

**MARCELE PANDELÓ MARTINS**

**ADSORÇÃO E RECICLAGEM DE ENZIMAS DE *Chrysosporthe cubensis*  
DURANTE A SACARIFICAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM  
DIFERENTES CONTEÚDOS DE LIGNINA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-graduação em Bioquímica  
Aplicada, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2017

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

T

M386a  
2017  
Martins, Marcele Pandeló, 1990-  
Adsorção e reciclagem de enzimas de *Chrysosporthe cubensis* durante a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar com diferentes conteúdos de lignina / Marcele Pandeló Martins. – Viçosa, MG, 2017.  
vii, 82f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Valéria Monteze Guimarães.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.69-82.

1. Enzimas. 2. *Chrysosporthe cubensis*. 3. Adsorção.  
4. Lignina. 5. Bagaço de cana. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22 ed. 572.7

MARCELE PANDELÓ MARTINS

**ADSORÇÃO E RECICLAGEM DE ENZIMAS DE *Chrysosporthe cubensis*  
DURANTE A SACARIFICAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM  
DIFERENTES CONTEÚDOS DE LIGNINA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-graduação em Bioquímica  
Aplicada, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

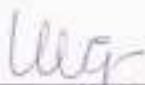
APROVADA: 21 de julho de 2017.



Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas



Monique Renon Eller



Valéria Monteze Guimarães  
(Orientadora)

Dedico este trabalho

A Deus

Aos meus pais

Aos meus irmãos

À toda minha família

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por me ajudar e me permitir chegar até aqui.

À minha mãe, Valéria, por me apoiar sempre, independente das adversidades, pelos conselhos, orações, aprendizagem, paciência, e seu maravilhoso colo que sempre esteve aberto a me receber.

Ao meu pai, Marcelino, pelo apoio, incentivo, pela empolgação em todas as novas etapas da minha vida, e por ser força nos momentos que mais precisei.

Aos meus irmãos, Matheus e Tayná pela paciência, pelo carinho e por fazer dos meus dias mais alegres.

À toda minha família por sempre me apoiar e incentivar na busca por esse sonho.

Ao Rafa, pela paciência, companheirismo, compreensão nos momentos mais difíceis e pela fundamental ajuda nesta etapa final.

Aos amigos, em especial à Jéssica, Raquel e Mari por sempre estarem presentes e me incentivarem na busca desse sonho.

Em especial, à minha professora e orientadora, Valéria Monteze Guimarães, pelos ensinamentos passados, paciência, conselhos, amizade, pelo carinho e por sempre me incentivar, mesmo nos momentos que estive desanimada.

A todos os colegas do laboratório Laboratório de Análises Bioquímicas, em especial à Amanda, Mari, Elisa, Rafa Ventorim, Bella, Rafa Ladeira, Thiago, Túlio, Murillo, Roberta, Camila e Lílian, pela paciência, pelos ensinamentos e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Às professoras Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas e Monique Renon Eller, por se disponibilizarem a me auxiliar nas correções deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo suporte técnico concedido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, o meu muito obrigada a todos aqueles que não citei, mas que, de alguma forma, contribuíram para que eu pudesse alcançar meu objetivo.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo geral .....	3
2.2. Objetivos específicos .....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3.1. Biomassa lignocelulósica e seu potencial para produção de biocombustíveis ..	4
3.2. Produção de etanol de segunda geração pela via enzimática.....	6
3.3. Perdas de atividade enzimática durante a sacarificação .....	8
3.4. Adsorção de enzimas na lignina e CBD (domínio de ligação a celulose) .....	8
3.5. Reciclagem enzimática .....	12
3.6. Estratégias de recuperação de atividades enzimáticas .....	13
3.7. <i>Chrysosporthe cubensis</i> .....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
4.1. Origem dos reagentes e bagaço.....	19
4.2. Microrganismo e cultivo .....	19
4.3. Multiplicação e manutenção da cultura do fungo <i>Chrysosporthe cubensis</i> .....	20
4.4. Produção de extrato enzimático .....	20
4.5. Determinação das atividades enzimáticas.....	20
4.6. Determinação de proteínas.....	22
4.7. Pré-tratamento da biomassa .....	23
4.8. Análise da composição dos bagaços de cana-de-açúcar .....	23
4.9. Avaliação do perfil de adsorção de proteínas e enzimas nos bagaços pré-tratados alcalino e ácido em condições não hidrolíticas pelo uso da isoterma de adsorção do tipo Langmuir .....	24
4.10. Avaliação do perfil de adsorção de proteínas e enzimas nos bagaços pré-tratados alcalino e ácido durante a hidrólise da biomassa .....	25
4.11. Análise da termoestabilidade das enzimas de <i>C. cubensis</i> .....	25
4.12. Reciclagem enzimática .....	25
4.13. Análise dos açúcares liberados pela hidrólise dos bagaços de cana pré-tratados alcalino e ácido .....	27

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
5.1. Produção de enzimas hidrolíticas de <i>Chrysophorthe cubensis</i> .....	28
5.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar .....	29
5.3. Isoterma de adsorção .....	31
5.3.1. Distribuição de enzimas do extrato de <i>C. cubensis</i> nos bagaços de cana pré-tratados.....	34
5.4. Perfil de adsorção de enzimas e proteínas durante a hidrólise dos bagaços de cana pré-tratados .....	39
5.4.1. Proteínas adsorvidas durante a hidrólise dos bagaços de cana.....	39
5.4.2. Análise da termoestabilidade das enzimas de <i>C. cubensis</i> .....	41
5.4.3. Análise do perfil de adsorção das enzimas de <i>C. cubensis</i> em condições hidrolíticas.....	43
5.5. Reciclagem enzimática .....	46
5.5.1. Hidrólise das biomassas .....	46
5.5.2. Perfil de proteínas adsorvidas.....	51
5.5.3. Perfil de enzimas adsorvidas .....	54
6. DISCUSSÃO GERAL .....	62
7. CONCLUSÃO .....	67
8. PERSPECTIVAS .....	68
9. REFERÊNCIAS.....	69

## RESUMO

MARTINS, Marcele Pandeló, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Reciclagem de enzimas de *Chrysosporthe cubensis* durante a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar com diferentes conteúdos de lignina.** Orientadora: Valéria Monteze Guimarães.

A eficiência da hidrólise da biomassa lignocelulósica apresenta algumas limitações, dentre elas a possível adsorção inespecífica das enzimas à lignina. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o perfil de adsorção de proteínas e enzimas do fungo fitopatogênico *Chrysosporthe cubensis* em bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados e com diferentes conteúdos de lignina e avaliar a eficiência da recuperação destas enzimas e proteínas utilizando metodologias de reciclagem enzimática. De modo a obter o extrato enzimático, o fungo foi cultivado sob fermentação em estado semi-sólido com farelo de trigo. Os bagaços de cana foram pré-tratados com NaOH (BAL) e com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (BAC), de modo a conter 8,1% e 33,8% de lignina, respectivamente. A isoterma de Langmuir obtida pelo experimento em condições não hidrolíticas, revelou os parâmetros P<sub>max</sub> e K<sub>p</sub> superiores para BAC, e K superior para BAL. Ao final da hidrólise, BAC foi capaz de adsorver maiores quantidades de proteínas, comparado ao substrato BAL. As enzimas celobiohidrolase e xilanase sofreram maiores adsorções em BAC, e de modo contrário, a endoglucanase adsorveu majoritariamente em BAL. A β-glicosidase foi a enzima que menos adsorveu em ambos os substratos. Esses resultados demonstraram o efeito da lignina presente em biomassas complexas ao promover uma maior adsorção de proteínas e de algumas enzimas do extrato enzimático de *C. cubensis*. Dentre os experimentos de reciclagem enzimática, todos demonstraram ser eficientes na recuperação de proteínas e enzimas adsorvidas na biomassa. A reciclagem com adição de substratos e enzimas frescas foi capaz de promover a maior eficiência de hidrólise da biomassa. Entretanto, para BAC, com elevado conteúdo de lignina, as reciclagens de enzimas e proteínas não demonstraram ser tão eficazes, bem como a hidrólise de açúcares. Desse modo, conclui-se que a lignina presente em altas concentrações nos substratos, além de promover maiores adsorções de proteínas e enzimas, também interfere nos métodos de reciclagem. Também foi comprovada a alta eficiência de reciclagem das enzimas de *C. cubensis*, mesmo no substrato contendo alta concentração de lignina, além da alta termoestabilidade dessas enzimas, mesmo após 216 h de hidrólise. Desse modo, é confirmado o grande potencial hidrolítico do extrato enzimático obtido desse fungo.

## ABSTRACT

MARTINS, Marcele Pandeló, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Recycling of *Chrysosporthe cubensis* enzymes during sugarcane bagasse saccharification with different lignin contents.** Adviser: Valéria Monteze Guimarães.

The efficiency of biomass hydrolysis by enzymes has some limitations, such as the possible non-specific adsorptions of enzymes in lignin. The aims of this work were to evaluate the adsorption profile of proteins and enzymes from the phytopathogenic fungus *Chrysosporthe cubensis* in pretreated sugarcane bagasses with different lignin contents and to evaluate the efficiency of recuperation of this enzymes and proteins using enzymatic recycling methodologies. In order to obtain the enzymatic extract, the fungus was cultivated under semi-solid state fermentation with wheat bran. The sugarcane bagasses were pretreated with NaOH (BAL) and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (BAC), in order to obtain 8.1% and 33.8% of lignin, respectively. The Langmuir isotherm obtained by the experiment under non-hydrolytic conditions showed the highest P<sub>max</sub> and K<sub>p</sub> parameters for BAC, while K was higher for BAL. At the end of hydrolysis, BAC was able to adsorb greater amounts of proteins compared to BAL. The enzymes cellobiohydrolase and xylanase showed higher adsorption on BAC, and endoglucanase adsorbed mostly on BAL. β-glycosidase was the enzyme that suffered less adsorption on both substrates. These results demonstrate the negative effect of the lignin present in complex biomasses which promotes greater adsorption of proteins and some enzymes of the *C. cubensis* enzymatic extract. Among the enzymatic recycling experiments, all of them were efficient in the recovery of proteins and enzymes adsorbed in biomass. The recycling with the addition of fresh substrates and enzymes was able to promote higher biomass hydrolysis yields. However, for BAC, with high lignin content, the enzymes and proteins recycling did not show to be effective, as well as the sugars hydrolysis. Thus, it is concluded that high concentrations of lignin in the substrates, besides promoting greater adsorption of proteins and enzymes, also interferes in recycling methods. The results also demonstrated the high recycling efficiency of *C. cubensis* enzymes, even in the substrate containing high lignin concentration, besides the high thermostability of these enzymes, even after 216 h of hydrolysis. Thus, the great hydrolytic potential of enzymatic extract obtained from this fungus is confirmed.

# 1. INTRODUÇÃO

Os recursos petrolíferos limitados e os efeitos devastadores das mudanças climáticas a partir da queima de combustíveis fósseis tornam necessária a viabilização de fontes alternativas de energia sustentáveis (EDENHOFER, 2011). Existem muitas alternativas de fontes potencialmente sustentáveis de energia, no entanto há poucas opções para a substituição de combustíveis fósseis líquidos. Uma dessas possibilidades é a produção de combustíveis a partir de biomassa lignocelulósica (WEISS *et al.*, 2013), principalmente provenientes de resíduos agroindustriais, que podem ser palha de arroz, palha de trigo, palha de milho, bagaço de cana-de-açúcar, dentre outras (KIM; DALE, 2004).

A biomassa lignocelulósica representa um enorme potencial para produção de biocombustíveis devido à sua grande disponibilidade e ao seu baixo custo. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo que uma tonelada de cana gera 260 kg de bagaço. Aproximadamente 50% desse resíduo é usado em destilarias como fonte de energia e o restante é estocado (UNICA, 2013). Devido à disponibilidade de bagaço gerado como resíduo industrial, este se torna altamente interessante para produção de biocombustíveis e de outros produtos com alto valor agregado (MAITAN-ALFENAS; VISSER; GUIMARÃES, 2015).

A produção de etanol de segunda geração apresenta várias vantagens, tais como aproveitamento da cana-de-açúcar e seus subprodutos, aumento da produção de etanol em até 50% sem ampliação da área de cultivo, e permite a produção do biocombustível mesmo durante a entressafra da cana e redução da emissão de carbono durante a produção, gerando um combustível mais limpo. De modo geral, o processo de produção de etanol de segunda geração é mais compatível com o meio ambiente, pois aproveita melhor a planta, resultando em maior eficiência do processo (“Início | Raízen”).

Entretanto, o processo de produção desse biocombustível pela rota enzimática tem como principais gargalos a eficiência das enzimas utilizadas para a sacarificação da biomassa e o custo dessas enzimas, que representa uma parte significativa no preço final do processo (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). Durante a etapa de sacarificação da biomassa, as enzimas ainda podem ficar aderidas ao material lignocelulósico, o que diminui a eficiência do processo e aumenta ainda mais os custos.

Estas interações entre enzimas e o material lignocelulósico podem ser de forma não específica (interações com a lignina) e específica (interações entre sítio ativo da enzima e o substrato) (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

Como possibilidade de diminuição dos custos da etapa de sacarificação da biomassa, diferentes alternativas têm sido testadas, dentre elas, a reciclagem enzimática. A reciclagem enzimática visa à recuperação das atividades das enzimas que adsorvem na biomassa lignocelulósica durante a etapa de sacarificação (HAVEN *et al.*, 2015). O melhor entendimento das possíveis interações entre enzimas e biomassa poderá promover uma maior percepção sobre a processividade das enzimas, além de possibilitar o uso da tecnologia de reciclagem enzimática para recuperação das mesmas.

O fungo *Chrysosporthe cubensis* é um fungo fitopatogênico que infecta principalmente culturas de *Eucaliptus* (ALFENAS *et al.*, 2009). Este microrganismo, quando cultivado em meio adequado, é capaz de secretar um arsenal de enzimas lignocelulolíticas. Trabalhos na literatura relatam o elevado potencial biotecnológico do extrato enzimático de *C. cubensis* na sacarificação da biomassa lignocelulolósica. Este apresenta melhores rendimentos de hidrólise se comparados até mesmo a coquetéis enzimáticos comerciais, como o Multifect® CL, Multifect® XL e Accellerase®1500 (FALKOSKI *et al.*, 2013a; MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015).

Desse modo, este projeto visa compreender a possível ocorrência de adsorções não produtivas das enzimas secretadas pelo fungo *Chrysosporthe cubensis* no bagaço de cana-de-açúcar, e estabelecer as melhores condições para reciclagem dessas enzimas durante a etapa de sacarificação.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo geral desse trabalho foi compreender o processo de adsorção das enzimas secretadas pelo fungo *Chrysosporthe cubensis* em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, contendo diferentes conteúdos de lignina, visando aumentar a eficiência da etapa de sacarificação para produção de bioetanol utilizando a reciclagem enzimática.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Produzir o extrato enzimático secretado por *C. cubensis* cultivado em meio semi-sólido com farelo de trigo;
- Realizar os pré-tratamentos ácido e alcalino do bagaço de cana-de-açúcar e determinar sua composição antes e após os pré-tratamentos;
- Avaliar o perfil de adsorção de proteínas e enzimas de *C. cubensis* nos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados alcalino e ácido (BAL e BAC, respectivamente), em condições não hidrolíticas (isoterma de Langmuir) e hidrolíticas;
- Avaliar a capacidade de reciclagem das enzimas de *C. cubensis* durante a sacarificação dos bagaços de cana pré-tratados (BAL e BAC);
- Avaliar a eficiência de sacarificação dos bagaços de cana-de-açúcar (BAL e BAC), pela quantificação de glicose e xilose liberadas em cada ciclo de reciclagem das enzimas.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Biomassa lignocelulósica e seu potencial para produção de biocombustíveis

A biomassa lignocelulósica é constituída principalmente de quatro componentes básicos: celulose (35–45%), a fibra mais abundante no reino vegetal, hemicelulose (20–30%), lignina (10 – 30%) e em menor quantidade, a pectina (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). A composição da parede celular, assim como sua estrutura geométrica, variam de espécie para espécie (GIBSON *et al.*, 2011), de acordo com a idade e as condições de crescimento da planta (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). A parede celular é caracterizada como uma barreira físico-química natural por atuar na proteção a agentes externos e no impedimento da lise osmótica quando em meio hipotônico. Esses polímeros são a fonte mais abundante de carbono orgânico na terra, o que lhes garante, potencial de matéria-prima renovável para a produção de biocombustíveis (GRUNINGER *et al.*, 2014).

A celulose se caracteriza por ser um polissacarídeo semi-cristalino, presente na natureza sob a forma de fibras com vários milímetros de comprimento (KLEMM *et al.*, 2011). É composta por unidades de  $\beta$ -D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ (1-4) apresentado fórmula  $(C_6H_{10}O_5)_n$  (LIU, 2014). As cadeias de celulose podem agregar em conjunto sob a forma de fibrilas elementares, cada uma com cerca de 3 nm de diâmetro, formando alternativamente domínios cristalinos e amorfos (BOUFI *et al.*, 2016).

As hemiceluloses são formadas por polissacarídeos ramificados e lineares de baixo peso molecular, ligados através de ligações de hidrogênio. Juntos formam uma robusta rede de microfibrilas, atuando como agente de ligação entre a celulose e a lignina nas paredes das plantas (LE FLOCH; JOURDES; TEISSEDRE, 2015). Esses polissacarídeos são constituídos de pentoses e hexoses tais como xilose, arabinose, manose, glicose e galactose, bem como açúcares ácidos. A composição geral da hemicelulose é de natureza variável, dependendo da origem da planta. Contudo, na maioria dos casos, o componente mais abundante de hemicelulose é a xilose (KRICKA; FITZPATRICK; BOND, 2014).

A lignina é o componente estrutural e defensivo das paredes celulares vegetais e o segundo biopolímero mais abundante na Terra (DAVIN *et al.*, 2008). A lignina permite que as plantas desenvolvam estruturas rígidas de modo a fornecer proteção contra a hidrólise da celulose e da hemicelulose. É um polímero altamente reticulado formado pela polimerização de monômeros de 4-hidroxifenilpropanoides (monolignóis) por meio de várias ligações éter e de carbono-carbono. As frações fenólicas das unidades monoméricas são constituídas de siringil, p-hidroxifenil e guaiacil, sendo a quantidade de cada um dependente da espécie de planta e de tecido (DE GONZALO *et al.*, 2016).

Devido à acelerada quantidade de carbono emitida no mundo e às mudanças climáticas observadas, se torna inevitável a busca por combustíveis alternativos que possam substituir os derivados de petróleo (SCHNEIDER *et al.*, 2016). Estas preocupações mudaram os esforços globais de modo a utilizar recursos renováveis a fim de produzir uma energia "mais verde" e que também possa atender à alta demanda por combustíveis do mundo (MAKI; LEUNG; QIN, 2009).

A produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica vem recebendo grande destaque devido à sua utilização na produção de energia renovável e não poluente. Isso ocorre porque a biomassa é abundante, barata e a produção da mesma torna o processo ambientalmente sustentável (SCHNEIDER *et al.*, 2016). A biomassa lignocelulósica pode ser encontrada na natureza, ou derivados de resíduos de alimentos e resíduos agroindustriais (MAITAN-ALFENAS; VISSER; GUIMARÃES, 2015), sendo portanto, uma alternativa em potencial para substituir parcialmente os combustíveis fósseis.

No Brasil, maior produtor de cana no mundo, a cada uma tonelada de cana-de-açúcar são gerados 260 kg de bagaço (LIMA *et al.*, 2014). Dada a grande quantidade dessa biomassa produzida como lixo industrial, esta apresenta elevado potencial para ser utilizada na produção de biocombustíveis e produtos químicos que possibilitem vantagens econômicas, ambientais e sociais (MAITAN-ALFENAS; VISSER; GUIMARÃES, 2015).

### 3.2. Produção de etanol de segunda geração pela via enzimática

O processo de produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica se caracteriza por quatro etapas básicas: o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, a hidrólise enzimática (sacarificação), a fermentação e a destilação (LINDEDAM *et al.*, 2013).

A estrutura da parede celular vegetal, composta de microfibrilas de celulose embebidas em hemicelulose e lignina torna essa estrutura rígida e impossibilita o ataque de enzimas hidrolíticas. Desse modo, é preciso utilizar metodologias que permitam a acessibilidade de celulasas e hemicelulasas aos polissacarídeos da parede. A etapa de pré-tratamento tem por finalidade aumentar a porosidade do material, alterar a cristalinidade da parede celular, remover a lignina e quebrar as ligações entre celulose e hemicelulose com lignina (KOPPRAM *et al.*, 2014), de modo a permitir a ação das enzimas na etapa posterior. A etapa de hidrólise enzimática visa hidrolisar a celulose e hemicelulose presentes na biomassa, de modo a obter açúcares monoméricos, que são então fermentados por microrganismos na terceira etapa, para obtenção do etanol de segunda geração (MAITAN-ALFENAS; VISSER; GUIMARÃES, 2015).

A hidrólise da biomassa, segunda etapa do processo de produção de bioetanol, pode ser realizada tanto por métodos químicos quanto por métodos enzimáticos. O método enzimático é vantajoso por apresentar alta especificidade e não gerar subprodutos tóxicos, como observado nos métodos químicos, além dos métodos químicos utilizarem altas temperaturas e altas concentrações de ácido, o que torna o processo economicamente inviável (EL-ZAWAWY *et al.*, 2011). Devido ao reconhecimento desta tendência, observa-se um aumento na utilização de enzimas em processos industriais.

Devido à natureza altamente complexa da biomassa lignocelulósica, são necessárias um conjunto de enzimas para a sua eficiente hidrólise (MAITAN-ALFENAS; VISSER; GUIMARÃES, 2015). Três grupos gerais de enzimas são consideradas fundamentais para a completa hidrólise da biomassa vegetal, tais incluem as celulasas, hemicelulasas e as enzimas acessórias, que integram as desramificadoras de hemicelulose, esterases de ácido fenólico e enzimas modificadoras de lignina. As principais enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose são as endoglucanases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (EC 3.2.1.176), exoglicohidrolases (EC 3.2.1.74) e as  $\beta$ -

glicosidasas (EC 3.2.1.21) (MAITAN-ALFENAS; VISSER; GUIMARÃES, 2015). As endoglucanases atuam randomicamente ao catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 nas cadeias de celulose, produzindo assim, cadeias com extremidades livres. As celobiohidrolases e exoglicohidrolases atuam hidrolisando as cadeias de celulose com extremidades livres, liberando celobiose e glicose, respectivamente. Por fim, as  $\beta$ -glicosidasas hidrolisam celobiose em glicose (GLASS *et al.*, 2013).

Como a hemicelulose é um polímero altamente complexo, necessita de várias enzimas para sua completa degradação. A hidrólise enzimática completa da xilana, o polímero principal encontrado nas hemiceluloses, requer a ação da endo- $\beta$ -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8), que atua de forma aleatória sobre as ligações internas da xilana, liberando xilo-oligossacarídeos. Estes então são hidrolisados pela  $\beta$ -xilosidase (EC 3.2.1.37), gerando xilose ao fim da hidrólise. A hidrólise das diversas ramificações existentes na xilana necessita de várias outras enzimas hidrolíticas, incluindo  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55),  $\alpha$ -glucuronidase (EC 3.2.1.139),  $\alpha$ -galactosidase (EC 3.2.1.22), acetilxilana esterase (EC 3.1.1.72) e esterase de ácido ferúlico (EC 3.1.1.73) (GLASS *et al.*, 2013).

Em 2010 foi definida a família das enzimas auxiliares (AAs) (VAAJE-KOLSTAD, 2010). As enzimas auxiliares responsáveis pelas modificações na lignina abrangem uma diversidade de oxidases e peroxidases, das quais incluem as ligninas peroxidases (Lip), manganês peroxidases (MnP), peroxidases versáteis (VP), lacases e peroxidases de descoloração de corantes (DyP). Estas enzimas promovem a formação de radicais livres altamente reativos e não específicos (radicais arila e fenóxi), sendo capazes de promover reações degradativas na lignina (ABDEL-HAMID; SOLBIATI; CANN, 2013). Além das enzimas citadas, destacam-se também as LPMOs (do inglês, lytic polysaccharide monooxygenases), que catalisam a clivagem oxidativa de ligações glicosídicas na superfície da celulose, de modo a aumentar a acessibilidade do substrato para as enzimas hidrolíticas (VU; MARLETTA, 2016).

Como o bagaço de cana-de-açúcar, biomassa rica em polissacarídeos, é um resíduo industrial produzido em grande quantidade no Brasil, apresenta baixo custo e grande disponibilidade. Desse modo, esse resíduo demonstra grande apelo para ser utilizado na produção de bioetanol, principalmente devido às preocupações atuais de geração de energia limpa e renovável.

### **3.3. Perdas de atividade enzimática durante a sacarificação**

A hidrólise da biomassa por enzimas, também chamada de sacarificação, não é eficiente na sua totalidade. Durante essa etapa ocorrem algumas limitações do processo que diminuem a *performance* enzimática (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). Tais limitações ocorrem devido a perdas de atividades enzimáticas, devido a fatores como: inibição pelos produtos glicose e celobiose, como nas  $\beta$ -glicosidases e celobiohidrolases, respectivamente; ligação improdutiva das celobiohidrolases nas cadeias de celulose; desnaturação ou perda de atividade enzimática devido ao agito mecânico, atividade proteolítica ou baixa estabilidade térmica; associações entre hemiceluloses e lignina que impedem o acesso das celulases à superfície de celulose; e adsorção das enzimas (celulases e hemicelulases) de forma inespecífica na lignina (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

A presença da lignina é um dos maiores obstáculos na etapa de hidrólise enzimática. Cerca de 60 a 70% das enzimas podem ficar aderidas neste polímero ao final da hidrólise. A presença da lignina é responsável por fazer uma aderência física com as enzimas, fazendo com que estas fiquem associadas de forma não processiva na biomassa lignocelulósica residual, impedindo-as de expor seu sítio ativo, perdendo então sua atividade de hidrólise do substrato (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

### **3.4. Adsorção de enzimas na lignina e CBD (domínio de ligação a celulose)**

O fator que determina a presença das enzimas na fração sólida residual da biomassa durante a sacarificação é o domínio CBD (domínio de ligação a celulose), que é uma parte da ampla classe de domínios de ligação a carboidratos (CBMs) (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). Estes domínios apresentam sequências de aminoácidos específicas (entre 30 e 200 aminoácidos) e estão presentes em muitas enzimas que hidrolisam carboidratos e que possuem uma atividade de ligação a carboidrato (GOMES *et al.*, 2015). Os CBMs são particularmente comuns em celulases e apresentam um papel fundamental no que diz respeito à afinidade e especificidade dessas enzimas para com o substrato. Este permite a interação das enzimas com os

carboidratos e a subsequente hidrólise dos mesmos (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999; SAINI *et al.*, 2016). Esses módulos não catalíticos podem apresentar-se ligados ao C-terminal ou ao N-terminal da estrutura proteica e facilitam a adsorção a carboidratos específicos (GOMES *et al.*, 2015). De acordo com Arantes e Saddler (2010), a ação dos CBMs sobre celulose pode ocorrer aumentando a concentração de celulase na superfície da celulose, promovendo a seletividade ao substrato e a subsequente ruptura do substrato cristalino.

Para o caso específico de CBDs, estes permitem uma adsorção eficiente de celulases à celulose e sua hidrólise de forma processiva. Após a clivagem de uma ligação glicosídica, a celulase não se separa da celulose, apenas seu domínio catalítico (GOMES *et al.*, 2015). A remoção do domínio CBD diminui a eficiência hidrolítica das enzimas na celulose cristalina, mas não na celulose amorfa (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999). Já a adição de CBD a uma enzima que anteriormente não possuía este domínio aumenta sua atividade e a interação sinérgica com outras enzimas (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999). Entretanto, foi relatado que a presença de domínios CBMs também está relacionada com as interações não específicas das enzimas com a lignina (GOMES *et al.*, 2015; JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; JØRGENSEN; PINELO, 2016).

Durante a sacarificação ocorrem interações inespecíficas entre enzima e lignina de modo a promover a adsorção de ambas. As interações hidrofóbicas são a principal causa da ligação não produtiva das enzimas neste polímero (SAINI *et al.*, 2016). A presença do domínio CBM contribui diretamente para essas interações, pois assim como a lignina, esses domínios apresentam alta característica hidrofóbica (JØRGENSEN; PINELO, 2016). Desse modo, podem ocorrer interações não específicas hidrofóbicas entre as enzimas com domínio CBM e a lignina (HATAKEYAMA; HATAKEYAMA, 1998).

A característica dos aminoácidos presentes em um domínio é responsável pelo seu grau de hidrofobicidade (YEMSHANOV; MCKENNEY, 2008). Alguns aminoácidos específicos presentes em domínios CBMs, como tirosina e triptofano, são capazes promover a adsorção de celulases na celulose, bem como na lignina. O triptofano, com seu anel indol, é capaz de aumentar ainda mais a hidrofobicidade do domínio (BÖRJESSON *et al.*, 2007) e assim, facilitar a ocorrência de interações

hidrofóbicas entre enzimas e polímeros. No entanto, celulasas sem o domínio CBD também apresentam afinidade pela lignina, sugerindo a presença de sítios de ligação a lignina nos domínios catalíticos (BERLIN *et al.*, 2006).

Para uma determinada celulase, diversas afinidades podem ser encontradas para diferentes substratos. Para o extrato de *T. reesei*, com exceção da Cel12A, a maioria das endoglucanases e celobihidrolases apresentam o domínio CBD (VIIKARI *et al.*, 2007). Na literatura é descrito que a maioria das celulasas apresentam o domínio CBD e, portanto, realizam adsorções não específicas com a lignina (JØRGENSEN; PINELO, 2016; YARBROUGH *et al.*, 2015). Entretanto, vários estudos sugerem que as  $\beta$ -glicosidades não apresentam esse domínio, estando portanto, livres em solução (HAVEN; JØRGENSEN, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2015). Algumas LPMOs apresentam domínio CBM, mas informações sobre essas enzimas e sua possível adsorção na lignina são limitadas (JØRGENSEN; PINELO, 2016). Em relação às xilanases, observa-se algumas divergências quanto à presença ou não do domínio CBM. Entretanto, xilanases com domínio CBM são esperadas de sofrerem adsorção na lignina (PRIBOWO; ARANTES; SADDLER, 2012; SAMMOND *et al.*, 2014).

Além das características hidrofóbicas dos domínios das enzimas, a hidrofobicidade do próprio substrato lignocelulósico afeta a adsorção de enzimas na lignina e na celulose. Já foi relatado que a lignina apresenta maior característica hidrofóbica do que a celulose devido ao seu maior ângulo de contato (HODGSON; BERG, 1988). Consequentemente, em substratos com maior conteúdo de lignina, a hidrofobicidade da biomassa lignocelulósica é aumentada como um todo (SAINI *et al.*, 2016), facilitando as interações hidrofóbicas com enzimas.

Além do maior conteúdo de lignina nas biomassas facilitar a adsorção de enzimas, a composição desta também interfere de modo significativo na adsorção enzimática. Ligninas com maior conteúdo guaiacil são capazes de adsorver mais enzimas do que ligninas com menor conteúdo do mesmo (KO *et al.*, 2015).

O pré-tratamento de biomassa e o isolamento de lignina podem modificar sua estrutura de diferentes modos, afetando assim as interações lignina-enzima (LI; ZHENG, 2017). Uma vez que a estrutura da lignina afeta as interações com as celulasas e xilanases, a modificação desta pode ser uma estratégia promissora para reduzir a adsorção de enzimas na etapa de hidrólise enzimática (KO *et al.*, 2015). Foi observado

que entre diferentes tipos de espécies lenhosas, a lignina de madeira macia tende a ter efeito mais inibitório sobre as enzimas hidrolíticas em comparação com a lignina de madeira dura, por apresentar maior afinidade e capacidade de adsorção das enzimas (ERIKSSON; BÖRJESSON; TJERNELD, 2002; KO *et al.*, 2015). Isso ocorre pois a madeira macia possui um maior teor de unidade guaiacil (KO *et al.*, 2015), uma hidrofobicidade superficial mais alta (LAI *et al.*, 2014) e menores cargas superficiais negativas, que neste caso reduzem a repulsão elétrica entre a lignina e enzimas e facilitam seu contato (LI; ZHENG, 2017).

Além das interações hidrofóbicas, outras interações também podem estar envolvidas na adsorção de enzimas na lignina, como as ligações de hidrogênio (SAINI *et al.*, 2016). Alguns estudos indicam o envolvimento de grupos hidroxila fenólicos na adsorção de celulasas à lignina por ligações de hidrogênio (PAN, 2008; SEWALT; GLASSER; BEAUCHEMIN, 1997). Ligninas pré-tratadas por Organosolv, devido ao seu maior conteúdo de grupos hidroxila fenólicos, adsorvem celulasas de forma mais eficaz do que ligninas pré-tratadas por explosão a vapor (SEWALT; GLASSER; BEAUCHEMIN, 1997).

Interações alifáticas também podem estar envolvidas na adsorção de enzimas na lignina. Na superfície de alguns polímeros, como a lignina, estão presentes grupos químicos carregados (SAINI *et al.*, 2016). A dissociação ou associação desses grupos (como carboxilo, amino, fosfato e imidazol) é responsável pela carga superficial do polímero. As enzimas apresentam muitos resíduos de aminoácidos expostos em suas superfícies, que dependendo do pH, possuem carga negativa ou positiva. Portanto, se tanto a molécula da proteína como a superfície do polímero tiverem a mesma carga, eles se repelem, e se eles possuírem cargas opostas, sofrem adsorção (ELGERSMA *et al.*, 1990).

Devido à estrutura altamente complexa da biomassa lignocelulósica e mais especificamente da lignina, é difícil determinar quais destas interações são mais proeminentes no aumento da adsorção de enzimas. É altamente possível que mais de um tipo de interação possa estar envolvida na ligação não produtiva de enzimas à matriz de lignina (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012). Como forma de aumentar a eficiência da hidrólise da biomassa causada pela ligação improdutiva das enzimas na lignina, pode-se realizar a etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, aumentar o conteúdo

enzimático, o que acaba aumentando ainda mais os custos do processo, ou implementar a reciclagem enzimática (LEE; YU; SADDLER, 1995).

### **3.5. Reciclagem enzimática**

As enzimas contribuem para uma parte significativa do custo final da produção do bioetanol (ADEN; FOUST, 2009). De acordo com Klein-Marcusschamer *et al.* (2012), o custo das celulasas na produção de bioetanol é de aproximadamente U\$ 0,60 a U\$ 1,30 por galão, utilizando 10FPU/g substrato e 20% de substrato (KLEIN-MARCUSCHAMER *et al.*, 2012). Nos últimos anos, foram realizados intensos esforços para modificar este cenário, apresentando três estratégias principais para isso: redução do custo de produção de enzimas; desenvolvimento de enzimas mais eficientes; e redução das quantidades de enzimas requeridas na etapa de sacarificação (PRIBOWO; ARANTES; SADDLER, 2012). Uma possibilidade para este último objetivo seria a realização da reciclagem de enzimas em vários ciclos de hidrólise.

A reciclagem enzimática visa à recuperação das atividades de enzimas adsorvidas na biomassa lignocelulósica como forma de diminuir a quantidade utilizada destas enzimas durante a hidrólise enzimática (HAVEN *et al.*, 2015). É muito importante compreender o processo de sacarificação enzimática da biomassa lignocelulósica de maneira a reduzir a carga de enzimas, melhorar o processo de bioconversão da biomassa e diminuir o custo global da produção do biocombustível lignocelulósico (SAINI *et al.*, 2016).

Para recuperar e reciclar eficientemente as enzimas, é essencial encontrar métodos que minimizam a adsorção ou dessorvam as enzimas da lignina (JØRGENSEN; PINELO, 2016). A adsorção de uma enzima em um material reflete na sua capacidade de reciclagem (JØRGENSEN; PINELO, 2016), pois a prevenção da ligação não produtiva entre enzima e lignina poderia facilitar o processo de reciclagem enzimática (SAINI *et al.*, 2016). Além do seu papel evidente na hidrólise do substrato, os CBMs também podem desempenhar um papel crítico na reciclagem de enzimas. Como um elemento importante no processo de adsorção de enzimas no substrato e na lignina, estes ditarão de modo significativo o equilíbrio entre enzimas livres e adsorvidas, e a sua possível dessorção a partir de resíduos sólidos (GOMES *et al.*,

2015). As enzimas sem o domínio CBM permitiriam sua reutilização enzimática mais eficientemente devido à diminuição da ligação improdutiva na lignina (PAKARINEN *et al.*, 2014).

Entretanto, deve-se ressaltar que durante o processo de hidrólise enzimática, a quantidade relativa de enzimas na fase líquida não é constante, já que a sacarificação é um processo dinâmico. Este processo dinâmico depende fortemente da afinidade de cada enzima para celulose e lignina (PRIBOWO; ARANTES; SADDLER, 2012), da estrutura e composição do substrato (TU; CHANDRA; SADDLER, 2007a) e dos múltiplos fatores ambientais (por exemplo, pH e presença de surfactantes) (SEO; FUJITA; SAKODA, 2011).

Já foram descritos na literatura experimentos com reciclagem enzimática que conseguiram reciclar uma quantidade considerável de enzimas. No trabalho de Zhu *et al.* (2009), 90% das celulasas foram recicladas utilizando farelo de milho pré-tratado em ácido diluído como substrato; Deshpandey e Eriksson (1984) recuperaram 90, 87 e 91% de endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase, respectivamente, após sacarificação em palha de trigo explodida a vapor. Lindedam *et al.* (2013) conseguiram melhores resultados de reciclagem enzimática com 25% de matéria seca (palha de trigo pré-tratada a vapor), recuperando 59% e 41% da carga enzimática inicial da mistura comercial de Celluclast:Novozyme188. Rodrigues *et al.* (2015) observaram que a reciclagem enzimática com a suplementação de  $\beta$ -glicosidase no coquetel enzimático Celluclast promoveu um aumento de 29% na hidrólise enzimática da palha de trigo pré-tratada hidrotermicamente.

### **3.6. Estratégias de recuperação de atividades enzimáticas**

Como descrito anteriormente, as enzimas podem adsorver na lignina presente em substratos lignocelulolíticos e assim, diminuir sua atividade catalítica, acarretando na redução da eficiência de sacarificação da biomassa. Para recuperação das atividades enzimáticas adsorvidas na biomassa lignocelulósica podem ser utilizadas algumas estratégias de recuperação de enzimas. Tais estratégias de recuperação podem estar relacionadas à fração de enzimas presente na fase líquida, ou à fração de enzimas ligada na fase sólida (RODRIGUES; FELBY; GAMA, 2014).

Os métodos de recuperação de enzimas adsorvidas são conhecidos por serem dependentes da natureza da interação entre enzima e substrato, o que resulta no uso de diferentes estratégias de reciclagem de acordo com as interações específicas entre enzima-substrato (PRIBOWO; ARANTES; SADDLER, 2012). Como descrito anteriormente, as interações entre enzima-substrato podem ser de vários tipos, dentre elas, ligações de hidrogênio, interações alifáticas ou interações hidrofóbicas (DING; XU, 2004; LEHTIO *et al.*, 2003).

Desse modo, existem diferentes métodos capazes de dessorver as enzimas ligadas à fração sólida. Estas podem ser recuperadas por meio de agentes, tais como alcalinos, surfactantes, ureia, glicerol, polietileno glicol (PEG), tampões de diferentes valores de pH, e também pela adição de enzimas livres e/ou pela adição de carga sólida fresca (DESHPANDE; ERIKSSON, 1984; OTTER *et al.*, 1989; PRIBOWO; ARANTES; SADDLER, 2012; RAD; YAZDANPARAST, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2012).

A adição de aditivos, como surfactantes não iônicos (ERIKSSON; BÖRJESSON; TJERNELD, 2002) e polímeros (BÖRJESSON *et al.*, 2007), é uma maneira eficiente de reduzir a adsorção não produtiva de enzimas na lignina durante a hidrólise da biomassa. Os aditivos podem adsorver na lignina de modo a evitar a adsorção inespecífica das enzimas, produzindo assim uma melhor reciclagem enzimática e maior rendimento de hidrólise (SIPOS *et al.*, 2010; ZHENG, YI *et al.*, 2008). É proposto que o PEG se ligue na lignina por ligações hidrofóbicas e de hidrogênio, evitando a adsorção das enzimas (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). A vantagem de se utilizar o PEG ao invés de Tween 20 ou 80 para reduzir a adsorção de enzimas na lignina é devido ao baixo custo desse produto. A ureia, por apresentar alto teor de nitrogênio, provoca a acumulação de nitrogênio na lignina, por meio de reações de adição nucleofílica, impedindo assim, interações entre enzima e lignina, aumentando a acessibilidade das enzimas à celulose (MONSCHEIN; REISINGER; NIDETZKY, 2014). Otter *et al.* (1989) verificaram que o glicerol compete diretamente com as enzimas nos locais de ligação de hidrogênio à lignina e, à medida em que ocorre aumento da concentração de glicerol, a quantidade de enzima dessorvida aumenta (OTTER *et al.*, 1989).

As enzimas podem apresentar em sua estrutura aminoácidos com cadeia lateral que podem sofrer titulação com pH, o que conseqüentemente modifica sua estrutura e suas interações com outros materiais. Portanto, o controle do pH permite um substancial controle da adsorção e dessorção das enzimas (GOMES *et al.*, 2015). Estudos constataram que pH muito ácido ou muito básico levam a uma ótima dessorção das enzimas do substrato, entretanto podem interferir em sua estrutura e afetar sua atividade, como observado por Otter *et al.* (1984), que constataram uma dessorção de 40 a 45% de celulases utilizando essa metodologia, porém, uma baixa atividade destas enzimas. Entretanto, Zhu *et al.* (2009) observaram que a dessorção de celulases em meio alcalino foi o melhor método de dessorção testado entre vários outros.

Algumas enzimas adsorvidas na fração sólida ainda retêm atividade e capacidade de adsorver eficientemente em substratos frescos (RODRIGUES *et al.*, 2012), apresentando considerável atividade hidrolítica remanescente. A adição de substratos frescos se baseia no princípio de que as enzimas possuem uma maior afinidade para o novo substrato pré-tratado do que para a biomassa residual (consistindo principalmente em lignina) (JØRGENSEN; PINELO, 2016). Entretanto, alguns autores relatam que a reciclagem com adição de sólido poderia não ser viável, pois provavelmente levaria a um acúmulo significativo de resíduos ricos em lignina que, apresentaria um efeito adverso sobre a capacidade hidrolítica das enzimas recuperadas e na sua subsequente hidrólise dos substratos frescos (LEE; YU; SADDLER, 1995; QI *et al.*, 2011). Entretanto, essa constatação provavelmente só ocorreria em biomassas com alto teor de lignina.

Já foi observado que os métodos de pré-tratamento, assim como o conteúdo de lignina, podem afetar as características de adsorção de enzimas na lignina (KUMAR; WYMAN, 2009; PEJIC *et al.*, 2008; TU *et al.*, 2009). Qi *et al.* (2011) observaram que a reciclagem realizada pela adição de substratos frescos se mostrou mais eficiente com o farelo de trigo pré-tratado alcalino (3,6% de lignina) comparado com o farelo de trigo pré-tratado ácido (20,5% lignina), expondo o efeito negativo da lignina sobre os métodos de reciclagem enzimática. Com isso, Qi *et al.* concluíram que é possível recuperar e reciclar uma quantidade substancial de celulases durante a hidrólise de substratos celulósicos com baixo teor de lignina. Visser *et al.* (2015) utilizaram o bagaço de cana pré-tratado alcalino no estudo de reciclagem enzimática, em que

aproximadamente 50% de lignina foi removida, facilitando a ação das enzimas na celulose e hemicelulose, permitindo uma reciclagem de enzimas eficiente.

Algumas enzimas já descritas por apresentarem o domínio de ligação a carboidratos ficam aderidas na porção sólida. Dentre elas, estão presentes especialmente as celulasas endoglucanases e celobihidrolases (RAMOS; BREUIL; SADDLER, 1993; VALLANDER; ERIKSSON, 1987; WEISS *et al.*, 2013).

Em relação à recuperação de enzimas da fração sólida, existem algumas vantagens, tais como: recuperação da maioria das celulasas (que frequentemente adsorvem em sólidos residuais), remoção de açúcares e outros possíveis inibidores enzimáticos presentes em solução e a simples tecnologia de separação das frações sólida e líquida. Entretanto, também existem algumas desvantagens, tais como: aumento da concentração de lignina (se esta não for removida durante o pré-tratamento) e perda das atividades de enzimas não adsorvidas nos sólidos residuais (JØRGENSEN; PINELO, 2016).

As estratégias de recuperação de enzimas presentes na fase líquida envolvem a ultrafiltração, que consiste na separação de compostos inibidores (tais como açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos) das enzimas presentes na fração líquida, com a obtenção de uma fração contendo majoritariamente atividade enzimática (WEISS *et al.*, 2013); a floculação utilizando taninos, seguida da adição de polietileno glicol (PEG), já que este causa dessorção das enzimas ligadas aos taninos (XU, J.; CHEN, 2009); e a utilização de outras técnicas tais como a imobilização de enzimas (RODRIGUES; FELBY; GAMA, 2014; TU *et al.*, 2006). A adição de substratos frescos na fase líquida, após essa ser separada da fase sólida, garante a readsorção das enzimas livres em solução em substratos novos, e conseqüentemente, uma renovação de atividade destas enzimas (RODRIGUES; FELBY; GAMA, 2014; TU; CHANDRA; SADDLER, 2007a; WEISS *et al.*, 2013).

A principal vantagem da recuperação de enzimas da fração líquida é a remoção de água e dos componentes menores (inibidores). Já as principais desvantagens são: pode ocorrer desnaturação das enzimas ao realizar recuperação do produto por destilação, nem todas as enzimas estão presentes na fase líquida e com isso ocorrem perdas enzimáticas, e a tecnologia de separação para concentrar enzimas e remover inibidores é de certa forma dispendiosa (JØRGENSEN; PINELO, 2016). As atividades

de  $\beta$ -glicosidasas e exoglicosidasas se concentram majoritariamente na fração líquida durante a hidrólise enzimática (WEISS *et al.*, 2013). Rodrigues *et al.* (2014) observaram que a ultrafiltração permite a recuperação de enzimas solúveis com um rendimento aproximado de 80%, nos ensaios em escala laboratorial. Tu e colaboradores (2007a) recuperaram 88% das celulases livres em solução no final da hidrólise da madeira macia mista.

Maiores informações sobre o conhecimento das possíveis interações entre extratos enzimáticos e substratos lignocelulósicos são requeridas para a maior eficiência da sacarificação da biomassa. Para tanto, estudos de adsorção, readsorção e dessorção de enzimas em biomassas lignocelulósicas com diferentes conteúdos de lignina são de extrema importância por promoverem um entendimento fundamental no processo de reciclagem enzimática.

### 3.7. *Chrysosporthe cubensis*

Alguns patógenos que infectam plantas possuem enzimas hidrolíticas que são responsáveis pela hidrólise da parede celular, levando à subsequente infecção da planta (CANTU *et al.*, 2008). O fungo *Chrysosporthe cubensis* é um fungo fitopatogênico encontrado principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Este é responsável por infectar principalmente espécies de *Eucalyptus*, causando a doença chamada cancro, uma patologia que ocorre no tronco das plantas hospedeiras e causa lesões superficiais ou profundas bem definidas na região do caule levando a perdas de produtividade, qualidade e volume da madeira e inclusive à morte (ALFENAS *et al.*, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

A doença foi relatada primeiramente em Cuba por Bruner (1917), sendo posteriormente, em 1970, relatada em outros lugares, como Suriname (BOERBOOM; MAAS, 1970), Brasil (HODGES, S. C.; REIS, S. M., 1973), Costa Rica (HODGES, C.S. *et al.*, 1976) e Estados Unidos – Florida, Havai e Porto Rico (HODGES, C S; GEARY; CORDELL, 1979). Além de *Eucalyptus*, o patógeno pode infectar outras melastomataceas como cravo da Índia (*Eugenia caryophyllata*), araçazeiro (*Psidium* spp.), quaresmeira (*Tibouchina* sp.) e goiaba-de-anta (*Bellucia dichotoma*) (ALFENAS *et al.*, 2009).

De acordo com Gibson *et al.* (2011), fungos fitopatogênicos produzem um arsenal de enzimas lignocelulolíticas extracelulares que eficientemente rompem a barreira da parede celular vegetal de modo a obterem nutrientes necessários para sua sobrevivência. Como o fungo *Chrysosporthe cubensis* é um fungo fitopatogênico, este, ao infectar uma planta, libera enzimas hidrolíticas (principalmente  $\beta$ -glicosidades, xilanases e algumas enzimas acessórias de interesse) capazes de hidrolisar a parede celular vegetal (FALKOSKI *et al.*, 2013a; VISSER *et al.*, 2013).

Estudos recentes tem apontado elevado potencial biotecnológico para *C. cubensis*, sobretudo na produção de enzimas envolvidas na sacarificação da biomassa lignocelulósica. Além da alta produção de enzimas celulolíticas e hemicelulíticas (FALKOSKI *et al.*, 2013a; MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015; VISSER *et al.*, 2013), o extrato enzimático deste fungo apresentou elevada eficiência na sacarificação do bagaço de cana submetido a pré-tratamento alcalino (56,1% para a degradação de glicana e 90% para a degradação de xilana), enquanto o coquetel enzimático comercial Multifect® CL apresentou 43,7% de hidrólise de glicana e 19,4% de hidrólise de xilana (FALKOSKI *et al.*, 2013a). O estudo realizado por Maitan-Alfenas *et al.* (2015) verificou que o extrato enzimático obtido de *C. cubensis* apresentou a melhor liberação de glicose (5,32 g/L) e xilose (9,00 g/L) a partir do bagaço de cana pré-tratado alcalino, em comparação com outros coquetéis comerciais, tais como Multifect® CL (5,30 g/L de glicose e 3,19 g/L de xilose), Multifect® XL (1,90 g/L de glicose e 8,83 g/L de xilose), Accellerase® 1500 (3,19 g/L de glicose e 0,37 g/L de xilose). Além disso, este trabalho evidenciou a produção da enzima lacase (2,49 U/mg de proteína) por esse fungo, não sendo esta detectada nos outros coquetéis comerciais testados. O trabalho realizado por Visser *et al.* (2013) demonstra o grande potencial hidrolítico do *blend* dos extratos enzimáticos de *C. cubensis* e *P. pinophilum*. O *blend* realizado na proporção de 50:50 dos coquetéis enzimáticos citados resultou em sinergismo entre as enzimas, sendo capaz de obter elevados índices de conversão de glicana e xilana (63% e 93%, respectivamente) na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado alcalino.

Devido ao grande potencial do extrato enzimático produzido pelo fungo *Chrysosporthe cubensis*, este se torna altamente viável para estudos de adsorção, readsorção e dessorção de enzimas em bagaços com diferentes conteúdos de lignina. Tais estudos irão promover um melhor entendimento destes processos e poderão

contribuir para a utilização eficiente da reciclagem das enzimas de *C. cubensis* durante a sacarificação de biomassas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Origem dos reagentes e bagaço

Os reagentes xilose, arabinose, frutose, glicose, xilana oat spelt, xilana birchwood,  $\rho$ -nitrofenol ( $\rho$ NP),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( $\rho$ NP $\beta$ Glc),  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo ( $\rho$ NP $\alpha$ Glc),  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo ( $\rho$ NP $\alpha$ Gal),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo ( $\rho$ NP $\beta$ Gal),  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo ( $\rho$ NP $\alpha$ Man),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-manopiranosídeo ( $\rho$ NP $\beta$ Man),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo ( $\rho$ NP $\beta$ Xyl),  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-arabinopiranosídeo ( $\rho$ NP $\alpha$ Ara), carboximetilcelulose (CMC), xilana *Beechwood*, *Locust bean gum*, ácido poligalacturônico e também os reagentes fosfato de monopotássio, nitrato de amônio, sulfato de magnésio, sulfato de cobre, acetato de sódio, carbonato de sódio, ácido dinitrossalicílico (DNS), potato dextrose agar (PDA) e ácido bicinconínico foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). O extrato de levedura foi obtido de Himedia Laboratories Co. (Mumbai, Maharashtra, India).

O bagaço de cana-de-açúcar foi obtido da Usina de Jatiboca localizada na cidade de Urucânia - MG. Os demais reagentes utilizados para a execução deste trabalho apresentam grau de pureza analíticos.

### 4.2. Microrganismo e cultivo

O fungo *Chrysosporthe cubensis* foi obtido da coleção micológica do Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. O fungo foi mantido em placas de PDA (potato dextrose agar) a 28 °C e repicado periodicamente.

#### **4.3. Multiplicação e manutenção da cultura do fungo *Chrysosporthe cubensis***

O inóculo para produção do extrato enzimático foi preparado pelo cultivo do fungo via fermentação submersa em frascos de Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio com a seguinte composição: glicose 10,0 g/L; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1,0 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 g/L; MgSO<sub>4</sub> 0,5 g/L e extrato de levedura 2,0 g/L. Cada frasco com o meio foi autoclavado a 120 °C por 20 min e posteriormente inoculado com 10 discos de ágar cortados a partir de uma placa incubada com o fungo por 5 dias em meio PDA e incubado em shaker rotatório, a 28 °C, 150 rpm por 5 dias.

#### **4.4. Produção de extrato enzimático**

Para a produção de enzimas via fermentação em estado semi-sólido, foram utilizados Erlenmeyers de 250 mL contendo 12,5 g de farelo de trigo e 18,75 mL de meio de cultura (mistura final de 60%), contendo: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1,0 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 g/L; MgSO<sub>4</sub> 0,5 g/L; CuSO<sub>4</sub> 0,25 g/L e extrato de levedura 2,0 g/L. Foram adicionados ao meio os seguintes elementos traço: MnCl<sub>2</sub> 0,1 mg/L; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,075 mg/L; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0,02 mg/L; FeCl<sub>3</sub> 1,0 mg/L e ZnSO<sub>4</sub> 3,5 mg/L. O meio foi autoclavado a 120 °C por 20 min e então inoculado com 10 mL (contendo 1,5 x 10<sup>7</sup> esporos/mL) do inóculo. Os frascos foram mantidos a 28°C, e a extração das enzimas foi realizada depois de 7 dias de fermentação. As enzimas secretadas foram extraídas com tampão acetato de sódio, 50 mM pH 5, na proporção de 10:1 (tampão/massa de substrato seco), durante agitação a 150 rpm por 60 min em temperatura ambiente. Os sólidos foram separados por filtração em membrana de nylon, seguido de centrifugação a 15.000 g por 10 min. No sobrenadante clarificado ainda foi realizada a etapa de ultrafiltração utilizando unidade de ultrafiltração Micron (Millipore Corporation, Bedford, MA) em membrana de Poliéter Sulfona Millipore (cutoff 10 kDa). Posteriormente, a amostra foi liofilizada em liofilizador Edwards Super Modulyo por 5 horas para concentração do extrato enzimático. Após essas etapas, o extrato enzimático concentrado foi congelado e estocado para análise de atividade enzimática.

#### **4.5. Determinação das atividades enzimáticas**

A atividade de xilanase foi determinada usando xilana *Beechwood* na concentração final 1% (m/v). A reação enzimática foi iniciada pela adição de 100 µL do extrato enzimático apropriadamente diluído para 400 µL de solução do polissacarídeo

diluído em tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0. A mistura reacional foi incubada por 15 min a 50 °C, e foi paralisada pela adição de 500 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A quantificação de açúcares redutores foi realizada pelo método de Miller (1959), efetuando-se a leitura de absorvância a 540 nm, estimada utilizando-se uma curva-padrão construída com solução de xilose 1 mg/mL.

As atividades de endoglucanase, mananase e pectinase foram determinadas usando CMC (carboximetilcelulose) na concentração final 1% (m/v), *locust bean gum* na concentração final 0,4% (m/v) e ácido poligalacturônico na concentração final 0,25% (m/v), respectivamente. As reações enzimáticas foram iniciadas pela adição de 100 µL de solução enzimática apropriadamente diluída para 400 µL de solução do polissacarídeo diluído em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0. A mistura reacional foi incubada por 30 min, a 50 °C. Após esse tempo, a reação foi paralisada pela adição de 500 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A quantificação de açúcares redutores foi realizada pelo método de Miller (1959), efetuando-se a leitura de absorvância a 540 nm, estimada utilizando-se uma curva-padrão construída com solução de glicose 1 mg/mL.

A atividade de FPase foi determinada utilizando papel de filtro Whatman nº 1 (1 x 6 cm) como substrato, em um volume total de reação de 1,5 mL. A reação enzimática foi iniciada pela adição do substrato, 1,4 mL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5, e 100 µL do extrato enzimático previamente diluído. O meio reacional foi incubado a 50 °C por 60 min. Após esse tempo, a reação foi paralisada pela adição de 500 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A quantificação de açúcares redutores foi realizada pelo método de Miller (1959), efetuando-se a leitura de absorvância a 540 nm, estimada utilizando-se uma curva-padrão construída com solução de glicose 1 mg/mL.

As atividades de β-glicosidase, β-xilosidase, β-manosidase, α-galactosidase, α-arabinofuranosidase e celobihidrolase foram determinadas usando p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (pNP-β-Glc), p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (pNP-β-Xil), p-nitrofenil-β-D-manopiranosídeo (pNP-β-Man), p-nitrofenil-α-D-galactopiranosídeo (pNP-α-Gal), p-nitrofenil-α-L-arabinopiranosídeo (pNP-α-Ara) e p-Nitrofenil-β-D-celulobiosídeo (pNP-β-Cel) como substratos, respectivamente. A mistura reacional continha 20 µL de solução enzimática apropriadamente diluída, 50 µL de solução do substrato sintético (concentração final 1 mM) e 30 µL de tampão acetato de sódio 100

mM pH 5,0. A mistura reacional foi incubada em micropoços em placa de Elisa por 15 min a 50 °C e paralisada pela adição de 100 µL de solução carbonato de sódio 0,5 M. A absorbância foi medida a 410 nm e o conteúdo de p-nitrofenol liberado foi estimado por uma curva padrão.

A atividade de lacase foi determinada monitorando a oxidação do substrato ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)]). O ensaio enzimático foi realizado utilizando 350 µL de tampão de acetato de sódio 100 mM pH 5,0, 100 µL da solução enzimática diluída e 50 µL de ABTS 10 mM. A mistura reacional foi incubada a 50 °C por 10 min. No final desse período, a absorbância foi imediatamente medida em 420 nm. A atividade de laccase foi calculada pelo princípio de Lambert-Beer, utilizando o coeficiente de extinção molar de  $3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (LI *et al.*, 2008).

Todos os ensaios de atividade enzimática foram realizados em triplicata e os valores médios foram calculados. Para todas as atividades, uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol do produto correspondente (equivalentes de glicose, xilose e p-nitrofenol) por minuto na condição utilizada no ensaio.

#### **4.6. Determinação de proteínas**

As concentrações proteicas nas preparações enzimáticas foram determinadas pelo método de Bradford (1976) com modificações. O reagente de Bradford concentrado 5 vezes foi preparado misturando-se 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL de etanol 95 % (v/v) e 100 mL de ácido fosfórico 85 % (v/v). Após solubilização, o volume foi completado para 200 mL e agitado por 30 min, filtrando-se a solução em algodão. Este método baseia-se no desenvolvimento da cor em função da ligação da proteína com o pigmento Coomassie Brilliant Blue G-250.

O ensaio para determinação da concentração proteica das preparações enzimáticas foi conduzido a partir da mistura de 50-150 µL do extrato proteico precipitado com etanol gelado em banho de gelo por 30 min (JIN *et al.*, 2016), 800 µL de água destilada e 200 µL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada em vórtex e mantida por 15 min à temperatura ambiente. Os valores de absorbância foram tomados a

595 nm e convertidos em valores de massa proteica utilizando uma curva padrão construída com BSA (albumina bovina sérica).

#### **4.7. Pré-tratamento da biomassa**

O bagaço de cana-de-açúcar foi moído em moinho de facas em partículas menores que 1 mm e submetido ao pré-tratamento alcalino ou ácido antes da aplicação no experimento de hidrólise enzimática. Foram utilizadas soluções de hidróxido de sódio (NaOH) 1,5% (p/v) e de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,5% (v/v) para pré-tratar o bagaço de cana-de-açúcar alcalino e ácido, respectivamente. O pré-tratamento foi conduzido em autoclave a 120 °C por 1 h. Os materiais pré-tratados foram separados em frações sólida e líquida utilizando-se um funil de Buchner com papel de filtro a vácuo. A fração sólida foi lavada com água destilada e posteriormente seca em estufa em temperatura de 60 °C. Após completa secagem, o material sólido foi triturado, peneirado em peneira de 32 mesh (0,5 mm) e estocado para posterior utilização.

#### **4.8. Análise da composição dos bagaços de cana-de-açúcar**

O teor de lignina das amostras foi determinado pelo método de Klason, segundo a Norma TAPPI T222 om-02, modificada como descrito a seguir. Pesou-se cerca de 0,7133 g (base seca) de bagaço de cana-de-açúcar previamente moído (32 mesh) e transferiu-se para um tubo autoclavável de 500 mL contendo 10,7 mL de solução de ácido sulfúrico 72% (d = 1,6338 g/mL). A mistura bagaço/ácido permaneceu sob agitação em chapa magnética por um período de 2 h. Logo após essa etapa, iniciou-se a etapa de hidrólise, em que o ácido foi diluído a uma concentração de 3% (m/v) adicionando-se 400 mL de água destilada. Os tubos foram incubados a 121 °C por 1 h e posteriormente, a solução foi filtrada a quente em funil de placa sinterizada do tipo ASTM 10-15M previamente seco em estufa a 105 °C por 1 h. O material insolúvel foi seco em estufa a 80 °C por cerca de 24 h e resfriado em dessecador até peso constante. Após esta etapa, o material foi incubado a 525 °C por um período de 2 h, e foram dessacadas até peso constante. Nesta etapa, considerou-se que toda a matéria orgânica insolúvel era lignina. O teor de lignina insolúvel foi determinado gravimetricamente.

Para determinação da lignina solúvel e dos açúcares, utilizou-se o filtrado obtido durante a determinação da lignina insolúvel, anteriormente descrito. A quantificação da

lignina solúvel foi feita por meio da medida de absorvância em 215 nm e 280 nm seguindo metodologia adaptada por (MARABEZI, 2009). A concentração de açúcares (celobiose, glicose, xilose e arabinose) presentes no hidrolisado foi utilizada para estimar os conteúdos de celulose e hemiceluloses nos bagaços pré-tratados. Os coeficientes utilizados para converter açúcares em celulose e hemiceluloses foram os relatados por Gurgel *et al.* (2014). Para determinação da concentração dos açúcares foi utilizado um sistema de HPLC Shimadzu, equipado com um detector de índice de refração (Shimadzu RID-6A) e uma coluna Aminex HPX 87H (Bio-Rad de 300 x 7,8 mm) mantida a 45 °C. As condições cromatográficas utilizadas para separar os analitos envolveram o uso de ácido sulfúrico (0,5 mmol/L) como eluente em um fluxo de 0,6 mL/min.

#### **4.9. Avaliação do perfil de adsorção de proteínas e enzimas nos bagaços pré-tratados alcalino e ácido em condições não hidrolíticas pelo uso da isoterma de adsorção do tipo Langmuir**

Os experimentos foram conduzidos em um volume de trabalho de 1 mL contendo 8% de bagaço pré-tratado (alcalino ou ácido), tampão acetato de sódio 100 mM pH 5, e 2,5 – 50 mg de proteínas do extrato enzimático/g de bagaço pré-tratado por 2 h a 4 °C, sob agitação de 250 rpm em shaker orbital. Esse experimento foi realizado em baixa temperatura (4 °C) para evitar hidrólise enzimática. Após a adsorção, as frações sólida e líquida foram separadas por centrifugação (13200 rpm, por 10 min). As concentrações das proteínas e enzimas adsorvidas foram calculadas subtraindo a quantidade de proteína e enzima inicialmente adicionada da quantidade total encontrada no sobrenadante após as 2 h de adsorção. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Os parâmetros de adsorção foram calculados utilizando a isoterma de adsorção do tipo de Langmuir, descrita na equação a seguir. Para correção dos valores obtidos foi utilizado o Solver (Excel) (KEMMER; KELLER, 2010).

$$P_{ads} = \frac{K \times P_{max} \times P}{(1 + K) \times P}$$

Onde  $P_{máx}$  é a quantidade máxima de proteína adsorvida (mg proteína/g sólido);  $P$  é a quantidade de proteína livre (mg proteína/mL) no sobrenadante depois da

adsorção;  $K$  é a constante de equilíbrio (mL/mg de proteína), que relaciona com a afinidade de adsorção.  $P_{máx}$  e  $K$  podem ser calculados através do gráfico de  $P/P_{máx}$  vs.  $P$ , e a força de adsorção da proteína pode ser calculada através da fórmula  $Kp = P_{máx} \times K$ .

#### **4.10. Avaliação do perfil de adsorção de proteínas e enzimas nos bagaços pré-tratados alcalino e ácido durante a hidrólise da biomassa**

Os ensaios de hidrólise foram realizados em frascos Erlenmeyers de 50 mL com 5 mL de volume de trabalho. Dois experimentos foram realizados, um com bagaço pré-tratado alcalino e outro, com bagaço pré-tratado ácido com o objetivo de avaliar o perfil de adsorção de proteínas e enzimas nos dois bagaços durante a hidrólise enzimática. Os experimentos foram conduzidos com 8% (m/v) dos bagaços pré-tratados, carga enzimática de 10 FPU/g de bagaço, tampão acetato de sódio 100 mM pH 5, tetraciclina 40 µg/L e azida 10 mM, de modo a evitar contaminação. Os frascos foram mantidos sob agitação em shaker orbital a 250 rpm, a 50 °C por 24 h. Foram retiradas alíquotas ao fim de 24 h para avaliação do perfil de proteínas e enzimas adsorvidas, assim como a quantidade de glicose e xilose liberadas. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores médios foram calculados. Foi realizado um experimento controle, sem os bagaços de cana pré-tratados, onde foi verificado a perda de atividade enzimática a 50 °C durante 24 h.

#### **4.11. Análise da termoestabilidade das enzimas de *C. cubensis***

A estabilidade térmica das enzimas de *C. cubensis* foi testada na temperatura de 50 °C. O extrato enzimático foi incubado com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 durante 24 h em shaker rotatório a 250 rpm. Alíquotas ao longo do tempo foram retiradas e a atividades enzimáticas relativas foram conduzidas como descrito no item 4.5.

#### **4.12. Reciclagem enzimática**

Os experimentos de reciclagem foram realizados em tubos do tipo Falcon de 50 mL contendo 2 mL de volume de trabalho. Os dois tipos de bagaço pré-tratados (alcalino e ácido) foram utilizados nos experimentos, de modo a avaliar a interferência

da lignina nas reciclagens testadas. Nos tubos foram adicionados 5% (m/v) de bagaço de cana pré-tratado alcalino ou ácido, carga enzimática de 10 FPU/g bagaço, tampão de acetato de sódio 100 mM pH 5, tetraciclina (40 µg/L) e azida (10 mM) de modo a evitar contaminação. O meio reacional foi incubado a 50 °C, sob agitação de 250 rpm, por 216 h. A cada 72 h de hidrólise, iniciou-se um novo ciclo de reciclagem, totalizando três ciclos. Ao fim de cada ciclo, o meio reacional foi centrifugado, e o sobrenadante estocado para análise. Logo após, ao centrifugado (biomassa residual) foram adicionados conteúdos diferentes de extrato enzimático e bagaço pré-tratado. Para tanto, foram realizadas três tipos de experimentos de reciclagem enzimática. O tipo A, em que houve a adição de nova carga de sólidos e nova carga enzimática; o tipo B, em que houve a adição de somente nova carga enzimática; e o tipo C, em que houve a adição de somente nova carga de sólidos (Tabela 1).

Tabela 1: Quantidade de biomassa e enzima adicionadas a cada ciclo de reciclagem nos três experimentos, realizados com os bagaços pré-tratados alcalino ou ácido.

		<b>Experimentos</b>		
		<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Ciclo 1</b>	Sólido (%)	5	5	5
	Enzima (FPU/g)	10	10	10
<b>Ciclo 2</b>	Sólido (%)	5	0	5
	Enzima (FPU/g)	10	10	0
<b>Ciclo 3</b>	Sólido (%)	5	0	5
	Enzima (FPU/g)	10	10	0

Durante os experimentos, os sobrenadantes retirados a cada 72 h foram avaliados quanto ao conteúdo de glicose e xilose liberados e o conteúdo de enzimas e proteínas adsorvidas.

#### **4.13. Análise dos açúcares liberados pela hidrólise dos bagaços de cana pré-tratados alcalino e ácido**

A detecção e quantificação de glicose e de xilose foi realizada no Laboratório de Análises Bioquímicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIAGRO) da Universidade Federal de Viçosa. A detecção desses açúcares foi feita utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-10AD-Shimadzu, com detector RID-6A Shimadzu. A coluna usada foi a Carbohydrate Analysis Column Aminex® HPX-87P Column- 300mm x 7,8mm. A fase móvel (água) foi conduzida a um fluxo de 0,6 mL/min e a condição de temperatura utilizada foi de 80 °C. Os resultados foram calculados pela média dos valores das triplicatas das amostras. O tempo de retenção da glicose e da xilose, assim como suas concentrações, foram estimados por meio de curvas-padrão produzidas com soluções de glicose e de xilose, respectivamente.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Produção de enzimas hidrolíticas de *Chrysophorthe cubensis*

O extrato enzimático obtido a partir do cultivo do fungo *C. cubensis* em meio semi sólido contendo farelo de trigo, foi concentrado 62,8 vezes por liofilização e posterior ultrafiltração em membrana de 3 kDa. As atividades enzimáticas e conteúdo proteico do extrato concentrado foram analisados, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2: Concentração proteica (mg/mL) e atividade enzimática (U/mL) do extrato enzimático de *C. cubensis*

Extrato de <i>C. cubensis</i>	
<i>Proteína (mg/mL)</i>	
Total de proteínas	6,08 ± 0,36
<i>Atividades enzimáticas (U/mL)</i>	
Fpase	6,54 ± 0,03
Endoglucanase	62,4 ± 0,03
β-glicosidase	21,3 ± 1,01
α-glicosidase	0,19 ± 0,01
Celobiohidrolase	11,2 ± 0,94
Xilanase	433,8 ± 0,01
β-xilosidase	2,74 ± 0,09
Mananase	8,84 ± 0,01
β-galactosidase	0,56 ± 0,10
α-galactosidase	2,21 ± 0,24
α-arabinofuranosidase	9,89 ± 0,14
β-manosidase	0,27 ± 0,00
α-manosidase	0,25 ± 0,00
Pectinase	52,95 ± 0,03
Lacase	0,61 ± 0,00

O fungo *C. cubensis* possui capacidade de secretar enzimas de degradação da parede celular vegetal (Tabela 2), com destaque para as atividades hemicelulolíticas e de

pectinase, como também relatado por outros autores (FALKOSKI *et al.*, 2013b; MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015; VISSER *et al.*, 2013). Estas enzimas acessórias são fundamentais para a completa hidrólise da biomassa lignocelulósica e apresentam efeito sinérgico com as celulases (MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015). Ao atuarem em sinergismo, o efeito total dessas enzimas é maior que a soma dos efeitos individuais (KOSTYLEV; WILSON, 2012), garantindo eficiência na sacarificação da biomassa.

Ainda pode-se observar na Tabela 2 o destaque para a presença da atividade enzimática de lacase. Esta enzima promove a oxidação de compostos fenólicos que atuam como inibidores enzimáticos e são gerados pela degradação da lignina durante a etapa de pré-tratamento (KUDANGA; LE ROES-HILL, 2014). Desse modo, extratos enzimáticos ricos em lacase podem contribuir significativamente na hidrólise da biomassa, podendo gerar maiores rendimentos na etapa de sacarificação. O potencial hidrolítico do extrato enzimático de *C. cubensis* já foi verificado em outros trabalhos, de modo a demonstrar elevados rendimentos na sacarificação da biomassa lignocelulósica (FALKOSKI *et al.*, 2013b; MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015; VISSER *et al.*, 2013, 2015).

## 5.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi submetido aos pré-tratamentos alcalino com NaOH 1,5% (p/v) e ácido com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5% (p/v) e os conteúdos de lignina, celulose e hemicelulose estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Análise composicional dos bagaços de cana *in natura* e pré-tratados. As quantidades de lignina, celulose e hemicelulose foram baseadas no peso seco.

	Composição (%)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina total
Bagaço <i>in natura</i>	45,55 ± 1,81	24,58 ± 0,97	25,44 ± 1,75
Bagaço pré-tratado alcalino	47,25 ± 0,69	32,81 ± 0,92	8,12 ± 0,07
Bagaço pré-tratado ácido	49,88 ± 1,56	8,70 ± 0,56	33,81 ± 0,39

O pré-tratamento alcalino promoveu redução considerável do conteúdo de lignina presente no bagaço de cana (cerca de 68%). Na literatura é mencionado que o

pré-tratamento alcalino tem por característica remover preferencialmente a lignina (MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015), aumentando assim o conteúdo relativo de celulose e hemicelulose presentes na biomassa (Tabela 3). Visser *et al.* (2015) verificaram que pré-tratamento alcalino com NaOH 1,5% (p/v) do bagaço de cana removeu cerca de 50% da quantidade inicial de lignina, assim como Falkoski *et al.* (2013b), que relataram a remoção de aproximadamente 63% de lignina total do bagaço de cana pré-tratado com NaOH 1,0% (p/v).

O pré-tratamento ácido removeu grande parte da hemicelulose (64,6%), aumentando consideravelmente a quantidade relativa de lignina no meio (cerca de 33%), e em menor quantidade, de celulose (cerca de 5%), como pode ser observado na Tabela 3. Maitan-Alfenas *et al.* (2016) também obtiveram resultado similar ao realizarem o pré-tratamento ácido com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0% (p/v) do bagaço de cana, de modo a obter um aumento de aproximadamente 30% e 25% no conteúdo de lignina e celulose, respectivamente, e a diminuição cerca de 62% no conteúdo de hemicelulose, condizente com o resultado encontrado na Tabela 3.

Ao final dos pré-tratamentos realizados, obteve-se bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados com conteúdos próximos de celulose, mas distintas concentrações de lignina e hemicelulose em sua composição. O bagaço pré-tratado alcalino (BAL) apresentou uma menor concentração de lignina (8,12%) e maior concentração de hemicelulose (32,81%), e de forma contrária, o bagaço pré-tratado ácido (BAC) apresentou uma maior concentração de lignina (33,8%) e menor concentração de hemicelulose (8,7%). Uma vez que a lignina é descrita como a principal fração responsável pela adsorção de proteínas e enzimas, estes dois tipos de substratos apresentam potencial para serem posteriormente utilizados na avaliação da adsorção de enzimas de *C. cubensis* e na avaliação do potencial de reciclagem das mesmas durante a etapa de sacarificação.

A lignina é um fator limitante no rendimento da sacarificação da biomassa por promover a adsorção de enzimas (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; JØRGENSEN; PINELO, 2017) e agir como barreira física (FALKOSKI *et al.*, 2013b; JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007), impedindo que as enzimas atuem sobre a celulose e a hemicelulose. Como tentativa de diminuição da interferência da lignina sobre as enzimas e de modo a aumentar a digestibilidade do material lignocelulósico

(JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007), são empregados vários métodos de pré-tratamento da biomassa. Os métodos de pré-tratamento apresentam características distintas, podendo aumentar, diminuir ou até mesmo não alterar o conteúdo de lignina presente nas biomassas lignocelulósicas (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). Portanto, a escolha do método de pré-tratamento apresenta uma influência significativa sobre o potencial de sacarificação (JØRGENSEN; PINELO, 2017) e até mesmo, na reciclagem enzimática. Pré-tratamentos como o de Organosolv e o pré-tratamento alcalino, reduzem o conteúdo de lignina e, assim, amenizam o problema associado com a adsorção de enzimas (RESCH *et al.*, 2014; RØDSRUD; LERSCH; SJÖDE, 2012), sendo portanto, vantajosos nessa perspectiva (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

### 5.3. Isoterma de adsorção

A ligação inespecífica e não produtiva das enzimas na lignina é conhecida por limitar a eficiência da hidrólise enzimática (BERLIN *et al.*, 2006; NAKAGAME *et al.*, 2011; PALONEN *et al.*, 2004). O perfil de adsorção das proteínas do extrato enzimático de *Chrysophorte cubensis* nos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados, contendo diferentes conteúdos de lignina, foi avaliado em condições não hidrolíticas, utilizando as isotermas do tipo Langmuir. Essa isoterma permite determinar a quantidade de proteínas ligadas de forma inespecífica e não produtiva nas biomassas citadas, assim como a força de interação dessas ligações e a afinidade de adsorção entre as proteínas e os substratos estudados.

Os experimentos para elaboração da isoterma de Langmuir foram conduzidos utilizando concentrações de 2,5 a 50 mg de proteínas do extrato enzimático/g de bagaço pré-tratado alcalino ou ácido, a 4 °C. A correção dos parâmetros de adsorção obtidos utilizando a isoterma de adsorção do tipo de Langmuir foi realizada no Solver (Excel) (KEMMER; KELLER, 2010).

As isotermas de adsorção obtidas para proteínas do extrato enzimático de *Chrysophorte cubensis* nos bagaços pré-tratados alcalino e ácido podem ser observadas pela Figura 1. Os parâmetros de adsorção foram estimados ajustando os dados de adsorção à equação de Langmuir.

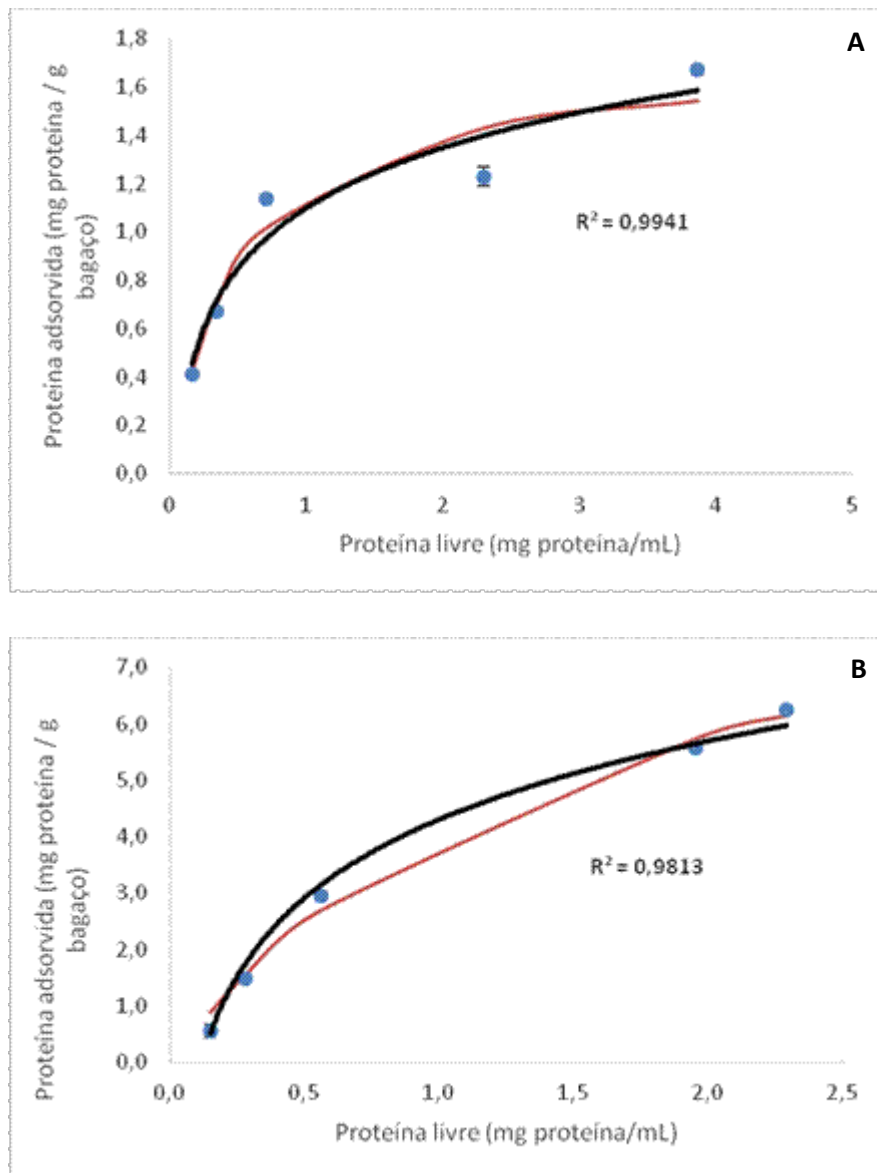


Figura 1: Isotherma de adsorção das proteínas (2,5–50 mg proteína do extrato enzimático de *C. cubensis* /g bagaço) nos bagaços pré-tratados alcalino (A) e ácido (B). A linha em preto indica a quantidade prevista de proteína adsorvida que melhor foi ajustada pela equação de Langmuir.

Na literatura são encontrados diversos trabalhos que analisam a adsorção de proteínas na lignina isolada e pura (KO *et al.*, 2015; TU; PAN; SADDLER, 2009), de modo a apresentar um perfil de adsorção específico para esse polímero. Entretanto, é interessante conhecer o perfil de adsorção de proteínas em substratos complexos, os quais mais se aproximam das condições reais de sacarificação. Poucos trabalhos relatam o perfil de adsorção de proteínas em tais substratos (LU *et al.*, 2002; QI *et al.*, 2011), reiterando a escolha do bagaço de cana como substrato complexo para os estudos de adsorção das proteínas de *C. cubensis*.

Os valores das constantes de capacidade máxima de adsorção ( $P_{max}$ ), afinidade de adsorção ( $K$ ) e o coeficiente de partição, que representa a força de interação entre o bagaço e proteína ( $K_p$ ), calculados a partir das isotermas de Langmuir, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros de capacidade máxima de proteínas adsorvidas ( $P_{max}$ ), afinidade ( $K$ ) e coeficiente de partição ( $K_p$ ), calculados a partir da isoterma de adsorção de Langmuir das proteínas de *C. cubensis* nos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados.

Substrato	$P_{max}$ (mg/g substrato)	$K$ (mL/mg proteína)	$K_p$ (mL/mg substrato)
BAC	10,5	0,6	6,3
BAL	1,7	2,0	3,4

BAC: Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado ácido

BAL: Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado alcalino

O bagaço pré-tratado ácido (BAC) apresentou a máxima capacidade de adsorção de proteínas por grama de bagaço ( $P_{max}$ ) observada (10,5 mg/g) exibindo aproximadamente 6 vezes mais proteínas adsorvidas comparado ao bagaço pré-tratado alcalino (BAL), 1,7 mg/g (Tabela 4). A maior concentração relativa de lignina em BAC (Tabela 3) sugere que a lignina possa ter sido responsável pela maior adsorção de proteínas. Este resultado está concordante com a literatura, na qual demonstra que  $P_{max}$  parece ser maior para biomassas com maior conteúdo de lignina. Ensaio de adsorção do coquetel Celluclast 1.5L em resíduos de madeira com concentrações de lignina de 46,1% e 8,2% mostraram que  $P_{max}$  foi cerca de 2 vezes maior para o substrato com maior concentração de lignina (LU *et al.*, 2002). Diferentes valores de  $P_{max}$  foram determinados para biomassas com diversos conteúdos de lignina: Avicel (celulose pura) o  $P_{max}$  foi de 17,41 mg/g; bagaço de cana pré-tratado por organosolv com 4,42% de lignina, o valor de  $P_{max}$  foi de 29,40 mg/g e bagaço de cana pré-tratado hidrotérmico com 31,97% de lignina, o valor de  $P_{max}$  foi de 36,93 mg/g (MACHADO *et al.*, 2015). As proteínas do coquetel Celluclast 1,5L também apresentaram  $P_{max}$  diferentes para distintos substratos: para o Avicel,  $P_{max}$  foi de 22,86 mg/g, já para a palha de alecrim selvagem rastejante pré-tratada com ácido sulfúrico (38% de lignina),  $P_{max}$  foi de 42,55 mg/g e de 86,07 mg/g para a lignina pura (ZHENG; ZHANG; PAN, 2016).

A afinidade de adsorção de proteínas ( $K$ ) no substrato com menor conteúdo de lignina (BAL), foi aproximadamente três vezes superior (2,0 mL/mg proteína)

comparado ao substrato com maior conteúdo de lignina (BAC), que foi de 0,6 mL/mg de proteína, indicando que BAL teria maior afinidade com as proteínas do extrato enzimático de *C. cubensis*. O coeficiente de partição (Kp) está relacionado com a força de interação entre substrato e enzima (KO *et al.*, 2015). O valor de Kp das proteínas de *C. cubensis* com o substrato BAC foi de 6,3 mL/mg substrato, cerca de 2 vezes maior, comparado com o valor de Kp utilizando o BAL, que foi de 3,4 mL/mg substrato, indicando maior interação entre BAC e as proteínas (Tabela 4). Assim como observado para P<sub>máx</sub>, uma vez que BAC apresenta maior conteúdo de lignina, pode ser sugerido que a maior quantidade de lignina no bagaço seja responsável pelo aumento do coeficiente de partição.

A adsorção não produtiva de enzimas na lignina diminui o rendimento da sacarificação e demanda altas dosagens de enzimas para melhorar a eficiência do processo (BÖRJESSON *et al.*, 2007; LOU *et al.*, 2013). Assim como os resultados observados na Tabela 4, Lu *et al.*, 2002 e Qi *et al.*, 2011 também encontraram valores de Kp superiores para substratos com altos teores de lignina. Zheng *et al.* (2016) relataram diferentes valores de Kp de celulasas para diferentes substratos, evidenciando que a presença da lignina no substrato além de aumentar os sítios de adsorção com as enzimas, também promove um aumento da força de interação entre lignina e enzimas.

### **5.3.1. Distribuição de enzimas do extrato de *C. cubensis* nos bagaços de cana pré-tratados**

A adsorção de enzimas sobre a biomassa lignocelulósica é de fundamental importância para o entendimento da eficiência da hidrólise enzimática. A distribuição de celulasas e hemicelulasas, bem como das proteínas totais do extrato de *C. cubensis* nos dois tipos de substratos (BAL e BAC) durante os experimentos de adsorção em condições não hidrolíticas, foi avaliada. A distribuição de  $\beta$ -glicosidase, celobiohidrolase, endoglucanase e xilanase revela perfis de adsorção únicos para cada enzima (Figura 2).

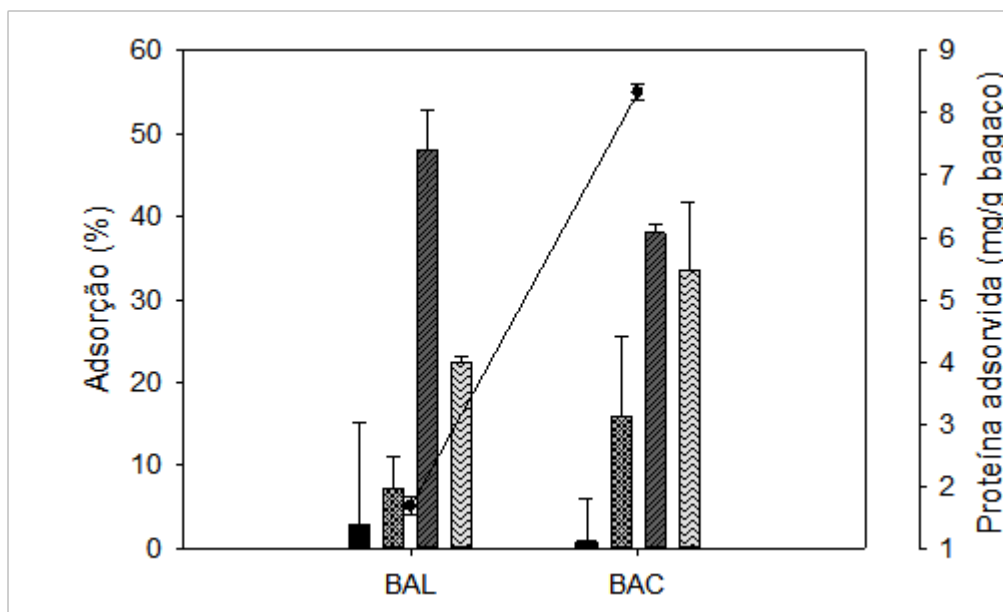


Figura 2: Distribuição de enzimas e proteína total de *C. cubensis* nos bagaços pré-tratados alcalino (BAL) e ácido (BAC). A porcentagem de adsorção das enzimas e proteína total foi calculada pela quantificação de proteínas e das atividades enzimáticas residuais a partir do experimento de adsorção em condições não hidrolíticas (4 °C), utilizando 50 mg de proteína do extrato de *C. cubensis*/g bagaço.  $\beta$ -glicosidase (■), celobiohidrolase (▨), endoglucanase (▧), xilanase (▩) e proteína (—▲).

A quantidade de proteína do extrato de *C. cubensis* adsorvida em BAC foi em torno de 8 mg por grama de bagaço, enquanto que em BAL foi em torno de 2 mg por grama de bagaço (Figura 2). Neste experimento foram usados 50 mg de proteínas do extrato de *C. cubensis* por grama de bagaço. Assim, cerca de 20% das proteínas ficaram adsorvidas em BAC e apenas 8% adsorvidas em BAL. Uma vez que esses bagaços diferem basicamente nas concentrações de hemicelulose e lignina, e esta última tem sido identificada como a fração responsável pela maior adsorção de proteínas, realmente era de se esperar que BAC, por conter maior concentração de lignina, apresentasse maior capacidade de adsorção de proteínas, comparado ao BAL. O extrato de *C. cubensis* contém uma alta concentração de proteínas, sendo que apenas parte dessas proteínas corresponde às enzimas com atividade hidrolítica sobre os carboidratos da biomassa, assim como relatado para fungos fitopatogênicos (KIM *et al.*, 2016).

A análise da adsorção das diferentes enzimas sobre os dois tipos de bagaço mostrou que a porcentagem de adsorção de  $\beta$ -glicosidase nas condições experimentais foi bastante reduzida, cerca de 3% e 1% em BAL e BAC, respectivamente, considerando a atividade de  $\beta$ -glicosidase inicialmente presente no extrato de *C.*

*cubensis* (Figura 2). Esse resultado é similar com outros perfis de adsorção de  $\beta$ -glicosidases descritos na literatura. A  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus niger* sofreu baixa adsorção na lignina derivada de cerne de madeira (8-11%) (BERLIN *et al.*, 2006), e se apresentou majoritariamente livre no sobrenadante durante a hidrólise de madeira pré-tratada a vapor (SIPOS *et al.*, 2010). Lu *et al.* (2002) também verificaram que 72,9% da atividade de  $\beta$ -glicosidase estava livre no sobrenadante após a hidrólise do resíduo de madeira pré-tratado com explosão a vapor Douglas-fir. Puls *et al.* (1985) revelaram que quase 100% da atividade original de  $\beta$ -glicosidase se encontrava livre no sobrenadante após a hidrólise e fermentação simultânea da celulose. Existem várias discordâncias sobre a presença ou não do domínio CBD nas  $\beta$ -glicosidases, que seria responsável pela interação das enzimas com a celulose de modo a promover sua hidrólise, mas também poderia promover a adsorção inespecífica das enzimas na lignina (JØRGENSEN; PINELO, 2016).

A celobiohidrolase adsorveu cerca de 7% e 16% nos bagaços pré-tratados alcalino e ácido, respectivamente (Figura 2). Guo *et al.* (2014) descreveram que a celobiohidrolase de *Penicillium oxalicum* sofre adsorção nas diferentes ligninas testadas, assim como a celobiohidrolase de *Hypocrea jecorina*, em que apenas 10% desta encontrava-se livre em solução após a hidrólise de madeira de pinheiro pré-tratada a vapor (BÖRJESSON *et al.*, 2007). Os resultados mostrados na Figura 2 sugerem que celobiohidrolase de *C. cubensis* apresenta maior afinidade pelo substrato com maior conteúdo de lignina (BAC), enquanto a endoglucanase apresenta maior afinidade pelo substrato com menor conteúdo de lignina (BAL). Embora os altos valores dos desvios-padrão dos dados não nos permitam afirmar tal comportamento, resultados similares também foram reportados por outros autores (BERLIN *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2014). Os altos valores de desvio-padrão são decorrentes das características dinâmicas do processo de adsorção/dessorção de enzimas nos substratos, o que sugere essa variação, mesmo considerando todos os cuidados e padronização das condições dos ensaios enzimáticos.

A enzima com maior porcentagem de adsorção em ambos os substratos foi a endoglucanase, com cerca de 48 e 38% em BAL e BAC, respectivamente (Figura 2). Berlin e colaboradores (2006) verificaram que a endoglucanase foi a enzima mais fortemente adsorvida nas biomassas com diferentes conteúdos de lignina, variando de 17 a 84%. Similarmente, a endoglucanase do coquetel Celluclast 1.5L mostrou alto grau

de adsorção, e após a hidrólise de madeira de pinheiro pré-tratada a vapor, apenas 2% de enzima encontrava-se livre (SIPOS *et al.*, 2010). Estes resultados indicam que a adsorção da endoglucanase não parece ser muito afetada pelo conteúdo de lignina presente na biomassa, já que esta adsorveu majoritariamente na biomassa com menor conteúdo de lignina.

A xilanase adsorveu cerca de 20% e 30% em BAL e BAC, respectivamente (Figura 2). Há discordâncias na literatura quanto à possível adsorção ou não de xilanase na lignina. Guo *et al.* (2014) descreveram que a xilanase foi uma das enzimas que mais adsorveu em diferentes ligninas testadas. Estudos demonstram que as xilanases GH11 têm baixa afinidade por lignina, enquanto as xilanases GH10 podem adsorver mais nesse polímero (SAMMOND *et al.*, 2014; YARBROUGH *et al.*, 2015). Berlin *et al.* (2006) reportaram que a xilanase do coquetel Multifect adsorve de 11% a 39% nas ligninas testadas, similar ao valor encontrado neste trabalho. Ryu e Kim (1998) observaram que uma quantidade significativa da xilanase comercial Pulpzyme HC adsorve na lignina alcalina (Indulin AT).

Visto que para os ensaios de adsorção das enzimas de *C. cubensis* em BAC e BAL foram usados 50 mg de proteínas por grama de bagaço e que apenas parte deste conteúdo proteico foi capaz de adsorver nos bagaços testados, poderia se supor que a concentração de proteínas poderia afetar os perfis de adsorção das diferentes enzimas. Assim, a adsorção das enzimas de *C. cubensis* nos dois tipos de bagaço foi avaliada utilizando-se também concentrações iniciais de proteínas de 2,5, 5,0 e 10,0 mg de proteínas/g de bagaço (Figura 3).

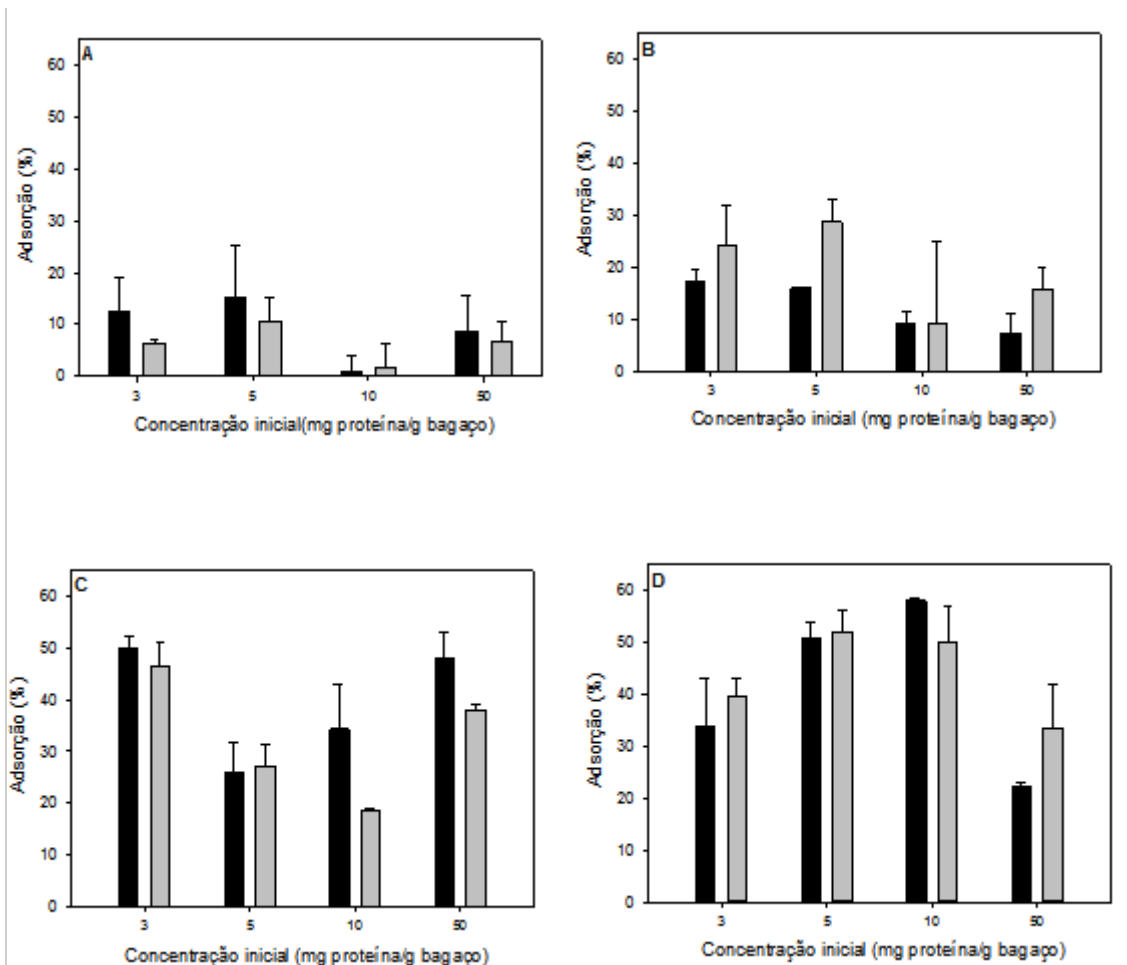


Figura 3: Distribuição de enzimas de *C. cubensis* nos bagaços pré-tratados alcalino, BAL (■) e ácido, BAC (▒). A porcentagem de adsorção das enzimas foi calculada pela quantificação das atividades enzimáticas residuais a partir do experimento de adsorção em condições não hidrolíticas, utilizando 2,5, 5,0, 10 e 50 mg de proteína do extrato de *C. cubensis* por g de bagaço. A: β-glicosidase; B: Celobiohidrolase; C: Endoglucanase; D: Xilanase.

De forma geral, parece que a adsorção relativa das enzimas nos bagaços foi maior utilizando concentrações de 2,5 a 10 mg de proteína do extrato de *C. cubensis* por g de bagaço, em relação à concentração de 50 mg de proteína por g de bagaço (Figura 3). Assim como as enzimas, outras proteínas presentes no extrato de *C. cubensis* podem adsorver no bagaço e esta adsorção vai depender, além da afinidade de cada proteína pelo substrato, da concentração total de proteínas, que competem com as enzimas pela adsorção no substrato. Assim, maiores concentrações de proteínas totais possibilitariam menor adsorção de algumas enzimas. Levando em conta que adsorção improdutivo diminui a eficiência hidrolítica do extrato enzimático, a presença de outras proteínas,

que não enzimas, poderia exercer um efeito positivo, protegendo as enzimas desse tipo de adsorção, como relatado para BSA (albumina de soro bovino) (XU, FENG *et al.*, 2008).

Nas diferentes concentrações de proteínas do extrato testadas, os perfis de adsorção de  $\beta$ -glicosidase (Figura 3A) e endoglucanase (Figura 3C) nos bagaços mostraram, de forma geral, adsorção maior destas enzimas em BAL, comparada com a adsorção em BAC. Também foi confirmada a baixa adsorção de  $\beta$ -glicosidase, independente da composição do bagaço (Figura 3A). Independentemente da concentração de proteínas utilizada nos ensaios, os perfis de adsorção de celobiohidrolase (Figura 3B) e xilanase (Figura 3D) em BAC e BAL mantiveram, de forma geral, a mesma tendência de maior adsorção em BAC.

Estes ensaios de adsorção foram realizados a 4 °C, ou seja, em condições não hidrolíticas. A temperatura do ensaio da isoterma de Langmuir foi escolhida de modo a evitar hidrólise, pois seus produtos podem interferir na adsorção das proteínas no bagaço. Essa condição foi estabelecida devido a alguns requerimentos para utilização da isoterma de Langmuir como modelo de adsorção, tais como: cada sítio de adsorção deve se ligar a um soluto individual; deve ser estabelecido um equilíbrio dinâmico reversível no período de tempo da experiência e não deve existir nenhuma interação entre solutos na superfície que altere seu comportamento de adsorção (LATOUR, 2014).

#### **5.4. Perfil de adsorção de enzimas e proteínas durante a hidrólise dos bagaços de cana pré-tratados**

##### **5.4.1. Proteínas adsorvidas durante a hidrólise dos bagaços de cana**

De modo a verificar os perfis de adsorção de proteínas e enzimas do extrato de *C. cubensis* nos bagaços testados, sob condições reais de hidrólise, foram realizados experimentos de sacarificação com os dois tipos de substratos (BAL e BAC) a 50 °C. Alíquotas ao longo da sacarificação foram retiradas, centrifugadas e o conteúdo de proteínas presentes no sobrenadante foi quantificado. A Figura 4 apresenta o perfil de adsorção de proteínas durante a hidrólise do bagaço de cana pré-tratado alcalino e ácido por 24 h.

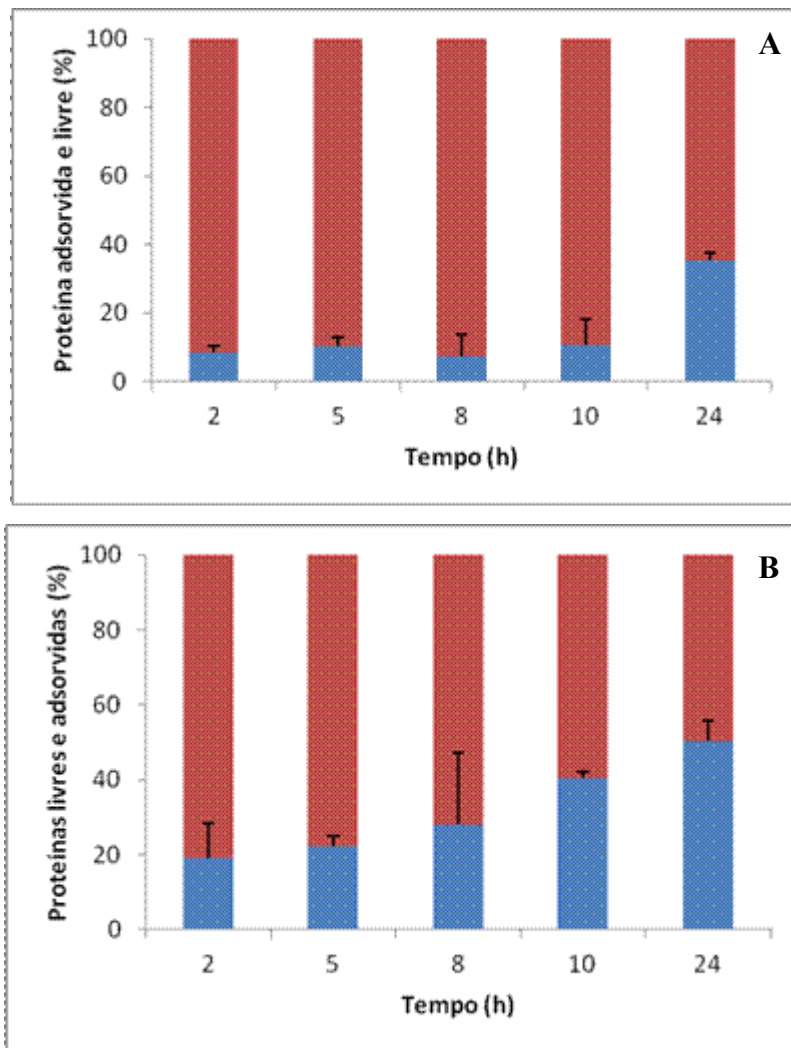


Figura 4: Perfil de adsorção de proteínas durante a hidrólise do bagaço pré-tratado alcalino, BAL (A) e ácido, BAC (B). Porcentagem de proteínas livres (■) e proteínas adsorvidas (■), ao longo de 24 h de hidrólise dos bagaços a 50 °C. A quantidade de proteína inicial utilizada no experimento foi estipulada como 100%.

A adsorção de proteínas nos bagaços aumentou com o tempo, e ao final da sacarificação de BAL (Figura 4A) e BAC (Figura 4B), cerca de respectivamente, 65% e 50% das proteínas do extrato de *C. cubensis* estavam livres no sobrenadante, respectivamente. Foi observada maior adsorção das proteínas ao longo da sacarificação em BAC (bagaço contendo maior quantidade de lignina). Lu *et al.* (2002) relataram que após 48h de hidrólise de Avicel (0% de lignina) e de um substrato contendo 46% de lignina, havia 85% e 30%, respectivamente, de proteínas presentes no sobrenadante, ou seja, não adsorvidas. Outro exemplo foi reportado por Qi *et al.* (2011), em que após 48 h de hidrólise de substratos com 20% e 3,6% de lignina, relatou cerca de 30% e 65%, respectivamente, de proteínas livres no sobrenadante.

A temperatura do ensaio de sacarificação interfere na quantidade de enzimas adsorvidas (MACHADO *et al.*, 2015). Pareek *et al.* (2013), ao analisarem a adsorção de proteínas do coquetel Celluclast 1.5L e Novozymes 188 na lignina isolada e em polissacarídeos, notaram que a 4 °C cerca de 10% e 70% das proteínas adsorveram na xilana beechwood e na lignina alcalina isolada, respectivamente. Já na temperatura de 45 °C, esse valor aumentou para 20% para a xilana beechwood e 80% para a lignina alcalina isolada. Zheng *et al.* (2013) também relataram que um aumento na temperatura de 4 °C para 50 °C resultou num acréscimo de 10 vezes na capacidade da lignina de adsorver proteínas.

Similarmente ao resultado encontrado nos ensaios de adsorção de proteínas de *C. cubensis* nos bagaços sob condições não hidrolíticas (item 5.3.1), no qual o bagaço com maior conteúdo de lignina (BAC) apresentou maior capacidade de adsorção de proteínas, observa-se que este cenário ocorreu também nas condições reais de hidrólise (50 °C). Esses dados são esperados, visto que com o aumento da quantidade de lignina presente no substrato, maior a possibilidade de ocorrer interações inespecíficas e não produtivas entre proteínas e lignina (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; SAINI *et al.*, 2016).

#### **5.4.2. Análise da termoestabilidade das enzimas de *C. cubensis***

A atividade das enzimas durante a etapa de hidrólise das biomassas pré-tratadas é influenciada negativamente principalmente pelas interações inespecíficas e não produtivas entre enzimas e os componentes do bagaço, especialmente a lignina; mas também pela inibição das enzimas pelos produtos de hidrólise e por compostos gerados durante o pré-tratamento das biomassas; e pela perda da estabilidade das enzimas em função da temperatura e tempo de exposição (termoestabilidade) (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). Durante os ensaios de sacarificação, que geralmente ocorrem durante um tempo prolongado, de 24 a 72 h, em temperatura em torno de 50 °C, a perda da atividade enzimática devido à baixa termoestabilidade das enzimas, pode ser um fator importante, que associado principalmente à perda da atividade por adsorção, resulta em uma menor eficiência das misturas enzimáticas. A avaliação da termoestabilidade das enzimas de *C. cubensis* foi realizada, de modo a mensurar o valor

da perda de atividade gerada pela desnaturação das enzimas por efeito de temperatura durante 24 h a 50 °C (Figura 5).

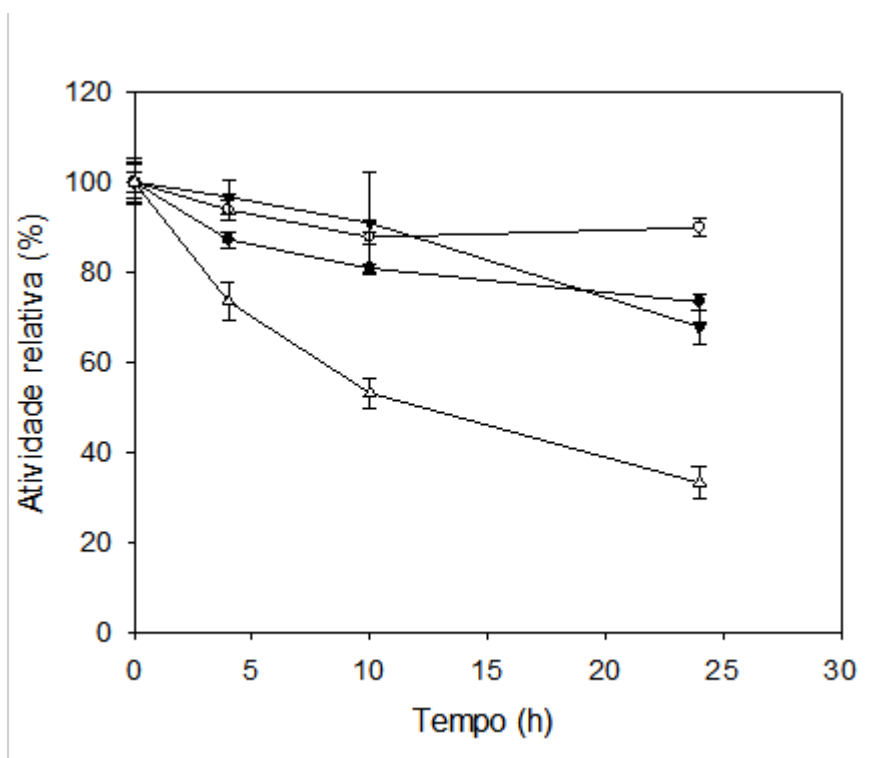


Figura 5: Efeito da temperatura na estabilidade da β-glicosidase (—●—), celobiohidrolase (—□—), endoglucanase (—▲—) e xilanase (—△—) de *C. cubensis*. O extrato enzimático foi incubado a 50 °C por 24 h. As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade inicial como 100%.

As atividades de β-glicosidase e endoglucanase mantiveram cerca de 70% de sua atividade inicial após 24 h. A celobiohidrolase reteve cerca de 90% de sua atividade inicial após 24 h, apresentando elevada estabilidade térmica a 50 °C. A xilanase foi a enzima que apresentou menor estabilidade térmica nessa temperatura, retendo apenas 33% de sua atividade inicial após 24 h (Figura 5).

Rodrigues *et al.* (2014), ao estudarem o efeito da temperatura de 50 °C nas enzimas do coquetel Celluclast 1.5L e Novozymes 188, verificaram que após 24 h de incubação, as enzimas β-glicosidase, celobiohidrolase e endoglucanase apresentaram 85%, 66% e 64% de sua atividade inicial, respectivamente. A β-glicosidase do coquetel Novozyme 188 apresentou 100 % de sua atividade após 24 h a 45 °C, entretanto a 65 °C, a enzima perdeu toda sua atividade após 10 h de incubação (TU, 2006). A ocorrência de xilanases apresentando baixa estabilidade térmica foi descrita por vários autores. A xilanase de *Cryptococcus adeliae* perdeu 71 % e 95 % de sua atividade em 5 minutos,

após incubação a 40 °C e 50 °C, respectivamente (GOMES, J; GOMES; STEINER, 2000); enquanto a xilanase de *Bacillus tequilensis* da cepa ARMATI reteve 51% de sua atividade inicial após 4 h a 60 °C, (KHUSRO *et al.*, 2016).

Uma vez que durante o processo de hidrólise da biomassa, vários fatores podem promover redução na atividade enzimática, é difícil prever quanto da atividade perdida realmente reflete a perda pela adsorção improdutivo das enzimas (JØRGENSEN; PINELO, 2016; LU *et al.*, 2002), ou se a perda é devido à desnaturação pelo calor ou agitação mecânica durante a sacarificação (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

#### 5.4.3. Análise do perfil de adsorção das enzimas de *C. cubensis* em condições hidrolíticas

A atividade residual das enzimas de *C. cubensis* presentes no sobrenadante dos ensaios de hidrólise dos bagaços de cana pré-tratados alcalino e ácido a 50 °C por 24 h está representada na Figura 6.

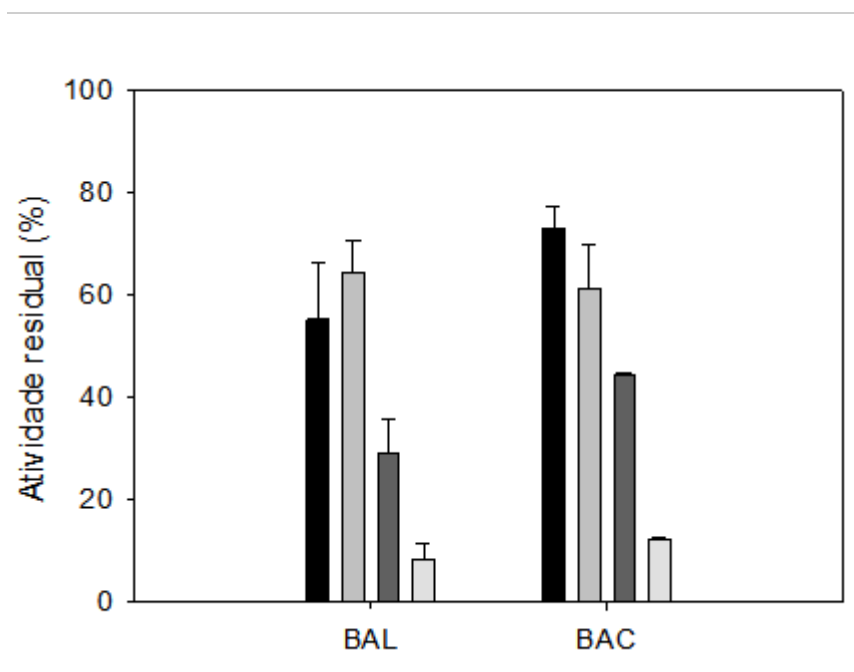


Figura 6: Atividade residual das enzimas β-glicosidase (■), celobiohidrolase(□), endoglucanase (■) e xilanase (□) no sobrenadante dos ensaios de hidrólise do bagaço de cana pré-tratado alcalino (BAL) e ácido (BAC), após 24 h a 50 °C. A atividade inicial foi considerada como 100%.

A atividade residual reflete as enzimas ativas, livres no sobrenadante, após o período de sacarificação. Uma vez que os ensaios de sacarificação foram realizados na mesma temperatura do ensaio de termoestabilidade, 50 °C, pode-se supor que as perdas de atividade em função da termoestabilidade possam ser consideradas nos ensaios de sacarificação. A fim de eliminar o efeito dos compostos inibidores gerados durante os pré-tratamentos ácido e alcalino do bagaço de cana, estes foram lavados após a etapa de pré-tratamento, para retirada desses compostos. Os produtos de hidrólise são também inibidores das enzimas, mas embora com algumas variações, esses produtos são gerados durante a sacarificação dos dois tipos de bagaço. Assim, pode-se supor que as diferenças na redução das atividades das enzimas de *C. cubensis*, que ocorrem durante a sacarificação de BAC e BAL, devam refletir principalmente as diferenças na capacidade de adsorção dessas enzimas, em função da composição de BAC e BAL. A atividade residual de  $\beta$ -glicosidase foi de aproximadamente 55 % e 75 % em BAL e BAC, respectivamente (Figura 6). Analisando a termoestabilidade dessa enzima, nota-se que cerca de 30 % da sua atividade foi reduzida, após o período de 24 h de incubação a 50 °C. Assim, sugere-se que durante a sacarificação de BAL, que apresenta menor conteúdo de lignina, pode ter havido ligeira maior adsorção de  $\beta$ -glicosidase, comparada com a sacarificação de BAC. Este resultado está de acordo com aquele anteriormente encontrado pela adsorção das enzimas de *C. cubensis* em condições não hidrolíticas.

A celobiohidrolase apresentou atividade residual de aproximadamente 60 % após o período de 24 h de sacarificação de BAL e BAC (Figura 6) e apresentou alta termoestabilidade a 50 °C, mantendo 9 % da atividade inicial (Figura 5). Assim, a perda de atividade observada pode ter sido decorrente, principalmente da adsorção dessa enzima. A atividade residual de endoglucanase, após a sacarificação de BAL e BAC, foi de aproximadamente 30% e 40%, respectivamente. Entretanto, esta enzima apresentou razoável termoestabilidade a 50 °C, mantendo em torno de 70 % da sua atividade inicial. Este resultado sugere que endoglucanase de *C. cubensis* pode ter significativa capacidade de adsorção nos bagaços ou perda de atividade por inibição pelos produtos. A xilanase foi a enzima que apresentou menor atividade residual após a sacarificação dos bagaços, cerca de 10% da atividade inicial (Figura 6) e também foi a enzima que mostrou menor termoestabilidade, mantendo apenas 33% da atividade inicial após 24 h a 50 °C (Figura 5).

O perfil de adsorção de uma xilanase purificada do coquetel Pulpzyme HC sobre lignina isolada revelou que grande quantidade da enzima foi capaz de adsorver na lignina a 40 °C (RYU; KIM, 1998). Berlin *et al.* (2006) reportaram que xilanases e celulasas são fortemente adsorvidas na lignina, sendo a  $\beta$ -glicosidase a enzima menos adsorvida. As celulasas apresentam alta afinidade pela celulose e a lignina, mas enquanto as celulasas ligadas à celulose retornam para a fase líquida, uma vez que esse polímero é completamente hidrolisado, as celulasas ligadas à lignina permanecem adsorvidas de forma não produtiva (YANG; WYMAN, 2006).

Após a hidrólise, é frequentemente observado que 40 a 50% ou até mesmo maiores quantidades de celulasas (celobiohidrolases e endoglucanases) permanecem adsorvidas sobre o resíduo rico em lignina (BERLIN *et al.*, 2005; TU; CHANDRA; SADDLER, 2007a; XU, FENG *et al.*, 2008). Yarbrough *et al.* (2015) reportaram que o perfil de enzimas ligadas à fração sólida durante a hidrólise aumenta com o aumento da concentração de lignina no meio.

A hidrólise de 24 h dos substratos BAL e BAC utilizando o extrato enzimático de *C. cubensis* resultou em maiores quantidades de açúcares na hidrólise de BAL (10,9 g/L de glicose e 8,68 g/L de xilose) em comparação a BAC (3,29 g/L de glicose e 1,55 g/L de xilose). O maior rendimento de hidrólise no bagaço com menor conteúdo de lignina é devido provavelmente ao fato de que a lignina além de agir como barreira física (FALKOSKI *et al.*, 2013a), impedindo as enzimas de atuarem sobre a celulose e hemicelulose, também é capaz de promover a adsorção das enzimas hidrolíticas de modo não específico (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007), como observado por outros autores (BERLIN *et al.*, 2006; KO *et al.*, 2015; YARBROUGH *et al.*, 2015).

De forma geral, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que, independente da composição do bagaço, especialmente no que se refere ao conteúdo de lignina, as enzimas de *C. cubensis* tiveram suas atividades reduzidas em diferentes extensões, devido principalmente, à adsorção não produtiva na lignina. Os perfis de adsorção das enzimas de *C. cubensis* nos substratos estudados, em condições não hidrolíticas (Figura 2) reforçam os resultados encontrados em condições reais de hidrólise dos bagaços de cana (Figura 6).

A significativa quantidade de proteínas de *C. cubensis* adsorvidas nos bagaços, observada em condições não hidrolíticas, pela isoterma de Langmuir e em condições de

hidrólise, indicam a possibilidade de recuperação e reutilização das mesmas de forma vantajosa no processo de sacarificação das biomassas. A dessorção dessas enzimas da biomassa residual e a sua reciclagem podem aumentar a eficiência da sacarificação. Para tal, procedeu-se com os ensaios de reciclagem enzimática, descritos a seguir.

## **5.5. Reciclagem enzimática**

Após análise do perfil de enzimas adsorvidas no material lignocelulósico com menor e maior quantidade de lignina, propôs-se uma metodologia que fosse capaz de recuperar tais enzimas adsorvidas ainda ativas. A reciclagem enzimática permite a recuperação de enzimas adsorvidas ainda com atividade, e se torna uma metodologia atrativa por promover a redução de custos na etapa de hidrólise enzimática (GREGG; BOUSSAID; SADDLER, 1998; LEE; YU; SADDLER, 1995; RAMOS; BREUIL; SADDLER, 1993; SINGH; KUMAR; SCHÜGERL, 1991).

Existem várias estratégias de reciclagem de enzimas, dentre elas, a adição de substratos frescos (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; VISSER *et al.*, 2015) e enzimas frescas (RODRIGUES; FELBY; GAMA, 2014; VISSER *et al.*, 2015) a cada ciclo de reciclagem. Neste trabalho três experimentos foram propostos para avaliar a reciclagem das enzimas durante os ciclos de sacarificação dos bagaços: adição de enzimas e substratos frescos (Experimento A), adição de enzimas frescas (Experimento B) e a adição de substratos frescos (Experimento C).

### **5.5.1. Hidrólise das biomassas**

Ao final de cada ciclo de sacarificação enzimática dos bagaços de cana, equivalente a 72 h, o sobrenadante foi retirado para quantificação dos açúcares liberados (Figura 7).

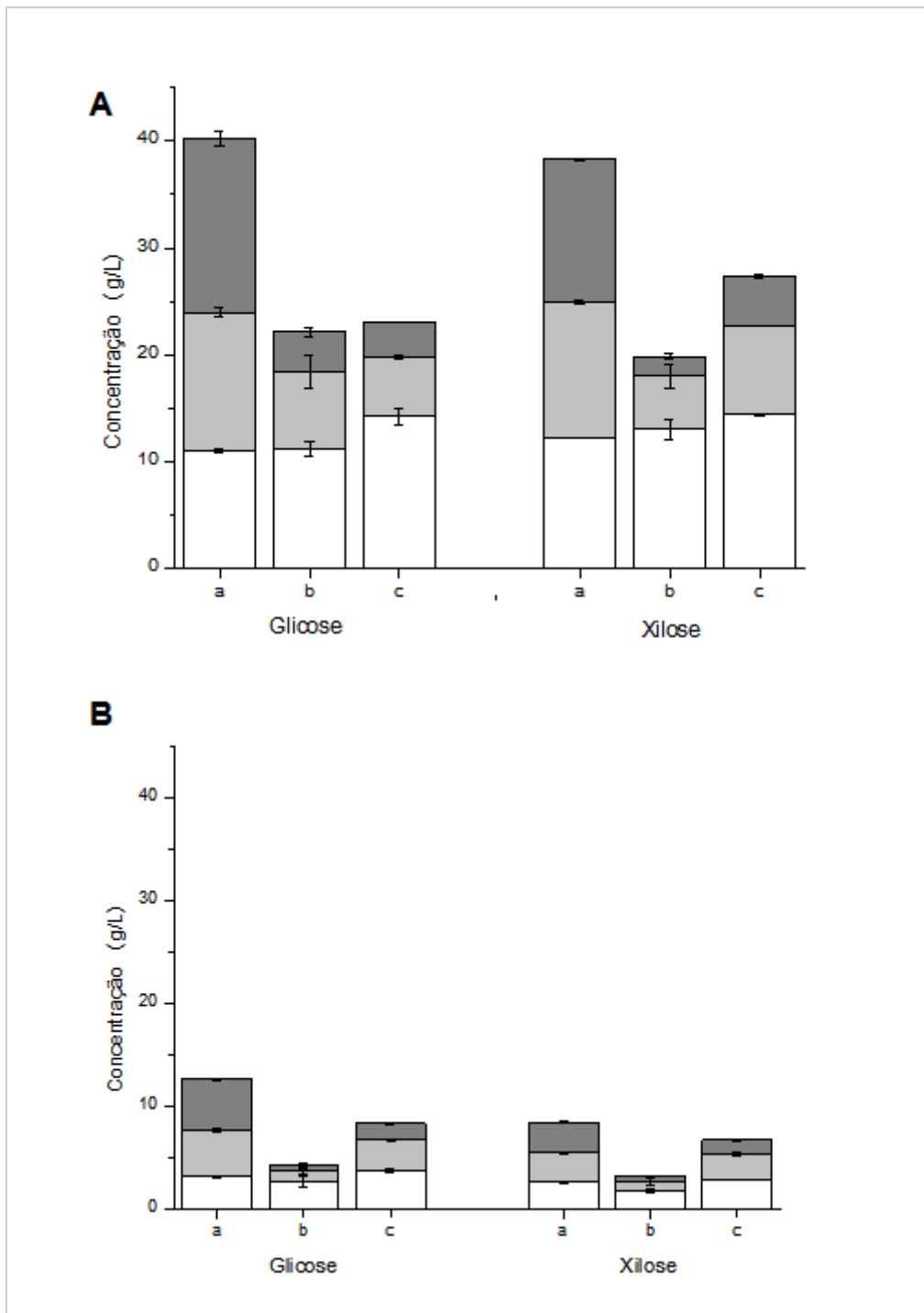


Figura 7: Concentração de glicose e xilose obtida nos 1º ciclo (□), 2º ciclo (▒) e 3º ciclo (■) dos experimentos de sacarificação com adição de enzimas e substratos frescos (a) , adição de enzimas frescas (b) e adição de substratos frescos (c), utilizando os bagaços pré-tratados: (A) Bagaço pré-tratado alcalino (B) Bagaço pré-tratado ácido.

Em todos os ciclos de sacarificação, nas diferentes condições testadas, o substrato com menor concentração de lignina (BAL) promoveu liberação de maiores conteúdos dos açúcares glicose e xilose, comparado ao substrato com maior conteúdo de lignina (BAC). Este resultado comprova o efeito negativo da lignina na hidrólise de glicana e xilana dos bagaços. Tu *et al.* (2007b) observaram que nos sucessivos ciclos de reciclagem enzimática, o substrato contendo alto teor de lignina apresentou uma eficiência de hidrólise menor comparada com o substrato com baixo teor de lignina. Observa-se que ao fim dos segundo e terceiro ciclos, em todas as condições estudadas, ainda ocorreu liberação de glicose e xilose, assim como observado por outros autores (VISSER *et al.*, 2015; WEISS *et al.*, 2013).

A quantidade de açúcares liberados no segundo ciclo de hidrólise de BAL foi maior para o experimento A (12,9 g/L de glicose e 12,7 g/L de xilose), seguido do experimento C (8,84 g/L de glicose e 12,7 g/L de xilose) e do experimento B (7,22 g/L de glicose e 5,01 g/L de xilose). No terceiro ciclo os experimentos A, B e C promoveram a mesma ordem de quantidade de açúcares liberados, como observado no segundo ciclo, 16,3 g/L de glicose e 13,4 g/L de xilose em A; 6,64 e 9,25 g/L para glicose e xilose, respectivamente, em C; e 3,76 g/L de glicose e 1,83 g/L de xilose em B.

A quantidade de açúcares liberados no segundo ciclo de hidrólise de BAC foi maior nos experimentos C (4,73 g/L e 4,13 g/L de glicose e xilose, respectivamente), seguido de A (4,47 g/L de glicose e 2,87 g/L de xilose) e de B (0,64 e 0,58 g/L de glicose e xilose, respectivamente). Já ao fim do terceiro ciclo, a quantidade de açúcares liberados seguiu o mesmo padrão observado nos ciclos de hidrólise de BAL, ou seja, o experimento A promoveu maior quantidade de açúcares liberados (4,96 e 2,92 g/L de glicose e xilose, respectivamente), seguido de C (3,01 g/L de glicose e 2,62 g/L de xilose) e de B (0,64 e 0,58 g/L de glicose e xilose, respectivamente).

O experimento A, no qual substrato e enzimas frescas foram adicionados ao fim de cada ciclo, promoveu a maior liberação de açúcares para ambos os bagaços. Em seguida, o experimento C, no qual ocorreu somente adição de substratos, e por fim, o experimento B, em que ocorreu somente a adição de enzimas (Figura 7). Esses resultados também foram observados por Visser *et al.* (2015).

De modo interessante, no experimento C, mesmo sem a adição de enzimas ao longo dos ciclos, ainda houve liberação de açúcares ao final dos segundo e terceiro

ciclos. Em C, mesmo sem adição de enzimas e com adição apenas de BAL nos segundo e terceiro ciclos, houve liberação de glicose de maneira notavelmente similar ao experimento B, no qual houve adição apenas de enzimas. Ainda pode-se notar que no experimento C, a liberação de xilose a partir de BAC foi similar ao experimento A para o BAC. Visser *et al.* (2015) notaram que no experimento em que não houve adição de enzimas frescas do blend *C. cubensis* e *P. pinophilum* também ocorreu liberação de glicose e xilose nos ciclos subsequentes. Desse modo, pelo resultado encontrado no experimento C, comprova-se que houve reciclagem das enzimas que se encontravam adsorvidas na biomassa. Essa constatação é devida ao fato de nesse experimento não ocorrer adição de enzimas frescas nos ciclos subsequentes de hidrólise. Como o sobrenadante contendo as enzimas livres é removido ao fim de cada ciclo de hidrólise, os açúcares liberados são provenientes da ação das enzimas que estavam adsorvidas e foram recuperadas ainda com atividade. Weiss *et al.* também notaram que a reciclagem realizada pela adição de substratos frescos liberou maiores quantidades de glicose comparada com a reciclagem em que se adicionou somente enzimas frescas (WEISS *et al.*, 2013). Este tipo de reciclagem apresenta elevada vantagem econômica, pois a utilização de enzimas acontece somente no primeiro ciclo, o que diminui os custos do processo.

Nos dois experimentos em que houve adição de substrato (A e C), a concentração de lignina no meio reacional tende a aumentar, uma vez que este polímero não é hidrolisado e acumula a cada adição do bagaço. De modo a verificar como o aumento da concentração de lignina no meio reacional interfere na hidrólise enzimática, foi averiguada a correlação entre a eficiência de conversão de glicana e o aumento da concentração de lignina no meio, para cada tipo de bagaço estudado, BAL e BAC, durante os segundo e terceiro ciclos de hidrólise dos experimentos A e C (Figura 8).

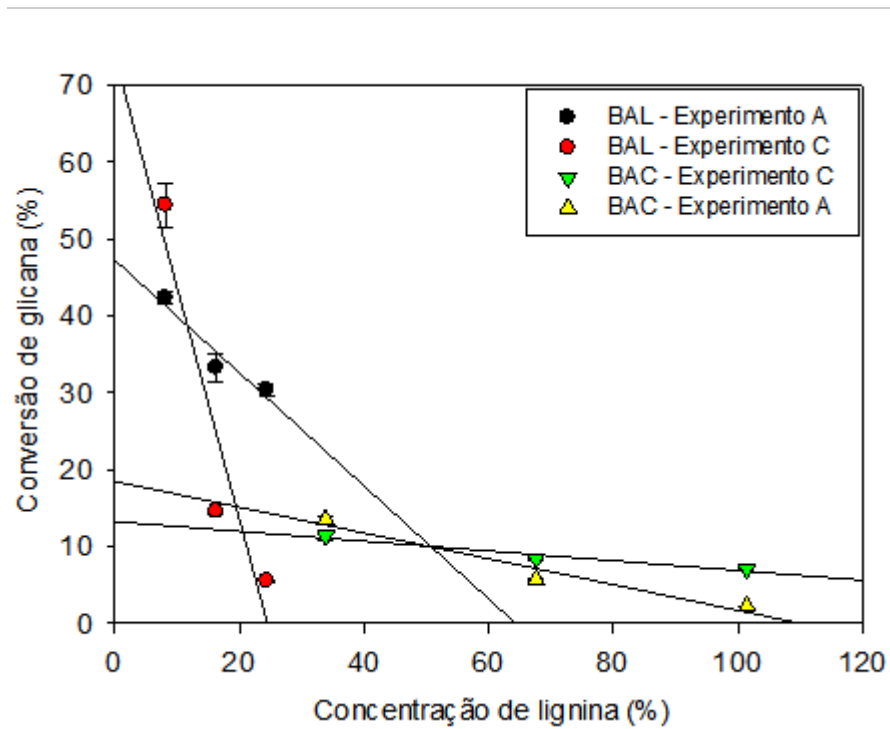


Figura 8: Relação entre eficiência de conversão de glicana com a porcentagem de lignina teórica presente na fração sólida a cada ciclo de hidrólise nos experimentos com adição de enzimas e substratos frescos (A) e com adição de substratos frescos (C), utilizando os substratos BAL e BAC.

A inclinação da linha de tendência mostra a correlação entre a concentração de lignina e a conversão de glicana durante os ciclos de hidrólise enzimática de BAL e BAC (Figura 8). Quanto maior for a inclinação da linha de tendência, maior será o coeficiente angular da reta, e maior será a eficiência de hidrólise de glicana para o substrato analisado (Tabela 5). Sendo assim, a maior conversão de glicana a partir de BAL foi verificada no experimento A, confirmando os resultados encontrados na Figura 7. Para o BAC é interessante notar que as linhas de tendência geradas a partir dos experimentos A e C são similarmente inclinadas (Tabela 5), indicando que a eficiência de hidrólise da glicana nesses dois experimentos foi similar, como pode ser verificado na Tabela 5.

Tabela 5: Comparação do coeficiente angular com a conversão de glicana para cada substrato durante os experimentos de reciclagem A e C.

Reta	Coeficiente angular	Conversão de glicana (%) <sup>a</sup>
BAL - Experimento A	-0,73	44,2
BAL - Experimento C	-3,01	13,3
BAC- Experimento A	-0,06	13,1
BAC- Experimento C	-0,16	12,5

<sup>a</sup>A conversão de glicana foi calculada pela soma da conversão de glicana nos três ciclos dos experimentos A e C.

No experimento B, no qual não ocorre adição de sólidos ao longo dos ciclos de hidrólise, a concentração de lignina permanece a mesma do início ao fim do experimento, já que este polímero não é hidrolisado (VISSER *et al.*, 2015). Sendo assim, não é possível construir uma linha de tendência para esse tipo de reciclagem. Entretanto, é notável a maior conversão de glicana para o substrato com menor concentração de lignina (BAL), comparado ao substrato com maior conteúdo de lignina (BAC), conforme observado nos resultados anteriores.

### 5.5.2. Perfil de proteínas adsorvidas

De modo a verificar o perfil de proteínas adsorvidas durante os experimentos A, B e C, ao fim de cada ciclo de hidrólise, o sobrenadante foi retirado e avaliado quanto ao conteúdo de proteínas. A quantidade de proteína adsorvida nos experimentos foi calculada considerando a quantidade de proteína total presente no extrato enzimático, já que a quantidade de proteína calculada nos bagaços foi desprezível.

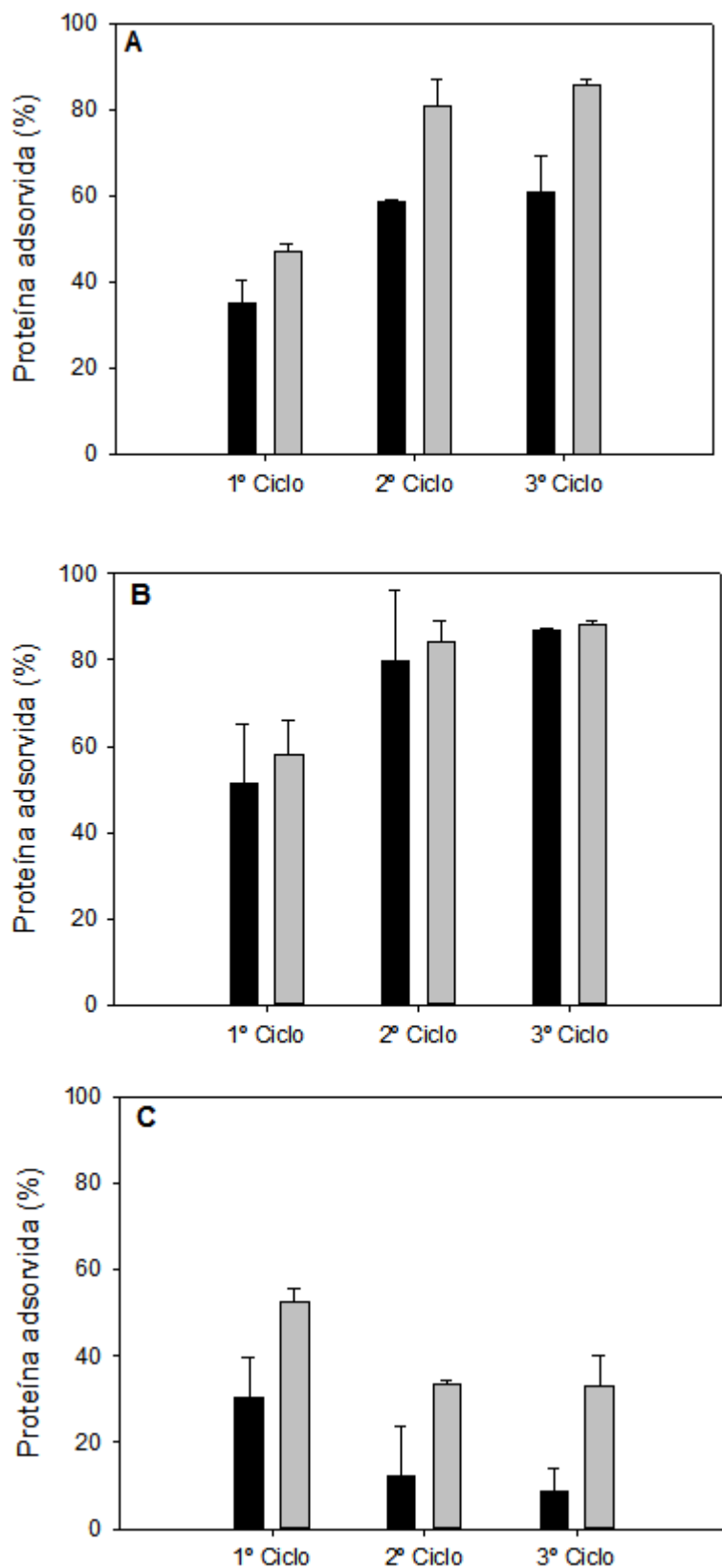


Figura 9: Perfil de adsorção de proteínas ao fim de cada ciclo de hidrólise dos bagaços BAL (■) e BAC (▒), nos experimentos com adição de enzimas e substratos frescos (A), adição de enzimas frescas (B) e adição de substratos frescos (C).

Nos três tipos de experimentos, A, B e C, ocorreu uma maior adsorção de proteínas no substrato com maior concentração de lignina (BAC) (Figura 9). A eficiência da reciclagem de celulases de *Trichoderma reesei* está diretamente ligada com a afinidade das enzimas pelo substrato, sendo que o substrato com baixo conteúdo de lignina facilita a readsorção das enzimas em substratos frescos, de modo contrário ao substrato com alto conteúdo de lignina (TU; CHANDRA; SADDLER, 2007b). Com isso, demonstra-se o efeito prejudicial que a lignina apresenta sobre as estratégias de reciclagem de enzimas.

A quantidade de proteínas adsorvidas nos experimentos A e B aumentou a cada ciclo de hidrólise. Isso aconteceu principalmente porque nesses dois experimentos ocorreu adição de enzimas frescas nos sucessivos ciclos. Com o aumento da quantidade total de proteína presente em solução no fim de cada ciclo (Proteína total = Proteína adsorvida + Proteína adicionada), a quantidade de proteínas adsorvidas se tornou maior. Nesses dois experimentos em que ocorreu a adição de enzimas frescas, a maior quantidade de proteínas livres no sobrenadante foi detectada em A, utilizando BAL (Tabela 6). Já para BAC, rico em lignina, o perfil de adsorção de proteínas foi similar para ambos experimentos, A e B (Figura 9), demonstrando o quanto a lignina interfere negativamente no experimento de reciclagem, promovendo uma igual adsorção de proteínas em ambos os tratamentos, mesmo para aquele que recebe substratos frescos.

Tabela 6: Proteínas livres em solução após os ciclos de hidrólise dos bagaços pré-tratados alcalino (BAL) e ácido (BAC), nos experimentos com adição de enzimas e substratos frescos (A); adição de enzimas frescas (B) e adição de substratos frescos (C).

	BAL (%) <sup>a</sup>			BAC (%) <sup>a</sup>		
	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo
A	64,7 ± 4,9	28,2 ± 0,9	21,4 ± 4,9	52,8 ± 1,9	15,7 ± 0,9	8,33 ± 1,1
B	48,8 ± 13	21,8 ± 4,9	8,6 ± 0,3	42,2 ± 8,1	14,4 ± 0,4	8,9 ± 0,9
C	56,3 ± 9,4	41,8 ± 4,8	23,1 ± 1,2	47,5 ± 3,1	36,3 ± 0,4	1,4 ± 0,3

<sup>a</sup> Os valores em porcentagem foram calculados em relação ao total de proteínas presentes em solução (proteínas adsorvidas + proteínas adicionadas) que foi considerado como 100%.

No experimento B para ambos os substratos, no segundo e terceiro ciclos, ocorreu uma adsorção de proteínas similar (Figura 9B), sugerindo que os possíveis sítios de interação entre biomassa e proteína podem ter sido esgotados a partir do 2º ciclo. Assim, mesmo com a adição de enzimas frescas, não ocorreu um aumento relevante na quantidade de proteínas adsorvidas. Já no experimento C, a quantidade de proteína total adsorvida, ao fim de cada ciclo, diminuiu (Figura 9C). É interessante notar que o experimento C proporcionou maior recuperação total de proteínas (Tabela 6), justamente por ser aquele no qual houve menor quantidade de proteína adicionada, o que pode ter permitido uma maior recuperação destas ao longo dos ciclos.

### **5.5.3. Perfil de enzimas adsorvidas**

A recuperação de enzimas é influenciada pela sua adsorção na biomassa, especialmente na lignina (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). A ligação de celulasas à lignina tem sido comumente considerada como sendo uma das principais formas de inibição enzimática no processo de conversão da biomassa lignocelulósica (RAHIKAINEN *et al.*, 2011). Para avaliar a recuperação das enzimas de *C. cubensis* durante os experimentos de reciclagens A, B e C, analisou-se o perfil de enzimas livres após cada ciclo de hidrólise (Figura 10) e os resultados da recuperação de cada atividade enzimática estão apresentados na Tabela 7.

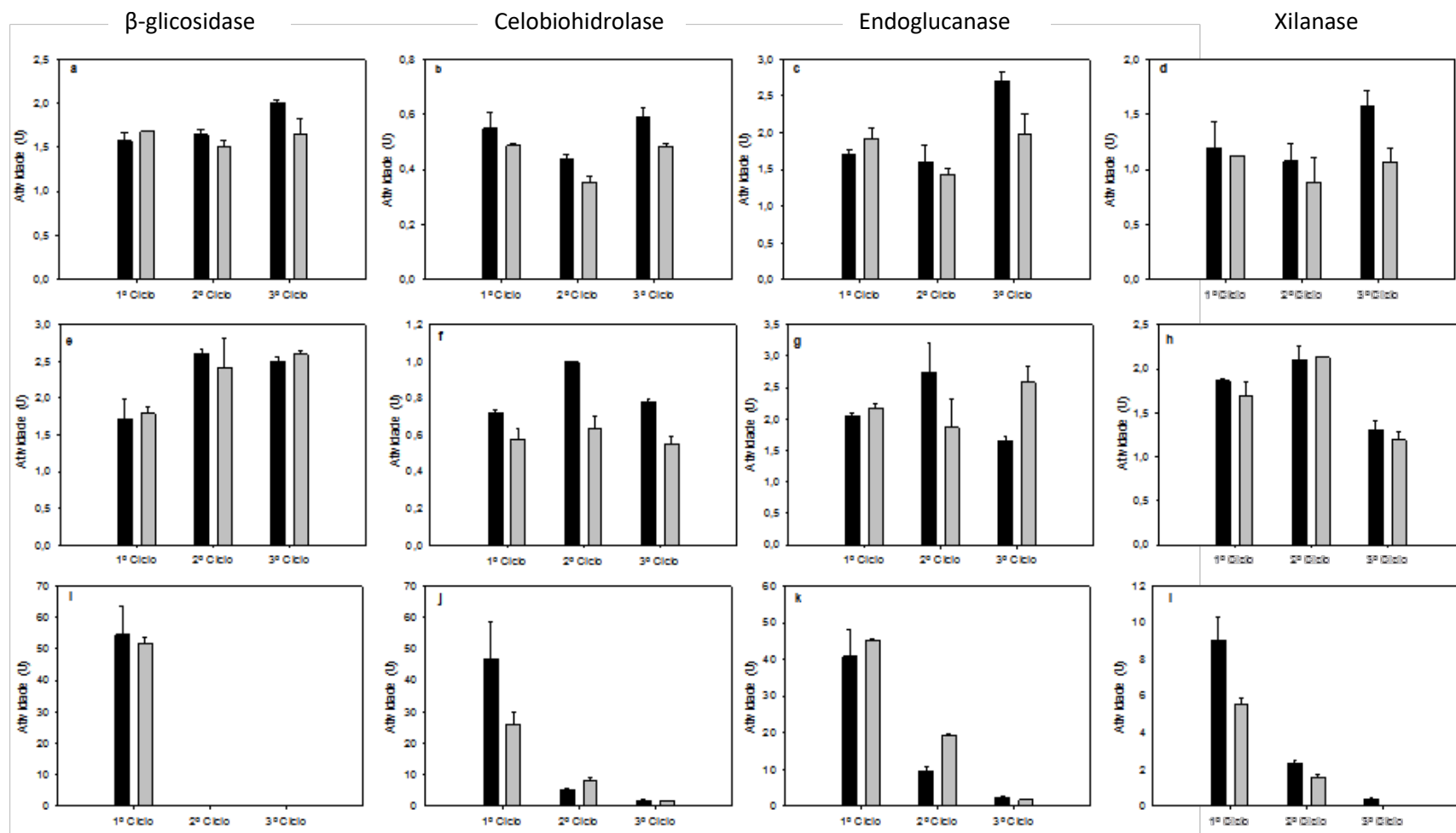


Figura 10: Atividades enzimáticas livres ao fim de cada ciclo de hidrólise de BAL (■) e BAC (▒), durante os experimentos A, B e C. β-glicosidase: Experimentos A (a), B (e) e C (i); Celobiohidrolase: Experimentos A (b), B (f) e C (j); Endoglucanase: Experimentos A (c), B (g) e C (k); Xilanase: Experimentos A (d), B (h) e C (l).

Tabela 7: Recuperação das atividades enzimáticas ao final dos experimentos A, B e C.

Experimento	Atividade Enzimática	Recuperação total (%)	
		BAL	BAC
A*	$\beta$ -glicosidase	53,5 $\pm$ 5,4	48,2 $\pm$ 7,7
	Celobiohidrolase	32,5 $\pm$ 5,6	25,8 $\pm$ 2,4
	Endoglucanase	49,0 $\pm$ 9,8	43,3 $\pm$ 11
	Xilanase	7,6 $\pm$ 3,4	6,5 $\pm$ 2,2
B**	$\beta$ -glicosidase	69,9 $\pm$ 12	69,7 $\pm$ 16
	Celobiohidrolase	50,0 $\pm$ 7,4	34,3 $\pm$ 9,2
	Endoglucanase	52,4 $\pm$ 5,6	53,9 $\pm$ 18
	Xilanase	11,1 $\pm$ 1,8	10,5 $\pm$ 1,6
C***	$\beta$ -glicosidase	54,4 $\pm$ 9,2	51,6 $\pm$ 1,9
	Celobiohidrolase	50,4 $\pm$ 12	33,5 $\pm$ 4,5
	Endoglucanase	47,8 $\pm$ 6,4	56,7 $\pm$ 0,8
	Xilanase	11,5 $\pm$ 1,5	7,0 $\pm$ 0,4

\* Experimento com adição de enzimas e substratos frescos

\*\* Experimento com adição de enzimas frescas

\*\*\* Experimento com adição de substratos frescos

BAL: Bagaço pré-tratado alcalino; BAC: bagaço pré-tratado ácido

A análise da composição final do meio reacional da hidrólise é de extrema importância, pois determina qual fração da enzima estará livre em solução e qual fração permanecerá ligada ao sólido final, a qual requer um passo adicional para ser recuperada (GOMES *et al.*, 2015).

Nos experimentos A, B e C, o padrão de  $\beta$ -glicosidase livre foi semelhante para ambos os bagaços (Figura 10a, 10e e 10i), visto que essa enzima não adsorveu ou adsorveu muito pouco nos substratos analisados, como também observado nos resultados anteriores. No experimento realizado por Lu *et al.* (2002) foi observado que a quantidade de  $\beta$ -glicosidase que permanece livre após três ciclos de reciclagem foi de aproximadamente 72%, 71% e 57%, para o substrato com menor concentração de

lignina e 38%, 25% e 19%, para o substrato com maior conteúdo de lignina, o que demonstrou claramente que o substrato com maior conteúdo de lignina, além de aumentar a adsorção de enzimas, também interfere na capacidade de reciclagem das mesmas. É interessante notar que no experimento C, a  $\beta$ -glicosidase foi completamente recuperada ao final do primeiro ciclo, e não apresentou atividade nos ciclos seguintes (Figura 10i), reiterando os resultados previamente encontrados de que esta enzima não adsorve nos bagaços estudados.

A atividade de  $\beta$ -celobiohidrolase livre ao fim de cada ciclo de hidrólise de BAL foi maior, comparado com BAC (Figura 10b, 10f e 10j), indicando que esta enzima exibiu maior caráter de adsorção em BAC, como também indicado pelos resultados anteriores (Figuras 2, 3 e 6). Como esta enzima se apresentou mais livre em BAL, substrato de menor concentração de lignina, esta exibiu maior recuperação neste tipo de substrato (Tabela 7). É evidente que o aumento da quantidade de enzimas na fase líquida afeta significativamente a recuperação das mesmas quando são readsorvidas em substratos frescos (TU; CHANDRA; SADDLER, 2007a, b). A maioria das celulasas do coquetel Celluclast 1.5 FG L e Novozym 188 se apresentavam livres na fração líquida, após a reciclagem enzimática, apresentando ainda atividade e capacidade de adsorver em substratos frescos (RODRIGUES *et al.*, 2012).

A endoglucanase (Figuras 10c, 10g e 10k) apresentou-se majoritariamente livre em BAC ao fim do 1º ciclo, em todos os experimentos, reiterando os resultados previamente encontrados (Figuras 2, 3 e 6). Entretanto, ao fim dos 2º e 3º ciclos do experimento A e ao fim do 2º ciclo do experimento B, a endoglucanase estava mais livre em BAL, o que também pode ser observado na Tabela 7. Isto sugere que provavelmente estes ciclos de hidrólise de BAL permitiram maior recuperação da endoglucanase. Com exceção da Cel12A, a maioria das endoglucanases de *T. reesei* apresentam domínio CBD (VIAKARI *et al.*, 2007), que além de interagir inespecificamente com a lignina, é responsável pela alta afinidade com a celulose (GOMES, *et al.*, 2015), o que acaba implicando na eficiência de reciclagem desta enzima. Lu *et al.* (2002) observaram que após os três ciclos de reciclagem enzimática, a porção de endoglucanase livre no sobrenadante foi aproximadamente de 80%, 56% e 48% para o substrato com menor teor de lignina e 40%, 32% e 17% para o substrato com maior conteúdo de lignina. Esta diferença provavelmente é devida às características do domínio CBD em endoglucanases. Tu *et al.* (2007b) observaram que as celulasas de *T. reesei* apresentaram

maior afinidade pelo substrato do que as celulases de *Penicillium sp.*, isto porque provavelmente esta última não apresentaria domínio CBD (JØRGENSEN *et al.*, 2003).

A xilanase apresentou-se predominantemente livre em BAL, ao fim dos ciclos de hidrólise de todos os experimentos de reciclagem testados, assim como nos resultados previamente obtidos (Figuras 2 e 3). Esta enzima apresentou baixa atividade residual no sobrenadante, o que pode ter sido principalmente devido à sua baixa estabilidade térmica (Figura 5). Contudo, percebe-se que esta enzima ainda apresentou atividade ao fim dos segundo e terceiro ciclos do experimento de reciclagem C (Figura 10). Isto sugere que mesmo apresentando baixa estabilidade térmica, o contato com os substratos BAL e BAC poderia ter protegido a molécula, de forma que esta ainda apresentasse atividade hidrolítica após 216 h. A maior quantidade de enzimas na fase líquida favorece sua recuperação (TU; CHANDRA; SADDLER, 2007a, b). Portanto, a maior quantidade dessa enzima livre nos experimentos de reciclagem de BAL, permitiu uma maior recuperação da mesma para esse tipo de bagaço (Tabela 7). Gonçalves *et al.* (2008), ao analisarem a reciclagem de uma xilanase comercial no bagaço de cana, verificaram que ao fim do primeiro tratamento, a quantidade de xilanase recuperada foi 7% em relação à quantidade inicial utilizada, e ao fim do segundo tratamento não foi possível recuperar nenhuma atividade de xilanase.

Como mencionado, a presença ou não de uma determinada enzima livre no sobrenadante afeta significativamente a eficiência de sua recuperação (TU; CHANDRA; SADDLER, 2007a, b). Portanto, de acordo com a Figura 10, a maioria das enzimas encontraram-se majoritariamente na fase líquida, nos experimentos de reciclagem utilizando o substrato de menor conteúdo de lignina (BAL), indicando que este permitiu a maior recuperação das mesmas. Essa hipótese é confirmada pelos resultados da Tabela 7, em que para a maioria das enzimas, o substrato BAL permitiu maior porcentagem de recuperação das atividades enzimáticas. Exceção foi a endoglucanase, que nos experimentos de reciclagem B e C, o substrato de maior conteúdo de lignina permitiu maior recuperação desta enzima. Este resultado é justificável, uma vez esta enzima se encontrou preferencialmente livre no substrato com maior concentração de lignina (BAC) (Figuras 2, 3 e 6), o que permitiu maior porcentagem de recuperação no mesmo.

As maiores quantidades de enzimas recuperadas ocorreu no experimento de reciclagem B (Tabela 7). Isto ocorre, pois provavelmente todos os sítios de interação entre proteína/enzima e lignina estão ocupados devido à falta de substratos frescos ao longo dos ciclos. Portanto, não havendo possibilidades de novas interações entre enzimas frescas e biomassa residual, a quantidade de enzimas livres no sobrenadante aumentou, acarretando em uma maior recuperação destas. Lindedam *et al.* (2013) conseguiram recuperar 59% e 41% da carga enzimática inicial da mistura comercial de Celluclast:Novozyme188 na reciclagem enzimática utilizando 25% de matéria seca. Também 90, 87 e 91% de endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase de *T. reesei* respectivamente, foram recuperadas na fração líquida da sacarificação da palha de trigo rica em lignina utilizando eluição com tampão fosfato (DESHPANDE; ERIKSSON, 1984).

Devido ao fato de nos experimentos de reciclagem A e B terem ocorrido adição de enzimas frescas, para conhecer o comportamento dessas enzimas ao longo dos ciclos de hidrólise, as atividades residuais foram avaliadas 2 horas após a adição das enzimas nos segundo e terceiro ciclos e ao final dos três ciclos (Figura 11).

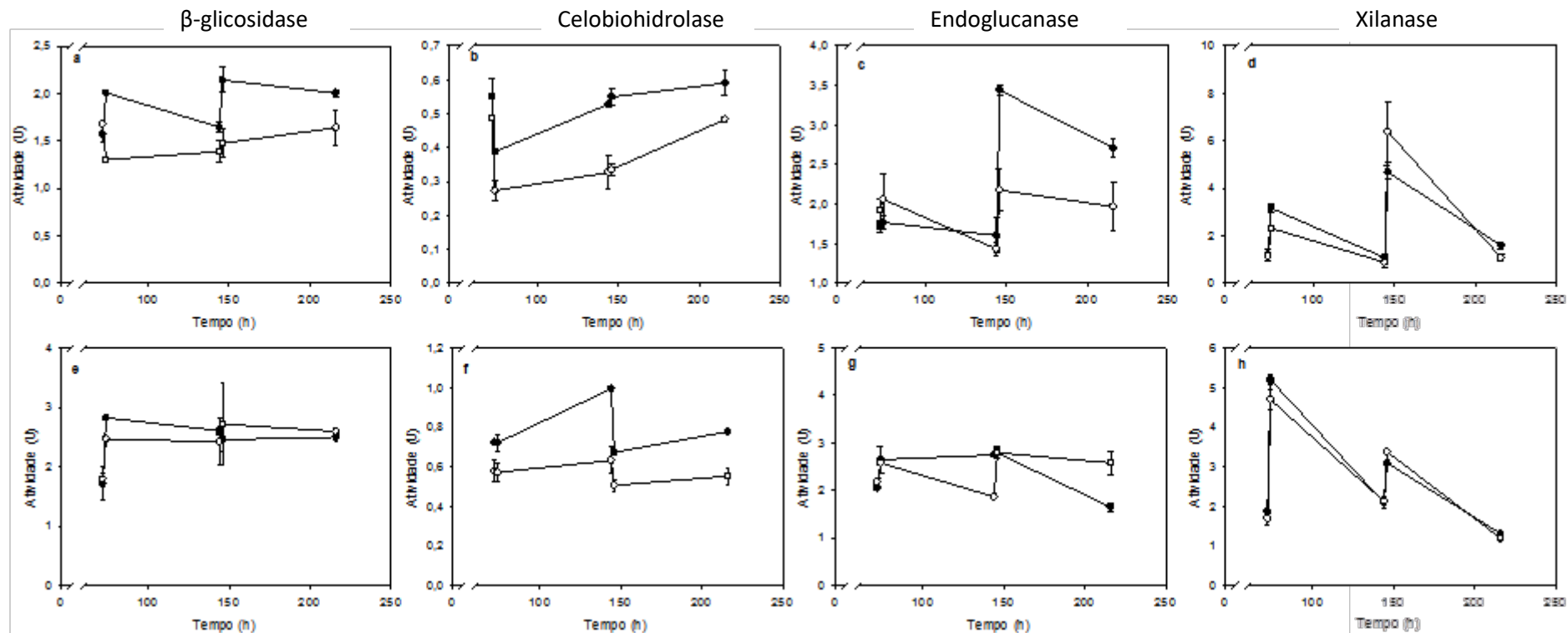


Figura 11: Atividade das enzimas livres após 72, 74, 144, 146 e 216 horas das reciclagens A e B utilizando os substratos BAL (●) e BAC (○). Reciclagem A: β-glicosidase (A), β-celobiohidrolase (B), Endoglucanase (C), Xilanase (D). Reciclagem B: β-glicosidase (E), β-celobiohidrolase (F), Endoglucanase (G), Xilanase (H)

A quantidade de enzima livre na fase líquida não é constante, esta muda ao longo da hidrólise (GOMES *et al.*, 2015). Como mencionando anteriormente, este processo dinâmico depende de vários fatores, tais como: da afinidade das enzimas pela celulose e pela lignina (PRIBOWO; ARANTES; SADDLER, 2012), da estrutura e composição do substrato (TU; CHANDRA; SADDLER, 2007a), e de múltiplos fatores ambientais (como por exemplo, pH e presença de surfactantes) (SEO; FUJITA; SAKODA, 2011).

De acordo com a Figura 11, observa-se que o perfil de enzimas livres logo após o início de cada ciclo das reciclagens A (Figura 11a-11d) e B (Figura 11e-11h) é similar, para ambos os bagaços, e que houve um comportamento único para cada enzima. Nas reciclagens A (Figura 11a) e B (Figura 11e), após 2 h a adição de enzimas (74 h e 146 h), a atividade de  $\beta$ -glicosidade aumentou na fase líquida, e em seguida diminuiu até o fim dos ciclos (144 h e 216 h). Esse perfil também pode ser observado nos dois tipos de reciclagem, para a endoglucanase (Figuras 11c e 11g) e para a xilanase (Figuras 11d e 11h). O conteúdo de enzimas adsorvidas ao longo da hidrólise aumenta, pois a lignina não é hidrolisada (VISSER *et al.*, 2015), gerando assim, um aumento na quantidade total de lignina presente na biomassa residual. Desse modo, as interações entre enzimas e lignina também tendem a aumentar, acarretando em uma menor quantidade de enzimas livres no sobrenadante.

A celobiohidrolase apresentou um perfil de adsorção distinto das outras enzimas (Figuras 11b e 11f). Para ambas reciclagens, após adição de enzimas, ou seja, 2 h após o início do novo ciclo (74 h e 146 h), a quantidade de celobiohidrolase livre diminuiu e aumentou consideravelmente ao final dos ciclos (144 h e 216 h). Provavelmente para a celobiohidrolase esse fato ocorreu devido a possíveis interações desta enzima na cadeia de celulose (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). A celobiohidrolase cliva a celobiose a partir da extremidade das cadeias de celulose (MAITAN-ALFENAS; VISSER; GUIMARÃES, 2015) de uma maneira processiva, isto é, a enzima não se dissocia da cadeia de celulose mas move-se sobre a superfície desta e continua a hidrolisar a mesma cadeia através de várias etapas (JØRGENSEN; PINELO, 2016; KOSTYLEV; WILSON, 2012). No início de cada ciclo de reciclagem, a concentração de celulose é alta e, supõe-se que ocorreu maior adsorção da celobiohidrolase na celulose. Como ao final dos ciclos a quantidade de celulose diminui, a celobiohidrolase tornou-se então mais livre em solução.

## 6. DISCUSSÃO GERAL

O bagaço pré-tratado ácido, com maior conteúdo de lignina, apresentou maior capacidade de adsorção de proteínas ( $P_{max}$ ) e maior o coeficiente de partição ( $K_p$ ) das proteínas do extrato de *C. cubensis*. Os resultados de adsorção das proteínas e enzimas de *C. cubensis* nos bagaços com maior (BAC) e menor (BAL) conteúdo de lignina, mostram que tanto nos experimentos de adsorção realizados em condições não hidrolíticas como nas condições reais de sacarificação (50 °C), o conteúdo de proteínas adsorvidas foi maior na biomassa com maior conteúdo de lignina, assim como observado por outros autores (LU *et al.*, 2002; NAKAGAME *et al.*, 2011; QI *et al.*, 2011; YARBROUGH *et al.*, 2015; ZHENG, YI; ZHANG; PAN, 2016). Pré-tratamentos que aumentam a concentração relativa de lignina na biomassa, como por exemplo, o pré-tratamento a vapor e o pré-tratamento ácido, resultam em mais locais de ligação de proteínas na superfície da lignina devido à preservação de grupos funcionais (hidroxil e benzil fenólicos) comparados a pré-tratamentos que diminuem o teor relativo de lignina, como por exemplo, a organosolv e o pré-tratamento alcalino (SERGEY M. SHEVCHENKO; SADDLER, 1999; TU; PAN; SADDLER, 2009).

Também, em condições de temperaturas mais elevadas, como em condições hidrolíticas a 50 °C, as adsorções entre biomassa e proteína aumentaram. Isso naturalmente ocorreu pois a adsorção de proteínas na superfície da lignina é considerada um processo endotérmico (PAREEK; GILLGREN; JONSSON, 2013). Assim, aumentando a temperatura do sistema, é favorecida a adsorção de proteínas na lignina. Além disso, um aumento na temperatura pode afetar a estrutura molecular das proteínas, expondo os resíduos hidrofóbicos destas, que apresentam um importante papel na adsorção de enzimas (BONOMO *et al.*, 2006).

A  $\beta$ -glicosidase de *C. cubensis* apresentou pouca ou nenhuma adsorção nos bagaços de cana, em todas as condições estudadas. Esta baixa adsorção da  $\beta$ -glicosidase nos bagaços estudados, leva à suposição de que esta enzima provavelmente não apresente o domínio CBD, assim como outros tipos de domínios que permitam a ligação desta enzima à lignina, como, por exemplo, o domínio catalítico hidrofóbico. Várias  $\beta$ -glicosidasas descritas na literatura também apresentaram baixa adsorção na lignina (BERLIN *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2002; PULS *et al.*, 1985; SIPOS *et al.*, 2010).

A adsorção da celobiohidrolase de *C. cubensis* no bagaço com maior conteúdo de lignina, BAC, foi mais acentuada em condições não hidrolíticas (na isoterma de Langmuir) do que em condições hidrolíticas, tanto na sacarificação por 24 h, quanto na sacarificação de 72 h nos ciclos de reciclagens testados. Para a TrCel7A (celobiohidrolase I) de *T. reesei*, é descrito que seu domínio CBD apresenta quatro resíduos aromáticos, todos eles sendo tirosinas, o que garante uma certa hidrofobicidade a este domínio. Como a lignina exibe maior caráter hidrofóbico do que a celulose (HODGSON; BERG, 1988), esta permite uma maior interação com a celobiohidrolase, comparada à celulose (SAINI *et al.*, 2016). Esta informação é confirmada por Vermass *et al.* (2015), que por simulação de dinâmica molecular atômica utilizando biomassa contendo celulose e lignina, sugeriu que a lignina de fato supera a celulose ao se ligar em locais de reconhecimento na superfície do domínio CBD da celobiohidrolase.

A endoglucanase de *C. cubensis* apresentou maior adsorção em ambos substratos testados, comparada à celobiohidrolase. O domínio CBD da Cel7B (endoglucanase I) apresenta cinco resíduos aromáticos. Quatro deles são tirosinas e um é um resíduo de triptofano, o que aumenta ainda mais a hidrofobicidade do domínio e permite uma maior adsorção nos substratos, tanto na lignina quanto na celulose cristalina ou amorfa (BÖRJESSON *et al.*, 2007). Além disso, a endoglucanase de *C. cubensis* adsorveu preferencialmente no bagaço com menor conteúdo de lignina em todos os experimentos. Sabe-se que a endoglucanase liga-se preferencialmente nas regiões amorfas da celulose (GUPTA; LEE, 2009; KOSTYLEV; WILSON, 2012; LE COSTAOUËC *et al.*, 2013). De acordo com Ibrahim *et al.* (2011), o pré-tratamento alcalino proporciona uma melhor descristalização da celulose e portanto, maior quantidade de celulose amorfa, comparado ao pré-tratamento com ácido sulfúrico (KOOTSTRA *et al.*, 2009). Desse modo, sugere-se que o bagaço em que foi realizado o pré-tratamento alcalino (BAL), provavelmente por conter maior quantidade de celulose amorfa, seria capaz de promover uma maior interação com a endoglucanase. A adsorção da endoglucanase Cel9A de *Thermobifida fusca* preferencialmente na celulose foi também relada por Kostylev *et al.* (2012), que descreveram que esta enzima se encontrava adsorvida na celulose pelo domínio CBM, mas que apresentava o domínio CD livre, acessível a outros substratos (como a celulose amorfa ou oligossacarídeos de glicose) e assim, não apresentava perda considerável de sua atividade catalítica. De acordo com as características do domínio CBM, este pode se apresentar de três tipos A, B e C. A

endoglucanase de *C. cubensis* parece conter o CBM do tipo B, de modo a apresentar maior afinidade pela celulose amorfa do que pela lignina, uma vez que apresentou maior adsorção no substrato com menor quantidade de lignina (Figuras 2, 3 e 6). O CBM do tipo A apresenta uma superfície hidrofóbica constituída de resíduos aromáticos que se ligam às superfícies de polissacarídeos cristalinos, como celulose ou quitina. De forma contrária, o tipo B exibe uma fenda de resíduos aromáticos que interagem com cadeias polissacarídicas livres, ligando-se principalmente na celulose amorfa, e até mesmo no resíduo de xilana. Já o tipo C, por apresentar restrições estéricas causadas pelo sítio de ligação, liga-se a monossacarídeos, dissacarídeos ou trissacarídeos (LIBERATO, 2013). A endoglucanase de *C. fini* também pertence ao grupo B do domínio CBM, e se liga preferencialmente na celulose amorfa (BORASTON *et al.*, 2002).

A xilanase de *C. cubensis* apresentou algumas divergências quanto à preferência de adsorção nos bagaços estudados. Entretanto, na maioria dos experimentos testados (isoterma de Langmuir, sacarificação e reciclagem), esta adsorveu principalmente no bagaço com maior conteúdo de lignina. A presença de xilanase no sobrenadante é esperada, já que a maioria das xilanases descritas, não apresenta o domínio CBM (YARBROUGH *et al.*, 2015) e, portanto, não realiza interações hidrofóbicas com a lignina. Entretanto, podem ocorrer interações não específicas do tipo van der Waals entre as porções não polares da lignina e as xilanases, assim como interações químicas entre a celulose e as xilanases (RYU; KIM, 1998). Estudos revelam que a lignina é capaz de promover uma maior adsorção de xilanases do que a própria xilana (PAREEK; GILLGREN; JONSSON, 2013; VÁRNAI *et al.*, 2011). Alguns estudos indicam que certas xilanases apresentam domínio CBM, o qual pode aumentar a adsorção destas enzimas na lignina (LAFOND *et al.*, 2011; WATANABE *et al.*, 2014). Por outro lado, foi verificado que a xilanase de *Nonomuraea flexuos* apresenta domínio CBM e este, interessantemente, diminui a adsorção não produtiva entre xilanase e lignina. (ZHANG *et al.*, 2013)

As enzimas que apresentaram maior adsorção nos bagaços foram a endoglucanase (calculada pelo experimento em condições não hidrolíticas) e a xilanase (calculada nos experimentos de hidrólise). Esta diferença pode ser devido à alteração na estrutura molecular das enzimas acarretada pelo aumento da temperatura do sistema, como mencionado anteriormente, o que provavelmente facilitaria a exposição dos aminoácidos hidrofóbicos das proteínas (BONOMO *et al.*, 2006). De acordo com

Sammond *et al.* (2014), a adsorção é provável de ocorrer para todas as enzimas, mas o real grau de interação depende de suas características de superfície.

Nos experimentos de hidrólise dos bagaços com os ciclos de reciclagem enzimática é notável a menor quantidade de açúcares liberados a partir do bagaço com maior conteúdo de lignina. Este resultado confirma a ação da lignina, que atua como barreira física, impedindo o acesso das enzimas à celulose e à hemicelulose (FALKOSKI *et al.*, 2013a), além de ser responsável pela adsorção de enzimas de forma inespecífica, impedindo a atividade hidrolítica (ERIKSSON; BÖRJESSON; TJERNELD, 2002; JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). Portanto, substratos ricos em lignina são capazes de adsorver maiores quantidades de enzimas, como observado anteriormente, o que possivelmente causa a diminuição da eficiência da reciclagem enzimática sobre esses substratos (RAMOS; BREUIL; SADDLER, 1993).

A adição simultânea de enzimas e substratos frescos no experimento de reciclagem A promoveu maior rendimento de hidrólise, provavelmente por proporcionar uma melhor reciclagem das enzimas adsorvidas, e pela presença constante de substratos frescos e enzimas disponíveis para hidrólise. Contrariamente, a reciclagem B foi a menos eficiente na hidrólise de glicana e xilana. Mesmo com a adição de enzimas nos ciclos de hidrólise, não ocorreu aumento da eficiência de sacarificação, provavelmente devido à baixa disponibilidade de substrato no meio reacional (GUPTA; LEE, 2009) e ao acúmulo de lignina, que aumenta a adsorção não produtiva das enzimas.

A notável liberação de açúcares ao fim dos segundo e terceiro ciclos do experimento de reciclagem C, ocorreu provavelmente devido à presença constante de substratos frescos, e principalmente devido à eficiente recuperação e reciclagem das enzimas de *C. cubensis* que se encontravam adsorvidas no material lignocelulósico residual, uma vez que neste experimento não houve adição de enzimas nos segundo e terceiro ciclos de hidrólise. Esse experimento confirma que realmente ocorreu a reciclagem das enzimas adsorvidas na biomassa, e que a liberação de açúcares ao fim dos segundo e terceiro ciclos de hidrólise decorreu da recuperação das enzimas ativas que se encontravam adsorvidas na biomassa residual. Mesmo com a utilização de baixa carga enzimática, nota-se que esta reciclagem foi capaz de gerar altas quantidades de glicose (22,5 g/L) e xilose (27,5 g/L) na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado alcalino. Isto reafirma o grande potencial de utilização do extrato enzimático de *C.*

*cubensis* na sacarificação da biomassa lignocelulósica em condições que permitam a reciclagem das enzimas, promovendo redução de custos do processo.

Mesmo que na biomassa residual, formada após cada ciclo de hidrólise, haja acúmulo de lignina, foi observado que a utilização do substrato com baixa concentração de lignina (BAL) não afetou negativamente o rendimento da sacarificação. Entretanto, a utilização do bagaço com alta concentração de lignina (BAC) nos sucessivos ciclos de reciclagem causou um efeito negativo no rendimento de glicose, devido provavelmente ao maior acúmulo de lignina no resíduo sólido. Entretanto, mesmo no experimento B, onde houve adição apenas de enzimas nos segundo e terceiro ciclos, o que favoreceu a hidrólise de glicana e xilana e o acúmulo de lignina na biomassa residual, ainda houve liberação de açúcares após o terceiro ciclo de hidrólise.

A reciclagem de enzimas nem sempre é possível. Para que esta ocorra, são necessários alguns requerimentos, tais como: (1) enzimas altamente estáveis, (2) um processo de hidrólise altamente eficiente e (3) um bom controle sobre o processo de adsorção/dessorção (GOMES, *et al.*, 2015). Os resultados deste trabalho mostram que a reciclagem de enzimas do extrato de *C. cubensis* foi possível, até mesmo em substratos com elevadas concentrações de lignina. Estes experimentos reafirmam o potencial promissor do extrato enzimático de *C. cubensis* em processos de sacarificação do bagaço de cana utilizando a reciclagem das enzimas, possibilitando redução de custos do processo de produção de etanol 2G.

## 7. CONCLUSÃO

Os estudos de adsorção realizados em condições não hidrolíticas (4 °C) e em condições hidrolíticas com o extrato enzimático de *C. cubensis*, revelaram maior capacidade de adsorção de proteínas desse extrato no substrato com maior conteúdo de lignina. Também foram observadas características de adsorções únicas para cada enzima, que são determinadas pela estrutura proteica da enzima, pela estrutura da lignina e pelas condições do ensaio.

Pelos experimentos de reciclagem enzimática foi confirmada a possibilidade de reciclar as enzimas do extrato de *C. cubensis*, mesmo nos experimentos em que se utilizou o bagaço com alta concentração de lignina. A reciclagem em que houve somente adição de substratos frescos demonstrou a eficiente capacidade de reciclar as enzimas de *C. cubensis*, com atividade mesmo após 216 h de hidrólise enzimática, de modo a confirmar o grande potencial do extrato enzimático obtido desse fungo. A maior quantidade de enzimas e proteínas livres na fração líquida durante a reciclagem não indica necessariamente maior eficiência de hidrólise. O conteúdo e o tipo de substrato, além das características estruturais das enzimas, devem ser analisados e considerados.

## 8. PERSPECTIVAS

A sacarificação da biomassa lignocelulósica utilizando reciclagem de enzimas proporciona altos rendimentos de hidrólise. Este processo pode ser otimizado pela diminuição das interações inespecíficas entre lignina e as enzimas lignocelulolíticas. Para tal, seria interessante determinar a composição das ligninas presentes nos bagaços pré-tratados, de modo a avaliar se as interações entre enzimas e lignina também estão sendo influenciadas pelos componentes da lignina. Além disso, deve-se determinar se as enzimas de *C. cubensis* apresentam domínio hidrofóbico capaz de interagir com a lignina e assim, selecionar enzimas com afinidade reduzida por esse polímero.

## 9. REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, Ahmed M.; SOLBIATI, Jose O.; CANN, Isaac K O. Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. **Advances in Applied Microbiology**. v. 82, p. 1–28, 2013.
- ADEN, Andy; FOUST, Thomas. Technoeconomic analysis of the dilute sulfuric acid and enzymatic hydrolysis process for the conversion of corn stover to ethanol. **Cellulose** v. 16, n. 4, p. 535–545 , 2009.
- ALFENAS, A.C. *et al.* **Clonagem e doenças do Eucalipto**. Editora UFV, 500 p, 2009.
- ARANTES, Valdeir; SADDLER, Jack N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for biofuels** v. 3, n. 4, p. 1–11 , 2010.
- BERLIN, Alex *et al.* Inhibition of cellulase, xylanase and beta-glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of biotechnology** v. 125, n. 2, p. 198–209 , 2006.
- BERLIN, Alex *et al.* Weak lignin-binding enzymes a novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 121, p. 163–170 , 2005.
- BOERBOOM, J H A; MAAS, W. Th. Canker of Eucalyptus grandis and E. saligna in Surinam caused by Endothia havanensis. **Turrialba** v. 20, n. 1, p. 94–99 , 1970.
- BONOMO, Renata C F *et al.* Hydrophobic interaction adsorption of whey proteins: Effect of temperature and salt concentration and thermodynamic analysis. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences** v. 844, n. 1, p. 6–14 , 2006.
- BORASTON, Alisdair B. *et al.* Differential oligosaccharide recognition by evolutionarily-related  $\beta$ -1,4 and  $\beta$ -1,3 glucan-binding modules. **Journal of Molecular Biology** v. 319, n. 5, p. 1143–1156 , 2002.
- BÖRJESSON, Johan *et al.* Effect of poly(ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology** v. 41, n. 1–2, p. 186–195 , 2007.

BOUFI, Sami *et al.* Nanofibrillated cellulose as an additive in papermaking process: A review. **Carbohydrate Polymers** v. 154, p. 151–166 , 2016.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** v. 72, n. 1–2, p. 248–254 , 1976.

BRUNER, SC. Una enfermedad gangrenosa de los eucaliptos. **Boletine** v. 37, p. 1–38 , 1917.

CANTU, Dario *et al.* Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. **Trends in Plant Science** v. 13, n. 11, p. 610–617, 2008.

DAVIN, Laurence B. *et al.* Dissection of lignin macromolecular configuration and assembly: Comparison to related biochemical processes in allyl/propenyl phenol and lignan biosynthesis. **Natural Product Reports** v. 25, n. 6, p. 1015, 2008.

DE GONZALO, Gonzalo *et al.* Bacterial enzymes involved in lignin degradation. **Journal of Biotechnology** v. 236, p. 110–119 , 2016.

DESHPANDE, M. V.; ERIKSSON, K. E. Reutilization of enzymes for saccharification of lignocellulosic materials. **Enzyme and Microbial Technology** v. 6, n. 8, p. 338–340 , 1984.

DING, Hanshu; XU, Feng. Productive Cellulase Adsorption on Cellulose. **Lignocellulose Biodegradation**. v. 889, p. 154–169, 2004.

EDENHOFER, O. R. **Summary for Policy Makers BT - IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation**. Cambridge UK: Cambridge University Press, 2011.

EL-ZAWAWY, Waleed K. *et al.* Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. **Carbohydrate Polymers** v. 84, n. 3, p. 865–871 , 2011.

ELGERSMA, Alfred V. *et al.* The adsorption of bovine serum albumin on positively and negatively charged polystyrene latices. **Journal of Colloid And Interface Science** v. 138, n. 1, p. 145–156 , 1990.

ERIKSSON, Torny; BÖRJESSON, Johan; TJERNELD, Folke. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology** v. 31, n. 3, p. 353–364 , 2002.

FALKOSKI, Daniel Luciano *et al.* Chrysosporthe cubensis: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology** v. 130, p. 296–305 , 2013a.

FALKOSKI, Daniel Luciano *et al.* Chrysosporthe cubensis: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology** v. 130, p. 296–305 , 2013b.

GIBSON, Donna M. *et al.* Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. **Current Opinion in Microbiology** v. 14, n. 3, p. 264–270 , 2011.

GLASS, N Louise *et al.* Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Annual review of microbiology** v. 67, n. June, p. 477–98 , 2013.

GOMES, Daniel *et al.* Cellulase recycling in biorefineries??is it possible? **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 99, p. 4131–4143 , 2015.

GOMES, J; GOMES, I; STEINER, W. Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast *Cryptococcus adeliae*: production and properties. **Extremophiles : life under extreme conditions** v. 4, n. 4, p. 227–35 , 2000.

GONÇALVES, A. R. *et al.* Xylanase recycling for the economical biobleaching of sugarcane bagasse and straw pulps. **Enzyme and Microbial Technology** v. 43, n. 2, p. 157–163 , 2008.

GREGG, D. J.; BOUSSAID, A.; SADDLER, J. N. Techno-economic evaluations of a generic wood-to-ethanol process: Effect of increased cellulose yields and enzyme recycle. **Bioresource Technology** v. 63, n. 1, p. 7–12 , 1998.

GRUNINGER, R. J. *et al.* Biochemical and kinetic characterization of the multifunctional  $\beta$ -glucosidase/ $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -arabinosidase, Bgxa1. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 98, n. 7, p. 3003–3012 , 2014.

GUIMARÃES, Lúcio Mauro da Silva *et al.* Genetic control of *Eucalyptus urophylla*

and *E. grandis* resistance to canker caused by *Chrysosporthe cubensis*. **Genetics and Molecular Biology** v. 33, n. 3, p. 525–531 , 2010.

GUO, Fenfen *et al.* Differences in the adsorption of enzymes onto lignins from diverse types of lignocellulosic biomass and the underlying mechanism. **Biotechnology for biofuels** v. 7, n. 1, p. 38 , 2014.

GUPTA, Rajesh; LEE, Y. Y. Mechanism of cellulase reaction on pure cellulosic substrates. **Biotechnology and Bioengineering** v. 102, n. 6, p. 1570–1581 , 2009.

GURGEL, Leandro Vinícius Alves; PIMENTA, Maria Teresa Borges; CURVELO, Antonio Aprigio da Silva. Enhancing liquid hot water (LHW) pretreatment of sugarcane bagasse by high pressure carbon dioxide (HP-CO<sub>2</sub>). **Industrial Crops and Products** v. 57, p. 141–149 , 2014.

HATAKEYAMA, Hyoe; HATAKEYAMA, Tatsuko. Interaction between water and hydrophilic polymers. **Thermochimica Acta** v. 308, n. 1–2, p. 3–22 , 1998.

HAVEN, Mai Østergaard *et al.* Continuous recycling of enzymes during production of lignocellulosic bioethanol in demonstration scale. **Applied Energy** v. 159, p. 188–195 , 2015.

HAVEN, Mai Ostergaard; JØRGENSEN, Henning. Adsorption of  $\beta$ -glucosidases in two commercial preparations onto pretreated biomass and lignin. **Biotechnology for biofuels** v. 6, n. 1, p. 165 , 2013.

HODGES, C.S. *et al.* Estudos sobre o cancro causado por *Diaporthe cubensis*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 1, p. 129–161 , 1976.

HODGES, C S; GEARY, T F; CORDELL, C E. The occurrence of *Diaporthe cubensis* on *Eucalyptus* in Florida, Hawaii, and Puerto Rico. **Plant Disease Reporter** v. 63, n. 3, p. 216–220 , 1979.

HODGES, S. C.; REIS, S. M., Et Al. Duas enfermidades em plantações de essências florestais exóticas no Brasil. **Brasil Florestal** v. 4, p. 5–12 , 1973

HODGSON, Kevin; BERG, John. Dynamic Wettability Properties of Single Wood Pulp Fibers and Their Relationship to Absorbency. **Wood and Fiber Science** v. 20, n. 1, p. 3–17 , 1988.

IBRAHIM, Maha M. *et al.* Comparison of alkaline pulping with steam explosion for glucose production from rice straw. **Carbohydrate Polymers** v. 83, n. 2, p. 720–726 , 2011.

*Início | Raízen.* Disponível em: <<http://www.raizen.com.br/>>. Acesso em: 2 jun. 2017.

JIN, Wenxiang *et al.* Tween-80 is effective for enhancing steam-exploded biomass enzymatic saccharification and ethanol production by specifically lessening cellulase absorption with lignin in common reed. **Applied Energy** v. 175, p. 82–90 , 2016.

JØRGENSEN, Henning *et al.* Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme and Microbial Technology** v. 32, n. 7, p. 851–861 , 2003.

JØRGENSEN, Henning; KRISTENSEN, Jan Bach; FELBY, Claus. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining** v. 1, p. 119–134 , 2007.

JØRGENSEN, Henning; PINELO, Manuel. Enzyme recycling in lignocellulosic biorefineries. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining** v. 11, n. 1, p. 150–167 , 2016.

JØRGENSEN, Henning; PINELO, Manuel. Enzyme recycling in lignocellulosic biorefineries. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining** v. 11, n. 1, p. 150–167 , jan. 2017.

KEMMER, Gerdi; KELLER, Sandro. Nonlinear least-squares data fitting in Excel spreadsheets. **Nature protocols** v. 5, n. 2, p. 267–281 , 2010.

KHUSRO, Ameer *et al.* Statistical optimization of thermo-alkali stable xylanase production from *Bacillus tequilensis* strain ARMATI. **Electronic Journal of Biotechnology** v. 22, n. 2015, p. 16–25, 2016.

KIM, Ki-Tae *et al.* Kingdom-Wide Analysis of Fungal Small Secreted Proteins (SSPs) Reveals their Potential Role in Host Association. **Frontiers in Plant Science** v. 7, p. 186 , 2016.

KIM, Seungdo; DALE, Bruce E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy** v. 26, n. 4, p. 361–375 , 2004.

KLEIN-MARCUSCHAMER, Daniel *et al.* The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering** v. 109, n. 4, p. 1083–1087, 2012.

KLEMM, Dieter *et al.* Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. **Angewandte Chemie - International Edition** v. 50, n. 24, p. 5438–5466, 2011.

KO, Ja Kyong *et al.* Adsorption of enzyme onto lignins of liquid hot water pretreated hardwoods. **Biotechnology and Bioengineering** v. 112, n. 3, p. 447–456, 2015.

KOOTSTRA, A. Maarten J *et al.* Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Biochemical Engineering Journal** v. 46, n. 2, p. 126–131, 2009.

KOPPRAM, Rakesh *et al.* Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: Challenges and perspectives. **Trends in Biotechnology** v. 32, n. 1, p. 46–53, 2014.

KOSTYLEV, Maxim *et al.* Determination of the molecular states of the processive endocellulase *Thermobifida fusca* Cel9A during crystalline cellulose depolymerization. **Biotechnology and Bioengineering** v. 109, n. 1, p. 295–299, 2012.

KOSTYLEV, Maxim; WILSON, David. Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. **Biofuels** v. 3, n. 1, p. 61–70, 2012.

KRICKA, William; FITZPATRICK, James; BOND, Ursula. Metabolic engineering of yeasts by heterologous enzyme production for degradation of cellulose and hemicellulose from biomass: A perspective. **Frontiers in Microbiology** v. 5, n. APR, p. 174, 22 abr. 2014.

KUDANGA, Tukayi; LE ROES-HILL, Marilize. Laccase applications in biofuels production: Current status and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 98, n. 15, p. 6525–6542, 2014.

KUMAR, Rajeev; WYMAN, Charles E. Cellulase adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments. **Biotechnology and Bioengineering** v. 103, n. 2, p. 252–267, 2009.

LAFOND, Mickael *et al.* GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production. **Microbial cell factories** v. 10, n. 1, p. 20, 2011.

2011.

LAI, Chenhuan *et al.* Contrasting effects of hardwood and softwood organosolv lignins on enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Bioresource Technology** v. 163, p. 320–327, 2014.

LATOUR, Robert A. The Langmuir isotherm: A commonly applied but misleading approach for the analysis of protein adsorption behavior. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A** v. 103, n. 3, p. 949–958 , 2014.

LE COSTAOUËC, Tinaïg *et al.* The role of carbohydrate binding module (CBM) at high substrate consistency: Comparison of *Trichoderma reesei* and *Thermoascus aurantiacus* Cel7A (CBHI) and Cel5A (EGII). **Bioresource Technology** v. 143, p. 196–203 , 2013.

LE FLOCH, Alexandra; JOURDES, Michael; TEISSEDRE, Pierre Louis. Polysaccharides and lignin from oak wood used in cooperage: Composition, interest, assays: A review. **Carbohydrate Research** v. 417, p. 94–102 , 2015.

LEE, Dora; YU, Alex H C; SADDLER, John N. Evaluation of cellulase recycling strategies for the hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Biotechnology and Bioengineering** v. 45, n. 4, p. 328–336 , 1995.

LEHTIO, J. *et al.* The binding specificity and affinity determinants of family 1 and family 3 cellulose binding modules. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 100, n. 2, p. 484–489 , 2003.

Li, Airong; Zhu, Yue; Xu, Liang; Zhu, Wenqing; Tian, Xingjun. Comparative study on the determination of assay for laccase of *Trametes sp*, **African Journal of Biochemistry Research** Vol.2 (8), p. 181-183, 2008

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

LIBERATO, Marcelo Vizoná. Caracterização estrutural de endoglucanases da família GH5 e beta-glicosidases da família GH1: interação enzima-substrato. p. 141 , 2013.

LIMA, Marisa a *et al.* Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. **Biotechnology**

**for biofuels** v. 7, n. 1, p. 10 , 2014.

LINDEDAM, Jane *et al.* Recycling cellulases for cellulosic ethanol production at industrial relevant conditions: Potential and temperature dependency at high solid processes. **Bioresource Technology** v. 148, p. 180–188 , 2013.

LIU, Peng. Nanopolysaccharides for Adsorption of Heavy Metal Ions from Water. **Luleå University of Technology**, 1-104 p, 2014.

LOU, Hongming *et al.* Reducing non-productive adsorption of cellulase and enhancing enzymatic hydrolysis of lignocelluloses by noncovalent modification of lignin with lignosulfonate. **Bioresource Technology** v. 146, p. 478–484 , 2013.

LU, Yanpin *et al.* Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. **Applied biochemistry and biotechnology** v. 98–100, p. 641–654 , 2002.

MACHADO, Daniele Longo *et al.* Adsorption Characteristics of Cellulase and  $\beta$ -glucosidase on Avicel, Pretreated Sugarcane Bagasse and Lignin. **Biotechnology and applied Biochemistry** v. 62, n. 5, p. 681–689 , 2015.

MAITAN-ALFENAS, Gabriela P. *et al.* Characterization and biotechnological application of recombinant xylanases from *Aspergillus nidulans*. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 91, p. 60–67 , 2016.

MAITAN-ALFENAS, Gabriela Piccolo *et al.* The influence of pretreatment methods on saccharification of sugarcane bagasse by an enzyme extract from *Chrysosporthe cubensis* and commercial cocktails: A comparative study. **Bioresource Technology** v. 192, p. 670–676 , 2015.

MAITAN-ALFENAS, Gabriela Piccolo; VISSER, Evan Michael; GUIMARÃES, Valéria Monteze. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science** v. 1, n. 1, p. 44–49 , 2015.

MAKI, Miranda; LEUNG, Kam Tin; QIN, Wensheng. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological Sciences** v. 5, n. 5, p. 500–516 , 2009.

MANSFIELD, Shawn D.; MOONEY, Caitriona; SADDLER, John N. Substrate and

enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress** v. 15, n. 5, p. 804–816 , 1999.

MARABEZI, Karen. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de Lignina e Holocelulose em amostras de Bagaço e Palha de Cana-de-Açúcar**. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Carlos, 158 p., 2009.

MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry** v. 31, n. 3, p. 426–428 , 1959.

MONSCHEIN, Mareike; REISINGER, Christoph; NIDETZKY, Bernd. Dissecting the effect of chemical additives on the enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Bioresource Technology** v. 169, p. 713–722 , 2014.

NAKAGAME, Seiji *et al.* The isolation, characterization and effect of lignin isolated from steam pretreated Douglas-fir on the enzymatic hydrolysis of cellulose. **Bioresource Technology** v. 102, n. 6, p. 4507–4517 , 2011.

OTTER, D. E. *et al.* Desorption of *Trichoderma reesei* cellulase from cellulose by a range of desorbents. **Biotechnology and Bioengineering** v. 34, n. 3, p. 291–298 , 1989.

OTTER, D. E. *et al.* Elution of *Trichoderma reesei* cellulase from cellulose by pH adjustment with sodium hydroxide. **Biotechnology Letters** v. 6, n. 6, p. 369–374 , 1984

PAKARINEN, Annukka *et al.* Cellulases without carbohydrate-binding modules in high consistency ethanol production process. **Biotechnology for Biofuels** v. 7, n. 27, p. 1–11, 2014.

PALONEN, Hetti *et al.* Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology** v. 107, n. 1, p. 65–72 , 2004.

PAN, Xuejun. Role of functional groups in lignin inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose to glucose. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy** v. 2, n. 1, p. 25–32, 2008.

PAREEK, Nidhi; GILLGREN, Thomas; JONSSON, Leif J. Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicelluloses. **Bioresource**

**Technology** v. 148, p. 70–77 , 2013.

PEJIC, Biljana M. *et al.* The effects of hemicelluloses and lignin removal on water uptake behavior of hemp fibers. **Bioresource Technology** v. 99, n. 15, p. 7152–7159 , 2008.

PRIBOWO, Amadeus; ARANTES, Valdeir; SADDLER, Jack N. The adsorption and enzyme activity profiles of specific *Trichoderma reesei* cellulase/xylanase components when hydrolyzing steam pretreated corn stover. **Enzyme and Microbial Technology** v. 50, n. 3, p. 195–203 , 2012.

PULS, Jürgen *et al.* Biotechnical utilization of wood carbohydrates after steaming pretreatment. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 22, n. 6, p. 416–423 , 1985.

QI, Benkun *et al.* Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Bioresource Technology** v. 102, n. 3, p. 2881–2889 , 2011.

RAD, B. Lamah; YAZDANPARAST, R. Desorption of the cellulase systems of *Trichoderma reesei* and a *Botrytis* sp. from Avicel. **Biotechnology Techniques** v. 12, n. 9, p. 693–696 , 1998.

RAHIKAINEN, Jenni *et al.* Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood-study of enzyme binding and inactivation on lignin-rich surface. **Biotechnology and Bioengineering** v. 108, n. 12, p. 2823–2834 , 2011.

RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N. The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. **Enzyme and Microbial Technology** v. 15, n. 1, p. 19–25 , 1993.

RESCH, Michael G. *et al.* Clean fractionation pretreatment reduces enzyme loadings for biomass saccharification and reveals the mechanism of free and cellulosomal enzyme synergy. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering** v. 2, n. 6, p. 1377–1387 , 2014.

RODRIGUES, Ana Cristina *et al.* Cellic ® CTec2 : Saccharification / fermentation of wheat straw , solid – liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. **Enzyme and Microbial Technology** v. 80, p. 70–77 , 2015.

RODRIGUES, Ana Cristina *et al.* Recycling of cellulases in lignocellulosic

hydrolysates using alkaline elution. **Bioresource Technology** v. 110, p. 526–533 , 2012.

RODRIGUES, Ana Cristina; FELBY, Claus; GAMA, Miguel. Cellulase stability, adsorption/desorption profiles and recycling during successive cycles of hydrolysis and fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology** v. 156, p. 163–169 , 2014.

RØDSRUD, Gudbrand; LERSCH, Martin; SJÖDE, Anders. History and future of world's most advanced biorefinery in operation. **Biomass and Bioenergy** v. 46, p. 46–59 , 2012

RYU, Keungarp; KIM, Youngon. Adsorption of a xylanase purified from Pulpzyme HC onto alkali-lignin and crystalline cellulose. **October** v. 20, n. 10, p. 987–990 , 1998.

SAINI, Jitendra Kumar *et al.* Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass. **Renewable Energy** v. 98, p. 29–42 , 2016.

SAMMOND, Deanne W. *et al.* Predicting enzyme adsorption to lignin films by calculating enzyme surface hydrophobicity. **Journal of Biological Chemistry** v. 289, n. 30, p. 20960–20969 , 2014.

SCHNEIDER, Willian Daniel Hahn *et al.* Penicillium echinulatum secretome analysis reveals the fungi potential for degradation of lignocellulosic biomass. **Biotechnology for biofuels** v. 9, n. 66, p. 1–26 , 2016.

SEO, Dong June; FUJITA, Hiroataka; SAKODA, Akiyoshi. Effects of a non-ionic surfactant, Tween 20, on adsorption/desorption of saccharification enzymes onto/from lignocelluloses and saccharification rate. **Adsorption** v. 17, n. 5, p. 813–822 , 2011.

SERGEY M. SHEVCHENKO, Rodger P. Beatson; SADDLER, And John N. The Nature of Lignin from Steam Explosion / Enzymatic Hydrolysis of Softwood S ERGEY M . S HEVCHENKO , R ODGER P . B EATSON ,. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 77–79, n. 1, p. 867–876 , 1999.

SEWALT, V. J. H.; GLASSER, W. G.; BEAUCHEMIN, K. A. Lignin Impact on Fiber Degradation. 3. Reversal of Inhibition of Enzymatic Hydrolysis by Chemical Modification of Lignin and by Additives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 45, n. 5, p. 1823–1828 , 1997.

SINGH, Ajay; KUMAR, P. K R; SCHÜGERL, K. Adsorption and reuse of cellulases

during saccharification of cellulosic materials. **Journal of Biotechnology** v. 18, n. 3, p. 205–212 , 1991.

SIPOS, Bálint *et al.* Hydrolysis efficiency and enzyme adsorption on steam-pretreated spruce in the presence of poly(ethylene glycol). **Enzyme and Microbial Technology** v. 47, n. 3, p. 84–90 , 2010.

TU, Maobing. **ENZYMATIC HYDROLYSIS OF LIGNOCELLULOSE: CELLULASE ENZYME ADSORPTION AND RECYCLE**. University of British Columbi, 2006. 1-195 p.

TU, Maobing *et al.* Immobilization of  $\beta$ -glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology Letters** v. 28, n. 3, p. 151–156 , 2006.

TU, Maobing *et al.* The potential of enzyme recycling during the hydrolysis of a mixed softwood feedstock. **Bioresource Technology** v. 100, n. 24, p. 6407–6415 , 2009.

TU, Maobing; CHANDRA, Richard P.; SADDLER, Jack N. Evaluating the distribution of cellulases and the recycling of free cellulases during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Biotechnology Progress** v. 23, n. 2, p. 398–406 , 2007a.

TU, Maobing; CHANDRA, Richard P.; SADDLER, Jack N. Recycling cellulases during the hydrolysis of steam exploded and ethanol pretreated lodgepole pine. **Biotechnology Progress** v. 23, n. 5, p. 1130–1137 , 2007b.

TU, Maobing; PAN, Xuejun; SADDLER, Jack N. Adsorption of cellulase on cellulolytic enzyme lignin from lodgepole pine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 57, n. 17, p. 7771–7778 , 2009.

UNICA. *Brazilian Sugarcane Industry Association - Sugarcane Production and Processing*, 2013

VAAJE-KOLSTAD, Gustav. An Oxidative Enzyme Boosting the. **Science** v. 330, n. October, p. 219–222 , 2010.

VALLANDER, Lars; ERIKSSON, Karl Erik. Enzyme recirculation in saccharification of lignocellulosic materials. **Enzyme and Microbial Technology** v. 9, n. 12, p. 714–720, 1987.

- VÁRNAI, Anikó *et al.* Adsorption of monocomponent enzymes in enzyme mixture analyzed quantitatively during hydrolysis of lignocellulose substrates. **Bioresource Technology** v. 102, n. 2, p. 1220–1227 , 2011.
- VERMAAS, Josh V. *et al.* Mechanism of Lignin Inhibition of Enzymatic Biomass Deconstruction. **Biotechnology for Biofuels** n. 2015, p. 1–16 , 2015.
- VIIKARI, Liisa *et al.* Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology** v. 108, n. June, p. 121–145 , 2007.
- VISSER, Evan Michael *et al.* Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse from enzyme recycling. **Biotechnology for Biofuels** v. 8, n. 5, p. 1–9 , 2015.
- VISSER, Evan Michael *et al.* Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology** v. 144, p. 587–594 , 2013.
- VU, Van V.; MARLETTA, Michael A. Starch-degrading polysaccharide monooxygenases. **Cellular and Molecular Life Sciences** v. 73, n. 14, p. 2809–2819 , 2016.
- WATANABE, Masahiro *et al.* Xylanase (GH11) from *Acremonium cellulolyticus*: homologous expression and characterization. **AMB Express** v. 4, p. 27 , 2014.
- WEISS, Noah *et al.* Enzymatic lignocellulose hydrolysis: Improved cellulase productivity by insoluble solids recycling. **Biotechnology for Biofuels** v. 6, n. 1, p. 5 , 2013.
- XU, Feng *et al.* Partition of enzymes between the solvent and insoluble substrate during the hydrolysis of lignocellulose by cellulases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 51, n. 1–2, p. 42–48 , 2008.
- XU, J.; CHEN, H. Coupling recovery strategy of cellulase in hydrolyzate after hydrolysis with Tannin flocculation and PEG desorption. **Applied Biochemistry and Microbiology** v. 45, n. 3, p. 309–312 , 2009.
- YANG, Bin; WYMAN, Charles E. BSA Treatment to Enhance Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Lignin Containing Substrates. **Biotechnology Bioengineering** v. 94, p. 611–617 , 2006.

YARBROUGH, John M *et al.* New perspective on glycoside hydrolase binding to lignin from pretreated corn stover. **Biotechnology for biofuels** v. 8, n. 1, p. 214 , 2015.

YEMSHANOV, Denys; MCKENNEY, Daniel. Fast-growing poplar plantations as a bioenergy supply source for Canada. **Biomass and Bioenergy** v. 32, n. 3, p. 185–197 , 2008.

ZHANG, Junhua *et al.* The carbohydrate-binding module of xylanase from *Nonomuraea flexuosa* decreases its non-productive adsorption on lignin. **Biotechnology for biofuels** v. 6, n. 1, p. 18 , 2013.

ZHAO, Xuebing; ZHANG, Lihua; LIU, Dehua. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining** v. 6, n. 4, p. 465–482 , 2012.

ZHENG, Yi *et al.* Non-ionic surfactants and non-catalytic protein treatment on enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 146, n. 1–3, p. 231–248 , 2008.

ZHENG, Yi; ZHANG, Ruihong; PAN, Zhongli. Investigation of adsorption kinetics and isotherm of cellulase and  $\beta$ -glucosidase on lignocellulosic substrates. **Biomass and Bioenergy** v. 91, p. 1–9 , 2016.

ZHENG, Yingfu *et al.* Temperature sensitivity of cellulase adsorption on lignin and its impact on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Journal of Biotechnology** v. 166, n. 3, p. 135–143 , 2013.

ZHU, Zhiguang; SATHITSUKSANO, Noppadon; PERCIVAL ZHANG, Y-H. Direct quantitative determination of adsorbed cellulase on lignocellulosic biomass with its application to study cellulase desorption for potential recycling. **The Analyst** v. 134, p. 2267–2272 , 2009.