proteínas Tls e ainda sem classificação (EG2); e duas celobiohidrolases, GH6 e GH7, foi purificado de *P. sanguineus* PF-2 e caracterizado cinético e bioquimicamente. A endoglicanase EG1 (GH10) possui massa molecular de 35,9 kDa. A endoglicanase EG2 e a celobiohidrolase (GH6) possuem massas moleculares de 42 kDa, já a celobiohidrolase (GH7) possui massa molecular de 52,7 kDa. O complexo CMCCase apresentou um K_M de 5,72 mg/mL e V_{max} foi calculado em 4,7 $\mu\text{mol}/\text{min}$. Foi verificado que os íons metálicos Fe^{3+} , Ag^{3+} , Hg^{2+} e Cu^{2+} apresentam grande efeito inibitório sobre a atividade enzimática deste complexo. Em relação aos reagentes testados, observou-se que o detergente SDS causou uma drástica redução na atividade do complexo CMCCase. Além disso, o furfural, o HMF e o ácido acético também causaram forte inibição na atividade. Verificou-se também que o complexo CMCCase possui especificidade não só por substratos celulósicos, mas também por substratos hemicelulósicos, apresentando também altas atividades sobre este substrato. Por fim, o complexo CMCCase foi aplicado na hidrólise do CMC a fim de se compreender melhor o mecanismo de ação deste complexo sobre este substrato. Durante a hidrólise, verificou-se uma grande formação de glicose e celobiose com o

decorrer do tempo, sugerindo uma clivagem assimétrica dos oligossacarídeos maiores produzidos pela clivagem do CMC, ou seja, o complexo CMCase cliva preferencialmente em regiões mais externas dos oligossacarídeos maiores.

O complexo CMCase foi bastante termoestável, com temperatura ótima de atividade a 70 °C, e apresentando meia-vida de 57,2 h a 50 °C. Além disso, apresentou altas atividades em uma ampla faixa de pH (3,5-5,5) e temperatura (50-75 °C), o que é uma característica interessante já que pode ser utilizado em diferentes aplicações. Para a incorporação de enzimas em processos de biotransformação industrial é necessário que as enzimas tenham uma alta eficiência hidrolítica e que sejam estáveis por longos períodos de tempos. Assim, o uso de celulasas na forma de complexo multienzimáticos é bastante vantajoso, visto que esta é uma estratégia utilizada pelo fungo justamente para aumentar a eficiência catalítica e a estabilidade das enzimas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, B.R.S., ZHOU, L., GRAVES, F.M., FREEDMAN, R.B., BLACK, G.W., GILBERT, H.J., et al. Cellulases and hemicellulases of the anaerobic fungus *Piromyces* constitute a multiprotein cellulose-binding complex and are encoded by multigene families. **FEMS Microbiology Letters**. 125: 15-22, 1995.

ALMEIDA, M.N, FALKOSKI, D.L., GUIMARÃES, V.M, RAMOS, H.J.O., VISSER, E.M., MAITAN-ALFENAS, G.P., de REZENDE, S.T. Characteristics of free endoglucanase and glycosylases multienzyme complex from *Fusarium verticillioides*. **Bioresource Technology**. 143: 413-422, 2013.

BADAL, C., SAHA. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. **Process Biochemistry**. 39: 1871–1876, 2004.

BEGUIN, P., AUBERT, J.P. The Biological Degradation of Cellulose. **Fems Microbiology Reviews**. 13, 25-58, 1994.

BIELY, P., VRSANSKA, M., CLAEYSSSENS, M. The endo-1,4- β -glucanase I from *Trichoderma reesei*. Action on β -1,4-oligomers and polymers derived from D-glucose and D-xylose. **Eur J Biochem**. 200:157–63, 1991.

BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**. 8: 93-99, 1987.

COHEN, R., SUZUKI, M.R., HAMMEL, K.E. Processive Endoglucanase Active in Crystalline Cellulose Hydrolysis by the Brown Rot Basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Applied And Environmental Microbiology*. 71 (5): 2412–2417, 2005.

CRUYS-BAGGER, N., ELMERDAHL, J., PRAESTGAARD, E., TATSUMI, H., SPODSBERG, N., BORCH, K., AND WESTH, P. Pre-steady-state kinetics for hydrolysis of insoluble cellulose by cellobiohydrolase Cel7A. **J. Biol. Chem.** 287: 18451–18458, 2012.

DALE, B.E., MOREIRA, M.J. A Freeze-Explosion Technique for Increasing Cellulose Hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**. 31-43, 1982.

EUGENIO, M.E., SANTOS, S.M., CARBAJO, J.M., MARTÍN, J.A., MARTÍN-SAMPEDRO, R., GONZÁLEZ, A.E., VILLAR, J.C. Kraft pulp biobleaching using an extracellular enzymatic fluid produced by *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**. 101: 1866–1870, 2010.

FALKOSKI, D.L., GUIMARÃES, V.M., ALMEIDA, M.N., ALFENAS, A.C., COLODETTE, J.L., de REZENDE, S.T. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 166: 1586-1603, 2012.

GEIB, S.M., TIEN, M., HOOVER, K. Identification of proteins involved in lignocellulose degradation using in gel zymogram analysis combined with mass spectroscopy-based peptide analysis of gut proteins from larval Asian longhorned beetles, *Anoplophora glabripennis*. **Insect Science**. 17: 253–264, 2010.

GONZALEZ-VOGEL, A., EYZAGUIRRE, J., OLEAS, G., CALLEGARI, E., NAVARRETE, M. Proteomic analysis in non-denaturing condition of the secretome reveals the presence of multienzyme complexes in *Penicillium purpurogenum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 89: 145-155, 2011.

GREEN A.A., HUGHES, W.L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solution of salts and organic solvents. In: Colowick, S.; Kaplan, N. **Methods in Enzymology Academic Press**, New York. 1: 67-90, 1955.

GRENIER, J., POTVIN, C., ASSELIN, A. Some Fungi Express β -1,3-Glucanases Similar to Thaumatin-like Proteins. **Mycologia**. 92: 841-848, 2000.

GUPTA, V., PRASANNA, R., CHAUDHARY, V., NAIN, L. Biochemical, structural and functional characterization of two novel antifungal endoglucanases from *Anabaena laxa*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 1: 338-347, 2012.

HAHN-HAGERDAL, B., GALBE, M., GORWA-GRAUSLUND, M.F., LIDEN, G., ZACCHI, G. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**. 24: 549-556, 2006.

HENRISSAT, B., DAVIEST, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**. 7:637-644, 1997.

HEYDA, J., POKORNA, J., VRBKA, L., VACHA, R., JAGODA-CWIKLIK, B., KONVALINKA, J., JUNGWIRTH, P., VONDRASEK, J., Ion specific effects of sodium and potassium on the catalytic activity of HIV-1 protease. **Phys. Chem. Chem. Phys.** 11: 7599-7604, 2009.

ILMÉN, M., SALOHEIMO, A., ONNELA, M. L., PENTTILÄ, M. E. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 1298–1306, 1997.

JEGANNATHAN, K.R., CHAN, E-S., RAVINDRA, P. Harnessing biofuels: A global Renaissance in energy production? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 13: 2163-2168, 2009.

JÖNSSON, L.J., ALRIKSSON, B., NILVEBRANT, N-O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**. 6:16, 2013.

KARBOUNE, S., GERAERT, P-A., KERMASHA, S. Characterization of selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *Penicillium funiculosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56: 903-909, 2008.

KARNCHANATAT, A., PETSOM, A., SANGVANICH, P., PIAPUKIEW, J., WHALLEY, A.J.S., REYNOLDS, C.D., GADD, G.M, SIHANONTH, P. A novel thermostable endoglucanase from the wooddecaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. **Enzyme and Microbial Technology**. 42: 404-413, 2008.

KIM, K.H., HONG, J. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**. 77, 139-144, 2001.

KUMARI, A., SINGH, V.K., FITTER, J., POLEN, T., KAYASTHA, A.M. α -amylase from germinating soyabean (*Glycine max*) seeds-purification, characterization and sequential similarity of conserved and catalytic aminoacid residues. **Phytochemistry**. 7: 1657-1666, 2010.

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

LEE, K-M., JEYA, M., JOO, A-R., SINGH, R., KIM, I-W., LEE, J-K. Purification and characterization of a thermostable endo-beta-1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. **Enzyme and Microbial Technology**. 46: 206-211, 2010.

LEE, H.J., MCAULEY, A., SCHILKE, K.F., MCGUIRE, J. Molecular origins of surfactant-mediated stabilization of protein drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 63: 1160-1171, 2011.

LINDENMUTH, B.E., MCDONALD, K.A. Production and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**. 77: 153-158, 2011.

LIU, D., ZHANG, R., YANG, X., XU, Y., TANG, Z., TIAN, W., SHEN, Q. Expression, purification and characterization of two thermostable endoglucanases cloned from a lignocellulosic decomposing fungi *Aspergillus fumigatus* Z5 isolated from compost. **Protein Expression and Purification**. 79: 176-186, 2011.

LI, X., YU, H.Y. Purification and characterization of an organic-solventtolerant cellulase from a halotolerant isolate, *Bacillus* sp. L1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 39: 1117-1124, 2012.

MAI, C., KUES, U., MILITZ, H. Biotechnology in the wood industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 63: 477-494, 2004.

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

MOMENI, M.H., PAYNE, C.M., HANSSON, H., MIKKELSEN, N.E., SVEDBERG, J., ENGSTRÖM, A., SANDGREN, M., BECKHAM, G.T., STÅHLBERG, J. Structural, Biochemical, and Computational Characterization of the Glycoside Hydrolase Family 7 Cellobiohydrolase of the Tree-killing Fungus *Heterobasidion irregulare*. **The Journal of Biological Chemistry**. 288 (8): 5861–5872, 2013.

MUKHOPADHYAY, A., HAZRA, P.P., SENGUPTA, T., SAHA, R., NANDI, R., SENGUPTA, S. Protein-protein interaction conferring stability to an extracellular acetyl (xylan) esterase produced by *Termitomyces clypeatus*. **Biotechnol Prog**. 19:720-726, 2003.

NARRA, M., DIXIT, G., DIVECHA, J., KUMAR, K., MADAMWAR, D., SHAH, A.R. Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 88: 150-161, 2014.

NOVOTNÝ, Č., CAJTHAML, T., SVOBODOVÁ, K., ŠUŠLA, M., ŠAŠEK, V. *Irpex lacteus*, a White-Rot Fungus with Biotechnological Potential — review. **Folia Microbiol**. 54 (5): 375–390, 2009.

OHTSUKI, T., SUYANTO, YAZAKI, S., UI, S., MIMURA, A. Production of large multienzyme complex by aerobic thermophilic fungus *Chaetomium* sp. nov. MS-017 grown on palm oil mill fibre. **Letters in Applied Microbiology**. 40: 111-116, 2005.

PARRY, N.J., BEEVER, D.E., OWEN, E., NERINCKX, W., CLAAEYSSSENS, M., BEEUMEN, J.V., BHAT, M.K. Biochemical characterization and mode of action of a thermostable endoglucanase purified from *Thermoascus aurantiacus*. **Arch Biochem Biophys**. 404: 243–53, 2002.

QUIROZ-CASTANEDA, R.E., PEREZ-MEIA, N., MARTINEZ-ANAYA, C., ACOSTA-URDAPILLETA, L., FOLCH-MALLOL, J. Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the Basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. **Biodegradation**. 1-8, 2011.

SAKAMOTO, Y., NAKADE, K., KONNO, N. Endo- β -1,3-Glucanase GLU1, from the Fruiting Body of *Lentinula edodes*, Belongs to a New Glycoside Hydrolase Family. **Applied and Environmental Microbiology**. 77 (23): 8350–8354, 2011.

SILVA, A.J.D., GÓMEZ-MENDOZA, D.P., JUNQUEIRA, M., DOMONT, G.B., XIMENES, E.F.F., de SOUSA, M.V., RICART, C.A.O. Blue native-PAGE analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multienzymatic complexes. **Proteomics**. 12: 2729-2738, 2012.

SHUYAN, L., XINYUAN, D., XUEMEI, L., PEIJI, G. A novel thermophilic endoglucanase from a mesophilic fungus *Fusarium oxysporum*. **Chinese Science Bulletin**. 51: 191-197, 2006.

SMITH, P.K., KROHN, R.I. HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, M.D., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, N.M., GOEKE, B.J., OLSON, D.C., KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**. 150: 76-85, 1985.

WAEONUKUL, R., KYU, K.L., SAKKA, K., RATANAKHANOKCHAI, K. Isolation and characterization of a multienzyme complex (cellulosome) of the *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 grown on Avicel under aerobic conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 107: 610-614, 2009.

WANG, Y., WANG, X., TANG, R., YU, S., ZHENG, B., FENG, Y. A novel thermostable cellulase from *Fervidobacterium nodosum*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 66: 294-301, 2010.

WANG, H-C., CHEN, Y-C., HUANG, C-T., HSEU, R-S. Cloning and characterization of a thermostable and pH-stable cellobiohydrolase from *Neocallimastix patriciarum* J11. **Protein Expression and Purification**. 90: 153–159, 2013.

WARNER, C.D., GO, R.M., GARCIA-SALINAS, C., FORD, C., REILLY, P.J. Kinetic characterization of a glycoside hydrolase family 44 xyloglucanase/endoglucanase from *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. **Enzyme and Microbial Technology**. 48: 27–32, 2011.

WARNER, C.D., HOY, J.A., SHILLING, T.C., LINNEN, M.J., GINDER, N.D., FORD, C.F., HONZATKO, R.B., REILLY, P.J. Tertiary structure and

characterization of a glycoside hydrolase family 44 endoglucanase from *Clostridium acetobutylicum*. **Appl Environ Microb.** 76:338–46, 2010.

VINCKEN, J-P., BELDMAN, G., VORAGEN, A.G.J. Substrate specificity of endoglucanases: what determines xyloglucanase activity? **Carbohydrate Research.** 298: 299-310, 1997.

VLASENKO, E., SCHÜLEIN, M., CHERRY, J., XU, F. Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. **Bioresource Technology.** 101: 2405-2411, 2010.

XU, C., QIN, Y., LI, Y., JI, Y., HUANG, J., SONG, H., XU, J. Factors influencing cellulosome activity in Consolidated Bioprocessing of cellulosic ethanol. **Bioresource Technology.** 101: 9560-9569, 2010.

ZHANG, Z., DONALDSON, A.A., MA, X. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. **Biotechnology Advance.** 30: 913-919, 2012.

ZHU, C., XU, Z., SONG, R. The endoglucanase from *Bacillus subtilis* BEC-1 bears halo-tolerant, acidophilic and dithiothreitol-stimulated enzyme activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** 27: 2863-2871, 2011.

CONCLUSÕES GERAIS

- O fungo basidiomiceto causador da podridão branca *Pycnoporus sanguineus* PF-2 possui um relevante potencial para a produção de hidrolases em fermentação submersa visando à aplicação em processos de sacarificação de biomassas lignocelulósicas para a produção de etanol;

- O perfil de secreção de celulases e xilanase pelo fungo *P. sanguineus* pode ser alterado variando-se algumas condições de cultivo, como a fonte de carbono e de nitrogênio;

- Os fatores concentração de forrageira, concentração de peptona, concentração de sulfato de zinco e o tempo de cultivo para a produção das atividades FPase, endoglicanase, celobiase e xilanase foram otimizados, obtendo-se aumentos nas atividades de 4,1, 3,2, 19,5 e 17,2 vezes, respectivamente;

- O extrato otimizado produzido por *P. sanguineus* mostrou características compatíveis com o processo de sacarificação de biomassas lignocelulósicas, contudo, maiores estudos ainda devem ser realizados visando maiores rendimentos de conversão;

- O extrato enzimático produzido por *P. sanguineus* em fermentação submersa (FS), e o extrato enzimático produzido por *C. cubensis* em fermentação em estado sólido (FES), foram misturados de forma não convencional, ou seja, durante a etapa da extração das enzimas na FES. O coquetel resultante (MT) apresentou um balanço enzimático satisfatório para a hidrólise do bagaço de cana pré-tratado com NaOH 1 % (m/v), proporcionado principalmente por efeitos sinérgicos positivos entre várias enzimas.

- O coquetel MT produzido mostrou-se promissor para aplicação em processos de sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com solução alcalina, já que altos rendimentos de hidrólise da glicana e xilana foram obtidos, utilizando tanto uma carga enzimática de 10 FPU/g (85 % e 95 %, respectivamente) quanto de 5 FPU/g (68 % e 85 %, respectivamente).

- Um complexo multienzimático, CMCase, contendo duas endoglicanases e duas celobiohidrolases, produzido por *P. sanguineus* PF-2 foi purificado e caracterizado cinético e bioquimicamente.

- A partir da hidrólise do CMC, verificou-se que o complexo CMCase cliva preferencialmente em regiões mais externas dos oligossacarídeos maiores, apresentando uma clivagem assimétrica.

- O complexo CMCase foi bastante termoestável, apresentando meia-vida de 57,2 h a 50 °C, além disso, foi estável em uma ampla faixa de pH (3,5-5,5) e temperatura (50-75 °C).

- A utilização de complexos multienzimáticos em processos de biotransformação industrial pode ser bastante vantajosa, visto que esta é uma estratégia utilizada pelo fungo justamente para aumentar a eficiência catalítica e a estabilidade das enzimas.