

CARLOS JOULBERT ALVES DE SOUZA

**INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA NA
PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO E
CARACTERIZAÇÃO DE UMA β -GLUCANASE DE
*Kluyveromyces marxianus***

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014**

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

T

S729i
2014
Souza, Carlos Joulbert Alves de, 1983-
Influência da concentração de biomassa na produção de
etanol celulósico e caracterização de uma β -glucanase de
Kluyveromyces marxianus / Carlos Joulbert Alves de Souza. –
Viçosa, MG, 2014.
x, 88f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luciano Gomes Fietto.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.76-88.

1. Biomassa. 2. Etanol. 3. Cana-de-açúcar. 4. Bagaço de
cana. 5. *Kluyveromyces marxianus*. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 633.61

CARLOS JOULBERT ALVES DE SOUZA

**INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA NA
PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO E
CARACTERIZAÇÃO DE UMA β -GLUCANASE DE
*Kluyveromyces marxianus***

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

APROVADA: 26 de maio de 2014.

Valéria Monteze Guimarães

Rogélio Lopes Brandão

Juliana Rocha Lopes Soares Ramos

Wendel Batista da Silveira

Luciano Gomes Fietto
(Orientador)

DEDICO

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Molecular - LBM

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter estado presente em todos os momentos da minha vida e ter me carregado no colo nos momentos que mais necessitava.

A Universidade Federal de Viçosa por ter contribuído para a minha formação.

Ao Orientador e amigo Luciano Gomes Fietto pela orientação desde a graduação. Pela paciência, ensinamentos, amizade, confiança e oportunidade. Enfim por ter contribuído para minha formação pessoal e profissional.

Ao grupo Etanol do LBM: Daniela, Ancély, Mariana, Marina, Edgard, Aline e Patrícia que ao longo dos anos contribuíram e muito para que esse trabalho fosse realizado em especial a Daniela Arruda Costa que me ajuda muito desde sempre.

A todos que fazem e já fizeram parte do melhor laboratório do mundo (LBM) para se trabalhar. E por fazerem o melhor amigo oculto de todos: Dani Mendes, Daniela Arruda, Ananda, Murilo, Silvana, Vanessa, Amanda, Mônica, Gilza, Edgard, Raphael, Mary, Gabriela, Luíza, Zamira, Patrícia, Patrícia II, Edgard, Priscila, Héllida, Eu, Fernanda, Marina, Mariana, Ancély, Eduardo, Aline Mello.

Ao quarteto fantástico que se fizeram família durante o tempo de Viçosa: Dani Mendes, Mônica, Ananda e Gilza. E o quinto elemento: Daniela Arruda.

Aos colegas dos laboratórios do departamento de bioquímica e biologia molecular em especial aos do Laboratório de Proteômica e bioquímica de proteínas.

Aos amigos da república Broca Viçosa: Wagner, Fábio, Luciano, Flávio, Anderson, Thiago e Cléber por tornar a vida em Viçosa muito mais divertida.

A Mário José Câmara de Oliveira *in memoriam* por sempre ter torcido e acreditado em mim.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelos valiosos ensinamentos recebidos durante minha vida acadêmica.

Aos professores Wendel Batista da Silveira e Valéria Montezze Guimarães que desde sempre acompanham o nosso trabalho e contribuem com valiosas sugestões.

Ao Professor Carlos Rosa e a doutoranda Mariana Rocha Lopes do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras – UFMG pela ajuda nos experimentos.

Ao professor Hilário Cuquetto Mantovani por gentilmente disponibilizar seu laboratório para a realização dos experimentos.

Ao Doutorando Rafael Cunha e a Professora Inês Roberto por ter cedido o laboratório para a realização dos experimentos e pelas valiosas contribuições para este trabalho.

A Escola de Engenharia de Lorena – USP em especial ao professor Paulo Atsushi Suzuki pelas análises de difração de raio-x.

Ao Núcleo de Biomoléculas e ao do Núcleo de Microscopia da UFV.

A minha família em especial a minha mãe Delcy Alves de Souza e Silva, meu pai José Carlos Souza Silva, minha irmã Adriana Alves Souza, meu cunhado Nelson de Abreu Delvaux e minha vó Maria Rosa da Silva por sempre me apoiarem, acreditarem e por todos os esforços na vida que contribuíram e muito para todas as minhas conquistas.

Pela minha sobrinha e afilhada Amira que veio ao mundo e trouxe mais alegria para minha vida.

A CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	IX
CAPÍTULO 1: ETANOL LIGNOCELULÓSICO: DESAFIOS E ESTRATÉGIAS	1
1.0. Revisão de literatura.....	2
1.1. Etanol Lignocelulósico	2
1.1.1. Recalcitrância da Biomassa	3
1.1.1.1. Pré-tratamentos.....	4
1.1.2. Inibição das celulasas	6
1.1.2.1. Sacarificação e fermentação simultânea (SSF)	7
1.1.2.2. Temperaturas incompatíveis de e fermentação.....	10
1.1.3. Custo das enzimas.....	12
1.1.3.1. Bioprocesso consolidado (CBP).....	12
1.1.3.2. Co-fermentação de xilose e celobiose.....	14
1.1.3.3. Engenharia de superfície celular	15
1.1.4. Micro-organismos que fermentam xilose.....	16
1.1.4.1. Engenharia metabólica.....	17
1.1.5. Estresse por inibidores.....	20
1.1.5.1. Detoxificação.....	21
1.1.6. Baixo rendimento em etanol do processo	23
1.1.6.1. Co-fermentação (CF).....	24
1.1.6.2. Sacarificação e co-fermentação simultâneas (SCFS) ..	25
1.1.6.3. Pré-sacarificação.....	26
1.2. Considerações finais.....	27
CAPÍTULO 2: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA E ALIMENTAÇÃO DO REATOR NA PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO	29
2.0. Revisão de literatura	31
3.0. Objetivos	33
3.1. Objetivos Específicos.....	33
4.0. Metodologia	34
4.1. Micro-organismos e condições de crescimento	34
4.2. Pré-tratamentos	34
4.3. Sacarificação e fermentação simultâneas com pré-sacarificação.....	34
4.4. Sacarificação e fermentação simultânea	35
4.5. Hidrólise da biomassa pré-tratada e residual.....	36
4.6. Adsorção enzimática.....	36
4.7. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar.....	37
4.7.1. Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar	37
4.7.2. Cristalinidade.....	37
4.7.3. Microscopia	37

4.8.	Métodos analíticos	38
4.8.1.	Concentração de glicose e etanol	38
4.9.	Análises estatísticas.....	38
4.10.	Determinação dos parâmetros fermentativos.....	38
5.	Resultados e discussão	39
5.1.	Efeito da adição gradual da enzima	44
5.2.	Fatores que afetam a hidrólise e fermentação	45
6.	Conclusões	51
CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO DE UMA β -GLUCANASE EXTRACELULAR DE <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i>		52
7.0	Revisão de literatura	54
7.1.	Características das β -glucanases	56
7.2.	Glicosil hidrolases da família 5.....	57
7.3.	Aplicações das β -glucanases.....	57
7.4.	Parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
8.	Objetivo geral.....	60
8.1.	Objetivos específicos	60
9.	Metodologia	61
9.1.	Caracterização da β -glucanase.....	61
9.1.1.	Produção e purificação da enzima	61
9.1.2.	Análise por espectrometria de massas	62
9.2.	Purificação e caracterização da β -glicosidase	63
9.2.1.	Purificação da BGL extracelular através de Cromatografia Líquida (FPLC)	63
9.2.2.	Ensaio enzimático	63
9.2.3.	Determinação da concentração de proteínas solúveis.....	64
9.2.4.	Hidrólise da celobiose	64
9.2.5.	Atividade lítica	64
9.2.6.	Atividade sobre CMC e β -glucan.....	64
10.	Resultados e discussão	66
10.1.	Sequenciamento da enzima.....	66
10.2.	Especificidade por substratos	69
10.3.	Atividade em parede celular de levedura	72
11.	Conclusões.....	75
12.	Referências bibliográficas.....	76

RESUMO

SOUZA, Carlos Joulbert Alves de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2014. **INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA NA PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA β -GLUCANASE DE *Kluyveromyces marxianus***. Orientador: Luciano Gomes Fietto.

A sacarificação e fermentação simultânea (SSF) de biomassa em altas concentrações de sólidos é um método promissor para aumentar a concentração de etanol no final do processo. No entanto, a biomassa lignocelulósica é um material heterogêneo e insolúvel em água e o aumento da sua concentração no meio reacional pode influenciar negativamente a taxa de conversão de biomassa em álcool. Assim um dos objetivos desse trabalho foi avaliar o efeito do aumento da concentração de sólidos e a forma de alimentação do reator, com enzimas e biomassa, sobre a produção de etanol em um processo SSF. Os resultados obtidos mostram um aumento da concentração de etanol com o aumento da concentração de biomassa em todas as condições testadas. Quando se avaliou o efeito da adição gradual de enzimas, concentrações semelhantes de etanol foram obtidas, sugerindo que as enzimas não perdem, significativamente, sua atividade ao longo do processo. Os resultados obtidos com as análises físico-químicas do bagaço antes e após o processo fermentativo sugerem que os principais fatores que estão influenciando a hidrólise enzimática da biomassa são o conteúdo de lignina e o índice de cristalinidade da celulose, fatores esses que aumentam ao longo do processo diminuindo o rendimento em etanol. Recentemente nosso grupo de pesquisa identificou uma nova enzima secretada por *Kluyveromyces marxianus* com atividade hidrolítica sobre celobiose e *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNpG). Neste trabalho a especificidade da enzima foi avaliada utilizando os substratos celobiose (β -1,4), CMC (β -1,4), β -glucano (β -1,3: β -1,4), e pNpG. Os resultados obtidos mostram uma atividade de hidrólise maior para o substrato β -glucano indicando que a enzima identificada possui especificidade para ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4. Para uma melhor caracterização da enzima identificada foi realizado seu sequenciamento da proteína por espectrometria de massas. As análises das sequências obtidas

mostraram alta similaridade com β -1,3 glucanases fúngicas. Além disto, foi medida a atividade hidrolítica desta enzima sobre a parede celular de leveduras. Os resultados mostram que a enzima possui um potencial para aplicação na produção de β -glucanos solúveis ou para preparação de protoplastos de leveduras. A atividade da enzima sobre ligações β -1,3 explica a sua atividade sobre a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. A sequência de aminoácidos e a especificidade pelos substratos β -glucanos sugerem que a enzima secretada por *K. marxianus* seja uma β -1-3(4)-glucanase.

ABSTRACT

SOUZA, Carlos Joulbert Alves de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2014. **INFLUENCE OF BIOMASS CONCENTRATION ON PRODUCTION OF CELLULOSIC ETHANOL AND CHARACTERIZATION OF A B-GLUCANASE FROM *Kluyveromyces marxianus***. Adviser: Luciano Gomes Fietto.

Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of biomass in high concentrations of solids is promising to increase the concentration of ethanol in the end of the process. However, lignocellulosic biomass is a heterogeneous and water-insoluble material and increase its concentration in the reaction medium may negatively influence the rate of conversion of biomass to ethanol. Objectives of the study were to evaluate how the increasing of solids concentration and the reactor feed mode with enzymes and biomass, have an effect on ethanol yield of a SSF process. The results show an increase of ethanol concentration with increasing of biomass concentration in all conditions evaluated. When assessing the effect of the gradual addition of enzymes, similar concentrations of ethanol were obtained, suggesting that enzymes do not significantly lose their activity during the process. The results obtained with the physico-chemical analyzes of the bagasse before and after the fermentation process suggest that the main factors influencing the enzymatic hydrolysis of biomass are lignin and cellulose crystallinity index, factors that increase throughout the process decreasing ethanol yield. Recently our research group identified a new enzyme secreted by *Kluyveromyces marxianus* with hydrolytic activity on cellobiose and p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG). In this study the specificity of the enzyme was assessed using the substrates cellobiose (β -1, 4), CMC (β -1, 4), β -glucan (β -1, 4: β -1, 4), and PNPG. The results show a higher activity for the hydrolysis of β -glucan substrate identified indicating that the enzyme has specificity for β -1, 3 and β -1, 4 glycosidic linkages. For a better characterization of the identified enzyme protein sequencing by mass spectrometry was performed. Analyses of the sequences obtained showed high similarity to β -1, 3 glucanases from yeast. Furthermore, we measured the hydrolytic activity of this enzyme on the yeast cell wall. The results show that the enzyme has a potential application in the production of soluble β -glucan or yeast protoplast preparation. The enzyme activity of β -1, 3

bonds explains their activity on the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. The amino acid sequence and specificity for β -glucans substrates suggest that the enzyme is secreted by *K. marxianus* one β -1-3 (4)-glucanase.

CAPÍTULO 1: ETANOL LIGNOCELULÓSICO: DESAFIOS E ESTRATÉGIAS

Revisão de literatura

1.1. Etanol Lignocelulósico

O provável esgotamento dos combustíveis fósseis, as questões ambientais e a crescente demanda por energia, têm aumentado o interesse mundial por fontes alternativas de energia (Demain, 2009; Sarkar et al., 2012). Neste âmbito, a conversão de biomassa lignocelulósica em etanol ganha especial atenção (De Souza et al., 2012; Faga et al., 2010), pois as biomassas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantes, sendo encontradas na natureza como materiais agroindustriais, resíduos urbanos e madeiras (Pandey et al., 2000; Sarkar et al., 2012).

O conteúdo de celulose e hemicelulose presente nessas biomassas pode ser convertido em monossacarídeos fermentescíveis como hexoses e pentoses representando, portanto, uma alternativa sustentável e barata de energia renovável para aumentar a produção de etanol (Jordan et al., 2012; Lin et al., 2011).

O processo de produção de etanol celulósico requer quatro etapas: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação. Essas etapas são necessárias para desestruturação da parede celular; clivagem da celulose e hemicelulose que leva à liberação de açúcares para a etapa de fermentação e destilação do mosto para se obter o etanol (Alvira et al., 2010; Cardona et al., 2010; Van Maris et al., 2006).

No entanto, existem vários desafios nas diferentes etapas do processo que devem ser superados para tornar viável a produção de etanol de biomassa lignocelulósica (Girio et al., 2010; Matano et al., 2012b; Olofsson et al., 2008; Parawira & Tekere, 2011; Percival Zhang et al., 2006; Soccol et al., 2010; Wang et al., 2012).

Dentre os desafios podemos citar:

- (1) Recalcitrância da biomassa;
- (2) Inibição das celulases pelos produtos de hidrólise;
- (3) Custo das enzimas;
- (4) Temperaturas incompatíveis de hidrólise e fermentação;
- (5) Micro-organismos incapazes de utilizar pentoses;

- (6) Estresse por inibidores;
- (7) Baixo rendimento em etanol do processo.

Nesta revisão serão abordadas as diferentes estratégias propostas para superar esses desafios e com isso tornar possível a produção de etanol de biomassa lignocelulósica.

1.1.1. Recalcitrância da Biomassa

O maior constituinte da biomassa lignocelulósica é a celulose, um polímero linear composto por resíduos de β -D-glicopirranose, unidos por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$. Polímeros lineares de celulose ocorrem como cadeias paralelas unidas principalmente por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals formando as microfibrilas. Por sua vez, essas são compostas por regiões amorfas e cristalinas. As regiões cristalinas são mantidas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares entre as cadeias de celulose tornando-as altamente resistentes ao ataque químico em comparação com as regiões amorfas (Bhat et al., 1997; Laureano-Perez et al., 2005).

O segundo componente é a hemicelulose, um heteropolímero complexo altamente ramificado que contém hexoses (D- glicose, D-galactose, D-manose, L-ramnose, L-fucose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e ácidos urônicos (ácido D-glucurônico e ácido D-galacturônico) (Labavitch et al., 1978; Scheller & Ulvskov, 2010).

A lignina, que constitui 10-20% em peso da biomassa seca, é um polímero aromático contendo resíduos fenólicos, tais como álcool trans-p-coumaril, álcool trans-p-coniferil e álcool trans-sinápico (Boerjan., et al., 2003). A presença da lignina limita a etapa da hidrólise por formar uma barreira física que diminui a acessibilidade de enzimas nas microfibrilas de celulose e por adsorção não produtiva das celulasas ao polímero fenólico. Essa inibição é dependente tanto do conteúdo da lignina como das unidades monoméricas que a compõe (Fu et al., 2011; Masarin et al., 2011; Rahikainen et al., 2013; Wagner et al., 2011).

A presença da lignina na parede celular vegetal e a forte associação entre a celulose e a hemicelulose conferem sustentação à planta, além de protegê-la contra patógenos e substâncias químicas. No entanto, essas

características físico-químicas e estruturais como porosidade, grau de polimerização e cristalinidade tornam a parede altamente recalcitrante e difícil de ser desestruturada. A recalcitrância dificulta o acesso e o ataque das celulasas e hemicelulasas às ligações glicosídicas nos resíduos de glucanas e xilanas e por isso tem sido um dos principais obstáculos para a produção economicamente viável de bioetanol de segunda geração (Alvira et al., 2010; Brodeur et al., 2011; Hendriks & Zeeman, 2009; Pauly & Keegstra, 2010; Agbor et al., 2011).

Nesse sentido, faz-se necessário melhorar os processos ou técnicas que alteram a estrutura e/ou composição da parede celular a fim de tornar esses polímeros acessíveis às enzimas na etapa da hidrólise.

1.1.1.1. Pré-tratamentos

Os pré-tratamentos podem ser classificados em quatro categorias: químicos, biológicos, físicos e físico-químicos. Cada tipo de pré-tratamento altera a biomassa de determinada maneira (Agbor et al., 2011; Alvira et al., 2010; Hendriks & Zeeman, 2009). A tabela 1 mostra os diversos tipos de pré-tratamento, as condições de operações e o efeito sobre a biomassa.

Os tratamentos físicos visam diminuir o tamanho da biomassa com consequente diminuição do grau de polimerização, aumentando dessa forma a área superficial (Vidal et al., 2011). Os tratamentos biológicos envolvem o uso de fungos produtores de enzimas como hemicelulasas e lacases que degradam hemicelulose e lignina respectivamente tendo um menor impacto sobre a celulose (Wan & Li, 2012). Os químicos envolvem substâncias químicas como ácidos, bases ou substâncias orgânicas visando à solubilização da hemicelulose e lignina (Brodeur et al., 2011; Vargas Betancur & Pereira Jr, 2010; Xu & Cheng, 2011; Zhao et al., 2009). Os físico-químicos visam solubilizar ou mesmo diminuir a interação entre os diferentes componentes (Brodeur et al., 2011). Além disso, tem sido muito utilizada a combinação de pré-tratamentos de modo a separar a biomassa em frações obtendo assim maiores rendimentos na hidrólise (de Souza et al., 2012; Hendriks & Zeeman, 2009).

Tabela 1 - Diversos processos de pré-tratamentos

Biomassa	Pré-tratamento	Condições	Observações	Referências
Bagaço de cana	AFEX	Proporção 1:1 (amônia para biomassa), 140°C	Conversão glucana (85%) e Hemicelulose (95-98%)	Krishnan et al., 2010
Bagaço de cana	Ácido e Básico	H ₂ SO ₄ (0,5%) e NaOH (4%), 120°C, 30 min	Próximo de 4% de glicose na hidrólise	(de Souza et al., 2012)
Bagaço de cana	Explosão a vapor	Reator de 5000 L a uma pressão de 15,3 kgf/cm ² durante 7 min	Próximo de 2% de glicose na hidrólise	(Santos et al., 2010)
Bagaço de cana	Ácido	H ₂ SO ₄ e ácido acético (1%), 190°C, 10 min	90,9% da hemicelulose solubilizada	(Rocha et al., 2011a)
Bagaço de cana	Ácido	H ₂ SO ₄ (1,25%), 121°C 2 h.	Solubilização da hemicelulose	(Cheng et al., 2008)
Bagaço de cana	Alcalino	NaOH (1.0%), 100°C, 1h	Solubilização da lignina	(Silva et al., 2010)
<i>Panicum virgatum</i>	Hidrotérmólise	200°C, 10 min	Próximo de 37,7% da xilana foi removida	(Faga et al., 2010)

Dentre esses pré-tratamentos destacam-se os pré-tratamentos ácidos e básicos. O principal objetivo do pré-tratamento ácido é solubilizar a fração hemicelulósica da biomassa e assim tornar a celulose mais acessível às enzimas. Diversos tipos de ácidos têm sido utilizados: ácido clorídrico, sulfúrico, nítrico e acético, sendo que o efeito na estrutura da biomassa vai depender do tipo de ácido, concentração, temperatura e tempo de pré-tratamento (Alvira et al., 2010; Gámez et al., 2006; Hendriks & Zeeman, 2009; Hernandez-Salas et al., 2009; Rocha et al., 2011a; Rodríguez-Chong et al., 2004; White et al., 2008).

Os pré-tratamentos alcalinos aumentam a digestibilidade da celulose e são mais eficazes para solubilizar a lignina, com menor solubilização da celulose e hemicelulose (Brodeur et al., 2011). Pré-tratamentos em que são empregados solventes orgânicos, aquosos ou mesmo mistura de solventes também são utilizados. Dependendo do solvente a ser utilizado pode-se obter lignina com um alto grau de pureza (Alvira et al., 2010; Zhao et al., 2009). Diversos tipos de bases podem ser utilizadas como o hidróxido de sódio e de cálcio (Carvalho et al., 2008; de Souza et al., 2012).

Postula-se que os pré-tratamentos ideais têm que alcançar os seguintes objetivos: aumentar a digestibilidade da biomassa; evitar a degradação ou perda de carboidratos; evitar a formação de inibidores para os processos subsequentes de hidrólise e fermentação; e ser economicamente viável (Alvira et al., 2010; Brodeur et al., 2011). Uma vez que fatores estruturais relacionados à biomassa tem impacto negativo nas taxas de hidrólise, pré-tratamentos devem ser desenvolvidos de forma a alterar a parede celular vegetal tornando os polissacarídeos acessíveis a enzimas na etapa da hidrólise. Essa acessibilidade deve ser de forma tal, que torne a etapa de pré-tratamento e hidrólise economicamente viáveis e que contribua para aumentar a concentração de etanol em valores que favoreça energeticamente a etapa da destilação.

1.1.2. Inibição das celulasas

A hidrólise da celulose em monômeros de glicose ocorre pela ação sinérgica de celulasas. De acordo com o sítio de atuação no substrato celulósico, as celulasas podem ser classificadas em três grupos principais: endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidases. As endoglucanases (EC 3.2.1.4) clivam aleatoriamente ligações glicosídicas em regiões amorfas diminuindo o grau de polimerização da celulose. Sendo assim, ela é responsável pela rápida solubilização do polímero. Os oligossacarídeos liberados pelas endoglucanases tornam-se substratos para as celobiohidrolases (CBH) que podem atuar nos terminais redutores (CBHI) ou nos terminais não-redutores (CBHII) liberando celobiose ou oligossacarídeos maiores. E por último, entram em ação as β -glicosidases que atuam sobre as

celobioses liberando moléculas de glicose (Chundawat et al., 2011; Lynd et al., 2002; Percival Zhang et al., 2006; Wang et al., 2012).

No entanto, as celulasas, principalmente as endoglucanases e celobiohidrolases, são fortemente inibidas por glicose e celobiose (Percival Zhang et al., 2006; Wang et al., 2012). Diversas alternativas podem ser utilizadas para reduzir essa inibição. Estas incluem: aumento da concentração de celulasas na reação e suplementação com β -glicosidase, visando diminuir a concentração de celobiose. No entanto, essas alternativas impactam negativamente o processo devido ao custo das enzimas (Chauve et al., 2010; Chen et al., 2010; Zhang et al., 2010). Outros tipos de inibição são por adsorção não produtiva na lignina, por xilanas e xilo-oligossacarídeos (Rahikainen et al., 2013; Zhang et al., 2012; Zhang & Viikari, 2012). Neste sentido, surge a necessidade de processos que visam vencer essas inibições de modo a aumentar a conversão da biomassa na etapa da hidrólise.

1.1.2.1. Sacarificação e fermentação simultânea (SSF)

Uma alternativa para superar a inibição das celulasas pelos produtos de hidrólise é a condução do processo fermentativo por sacarificação e fermentação simultânea (SSF). Este processo foi primeiro descrito por Gauss em uma patente em 1976. O processo consiste em realizar a hidrólise e fermentação de modo simultâneo em um mesmo recipiente (Figura 1) (Olofsson et al., 2008). A sacarificação e fermentação simultânea (SSF) combinam a hidrólise enzimática e a fermentação para manter uma concentração de glicose baixa no meio, sendo, portanto uma boa estratégia para aumentar a taxa de conversão de celulose em etanol (Krishna et al., 2001; Olofsson et al., 2008). Foi demonstrado que maiores rendimentos em etanol poderiam ser obtidos por sacarificação e fermentação simultânea em comparação com processos de hidrólise e fermentação separadas (SHF) (de Souza et al., 2012; Tomas-Pejo et al., 2009; Olofsson et al., 2008).

Além de melhorar a taxa de hidrólise pela conversão simultânea dos açúcares que inibem a atividade das celulasas, o SSF apresenta vantagens comparadas ao processo em que a hidrólise e a fermentação ocorrem de forma separada. Dentre as vantagens do SSF destacam-se: diminuição do requerimento de enzimas, aumento do rendimento do processo, diminuição do

requerimento de condições estéreis, considerando que a glicose é removida imediatamente do meio, e diminuição do tempo total do processo evitando contaminações. A desvantagem é que esse processo requer micro-organismos termotolerantes (de Souza et al., 2012; Olofsson et al., 2008; Santos et al., 2010).

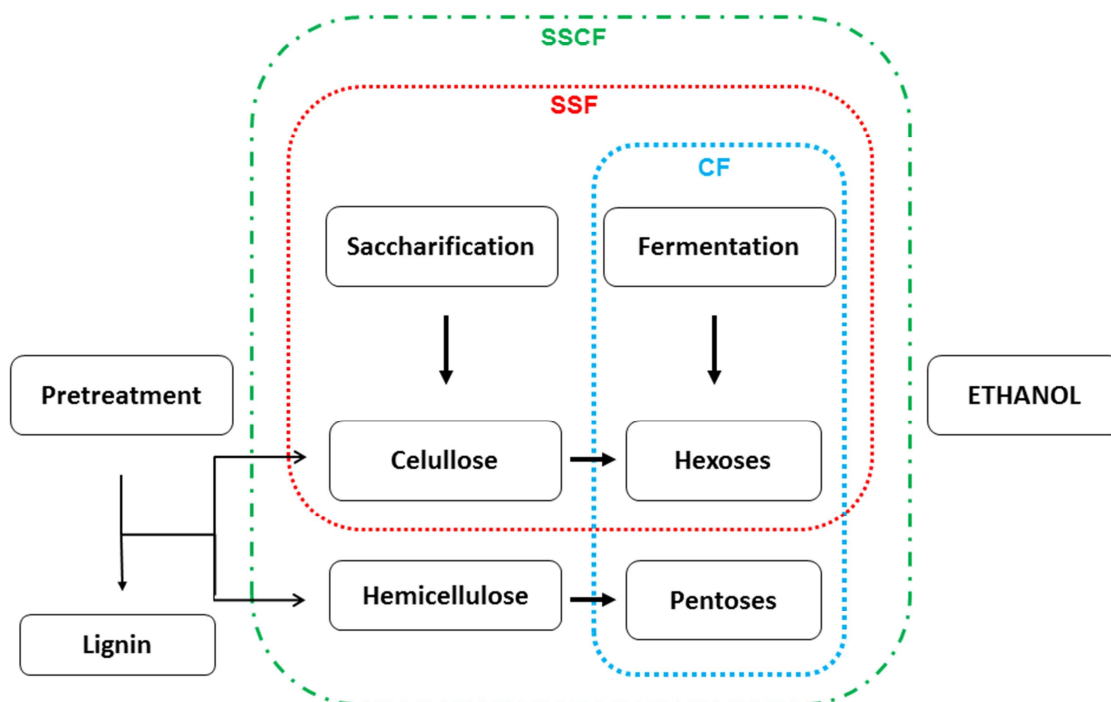


Figura 1 – Diagrama esquemático das diversas formas de condução do processo de produção de etanol de biomassa lignocelulósica. Co-fermentação (CF), sacarificação e fermentação simultânea (SSF) e Saccharificação e co-fermentação simultânea (SSCF).

Alternativas ao SSF seriam o isolamento e a caracterização de enzimas menos sensíveis a inibição por glicose e celobiose, uma vez que, a inibição causada por estes açúcares influenciam a taxa de disponibilização de açúcares fermentescíveis. Essa caracterização pode ser usada concomitantemente com a engenharia de proteínas. Neste caso, um estudo detalhado dos mecanismos de inibição enzimático com detalhes da estrutura molecular do sítio ativo contribuirá para a obtenção de enzimas menos sensíveis. Uma vez que, o

processo necessita de organismos termotolerantes, surge à necessidade do isolamento e caracterização de linhagens de leveduras capazes de crescer e fermentar em altas temperaturas. A Compreensão dos mecanismos de vias de sinalização como também de genes envolvidos na resposta ao estresse por temperaturas pode ser utilizada para se obter linhagens termotolerantes geneticamente modificadas de micro-organismos capazes de tolerar altas temperaturas.

Recentemente, Zhang & Viikari (2012) verificaram a inibição da CBHI de *Trichoderma reesei* por xilo-oligossacarídeos e por xilose. Neste mesmo estudo experimentos de cinética mostraram que xilobiose e xilotriose são inibidores competitivos das CBHI de *Thermoascus aurantiacus*. Os autores concluem que esta inibição é devido à semelhança estrutural desses oligossacarídeos com a celobiose. Ao se ligar no sítio ativo dessas enzimas tais oligossacarídeos causam impedimento estérico e dessa forma inibem a atividade da enzima. Em outro estudo (Zhang e colaboradores (2012) e colaboradores relataram a inibição das celulasas por xilanas. A inibição foi verificada nas endoglucanases e celobiohidrolases I e II. Uma das possíveis explicações é a barreira física que as xilanas formam na superfície da celulose. Como relatado por (Köhnke, 2010) as xilanas têm afinidade pela celulose e podem adsorver na superfície do polímero *in vitro* formando uma barreira que impede a ligação e ação das celulasas.

Sacarificação e fermentação simultânea da celulose e da hemicelulose pode ser uma alternativa para evitar esse tipo de inibição. Neste processo utiliza-se xilanasas e β -xilosidases visando a hidrólise de xilanas e xilo-oligossacarídeos que diminuem a atividade das celulasas por adsorverem na superfície da celulose e por inibição competitiva. E por último, o uso de micro-organismos que fermentam xilose evitaria o acúmulo desse açúcar e a inibição que o mesmo causa nas celulasas.

Outro tipo de inibição que pode contribuir para uma menor taxa de hidrólise é a adsorção não produtiva das celulasas na lignina. Uma alternativa para evitar a adsorção das enzimas é a adição de substâncias tais como BSA (Bovine Serum Albumin), Poly(ethylene glycol) (PEG) e tween durante a hidrólise. O PEG tem sido descrito por se ligar na lignina impedindo dessa forma a adsorção das celulasas na mesma. A adição de PEG na hidrólise

enzimática do Steam-pretreated spruce (SPS) aumentou a conversão enzimática de 47 para 67% (Börjesson et al., 2007). Uma correlação diretamente proporcional foi verificada entre concentração de tween e presença de celulase livre após a hidrólise de *Pinus contorta*. A adição de Tween foi verificada como essencial para a reciclagem da enzima devido ao seu papel de evitar adsorção da enzima (Tu & Saddler, 2010). Aumento da conversão enzimática foi verificado pela adição de BSA na hidrólise enzimática de papel de filtro por celulase. A conversão de celulose foi aumentada de 74,4% para 92,1% na presença de BSA. Os resultados indicaram que O BSA pode aumentar a estabilidade da enzima a altas temperaturas. Neste mesmo estudo foi verificada uma menor adsorção das celulasas com o aumento da concentração de BSA (Wang et al., 2013).

1.1.2.2. Temperaturas incompatíveis de hidrólise e fermentação

Um dos principais inconvenientes do processo de produção de etanol à partir de biomassa lignocelulósica são as temperaturas incompatíveis de hidrólise enzimática e fermentação. As celulasas possuem temperatura ótima de atuação próxima de 50°C enquanto os micro-organismos fermentam entre 30 e 37°C (Olofsson et al., 2008). Processos têm sido propostos visando vencer essa incompatibilidade e ao mesmo tempo evitar quedas no rendimento tanto da hidrólise quanto da fermentação. Alternativas incluem sacarificação e fermentação em separado (SHF) e uso de leveduras termotolerantes.

Sacarificação e fermentação em separado é a concepção tradicional, na qual a hidrólise da celulose, após o pré-tratamento da matéria-prima, é anterior a etapa de fermentação. A vantagem desse processo é a de se poder realizar cada etapa na sua condição ótima, eliminado assim o problema causado pela incompatibilidade de temperatura (de Souza et al., 2012; Saha et al., 2011). Os inconvenientes do processo são a necessidade de resfriamento de reatores e o baixo rendimento comparado ao SSF, pois ocorre a inibição das celulasas pelos produtos de hidrólise (Olofsson et al., 2008; Tomas-Pejo et al., 2009).

Devido à incompatibilidade de temperatura, trabalhos têm focado no uso de leveduras termotolerantes. Neste sentido, linhagens termotolerantes, principalmente pertencentes às espécies *Saccharomyces cerevisiae* e

Kluyveromyces marxianus, têm sido isolados e utilizados no processo SSF (de Souza et al., 2012; Faga et al., 2010; Moreno et al., 2012; Suryawati et al., 2008). Alguns isolados de *S. cerevisiae* que podem tolerar temperaturas superiores a 44°C têm sido selecionados com sucesso, entretanto as taxas de crescimento e de produção de etanol nestes casos são menores nestas temperaturas (Sree et al., 2000).

Entre as espécies de leveduras conhecidas utilizadas em processos fermentativos, *K. marxianus* tem mostrado alto desempenho em termos de crescimento e fermentação em altas temperaturas (Ballesteros et al., 2004; de Souza et al., 2012; Hong et al., 2007; Suryawati et al., 2008).

De Souza e colaboradores (2012) compararam a capacidade fermentativa de duas linhagens termotolerantes, *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e *Saccharomyces cerevisiae* LBM-1. As linhagens foram capazes de crescer em temperaturas acima de 40°C. Neste estudo a melhor temperatura de fermentação para a levedura *S. cerevisiae* LBM-1 foi 37°C, ao passo que para *K. marxianus* UFV-3 foi 42 °C. Produção de etanol próximo de 19 g/L foi obtido por Faga e colaboradores (2010) utilizando *K. marxianus* IMB3 fermentando a 45°C e *S. cerevisiae* D5A a 37 °C. Krishna e colaboradores (2001) utilizando uma linhagem de *S. cerevisiae* NRRL-Y-132, bagaço de cana-de-açúcar e 40 FPU de enzima por grama de substrato obtiveram aproximadamente 25 g/L de etanol a 40°C. No entanto, essa alta concentração de etanol exigiu uma carga de enzima muito alta o que impacta o processo.

Entre as vantagens no uso de leveduras termotolerantes incluem redução de custo com resfriamento, dispensa de unidade refrigeração, melhor rendimento de hidrólise, redução dos riscos de contaminação, evaporação contínua do caldo sob pressão reduzida e sustentabilidade para uso em países tropicais (Hasunuma & Kondo, 2012).

Uma vez que o crescimento e produção de etanol tendem a ser menor com o aumento da temperatura uma alternativa seria a busca por celulasas que tenham atividade ótima próxima a temperatura, ideal de crescimento dos micro-organismos. Além disso, o uso de temperaturas menores no processo contribuiria para uma menor perda de etanol por evaporação e menor gasto de energia com aquecimento. Neste sentido, o isolamento de micro-organismos produtores de enzimas e a caracterização cinética das mesmas surgem como

uma alternativa promissora. Modificação estrutural da enzima por mudanças na sequência de aminoácidos pode contribuir para obtenção de enzimas com temperaturas ótimas de atuação próximas ao do crescimento dos micro-organismos fermentadores.

1.1.3. Custo das enzimas

Atualmente, os custos do pré-tratamento e hidrólise enzimática são os principais obstáculos econômicos para a comercialização da tecnologia de bioconversão da biomassa em etanol. Uma limitação do processo que contribui ainda mais para o aumento do custo é a inibição das celulasas pelos produtos de hidrólise, glicose e celobiose (Kristensen et al., 2009b; Wang et al., 2012).

Devido à baixa concentração de β -glicosidases nos coquetéis enzimáticos disponíveis comercialmente, faz-se necessário sua suplementação com β -glicosidases de outras fontes. Isto é necessário, pois por meio da hidrólise da celobiose pelas β -glicosidases consegue-se diminuir o efeito inibitório causado na endoglucanase e celobiohidrolase. No entanto, isso resulta num impacto bastante significativo para o processo, em termos de custos, podendo representar de 30 a 50% (Chen & Qiu, 2010).

1.1.3.1. Bioprocesso consolidado (CBP)

Uma forma de reduzir os custos do processo de hidrólise é a obtenção de micro-organismos fermentativos capazes de hidrolisar a biomassa lignocelulósica. Assim, a hidrólise da celulose e a fermentação da glicose acontecem em um mesmo equipamento em um processo denominado bioprocesso consolidado. (Figura 2) (Lynd et al., 2005).

Nesse sentido, diversos trabalhos com leveduras geneticamente modificadas expressando enzimas do complexo celulolítico vêm sendo realizados (Hong et al., 2007; Jeon et al., 2009; Yanase et al., 2010b).

Dentre os organismos que têm sido geneticamente modificados se destacam as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*. *S. cerevisiae* destaca-se devido a sua capacidade fermentativa, sua tolerância a etanol e outros inibidores e por ser mais facilmente modificada devido a um maior conhecimento do seu genoma e da sua fisiologia. *K.*

marxianus devido ao fato de possuir características desejáveis para o processo. Dentre essas características destacam-se a termotolerância, a capacidade de assimilar uma ampla variedade de substratos como lactose, glicose, xilose, sacarose e inulina como também possuir a maior taxa de crescimento encontrado entre organismos eucariotos. E mais importante, por combinar características de eficiente capacidade fermentativa e capacidade de secretar proteínas heterólogas (de Souza et al., 2012; Faga et al., 2010; Fonseca et al., 2013; Fonseca et al., 2008; Lane et al., 2011; Lane & Morrissey, 2010; Lertwattanasakul et al., 2013; Rocha et al., 2011b).

Devido à capacidade de *K. marxianus* secretar uma proteína de alta massa molecular como a inulinase, supõem-se que essa seja uma característica favorável para sua aplicação em produção de proteínas heterólogas (Zhang et al., 2003). Alguns exemplos mostrando a produção heteróloga de proteínas nesta levedura foram relatados na literatura (Hong et al., 2007; Pecota et al., 2007; Rocha et al., 2010; Sieiro et al., 2009; Yanase et al., 2010a; Zhang et al., 2003).

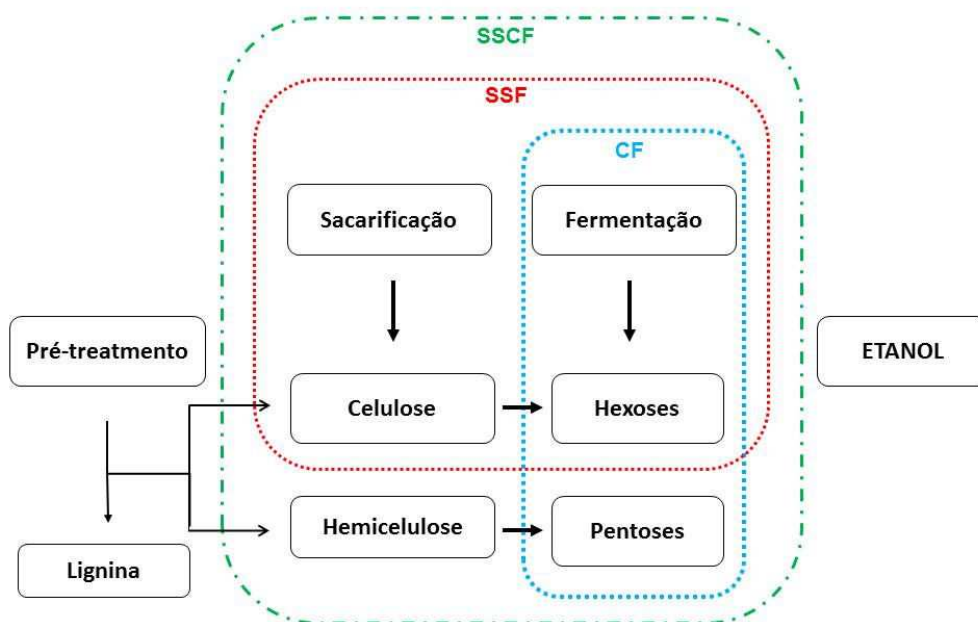


Figura 2 – Esquema representativo de produção de etanol de biomassa lignocelulósica por bioprocesso consolidado (CBP). Adpatado de (Hasunuma & Kondo, 2012).

1.1.3.2. Co-fermentação de xilose e celobiose

Uma opção pouco explorada é a utilização de linhagens que utilizam a celobiose. Linhagens selvagens de *S. cerevisiae* não conseguem assimilar celobiose, porque não possui um transportador de celobiose e uma β -glicosidase capaz de hidrolisar a celobiose em glicose. Uma alternativa seria utilizar linhagens geneticamente modificadas ou as que naturalmente expressam o transportador e/ou uma β -glicosidase (Ha et al., 2011).

Recentemente Ha e colaboradores (2011) obtiveram uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae* capaz de co-fermentar celobiose e xilose. Os genes que codificam um transportador de celodextrina e uma β -glicosidase intracelular foram expressos em *S. cerevisiae* modificada para fermentar xilose. Os autores destacam que a co-fermentação torna possível a utilização de coquetéis enzimáticos com atividade limitada de β -glicosidase, reduzindo dessa forma, o custo associado à hidrólise. Esta estratégia contribui também para o aumento da produtividade em etanol devido à sinergia entre celobiose e xilose. A presença de celobiose não interfere na utilização de xilose pela levedura como acontece quando a glicose está presente no meio.

Aeling e colaboradores (2012) obtiveram uma linhagem de *S. cerevisiae* capaz de co-fermentar xilose e celobiose sob condições anaeróbicas. Esta linhagem foi obtida pela inserção de uma xilose isomerase, superexpressão do gene que codifica uma xiluloquinase, expressão de um transportador de celobiose e de uma fosforilase de celobiose. A linhagem, no entanto, foi incapaz de utilizar xilose e celobiose como única fonte de carbono em anaerobiose, uma vez que, nessas condições não há geração suficiente de ATP para o crescimento. O crescimento e a fermentação ocorreram com a presença de pequenas quantidades de glicose no meio. Os autores apontam que talvez um aumento de atividade da fosforilase e a utilização de transportadores passivos de celobiose seja uma alternativa para que a própria celobiose seja fonte de carbono e energia para o crescimento microbiano.

1.1.3.3. Engenharia de superfície celular

A engenharia de superfície se baseia na expressão de uma proteína alvo na superfície celular de uma célula. Para isto, essa deve ser fusionada a uma determinada proteína chamada âncora. Existem várias características que a proteína âncora deve possuir para ser utilizada de maneira eficiente. Um delas é possuir mesma ou possua uma sequência sinal que tem como função dirigir sua transferência para a superfície da célula. Uma segunda característica é que esta proteína não interfira com a estabilidade e atividade da proteína alvo (Tanaka et al., 2012). Diferentes proteínas têm sido utilizadas como âncora. Dentre essas temos a α -agglutinin, Aga2 e Aga1 (Baek et al., 2012; Tanaka et al., 2012; Wen et al., 2010).

Existem várias vantagens que podem ser apontadas pelo uso da engenharia de superfície celular:

(1) A proximidade das enzimas facilita a hidrólise devido a ação sinérgica das enzimas;

(2) A ocorrência da hidrólise próxima a membrana aumenta a velocidade de captação da glicose evitando seu acúmulo no meio. Com isso diminui-se a chance de contaminação como também o efeito da repressão catabólica por glicose facilitando dessa forma a captação de xilose pela célula.

(3) Redução do custo relacionado a hidrólise uma vez que haverá reutilização das enzimas quando recuperado o inóculo.

(4) Manutenção da atividade das enzimas enquanto as leveduras continuam a crescer (Baek et al., 2012; Fujita et al., 2004; Matano et al., 2012a; Tanaka et al., 2012).

Neste cenário, tem sido obtidos nos últimos anos linhagens de leveduras geneticamente modificadas expressando celulases e hemicelulases na superfície celular visando assim, a sua aplicação na produção de etanol (Baek et al., 2012; Wen et al., 2010; Matano et al., 2012b).

Baek e colaboradores (2012) obtiveram 2,12 g/L de etanol utilizando PASC (phosphoric acid swollen cellulose) como substrato. Neste estudo o processo foi otimizado pela mistura na proporção (6:2:1) de linhagens de *S. cerevisiae* expressando na sua superfície endoglucanases, exoglucanase e β -glicosidase. Em outro estudo Wen e colaboradores (2010) obteve uma

linhagem recombinante de *S. cerevisiae* expressando na sua superfície um minicelulossoma trifuncional. A linhagem recombinante foi capaz de hidrolisar celulose e produzir aproximadamente 1,8 g/L de etanol com um rendimento de 0,31 g de etanol por g de PASC consumido depois de 70 h.

Uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae* expressando endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase na sua superfície foi capaz de produzir etanol com um rendimento 1,4 vezes maior que a linhagem selvagem. O processo foi conduzido em altas concentrações de palha de arroz como substrato e após 72 h obteve-se 27,3 g/L de etanol. Os autores concluíram que o uso da linhagem recombinante reduziu o uso de enzimas comerciais no processo (Matano et al., 2012b).

Melhoramento genético de micro-organismos é um dos principais fatores necessários para geração de uma planta competitiva para produção de etanol a partir de lignocelulose e marcaria um avanço significativo em termos de eficiência e simplicidade do processo. Apesar da diversidade de trabalhos com expressão de proteínas em leveduras, os níveis de secreção nesses organismos ainda são considerados baixos quando comparadas aos fungos filamentosos. Neste âmbito, surge a necessidade de mais estudos visando à padronização de um sistema de expressão fácil e mais eficiente para obtenção de leveduras recombinantes. No entanto, a utilização de linhagens expressando enzimas do complexo celulolítico não necessariamente culminará na independência da adição dos preparados enzimáticos durante o processo. Assim, além do uso desses micro-organismos seria de grande importância o desenvolvimento de técnicas que permitam a reciclagem das enzimas bem como o desenvolvimento de uma seção destinada à produção de celulasas e hemicelulasas na própria indústria.

1.1.4. Micro-organismos que fermentam xilose

O segundo polímero mais abundante presente na biomassa lignocelulósica é a hemicelulose, representando cerca de 15-35%. Os constituintes mais abundantes da hemicelulose são as xilanas, as quais contêm como principal constituinte resíduos de xilose unidos por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) (Girio et al., 2010; Scheller & Ulvskov, 2010). Um processo eficiente

de produção de etanol de segunda geração requer micro-organismos capazes de fermentar não somente a glicose como também as pentoses presentes na hemicelulose (Oreb et al., 2012). No entanto, um número limitado de micro-organismos fermentam xilose com altos rendimentos de etanol. Assim, estratégias de engenharia metabólica, engenharia evolucionária e isolamento de micro-organismos surgem como alternativas promissoras visando à obtenção de linhagens capazes de utilizar eficientemente este açúcar (Matsushika et al., 2009).

1.1.4.1. Engenharia metabólica

A via metabólica de utilização de xilose se inicia com a captação da xilose e sua conversão em xilitol pela enzima xilose redutase (XR) ou em xilulose pela ação da xilose isomerase (XI). O xilitol por sua vez pode ser convertido em xilulose pela xilulose desidrogenase (XDH) e em seguida em xilulose-5P pela enzima xiloquinase (XKS), o qual entra na via das pentoses fosfato (Figura 3) (Gunsalus et al., 1955; van Maris et al., 2006).

O principal organismo utilizado na fermentação alcoólica é a levedura *S. cerevisiae*, a qual fermenta açúcares como sacarose e glicose com altos rendimentos de etanol. No entanto, esse micro-organismo não é capaz de fermentar xilose em etanol, pois não possui um transportador específico para xilose e os genes da via de utilização de xilose são expressos em baixos níveis (Kim et al., 2013b; Runquist et al., 2010; Toivari et al., 2004).

Nesse contexto, a engenharia metabólica utilizando *S. cerevisiae* tem sido foco de intensas pesquisas. O primeiro relato de fermentação anaeróbica de xilose em *S. cerevisiae* é da década de 80, no qual genes de utilização de xilose foram superexpressos (Rizzi et al., 1988; Rizzi et al., 1989). Desde então, diversas abordagens têm sido testadas mudando a expressão de um ou mais genes envolvidos na via. Estas abordagens são importantes para evitar principalmente o desbalanço redox de coenzimas NADPH e NAD⁺, que pode afetar o fluxo metabólico desviando-o para a formação de xilitol. Esse desvio é comum em linhagens de levedura que utilizam xilose devido à especificidade diferencial da xilose redutase por NADPH e da xilitol desidrogenase por NAD⁺. A formação do NADPH ocorre na via das pentoses fosfato e a regeneração do NAD⁺ ocorre somente na cadeia transportadora de elétrons. Porém, sob

suprimento limitado de oxigênio, não ocorre à completa reoxidação do cofator, levando a um desequilíbrio redox o que induz a produção e excreção de xilitol (de Figueiredo Vilela et al., 2013; Guo & Jiang, 2013; Toivari et al., 2004; Watanabe et al., 2007).

Visando sua aplicação no processo de fermentação de biomassa lignocelulósica, diversos micro-organismos têm sido engenheirados e sua capacidade de fermentar xilose em etanol tem sido testada. Guo & Jiang (2013) obtiveram linhagens de leveduras expressando genes de xilitol desidrogenase, xilose redutase e xiloquinase. Neste estudo foi possível selecionar uma *S. cerevisiae* EP490 que mostrou captação de xilose e produtividade de etanol superior a *Scheffersomyces stipitis* TM1. Foi possível obter uma linhagem de *S. cerevisiae* com fermentação eficiente de xilose e etanol pela clonagem e expressão de uma xilose isomerase de *Burkholderia cenocepacia*. A expressão dessa enzima contribui para um consumo cinco vezes maior de xilose comparado com a linhagem selvagem (de Figueiredo Vilela et al., 2013). Ismail e colaboradores (2013) isolaram uma linhagem termotolerante de *S. cerevisiae* capaz de crescer a 38°C. Modificações genéticas foram realizadas para que fosse capaz de utilizar xilose. Teste de fermentação a altas temperaturas mostrou que 9 das 10 linhagens testadas foram capazes de consumir xilose eficientemente. Foi possível obter uma linhagem com uma produtividade de 0,87g/L/h de etanol com um rendimento de 0.34 g etanol/g xilose.

Alternativas a serem testadas para que seja possível a utilização de xilose seriam:

(1) A identificação e isolamento de xilose isomerase e otimização da sua expressão em *S. cerevisiae*.

(2) Identificação de possíveis transportadores de xilose.

(3) Engenharia de proteínas visando alterar a especificidade da xilose redutase e xilitol desidrogenase pelos cofatores de modo a evitar o desbalanço redox.

(4) Engenharia genética e metabólica da via oxidativa e não oxidativa da via das pentoses fosfato visando o desvio do fluxo de carbono para a produção de etanol.

(5) Paralelamente a isso, sugerem-se estudos mais detalhados dos genes, proteínas e regulação metabólica em leveduras não *Saccharomyces* como as do gênero *Spathaspora*, *Candida* e *Scheffersomyces*.

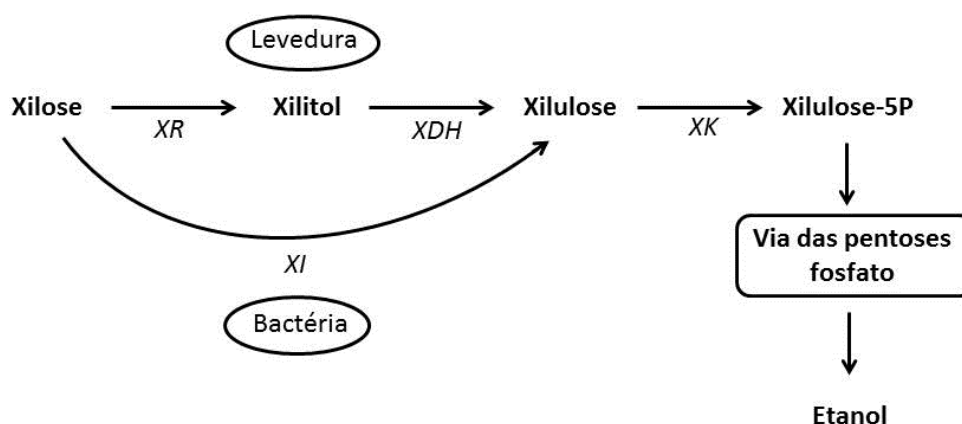


Figura 3 – Vias de utilização de xilose em leveduras e bactérias com as enzimas envolvidas. Xilose redutase (XR), Xilitol desidrogenase (XDH), Xiluloquinase (XK) e Xilose isomerase (XI).

A engenharia evolucionária surge como uma alternativa para adaptação, melhoramento e obtenção de linhagens de leveduras fermentadoras de xilose (Garcia Sanchez et al., 2010; Scalcinati et al., 2012).

Por essa técnica foi possível selecionar linhagens de *S. cerevisiae* com aumento no transporte de xilose e arabinose bem como dos níveis das enzimas da via da xilose que foram introduzidas (Garcia Sanchez et al., 2010). Zhou e colaboradores (2012) obtiveram uma linhagem com um aumento do crescimento, consumo de xilose e produção de etanol. Com a adaptação de uma recombinante de *S. cerevisiae* para a utilização de xilose foi possível selecionar uma linhagem capaz de fermentar xilose em etanol com rendimento de 0,37g/g e com um aumento na taxa de crescimento de 0.025 h⁻¹ para 0.133 h⁻¹ (Madhavan et al., 2009).

Visando um aproveitamento integral da biomassa muitos grupos de pesquisa têm focado no isolamento de micro-organismos que naturalmente fermentam xilose em etanol. Dentre esses micro-organismos destacam-se linhagens do gênero *Spathaspora* que têm sido isolados de diversos ambientes

como madeiras em decomposição (Cadete et al., 2013; Cadete et al., 2009; Cadete et al., 2012).

Cadete e colaboradores (2013) isolaram quatro novas espécies fermentadoras de xilose. Essas leveduras provenientes de madeira podre da região da Amazônia, norte do Brasil foram capazes de fermentar xilose em etanol sob condições aeróbicas. Neste trabalho, a espécie *Spathaspora xylofermentans* cresceu bem em glicose e xilose e produziu etanol com um rendimento ($YE/glu = 0.37 \pm 0.02$ para glicose e $YE/xyl = 0.34 \pm 0.04$) para xilose. Em um estudo anterior os mesmos autores isolaram um total de 224 linhagens de leveduras da região do Amazônia, norte do Brasil (Cadete et al., 2012). Entre as espécies fermentadoras de xilose foram identificadas linhagens de *Spathaspora passalidarum*, *Scheffersomyces stipitis* e cinco novas espécies do clado *Spathaspora*. As novas espécies produziram etanol e xilitol em diferentes concentrações utilizando xilose como substrato. A espécie *Spathaspora passalidarum* apresentou altos rendimentos (0.31 g/g e 0.37 g/g) e produtividade (0.62 g/L·h e 0.75 g/L·h) de etanol a partir de xilose (50g/L). Neste mesmo estudo, foram isoladas espécies de *Candida tropicalis*, *Asterotremella humicola*, *Candida boidinii* e *Debaryomyces hansenii*.

A espécie *Spathaspora passalidarum* descrita por Nguyen e colaboradores (2006) apresentou altas taxas de crescimento, rendimentos em etanol e rápida utilização de xilose após consumo da glicose sob condições anaeróbicas. A produção de etanol obtida de glicose (30 g/L), xilose (32 g/L) e mistura (15 g/L de xilose e 15 g/L de glicose) foram 90% do rendimento teórico que é de 0,52 e a taxa específica de crescimento foi de 0.67 ± 0.04 , 0.58 ± 0.04 , e $0.63 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$, respectivamente (Hou et al., 2011).

1.1.5. Estresse por inibidores

Durante a etapa de fermentação as células de leveduras estão sujeitas a diversos tipos de estresse. Dentro do contexto do etanol celulósico, destacam-se o estresse causado por inibidores formados na etapa de pré-tratamento ou na etapa da hidrólise (Jonsson et al., 2013).

Os compostos inibidores formados são divididos em três grandes grupos: os derivados furanos originados da desidratação de hexoses e

pentoses, sendo os principais representantes os furfurais e os hidroximetilfurfurais; os compostos fenólicos que são derivados da hidrólise da lignina e os ácidos carboxílicos sendo os mais comuns o acético, fórmico e levulínico que podem ser formados pela desacetilação da hemicelulose e degradação de hidroximetilfurfural. O tipo e a quantidade desses inibidores formados dependem da biomassa e do tipo de pré-tratamento utilizado (Alvira et al., 2010; Jonsson et al., 2013; Parawira & Tekere, 2011).

Cada um desses inibidores exerce um determinado efeito no metabolismo da levedura. Os furfurais podem afetar a expressão de genes que codificam enzimas da via glicolítica, via das pentoses fosfato, ciclo do ácido cítrico bem como podem alterar o balanço redox da célula. Os ácidos podem se difundir através da membrana, se dissociar no citoplasma levando a diminuição do pH do citoplasmático. O ácido acético, por exemplo, pode inibir o crescimento, causar apoptose e depleção de ATP. Os compostos fenólicos podem alterar a integridade da membrana. Juntos podem contribuir para a formação de espécies reativas de oxigênio e dessa forma induzir estresse oxidativo nas células. Esses fatores em conjunto podem afetar negativamente o metabolismo da levedura, causando diminuição da concentração e produtividade em etanol (Ullah et al., 2012; Palmqvist et al., 1999; Ding et al., 2011). Dessa forma, tornam-se necessárias estratégias visando remover esses inibidores ou mesmo tornar os micro-organismos tolerantes aos mesmos.

1.1.5.1. Detoxificação

Uma das possíveis opções para remoção dos inibidores é o uso de métodos de detoxificação que são formados antes das etapas de hidrólise e/ou fermentação ou mesmo durante essas etapas. Esse processo tem por finalidade reduzir a concentração dos inibidores que dependendo da concentração influenciam negativamente no processo (Jonsson et al., 2013; Parawira & Tekere, 2011).

Diversos métodos de detoxificação tais como alcalino, neutralização e resinas de troca iônica têm sido utilizados visando diminuir ou mesmo remover esses compostos. Tem sido testado também o uso de enzimas tais como lacases e micro-organismos modificados ou que, naturalmente têm a

capacidade de degradar esses compostos, como leveduras, fungos e bactérias. Dentre esses, destacam-se os fungos da podridão branca. Esses fungos produzem lacases e peroxidases. As lacases oxidam fenóis enquanto que as peroxidases visam diminuir espécies reativas de oxigênio (Chandel et al., 2007; Moreno et al., 2012; Parawira & Tekere, 2011; Sanchez & Cardona, 2008).

Na Figura 4 estão listados diversos métodos de detoxificação testados e seus efeitos na redução dos compostos inibidores.

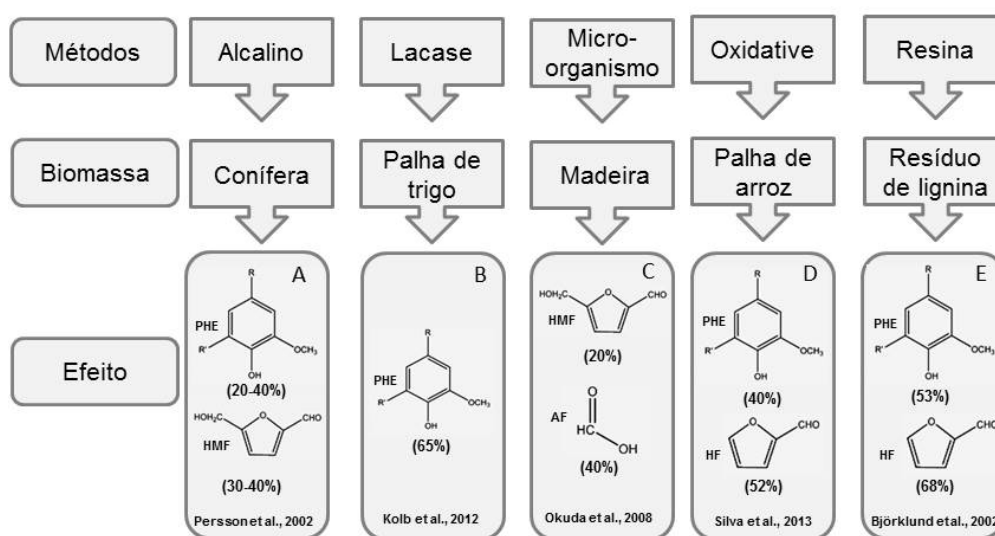


Figura 4 Efeito de diversos métodos de detoxificação na redução de compostos inibidores formados na etapa de pré-tratamento de diferentes biomassa: furfural (HF), hidroximetilfurfural (HMF), Fenólicos (PHE) e ácido fórmico (FA) sendo (A) (Björklund et al., 2002; (B) Kolb et al., 2012; (C) Okuda et al., 2008; (D) Persson et al., 2002; (E) Silva et al., 2013).

No entanto, esses passos adicionam custo e complexidade ao processo e geram resíduos. Estratégias de engenharia evolucionária têm se mostrado úteis na obtenção de linhagens com uma maior tolerância a inibidores.

Foi verificado um aumento na produtividade em etanol por linhagens de *S. cerevisiae* após cultivo em meio com concentrações crescente de inibidores (Martin et al., 2007). Neste mesmo experimento foi verificada uma maior conversão de furfural e 5-HMF da linhagem adaptada comparada com a linhagem não adaptada. Linhagens de *S. cerevisiae* obtidas pelo cultivo em meio contendo altas concentrações de inibidores exibiram aumento no

consumo de xilose e produção de etanol (Tomas-Pejo et al., 2010). Por meio de engenharia evolutiva em um meio contendo um coquetel de 12 inibidores foi possível obter linhagens de *S. cerevisiae* com significativo aumento no crescimento. Uma linhagem quando cultivada em hidrolisado de abeto apresentou aumento de 25 para 38% no consumo específico de açúcar, 32 para 50% na produtividade específica de etanol e redução do tempo de fermentação (Koppram et al., 2013). Wright e colaboradores (2011) utilizaram-se da engenharia evolucionária para aumentar a tolerância ao ácido acético da linhagem *S. cerevisiae* RWB218 fermentadora de xilose. Foram testadas duas estratégias, o cultivo contínuo e o descontínuo. Após 400 gerações as culturas em seleção contínua e descontínua foram capazes de crescer em xilose em pH ≤ 4 com 5 e 6 g L⁻¹ em ácido acético, respectivamente. Culturas em seleção contínua tiveram um aumento de 75% no consumo específico de xilose.

Isolamento e manipulação genética de micro-organismos tornam-se alternativa promissora para obtenção de organismos tolerantes a inibidores. Torna-se necessário uma compreensão das vias de sinalização e dos genes envolvidos na resposta ao estresse por inibidores. Esse conhecimento facilitará a obtenção de micro-organismos mais tolerantes ao estresse. O uso desses micro-organismos contribuirá para diminuição dos custos na etapa de detoxificação como também contribuirá para o aumento do rendimento em etanol do processo.

1.1.6. Baixo rendimento de etanol do processo

No processo de produção de etanol de primeira geração a partir do caldo de cana-de-açúcar obtém-se ao final da fermentação aproximadamente 8–11% (v/v) de etanol (Basso et al., 2008; Soccol et al., 2010). Na maioria dos trabalhos envolvendo produção de etanol de segunda geração, a concentração de etanol obtida fica próximo aos 3% (v/v) (de Souza et al., 2012; Faga et al., 2010; Krishna et al., 2001; Rudolf et al., 2008; Suryawati et al., 2008). Altas concentrações de etanol são importantes para o balanço energético e viabilidade econômica do processo, principalmente na etapa da destilação (Kristensen et al., 2009a). Nesse âmbito, diferentes estratégias têm sido testadas e otimizadas visando o aumento da concentração de etanol. Dentre as estratégias destacam-se: a co-fermentação, sacarificação e co-fermentação

simultânea, pré-sacarificação e a sacarificação utilizando altas concentrações de sólidos (de Souza et al., 2012; Erdei et al., 2013; Koppram et al., 2013; Varga et al., 2004).

1.1.6.1. Co-fermentação (CF)

A concentração de etanol é um importante parâmetro na avaliação da viabilidade de produção de etanol lignocelulósico. Esse processo consiste na fermentação de dois ou mais açúcares em uma única etapa (Figura 1). No caso do etanol de biomassa lignocelulósica da glicose e da xilose liberada na hidrólise da celulose e hemicelulose, respectivamente (Erdei et al., 2013; Oreb et al., 2012).

No entanto, esse processo requer micro-organismos que fermentam os açúcares a etanol com alto rendimento. Uma alternativa seria a obtenção de micro-organismos geneticamente modificados para a utilização de xilose e sua utilização em processos de co-cultura. Diferentes micro-organismos têm sido modificados pela introdução da via de utilização de xilose. Dentre os micro-organismos destacam-se linhagens de *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis* e *S. cerevisiae*. No entanto, o que se tem notado é uma reduzida tolerância ao etanol dessas linhagens engenheiradas durante a fermentação da xilose comparada ao da glicose (Jeffries & Jin, 2004; Kim et al., 2013a; Oreb et al., 2012; Saha et al., 2011).

Assim outra abordagem que tem sido testada é a utilização de mais de um micro-organismo no processo de co-fermentação. Nesse processo, tem sido utilizado um organismo que fermenta glicose e outro que fermenta xilose com altos rendimentos (Xu e Tschirner, 2011; Hanly et al., 2012; Qian et al., 2006).

Dentre os diversos micro-organismos utilizados em co-cultura destacam-se linhagens de *S. cerevisiae* para a fermentação de glicose e *S. stipitis* para a fermentação de xilose (Wan et al., 2012) (Yadav et al., 2011; Chandel et al., 2011). Yadav e colaboradores (2011) compararam o rendimento em etanol utilizando monocultura e co-cultura de *S. cerevisiae* e *S. stipitis*. Neste trabalho eles observaram um aumento no rendimento e produtividade em etanol quando os substratos glicose e xilose eram consumidos simultaneamente. *S.*

cerevisiae (OVB 11) utilizou 30 ± 0.2 g/L de açúcares e produziu 7.5 g/L em 36 h com um rendimento de 0.3 g/g e produtividade 0.20 g/L/h. Já em co-cultura de *S. cerevisiae* (OVB 11) e *P. stipitis* (NCIM 3498) a produção foi de 12 g/L com uma eficiência de 95%. A produtividade volumétrica foi de 0.33g/L/g com um rendimento de 0.4g/g.

Outros micro-organismos também têm sido testados em processos de co-cultura. Co-cultura de *Clostridium thermocellum* e *Clostridium thermolacticum* foram capazes de fermentar glicose, xilose, celulose e celulose microcristalina (CMC) (Xu e Tschirner, 2011). Dentre estes destacam-se *Escherichia coli* e *S. cerevisiae* em mistura de glicose e xilose (Hanly et al., 2012). Altos rendimentos em etanol 0,49g por g de açúcar total correspondendo a 96,1% do valor teórico foram obtidos após 48 h de fermentação utilizando co-cultura de *Pachysolen tannophilis* ATCC e *E. coli* (Qian et al., 2006). Co-imobilização de linhagens de *S. cerevisiae* e *Candida shehatae* foram capazes de consumir 100% da glicose e 73% de xilose com um rendimento de 0,48g de etanol por grama de açúcar total. Neste estudo a melhor performance de fermentação foi obtida com um excesso de *Candida shehatae* em relação a *S. cerevisiae*.

A utilização de co-cultura pode contribuir, portanto, para o aumento do rendimento e produtividade do processo devido à conversão simultânea dos dois açúcares glicose e xilose (Chen et al., 2011). Em cultura pura de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*, os açúcares tendem a ser consumidos de modo sequencial com uma preferência por glicose devido à menor afinidade dos transportadores *HXT* por xilose (Ha et al., 2010; Subtil and Boles, 2012). Devido ao fato de linhagens engenheiradas apresentarem uma menor tolerância ao etanol, a utilização preferencial de glicose leva ao aumento da concentração de etanol no meio reduzindo dessa forma a utilização de xilose (Jeffries and Jin, 2000). Esse fato pode estar influenciando no menor rendimento e produtividade em etanol quando se compara monocultura e co-cultura.

1.1.6.2. Sacarificação e co-fermentação simultâneas (SCFS)

Este processo consiste em realizar a sacarificação da biomassa simultaneamente à fermentação das pentoses e hexoses geradas pela hidrólise da celulose e hemicelulose, respectivamente, após o pré-tratamento. Portanto

é um processo mais integrado do que o processo SSF. A hidrólise da hemicelulose pode ocorrer pela ação de hemicelulases simultaneamente a hidrólise e fermentação da celulose ou proveniente da hemicelulose hidrolisada na etapa de pré-tratamento. Neste caso, o hidrolisado hemicelulósico é utilizado no processo SSF (Figura 1). Essa forma de condução do processo fermentativo permite um aproveitamento integral da biomassa contribuindo assim para um maior rendimento e produtividade de etanol no final do processo (Cardona et al., 2010; Cardona & Sanchez, 2007; Koppram et al., 2013; Olofsson et al., 2010).

No entanto, esse processo requer organismos geneticamente modificados capazes de fermentar xilose em etanol. Neste contexto, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas tem sido utilizadas no processo de sacarificação e co-fermentação simultânea (Bertilsson et al., 2009; Carrasco et al., 2011; Koppram et al., 2013; Ohgren et al., 2006; Olofsson et al., 2010).

Uma desvantagem a ser considerada é a reduzida tolerância a etanol de micro-organismos engenheirados durante a fermentação da xilose. E como os micro-organismos utilizam preferencialmente a glicose, após o seu consumo a concentração de etanol aumenta reduzindo dessa forma a fermentação da xilose (Jeffries e Jin et al., 2000).

1.1.6.3. Pré-sacarificação

O processo de sacarificação e fermentação simultânea pode ser antecedido por uma etapa de pré-sacarificação. Esse processo consiste em realizar a hidrólise parcial da biomassa antes do início da fermentação. A função da pré-sacarificação é fornecer uma fonte de carbono inicial para a levedura, uma vez que a biomassa está na forma de polímero que não é uma fonte de carbono diretamente fermentável (Martin et al., 2008; Varga et al., 2004).

Foi demonstrado que a pré-sacarificação leva a uma rápida dissolução e uma boa mistura do substrato no meio, levando a um maior rendimento de etanol no final do processo (de Souza et al., 2012; Martin et al., 2008). (De Souza et al., 2012) demonstraram que a concentração inicial de glicose é o

principal fator que afeta o rendimento em etanol no processo SSF, daí a importância dessa etapa no processo. Foi recentemente relatado por resultar em maior produtividade e produção de etanol que o alcançado pelo processo de SSF (de Souza et al., 2012; Shahsavarani et al., 2013). A maior produção de etanol é interessante visando principalmente reduzir gastos de energia referente à etapa de destilação do processo.

1.1.7. Hidrólise em altas concentrações de sólidos

Com o intuito de aumentar a concentração de etanol no final do processo, pesquisas têm sido focadas no aumento da concentração inicial de sólidos na etapa da hidrólise (Lu et al., 2010).

Altos teores de sólidos podem ser definidos como uma condição em que pouca ou nenhuma água livre esteja presente. Aumento da carga de sólido contribui para o aumento da concentração de açúcar e conseqüentemente de etanol, tendo, portanto, efeitos significativos nos custos energéticos e viabilidade econômica do processo, principalmente na etapa da destilação (Kristensen et al., 2009a; Kristensen et al., 2009b).

No entanto, esse aumento deve ser avaliado uma vez que o aumento na concentração de sólidos pode resultar em acúmulo de produtos de inibição que podem influenciar negativamente a hidrólise e fermentação. Além disso, a alta concentração de sólidos pode gerar o que se chama dificuldade de mistura devido à insolubilidade da biomassa. Assim, a baixa concentração de água nessa condição deve ser mensurada devido à importância da mesma no processo atuando no deslocamento de massa, na função da enzima e por atuar diretamente na clivagem da ligação glicosídica (Felby et al., 2008; Mohagheghi et al., 1992; Fan et al., 2003; Kristensen et al., 2009).

1.2. Considerações finais

Para alcançar uma produção de etanol economicamente viável há vários desafios a serem vencidos. Primeiramente existe a necessidade de conhecer estruturalmente a biomassa de forma a entender os fatores que contribuem para a recalcitrância. Esse conhecimento facilitará, por exemplo, na escolha das condições e métodos de pré-tratamentos a serem utilizados.

Atualmente os custos do pré-tratamento e da hidrólise impactam significativamente o processo em termos de custo. A hidrólise, por exemplo, pode representar até 30 a 50% do custo operacional de produção de etanol (Chen et al., 2010). Assim, processos de sacarificação e fermentação simultânea como também o bioprocessos consolidado têm sido testados para diferentes linhagens de micro-organismos. Neste sentido, linhagens termotolerantes têm sido modificadas geneticamente com genes que conferem resistência a inibidores, ao etanol e a temperatura, visando sua aplicação no processo.

Um importante parâmetro na avaliação da viabilidade de produção de etanol lignocelulósico é a concentração de etanol. Dessa forma, há necessidade da utilização integral da biomassa. Assim diversos grupos de pesquisa têm focado os estudos no isolamento e modificação genética de micro-organismos pela expressão de genes da via metabólica de utilização de xilose (de Figueiredo Vilela et al., 2013; Guo & Jiang, 2013). Isto é importante, pois altas concentrações de etanol são necessárias para o balanço energético e viabilidade econômica do processo, principalmente na etapa da destilação.

CAPÍTULO 2: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA E ALIMENTAÇÃO DO REATOR NA PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO

RESUMO

A sacarificação e fermentação simultânea (SSF) de biomassa em altas concentrações de sólidos é promissor para aumentar a concentração de etanol no final do processo. No entanto, a biomassa lignocelulósica é um material heterogêneo e insolúvel em água e o aumento da sua concentração no meio reacional pode influenciar negativamente a taxa de conversão de biomassa em álcool. Assim um dos objetivos do trabalho foi avaliar o efeito do aumento da concentração de sólidos e a forma de alimentação do reator, com enzimas e biomassa, no rendimento em etanol de um processo SSF. Os resultados obtidos mostram um aumento da concentração de etanol com o aumento da concentração de biomassa em todas as condições testadas. Quando se avaliou o efeito da adição gradual de enzimas, concentrações semelhantes de etanol foram obtidas, sugerindo que as enzimas não perdem, significativamente, sua atividade ao longo do processo. Os resultados obtidos com as análises físico-químicas do bagaço antes e após o processo fermentativo sugerem que os principais fatores que estão influenciando a hidrólise enzimática da biomassa são o conteúdo de lignina e o índice de cristalinidade da celulose, fatores esses que aumentam ao longo do processo diminuindo o rendimento em etanol.

2.0 Revisão de literatura

O processo de produção de etanol de segunda geração é dividido em quatro etapas: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação. As quatro etapas podem ser conduzidas de diferentes formas, sendo que o processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) tem se destacado pelo maior rendimento comparado a outros processos. O processo SSF pode ser antecedido por uma etapa de pré-sacarificação. Trabalhos recentes demonstram que a pré-sacarificação leva a uma rápida dissolução do substrato e uma boa mistura no meio, levando a um maior rendimento de etanol no final do processo (De Souza et al., 2012; Tomas-Pejo et al., 2009; Olofsson et al., 2008).

Na grande maioria dos trabalhos de produção de etanol de segunda geração se obtêm uma concentração final de etanol próxima a 3% (v/v) (de Souza et al., 2012; Faga et al., 2010; Rudolf et al., 2008; Suryawati et al., 2008). Assim para elevar o rendimento em etanol do processo, uma alternativa seria aumentar a concentração inicial de biomassa utilizada. O aumento da carga de sólidos contribui para o aumento da concentração de açúcar e conseqüentemente de etanol, tendo, portanto, efeitos significativos nos custos energéticos e viabilidade econômica do processo, principalmente na etapa da destilação (Kristensen et al., 2009a; Kristensen et al., 2009b).

Neste sentido, os efeitos do aumento da concentração de sólidos devem ser avaliados uma vez que a biomassa lignocelulósica é um material heterogêneo e insolúvel em água o que influencia na taxa de conversão de açúcares, principalmente devido à diminuição da quantidade de água livre no processo. De modo geral podemos dividir os efeitos da concentração de sólidos sobre o rendimento do processo em dois fatores principais: fatores ligados ao substrato e fatores ligados às enzimas. Dentre os fatores ligados ao substrato, destacam-se a recalcitrância e a solubilidade da biomassa e dentre os fatores ligados às enzimas destacam-se a inibição pelo produto de hidrólise, a adsorção na lignina e a perda de atividade ao longo do processo (Rahikainen et al., 2013; Kumar et al., 2012; Kristensen et al., 2009a; Kristensen et al., 2009b; Percival Zhang et al., 2006; Wang et al., 2012).

As celulases, principalmente as endoglucanases e celobiohidrolases, são fortemente inibidas por celobiose (Percival Zhang et al., 2006; Wang et al., 2012). Diversas alternativas podem ser utilizadas para reduzir essa inibição. Estas incluem: aumento da concentração de celulases na reação e suplementação com β -glicosidase, visando diminuir a concentração de celobiose. No entanto, essas alternativas aumentam significativamente os custos do processo (Chauve et al., 2010; Chen et al., 2010; Zhang et al., 2010). A presença da lignina também limita a etapa de hidrólise uma vez que a mesma pode diminuir a acessibilidade à celulose como também promover a adsorção não produtiva das celulases. Essa influência negativa da lignina é dependente tanto do conteúdo da lignina como das unidades monoméricas que a compõe (Fu et al., 2011; Masarin et al., 2011; Rahikainen et al., 2013; Wagner et al., 2011).

Os fatores relacionados ao substrato que afetam negativamente a hidrólise como a recalcitrância e a insolubilidade estão ligados às características físico-químicas da biomassa. Na parede celular vegetal a presença da lignina e a forte associação entre a celulose e a hemicelulose são importantes, conferindo sustentação à planta, além de protegê-la contra patógenos e substâncias químicas. No entanto, essas características físico-químicas tornam a parede altamente recalcitrante e difícil de ser desestruturada. A recalcitrância dificulta o acesso e o ataque das celulases e hemicelulases às ligações glicosídicas nos resíduos de glucanas e xilanas e, tem sido, um dos principais obstáculos para produção economicamente viável de bioetanol de segunda geração. Dentre os fatores que contribuem para a recalcitrância estão: grau de polimerização, cristalinidade, porosidade e a porcentagem, distribuição e tipo de lignina. (Alvira et al., 2010; Brodeur et al., 2011; Hendriks & Zeeman, 2009; Pauly & Keegstra, 2010; Agbor et al., 2011).

Neste sentido, um dos objetivos do trabalho foi avaliar o efeito do aumento da concentração de sólidos e a forma de alimentação do reator no rendimento em etanol do processo SSF. Além disso, avaliou-se o efeito da adição gradual da enzima durante o processo e as características físico-químicas da biomassa com o intuito de mapear quais os fatores que estão influenciando os rendimentos em etanol do processo.

2. Objetivos

Avaliar o efeito da concentração de biomassa e alimentação do reator com bagaço e enzima no rendimento em etanol do processo SSF como também dos fatores que influenciam na taxa de hidrólise e fermentação.

2.1. Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da adição e concentração de bagaço no rendimento no processo SSF;
- Avaliar o efeito da adição gradual de enzima no processo;
- Caracterizar físico-quimicamente o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, após o pré-tratamento e após a hidrólise;
- Determinar os fatores relacionados ao substrato e à enzima que podem influenciar a taxa de hidrólise e fermentação.

4. Metodologia

4.1. Micro-organismos e condições de crescimento

As células de *K. marxianus* foram pré-ativadas pelo crescimento em frascos erlenmeyers de 50mL contendo tampão citrato 50 mM pH 4,8 acrescido de extrato levedura (2,5 g/L); peptona (2,5 g/L); NH₄Cl (2g/L); KH₂PO₄ (1 g/L); MgSO₄7H₂O (0,3 g/L) e de glicose (20 g/L) sob agitação a 180 rpm por 16 h a 28 °C.

4.2. Pré-tratamentos

O bagaço de cana triturado, na concentração 10% (p/v), foi submetido a um pré-tratamento em 100 mL de solução de ácido sulfúrico 0,5% a 121°C por 30 minutos em autoclave. Posteriormente, o líquido foi coletado por filtração e o resíduo sólido lavado com água seguido de secagem a 50 °C por 24 horas. O sólido obtido, denominado celulignina, foi submetido a um pré-tratamento básico em solução de hidróxido de sódio 4% (p/v) nas mesmas condições descritas anteriormente.

4.3. Sacarificação e fermentação simultâneas com pré-sacarificação

Experimentos de SSF foram realizados em frascos erlenmeyers de 125 mL, cada um contendo 50 mL do meio de fermentação, sem glicose, sob agitação a 180 rpm. Inicialmente foi feito uma pré-hidrólise por 48 horas a 50 °C utilizando enzima comercial (Celluclast 1.5 L) na concentração final de 15FPU por grama de substrato. Ensaio SSF foram realizados em condições estéreis e a fermentação foi realizada a 42 °C utilizando leveduras em uma DO_(600nm) inicial igual a 2. Seis condições foram testadas no processo alterando-se a forma de alimentação do reator com relação a enzima e bagaço. As condições utilizadas estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Formas de condução do processo SSF com pré-sacarificação durante 48 h.

Ensaio	0h	8h	16h	24h	32h	48h	48h
1	4 : 60	-	-	-	-	-	-
2	4 : 15	-	15	-	15	-	15
3	4 : 60	-	1	-	1	-	1
4	4 : 15	-	1 : 15	-	1 : 15	-	1 : 15
5	1 : 60	-	1	-	1	-	1
6	1 : 15	-	1 : 15	-	1 : 15	-	1 : 15

Os valores 1, 4, 7 e 10 representam a quantidade em gramas de bagaço adicionado enquanto os valores 15 e 60 representam a quantidade em FPU de celulase comercial utilizada.

Alíquotas foram coletadas para análise de consumo de glicose e produção de etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

4.4. Sacarificação e fermentação simultânea

Experimentos de SSF foram realizados em frascos erlenmeyers de 125 mL, cada um contendo 50 mL do meio de fermentação sob agitação a 180 rpm. A hidrólise e a fermentação foram realizadas a 42 °C utilizando as leveduras em uma $DO_{(600nm)}$ inicial igual a 2 e enzima comercial (Celluclast 1.5 L) na concentração final de 15 FPU por grama de substrato. Nove condições foram testadas no processo no qual se variou a forma de alimentação do reator com relação à enzima e bagaço. As condições testadas estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 – Formas de condução do processo SSF sem pré-sacarificação.

Ensaio	0h	5h	10h	15h	20h	25h	30h
1	4 : 60	-	-	-	-	-	-
2	4 : 15	-	15	-	15	-	15
3	4 : 60	-	1	-	1	-	1
4	4 : 15	-	1 : 15	-	1 : 15	-	1 : 15
5	1 : 60	-	1	-	1	-	1
6	1 : 15	-	1 : 15	-	1 : 15	-	1 : 15
7	7 : 60	-	-	-	-	-	-
8	7 : 60	-	1	-	1	-	1
9	10 : 60	-	-	-	-	-	-

Os valores 1 e 4 representam a quantidade em gramas de bagaço adicionada, enquanto os valores 15 e 60 representam a quantidade em FPU de Celluclast utilizada.

4.5. Hidrólise da biomassa da biomassa pré-tratada e residual

Para avaliar o efeito da estrutura da biomassa no rendimento de hidrólise, o bagaço pré-tratado e o residual (que restou após 48 de hidrólise enzimática) foram submetidos a sacarificação utilizando celulasas. Experimentos foram realizados em frascos erlenmeyers de 125 mL, cada um contendo 50 mL de tampão citrato 50 mM pH 4,8 e 4 g de bagaço residual ou pré-tratado. Ensaio foram conduzidos a 180 rpm por 72 horas a 50 °C utilizando enzima comercial (Celluclast 1.5 L) na concentração final de 15 FPU por grama de substrato. Alíquotas foram retiradas para análise de glicose por HPLC e para avaliar a quantidade de celulasas livres e ligadas no bagaço.

4.6. Adsorção enzimática

A quantidade de celulase adsorvida na biomassa foi determinada pelo método de Bradford. Nesse ensaio, a diferença na quantidade de enzima adicionada no início do processo em relação à quantidade livre durante o processo foi utilizada para cálculo da quantidade de celulase adsorvida na biomassa. As amostras coletadas durante o processo foram submetidas à

quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976), utilizando o reagente *Protein Assay* BIORAD seguindo as recomendações do fabricante.

4.7. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

4.7.1. Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

Foi pesado 0,3 g de bagaço de cana triturado. Em seguida adicionado 3 mL de ácido sulfúrico 72% e mantido em banho maria à temperatura de 40 °C por 1 hora. Após este tempo, a mistura foi diluída com água e aquecida em autoclave a 118 °C por 1 hora para promover a hidrólise total dos polissacarídeos. Após a hidrólise, a mistura foi filtrada em funil de Gooch previamente tarado. O líquido obtido foi utilizado para a quantificação de açúcares por HPLC. O resíduo foi lavado com água quente, seco em estufa até atingir massa constante. Em seguida, a percentagem de lignina insolúvel e solúvel foi determinada em relação à massa seca da amostra. Espectroscopia no ultravioleta foi utilizada para a determinação da lignina solúvel em ácido conforme a norma TAPPI T222 om-88 (Shoening e Johan 1965).

4.7.2. Cristalinidade

Para a determinação do índice de cristalinidade o bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, pré-tratado e residual foram submetidos a difração de raios-x operando a 40 kV e 200 mA. O índice de cristalinidade foi calculado segundo a equação seguinte, empregando para isso as intensidades de difração da estrutura cristalina (plano 002, $2\theta = 22,5^\circ$) e da fração amorfa (plano am, $2\theta = 18,7^\circ$). O índice de cristalinidade foi determinado com a porcentagem de material cristalino e amorfa presente na biomassa.

$$\%CrI = \left(\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) \times 100$$

CrI: Índice de cristalinidade

I: Intensidade

4.8. Métodos analíticos

4.8.1. Concentração de glicose e etanol

A quantificação de glicose e etanol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando coluna de troca iônica Rezex ROA-Organic Acid H+ (Phenomenex), mantida a 60°C. Como eluente pra separação foi utilizado ácido sulfúrico 5 mM, aplicado a uma taxa de eluição 0,5 mL.min⁻¹. A coluna foi acoplada ao detector de índice de refração HP 1047A.

4.9. Análises estatísticas

Todos os experimentos apresentados foram realizados pelo menos três vezes e a utilizados para o cálculo das médias e dos desvios padrões. As análises e construção de gráficos foram realizadas no programa SigmaPlot 12.

4.10. Determinação dos parâmetros fermentativos

O rendimento em etanol (YE/B) foi calculada no final da fermentação, por meio da diferença entre a quantidade final (EtOH_f) e inicial (EtOH_i) de etanol (g) pela massa de biomassa pré-tratada utilizada no processo (g):

$$Y_{E/B} = \frac{EtOH_f - EtOH_i}{Biomassa}$$

O rendimento em Glicose (YE/B) foi calculada no final da hidrólise, por meio da diferença entre a quantidade final (Glu_f) e inicial (Glu_i) de glicose (g) pela massa de biomassa pré-tratada utilizada no processo (g):

$$Y_{G/B} = \frac{Glu_f - Glu_i}{Biomass}$$

A produtividade volumétrica (Q_p) foi calculada dividindo a concentração de etanol (g/L) pelo tempo de fermentação em horas:

$$Q_p = \frac{EtOH_f}{t}$$

5. Resultados e discussão

O efeito da concentração do substrato e adição gradual de enzima e bagaço foi avaliado no processo SSF com e sem pré-sacarificação. As condições testadas foram comparadas com o método tradicional onde se inicia o processo adicionando-se o bagaço em uma única etapa.

Na figura 1 estão representados os valores de concentração de glicose e etanol para as etapas de pré-sacarificação e fermentação das condições testadas. Após 48 horas de hidrólise a concentração de glicose é maior para as condições 3 e 4, nas quais os processos iniciam-se com 4 gramas de bagaço e adiciona-se mais bagaço no decorrer do processo até atingir 7 gramas de substrato. Os maiores valores de glicose obtidos nas condições 3 e 4 refletem em maiores rendimentos de etanol (Figura 1). Após 15 horas de fermentação foram obtidos aproximadamente 19,29 e 20,08 g/L de etanol nas condições 4 e 3 respectivamente, quando comparado às outras condições em que se obteve valores próximos de 14,83 g/L (Tabela 3). O tempo escolhido para comparação entre as médias foi o menor tempo de fermentação, no qual foram atingidos os maiores valores de etanol para todas as condições testadas.

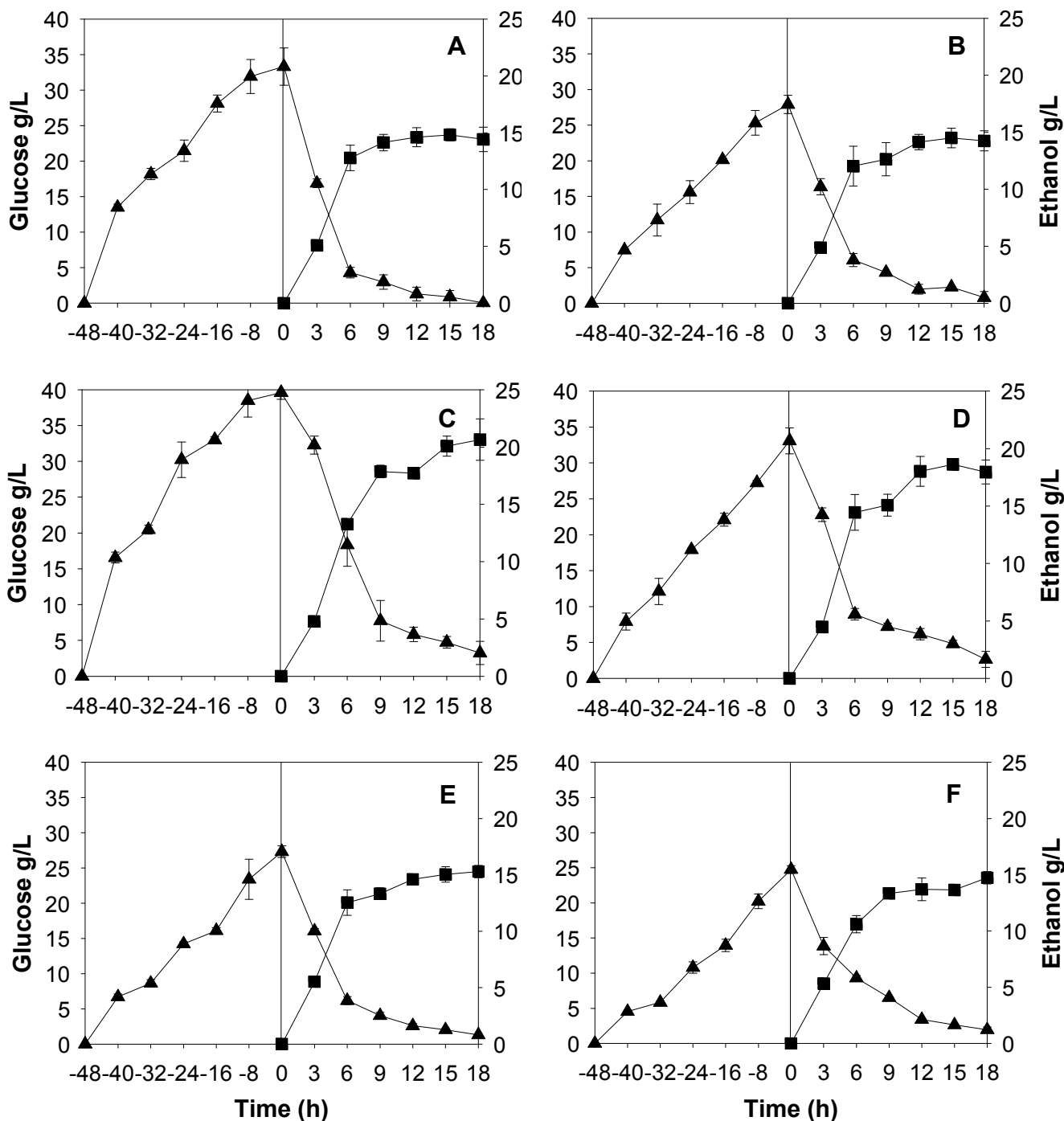


Figura 1 - Sacarificação e fermentação simultânea nos seis ensaios testados: **(A)** ensaio 1: adicionou-se 4 g de bagaço e a enzima de forma não gradual, **(B)** 2: adicionou-se 4 g de bagaço e a enzima de forma gradual, **(C)** 3: adicionou-se mais bagaço ao longo do processo até atingir 7 g e a enzima de forma não gradual, **(D)** 4: adicionou-se mais bagaço ao longo do processo até atingir 7 g e a enzima de forma gradual, **(E)** 5: adicionou-se bagaço de forma gradual até atingir 4 g e enzima de forma não gradual e **(F)** 6: adicionou-se bagaço de forma gradual até atingir 4 g e enzima de forma não gradual. No intervalo de -48 a 0 h estão representadas as concentrações de glicose liberadas na etapa de pré-sacarificação. No intervalo de 0 a 18 h estão representados o consumo de glicose e etanol em g/L na etapa de fermentação.

Resultados semelhantes foram obtidos para o processo SSF sem pré-sacarificação (Figura 2A). Neste processo foi verificado um aumento da concentração de etanol nas condições 3 e 4 nas quais foram utilizadas concentrações maiores de bagaço comparado às condições 1, 2, 5 e 6 (Tabela 2).

Dessa forma, parece haver uma relação diretamente proporcional entre a concentração de bagaço e a concentração de glicose e etanol no processo. Para ratificar a hipótese, novas condições foram testadas para o processo SSF sem pré-sacarificação utilizando uma maior concentração de bagaço. Foram testadas 3 novas condições que foram comparadas com a condição anterior em que se obteve maior produção. Confirmando o que foi obtido nos experimentos anteriores, verificou-se um aumento da quantidade de etanol após 40 horas de fermentação com o aumento da concentração de bagaço. Neste caso, a maior quantidade de etanol foi obtida quando o processo foi iniciado com 10 g de bagaço (Figura 2B e Tabela 2).

Esse efeito foi observado recentemente por Ramachandriya e colaboradores (2013). Neste estudo, os autores observaram um aumento da concentração de glicose com o aumento do teor de sólidos de 2 a 20% utilizando *Juniperus virginiana* pré-tratado como substrato. Do mesmo modo, em um estudo com biomassa de oliveira, foi observado um aumento da concentração de glicose com aumento da concentração de sólidos no intervalo de 2 a 30% (Cara et al., 2007). Zhang et al., 2009a observou um aumento da concentração de glicose de 26,6; 29,8; 39,9 e 43,1 g/L correspondendo a carga de sólidos de 15,0%; 20,0%; 25,0% e 30,0% (p/p), respectivamente. Neste mesmo estudo, alta concentração de glicose na hidrólise contribuiu para o aumento da concentração de etanol na fermentação. Foram observados crescentes valores de etanol variando de 24,7 g/L; 31,0 g/L; 39,3 g/L até 40,6 g/L, de acordo com a variação da carga de sólidos de 15,0%; 20,0% e 25,0% para 30,0% (w/w), respectivamente.

A análise do efeito da adição gradual de bagaço indica que o substrato não exerceu influência na taxa de hidrólise (Tabela 1). Rendimentos semelhantes foram encontrados no processo SSF sem e com pré-sacarificação, quando se adiciona uma mesma quantidade de bagaço de forma gradual e não gradual ao longo do processo.

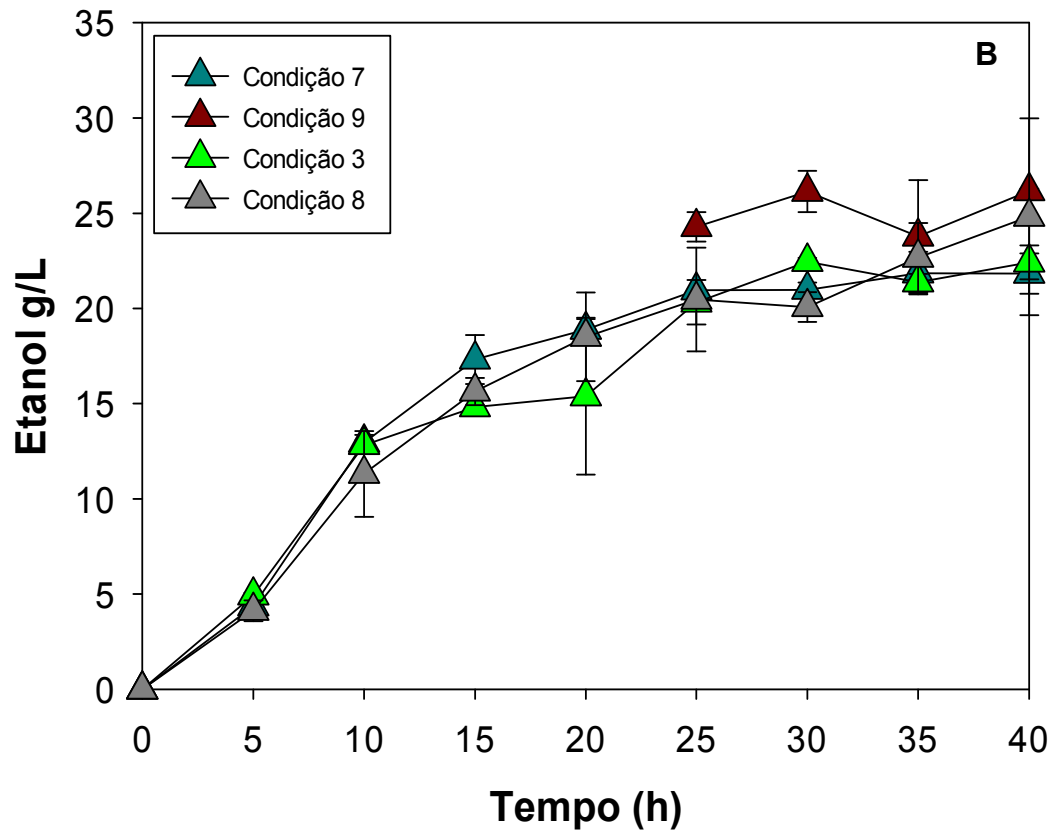
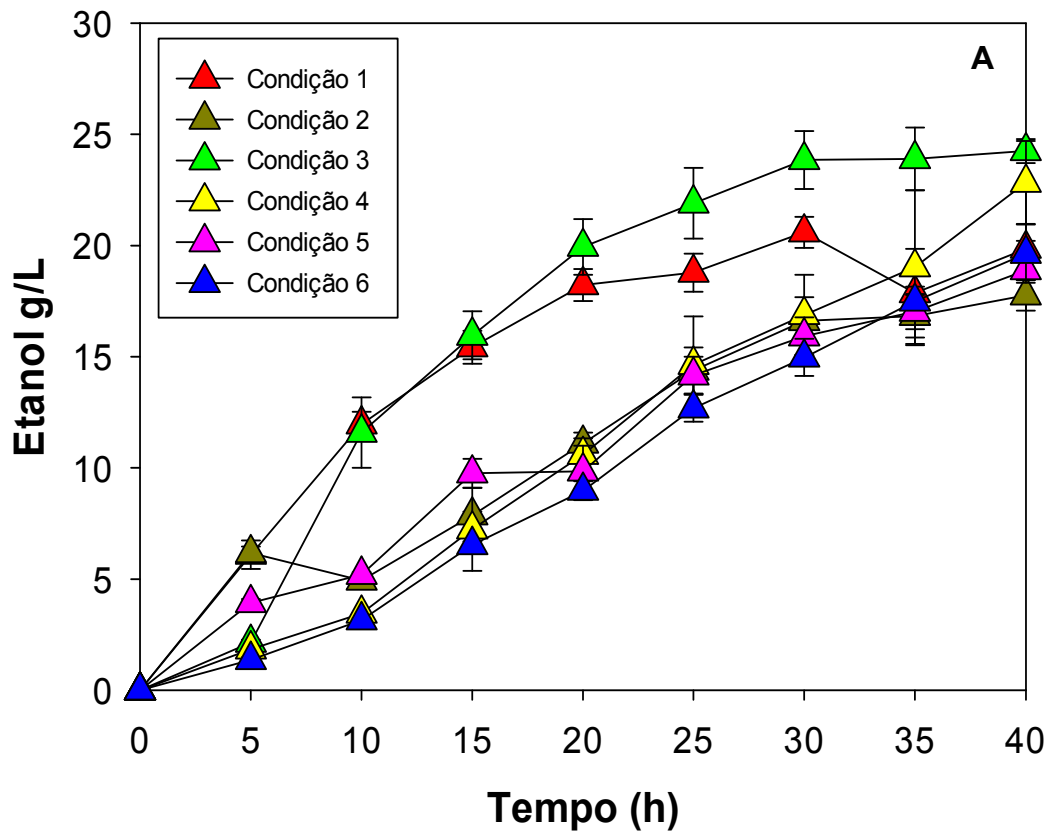


Figura 2 – Concentração de etanol do processo SSF sem pré-sacarificação nas nove condições testadas.

SSF	Pré-sacarificação			Sem Pré-sacarificação		
Condições	Etanol g/L	Y _{E/B}	Q _p	Etanol g/L	Y _{E/B}	Q _p
1	14,83 A	0,19 A	1,57 A	18,32 A	0,22 A	0,69 A
2	14,84 A	0,19 A	1,18 C	17,77 A	0,22 A	0,55 B
3	20,08 B	0,14 B	1,34 B	24,25 B	0,17 B	0,79 C
4	19,29 B	0,14 B	1,55 A	22,83 B	0,16 B	0,57 B
5	15,05 A	0,19 A	1,22 C	18,90 A	0,24 A	0,47 D
6	14,32 A	0,18 A	0,74 D	19,64 A	0,25 A	0,49 D

Tabela 3 – Concentração, rendimento e produtividade em etanol das condições testadas no processo SSF com e sem pré-sacarificação. *Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa ($\alpha=0,05$) pelo teste de DUNCAN.

Tabela 4 – Concentração, rendimento e produtividade em etanol das condições testadas no processo SSF sem pré-sacarificação nas condições 1, 7, 8 e 9.

SSF	Sem Pré-sacarificação		
Condições	Etanol g/L	Y _{E/B}	Q _p
3	21,83 A	0,15 A	0,75 A
7	20,12 A	0,14 A	0,70 A
8	24,42 B	0,12 B	0,91 B
9	26,18 B	0,13 B	1,05 C

*Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa ($\alpha=0,05$) pelo teste de DUNCAN.

5.1. Efeito da adição gradual da enzima

Sabe-se que fatores relacionados à enzima podem influenciar na hidrólise. Dentre estes, destacam-se a inibição das celulases pelos produtos de hidrólise e adsorção não produtiva na lignina (Rahikainen et al., 2013; Wang et al., 2012).

Neste sentido, avaliou-se o efeito da adição gradual de enzima no processo. Para uma mesma quantidade de bagaço, valores semelhantes de glicose foram obtidos quando se adiciona enzima de uma só vez e de forma gradual ao longo do processo. Após 48 h de hidrólise foram obtidos próximo de 28 g/L de glicose nessas 4 condições (Tabela 1 e Figura 1). O mesmo efeito foi observado para o processo SSF sem pré-sacarificação em todas as concentrações de bagaço utilizada no processo.

Avaliando-se valores de concentração e produtividade do processo verifica-se um aumento da concentração de etanol com o aumento da quantidade de bagaço em todas as condições testadas para os processos SSF com e sem pré-sacarificação. No entanto, verifica-se que o rendimento diminui com o aumento da concentração de bagaço. Neste sentido, dois fatores podem estar atuando em conjunto na diminuição do rendimento.

O primeiro deles diz respeito à quantidade de enzima utilizada no processo. No processo testado aumentou-se a quantidade de bagaço sem haver acréscimo na quantidade de enzima. Em todas as condições foram utilizadas uma concentração final de 60 FPU de celulases. Desta forma o aumento da quantidade de bagaço resultou em uma diminuição na quantidade de FPU de celulases por grama de substrato.

O outro fator diz respeito ao aumento da quantidade de bagaço. Este aumento interfere com as características reológicas dificultando o fluxo de enzimas e substratos e influenciando negativamente na hidrólise (Kristensen et al., 2009). No presente estudo descartou-se a influência da inibição pelos produtos de hidrólise devido ao não acúmulo de glicose no processo SSF sem pré-sacarificação.

A produtividade foi calculada no tempo em que foi obtida a maior quantidade de etanol para cada processo em separado. Nas tabelas 3 e 4 observa-se que a maior produtividade deu-se nas condições que possuíam

maiores quantidade de bagaço (condição 3, 4 e 9). Neste caso, as maiores concentrações de etanol obtidas nessas condições contribuíram para os valores obtidos de produtividade. Conclui-se ainda que, a adição de enzima de forma não gradual contribui para uma maior taxa de hidrólise e consequentemente maiores valores de rendimentos comparados às condições em que se adicionou enzima de forma gradual (condições 2 e 6 das tabelas 3 e 4). Pelos valores de concentração, rendimento e produtividade de etanol obtidos conclui-se que as melhores condições são aquelas em se utiliza uma maior quantidade de bagaço, e, a adição da enzima é realizada de uma só vez no início do processo. Essas condições são aquelas em que se obtém uma maior quantidade de etanol em menor tempo, utilizando menores concentrações de enzima. Isso é muito interessante para a aplicação industrial, visto que as etapas de pré-tratamento impactam bastante o processo em termos de custos, podendo representar de 30 a 50% do valor final (Chen & Qiu, 2010).

5.2. Fatores que afetam a hidrólise e fermentação

Pode-se observar que em nenhuma das condições testadas houve hidrólise completa da celulose. Iniciando a hidrólise com 4 gramas de bagaço sobrou no final 1 g de bagaço residual, ou seja, 3 gramas foram hidrolisados. Iniciando-se o processo com 7 gramas, 5 gramas foram hidrolisados. Portanto, o que se observou foi que uma mesma quantidade de enzima foi capaz hidrolisar uma quantidade maior de celulose com o aumento da quantidade de bagaço.

Portanto, algum fator relacionado à estrutura da biomassa pode estar influenciando na hidrólise completa da biomassa. Dentre os fatores relacionados ao substrato, foram avaliados a cristalinidade e a composição e a composição do substrato.

Neste sentido o bagaço *in natura*, pré-tratado e o bagaço que restou após 48 h de hidrólise (residual) foram submetidos primeiramente à difração de raios-X. Essa técnica permite avaliar o grau de cristalinidade da biomassa. Após o pré-tratamento percebe-se um aumento de 72,72% no índice de cristalinidade comparando a biomassa *in natura* e pré-tratada (Figura 3). Este resultado foi observado anteriormente por outros autores. O índice de

cristalinidade mede a quantidade relativa de celulose cristalina no sólido total. Neste caso, o aumento do índice de cristalinidade ocorreu devido a remoção de substâncias amorfas como hemicelulose no pré-tratamento ácido e lignina no pré-tratamento básico (Xiao et al., 2014; Kim et al., 2012). Kim et al., 2012 observou aumento da cristalinidade de 60,92% da palha de arroz após combinação de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e solução de amônia. Neste mesmo estudo observou-se um aumento da concentração de glicose com o aumento do índice de cristalinidade da palha de arroz. Os autores concluem que este fato é devido à remoção das barreiras para atuação das enzimas, como hemicelulose e lignina, que impedem o acesso das enzimas ao polímero de celulose.

Avaliando a figura 3 verifica-se um aumento de 16% no índice de cristalinidade do bagaço quando se compara o bagaço residual e pré-tratado. Isto foi confirmado quando se calcula o índice de cristalinidade (Tabela 3). Esse fato pode explicar a não hidrólise completa da biomassa. Nesse sentido, o aumento da concentração de glicose e etanol pelo aumento da quantidade de bagaço, diferentemente do que foi descrito acima pelos autores Xiao e Kim, pode estar ocorrendo devido ao aumento da quantidade de regiões amorfas. Quanto maior a quantidade de bagaço no processo maior a quantidade de regiões amorfas, que por serem mais acessíveis, resultarão em uma maior taxa de hidrólise.

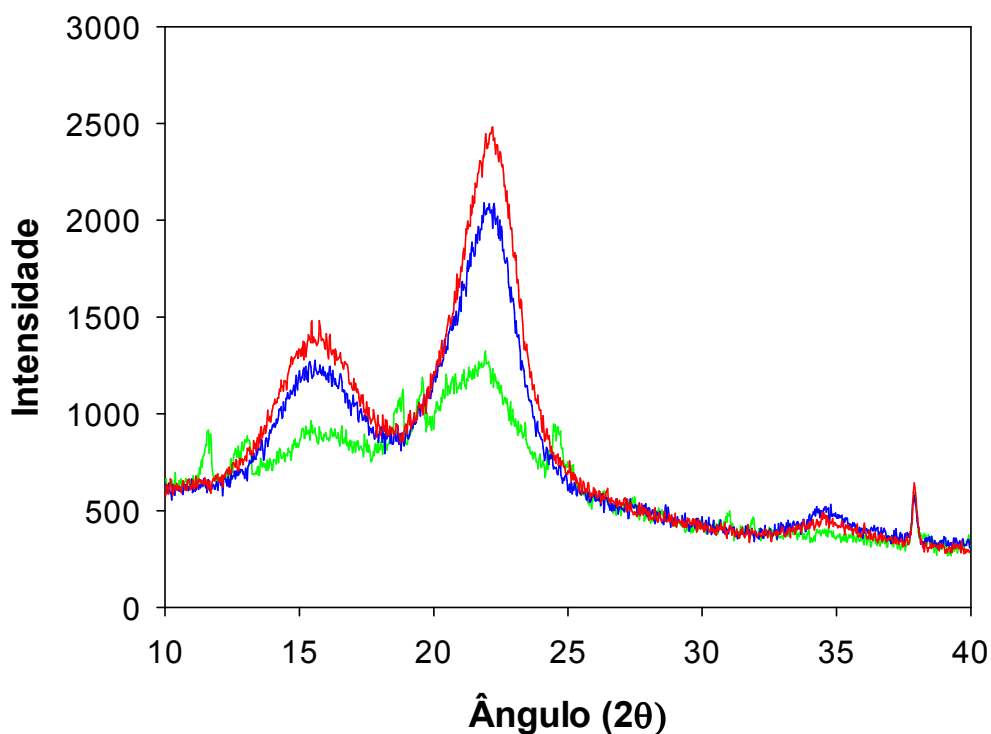


Figura 3 – Difração de raio X das amostras de bagaço de cana *in natura* (verde), pré-tratado (azul) e residual (vermelho).

Tabela 5 – Composição química (% p/p, peso seco) e índice de cristalinidade do bagaço *in natura*, pré-tratado e hidrolisado.

	Bagaço <i>in natura</i>	Pré-tratado	Hidrolisado
Celulose	42,18	64,55	60,03
Hemicelulose	18,5	15,62	13,41
Lignina	18,29	11,65	18,89
Acetil	3,60	0,00	0,00
Cinzas	0,93	0,27	0,20
Índice de Cristalinidade	31,79	54,91	63,69

Para confirmar essa hipótese realizou-se a hidrólise do bagaço pré-tratado e do bagaço que restou após a hidrólise. A concentração de proteínas totais foi quantificada durante o processo para verificar a porcentagem de enzima livre e ligada ao substrato. Após 72 h de hidrólise verificou-se que a

quantidade de glicose liberada foi maior para o bagaço pré-tratado (49,00 g/L) quando comparado ao residual (36,40 g/L) (Figura 4). Neste caso, a parada da hidrólise provavelmente ocorreu devido ao aumento da cristalinidade com o tempo de hidrólise.

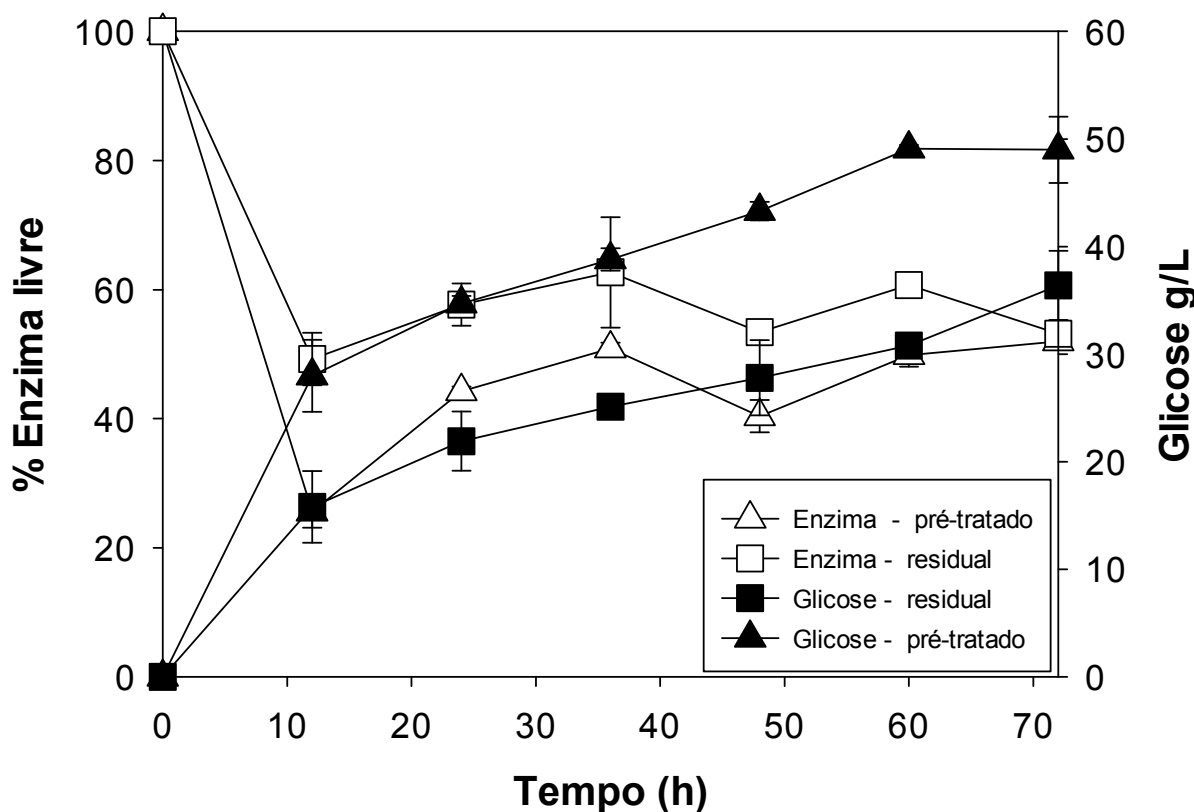


Figura 4 - Concentração total de glicose na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, residual e quantidade de proteínas livres com o tempo.

Essa diferença pode estar relacionada ao índice de cristalinidade do bagaço hidrolisado (Tabela 3). Essas regiões cristalinas são caracterizadas por possuírem cadeias de celuloses altamente ordenadas e próximas estabilizadas por ligações de hidrogênio e de van der waals. Tem sido demonstrado que o grau de agregação diminui a área superficial interna disponível dificultando o acesso até de pequenas moléculas como a água. Essas regiões cristalinas são um dos principais fatores que contribui para a resistência da celulose a degradação por diminuir a acessibilidade das celulasas as ligações glicosídicas

e conseqüentemente diminuir o rendimento de hidrólise (Carroll & Somerville, 2009; Laureano-Perez et al., 2005b).

Além da cristalinidade o outro fator que pode estar contribuindo para a não hidrólise completa é a maior porcentagem de lignina quando se compara o bagaço pré-tratado (11,65) e o residual (18,89) (Tabela 2). Yu e colaboradores (2011) utilizando fibras de floresta submetidas a diferentes pré-tratamentos observaram uma correlação entre a taxa de remoção de lignina e aumento da hidrólise enzimática. Neste caso, o término da hidrólise pode ser devido ao aumento do teor de lignina ao longo do processo.

A lignina pode afetar a hidrólise em três aspectos: lignina afeta acessibilidade das celulasas nas ligações glicosídicas, por adsorção não-produtiva da enzima e pela interação entre lignina e carboidratos. A remoção da lignina diminui a quantidade de enzima que se liga na mesma como, do mesmo modo, aumenta a acessibilidade da enzima ao criar poros, quebrar a interação entre carboidratos e lignina (Yu et al., 2011). Resultados semelhantes foram obtidos por Junior e colaboradores (2013), no qual foi observado um aumento da conversão enzimática da celulose do bagaço de cana-de-açúcar com a remoção da lignina. Os autores concluíram que a remoção da lignina aumenta o volume e área superficial dos poros, e conseqüentemente, a hidrólise da celulose.

Avaliando a quantidade de enzima livre e ligada ao substrato durante a hidrólise, verificou-se que, ao longo de todo o processo houve uma maior quantidade de enzima ligada ao bagaço pré-tratado comparada ao residual (Figura 3). Resultados semelhantes foram observados por Gao e colaboradores (2013), ao avaliarem a influência da cristalinidade da celulose no rendimento de hidrólise e na afinidade das celulasas pelos substratos. Foi verificada uma diminuição na afinidade de ligação com o aumento do índice de cristalinidade do substrato. Neste mesmo estudo, observou-se um aumento da quantidade de glicose liberada com a diminuição da cristalinidade da celulose.

Uma vez que a quantidade de glicose e etanol produzidos foram maiores com o aumento da concentração de bagaço, descartou-se a possibilidade de a hidrólise ter parado pela inibição das celulasas pelos produtos de hidrólise, glicose e celobiose. Verificou-se que mesmo após 48 h de hidrólise, em nenhuma das condições houve um comportamento hiperbólico característico

de inibição enzimática. Além do mais, o mesmo efeito foi encontrado para o processo SSF sem pré-sacarificação, condição essa que não houve acúmulo de glicose devido ao seu consumo pela levedura. Este mesmo achado foi observado por (Ramachandriya et al., 2013). Neste estudo, os autores observaram um aumento linear da quantidade de glicose como o aumento da concentração de sólidos demonstrando a não influência de inibição pelo produto.

Assim fica claro que o aumento da concentração de glicose com o acréscimo do teor de sólidos ocorre provavelmente devido ao aumento da porcentagem de celulose amorfa quando se adiciona mais bagaço durante o processo. No entanto, verifica-se uma diminuição do rendimento com o aumento da concentração de sólidos. Essa queda no rendimento pode ser explicada pela diminuição da quantidade de água livre o que acarreta dificuldade de mistura e transporte de substrato, produto e enzima. Esse transporte é necessário para que a enzima se ligue ao substrato para que ocorra a reação. Outra explicação é pela quantidade de enzima utilizada no processo. Neste estudo aumentou-se a quantidade de substrato mantendo-se constante a concentração final de celulases.

A produção anual de bagaço no Brasil está estimado em 186 milhões de toneladas (Cardona et al., 2010; Soccol et al., 2010). Parte desse bagaço é queimado para gerar energia na própria indústria, no entanto, há um excedente que sobra e é deixado no campo. O que tem sido proposto é utilizar esse excedente para produção de etanol. No entanto, pelos resultados obtidos nesse estudo sugere-se a utilização para produção de etanol de todo o bagaço gerado na moagem da cana. Neste caso, o bagaço que seria utilizado para queima e produção de energia é aquele bagaço residual obtido após a fermentação, e como foi mostrado neste trabalho é mais recalcitrante para hidrólise.

6. Conclusões

A maior concentração de glicose e etanol obtida com o aumento da concentração de sólidos no processo é devida, provavelmente, ao aumento da quantidade de celulose amorfa no meio reacional.

O rendimento de etanol do processo diminuiu com o aumento da concentração de biomassa. Isto provavelmente é devido efeitos reológicos que dificultam o fluxo de enzimas e substratos.

A adição gradual de enzima durante o processo não teve influência no rendimento de glicose.

Os resultados obtidos sugerem que os principais fatores que influenciam na hidrólise enzimática da biomassa são o conteúdo de lignina e o índice de cristalinidade da celulose, fatores esses que aumentam ao longo do processo.

**CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO DE UMA β -
GLUCANASE EXTRACELULAR DE
*Kluyveromyces marxianus***

RESUMO

Recentemente nosso grupo de pesquisa identificou uma nova enzima secretada por *Kluyveromyces marxianus* com atividade hidrolítica sobre celobiose e *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNpG). Neste trabalho a especificidade da enzima foi avaliada utilizando os substratos celobiose (β -1,4), CMC (β -1,4), β -glucano (β -1,4: β -1,4), e pNpG. Os resultados obtidos mostram uma atividade de hidrólise maior para o substrato β -glucano indicando que a enzima identificada possui especificidade para ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4. Para uma melhor caracterização da enzima identificada foi realizado o sequenciamento da proteína por espectrometria de massas. As análises das sequências obtidas mostraram alta similaridade com β -1,3 glucanases fúngicas. Além disto, foi medida a atividade hidrolítica desta enzima sobre a parede celular de leveduras. Os resultados mostram que a enzima possui um potencial para aplicação na produção de β -glucanos solúveis ou para preparação de protoplastos de *S. cerevisiae*. A atividade da enzima sobre ligações β -1,3 explica a sua atividade sobre a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. A sequência de aminoácidos e a especificidade pelos substratos β -glucanos sugerem que a enzima secretada por *K. marxianus* seja uma β -1-3(4)-glucanase

7. Revisão de literatura

β -glucanases são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas em polímeros β -glucanos. Elas podem ser divididas em dois grandes grupos, exo e endo- β -glucanases. As exo- β -glucanases clivam o polímero a partir da extremidade redutora ou não redutora liberando oligossacarídeos com graus de polimerização menor que três como principais produtos. As endo- β -glucanases clivam aleatoriamente em regiões internas do polímero liberando oligossacarídeos com graus de polimerização maior que três. O mecanismo e especificidade da enzima são dependentes do tipo de ligação e dos monossacarídeos envolvidos na ligação glicosídica (Peng et al., 2011; McCarthy et al., 2003).

As β -glucanases podem ser classificadas em quatro categorias: (1) β -1,3-1,4-glucanases, a qual clivam ligações β -1,4 glicosídicas adjacentes a ligações β -1,3; (2) β -1,4-glucanases, que clivam ligações β -1,4 glicosídicas; (3) β -1,3(4)-glucanases, que clivam polímeros de β -1,3-1,4-glucan e β -1,3-glucan; e (4) β -1,3-glucanases, que clivam ligações β -1,3 glicosídicas em polímeros de β -1,3-glucan (Luo et al., 2010; Boyce et al., 2007; Peng et al., 2010; Liu et al., 2013).

Os principais substratos para as β -glucanases são os polímeros de β -glucanas que são polímeros de glicose que possuem de centenas a milhares de unidades de glicose unidas por ligações β -glicosídicas e diferem entre si pelo grau de ramificação, tipo de ligação e grau de polimerização (Barbosa et al., 2010; Nelson and Cox 2002). β -glucanases podem ser encontradas em diferentes organismos como bactérias, fungos e plantas (Javmen et al., 2013; Labourel et al., 2013; Maloney et al., 2012).

β -1,3-glucanases são enzimas que hidrolisam especificamente ligações β -1,3 em polímeros de β -1,3-glucano. Portanto, estas glucanases hidrolisam substratos tais como laminarina, mas são inativas em polímeros não ramificados de β -1,3-glucano, β -1,3-1,4-glucano e em dissacarídeos. Tem sido demonstrado que possuem atividade sobre polímeros de β -1,3-1,6-glucanos presentes em parede celular de fungos e leveduras (Coutinho and Henrissat, 1999; Genta et al., 2009).

β -1,4-glucanases são enzimas que hidrolisam ligações β -1,4 em polímeros de β -1,4-glucanos. Elas podem ser classificadas em endo e exoglucanases. As 1,4- β -D-glucano-4-glucano-hidrolase hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor. O grupo das exoglucanases é constituído por celobio-hidrolase. As 1,4- β -D-glucano-celobio-hidrolase (EC 3.2.1.91) catalisam a hidrólise a partir da extremidade não-redutora da fibra celulósica liberando celobiose como principal produto (Lynd et al., 2002 e Castro, 2010). Recentemente essas enzimas tem recebido atenção pela a sua aplicação na hidrólise de matérias lignocelulósicos visando à produção de etanol de segunda geração (De Souza et al., 2012; Tambor et al., 2012).

As β -1,3-1,4-glucanases são enzimas que apresentam especificidade por polímeros de β -1,3-1,4-glucanos onde elas catalisam a hidrólise das ligações β -1,4 adjacentes a ligações β -1,3 (Tsai et al., 2008). Essas enzimas têm sido descritas como tendo atividades em substratos como Barley β -glucan e Lichenan. Os produtos de hidrólise da enzima são principalmente 3-O-celobiosil-D-glicose (G3) e 3-O-celotriosil-D-glicose (G4) de β -glucano (Bielecki et al., 1991). Recentemente, essas enzimas têm sido aplicadas na produção de etanol a partir de substratos como Lichenan e Barley β -glucan (Menon et al., 2011; Nghiem et al., 2010).

Dentre as enzimas destacam-se as β -3(4)-glucanases isoladas de micro-organismos. Estas enzimas têm sido purificadas e caracterizadas e os resultados têm mostrado que elas possuem especificidade por uma ampla gama de substratos. β -3(4)-glucanase isolada de *Rhizomucor miehei* apresentou especificidade por β -glucan (β -1,3; β -1,4), Laminarina (β -1,3; β -1,6) e CM-curdlan (β -1,3) (Boyce et al., 2007). Estudo de especificidade de substrato de uma β -3(4)-glucanase de thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4 indicou que a enzima catalisa a hidrólise de β -1,3-1,4-glucans (Barley β -glucan and lichenan), β -1,4-glucans (CMC-Na), e β -1,3-glucans (Laminarin). Por hidrolisar diferentes tipos de ligações β -1,3 e β -1,4 apresentam especificidade por diferentes substratos (Bai et al., 2010).

7.1. Características das β -glucanases

As glicosil hidrolases realizam a catálise das ligações glicosídicas por dois mecanismos, um com inversão e outro com retenção de quiralidade do carbono anomérico. Ambos esses mecanismos utilizam um par de ácidos e resíduos nucleofílicos em ambos os lados do açúcar. No mecanismo com inversão de quiralidade uma molécula de água ativada faz um ataque nucleofílico diretamente sobre o carbono anomérico em uma única etapa. Cada enzima apresenta um desses mecanismos. No entanto, há casos em que a hidrólise de substratos derivados de análogos ocorre por um mecanismo e a hidrólise do substrato natural ocorre por outro (Park et al., 2002; Ketudat Cairns & Esen, 2010).

Os valores de pH e de estabilidade das β -glucanases dependem da fonte e da sua sequência de aminoácidos. O pH ótimo se encontra no intervalo de 2,76 e 6,5 (Walsh et al., 2007; Sutivisedsak et al., 2012). A temperatura e a termoestabilidade também varia enormemente entre as β -glucanases. A temperatura ótima pode variar de 40 a 70 °C, também dependendo da fonte e da sequência de aminoácidos (Walsh et al., 2007; Tambor et al., 2012; Sutivisedsak et al., 2012). Essas enzimas geralmente apresentam termoestabilidade em temperaturas até 90°C, sendo que acima dessa temperatura elas perdem parte da sua atividade (Walsh et al., 2007). Walsh e colaboradores (2007) avaliando a termoestabilidade de uma β -3(4)-glucanase verificou que a enzima reteve 96, 94 e 81% da atividade original por um minuto a 70, 80 e 90°C respectivamente.

Glicose e celobiose são inibidores de muitas β -glucanases sendo que a inibição pode ser do tipo competitiva e não-competitiva. Dentre os íons avaliados, os que inibem mais frequentemente as β -glucanases são Hg^{+2} , Cu^{+2} e Ag^{+} , que chegam a provocar até a perda total da atividade catalítica (Castro, 2010; Ketudat Cairns & Esen, 2010). Bai e colaboradores (2010) avaliando a atividade de uma β -3(4)-glucanase frente aos diferentes íons e reagentes químicos verificaram que a atividade foi abolida por SDS, Hg^{2+} e Ag^{+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} e EDTA. Recentemente Zhang & Bao, (2012) relataram a

inibição das glucanases por xilanas. A inibição foi verificada nas endoglucanases e celobiohidrolases I e II.

7.2. Glicosil hidrolases da família 5

As glicosil hidrolases representam um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas entre dois carboidratos ou entre um carboidrato e uma molécula não carboidrato. As β -glucanases são pertencentes ao grupo das glicosil hidrolases. Uma vez que as glicosil hidrolases podem catalisar a hidrólise de uma variedade de substrato, um sistema de classificação com base na sequência de aminoácidos e semelhança estrutural tem sido proposto. Nesse sistema as enzimas que possuem similaridade na sequência de aminoácidos bem como motivos de sequências conservados são agrupadas em um mesmo grupo (Henrissat, 1991; Cantarel et al., 2009; Cairns, 2010). A versão desse sistema de classificação contém 115 famílias (Marana, 2006; Cairns et al., 2010).

β -glucanases já descritas pertencem a família 7, 16 como também da família (Duenas-santero et al., 2010; Luo et al., 2010). As glicosil hidrolases da família 5 possuem como principal característica a presença de uma região conservada onde se encontra um resíduo de glutamato, envolvido no mecanismo catalítico da enzima. É comum nessa família de enzima a presença de estruturas secundárias tais como folha β e α -hélice (β/α)₈. Enzimas pertencentes a esta família de hidrolases possuem as mais diversas atividades sendo capazes de hidrolisar diferentes substratos (Duenãs-Santero et al., 2010).

7.3. Aplicações das β -glucanases

As β -glucanases têm recebido significativa atenção pela sua aplicação na indústria. Por exemplo, na fabricação de cerveja industrial, a adição de β -glucanases pode reduzir a viscosidade e turbidez de extratos, aumentar os rendimentos e produzir cerveja de alta qualidade (Celestino et al., 2006). Na indústria de alimentos, a utilização dessas enzimas pode aumentar a digestibilidade de β -glucana na alimentação e com isso melhorar a eficiência de

conversão alimentar (Mathlouthi et al 2002; Beckmann et al. 2006). Outras aplicações incluem na área biotecnológica sendo utilizadas na fusão de célula, transformação e preparação de protoplastos, na indústria de alimentos, indústrias agrícola, farmacêutica e de fermentação (Castoria et al. 1997; Fleuri et al. 2008).

Kim e colaboradores (2006) demonstraram que β -glucano obtido a partir da parede celular de levedura parece ser mais eficaz do que a obtida a partir de outras fontes. Assim, a *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura amplamente utilizadas em processos de fermentação industrial, é uma importante fonte de β -glucanos bioativos (Aimanianda et al., 2009).

A atividade biológica de um polissacarídeo está relacionada ao o seu peso molecular, a configuração e ligações glicosídicas, entre outras características (Chaidedgumjorn et al., 2002). A hidrólise ácida tem sido a mais utilizada para se obter oligossacarídeos, no entanto, este método produz uma grande quantidade de oligossacarídeos, bem como subprodutos, tais como furfural e hidroximetilfurfural. Por esta razão, a hidrólise enzimática de β -glucana tem sido um método promissor para se obter gluco-oligossacarídeos, uma vez que permite a produção de oligômeros de maior peso molecular (grau de polimerização ≥ 4) (Giese et al., 2010). Neste contexto, a lise enzimática da parede celular da levedura usando β -glucanase tem uma potencial aplicação no tratamento da massa de células residuais para se obter β -glucano na indústria de fermentação.

7.4. Parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*

A parede celular de leveduras exerce várias funções como a de proteção, estabilidade osmótica, suporte de enzimas e adesão célula/célula. A parede representa 30% do peso seco da célula e é composta por 85% de polissacarídeo e 15% de proteínas. A parede não é uma estrutura estática e sim, uma estrutura em constante crescimento e mudança ,sendo muitas mudanças exercidas por glicosil-hidrolases. Essas mudanças são dependentes de condições ambientais como pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio e nutrientes (Fleuri et al., 2005; Lesage & Bussey, 2006).

A parede celular de *S. cerevisiae* é composta por três componentes principais: um polímero de moléculas de glicose unidas por ligações β -1,3 e β -

1,6 glicosídicas, mananaproteínas e quitina, um polímero de unidades de N-acetilglicosamina unidas por ligações β -1,4. A parede possui duas camadas principais: uma externa onde se encontra as mananaproteínas e uma interna de β -glucan (Lesage & Bussey, 2006).

As enzimas líticas são enzimas capazes de hidrolisar a parede celular de leveduras e fungos. Muitos micro-organismos são capazes de produzir β -1,3 glucanases, β -1,6 glucanases, mananases, proteases e quitinasesas as principais enzimas envolvidas no processo. Essas enzimas agem sinergicamente na lise hidrolisando a parede da face externa para a interna (Asenjo et al., 2006; Gacto et al., 2000; Peng et al., 2011).

As enzimas capazes de hidrolisar a parede celular de leveduras apresentam grande potencial de aplicação biotecnológica tais como aditivos para ração animal. Elas são também utilizadas no controle biológico de pragas, devido a sua capacidade de clivar as paredes celulares de microrganismos patogênicos e na obtenção de oligossacarídeos bioativos, β -glucana em particular, que é considerada uma potente imunomoduladora (Bamforth, 2009; Daenen et al., 2008; Iorio et al., 2008, Fleuri et al., 2008). β -glucan tem sido demonstrado possuir atividades anti-tumorais, anti-inflamatórios, anti-mutagênicas, hipocolesterolêmicos e hipoglicemia e proteção contra a infecção por micro-organismos (Barbosa et al., 2004; Behall, 2006; Kim et al., 2006; Giese et al., 2010).

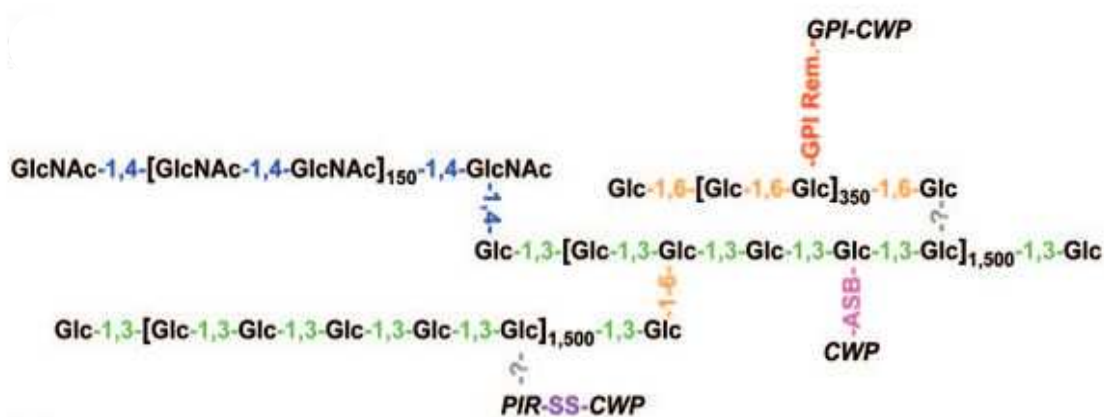


Figura 1 - Representação esquemática da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e suas ligações. As ligações glicosídicas β -1,3, β -1,4 e β -1,6 que une os resíduos de β -D-glicopiranosose estão representadas em verde, azul e

laranja respectivamente. CWP corresponde à camada de manoproteína presente na face externa da parede (Lesage & Bussey, 2006).

8. Objetivo geral

Caracterizar uma β -glucanase de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3

8.1. Objetivos específicos

- Determinar a sequência de aminoácidos da β -glucanase;
- Caracterizar a β -glucanase quanto à especificidade por diferentes substratos;
- Determinar a que classe pertence à enzima com base na sequência de aminoácidos e especificidade de substratos.
- Avaliar a capacidade da enzima em hidrolisar a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

9. Metodologia

9.1. Caracterização da β -glucanase

9.1.1. Produção e purificação da enzima

Para a produção enzimática erlenmeyers contendo 50 mL de meio YP, foram inoculados com linhagens de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. Após incubação por 24 horas a 37 °C, sob agitação orbital de 180 rpm, o sobrenadante de cultura foi coletado e inoculado em meio YP 0,1X pH 5,0 contendo 4 % de glicose de modo que a D.O._{600nm} fosse 0,6. Após 48 h de incubação, nas mesmas condições acima descritas, o meio foi centrifugado e o sobrenadante de cultura foi armazenado a -20°C para análises posteriores. Para purificação utilizando FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), o extrato de cultura foi primeiramente concentrado por ultra-filtração, utilizando Coluna Vivaspin 10 KDa MWCO (GE Healthcare), a 4500 rpm até a concentração final de 10% (v/v). Posteriormente, o extrato bruto concentrado, com valor de pH previamente ajustado para 7,0, foi aplicado na coluna de cromatografia líquida de troca aniônica HiTrap Cpto Q (GE Healthcare) de 1 mL, previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio pH 7,0 / 50 mM. O fluxo foi ajustado para 1,0 mL/minuto. A eluição foi realizada em passos, nas concentrações 100 mM, 200 mM, 400 mM e 1 M de NaCl, e em cada passo frações de 15 mL foram coletadas. Foi realizado o ensaio enzimático para cada fração.

A fração contendo atividade foi separada e determinada a concentração de proteínas solúveis totais. À fração da etapa anterior foi adicionado 50 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 / 50 mM e, para retirada do NaCl, foi feita ultra-filtração em Coluna Vivaspin 10 KDa MWCO (GE Healthcare). A amostra foi então re-cromatografada na Coluna HiTrap Cpto Q (GE Healthcare). A eluição com NaCl foi realizada em um passo inicial de 100 mM, seguida por um gradiente crescente de 100 a 200 mM, e dois passos finais de 200 mM e 1 M. Frações de 1 mL foram coletadas e analisadas por ensaio enzimático. As amostras contendo atividade foram unidas e concentradas em Coluna Vivaspin 10 KDa MWCO (GE Healthcare), sendo realizados o ensaio enzimático e a determinação de proteínas solúveis totais.

9.1.2. Análise por espectrometria de massas

Para análise no espectrômetro de massas o extrato enzimático proveniente da segunda etapa de purificação foi analisado por SDS-PAGE por (Rocha et al., 2014). As bandas do gel foram previamente cortadas e descoradas em solução de acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,8. Após o descorante ser removido, os géis foram desidratados com acetonitrila 100%, ficando branco/opaco, e seco em centrifuga a vácuo. As proteínas contidas nas bandas removidas do gel foram reduzidas com DTT (ditiotreitól) 65 mM em bicarbonato de amônio 100 mM. O DTT foi então removido e as proteínas alquiladas com Iodoacetamida 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM. Após serem lavados com bicarbonato de amônio 100 mM, os géis foram desidratados com acetonitrila 100% e, posteriormente, reidratados com bicarbonato de amônio 100 mM. Os géis foram novamente desidratados com acetonitrila 100% e secos na centrifuga a vácuo. Para tripsinização das proteínas, foram adicionadas aos géis uma solução contendo tripsina (Trypsin Gold Mass – Promega) 25 ng/μL em bicarbonato de amônio 40 mM e acetonitrila 10%. A reação foi então incubada a 37°C por 16 horas. Em seguida, o gel foi sonificado em ultrassom, e após agitação no vortex a solução com os peptídeos removida para outro microtubo. Ao gel restante foi adicionado ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%, seguido de agitação no vortex e repouso em temperatura ambiente. O gel foi posteriormente sonificado, agitado em vortex e a solução removida para o microtubo anterior. Este procedimento foi repetido 2 vezes. A amostra removida para o outro microtubo foi seca em centrifuga a vácuo. Os peptídeos foram estocados em freezer (- 20 °C) para posterior análise por espectrometria de massas.

A análise dos peptídeos por espectrometria de massas foi realizada no Núcleo de Análises de Biomoléculas (NuBioMol)/CCB/UFV, utilizando MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics). Os peptídeos trópticos foram solubilizados em 20 μL de acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% para análises por MALDI. Uma alíquota de 1,0 μL da digestão tróptica foi misturada a 1,0 μL da matriz ácido alfa-ciano-4- hidroxicinâmico e 0,5 μL aplicado em placa de

MALDI. Os espectros de massas tripticas foram obtidos em modo refletivo positivo e a fragmentação por meio do método do LIFT. Os espectros de massas foram processados usando o software FlexAnalysis (Bruker). As listas de picos monoisotópicos obtidas foram utilizadas para pesquisas contra banco de dados de proteínas pelo método de “Peptide Mass Fingerprinting” utilizando o banco de dados NCBI por meio do pacote computacional MASCOT, rodando em plataforma local. Os espectros de fragmentação MS/MS foram utilizados para identificação das seqüências de aminoácidos dos peptídeos por meio do método “MS/MS ion search”, utilizando-se o MASCOT. As seqüências obtidas foram confirmadas por inspeção visual dos fragmentos de massas utilizando-se o software FlexiAnalysis. A seqüência de aminoácidos obtida foi utilizada para pesquisa no banco de dados NCBI, utilizando o pacote computacional *MASCOT search*.

9.2. Purificação e caracterização da β -glicosidase

9.2.1. Purificação da BGL extracelular através de Cromatografia Líquida (FPLC)

Para purificação a enzima extracelular foi obtida através do cultivo da levedura *K. marxianus* UFV-3 e purificada segundo condições determinadas pelo por Rocha 2011.

9.2.2. Ensaio enzimático

A avaliação da atividade β -glicolítica foi realizada utilizando o substrato cromogênico *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNP β G) (Sigma). A reação consiste de pNP β G 2mM, tampão citrato de sódio (50 mM; pH 5,4) e da amostra contendo atividade. Após incubação da reação à 50°C por 40 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se carbonato de sódio (500 mM). A estimativa da atividade enzimática foi realizada em espectrofotômetro, através da leitura de absorvância (410 nm) do *p*-nitrofenol ($\epsilon = 18.700$) liberado; utilizando a curva padrão de *p*-nitrofenol [concentração (μ mol/mL) versus absorvância ($\lambda = 410$ nm)]. Uma unidade (U) de BGL foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1nmol de pNPG por minuto de reação.

9.2.3. Determinação da concentração de proteínas solúveis

A determinação da concentração de proteína solúvel nas diferentes etapas de purificação foi realizada através do método BCA - Ácido Bicinconínico (Smith et al., 1985).

9.2.4. Hidrólise da celobiose

Para testar atividade da BGL na hidrólise de celobiose, o extrato enzimático foi incubado com celobiose (100 mM) em tampão citrato de sódio (50 mM; pH 5,5), à 37, 42 e 50°C por 30 horas e a cada 6 horas alíquotas foram retiradas e fervidas por 5 minutos para inativar a enzima e parar a reação. A concentração de glicose foi mensurada por análise em HPLC.

9.2.5. Atividade lítica

A atividade lítica da enzima foi quantificada por medida da densidade ótica em 600 nm, produzida pela enzima em suspensão com células de *S. cerevisiae*. Células de *S. cerevisiae* com D.O. inicial igual a 0,7 foram coletadas por centrifugação e lavadas com tampão citrato 50 mM pH 7. As células foram suspensas no mesmo tampão para uma D.O. igual a 1,4. Ensaios foram realizados com o extrato bruto concentrado 10X acrescido ou não com β -mercaptoetanol 50mM. Culturas de leveduras foram adicionadas de modo que a D.O. inicial fosse 0,7. O controle utilizado foi de células de leveduras suspensas em tampão sem adição da enzima. O ensaio foi realizado por 18 h a 50°C em microplacas vedadas com parafilmes.

9.2.6. Atividade sobre CMC e β -glucan

A atividade da enzima foi medida por quantificação de extremidades redutoras, geradas no ensaio de hidrólise do substrato sintético carboximetilcelulose (CMC) e β -glucan, utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller et al 1959). Para tanto, os ensaios foram conduzidos em volume total de 750 μ L, sendo 225 μ L de amostra, 375 μ L de substrato CMC 2 % (p/v) (SIGMA) em tampão e 150 μ L de tampão citrato 50 mM pH 5,0. Os componentes da reação foram adicionados, a 4 °C, em microtubos de 1500 μ L, a e incubados por 4 h a 50 °C. A reação foi

interrompida pela adição de 500 μL de reagente de DNS em 500 μL da amostra. A mistura foi incubada a 99 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min e a 4 $^{\circ}\text{C}$ por 5min e transferida (200 μL) para microplacas e a concentração de açúcares redutores foi estimada por espectrometria em $\lambda = 540 \text{ nm}$. A dosagem de glicose foi realizada por HPLC.

10. Resultados e discussão

10.1. Sequenciamento da enzima

Uma nova enzima foi identificada em *Kluyveromyces marxianus* sendo esta enzima secretada e com capacidade de hidrolisar celobiose e pNpG (Lopes et al., 2014).

Visando uma melhor identificação e caracterização o extrato bruto, assim como a enzima parcialmente purificada por cromatografia de troca iônica foram submetidos à eletroforese desnaturante para posterior análise por espectrometria de massa. Abaixo encontra-se a tabela de purificação com dados de atividade após cada etapa de purificação (Lopes et al., 2014).

Tabela 1 - Tabela da purificação parcial por FPLC da BGL extracelular de *K. marxianus* UFV-3.

Etapa de purificação	Vol (mL)	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg ptn)	Atividade total (U)	Fator de purificação	Recuperação (%)
Ultra-filtração	40	113,0	1,0	113,0	4520	1,0	100
Troca iônica 1	2,5	962,4	0,478	2013,4	2406	18,0	53
Troca iônica 2	2,5	911,2	0,232	3927,6	2278	35,0	50

Com a coloração do gel foi possível observar duas bandas próximo de 45 kDa (Figura 2) que corresponde as duas bandas anteriormente observadas por Rocha et al., 2014 como tendo atividade no substrato sintético pNpG. Sendo assim, essas duas bandas foram excisadas do gel para posterior análise por espectrometria de massa.

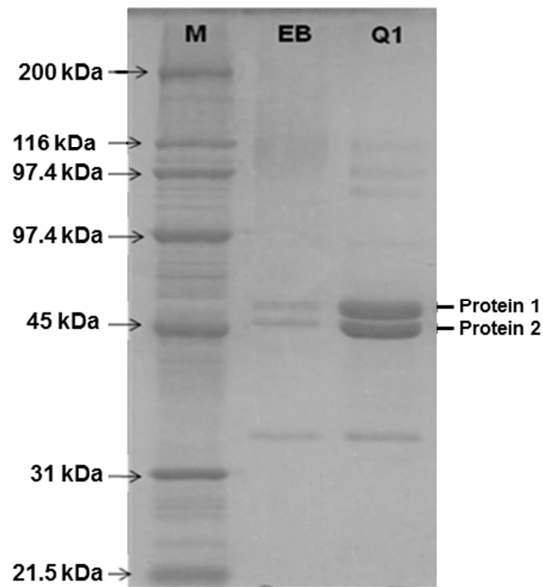


Figura 2 - Análise por SDS-PAGE da β -glucanase secretada por *K. marxianus*. O gel foi corado com Coomassie brilliant blue G-250. (M) marcador de peso molecular; (EB) sobrenadante de cultura concentrado por ultrafiltração; (Q1) enzima parcialmente purificada por cromatografia de troca iônica obtido por (Rocha et al., 2014).

Analisando os espectros de massas obtidos, verifica-se que as duas bandas apresentam padrões semelhantes de fragmentação (dados não mostrados). Este mesmo resultado foi obtido por Lopes e colaboradores (2014). Experimentos anteriores mostraram que as diferenças entre os seus pesos moleculares não é devido à diferença no padrão de glicosilação (dados não mostrados), reforçando mais uma vez a questão de se tratar de isoformas de uma mesma enzima.

Foi possível por essa técnica obter sequências de aminoácidos de 10 fragmentos. Com a sequência obtida foi feita uma busca no banco de dados do genoma de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. Com isso foi possível encontrar um peptídeo de 430 resíduos de aminoácidos cuja sequência encontra-se na figura 3. Com a sequência dos fragmentos obtida foi feito um alinhamento no banco de dados do NCBI mostrando se tratar de uma possível β -glucanase (Figura 4). Foi realizado um alinhamento no banco de dados do NCBI com a sequência do peptídeo de 430 e os mesmos resultados foram encontrados (dados não mostrados).

Essa busca pela sequência é importante, devido à diversidade de enzimas capazes de hidrolisar ligações glicosídicas em polímeros de carboidratos. As β -glucanases, por exemplo, fazem parte do grupo das glicosil hidrolases os quais podem ser agrupadas em até 115 famílias. Neste sentido a sequência de aminoácidos serviu pra identificar a enzima e a que grupo ela pertence (Marana, 2006; Cairns et al., 2010).

```

1  MLSINQALSV  LLFLVSVCF  TPLPLSKRYL  DYDSYKVKGV  NIGGWLVL  EP
51  FITPSLFEAF  RTNNDNDDGI  PVDEYHYCQQ  LGKEEATKRL  TQHYSTWITE
101 DDFAEMAKTG  LNMVRIPIGY  WAFDLLDNDP  YVTGVQEGFL  DQAIGWASKY
151 NLKVWVDLHG  APGSQNGFDN  SGLRDQIKFQ  EDQNTQLLKN  VLMHIIEKYS
201 GENYTDTVIG  IEVLNEPLGP  SIDMNKLDL  NNWAYDYLRN  QVKGDQVLVI
251 HDAFQAPQYW  NDQLTSLDGN  YGVLVDHHHY  QVFSPGELSR  SMDDHISVAC
301 QQGWDVSFEG  HWNLVGEWSA  ALTDCAKWLN  GVGVG YRYDG  SFNKNGDTSY
351 YIGSCEGSQD  ITTWESEKKN  NYRKYIEAQL  DAYEMRNGWI  YWCWKTESTL
401 EWDYKNLVQN  GLFPQPLDDR  QFPNQCHYGG

```

Figura 3 - Sequência de aminoácidos da β -glucanase obtida pela busca no banco de dados do genoma de *K. marxianus* UFV-3 utilizando sequências de aminoácidos dos fragmentos obtidos do sequenciamento por ms/ms.

Após análise da sequência realizou-se uma busca no InterProScan de forma a determinar a que grupo de hidrolases pertence a enzima mostrando se tratar de glicosil hidrolases do grupo 5. Esta família é caracterizada por possuir uma região conservada onde se encontra um resíduo de glutamato, envolvido no mecanismo catalítico da enzima. É comum nessa família de enzima a presença de estruturas secundárias tais como folha β e α -hélice (β/α)₈. Enzimas pertencentes a esta família de hidrolases possuem as mais diversas atividades, sendo capazes de hidrolisar diferentes substratos como será mostrado posteriormente (Duenãs-Santero et al., 2010).

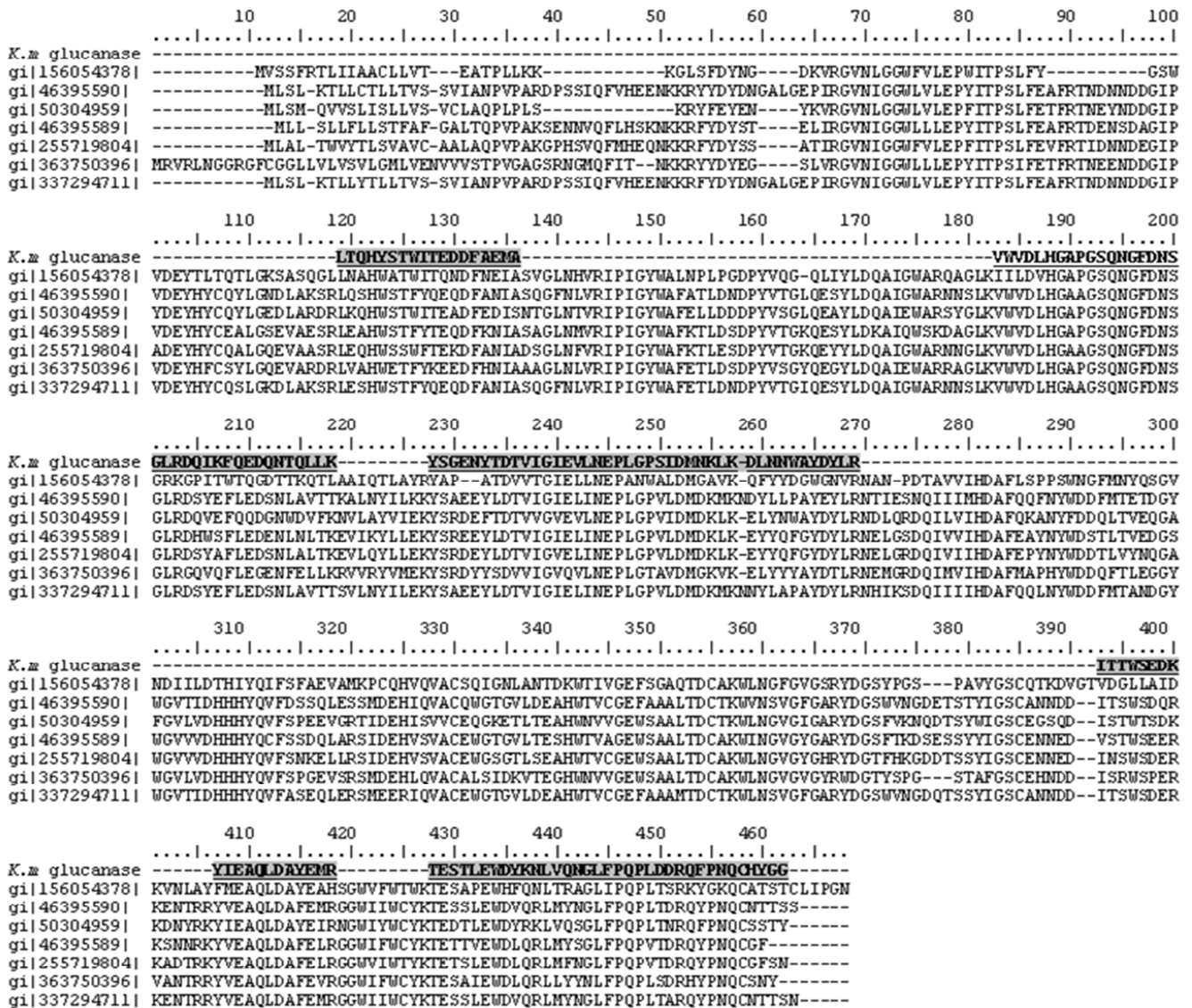


Figura 4 - Similaridade de aminoácidos obtidas pelo alinhamento de sequências presentes em bancos de dados e seis peptídeos obtidos por sequenciamento ms/ms da β -glucanase de *K. marxianus*. Caixas tracejadas indicam a sequência do peptídeo. As sequências e seus números de acesso são mostrados na figura 4.

10.2. Especificidade por substratos

Os grupos das β -glucanases podem ser agrupadas em quatro categorias com base na especificidade por substratos, sendo estas: β -1,3-glucanases, β -1,4-glucanases, β -1,3(4)-glucanases e β -1,3-1,4-glucanases (4-7). Neste

sentido, torna-se necessário uma melhor caracterização da enzima em relação a diferentes substratos visando agrupá-la em uma dessas categorias.

A especificidade da enzima foi testada com os substratos celobiose (β -1,4), CMC (β -1,4), β -glucano (β -1,4: β -1,4), e pNpG (Figura 5 e 6). Ao avaliar a sua atividade sobre CMC e β -glucano verificou-se uma atividade quase duas vezes maior para o substrato β -glucano, evidenciando sua alta especificidade sobre substratos com ligações β -1,3 e β -1,4 (Figura 5). Neste ensaio, percebe-se que após quatro horas aumenta-se a quantidade de açúcar redutor sem haver liberação de glicose, o que nos leva a inferir que se trata de uma endoglucanase, com atividade em ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4. As endoglucanases ao contrário das exo-glucanases clivam o polímero liberando oligossacarídeos como principais produtos de hidrólise (Peng et al., 2011; McCarthy et al., 2003).

Sabe-se que as β -glucanases não apresentam atividade para um único substrato podendo hidrolisar ligações β -1,3, β -1,4 e β -1,6 (Boyce & Walsh, 2007; Peng et al., 2011). De acordo com os resultados de atividades obtidos para os diferentes substratos acreditamos que a enzima seja uma β -1,3(4)-glucanase. Estas enzimas possuem a capacidade de hidrolisar ligações β -1,3 adjacentes a ligações β -1,4 coerente com a atividade obtida em β -glucan (Boyce et al., 2007; Bai et al., 2010). Elas também podem hidrolisar polímeros de glicose unidos somente por ligações β -1,3. (Bai et al., 2010) Isto pode explicar a capacidade da mesma em hidrolisar parede celular de levedura (Figura 7). Boyce et al., 2007 caracterizaram uma β -1,3(4)-glucanase de *Rhizomucor miehei* e verificaram que a enzima foi capaz de hidrolisar CM-curdlan (β -1-4) e β -glucan (β -1,3 e β -1-4). Bai e colaboradores (2010) identificaram uma nova β -1,3(4)-glucanase pertencente a família 9. Os resultados de caracterização mostraram que a enzima foi capaz de hidrolisar β -1,3-1,4-glucans (barley β -glucan and liqueena), β -1,4-glucans (CMC-Na), e β -1,3-glucans (laminarina). A maior atividade foi detectada em liquenana (109%) seguido por barley β -glucan (100%), CMC-Na (15.02%), e laminarina (6.19%).

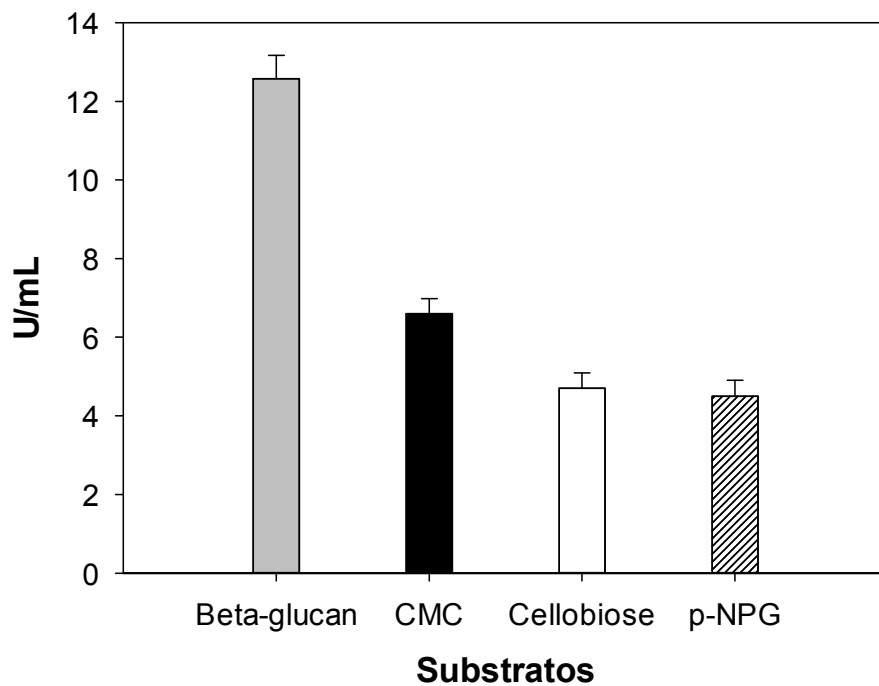


Figura 5 – Atividade de β -Glucanase em β -glucan (β -1,3 : β -1,4), CMC (β -1,4), celobiose (β -1,4) e p-NPG. Dados estão apresentados em nmolaçucar redutor/min/mL de meio de cultura.

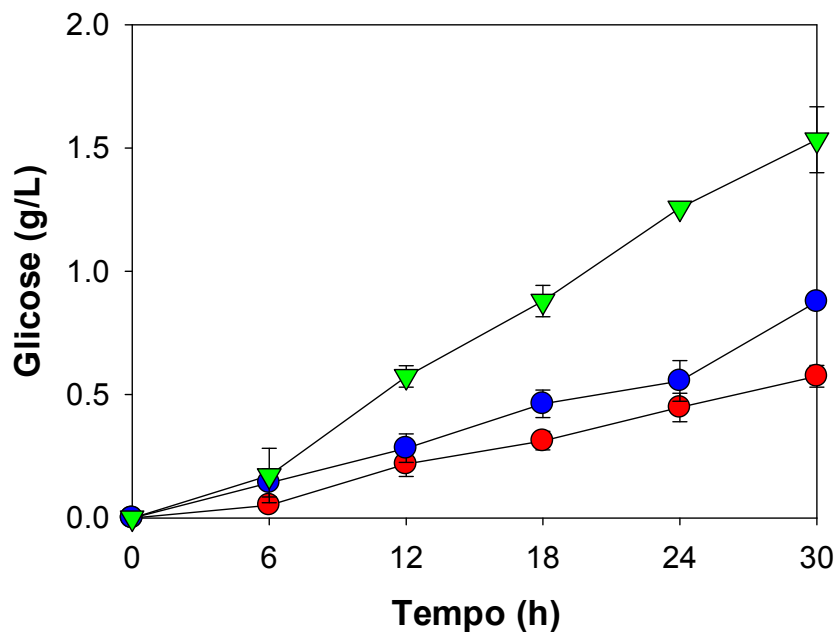


Figura 6 - Concentração de glicose em g/L em função do tempo de hidrólise da celobiose utilizando o extrato de cultura de *K. marxianus* a 37 (circulo vermelho), 42 (circulo azul) e 50 °C (triangulo verde).

O extrato enzimático foi testado, ainda, quanto à capacidade de hidrolisar celobiose. No entanto, verifica-se que a atividade em celobiose é muito baixa (4,5 U/mL) após 30 horas de ensaio a 50°C comparado a β -glucan (Figura 5). O mesmo pode-se inferir do pNPG o qual a atividade foi próxima ao da celobiose. Uma vez que a levedura *K. marxianus* UFV-3 cresce e fermenta a 37 e 42° com altos rendimentos o ensaio foi também realizado nessas temperaturas (De Souza et al., 2012). Analisando a Figura 6 verifica-se um aumento na quantidade de glicose liberada pelo aumento da temperatura. Essas características apresentadas pela enzima permitiu classificá-la como uma β -glucanase, descartando a possibilidade de se tratar de uma β -glicosidase.

Quanto à especificidade de substrato podemos classificar as β -glicosidase em: aril β -glicosidase, que agem sobre aril-glicosídeos; celobiasas, que hidrolisam a celobiose e as β -glicosidasas verdadeiras que apresentam especificidade por um amplo espectro de substrato (Bhatia et al., 2002 e Cairns, 2010).

Nos ensaios realizados vimos que a enzima apresentou baixa atividade em pNPG descartando a possibilidade de ser uma aril β -glicosídeo. A enzima não foi capaz de hidrolisar a rutina que também se trata de um aril-glicosídeo (dados não mostrados). E a baixa atividade em celobiose indicou não se tratar de uma celobiasa. O último grupo das β -glicosidasas também foi descartado, uma vez que, as enzimas desse grupo têm como principal característica hidrolisar ligações glicosídicas em pequenos oligossacarídeos e liberarem glicose como principal produto.

10.3. Atividade em parede celular de levedura

Foi avaliada a capacidade lítica do extrato enzimático concentrado em hidrolisar parede celular de *S. cerevisiae*. A atividade foi testada na ausência e presença de β -mercaptoetanol e a atividade lítica foi acompanhada pela redução da densidade ótica a 600nm. O β -mercaptoetanol foi utilizado uma vez que age como agente redutor, reduzindo as manoproteínas e desfazendo a camada protéica que envolve o polímero de glucano.

Pela Figura 7 verifica-se uma redução da densidade ótica quando a cultura de *S. cerevisiae* foi incubada na presença do extrato enzimático comparado com o controle. O controle consistiu em se adicionar água no lugar do extrato enzimático. Comparando o ensaio enzimático na presença e ausência de β -mercaptoetanol verifica-se uma pequena diferença na redução da densidade ótica na presença do mesmo.

Sabe-se que a parede celular de *S. cerevisiae* é formada por três componentes principais: um polímero de glucan (β -1,3 e β -1,6), manoproteínas e quitina (Lesage & Bussey, 2006). Neste caso, a retirada da camada de manoproteína pelo β -mercaptoetanol aumenta a acessibilidade do extrato para as ligações glicosídicas presentes no polímero de glucano.

As enzimas capazes de hidrolisar parede celular são principalmente as β -1,3-glucanases. Apesar de ter sido classificada como uma β -1,3(4)-glucanase sabe-se que esta classe de enzima é capaz de hidrolisar ligações β -1,3 adjacentes a β -1,4 como também ligações glicosídicas em polímeros de laminarina (Bai et al., 2010).

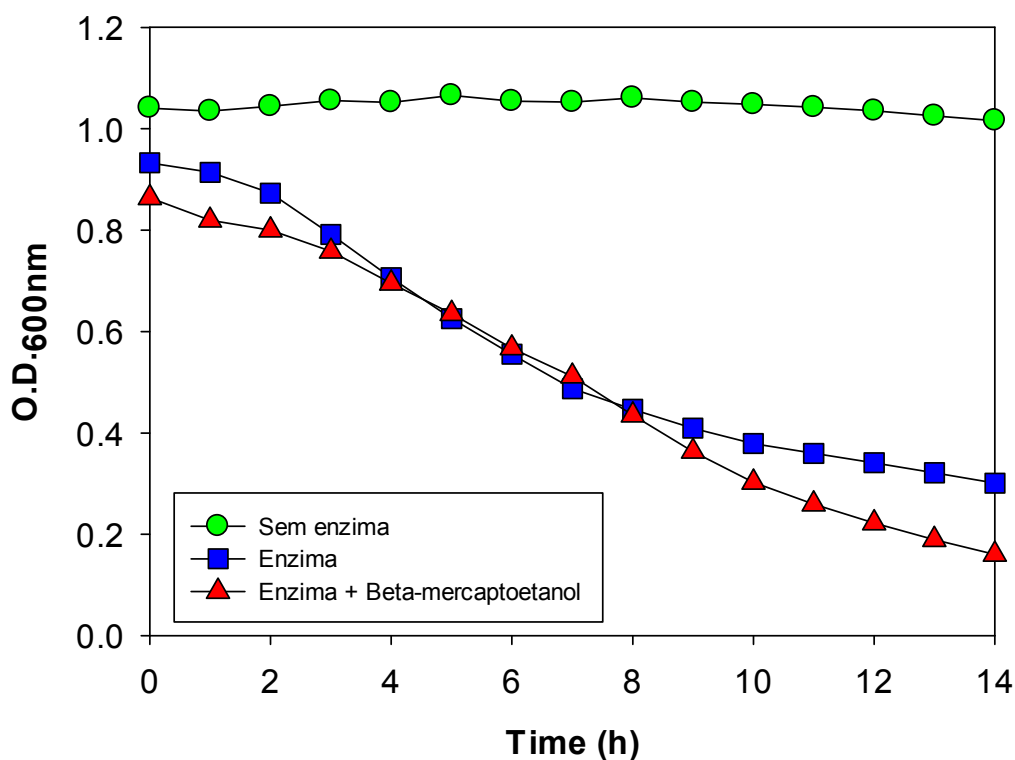


Figura 7 - Atividade lítica do sobrenadante de cultura sobre parede celular de *S. cerevisiae* W303 com e sem β -mercaptoetanol.

11. Conclusões

Uma nova β -glucanase foi identificada em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 sendo esta enzima secretada e classificada com base na sequência de aminoácidos e especificidade por substrato como uma β -3(4)-glucanase.

A enzima foi capaz de hidrolisar ligações glicosídicas β (1-3) e β (1-4) em polímeros de β -glucana, mas apresentou baixa atividade sobre celobiose.

Atividade enzimática mostrou que o extrato bruto concentrado foi capaz de lisar parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

12. Referências bibliográficas

- Aeling, K.A., Salmon, K.A., Laplaza, J.M., Li, L., Headman, J.R., Hutagalung, A.H., Picataggio, S. 2012. Co-fermentation of xylose and cellobiose by an engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **39**(11), 1597-604.
- Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B. 2011. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnol Adv*, **29**(6), 675-85.
- Aimanianda, V., Clavaud, C., Simenel, C., Fontaine, T., Delepierre, M., & Latge, J. P. 2009. Cell wall beta-(1,6)-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*: structural characterization and in situ synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, **(284)**,13401–13412.
- Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour Technol*, **101**(13), 4851-61.
- Baek, S.H., Kim, S., Lee, K., Lee, J.K., Hahn, J.S. 2012. Cellulosic ethanol production by combination of cellulase-displaying yeast cells. *Enzyme Microb Technol*, **51**(6-7), 366-72.
- Bai, Y., Wang, J., Zhang, Z., Shi, P., Luo, H., Huang, H., Luo, C., Yao, B. 2010. A novel family 9 beta-1,3(4)-glucanase from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4 with potential applications in the brewing industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, **87**(1), 251-9.
- Ballesteros, M., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I. 2004. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, **39**(12), 1843-1848.
- Bamforth, C.W. 2009. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. *Journal of Cereal Science*, **(50)**, 353–357.
- Barbosa, A. M., Giese, E. C., Dekker, R. F., Borsato, D., Briones Perez, A. I., & Ubeda Iranzo, J. F. 2010. Extracellular beta-glucosidase production by the yeast *Debaryomyces pseudopolymorphus* UCLM-NS7A: optimization using response surface methodology. *New Biotech*, **27**, 374–381.
- Basso, L.C., de Amorim, H.V., de Oliveira, A.J., Lopes, M.L. 2008. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res*, **8**(7), 1155-63.
- Beckmann L, Simon O, Vahjen W. 2006. Isolation and identification of mixed linked β -glucan degrading bacteria in the intestine of broiler chickens and partial characterization of respective 1, 3-1, 4- β -glucanase activities. *J Basic Microbiol*, **(46)**, 175–185.
- Behall, K. M. 2006. Consumption of both resistant starch and -glucan improves postprandial plasma glucose and insulin in women. *Diabetes Care*, **(29)**, 976–981.
- Bertilsson, M., Olofsson, K., Liden, G. 2009. Prefermentation improves xylose utilization in simultaneous saccharification and co-fermentation of pretreated spruce. *Biotechnol Biofuels*, **2**(1), 8.

- Bhatia, Y.; Mishra, S.; Bisaria, V.S. 2002. Microbial β -glucosidases: cloning, properties and applications. *Critical Review in Biotechnology*, **(22)**, 375-407.
- Bhat, M., K., Bhat, S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential Industrial applications. *Biotechnology Advance*, (15), 583-620.
- Björklund, L., Larsson, S., Jönsson, L.J., Reimann, E., Nilvebrant, N.O. 2002. Treatment with lignin residue: a novel method for detoxification of lignocellulose hydrolysates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **98-100**, 563-575.
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol*, **(54)**:519–546.
- Börjesson, J., Engqvist, M., Sipos, B., Tjerneld, F. 2007. Effect of poly(ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose. *Enzyme Microb Technol*, **41**(1-2), 186-195.
- Boyce, A., Walsh, G. 2007. Production, purification and application-relevant characterisation of an endo-1,3(4)-beta-glucanase from *Rhizomucor miehei*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **76**(4), 835-41.
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K.B., Ramakrishnan, S. 2011. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme Res*, **2011**, 787532.
- Cadete, R.M., Melo, M.A., Zilli, J.E., Vital, M.J., Mouro, A., Prompt, A.H., Gomes, F.C., Stambuk, B.U., Lachance, M.A., Rosa, C.A. 2013. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel (D)-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **103**(2), 421-31.
- Cantarella, M., Mucciante, C., Cantarella, L. 2014. Inactivating effects of lignin-derived compounds released during lignocellulosic biomass pretreatment on the endo-glucanase catalyzed hydrolysis of carboxymethylcellulose: A study in continuous stirred ultrafiltration-membrane reactor. *Bioresour Technol*, **156C**, 48-56.
- Castoria, R., Curtis, F., Lima, G., Cicco, V. 1997. β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharvest Biol and Technol*, **12**, 293-300.
- Castro, A. M. 2010. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quimica Nova*, **(33)**, 181-188.
- Cara, C., Moya, M., Ballesteros, I., Negro, M.J., González, A., Ruiz, E. 2007. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. *Process Biochemistry*, **42**(6), 1003-1009.
- Cardona, C.A., Quintero, J.A., Paz, I.C. 2010. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresour Technol*, **101**(13), 4754-66.
- Cardona, C.A., Sanchez, O.J. 2007. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresour Technol*, **98**(12), 2415-57.
- Carrasco, C., Baudel, H., Penarrieta, M., Solano, C., Tejeda, L., Roslander, C., Galbe, M., Liden, G. 2011. Steam pretreatment and fermentation of the

- straw material "Paja Brava" using simultaneous saccharification and co-fermentation. *J Biosci Bioeng*, **111**(2), 167-74.
- Carroll, A., Somerville, C. 2009. Cellulosic biofuels. *Annu Rev Plant Biol*, **60**, 165-82.
- Carvalho, F., Duarte, L.C., Gírio, F.M. 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **67**, 849-864.
- Celestino KRS, Cunha RB, Felix CR. 2006. Characterization of a β -glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, and its potential for application in the brewing industry. *BMC Biochem*, **(7)**, 23.
- Chaidedgumjorn, A. C.; Toyoda, H.; Woo, E. R.; Lee, K. B.; Kim, Y. S.; Toida, T.; Imanari, T. 2002. Effect of (1,3)- and (1,4)-linkages of fully sulfated polysaccharides on their anticoagulant activity. *Carbohydrate Research*, **(337)**, 925-933.
- Chandel, A.K., Kapoor, R.K., Singh, A., Kuhad, R.C. 2007. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresour Technol*, **98**(10), 1947-50.
- Chauve, M., Mathis, H., Huc, D., Casanave, D., Monot, F., Lopes Ferreira, N. 2010. Comparative kinetic analysis of two fungal beta-glucosidases. *Biotechnol Biofuels*, **3**(1), 3.
- Chen, H., Qiu, W. 2010. Key technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biotechnol Adv*, **28**(5), 556-62.
- Chen, M., Qin, Y., Liu, Z., Liu, K., Wang, F., Qu, Y. 2010. Isolation and characterization of a β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. *Enzyme Microb Technol*, **46**(6), 444-449.
- Chen, P., Fu, X., Ng, T.B., Ye, X.Y. 2011. Expression of a secretory beta-glucosidase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and its characterization. *Biotechnol Lett*, **33**(12), 2475-9.
- Chundawat, S.P., Beckham, G.T., Himmel, M.E., Dale, B.E. 2011. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, **2**, 121-45.
- Daenen, L., Saison, D., Sterckx, F., Delvaux, F. R., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. 2008. Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, **(104)**, 478–488
- De Figueiredo Vilela, L., de Mello, V.M., Reis, V.C., Bon, E.P., Goncalves Torres, F.A., Neves, B.C., Eleutherio, E.C. 2013. Functional expression of *Burkholderia cenocepacia* xylose isomerase in yeast increases ethanol production from a glucose-xylose blend. *Bioresour Technol*, **128**, 792-6.
- De Souza, C.J., Costa, D.A., Rodrigues, M.Q., dos Santos, A.F., Lopes, M.R., Abrantes, A.B., dos Santos Costa, P., Silveira, W.B., Passos, F.M., Fietto, L.G. 2012. The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. *Bioresour Technol*, **109**, 63-9.
- Demain, A.L. 2009. Biosolutions to the energy problem. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **36**(3), 319-32.
- Duenas-Santero, E., Martin-Cuadrado, A.B., Fontaine, T., Latge, J.P., del Rey, F., Vazquez de Aldana, C. 2010. Characterization of glycoside hydrolase

- family 5 proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*, **9**(11), 1650-60.
- Erdei, B., Franko, B., Galbe, M., Zacchi, G. 2013. Glucose and xylose co-fermentation of pretreated wheat straw using mutants of *S. cerevisiae* TMB3400. *J Biotechnol*, **164**(1), 50-8.
- Faga, B.A., Wilkins, M.R., Banat, I.M. 2010. Ethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of switchgrass using *Saccharomyces cerevisiae* D(5)A and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains. *Bioresour Technol*, **101**(7), 2273-9.
- Fan, Z., South, C., Lyford, K., Munsie, J., van Walsum, P., Lynd, L.R. 2003. Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor. *Bioprocess Biosyst Eng*, **26**(2), 93-101.
- Felby, C., Thygesen, L.G., Kristensen, J.B., Jørgensen, H., Elder, T. 2008. Cellulose–water interactions during enzymatic hydrolysis as studied by time domain NMR. *Cellulose*, **15**(5), 703-710.
- Fleuri, L. F., & Sato, H. H. 2008. β -1,3 Glucanases e quitinasas: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. *Ciênc a grotéc*, (**32**), 1224–1231.
- Fonseca, G.G., de Carvalho, N.M., Gombert, A.K. 2013. Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Fonseca, G.G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A.K. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, **79**(3), 339-54.
- Fu, C., Mielenz, J.R., Xiao, X., Ge, Y., Hamilton, C.Y., Rodriguez, M., Jr., Chen, F., Foston, M., Ragauskas, A., Bouton, J., Dixon, R.A., Wang, Z.Y. 2011. Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**(9), 3803-8.
- Fujita, Y., Ito, J., Ueda, M., Fukuda, H., Kondo, A. 2004. Synergistic Saccharification, and Direct Fermentation to Ethanol, of Amorphous Cellulose by Use of an Engineered Yeast Strain Codisplaying Three Types of Cellulolytic Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(2), 1207-1212.
- Gámez, S., González-Cabriales, J.J., Ramírez, J.A., Garrote, G., Vázquez, M. 2006. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering*, **74**(1), 78-88.
- Gao, D., Chundawat, S.P., Sethi, A., Balan, V., Gnanakaran, S., Dale, B.E. 2013. Increased enzyme binding to substrate is not necessary for more efficient cellulose hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Garcia Sanchez, R., Karhumaa, K., Fonseca, C., Sanchez Nogue, V., Almeida, J.R., Larsson, C.U., Bengtsson, O., Bettiga, M., Hahn-Hagerdal, B., Gorwa-Grauslund, M.F. 2010. Improved xylose and arabinose utilization by an industrial recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain using evolutionary engineering. *Biotechnol Biofuels*, **3**, 13.
- Genta, F.A., Bragatto, I., Terra, W.R., Ferreira, C. 2009. Purification, characterization and sequencing of the major beta-1,3-glucanase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochem Mol Biol*, **39**(12), 861-74.

- Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour Technol*, **101**(13), 4775-800.
- Gunsalus, I.C., Horecker, B.L., Wood, W.A. 1955. Pathways of carbohydrate metabolism in microorganisms. **19**(2), 79–128.
- Guo, C., Jiang, N. 2013. Physiological and enzymatic comparison between *Pichia stipitis* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on xylose fermentation. *World J Microbiol Biotechnol*, **29**(3), 541-7.
- Ha, S., Galazka, J.M., Kima, S.R., Choi, J., Yanf, X.S., J., Glass, L., D., C.J.H., Jin, Y. 2011. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *PNAS*, **108**, 504-509.
- Hasunuma, T., Kondo, A. 2012. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. *Process Biochemistry*, **47**(9), 1287-1294.
- Hendriks, A.T., Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*, **100**(1), 10-8.
- Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*; **(280)**,309–316.
- Hernandez-Salas, J.M., Villa-Ramirez, M.S., Veloz-Rendon, J.S., Rivera-Hernandez, K.N., Gonzalez-Cesar, R.A., Plascencia-Espinosa, M.A., Trejo-Estrada, S.R. 2009. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresour Technol*, **100**(3), 1238-45.
- Hong, J., Wang, Y., Kumagai, H., Tamaki, H. 2007. Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. *J Biotechnol*, **130**(2), 114-23.
- Iorio, E., Torosantucci, A., Bromuro, C., Chiani, P., Ferretti, A., Giannini, M., Cassone, A., & Podo, F. 2008. *Candida albicans* cell wall comprises a branched beta-D-(1→6)-glucan with beta-D-(1→3)-side chains. *Carbohydrate Research*, **(343)**, 1050–1061.
- Ismail, K.S., Sakamoto, T., Hatanaka, H., Hasunuma, T., Kondo, A. 2013. Gene expression cross-profiling in genetically modified industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during high-temperature ethanol production from xylose. *J Biotechnol*, **163**(1), 50-60.
- Javmen, A., Grigiskis, S., Rudenkov, M., Mauricas, M. 2013. Purification and partial characterization of a novel beta-1,3-endoglucanase from *Streptomyces rutgersensis*. *Protein J*, **32**(5), 411-7.
- Jeffries, T.W., Jin, Y.S. 2004. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, **63**(5), 495-509.
- Jeon, E., Hyeon, J.E., Suh, D.J., Suh, Y.W., Kim, S.W., Song, K.H., Han, S.O. 2009. Production of cellulosic ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* heterologous expressing *Clostridium thermocellum* endoglucanase and *Saccharomycopsis fibuligera* beta-glucosidase genes. *Mol Cells*, **28**(4), 369-73.
- Jonsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.O. 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol Biofuels*, **6**(1), 16.
- Jordan, D.B., Bowman, M.J., Braker, J.D., Dien, B.S., Hector, R.E., Lee, C.C., Mertens, J.A., Wagschal, K. 2012. Plant cell walls to ethanol. *Biochem J*, **442**(2), 241-52.

- Ketudat Cairns, J.R., Esen, A. 2010. beta-Glucosidases. *Cell Mol Life Sci*, **67**(20), 3389-405.
- Kim, J.H., Johnston, M. 2006. Two glucose-sensing pathways converge on Rgt1 to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **281**(36), 26144-9.
- Kim, S.B., Lee, S.J., Jang, E.J., Han, S.O., Park, C., Kim, S.W. 2012. Sugar recovery from rice straw by dilute acid pretreatment. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **18**(1), 183-187.
- Kim, S.R., Kwee, N.R., Kim, H., Jin, Y.S. 2013a. Feasibility of xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing endogenous aldose reductase (GRE3), xylitol dehydrogenase (XYL2), and xylulokinase (XYL3) from *Scheffersomyces stipitis*. *FEMS Yeast Res*, **13**(3), 312-21.
- Kim, S.R., Park, Y.C., Jin, Y.S., Seo, J.H. 2013b. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. *Biotechnol Adv*.
- Kolb, M., Sieber, V., Amann, M., Faulstich, M., Schieder, D. 2012. Removal of monomer delignification products by laccase from *Trametes versicolor*. *Bioresour Technol*, **104**, 298-304.
- Koppram, R., Nielsen, F., Albers, E., Lambert, A., Wannstrom, S., Welin, L., Zacchi, G., Olsson, L. 2013. Simultaneous saccharification and co-fermentation for bioethanol production using corncobs at lab, PDU and demo scales. *Biotechnol Biofuels*, **6**(1), 2.
- Krishna, S.H., Reddy, J., Chowdary, G.V. 2001a. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresour Technol*, **77**, 193-196.
- Krishna, S.H., Reddy, J., Chowdary, G.V. 2001b. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology*, **77**, 193-196.
- Kristensen, J.B., Felby, C., Jorgensen, H. 2009a. Determining yields in high solids enzymatic hydrolysis of biomass. *Appl Biochem Biotechnol*, **156**(1-3), 127-32.
- Kristensen, J.B., Felby, C., Jorgensen, H. 2009b. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol Biofuels*, **2**(1), 11.
- Labavitch J., M., Ray, P., M. 1978. Structure of hemicellulosic polysaccharides of *Avena sativa* coleoptilecell-walls. *Phytochemistry* (**17**):933-37
- Labourel, A., Jam, M., Jeudy, A., Hehemann, J.H., Czjzek, M., Michel, G. 2014. The beta-glucanase ZgLamA from *Zobellia galactanivorans* evolved a bent active site adapted for efficient degradation of algal laminarin. *J Biol Chem*, **289**(4), 2027-42.
- Lane, M.M., Burke, N., Karreman, R., Wolfe, K.H., O'Byrne, C.P., Morrissey, J.P. 2011. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **100**(4), 507-19.
- Lane, M.M., Morrissey, J.P. 2010. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, **24**(1-2), 17-26.
- Laureano-Perez, L., Teymori, F., Aliadeh, H., Dale, B.E. 2005a. Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass. *Appl Biochem Biotechnol*, **121-124**, 1081-1099.

- Laureano-Perez, L., Teymori, F., Aliadeh, H., Dale, B.E. 2005b. Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **121-124**, 1081-1099.
- Lertwattanasakul, N., Suprayogi, Murata, M., Rodrussamee, N., Limtong, S., Kosaka, T., Yamada, M. 2013. Essentiality of respiratory activity for pentose utilization in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **103**(4), 933-45.
- Lesage, G., Bussey, H. 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **70**(2), 317-43.
- Lin, Z.X., Zhang, H.M., Ji, X.J., Chen, J.W., Huang, H. 2011. Hydrolytic enzyme of cellulose for complex formulation applied research. *Appl Biochem Biotechnol*, **164**(1), 23-33.
- Liu, Z., Hou, J., Martinez, J.L., Petranovic, D., Nielsen, J. 2013. Correlation of cell growth and heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Lu, Y., Wang, Y., Xu, G., Chu, J., Zhuang, Y., Zhang, S. 2010. Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass. *Appl Biochem Biotechnol*, **160**(2), 360-9.
- Luo, H., Yang, J., Yang, P., Li, J., Huang, H., Shi, P., Bai, Y., Wang, Y., Fan, Y., Yao, B. 2010. Gene cloning and expression of a new acidic family 7 endo-beta-1,3-1,4-glucanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1. *Appl Microbiol Biotechnol*, **85**(4), 1015-23.
- Lynd, L.R., van Zyl, W.H., McBride, J.E., Laser, M. 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol*, **16**(5), 577-83.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66**(3), 506-577.
- Marana, S.R. 2006. Molecular basis of substrate specificity in family 1 glycoside hydrolases. *IUBMB Life*, **58**(2), 63-73.
- Martin, C., Thomsen, M.H., Hauggaard-Nielsen, H., Belindathomsen, A. 2008. Wet oxidation pretreatment, enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of clover-ryegrass mixtures. *Bioresour Technol*, **99**(18), 8777-82.
- Masarin, F., Gurrilhaes, D.B., Baffa, D.C., Barbosa, M.H., Carvalho, W., Ferraz, A., Milagres, A.M. 2011. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. *Biotechnol Biofuels*, **4**(1), 55.
- Matano, Y., Hasunuma, T., Kondo, A. 2012a. Cell recycle batch fermentation of high-solid lignocellulose using a recombinant cellulase-displaying yeast strain for high yield ethanol production in consolidated bioprocessing. *Bioresour Technol*.
- Matano, Y., Hasunuma, T., Kondo, A. 2012b. Display of cellulases on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* for high yield ethanol production from high-solid lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*, **108**, 128-33.
- Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T., Sawayama, S. 2009. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, **84**(1), 37-53.
- Mathlouthi N, Mallet S, Saulnier L, Quemener B, Larbier M. 2002. Effects of xylanase and β -glucanase addition on performance, nutrient digestibility,

- and physico-chemical conditions in the small intestine contents and faecal microflora of broiler chickens fed a wheat and barley-based diet. *Anim Res* **(51)**, 395–406
- McCarthy, T., Hanniffy, O., Savage, A.V., Tuohy, M.G. 2003. Catalytic properties and mode of action of three endo- β -glucanases from *Talaromyces emersonii* on soluble β -1,4- and β -1,3;1,4-linked glucans. *International Journal of Biological Macromolecules*, **33**(1-3), 141-148.
- Moreno, A.D., Ibarra, D., Fernandez, J.L., Ballesteros, M. 2012. Different laccase detoxification strategies for ethanol production from lignocellulosic biomass by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Bioresour Technol*, **106**, 101-9.
- Ohgren, K., Bengtsson, O., Gorwa-Grauslund, M.F., Galbe, M., Hahn-Hagerdal, B., Zacchi, G. 2006. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *J Biotechnol*, **126**(4), 488-98.
- Okuda, N., Soneura, M., Ninomiya, K., Katakura, Y., Shioya, S. 2008. Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. *J Biosci Bioeng*, **106**(2), 128-33.
- Olofsson, K., Bertilsson, M., Liden, G. 2008. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol Biofuels*, **1**(1), 7.
- Olofsson, K., Palmqvist, B., Liden, G. 2010. Improving simultaneous saccharification and co-fermentation of pretreated wheat straw using both enzyme and substrate feeding. *Biotechnol Biofuels*, **3**, 17.
- Oreb, M., Dietz, H., Farwick, A., Boles, E. 2012. Novel strategies to improve co-fermentation of pentoses with d-glucose by recombinant yeast strains in lignocellulosic hydrolysates. *Bioengineered*, **3**(6), 347-351.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, N., Soccol, S.T. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresour Technol*, **74**, 69-80.
- Parawira, W., Tekere, M. 2011. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Crit Rev Biotechnol*, **31**(1), 20-31.
- Park, J. K.; Wang, L.; Patel, H. V.; Roseman, S. 2002. Molecular cloning and characterization of a unique β -glucosidase from *Vibrio cholerae*. *Journal of Biological Chemistry*, **(277)**, 29555–2956.
- Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A., Xiong, G. 2013. Hemicellulose biosynthesis. *Planta*.
- Pauly, M., Keegstra, K. 2010. Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. *Curr Opin Plant Biol*, **13**(3), 305-12.
- Pecota, D.C., Rajgarhia, V., Da Silva, N.A. 2007. Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*. *J Biotechnol*, **127**(3), 408-16.
- Peng, Y., Liu, G.L., Yu, X.J., Wang, X.H., Jing, L., Chi, Z.M. 2011. Cloning of exo-beta-1,3-glucanase gene from a marine yeast *Williopsis saturnus* and its overexpression in *Yarrowia lipolytica*. *Mar Biotechnol (NY)*, **13**(2), 193-204.

- Percival Zhang, Y.H., Himmel, M.E., Mielenz, J.R. 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv*, **24**(5), 452-81.
- Persson, P., Andersson, J., Gorton, L., Larsson, S., Nilvebrant, N.O., Jonsson, L.F. 2002. Effect of Different Forms of Alkali Treatment on Specific Fermentation Inhibitors and on the Fermentability of Lignocellulose Hydrolysates for Production of Fuel Ethanol. *Journal of Agricultural and food chemistry*, **50**, 5318–5325.
- Qi M, Jun H-S, Forsbert CW (2008) Cel9D, an atypical 1, 4-b-D-glucan glucohydrolase from *Fibrobacter succinogenes*: characteristics, catalytic residues, and synergistic interactions with other cellulases. *J Bacteriol*, **(109)**, 1976–1984
- Rahikainen, J.L., Evans, J.D., Mikander, S., Kalliola, A., Puranen, T., Tamminen, T., Marjamaa, K., Kruus, K. 2013a. Cellulase-lignin interactions-The role of carbohydrate-binding module and pH in non-productive binding. *Enzyme Microb Technol*, **53**(5), 315-21.
- Rahikainen, J.L., Martin-Sampedro, R., Heikkinen, H., Rovio, S., Marjamaa, K., Tamminen, T., Rojas, O.J., Kruus, K. 2013b. Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: The effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption. *Bioresour Technol*, **133C**, 270-278.
- Ramachandriya, K.D., Wilkins, M., Atiyeh, H.K., Dunford, N.T., Hiziroglu, S. 2013. Effect of high dry solids loading on enzymatic hydrolysis of acid bisulfite pretreated Eastern redcedar. *Bioresour Technol*, **147C**, 168-176.
- Rizzi, M., Erlemann, P., Bui-Thanh, N.A. 1988. Xylose fermentation by yeasts. 4. Purification and kinetic studies of xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **190**, 39-43.
- Rizzi, M., Harwart, K., Erlemann, P., Bui-Thanh, N.A., Dellweg, H. 1989. Purification and properties of the NAD⁺-xylytol-dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. *J Ferment Bioeng*, **67**, 20-24.
- Rocha, J.M.G., Martin, C., Soares, I.B., Maior, A.M.S., Baudel, H.M., Abreu, C.A.M. 2011a. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, **35**(1), 663-670.
- Rocha, S.N., Abrahao-Neto, J., Cerdan, M.E., Gonzalez-Siso, M.I., Gombert, A.K. 2010. Heterologous expression of glucose oxidase in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Microb Cell Fact*, **9**, 4.
- Rocha, S.N., Abrahao-Neto, J., Gombert, A.K. 2011b. Physiological diversity within the *Kluyveromyces marxianus* species [corrected]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **100**(4), 619-30.
- Rodríguez-Chong, A., Alberto Ramírez, J., Garrote, G., Vázquez, M. 2004. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. *Journal of Food Engineering*, **61**(2), 143-152.
- Rudolf, A., Baudel, H., Zacchi, G., Hahn-Hagerdal, B., Liden, G. 2008. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. *Biotechnol Bioeng*, **99**(4), 783-90.
- Runquist, D., Hahn-Hagerdal, B., Radstrom, P. 2010. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*, **3**, 5.
- Saha, B.C., Nichols, N.N., Qureshi, N., Cotta, M.A. 2011. Comparison of separate hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification

- and fermentation processes for ethanol production from wheat straw by recombinant *Escherichia coli* strain FBR5. *Appl Microbiol Biotechnol*, **92**(4), 865-74.
- Sanchez, O.J., Cardona, C.A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol*, **99**(13), 5270-95.
- Santos, J.R.A., Souto-Maior, A.M., Gouveia, E.R. 2010. Comparação entre processos em shf e em ssf de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. *Química Nova*, **3**, 904-908.
- Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K. 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, **37**(1), 19-27.
- Scalcinati, G., Otero, J.M., Van Vleet, J.R., Jeffries, T.W., Olsson, L., Nielsen, J. 2012. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient aerobic xylose consumption. *FEMS Yeast Res*, **12**(5), 582-97.
- Scheller, H.V., Ulvskov, P. 2010. Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol*, **61**, 263-89.
- Shahsavarani, H., Hasegawa, D., Yokota, D., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Boonchird, C., Harashima, S. 2013. Enhanced bio-ethanol production from cellulosic materials by semi-simultaneous saccharification and fermentation using high temperature resistant *Saccharomyces cerevisiae* TJ14. *J Biosci Bioeng*, **115**(1), 20-3.
- Sieiro, C., Sestelo, A.B., Villa, T.G. 2009. Cloning, characterization, and functional analysis of the EPG1-2 gene: a new allele coding for an endopolygalacturonase in *Kluyveromyces marxianus*. *J Agric Food Chem*, **57**(19), 8921-6.
- Silva, J.P., Carneiro, L.M., Roberto, I.C. 2013. Treatment of rice straw hemicellulosic hydrolysates with advanced oxidative processes: a new and promising detoxification method to improve the bioconversion process. *Biotechnol Biofuels*, **6**(1), 23.
- Socol, C.R., Vandenberghe, L.P., Medeiros, A.B., Karp, S.G., Buckeridge, M., Ramos, L.P., Pitarelo, A.P., Ferreira-Leitao, V., Gottschalk, L.M., Ferrara, M.A., da Silva Bon, E.P., de Moraes, L.M., Araujo Jde, A., Torres, F.A. 2010. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresour Technol*, **101**(13), 4820-5.
- Sree, N.K., Sridhar, M., Suresh, K., Banat, I.M., Rao, L.V. 2000. High alcohol production by repeated batch fermentation using an immobilized osmotolerant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **24**, 222-226.
- Suryawati, L., Wilkins, M.R., Bellmer, D.D., Huhnke, R.L., Maness, N.O., Banat, I.M. 2008. Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass pretreated by hydrothermolysis using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. *Biotechnol Bioeng*, **101**(5), 894-902.
- Sutivisedsak, N., Leathers, T.D., Bischoff, K.M., Nunnally, M.S., Peterson, S.W. 2013. Novel sources of beta-glucanase for the enzymatic degradation of schizophyllan. *Enzyme Microb Technol*, **52**(3), 203-10.
- Tambor, J.H., Ren, H., Ushinsky, S., Zheng, Y., Riemens, A., St-Francois, C., Tsang, A., Powlowski, J., Storms, R. 2012. Recombinant expression, activity screening and functional characterization identifies three novel

- endo-1,4-beta-glucanases that efficiently hydrolyse cellulosic substrates. *Appl Microbiol Biotechnol*, **93**(1), 203-14.
- Tanaka, T., Yamada, R., Ogino, C., Kondo, A. 2012. Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, **95**(3), 577-91.
- Toivari, M.H., Salusjarvi, L., Ruohonen, L., Penttila, M. 2004. Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, **70**(6), 3681-6.
- Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M., Oliva, J.M., Olsson, L. 2010. Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **37**(11), 1211-20.
- Tomas-Pejo, E., Garcia-Aparicio, M., Negro, M.J., Oliva, J.M., Ballesteros, M. 2009. Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. *Bioresour Technol*, **100**(2), 890-5.
- Tsai, L.C., Chen, Y.N., Shyur, L.F. 2008. Structural modeling of glucanase-substrate complexes suggests a conserved tyrosine is involved in carbohydrate recognition in plant 1,3-1,4-beta-D-glucanases. *J Comput Aided Mol Des*, **22**(12), 915-23.
- Tu, M., Saddler, J.N. 2010. Potential enzyme cost reduction with the addition of surfactant during the hydrolysis of pretreated softwood. *Appl Biochem Biotechnol*, **161**(1-8), 274-87.
- van Maris, A.J., Abbott, D.A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M.A., Wisselink, H.W., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **90**(4), 391-418.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W. 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol*, **153**(3), 895-905.
- Varga, E., Klinke, H.B., Reczey, K., Thomsen, A.B. 2004. High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. *Biotechnol Bioeng*, **88**(5), 567-74.
- Vargas Betancur, G.J., Pereira Jr, N. 2010. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. *Electronic Journal of Biotechnology*, **13**(3).
- Vidal, B.C., Jr., Dien, B.S., Ting, K.C., Singh, V. 2011. Influence of feedstock particle size on lignocellulose conversion--a review. *Appl Biochem Biotechnol*, **164**(8), 1405-21.
- Wagner, A., Tobimatsu, Y., Phillips, L., Flint, H., Torr, K., Donaldson, L., Pears, L., Ralph, J. 2011. CCoAOMT suppression modifies lignin composition in *Pinus radiata*. *Plant J*, **67**(1), 119-29.
- Wan, C., Li, Y. 2012. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnol Adv*, **30**(6), 1447-57.
- Wan, P., Zhai, D., Wang, Z., Yang, X., Tian, S. 2012. Ethanol Production from Nondetoxified Dilute-Acid Lignocellulosic Hydrolysate by Cocultures of *Saccharomyces cerevisiae* Y5 and *Pichia stipitis* CBS6054. *Biotechnol Res Int*, **2012**, 656371.

- Wang, H., Mochidzuki, K., Kobayashi, S., Hiraide, H., Wang, X., Cui, Z. 2013. Effect of Bovine Serum Albumin (BSA) on Enzymatic Cellulose Hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol*, **170**(3), 541-51.
- Wang, M., Li, Z., Fang, X., Wang, L., Qu, Y. 2012. Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **128**, 1-24.
- Watanabe, S., Abu Saleh, A., Pack, S.P., Annaluru, N., Kodaki, T., Makino, K. 2007. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Microbiology*, **153**(Pt 9), 3044-54.
- Wen, F., Sun, J., Zhao, H. 2010. Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Appl Environ Microbiol*, **76**(4), 1251-60.
- White, J.S., Yohannan, B.K., Walker, G.M. 2008. Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol. *FEMS Yeast Res*, **8**(7), 1175-84.
- Wright, J., Bellissimi, E., de Hulster, E., Wagner, A., Pronk, J.T., van Maris, A.J. 2011. Batch and continuous culture-based selection strategies for acetic acid tolerance in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, **11**(3), 299-306.
- Xu, J., Cheng, J.J. 2011. Pretreatment of switchgrass for sugar production with the combination of sodium hydroxide and lime. *Bioresour Technol*, **102**(4), 3861-8.
- Yanase, S., Hasunuma, T., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A. 2010a. Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol*, **88**(1), 381-8.
- Yanase, S., Yamada, R., Kaneko, S., Noda, H., Hasunuma, T., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A. 2010b. Ethanol production from cellulosic materials using cellulase-expressing yeast. *Biotechnol J*, **5**(5), 449-55.
- Yu, Z., Jameel, H., Chang, H.M., Park, S. 2011. The effect of delignification of forest biomass on enzymatic hydrolysis. *Bioresour Technol*, **102**(19), 9083-9.
- Zhang, J., Bao, J. 2012. A modified method for calculating practical ethanol yield at high lignocellulosic solids content and high ethanol titer. *Bioresour Technol*, **116**, 74-9.
- Zhang, J., Chu, D., Huang, J., Yu, Z., Dai, G., Bao, J. 2010a. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnol Bioeng*, **105**(4), 718-28.
- Zhang, J., Tang, M., Viikari, L. 2012. Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases. *Bioresour Technol*, **121**, 8-12.
- Zhang, J., Viikari, L. 2012. Xylo-oligosaccharides are competitive inhibitors of cellobiohydrolase I from *Thermoascus aurantiacus*. *Bioresour Technol*, **117**, 286-91.
- Zhang, J., Yuan, H., Wen, T., Xu, F., Di, Y., Huo, K., Li, Y.Y. 2003. Cloning of the KcURA3 gene and development of a transformation system for *Kluyveromyces cicerisporus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **62**(4), 387-91.

- Zhang, M., Su, R., Qi, W., He, Z. 2010b. Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulose by optimizing enzyme complexes. *Appl Biochem Biotechnol*, **160**(5), 1407-14.
- Zhao, X., Cheng, K., Liu, D. 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl Microbiol Biotechnol*, **82**(5), 815-27.
- Zhou, H., Cheng, J.S., Wang, B.L., Fink, G.R., Stephanopoulos, G. 2012. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, **14**(6), 611-22.