



Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular

Programa de pós-graduação em Biologia Microbiana

**CONSÓRCIOS DE ENZIMAS MICROBIANAS APLICADOS À HIDRÓLISE
DE BIOMASSA E SILAGEM**

ANDREZA DE MELLO LOPES

Brasília – DF, abril de 2019



Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular

Programa de pós-graduação em Biologia Microbiana

**CONSÓRCIOS DE ENZIMAS MICROBIANAS APLICADOS À HIDRÓLISE
DE BIOMASSA E SILAGEM**

ANDREZA DE MELLO LOPES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Microbiana do Departamento de Biologia Celular
da Universidade de Brasília como pré-requisito para a
obtenção do título de Doutora em Biologia Microbiana.

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Co-orientadora: Prof. Dra. Leonora Rios de Souza Moreira

Laboratório de Enzimologia

Brasília – DF, abril de 2019

**CONSÓRCIOS DE ENZIMAS MICROBIANAS APLICADOS À HIDRÓLISE
DE BIOMASSA E SILAGEM**

ANDREZA DE MELLO LOPES

Banca Examinadora

Profa. Dra. Janice Lisboa de Marco

Prof. Dr. Felix Gonçalves Siqueira

Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca

Dr. Caio Gorgulho de Oliveira Silva

Brasília – DF, abril de 2019

Metade de mim
Agora é assim
De um lado a poesia, o verbo, a saudade
Do outro a luta, a força e a coragem pra chegar no fim
E o fim é belo e incerto...
depende de como você vê
O novo, o credo, a fé que você deposita em você
e só.
“O Teatro Mágico”

AGRADECIMENTOS

A Deus e a graça dos dons do Espírito Santo, principalmente pelo dom da fortaleza e de temor a Deus. Agradeço por me carregar nos braços nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao Prof. Dr. Edivaldo Ferreira Ximenes Filho e a Dra. Leonora Rios de Souza Moreira por terem me orientado e como orientadores me incentivaram, me cobraram, para o bem da minha formação acadêmica. Agradeço a vocês pelos ensinamentos, paciência e vastas correções.

Agradeço aos meus pais Antonio Carlos e Aparecida, por todo o carinho e mesmo não entendendo o que eu faço me apoiam.

Ao meu marido, meu príncipe lindo e forte; Artur, pela constante presença, valiosas sugestões e por todo o suporte emocional.

Ao meu irmão, Eduardo.

A minha família e amigos que sempre torceram pelo meu sucesso e que estarão para sempre comigo.

Ao melhor amigo João Pedro, por fazer do meu sonho, o seu sonho.

Agradeço as melhores madrinhas que alguém pode ter: Taís, Dani, Miriane, Analiane, Raianne, Bruna e Thalízia.

Sou eternamente grata aos meus professores do colégio, da graduação e da pós-graduação, que tanto me incentivaram, que acreditaram no meu potencial e acompanham a minha jornada até hoje.

Ao laboratório de enzimologia pelas valiosas e calorosas discussões para melhorar este trabalho, pelas risadas, fofocas e tardes de gordices.

Aos colegas que nunca me deixaram almoçar sozinha. Obrigada pela companhia e pela paciência de me esperar terminar de almoçar enquanto eu saía do corpo.

Agradeço os colegas que fiz durante o doutorado, Babi, Guilherme Recalde, Pedro Fontes, Alisson, Elenilde, Sadia, Jéssica, Alonso, Gabriel e em especial ao Helder por me ensinar a usar protetor solar e a levar a vida de jeito sério e brincalhão, por me trancar na câmara fria e esconder minha garrafinha de água. A Diandra por não brigar comigo quando eu ocupava a sua banca, apenas levantava a sobrancelha, pela minha rosa do deserto que ela cuida muito bem na casa dela. A Raíssa que me faz ter certeza de que não sou surda e por sempre sempre sempre me ajudar, quando eu crescer quero ser igual a ela, menos no tom de voz e na dislexia ao digitar. A Carol (peixe da sabedoria) pelo meu lixinho, por sanar minhas dúvidas de estatística e por “deixar” eu

implicar com ela. A Ton pelo Aladin, por sanar as dúvidas de inglês e mesmo quando não me conhecia me ajudou muito. Ao Caio por seu jeito simples e correto de levar a vida, mas que quase estragou meu aniversário surpresa. Ao Guilherme pelas palavras de motivação super realistas. A Fran por ser a pessoa mais doce do mundo e que consegue transmitir isso as pessoas.

Às técnicas do Laboratório de Enzimologia, Marísia e Margarete, pela ajuda diária e amizade.

Ao professor Prof. Dr. Clayton Quirino Mendes (Cirilo) por sonhar e realizar todas as condições necessárias para a execução do capítulo 4 e aos seus alunos por auxiliarem na montagem e abertura dos silos.

Ao professor Prof. Dr. João José da Silva Júnior e seu aluno Luiz Fernando Vidal Gusmão pelo experimento de estabilidade aeróbica da silagem.

A Ingrid por viabilizar e auxiliar nas micrografias obtidas por Microscópio Eletrônica de Varredura.

Ao Jacson e Nuno pelo acesso ao laboratório de bioquímica, permitindo o uso do moinho, liofilizador e sonicador.

Ao professor Prof. Dr. Thomas Christopher, por disponibilizar e auxiliar no uso do HPLC e por ter participado da minha banca de qualificação.

Ao NUPITEC pela parceira no desenvolvimento da patente que surgiu a partir dos resultados deste trabalho, em especial a Sarah Sampaio Py-Daniel.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPG Bio-micro), e à Universidade de Brasília, pela estrutura e pelos recursos financeiros.

APOIO FINANCEIRO

Esta pesquisa foi desenvolvida com o apoio financeiro da CAPES por meio de concessão de bolsa de estudos e pelos projetos de pesquisa: Rede Centro Oeste/CNPq/FAPDF, Universal/CNPq, Pronex/FAPDF, INCT do Bioetanol/CNPq

SUMÁRIO

Tabelas.....	XI
Figuras.....	XII
Lista de abreviaturas.....	XVI
Resumo.....	XVII
Abstract.....	XVIII

CAPÍTULO I

1 Introdução.....	19
2 Objetivos.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
2 Referências bibliográficas.....	23
3 Revisão de literatura - <i>An update on enzymatic cocktails for lignocellulose Breakdown</i>	25

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS PARA O ESTABELECIMENTO DE CONSÓRCIOS ENZIMÁTICOS PARA HIDRÓLISE DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

1 Introdução.....	40
2 Objetivos.....	42
2.1 Objetivo geral.....	42
2.2. Objetivos específicos.....	42
3 Material e métodos.....	43
3.1 Resíduos lignocelulósicos.....	44
3.2 Manutenção e cultivo dos micro-organismos.....	44
3.3 Fermentação submersa.....	45
3.4 Ensaio enzimáticos.....	46
3.4.1 Determinação das atividades de CMCase, xilanase, pectinase e mananase.....	46
3.4.2. Determinação da atividade de avicelase.....	46
3.4.3. Determinação da atividade de FPase.....	46

3.4.4. Determinação das atividades de β -xilosidase, β -glicosidase, β - manosidase e α -arabinofuranosidase.....	47
3.5. Dosagem de glicose.....	47
3.6. Dosagem de proteína.....	48
3.7. Efeito da temperatura e pH.....	48
3.8. Determinação da Termoestabilidade.....	48
3.9. Hidrólise enzimática.....	48
3.10. Determinação da carga de proteína para hidrólise enzimática.....	49
3.11. Planejamento de mistura para hidrólise enzimática.....	49
3.12. Efeito dos compostos fenólicos.....	50
3.13. Efeito de íons metálicos e EDTA.....	50
3.14. Verificação do efeito de sinergismo.....	51
3.15. Hidrólise enzimática em diversos substratos com consórcios enzimáticos e extratos brutos.....	51
3.16. Caracterização dos substratos lignocelulósicos.....	51
3.16.1. Análise bromatológica.....	51
3.16.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	52
3.17. Análise estatística.....	52
4 Resultados e discussões.....	53
4.1. <i>Screening</i> dos extratos brutos enzimáticos.....	53
4.2. Estudos dos efeitos do pH, temperatura e termoestabilidade na atividade enzimática dos extratos brutos.....	59
4.3. Determinação da carga de proteínas.....	66
4.4. Planejamento do consórcio enzimático.....	68
4.5. Novas combinações enzimáticas.....	72
4.6. Termoestabilidade dos consórcios e extratos brutos.....	75
4.7. Efeito dos compostos fenólicos.....	77
4.8. Efeito de íons e EDTA.....	85
4.9. Estudos de sinergismo dos consórcios e extratos brutos.....	91
4.10. Aplicação dos consórcios e extratos brutos na hidrólise de biomassas lignocelulósicas.....	93
4.11. Caracterização dos substratos lignocelulósicos.....	101
5 Conclusão.....	107

6 Referências bibliográficas.....	108
-----------------------------------	-----

CAPÍTULO III

SUPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DO CONSÓRCIO ENZIMÁTICO PARA HIDRÓLISE DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

1 Introdução.....	116
2 Objetivos.....	118
2.1 Objetivos gerais.....	118
2.2. Objetivos específicos.....	118
3 Material e métodos.....	119
3.1 Semi purificação de β -glicosidase para suplementação do consórcio enzimático.....	119
3.2. Validação da hidrólise enzimática em micro-escala.....	120
3.3. Suplementação do consórcio 4 com adição de surfactante – tween 80...120	
3.4. Suplementação do consórcio 4 com expansina.....	121
3.5. Suplementação do consórcio 4 com lacase.....	121
3.6. Suplementação concomitante do consórcio 4 com tween 80 e lacase.....	122
3.7. Suplementação do consórcio 4 com triptofano.....	122
3.8. Suplementação do consórcio com tween, lacase e expansina.....	123
3.9. Suplementação do consórcio 4LT com coquetéis comerciais.....	123
3.10. Comparação dos consórcios com os coquetéis comerciais.....	123
3.11. Microscopia eletrônica de varredura.....	124
3.12. Análise por HPLC das amostras de hidrólise.....	124
3.13. Análise estatística.....	124
4 Resultados e discussões.....	125
4.1. Semi-purificação de β -glicosidase para suplementação do consórcio enzimático.....	125
4.2 Validação da hidrólise enzimática em microescala.....	128
4.3. Suplementação do consórcio com adição de surfactante – tween 80.....	130
4.4. Suplementação do consórcio com expansina.....	133
4.5. Suplementação do consórcio com lacase.....	138
4.6. Suplementação do consórcio com lacase e tween.....	142

4.7. Suplementação do consórcio 4 LT com triptofano.....	143
4.8. Suplementação do consórcio 4 LT com expansina.....	145
4.9. Combinação do consórcio 4 LT com coquetéis comerciais.....	147
4.10. Comparação do consórcio com coquetéis comerciais.....	149
4.11 Avaliação das hidrólises por MEV.....	152
4.12 Análise dos carboidratos das biomassas hidrolisadas via HPLC.....	161
5 Conclusão.....	165
6 Referências bibliográficas.....	166

CAPÍTULO IV

EFEITO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS NA QUALIDADE DA SILAGEM DE MILHO

1 Introdução.....	171
2 Objetivos.....	173
2.1 Objetivos gerais.....	173
2.2. Objetivos específicos.....	173
3 Material e métodos.....	174
3.1 Matéria-prima.....	174
3.2. Inoculantes fibrolíticos.....	174
3.3. Ensilagem.....	174
3.4. Coleta, processamento e análises laboratoriais.....	175
4 Resultados e discussões.....	177
5 Conclusão.....	186
6 Referências bibliográficas.....	187

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	192
---------------------------	-----

PERSPECTIVAS.....	193
-------------------	-----

TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 2.1. Composição do meio mínimo.....	45
Tabela 2.2. Planejamento de misturas para a hidrólise enzimática.....	49
Tabela 2.3. Planejamento de misturas para a segunda rodada de hidrólise enzimática.....	50
Tabela 2.4. Atividades específica (UI/mg) dos extratos brutos.....	55
Tabela 2.5. Atividade específica (UI/mg) dos extratos brutos e quantificação de proteínas bradford.....	57
Tabela 2.6. Caracterização físico-química das atividades de CMCCase e xilanase presentes nos extratos brutos avaliados.....	60
Tabela 2.7 Termoestabilidade dos extratos brutos com relação a atividade de CMCCase.....	61
Tabela 2.8. Efeito dos compostos fenólicos na atividade de CMCCase dos extratos brutos e consórcios enzimáticos.....	79
Tabela 2.9. Efeito dos compostos fenólicos na atividade de xilanase dos extratos brutos e consórcios enzimáticos.....	80
Tabela 2.10. Efeito dos compostos fenólicos na atividade de pectinase dos extratos brutos e consórcios enzimáticos.....	81
Tabela 2.11. Efeito dos compostos fenólicos na atividade de mananase dos extratos brutos e consórcios enzimáticos.....	82
Tabela 2.12. Análise bromatológica das biomassas (%)......	102

CAPÍTULO III

Tabela 3.1. Detalhamento dos experimentos.....	119
---	------------

CAPÍTULO IV

Tabela 4.1. Teor de matéria seca e composição bromatológica (% na MS) da silagem de milho tratada com enzima fibrolítica exógena.....	180
--	------------

FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 2.1. Desenho experimental da metodologia utilizada para determinação dos consórcios enzimáticos.....	43
Figura 2.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática dos extratos brutos.....	63
Figura 2.3. Efeito do pH na atividade dos extratos brutos.....	64
Figura 2.4 Termoestabilidade da atividade de CMC _{Case} dos extratos brutos.....	65
Figura 2.5. Liberação de açúcares redutores totais em função das diferentes cargas de proteínas usadas durante hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar com os extratos brutos.....	67
Figura 2.6 Liberação de açúcares redutores totais (A) e glicose (B) dos consórcios enzimáticos durante a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.....	70
Figura 2.7. Superfície de resposta do planejamento de misturas simplex referente ao resultado da hidrólise enzimática em bagaço de cana-de-açúcar em 48 horas.....	71
Figura 2.8. Pontos propostos para a segunda rodada de hidrólise para definição dos melhores consórcios enzimáticos.....	73
Figura 2.9. Segunda rodada de hidrólise enzimática em bagaço de cana-de-açúcar. A: liberação de açúcares redutores totais e B: liberação de glicose.....	74
Figura 2.10. Termoestabilidade a 50°C dos extratos brutos e consórcios enzimáticos.....	76
Figura 2.11. Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade de CMC _{Case} dos extratos brutos e consórcios enzimáticos.....	87
Figura 2.12. Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade de xilanase dos extratos brutos e consórcios enzimáticos.....	88
Figura 2.13. Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade de pectinase dos extratos brutos e consórcios enzimáticos.....	89
Figura 2.14. Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade de mananase dos extratos brutos e consórcios enzimáticos.....	90
Figura 2.15. Avaliação do sinergismo em termos de liberação de glicose (esquerda) e açúcares redutores totais (direita).....	92
Figura 2.16. Hidrólise em casca de soja.....	95
Figura 2.17 Hidrólise em Palha de cana.....	96

Figura 2.18. Hidrólise em Palha de milho.....	98
Figura 2.19. Hidrólise em LCC.....	100
Figura 2.20. Degradação do LCC após as 72h de hidrólise.....	101
Figura 2.21. Caracterização da biomassa quanto a composição de açúcares estruturais por cromatografia líquida de alta eficiência.....	103
Figura 2.22. A e B - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de bagaço de cana. C - cromatograma de bagaço de cana-de-açúcar.....	104
Figura 2.23. A e B - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de casca de soja. C - cromatograma de casca de soja.....	104
Figura 2.24. A e B - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de Palha de milho. C - cromatograma de palha de milho.....	105
Figura 2.25. A e B - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de palha de cana-de-açúcar. C - cromatograma de palha de cana-de-açúcar.....	105

CAPÍTULO III

Figura 3.1. Perfil cromatográfico da semi-purificação do extrato bruto de <i>H. grisea</i> cultivado em bagaço de cana-de-açúcar aplicado na coluna de exclusão molecular S-100.....	126
Figura 3.2. Hidrólise enzimática de bagaço de cana de açúcar na presença do consórcio 4 suplementando com 1 CBU de β -glicosidase.....	127
Figura 4.3. Liberação de açúcares redutores totais na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar realizado em duas escalas.....	129
Figura 3.4. Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar com o consórcio 4 suplementando com tween 80.....	131
Figura 3.5. Incubação por 24 h do extrato de expansina em diferentes dosagens com papel whatman nº1.....	134
Figura 3.6. Ensaio de FPase após incubação do extrato de expansina com papel <i>whatman</i> nº1.....	134
Figura 3.7. Teste de dosagens de expansina na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.....	135
Figura 3.8. Hidrólise em bagaço de cana de açúcar com o consórcio suplementado com expansina.....	136

Figura 3.9. Efeito da adição de lacase no consórcio 4 na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.....	139
Figura 3.10. Hidrólise em bagaço de cana-de-açúcar com a adição de lacase ao consórcio 4.....	141
Figura 3.11. Hidrólise em bagaço de cana-de-açúcar com a adição de lacase e tween ao consórcio 4.....	143
Figura 3.12. Hidrólise em bagaço de cana-de-açúcar com a adição de triptofano a ao consórcio 4 LT.....	144
Figura 3.13. Hidrólise enzimática em bagaço de cana-de-açúcar com o consórcio 4 LT com suplementação de expansina.....	146
Figura 3.14. Hidrólise enzimática em bagaço de cana com suplementação de coquetéis comerciais	148
Figura 3.15. Hidrólise enzimática em bagaço de cana-de-açúcar.....	150
Figura 3.16. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado apenas com tampão – sem adição de enzimas – controle.....	153
Figura 3.17. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado apenas com lacase.....	153
Figura 3.18. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado apenas com expansina.....	154
Figura 3.19. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado apenas com lacase e tween.....	154
Figura 3.20. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o consórcio 4.....	156
Figura 3.21. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o consórcio 4 suplementado com expansina (simultaneamente).....	157
Figura 3.22. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o consórcio 4 suplementado com lacase e tween.....	158
Figura 3.23. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o coquetel comercial cellic ctec2.....	159

Figura 3.24. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o coquetel comercial celluclast.....	160
Figura 3.25. Monossacarídeos e oligossacarídeos e respectivo cromatograma da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o consórcio 4.....	162
Figura 3.26. Monossacarídeos e oligossacarídeos e respectivo cromatograma da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o consórcio 4 suplementado com expansina (simultaneamente)	162
Figura 3.27. Monossacarídeos e oligossacarídeos e respectivo cromatograma da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o consórcio 4 LT.....	162
Figura 3.28. Monossacarídeos e oligossacarídeos e respectivo cromatograma da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o coquetel comercial cellic ctec2.....	163
Figura 3.29. Monossacarídeos e oligossacarídeos e respectivo cromatograma da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o coquetel comercial celluclast.....	163

CAPÍTULO IV

Figura 4.1. Mini silos armazenados.....	175
Figura 4.2. Peso médio dos mini silos logo após a ensilagem.....	177
Figura 4.3. Valor do pH da silagem no momento da abertura dos mini silos.....	178
Figura 4.4. Contagem de bactérias ácido lácticas na silagem de milho.....	182
Figura 4.5. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do milho <i>in natura</i> triturado (não ensilado).....	184
Figura 4.6. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura da silagem de milho do tratamento controle.....	184
Figura 4.7. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura da silagem de milho tratada com o Coquetel 1x.....	184
Figura 4.8. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura da silagem de milho tratada com Cellic® CTec2 1x.....	185
Figura 4.9. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura da silagem de milho tratada com Cellic® CTec2 50x.....	185
Figura 4.10. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura da silagem de milho tratada com Celluclast® 1x.....	185

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS: 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)	HPLC: cromatografia líquida de alta performance
AN: <i>Acrophiphora nainiana</i>	kDa: quilodalton
AO: <i>Aspergillus tamari</i>	LCC: lignin carbohydrate complex
ART: açúcares redutores totais	LHW: liquid hot water
AT: <i>Aspergillus terreus</i>	LPMO: monooxigenases líticas de polissacarídeos
BSA: Albumina sérica bovina	MEV: microscopia eletrônica de varredura
BC: bagaço de cana-de-açúcar	MS: matéria seca
CBM: módulo de ligação ao carboidrato	°C: grau Celsius
CBU: unidade de celobiose	PC: palha de cana
Consórcio 4 ELT: consórcio 4 suplementado com expansina, tween e lacase	PEG: Polietileno glicol
Consórcio 4 LT: consórcio 4 suplementado com tween e lacase consórcio 4: 45% de CSTR + 10 % PCAT + 45% BCAT	pH: potencial hidrogeniônico
CS: casca de soja	PM: palha de milho
DEC: Dietileno glicol	pNPA: ρ -nitrofenil- α -arabinopiranosídeo
DNS: ácido 3,5-dinitro-salicílico	pNPG: ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo
DP: Desvio padrão	pNPM: ρ -nitrofenil- β -D-manopiranosídeo
EDTA: ácido etilenodiamino tetraacético	pNPX: ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo
FPU: Unidade de Papel de Filtro	TEG: Trietileno glicol
	TR: <i>Trichoderma reesei</i>
	UI: Unidade Internacional
	v/v: volume por volume

RESUMO

A aplicação de enzimas como biocatalizadores industriais oferecem inúmeras vantagens sobre os processos químicos tradicionais, principalmente no que diz respeito à sustentabilidade e eficiência do processo. A aplicação de enzimas tem impulsionado diversos setores industriais. Há um foco crescente no uso de enzimas para a conversão de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis e químicos diversos, além da aplicação para a alimentação animal. Em ambas aplicações, as enzimas produzidas por fungos filamentosos apresentam vantagens e os resíduos agroindustriais representam uma importante fonte de carbono alternativa para a produção de enzimas. Assim, o desenvolvimento de coquetéis envolvendo diferentes enzimas com proporções ótimas tornam promissoras as reações de hidrólise enzimática em processos industriais e agropecuários. O objetivo deste trabalho foi utilizar biomassa lignocelulósica para produção de enzimas holocelulolíticas de fungos filamentosos, para a produção e otimização de um consórcio enzimático que atuasse de forma eficiente na hidrólise da biomassa lignocelulósica e como aditivo fibrolítico exógeno a silagem de milho. No total foram produzidos 16 extratos brutos que foram avaliados por ensaios de atividade enzimática, efeito de pH, temperatura, termoestabilidade. Os extratos de *Trichoderma reesei* cultivado em Casca de Soja (CSTR), *Aspergillus terreus* em Bagaço de cana (BCAT) e *Aspergillus terreus* em Palha de cana (PCAT) foram os selecionados para a confecção de consórcios enzimáticos. Para isso, adotou-se um planejamento de misturas simplex. As misturas enzimáticas otimizadas 1 (33% de cada extrato bruto), 4 (45% de CSTR, 45% de BCAT e 10% de PCAT) e 6 (75% PCAT, 35% CSTR e 5% de BCAT) foram avaliadas na hidrólise de casca de soja, palha de cana, palha de milho e LCC, além de parâmetros físico-químicos de termoestabilidade, efeitos de íons e compostos fenólicos. O consórcio 4 foi aplicado como aditivo fibrolítico exógeno na silagem de milho. Afim de aprimorar o consórcio 4 na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente, esse foi suplementando com a adição de enzimas, proteínas não hidrolíticas (β -glicosidase, lacase e expansina) e aditivos (surfactante e triptofano). A combinação consórcio 4 com tween e lacase apresentou uma liberação de açúcares redutores totais e glicose 123 e 136 %, respectivamente, superior a liberada pelo coquetel comercial Celluclast, sob as mesmas condições de operação com 48 horas de hidrólise.

Palavras-chave: biomassa lignocelulósica, fungos filamentosos, coquetéis enzimáticos

ABSTRACT

The application of enzymes as industrial biocatalysts offer numerous advantages over traditional chemical processes, especially with respect to the sustainability and efficiency of the process. The application of enzymes has boosted several industrial sectors. There is a growing focus on the use of enzymes for the conversion of lignocellulosic biomass to biofuels and various chemicals, as well as the application for animal feed. In both applications, the enzymes produced by filamentous fungi have advantages and the agroindustrial residues represent an important alternative carbon source for the production of enzymes. Thus, the development of cocktails involving different enzymes with optimal proportions promises the reactions of enzymatic hydrolysis in industrial and agricultural processes. The objective of this work was to use lignocellulosic biomass for the production of holocellulolytic enzymes of filamentous fungi for the production and optimization of an enzymatic consortium that acted efficiently in the hydrolysis of lignocellulosic biomass and as an exogenous fibrolytic additive to corn silage. In total, 16 crude extracts were produced, which were evaluated by enzyme activity assays, pH, temperature and thermostability. The extracts of *Trichoderma reesei* cultivated in soybean hull (CSTR), *Aspergillus terreus* in sugarcane bagasse (BCAT) and *Aspergillus terreus* in sugarcane straw (PCAT) were selected for the preparation of enzyme consortia. For this, a planning of simplex mixtures was adopted. Optimized enzyme mixtures 1 (33% of each crude extract), 4 (45% CSTR, 45% BCAT and 10% PCAT) and 6 (75% PCAT, 35% CSTR and 5% BCAT) were evaluated in the hydrolysis of soybean hulls, sugarcane straw, corn straw and LCC, as well as physical-chemical parameters of thermostability, ion effects and phenolic compounds. Consortium 4 was applied as an exogenous fibrolytic additive in corn silage. In order to improve the consortium 4 in the enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse, this was supplemented with the addition of enzymes, non-hydrolytic proteins (β -glucosidase, laccase and expansin) and additives (surfactant and tryptophan). The combination consortium 4 with tween and laccase showed a liberation of total reducing sugars and glucose 123 and 136%, respectively, higher than that released by the commercial Cocktail Celluclast under the same operating conditions with 48 hours of hydrolysis.

Keywords: lignocellulosic biomass, filamentous fungi, enzymatic cocktails

1. INTRODUÇÃO

As enzimas como biocatalizadores industriais oferecem inúmeras vantagens sobre os processos químicos tradicionais no que diz respeito à sustentabilidade e eficiência do processo (Chapman, Ismail e Dinu, 2018). A demanda de enzimas foi impulsionada pelas indústrias farmacêuticas, bebidas, têxteis, detergente, cosméticos, entre outros. Há um foco da aplicação de enzimas para produção de biocombustíveis e químicos diversos, além da aplicação para a alimentação animal (Sarrouh *et al.*, 2014).

No segmento dos biocombustíveis, o impulso se deu a partir do aumento do preço do petróleo e os efeitos negativos dos combustíveis fósseis nas mudanças climáticas, impulsionando o uso da biomassa vegetal como fonte energética renovável (Jung *et al.*, 2015). Dentro do contexto acima descrito, as biorrefinarias são plantas industriais adequadas para produzir uma variedade de produtos, tais como biocombustíveis e químicos de base a partir de insumos residuais agrícolas (Kamm e Kamm, 2004).

Neste contexto de fontes alternativas de energia, os resíduos lignocelulósicos são destaque, por serem uma das matérias-primas mais abundantes do planeta. O Brasil produz inúmeros resíduos agrícolas que podem ser aplicados para o desenvolvimento de produtos pautados em uma economia verde e sustentável. Os resíduos agrícolas predominantemente gerados estão relacionados com os principais produtos agrícolas do Brasil, tais como café, soja, mandioca, milho e cana-de-açúcar (CONAB, 2018).

Para que a parede celular da planta possa ser utilizada, a biomassa deve ser decomposta em seus monômeros constituintes. Na natureza, a parede celular vegetal é tipicamente degradada por um consórcio de micro-organismos, incluindo bactérias e fungos, que produzem uma ampla gama de proteínas, incluindo enzimas. Nas biorrefinarias a conversão pode ser feita por rota química ou biológica, sendo mais vantajosa quando realizada por enzimas (rota biológica), pois é um processo eficaz e ecologicamente correto, que utiliza condições mais brandas, acarretando, assim, uma

diminuição da formação de subprodutos poluentes e de compostos inibitórios (Gomes *et al.*, 2017; Chundawat *et al.*, 2011). Dentre os micro-organismos os fungos filamentosos são os produtores mais potentes de enzimas, e apresentam atividades necessárias para desmontar a estrutura complexa da parede celular vegetal (Peciulyte *et al.*, 2017).

Uma grande variedade de enzimas com diferentes especificidades é necessária para degradar a lignocelulose, devido à complexa organização e interação dos polissacarídeos, juntamente com a lignina na parede celular da planta. Isso torna a parede celular uma estrutura recalcitrante. Sendo assim, para a sua efetiva degradação, é necessário que, tanto as enzimas principais quanto as enzimas acessórias trabalhem de forma coordenada e sinérgica (Gomes *et al.*, 2017, Van Dyk e Pletschke, 2012).

A formação de coquetéis holocelulolíticos é uma das alternativas para melhorar a eficiência da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica. Dessa forma, a montagem racional de coquetéis com elevada conversão pode impactar na redução dos custos do processo de hidrólise, uma vez que quantidades mínimas de enzimas seriam adicionadas à reação de hidrólise e, eventualmente, levariam a misturas enzimáticas mais eficientes (Bussamra, Freitas e Costa, 2015).

Outra aplicação de enzimas holocelulolíticas, é no ramo da agropecuária para a preservação de alimento volumoso na forma de silagem, para a alimentação animal, neste caso, conhecida como enzimas fibrolíticas, aplicadas como aditivo exógeno. Nesse ramo, as enzimas produzidas por fungos também apresentam vantagens, ao apresentar rápido crescimento em meio de cultivo e alta produção enzimática (Lara, 2013).

A silagem é uma técnica tradicional de conservação de forragens, preservando o valor nutritivo da planta para posterior utilização em períodos de escassez de alimento. Dentre as alternativas de conservação, a ensilagem é a mais utilizada em nosso país (Neto, 2012). Para confecção de silagem pode-se utilizar grande variedade de gramíneas e leguminosas. A planta do milho é uma das forrageiras mais utilizadas para a produção de silagem, devido ao seu potencial nutricional e perfil de fermentação desejável (Figueiredo *et al.*, 2018).

A adição de enzimas fibrolíticas nas dietas de ruminantes tem como objetivo aumentar a digestibilidade da fração fibrosa dos alimentos. Enzimas como xilanases e

celulases aumentam a degradação da hemicelulose e celulose da forragem, respectivamente, proporcionando maior liberação de energia e melhor aproveitamento pelo animal (Muck *et al.*, 2018). (Salem *et al.*, 2015) relataram que as enzimas fibrolíticas melhoraram a degradação da fibra no rúmen, ao atuarem sinergicamente com a microflora ruminal, aumentando assim sua capacidade hidrolítica no rúmen.

Assim, estratégias para melhorar os rendimentos da hidrólise de biomassa lignocelulósica e melhorar a qualidade da silagem estão pautadas no desenvolvimento de combinações enzimáticas que incluem diferentes atividades, proporcionando uma conversão mais eficiente do que a aplicação individual destas enzimas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e otimizar um consórcio enzimático microbiano que atuasse de forma eficiente na hidrólise de biomassa lignocelulósica e como aditivo fibrolítico exógeno a silagem.

2.2 Objetivo específico

- Selecionar diferentes substratos para atuasse como fonte de carbono para a produção de consórcio enzimático, a partir de diferentes espécies fúngicas.
- Otimizar o consórcio 4 (0,45 CSTR: 0,1 PCAT: 0,45 BCAT) com proteínas acessórias, surfactantes e aditivos químicos para a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.
- Avaliar os efeitos da aplicação de coquetéis contendo enzimas fibrolíticas exógenas sobre a qualidade da silagem de milho.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; COSTA, A. C. DA. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 173–181, 2015.
- CHAPMAN, J.; ISMAIL, A.; DINU, C. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. **Catalysts**, v. 8, n. 238, p. 1–26, 2018.
- CHUNDAWAT, S. P. S.; BECKHAM, G. T.; HIMMEL, M. E.; DALE, B. E. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. **Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.**, v. 2, p. 121–45, 2011.
- CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira. 2018.
- DYK, J. S. VAN; PLETSCHEKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458–1480, 2012.
- FIGUEIREDO, R. R.; PAULA, A.; SOUZA, S.; MADEIRA, A.; FRANÇA, S.; FERREIRA, I. C.; GUIMARÃES, E. C. Composição química da silagem de milho com aditivos. **PUBVET**, v. 12, n. 9, p. 1–6, 2018.
- GOMES, H. A. DA R.; SILVA, A. J. DA; GOMEZ-MENDOZA, D. P.; JUNIOR, A. C. M. DOS S.; COLOGNA, N. DE M. DI; ALMEIDA, R. M.; MILLER, R. N. G.; FONTES, W.; SOUSA, M. V. DE; RICART, C. A. O.; FILHO, E. X. F. Identification of multienzymatic complexes in the *Clonostachys byssicola* secretomes produced in response to different lignocellulosic carbon sources. **Journal of Biotechnology**, v. 254, p. 51–58, 2017.
- JUNG, Y. R.; PARK, J. M.; HEO, S.-Y. Y.; HONG, W.-K. K.; LEE, S.-M. M.; OH, B.-R. R.; PARK, S.-M. M.; SEO, J.-W. W.; KIM, C. H. Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. **Renewable Energy**, v. 76, p. 66–71, 2015.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v. 64, p. 137–145, 2004.

LARA, E. C. Produção e avaliação de enzimas fibrolíticas exógenas na silagem de milho. **Dissertação de Mestrado, Unesp**, p. 73, 2013.

MUCK, R. E.; NADEAU, E. M. G.; MCALLISTER, T. A.; SANTOS, M. C.; JR, L. K. Silage review : Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science Vol.**, v. 101, n. 5, p. 3980–4000, 2018.

NETO, A. DE S. Caracterização microbiológica, parâmetros fermentativos e estabilidade aeróbia em silagens de forragens tropicais com aditivos microbianos Adir de Sá Neto Piracicaba Adir de Sá Neto. **Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “ Luiz de Queiroz ”**, 2012.

PECIULYTE, A.; PISANO, M.; VRIES, R. P. DE; OLSSON, L. Hydrolytic potential of five fungal supernatants to enhance a commercial enzyme cocktail. **Biotechnology Letters**, p. 1–9, 2017.

SALEM, A. Z. M.; BUENDÍA-RODRÍGUEZ, G.; ELGHANDOUR, M. M. M.; MARIEZCURRENA, M. A.; JIMÉNEZ, F. J. P.; PLIEGO, A. B.; CHAGOYÁN, J. C. V; CERRILLO, M. A.; RODRÍGUEZ, M. A. Effects of cellulase and xylanase enzymes mixed with increasing doses of *Salix babylonica* extract on in vitro rumen gas production kinetics of a mixture of corn silage with concentrate. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 1, p. 131–139, 2015.

SARROUH, B.; SANTOS, T. M.; MIYOSHI, A.; DIAS, R.; AZEVEDO, V. Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. S4, n. 002, p. 1–10, 2014.

3. REVISÃO DE LITERATURA

AN UPDATE ON ENZYMATIC COCKTAILS FOR LIGNOCELLULOSE BREAKDOWN

Artigo de revisão publicado na revista *Journal of Applied Microbiology* 125, 632-645, 2018.

Esta revisão apresenta uma visão geral de coquetéis enzimáticos necessários para hidrólise de biomassa lignocelulósica, os últimos avanços relacionados, os principais resultados e as perspectivas futuras. Devido à heterogeneidade e complexidade da biomassa lignocelulósica, sua clivagem é efetuada por meio de múltiplas enzimas que convertem os carboidratos em açúcares monoméricos. Os altos custos das enzimas comerciais e a alta carga enzimática necessária para a hidrólise da biomassa motivam a busca por novas formulações enzimáticas que apresentem melhor rendimento de hidrólise do substrato.

REVIEW ARTICLE

An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown

A.M. Lopes, E.X. Ferreira Filho and L.R.S. Moreira 

Laboratory of Enzymology, Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

Keywords

biomass, enzymatic cocktail, enzymatic hydrolysis, lignocellulosic biomass, optimized cocktail.

Correspondence

Leonora Rios de Souza Moreira, Laboratory of Enzymology, Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil.

E-mail: leonorasm@gmail.com

2017/2417: received 9 December 2017,
revised 20 March 2018 and accepted 14 May 2018

doi:10.1111/jam.13923

Abstract

Alternative energy sources have received increasing attention in recent years. The possibility of adding value to agricultural wastes, by producing biofuels and other products with economic value from lignocellulosic biomass by enzymatic hydrolysis, has been widely explored. Lignocellulosic biomass, as well as being an abundant residue, is a complex recalcitrant structure that requires a consortium of enzymes for its complete degradation. Pools of enzymes with different specificities acting together usually produce an increase in hydrolysis yield. Enzymatic cocktails have been widely studied due to their potential industrial application for the bioconversion of lignocellulosic biomass. This review presents an overview of enzymes required to degrade the plant cell wall, paying particular attention to the latest advances in enzymatic cocktail production and the main results obtained with cocktails used to degrade a variety of types of biomass, as well as some future perspectives within this field.

Introduction

The utilization of enzymes in a variety of processes is long established. In ancient Greece, enzymes were used in baking, brewing, and alcohol and cheese making (Sarrouh *et al.* 2012). Currently, with the advent of enzymatic purification and other techniques, enzymes are also being used in a broad range of industrial processes. In the textile industry, enzymes are used in bioscouring, biopolishing and biostonewashing (Moreira *et al.* 2016). Enzymes are also applied in food industry processes, such as meat tenderization (Ono and Sorimachi 2012), cheese manufacturing (Yegin and Dekker 2013), baking (Ahmad *et al.* 2012; Döring *et al.* 2015), fruit juice processing (Bilal *et al.* 2017; Touthik *et al.* 2017), oil extraction (Touthik *et al.* 2017) and alcoholic beverage production (Touthik *et al.* 2017).

Beyond these applications, enzymes have been increasingly used to produce biofuels. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass is the critical step in bioethanol production to convert complex carbohydrates to simple monomers. Enzymatic hydrolysis requires less energy and milder environmental conditions than acid hydrolysis

(Ferreira *et al.* 2009). Today, increasing attention has been given to alternative energy sources, driven by forces such as spiraling oil prices and the need to secure sustainability of energy supplies, and, above all, the worry about climate change due to high emissions from fossil fuel use (Mohanram *et al.* 2013). Currently, biofuel comes from ethanol produced by fermenting sugars from high starch containing grain or sugarcane, or increasingly from cellulose and hemicellulose feedstocks (Harris *et al.* 2014).

Lignocellulosic materials are the most abundant feedstock, making them a natural and renewable resource. A considerable amount of such materials is constantly produced as waste by-products of agricultural practices, mainly from various agro-based industries (Anwar *et al.* 2014). In 2002, the annual worldwide production of lignocellulose was estimated at about 10–50 tons of dry lignocellulose, representing approximately half of the global biomass yield (Galbe and Zacchi 2002). This biomass is considered to be the only foreseeable feasible and sustainable resource for renewable energy and value-added chemicals (Sánchez 2009). Lignocellulose comprises up to 75% carbohydrates, and it is an important source of

fermentable carbohydrates for the production of liquid biofuels, as well as a diverse range of chemical commodities and biodegradable materials, including bioplastics, surfactants, biofuel, oils and fatty acids, detergents, adhesives, biogas, lubricants, paints and pigments (Turner *et al.* 2007; Xuebing *et al.* 2012).

A considerable cost in the biomass-based economy is related to enzymes. Due to this, great efforts have been devoted to the improvement of enzyme cocktails (Harris *et al.* 2014). Besides searching for new enzymes, or engineering existing ones, the improvement of enzymatic mixtures for specific lignocellulosic substrates is of interest. There is increasing recognition of the fact that a "one-size-fits-all" approach may not be optimal in the design of more efficient biomass processing (Chylenski *et al.* 2017). In this context, an enzymatic consortium appears to be an important strategy for complete lignocellulosic biomass deconstruction, with the possibility of optimizing each consortium to a specific substrate. Due to their recalcitrant structure, the complete degradation of plant cell walls requires the coordinate action of a broad range of enzymes with varied specificities acting synergistically.

A brief overview of enzymatic deconstruction of the cell wall

As mentioned above, the complete deconstruction of the vegetal cell wall demands different enzymes. Cellulose, the main polysaccharide within cell walls, is degraded by cellulases. Endoglucanases (EC 3-2-1-4) randomly hydrolyse the cellulose chains, cellobiohydrolases (EC 3-2-1-91) release cellobiose from nonreducing (CBH I) and reducing (CBH II) ends of the cellulose chain, and β -glucosidase (EC 3-2-1-21) hydrolyses cellobiose to release glucose (Moreira *et al.* 2011).

As with cellulose, the full degradation of xylan requires a large number of enzymes, including endo- β -1,4 xylanases (EC 3-2-1-8) that hydrolyse the glycosidic bonds in the xylan backbone releasing small oligosaccharides. These oligosaccharides will be hydrolysed by β -xylosidases (EC 3-2-1-37), releasing xylose from the nonreducing end of xylan (Polizeli *et al.* 2005). As xylan presents a branched structure, its complete breakdown demands side chain-acting enzymes, including acetylxylan esterases (EC 3-1-1-6) that remove the *O*-acetyl groups from acetyl xylan (Polizeli *et al.* 2005), α -L-arabinofuranosidases (EC 3-2-1-55) to cleave the terminal α -L-1,2-, α -L-1,3- and α -L-1,5-arabinofuranosyl residues (Polizeli *et al.* 2005), and α -glucuronidases (EC 3-2-1-.) that cleave the α -1,2 bonds between glucuronic acid residues and the main chain in glucuronoxylan (Polizeli *et al.* 2005). Moreover, feruloyl esterases (E.C. 3-1-1-73) and *p*-coumaroyl esterases (E.C.

3-1-1-73) are able to hydrolyse the ester-link between arabinose and monomeric or dimeric ferulic acid and the linkages between arabinose and *p*-coumaric acid, respectively (Polizeli *et al.* 2005; Moreira *et al.* 2011). Xyloglucans are hydrolysed by endo-transglycosylase/hydrolases (2-4-1-2070), a xyloglucan-active β -D-galactosidase (3-2-1-23), a xyloglucan-specific α -L-fucosidase (3-2-1-51/3-2-1-63), and a xyloglucan oligosaccharide-specific α -D-xylosidase (3-2-1-37) (Minic and Jouanin 2006).

The classical model for degradation of mannan involves the synergic action of β -mannanase (EC 3-2-1-78), β -mannosidase (EC 3-2-1-25), β -glucosidase (BGL; EC 3-2-1-21), acetyl mannan esterase (EC 3-1-1-6) and α -galactosidase (EC 3-2-1-22). β -mannanase acts on the mannan backbone and β -mannosidase releases mannanose from the nonreducing ends of mannan and manno-oligosaccharides. BGL (EC 3-2-1-21), an exo-type enzyme, cleaves the β -D-1,4-glucopyranose at the nonreducing end of the oligosaccharides released from glucomannan and galactoglucomannan by β -mannanase, liberating monosaccharides (Moreira and Filho 2008). Additional debranching enzymes are also necessary, including acetyl mannan esterase (EC 3-1-1-6) and α -galactosidase (EC 3-2-1-22), that cleave the linkages in the acetyl groups from galactoglucomannan and α -1,6 linked D-galactopyranosyl side chains of galactomannan and galactoglucomannan, respectively (Moreira and Filho 2008).

Pectic substances are deconstructed by endopolygalacturonase (EC 3-2-1-15) and exopolygalacturonase (3-2-1-67) that cleave polygalacturonic acid chain-forming oligogalacturonates and monogalacturonates, respectively. The deesterification of methyl ester linkages in the galacturonan backbone of pectic substances, to release acidic pectins and methanol, is catalysed by pectinesterases (EC 3-1-1-11). Lyases break down pectinases through transesterification. Endopolygalacturonase lyase (EC 4-2-2-2) and exopolygalacturonase lyase (EC 4-2-2-9) act on pectic acids, releasing unsaturated oligogalacturonates and digalacturonates, respectively (Jayani *et al.* 2005).

Oxidative enzymes, classified as having auxiliary activity, are recognized as part of the lignocellulose-active enzyme family, after the first detection of their synergistic enhancement of the action of cellulases. Cellobiose dehydrogenase (EC 1-1-99-18) is capable of oxidizing a variety of sugars, including cellobiose, lactose, and in some cases, glucose. While the substrate is being oxidized, the cofactor flavin adenine mononucleotide is fully reduced (Knöös *et al.* 2014; Cazy 2017). Another proposed role for cellobiose dehydrogenase is the activation of hydrolytic cellulases by relief of cellobiose product inhibition (Langston *et al.* 2011). Currently, cellobiose dehydrogenases are classified in the auxiliary activity 3 (AA3) family

(Cazy 2017). The AA9 family (formerly GH 61) contains lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs), mononuclear type II copper enzymes that need an external electron donor, a small molecule, or a partner redox protein for activity. The breakdown of the glucosidic bonds occurs with the oxidation of C-1 and C-4. LPMOs degrade cellulose using C-H activation followed by O₂-dependent chain cleavage (Eibinger *et al.* 2014; Cazy 2017).

Due to the complex and random phenylpropanoic polymer structure of lignin, enzymes involved in its breakdown must have broad substrate specificity (Janusz *et al.* 2013). Delignification is carried out by enzymes such as laccases (EC 1.10.3.2) that oxidize phenolic compounds and aromatic amines using molecular oxygen as a terminal electron acceptor. Lignin peroxidase (EC 1.11.1.14) and manganese peroxidase (EC 1.11.1.13) are low substrate specificity enzymes capable of oxidizing lignin at the phenolic and nonphenolic aryl-ether positions, respectively (Crestini *et al.* 2011).

Lignocellulolytic organisms also produce a third class of biomass-degrading proteins, generally termed disrupting or amorphogenesis-inducing proteins (Gourlay *et al.* 2013). Swollenin, a protein with sequence similarity to plant expansins, is also associated with plant cell wall degradation. This protein breaks down hydrogen bonds between cellulose microfibrils or between cellulose and other cells without hydrolysing them. In this way, they are thought to allow the sliding of cellulose fibres and enlargement of the cell wall. Swollenins synergistically enhance the activity of cellulases but do not exhibit any enzymatic activity on cellulose themselves (Saloheimo *et al.* 2002; Kubicek *et al.* 2014). Loosenin, another expansin-type protein, acts by disrupting the intramolecular hydrogen bonds (Quiroz-Castañeda *et al.* 2011).

Enzymatic cocktails

The major obstacle to the efficiency of enzymatic breakdown of lignocellulose is that the plant cell wall has evolved to resist enzymatic deconstruction (Mohanram *et al.* 2013); the recalcitrant structure of the plant cell wall is a challenge to micro-organisms that try to break it down. In attempts to improve the feasibility of the bioconversion of lignocellulose to biofuel, enzymes must have high catalytic efficiencies, high thermal stability and low end-product inhibition (Maki *et al.* 2009). Application of enzymes to catalyse the degradation of cellulose to glucose and hemicellulose to free sugars has long been considered the most viable strategy to provide cost-effective second-generation ethanol (Himmel *et al.* 2007; Meyer *et al.* 2009).

Micro-organisms possess several mechanisms for lignocellulose deconstruction. Fungi and bacteria have the free

enzyme system, the most common mechanism (Malgas *et al.* 2017). Beyond that, cellulosomes and xylanosomes are complex protein structures for the degradation of biomass, produced by anaerobic bacteria (Morais *et al.* 2011; Galanopoulou *et al.* 2016; Malgas *et al.* 2017). Finally, there are multicatalytic enzyme systems that combine various activities into a single gene product (Chung *et al.* 2015; Malgas *et al.* 2017). The free enzyme system, the most common and comprehensively studied enzymatic mechanism, has great potential to produce enzymatic cocktails with industrial applicability, combining low cost with complete degradation of biomass.

In developed countries, such as the US, Western Europe, Japan, and Canada, the demand for industrial enzymes has been relatively stable during recent times, while developing economies in Asia-Pacific, Eastern Europe, Africa and Middle East regions have emerged as the fastest growing markets for industrial enzymes (Sarrouh *et al.* 2012). Hydrolases are by far the most widely used class of enzymes in industry (Novozymes 2017a). Enzymes are a very well-established product in biotechnology, and sales in the US rose from \$1.3 billion in 2002 to \$5.1 billion in 2009 (Sarrouh *et al.* 2012). In the world market, enzymes for industrial applications are expected to achieve a compound annual growth rate (CAGR) of 4.7% for 2016–2021. This market is expected to be worth \$6.3 billion in 2021 (BBC Research 2017). The cost of enzymes for biofuel applications alone should total \$1.0 billion in 2020, registering a CAGR of 10.4%. In 2020, the US and European markets for biofuel enzymes are expected to be worth \$355.7 million and \$325.2 million, respectively, both with a CAGR >10% (BBC Research 2015). Lignocellulose-degrading enzymes are applied in various fields, including technical use, food manufacturing, paper bleaching, biofuels, and the textile industry, and as tools for research and development (R&D) (Howard *et al.* 2003). High turnover in recent years in the enzyme market highlights a need for the establishment of enzymatic consortiums, with the aims of reducing cost and completely deconstructing lignocellulose. One possible and promising approach to accomplish this goal is to mix different enzymes from varied sources to build a balanced enzymatic mixture.

Increased demands for energy have had a negative impact on the environment. Biorefineries appear to be an alternative to reduce these negative impacts, by producing energy beyond commodity chemicals using biodegradable materials. In this context, we propose to use enzymatic cocktails in biorefineries, as demonstrated in Fig. 1. Prospection of unknown micro-organisms, as well as the utilization of micro-organisms recognized as good holo-cellulase producers, is important in the design of a new enzymatic cocktail. Exploitation of lignocellulosic residues

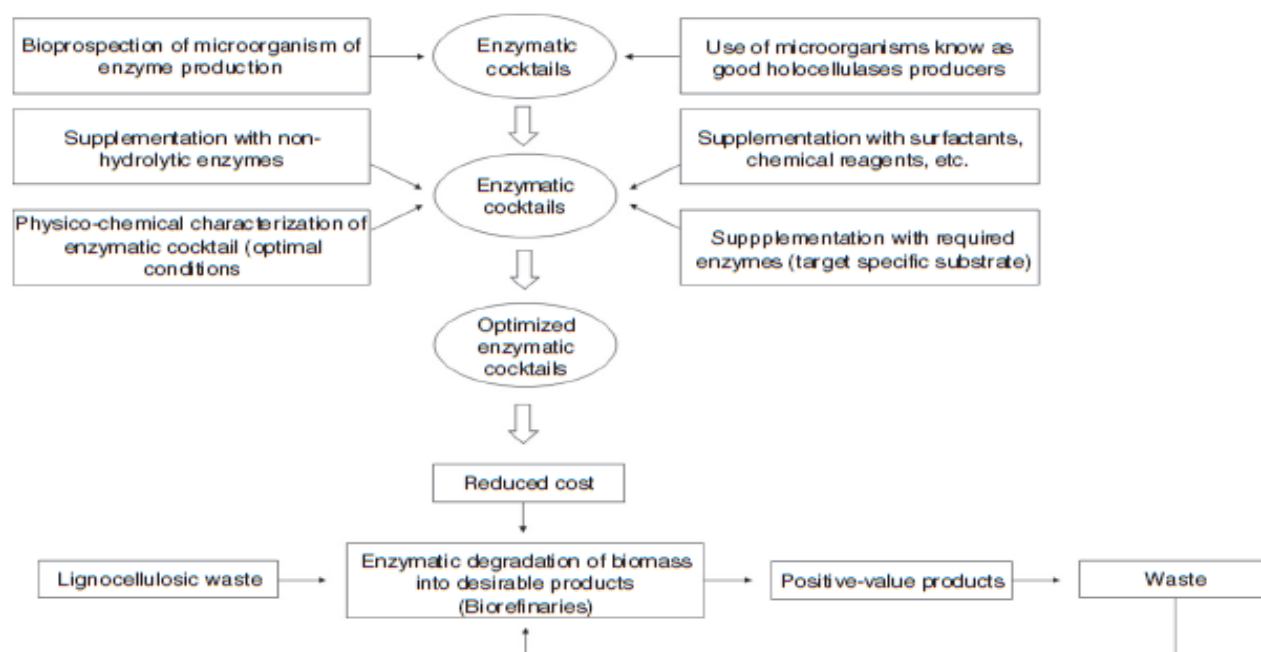


Figure 1 Overview of design, characterization, optimization and application of enzymatic cocktails in biorefineries.

to grow micro-organisms has the advantage of being an inexpensive source of enzymes. This approach facilitates the reuse and addition of value to waste, which reduces environmental pollution. Optimization of these enzymatic consortiums is critical to their industrial application and will be further discussed in this review. Pathways used for the optimization of cocktails may include supplementation with a specific enzyme aiming to hydrolyse a particular substrate, supplementation with nonhydrolytic enzymes, or even the supplementation with surfactants or other chemicals. In biorefineries, the optimized cocktail can reduce the costs of enzymatic hydrolysis of lignocellulose.

Today, large companies sell a variety of enzymatic cocktails for diverse purposes. Recently, Novozymes launched the Spirizyme[®] cocktails, available in three versions, aimed at total sugar conversion in the biofuel industry (Novozymes 2017b). This cocktail is supplemented with trehalase; by converting trehalose to a fermentable sugar, the hydrolysis yield will increase considerably (Novozymes 2017b). Another company in the biofuels field, DuPont, launched Acellerase[®] in 2007, composed of a mixture of cellulases and accessory enzymes, and available in different versions that work with a variety of pretreatments and biomasses (DuPont 2017). Additionally, also aimed at biomass degradation,

the new generation of the Cellic family, from Novozymes, Cellic[®]CTec3, endeavours to lower the total cost of producing cellulosic ethanol (Novozymes 2017c).

The secretome composition of any filamentous fungus varies according to biological features of the micro-organism and continuously changes in response to environmental conditions (Papagianni 2004). Furthermore, the same fungi grown on different lignocellulosic biomasses produce different protein profiles, and it has been demonstrated that the utilization of a crude extract produced by a fungus, which has been induced by the same lignocellulosic residue that will be hydrolysed, shows higher yields (Juhász *et al.* 2005; Sciuto *et al.* 2017). This is an essential aspect to the design of an enzymatic cocktail targeting a specific substrate. To achieve this, the environmental aspects can be modified to produce secretome alterations. Individually, enzymes possess very limited hydrolysis activity, while a mixture of enzymes can exhibit a synergistic effect (Zhou *et al.* 2009). Enzymatic cocktails are a good choice to hydrolyse plant cell walls due to the combined action of a pool of enzymes with different specificities, enabling one enzyme to act on the product of another enzyme. Moreover, in an enzymatic cocktail, it is possible to replace an individual enzyme to fulfil the requirements of a determinate substrate. As different interactions can occur among enzymes and

substrates, and specific enzymatic inhibitors can be generated during the hydrolysis process, studies on enzymatic mechanisms of action are necessary. Furthermore, the optimization of the designed cocktails is essential to increase lignocellulose conversion, since each substrate possesses particular characteristics and demands distinct conditions for its complete breakdown.

On the other hand, the extreme complexity and flexibility of cocktails is an impediment to developing efficient artificial cellulase cocktails (Percival Zhang *et al.* 2006). Under industrial conditions, only a fraction of the enzymes is able to contribute to the performance of the whole cocktail, and some encoding cellulase genes can be deleted. To reduce the interference of less-contributive cellulase in *Myceliophthora thermophila*, specific genes were deleted and an increment in the cellulolytic efficiency of the cocktail was observed, validating the management of cellulase diversity as a strategy to obtain improved fungal cellulolytic cocktails. The high diversity of enzymes produced by most cellulolytic fungi can be detrimental to an efficient industrial cocktail (Reyes-Sosa *et al.* 2017).

In this way, to construct an efficient enzymatic cocktail, it is also important to verify the behaviour of fungi when grown on a variety of types of biomass, and identify the types of enzymes they produce and the enzymatic sequences necessary to deconstruct each kind of biomass (Polizeli *et al.* 2017). Study of the secretomes from *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* grown on sugarcane bagasse showed that these fungi use different enzymatic sequences to degrade the same biomass (Borin *et al.* 2015). Moreover, a remarkable variation in the secretomes of *T. reesei* and *A. niger* was observed in consequence of two cultivation methods: sequential fermentation (solid state followed by submerged) and submerged fermentation. Higher cellulolytic and hemicellulolytic production occurred for sequential fermentation in comparison to submerged fermentation, using extracts of both fungi when nonwashed steam-exploded sugarcane bagasse was used as carbon source (Florencio *et al.* 2016).

Early studies on enzymatic cocktail optimization concentrated on the improvement of such cocktails for commercial model cellulosic substrates like Sigmacell (Baker *et al.* 1998) and filter paper (Kim *et al.* 1998). Since then, several studies have been performed on the advancement of enzymatic mixtures for industrially relevant pretreated lignocellulosic substrates like sugarcane bagasse, corn stover and wheat straw, among others (Banerjee *et al.* 2010; Gao *et al.* 2011; Kallioinen *et al.* 2014; Chylenski *et al.* 2017). Enzymatic cocktails may be produced using different approaches, such as mixing crude extracts from fungi (Arias *et al.* 2016), bacteria (Qi *et al.* 2011), or fungi and bacteria (Verma *et al.* 2010; Gao *et al.* 2011;

Kallioinen *et al.* 2014). Another approach consists of supplementing crude extracts or commercial preparations with a specific enzyme that is necessary for the hydrolysis, but is lacking in the cocktail preparation (Ji *et al.* 2014; Peciulyte *et al.* 2017).

Mixtures of varied enzymes from different sources usually lead to an increment in hydrolysis rate. Enzymatic breakdown of sugarcane bagasse by crude extracts from *Trichoderma harzianum*, *Penicillium funiculosum* and *A. niger* yielded 42, 66 and 1%, respectively. On the other hand, the optimized cocktail comprising 50% of the crude extract from *P. funiculosum*, and 35 and 15% of the crude extracts from *A. niger* and *T. harzianum*, respectively, showed a hydrolysis yield of sugarcane bagasse of 91% (Arias *et al.* 2016). Another study demonstrated that an optimized enzymatic cocktail composed of both fungal cellulases and bacterial hemicellulases was able to hydrolyse ammonium fibre expansion (AFEX) corn stover with yields >80 and 70% for glucose and xylose respectively, at a protein load of ~20 mg g⁻¹ glucan (Gao *et al.* 2011). Another strategy consists of the supplementation of cellulosic cocktails with hemicellulases, which provides improved hydrolysis yields of cellulose and hemicelluloses. The addition of a GH11 xylanase in Celluclast 1.5L, a commercial cellulase, allowed reduction of the cellulase loading by a factor of 7, due to the removal of xylans and the increased cellulose accessibility due to enhanced fibre porosity and swelling (Hu *et al.* 2011). A different approach consisted of the cultivation of a fungus in different sugar sources and ratios, and then preparing various enzymatic cocktails (Dondelinger *et al.* 2016). The mixture of two crude extracts from *T. reesei*, both grown on a combination of different sugars, had high levels of filter paper unit (FPU), BGL, xylanase and β -xylosidase activities, and showed a glucose yield of approximately 30% on hydrolysis of avicel (Dondelinger *et al.* 2016).

Similarly, the optimization of cellulases from *Penicillium verruculosum* with a BGL from *A. niger* (20 U g⁻¹) produced an increment in the glucose released from avicel and milled aspen wood after 72 h of hydrolysis. The heterologous expression of this same BGL in *P. verruculosum* enhanced enzymatic deconstruction of avicel and milled aspen wood. These results strongly advocated the necessity of optimization of the cellulase preparation from *P. verruculosum* by adding BGL in order to improve its hydrolytic performance (Dotsenko *et al.* 2015). In another study, an optimized enzymatic cocktail developed to hydrolyse sugarcane bagasse, comprising 80% *T. reesei* fraction, 10% endoglucanase (recombinant enzyme from *Bacillus subtilis*), and 10% BGL (from *A. niger*), converted 72% of cellulose present in hydrothermally pretreated bagasse (Bussamra *et al.* 2015). Likewise, supplementation

of a commercial preparation (Celluclast 1-5L; Novozymes) with 30% of the crude extract from *Aspergillus oryzae* P21C3, a good producer of xylanase and feruloyl esterases, resulted in an enhancement of 36% in the conversion of cellulose from pretreated sugarcane bagasse (Braga *et al.* 2014). Furthermore, the enrichment of a crude enzymatic extract produced by *T. harzianum* with a commercial pectinase from *A. niger* and a recombinant α -L-arabinofuranosidase from *B. subtilis* had a positive effect on pretreated sugarcane bagasse. This positive effect of α -L-arabinofuranosidase on the enzymatic depolymerization efficiency could be due to the removal of arabinose residues from the xylan chain, which could further contribute to the action of endoxylanases. It is possible that steric hindrance caused by arabinose residues was preventing the action of other enzymes. In the same way, the positive effect of pectinase on this hydrolysis can be explained by the removal of the remaining pectin fraction from the pretreated biomass (Delabona *et al.* 2012). The surfactant sodium taurocholate exhibited stimulatory effects on cellulolytic enzyme production by a mixed culture of *T. reesei* and *A. niger*, enhancing both filter paper activity (FPase) and BGL activity, and producing the highest FPase activity (Fang *et al.* 2013). Table 1 contains some examples of commercial and noncommercial enzymatic cocktails, the respective substrates used, and the results observed.

The introduction of nonhydrolytic enzymes, such as LPMOs, in currently used commercial cocktails helps to increase the efficiency of lignocellulosic biomass breakdown. Many experiments with this enzyme have shown that it can enhance the cellulose conversion yield and reduce the amounts of other enzymes necessary to saccharify biomass (Polizeli *et al.* 2017). Recently, the effect of oxidative enzymes from *Streptomyces coelicolor* was investigated in the hydrolysis of sugarcane bagasse and Norway spruce. The observed effects were substrate-dependent: for sugarcane bagasse, positive effects were observed when adding up to approximately 8% LPMO, whereas addition of this enzyme did not seem to contribute to decomposition of Norway spruce (Chylenski *et al.* 2017).

Biomass recalcitrance is related to the chemical and physical aspects of the plant cell wall. The presence of lignin, hemicelluloses, pectin, ash and their spatial interlinks builds physical barriers to protect cellulose from degradation. Although the way in which these factors limit the enzymatic hydrolysis of biomass has been extensively studied, the molecular mechanisms of biomass recalcitrance are still not completely clear (Fang *et al.* 2013). It is probable that recalcitrance was acquired during evolution, since cell walls have to be physically and chemically resistant to microbial attack (Buckeridge and Souza

2014). From this evolutionary standpoint, one explanation for this phenomenon is the glycomic code, which is described as 'the diversity of encrypted results of the biosynthetic mechanisms of plant cell wall polysaccharides, that give rise to fine-structural domains containing information in polysaccharides' (Buckeridge and Souza 2014). These then form polymer composites with different levels of polymer-polymer interaction and recalcitrance to hydrolysis. Assuming that the glycomic code is represented by the fine structure of the polysaccharides, it follows that the glycomic code determines how polysaccharides can be decrypted. The plant cell wall shows regions with different degrees of recalcitrance; the branching polysaccharides can be arranged nonrandomly within the polymers, reducing enzyme access to the cell wall and highlighting the fact that branching is a limiting factor to hydrolysis (Buckeridge and Souza 2014). For this reason, main chain-cleaving enzymes will exhibit greater activity if substituents are first removed by debranching enzymes. Therefore, debranching enzymes have been used as a pretreatment in a sequential manner in order to intensify main chain activity. Synergistic interactions between the release of arabinose and xylanase activity were demonstrated on water-soluble and insoluble wheat arabinoxylan (Sørensen *et al.* 2007a,b).

As discussed above, a limitation in the biomass degradation process is the restricted access of hydrolytic enzymes to the lignocellulosic structure. Disruption of the lignocellulosic matrix has been suggested as a limiting step in its depolymerization (Gourlay *et al.* 2013). The initial stage in enzymatic saccharification of cellulose has been termed amorphogenesis, and there are several indications that many other proteins contribute to the deconstruction of lignocellulose (Arantes and Saddler 2010). It has been suggested that cellulases have to be adsorbed onto the surface of the insoluble fraction of cellulose before hydrolysis. The substrate then becomes loosened to increase the molecular disorder of the tightly packed regions in the fibrous cellulosic network, and once this region is accessible to enzymes, the coordinated action of endo- and exoglucanases promotes hydrolysis (Buckeridge and Souza 2014). Amorphogenesis enhances the reactivity of the fibrous cellulosic substrates by increasing the amount of cellulose directly accessible to the enzymes (Arantes and Saddler 2010). Among the known functions of carbohydrate-binding modules (CBMs), the ability to nonhydrolytically disrupt crystalline substrates has been evaluated and shown to enhance hydrolysis. It has been proposed that CBMs isolated from bacteria and fungi facilitate cellulose hydrolysis by physically disrupting the structure of the fibrous cellulosic network and releasing small particles, without showing any detectable hydrolytic activity; this is the so-called disruptive function (Din

Table 1 Enzymatic cocktails with the respective substrates used and the corresponding hydrolysis results

Enzymatic cocktail	Condition of enzymatic hydrolysis	Proportion	Hydrolysis result	Reference
Celluloclast 1.5L + <i>Aspergillus aculeatus</i> BCC 199+ <i>Bacillus subtilis</i> expansin*	Rice straw (alkali-pretreated), 50°C, 48 h, 2.82 FPU per gram	41.4% de celluloclast 1.5L + 37% <i>A. aculeatus</i> BCC 199 + 21.6% <i>Bacillus subtilis</i> expansin*	769 mg reducing sugar per gram biomass using 2.82 FPU per gram	Suwanarangsue et al. (2012)
<i>Trichoderma reesei</i> + β -1,4-endoglucanase from <i>Bacillus subtilis</i> * + β -glucosidase C6105 (BGL) from <i>Aspergillus niger</i> , Sigma, St. Louis, Missouri, EUA	Sugar cane bagasse (hydrothermally pretreated), 5% (w/w) water-insoluble substrate (WIS), 50°C, pH 4.8, protein load -10 mg g ⁻¹	<i>T. reesei</i> fraction (80%), endoglucanase (10%), and β -glucosidase (10%)	Converted 72% of cellulose. Increment of approximately 40% compared to Cellucast 1.5 L. Increased the conversion of cellulose by approximately 40% compared to Cellucast 1.5 L	Bussamra et al. (2015)
<i>Cladosporium cladosporioides</i> Ch2-2+ commercial xylanase (BoBoYee)+ commercial cellulase (Onozuka R-10; Merck, Darmstadt, Alemanha)	Jerusalem artichoke stalks 1% w/v, pH 4.5, 28°C, 96 h	The freeze-drying powder of crude enzymes from <i>Cladosporium cladosporioides</i> Ch2-2 was used in different combinations at a loading of 0.1 g g ⁻¹ substrate. The commercial cellulase and xylanase were assessed at a loading of 0.05 g g ⁻¹ substrate and 0.3 g g ⁻¹ substrate, respectively.	Synergistic degree reached 4.7 at 28°C resulting in 10.1 mg ml ⁻¹ reducing sugars	Ji et al. (2014)
Cellulase—Cellic CTec2 and endoxylanase—Cellic HTec2	Sweet sorghum bagasse (steam-treated), 2% WIS, 50°C, 120 h, pH 5.0	24.9 mg protein per gram WIS—Cellic CTec2 and 54 mg protein per gram WIS—Cellic HTec2	364.8 kg sugar per ton of bagasse, 20% more than with a conventional enzyme combination	Pengilly et al. (2015)
<i>Trichoderma reesei</i> ATCC 66587 and <i>Aspergillus tubingensis</i> KRCF 700-33	12.5 wt% sugi pulp, pH 4.8, 40°C, 4 days, 4 FPU per gram-pulp, simultaneous saccharification and fermentation (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BA-11)	25% <i>A. tubingensis</i> + 75% <i>T. reesei</i>	Ethanol yield of 76% after 72 h	Shimokawa et al. (2013)
Seven purified enzymes from <i>Trichoderma viride</i> T 100-14 mutant strain	Corn stover (steam-exploded) pH 4.8, 50°C	Cel7A (19.8%), Cel6A (37.5%), Cel6B (4.7%), Cel7B (17.7%), Cel12A (15.2%), Cel61A (2.3%), and β -glucosidase (2.8%)	Glucose production of 15.5 mg ml ⁻¹ (2.1 times higher than the crude cellulase preparation)	Zhou et al. (2009)
Endoglucanase (Cel6A) with CBM + endoxylanases, XynZ-C + Xyn11A with XBM	Bagasse pretreated with peracetic acid Bagasse pretreated with ionic liquid (1-ethyl-3-methylimidazolium acetate). 72 h, 0.25 wt% of biomass 50°C and 1000 rev min ⁻¹ , sodium phosphate buffer (50 mmol l ⁻¹ , pH 7.0), 2 mg protein per gram biomass	Binary mixtures, each enzyme loading was 1 mg g ⁻¹ . Ternary mixture, 1 mg g ⁻¹ . Cel6A was supplemented with 0.5 mg g ⁻¹ XynZ-C and 0.5 mg g ⁻¹ Xyn11A.	Cel6A + Xyn11A >2% glucan conversion/ >20% xylan conversion >20% xylan conversion Cel6A + Xyn11A + XynZ-C ->2.5% glucan conversion/>35% xylan conversion Cel6A + Xyn11A ->7% glucan conversion/>10% xylan conversion Cel6A + XynZ-C ->6% glucan conversion/-10% xylan conversion Cel6A + Xyn11A+XynZ-C ->8% glucan conversion/>15% xylan conversion	Jia et al. (2015)

(Continued)

Table 1 (Continued)

Enzymatic cocktail	Condition of enzymatic hydrolysis	Proportion	Hydrolysis result	Reference
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30 and <i>Aspergillus niger</i>	Steam-exploded corn stover (SECS), 10% w/w, pH 4.8, 50°C, 48 h. Enzymes with specified dosages (FPA per gram cellulose)	5 : 1 (<i>T. reesei</i> : <i>A. niger</i>)	80.93% of yield in hydrolysis 48 h and inoculum ratio 5 : 1 allowed the highest FPA and a relatively high BGA	Fang et al. (2013)
Commercial cellulase (Spezyme CP) and <i>Aspergillus fumigatus</i> ECU0811	Corn stover (steam explosion-pretreated), enzyme cocktail was composed with a fixed dosage of Spezyme CP (CPCel) at 14.2 (FPU) per gram glucan and varied dosages of <i>A. fumigatus</i> cellulase (AFCel), pH 4.8, 24 h, 5 mg ml ⁻¹ corn stover	(14.2 FPU per gram glucan commercial cellulase—CPCel + 1.21 FPU <i>Aspergillus fumigatus</i> —FCel per gram of glucan	Glucan-to-glucose conversion of corn stover was increased from 25.6% in the presence of the enzyme cocktail in comparison to CPCel.	Wang et al. (2012)
<i>Trichoderma harzianum</i> IOC 3844, <i>Penicillium funiculosum</i> ATCC 11797 and <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1004	Sugarcane bagasse—partially delignified cellulignin, 25 g l ⁻¹ of substrate, pH 5.0, 48 h, 10 mg g ⁻¹ of cellulose	15% (<i>T. harzianum</i>) + 50% (<i>P. funiculosum</i>) + 35% (<i>A. niger</i>)	Mixture was able to hydrolyse 25 g l ⁻¹ of pretreated sugarcane bagasse with 91% of yield.	Arias et al. (2016)
Cellulases (CBH I, CBH II and EGI), xylanases (LX3 and LX4), accessory hemicellulases (β -xylosidase, α -arabinofuranosidase and α -glucuronidase)	Corn stover (AFEX treated) 0.2 w/w, pH 4.5, 50°C, 24 h, -20 mg g ⁻¹ glucan	75% xylanases and 75% cellulases. LbX (0.6 mg g ⁻¹ glucan), LArb (0.6 mg g ⁻¹ glucan) and LaGI (0.8 mg g ⁻¹ glucan)	Resulting in glucose and xylose hydrolysis yields >80 and 70%, respectively. Accessory hemicellulases increase xylose yield by an additional 20%.	Gao et al. (2011)
Cellulases (Cel7A, Cel6A, Cel7B and Cel5A) and accessory enzymes (GH11 EX, GH10 EX and GH5 XG)	Steam-pretreated corn stover (SPCS), 2% w/w, 72 h, pH 4.8, 50°C	Cellulases 15 mg g ⁻¹ cellulose and accessory enzymes 10 mg g ⁻¹ cellulose	Sequential hydrolysis (Cel7A + GH10 EX) increased hydrolysis rate in 20% (compared to control)	Hu et al. (2013)
Cellulast 1.5L + <i>Aspergillus oryzae</i> P2.1C3 extract	Sugarcane bagasse (hydrothermally pretreated), 50°C, 72 h, pH 4.8	Cellulast 1.5L (10 FPU per gram of solids) and 30% <i>Aspergillus oryzae</i> P2.1C3 crude enzymatic extract	36% improvement in the conversion of cellulose from pretreated sugarcane bagasse.	Braga et al. (2014)
CEL7A, CEL5A, XYN10A and XYN11A	10 mg steam-pretreated corn stover, pH 5.0	10 μ g hydrolytic enzyme + 10 μ g Swollenin per mg SPCS+2 μ g β -glucosidase (Novo 188; Novozymes)/mg dry SPCS	Xylanase GH10 and Xylanase GH11 resulting in the release of significantly more xylose (>300%)	Gourlay et al. (2013)

et al. 1991; Teeri 1997). In studies to investigate the morphological and structural changes of cotton fibres after treatment with purified CBMs from fungal CBH1, it was found that CBMs could promote nonhydrolytic disruption of crystalline cellulose by reducing and splitting the hydrogen bonds (Wang *et al.* 2008). The utilization of nonhydrolytic enzymes presents an interesting approach to increase the hydrolysis rate; therefore, a variety of studies have supplemented hydrolytic enzymes with nonhydrolytic enzymes such as swollenin and loosenin. These proteins created a loosened cell wall structure, allowing hemicellulose and cellulose to become more accessible to hydrolytic enzymes. The utilization of swollenin intensified the activity of two xylanases, XYN10A and XYN11A, from *Hypocrea jecorina* during the degradation of steam-pretreated corn stover. A pronounced synergistic interaction was observed between XYN11A and swollenin, with a more than 300% increment in xylose release when compared to the liberation of xylose using the two enzymes separately. However, the release of glucose did not show any improvement (Gourlay *et al.* 2013), and swollenin alone resulted in the release of low levels of soluble monomers and oligomers from steam-pretreated corn stover (Gourlay *et al.* 2013). An enhancement of reducing sugars liberation by a commercial cellulase was observed when cotton fibres were treated with loosenin from *Bjerkandera adusta*. The increment of sugars released was proportional to the amount of loosenin added to the reaction, because this protein binds to cellulose and has disrupting activity on cellulose fibres (Quiroz-Castañeda *et al.* 2011).

Phenolic compounds present an important group of enzyme inhibitors. In higher plants, phenols range from simple, low-molecular weight phenolic glycosides to polymeric compounds. They act as the first line of defence, and they are a barrier to many different micro-organisms to which plants are exposed (Shimokawa *et al.* 2013). Pretreatment, largely used to enhance the access of enzymes to the plant cell wall, usually generates lignin-derived phenols. Phenols are well established as inhibitors of cellulase (Ximenes *et al.* 2010, 2011; Duarte *et al.* 2012), hemicellulose (Palmqvist *et al.* 1996; Gamble *et al.* 2000; Duarte *et al.* 2012) and pectinase (Suwannarangsee *et al.* 2012) activity. However, enzymes may also differ regarding their chemical tolerance to specific biomass pretreatment by-products; this may occur because of the micro-organisms from which the particular enzyme is derived (Malgas *et al.* 2017) or be a particularity of each enzyme. Two xylanases (XylT1 and XylT2) purified from *Aspergillus terreus* showed different results in the presence of a variety of phenolic compounds; while XylT1 was inhibited or deactivated when incubated with these compounds, XylT2 was very resistant, or showed increased

activity in the presence of the same compounds (Moreira *et al.* 2013, 2015). Another report regarding xylanase resistance to phenolic compounds was made by Kaya *et al.* (2000). The enzymatic activity of a commercial xylanase preparation was increased in the presence of low concentrations of some phenolic compounds (Kaya *et al.* 2000). A commercial cellulase was also activated after incubation with different phenolic compounds (Tian *et al.* 2013). The supplementation of enzymatic cocktails with enzymes with proven resistance to phenolic compounds is an important approach to overcome one of the obstructions to enzymatic hydrolysis of lignocellulose, that is, the inhibition caused by compounds that are usually produced during the pretreatment steps.

Independent of the approach used for enzymatic production, a reduction in production costs can be achieved by increasing enzyme productivity (the amount of enzyme produced by volume and time) and fermentation yields (amount of enzyme produced according to feedstock weight) (Silva and Filho 2017). Lower costs in the production of enzymes will lead to lower costs of producing enzymatic cocktails, and consequently, a cheaper industrial process.

Usually, statistical tools are employed to design and validate cocktails. Enzymatic cocktails are routinely experimental design using the simplex mixture approach (Bussamra *et al.* 2015; Laothanachareon *et al.* 2015; Arias *et al.* 2016), and data are validated using analysis of variance (Bussamra *et al.* 2015). Recently, with their Synthetic Biology Project, Novozymes developed new technology aimed at faster tailoring of enzymatic cocktails. This methodology can be applied to a specific feedstock and/or coupled to address a specific hydrolytic conversion process context. Using combinatorial high-throughput screening of libraries of enzyme domains, the combination of catalytic modules predicted to deliver the best performance for a specific condition is accessed (Lin and Teter 2016).

Concluding remarks and future perspectives

The increasing demand for a sustainable world has led to the development and improvement of a variety of techniques for the utilization of agricultural wastes. Enzymatic cocktails possess the potential to breakdown this lignocellulosic material, since they comprise a pool of enzymes with different specificities and coordinate actions capable of disrupting these materials. Enzymatic cocktail preparations have a broad range of advantages: they are more ecologically friendly compared to chemicals used to degrade lignocellulose, they can improve the hydrolysis rate compared to single enzymes, and it is possible to adjust the enzyme type and load to adequately hydrolyse

each substrate. Trends suggest that bioenergy consumption will continue to increase under the influence of current renewable energy and climate change policies. Lignocellulosic bioethanol is one of the most prosperous bioenergy and renewable sectors with the highest growth potential in the near future. New approaches must be exploited, such as enzymatic platforms focusing on the topography and bromatological characteristics of the substrate, making possible the utilization of a broad range of lignocellulosic substrates.

Different sources of enzymes still need to be evaluated to open up new possibilities for designing a customized enzymatic cocktail. In order to discover new sources of enzymes, metagenomic tools could be applied, as well as bioprospection of micro-organisms. Heterologous expression should also be applied with the goal of achieving higher enzymatic activities.

Most enzymatic cocktails have been developed for acid-pretreated corn stover (Banerjee et al. 2010), and, in this context, the development and optimization of new enzymatic cocktails for the degradation of other substrates with biotechnological potential is necessary. Moreover, the advancement of research into mechanisms of action of auxiliary enzymes and nonhydrolytic enzymes is very important for optimization of such cocktails.

From an industrial point of view, the comprehension of enzymatic synergism is of paramount importance. This information may lead to ways of enhancing the enzymatic speed of conversion of biomass, reducing enzyme loads and hydrolysis time, important factors in the cost of hydrolysis of lignocellulosic substrates.

Acknowledgements

The authors acknowledge the receipt of financial support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Foundation for Research Support of the Federal District (FAPDF), and the National Institute for Science and Technology of Bioethanol.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interests.

References

- Ahmad, Z., Butt, M.S., Ahmed, A., Riaz, M., Sabir, S.M., Farooq, U. and Rehman, F.U. (2012) Effect of *Aspergillus niger* xylanase on dough characteristics and bread quality attributes. *J Food Sci Technol* **51**, 2445–2453.
- Anwar, Z., Gulfranz, M. and Irshad, M. (2014) Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bioenergy: a brief review. *J Radn Res Appl Sci* **7**, 163–173.
- Arantes, V. and Saddler, J.N. (2010) Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol Biofuels* **3**, 4–4.
- Arias, J.M., Modesto, L.F.A., Polikarpov, I. and Pereira-Jr, N. (2016) Design of an enzyme cocktail consisting of different fungal platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse: optimization and synergism studies. *Biotechnol Prog* **32**, 1222–1229.
- Baker, J.O., Ehrman, C.I., Adney, W.S., Thomas, S.R. and Himmel, M.E. (1998) Hydrolysis of cellulase using ternary mixtures of purified cellulases. *Appl Biochem Biotechnol* **70**, 395–403.
- Banerjee, G., Scott-Craig, J.S. and Walton, J.D. (2010) Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. *Bioenergy Res* **3**, 82–92.
- BBC Research (2015) *Global Markets and Technologies for Biofuel Enzymes - EGY099B*. Wellesley, MA: BBC Research. Available at <https://www.bcresearch.com/market-research/energy-and-resources/biofuels-enzymes-global-markets-technologies-report-egy099b.html> (accessed 1 July 2017).
- BBC Research (2017) *Global Markets for Enzymes in Industrial Application - BIO030J*. Wellesley, MA: BBC Research. Available at <https://www.bcresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-report-bio030j.html> (accessed 1 July 2017).
- Bilal, M., Asgher, M., Iqbal, H.M.N., Hu, H. and Zhang, X. (2017) Delignification and fruit juice clarification properties of alginate-chitosan-immobilized lignolytic cocktail. *LWT - Food Sci Technol* **80**, 348–354.
- Borin, G.P., Sanchez, C.C., De Souza, A.P., De Santana, E.S., De Souza, A.T., Leme, A.F.P., Squina, F.M., Buckeridge, M. et al. (2015) Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. *PLoS ONE* **10**, 1–20.
- Braga, C.M.P., Delabona, P.D.S., Lima, D.J.D.S., Paixão, D.A.A., Pradella, J.G.D.C. and Farinas, C.S. (2014) Addition of feruloyl esterase and xylanase produced on-site improves sugarcane bagasse hydrolysis. *Biores Technol* **170**, 316–324.
- Buckeridge, M.S. and Souza, A.P. (2014) Breaking the “glycomic code” of cell wall polysaccharides may improve second-generation bioenergy production from biomass. *Bioenergy Res* **7**, 1065–1073.
- Bussamra, B.C., Freitas, S. and Costa, A.C. (2015) Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. *Biores Technol* **187**, 173–181.
- Cazy (2017) *CAZy - Carbohydrate-active enzyme database*. Available at www.cazy.org (accessed 27 June 2017).
- Chung, D., Young, J., Cha, M., Brunecky, R., Bomble, Y.J., Himmel, M.E. and Westpheling, J. (2015) Expression of the *Acidothermus cellulolyticus* E1 endoglucanase in

- Caldicellulosiruptor bescii* enhances its ability to deconstruct crystalline cellulose. *Biotechnol Biofuels* **8**, 113–113.
- Chylenski, P., Forsberg, Z., Ståhlberg, J., Várnai, A., Lersch, M., Bengtsson, O., Sæbø, S., Horn, S.J. et al. (2017) Development of minimal enzyme cocktails for hydrolysis of sulfite-pulped lignocellulosic biomass. *J Biotechnol* **246**, 16–23.
- Crestini, C., Melone, F. and Saladino, R. (2011) Novel multienzyme oxidative biocatalyst for lignin bioprocessing. *Bioorg Med Chem* **19**, 5071–5078.
- Delabona, P.S., Cota, J., Hoffman, Z.B., Paixão, D.A.A., Farinas, C.S., Cairo, J.P.L.F., Lima, D.J., Squina, F.M. et al. (2012) Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α -L-arabinofuranosidase. *Biores Technol* **131**, 500–507.
- Din, N., Gilkes, N.R., Tekant, B., Miller, R.C., Warren, R.A.J. and Kilburn, D.G. (1991) Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase. *Bio/Technology* **9**, 1096–1099.
- Dondelinger, E., Aubry, N., Ben Chaabane, E., Cohen, C., Tayeb, J. and Rémond, C. (2016) Contrasted enzymatic cocktails reveal the importance of cellulases and hemicellulases activity ratios for the hydrolysis of cellulose in presence of xylans. *AMB Express* **6**, 24–24.
- Döring, C., Nuber, C., Stukenborg, F., Jekle, M. and Becker, T. (2015) Impact of arabinoxylan addition on protein microstructure formation in wheat and rye dough. *J Food Eng* **154**, 10–16.
- Dotsenko, G.S., Gusakov, A.V., Rozhkova, A.M., Korotkova, O.G. and Sinitsyn, A.P. (2015) Heterologous β -glucosidase in a fungal cellulase system: comparison of different methods for development of multienzyme cocktails. *Process Biochem* **50**, 1258–1263.
- Duarte, G.C., Moreira, L.R.S., Jaramillo, P.M.D. and Filho, E.X.F. (2012) Biomass-derived inhibitors of holocellulases. *BioEnergy Res* **5**, 768–777.
- DuPont (2017) Accellerase. Available at www.accelerated.com/duPont (accessed 22 June 2017).
- Eibinger, M., Ganner, T., Bubner, P., Rosker, S., Kracher, D., Haltrich, D., Ludwig, R., Plank, H. et al. (2014) Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharide monoxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency. *J Biol Chem* **289**, 35929–35938.
- Fang, H., Zhao, C., Song, X.Y., Chen, M., Chang, Z. and Chu, J. (2013) Enhanced cellulolytic enzyme production by the synergism between *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02 and by the addition of surfactants. *Biotechnol Bioprocess Eng* **18**, 390–398.
- Ferreira, S., Duarte, A.P., Ribeiro, M.H.L., Queiroz, J.A. and Domingues, F.C. (2009) Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. *Biochem Eng J* **45**, 192–200.
- Florencio, C., Cunha, F.M., Badino, A.C., Farinas, C.S., Ximenes, E. and Ladisch, M.R. (2016) Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. *Enzyme Microb Technol* **90**, 53–60.
- Galanopoulou, A.P., Moraïs, S., Georgoulis, A., Morag, E., Bayer, E.A. and Hatzinikolaou, D.G. (2016) Insights into the functionality and stability of designer cellulosomes at elevated temperatures. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 8731–8743.
- Galbe, M. and Zacchi, G. (2002) A review of the production of ethanol from softwood. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**, 618–628.
- Gamble, G.R., Snook, M.E., Henriksson, G. and Akin, D.E. (2000) Phenolic constituents in flax bast tissue and inhibition of cellulase and pectinase. *Biotech Lett* **22**, 741–746.
- Gao, D., Uppugundla, N., Chundawat, S.P., Yu, X., Hermanson, S., Gowda, K., Brumm, P., Mead, D. et al. (2011) Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. *Biotechnol Biofuels* **4**, 2–11.
- Gourlay, K., Hu, J., Arantes, V., Andberg, M., Saloheimo, M., Penttilä, M. and Saddler, J. (2013) Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. *Biores Technol* **142**, 498–503.
- Harris, P.V., Xu, F., Kreel, N.E., Kang, C. and Fukuyama, S. (2014) New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. *Curr Opin Chem Biol* **19**, 162–170.
- Himmel, M.E., Ding, S.-Y., Johnson, D.K. and Adney, W.S. (2007) Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* **315**, 804–807.
- Howard, R.L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E.L. and Howard, S. (2003) Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr J Biotech* **2**, 602–619.
- Hu, J., Arantes, V. and Saddler, J.N. (2011) The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? *Biotechnol Biofuels* **4**, 36–36.
- Hu, J., Arantes, V., Pribowo, A. and Saddler, J.N. (2013) The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a “cellulase mixture” but is highly substrate specific. *Biotechnol Biofuels* **6**, 112.
- Janusz, G., Kucharzyk, K.H., Pawlik, A., Staszczak, M. and Paszczynski, A.J. (2013) Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. *Enzyme Microb Technol* **52**, 1–12.
- Jayani, R.S., Saxena, S. and Gupta, R. (2005) Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem* **40**, 2931–2944.
- Ji, L., Yang, J., Fan, H., Yang, Y., Li, B., Yu, X., Zhu, N. and Yuan, H. (2014) Synergy of crude enzyme cocktail from cold-adapted *Cladosporium cladosporioides* Ch2-2 with commercial xylanase achieving high sugars yield at low cost. *Biotechnol Biofuels* **7**, 130–130.

- Jia, L., Gonçalves, G.A.L., Takasugi, Y., Mori, Y., Noda, S., Tanaka, T., Ichinose, H. and Kamiya, N. (2015) Effect of pretreatment methods on the synergism of cellulase and xylanase during the hydrolysis of bagasse. *Biores Technol* **185**, 158–164.
- Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-Aho, M. and Viikari, L. (2005) Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochem* **40**, 3519–3525.
- Kallioinen, A., Puranen, T. and Siika-Aho, M. (2014) Mixtures of thermostable enzymes show high performance in biomass saccharification. *Appl Biochem Biotechnol* **173**, 1038–1056.
- Kaya, F., Heitmann, J.A. and Joyce, T.W. (2000) Influence of lignin and its degradation products on enzymatic hydrolysis of xylan. *J Biotechnol* **80**, 241–247.
- Kim, E., Irwin, D.C., Walker, L.P. and Wilson, D.B. (1998) Factorial optimization of a six-cellulase mixture. *Biotechnol Bioeng* **58**, 494–501.
- Knöös, P., Schulz, C., Piculell, L., Ludwig, R., Gorton, L. and Wahlgren, M. (2014) Quantifying the release of lactose from polymer matrix tablets with an amperometric biosensor utilizing cellobiose dehydrogenase. *Int J Pharm* **468**, 121–132.
- Kubicek, C.P., Starr, T.L. and Glass, N.L. (2014) Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* **52**, 427–451.
- Langston, J.A., Shaghasi, T., Abbate, E., Xu, F., Vlasenko, E. and Sweeney, M.D. (2011) Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. *Appl Environ Microbiol* **77**, 7007–7015.
- Laohanachareon, T., Bunternsook, B., Suwannarangsee, S., Eurwilachit, L. and Champreda, V. (2015) Synergistic action of recombinant accessory hemicellulolytic and pectinolytic enzymes to *Trichoderma reesei* cellulase on rice straw degradation. *Biores Technol* **198**, 682–690.
- Lin, J. and Teter, S. (2016) *SynTec - Final Technical Report: Synthetic Biology for Tailored Enzyme Cocktails*.
- Maki, M., Leung, K.T. and Qin, W. (2009) The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int J Biol Sci* **5**, 500–516.
- Malgas, S., Thoresen, M., van Dyk, J.S. and Pletschke, B.I. (2017) Time dependence of enzyme synergism during the degradation of model and natural lignocellulosic substrates. *Enzyme Microb Technol* **103**, 1–11.
- Meyer, A.S., Rosgaard, L. and Sørensen, H.R. (2009) The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. *J Cereal Sci* **50**, 337–344.
- Minic, Z. and Jouanin, L. (2006) Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiol Biochem* **44**, 435–449.
- Mohanram, S., Amat, D., Choudhary, J., Arora, A. and Nain, L. (2013) Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. *Sust Chem Process* **1**, 1–12.
- Moraïs, S., Barak, Y., Hadar, Y., Wilson, D.B., Shoham, Y., Lamed, R. and Bayer, E.A. (2011) Assembly of xylanases into designer cellulosomes promotes efficient hydrolysis of the xylan component of a natural recalcitrant cellulosic substrate. *MBio* **2**, 1–11.
- Moreira, L.R.S. and Filho, E.X.F. (2008) An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**, 165–178.
- Moreira, L.R.S., Milanezi, N.G. and Filho, E.X.F. (2011) Enzymology of plant cell wall breakdown: an update. In *Routes to Cellulosic Ethanol* ed. Buckridge, M.S. and Goldman, G.H. pp. 73–96. New York: Springer.
- Moreira, L.R.S., Campos, M.C., Siqueira, P.H.V.M., Silva, L.P., Ricart, C.A.O., Martins, P.A., Queiroz, R.M.L. and Filho, E.X.F. (2013) Two beta-xylanases from *Aspergillus terreus*: characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. *Fungal Genet Biol* **60**, 46–52.
- Moreira, L.R.S., Álvares, A.C.M., Silva-Junior, F.G., Freitas, S.M. and Filho, E.X.F. (2015) Xylan-degrading enzymes from *Aspergillus terreus*: physicochemical features and functional studies on hydrolysis of cellulose pulp. *Carbohydr Polym* **134**, 700–708.
- Moreira, L.R.S., Sciuto, D.L. and Filho, E.X.F. (2016) An overview of cellulose-degrading enzymes and their applications in textile industry. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Cellulase System Properties and Applications* ed. Vijai Kumar, G. pp. 165–177. Galway, Ireland: Elsevier.
- Novozymes (2017a) Enzymes at work pp. 76–76. Available at https://www.novozymes.com/en/-/media/Novozymes/en/about-us/brochures/Documents/Enzymes_at_work.pdf?&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br (accessed 2 July 2017).
- Novozymes (2017b) Novozymes launches advanced enzymes to increase ethanol yields and plant profits. Available at <http://www.novozymes.com/en/news/news-archive/2017/02/novozymes-launches-advanced-enzymes-to-increase-ethanol-yields-and-plant-profits> (accessed 29 July 2017).
- Novozymes (2017c) SynTec, Synthetic Biology Project - Cellic CTec. Available at <http://www.synbioproject.org/cpi/applications/cellic-ctec/> (accessed 29 June 2017).
- Ono, Y. and Sorimachi, H. (2012) Calpains - an elaborate proteolytic system. *Biochim Biophys Acta* **1824**, 224–236.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M. and Zacchi, G. (1996) The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Enzyme Microb Technol* **19**, 470–476.

- Papagianni, M. (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv* **22**, 189–259.
- Peciulyte, A., Pisano, M., de Vries, R.P. and Olsson, L. (2017) Hydrolytic potential of five fungal supernatants to enhance a commercial enzyme cocktail. *Biotech Lett*, **39**, 1403–1411.
- Pengilly, C., García-Aparicio, M.P., Diedericks, D., Brienza, M. and Görgens, J.F. (2015) Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated sweet sorghum bagasse by combinations of cellulase and endo-xylanase. *Fuel* **154**, 352–360.
- Percival Zhang, Y.H., Himmel, M.E. and Mielenz, J.R. (2006) Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv* **24**, 452–481.
- Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A. and Amorim, D.S. (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**, 577–591.
- Polizeli, M.D.L.T.M., Somera, A.F., Lucas, R.C.D., Nozawa, M.S.F. and Michelin, M. (2017) Enzymes involved in the biodegradation of sugarcane biomass: challenges and perspectives. In *Advances of Basic Science for Second Generation Bioethanol from Sugarcane* ed. Buckridge, M.S. and Souza, A.P. pp. 55–79. Springer, Cham: Springer.
- Qi, B., Chen, X., Su, Y. and Wan, Y. (2011) Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Biores Technol* **102**, 2881–2889.
- Quiroz-Castañeda, R.E., Martínez-Anaya, C., Cuervo-Soto, L.I., Segovia, L. and Folch-Mallol, J.L. (2011) Loosenin, a novel protein with cellulose-disrupting activity from *Bjerkandera adusta*. *Microb Cell Fact* **10**, 8–8.
- Reyes-Sosa, F.M., López Morales, M., Platero Gómez, A.I., Valbuena Crespo, N., Sánchez Zamorano, L., Rocha-Martín, J., Molina-Heredia, F.P. and Díez García, B. (2017) Management of enzyme diversity in high-performance cellulolytic cocktails. *Biotechnol Biofuels* **10**, 156–156.
- Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyssönen, E., Bhatia, A., Ward, M. et al. (2002) Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur J Biochem* **269**, 4202–4211.
- Sánchez, C. (2009) Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv* **27**, 185–194.
- Sarrouh, B., Santos, T.M., Miyoshi, A., Dias, R. and Azevedo, V. (2012) Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. *J Bioprocess Biotech* **s1**, 1–10.
- Sciuto, D.L., Almeida, R.M., Miller, R.N.G., Moreira, L.R.S. and Filho, E.X.F. (2017) Cellulose-degrading enzyme production by *Clonostachys bysicola*: partial purification and characterization of an endoglucanase. *Mycosphere* **8**, 415–431.
- Shimokawa, T., Shibuya, H., Ikeda, T., Magara, K., Shinagawa, S., Shinagawa, H., Nojiri, M. and Ohara, S. (2013) Ethanol production from sugi pulp under simultaneous saccharification and fermentation using a cocktail enzyme of *T. reesei* and *A. tubingensis* produced by solid-state fermentation. *J Wood Sci* **59**, 171–178.
- Silva, C.O.G. and Filho, E.X.F. (2017) A review of holocellulase production using pretreated lignocellulosic substrates. *Bioenergy Res* **10**, 592–603.
- Sørensen, H.R., Pedersen, S., Jørgensen, C.T. and Meyer, A.S. (2007a) Enzymatic hydrolysis of wheat arabinoxylan by a recombinant “minimal” enzyme cocktail containing β -xylosidase and novel endo-1,4- β -xylanase and α -L-arabinofuranosidase activities. *Biotechnol Prog* **23**, 100–107.
- Sørensen, H.R., Pedersen, S. and Meyer, A.S. (2007b) Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. *Enzyme Microb Technol* **40**, 908–918.
- Suwannarangsue, S., Bunterngsook, B., Arnthong, J., Paemane, A., Thamchaipenet, A., Eurwilaichitr, L., Laosiripojana, N. and Champreda, V. (2012) Optimisation of synergistic biomass-degrading enzyme systems for efficient rice straw hydrolysis using an experimental mixture design. *Biores Technol* **119**, 252–261.
- Teeri, T.T. (1997) Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases G3. *Trends Biotechnol* **15**, 160–167.
- Tian, Y., Jiang, Y. and Ou, S. (2013) Interaction of cellulase with three phenolic acids. *Food Chem* **138**, 1022–1027.
- Toushik, S.H., Lee, K.T., Lee, J.S. and Kim, K.S. (2017) Functional applications of lignocellulolytic enzymes in the fruit and vegetable processing industries. *J Food Sci* **82**, 585–593.
- Turner, P., Mamo, G. and Karlsson, E.N. (2007) Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb Cell Fact* **6**, 1–23.
- Verma, D., Kanagaraj, A., Jin, S., Singh, N.D., Kolattukudy, P.E. and Daniell, H. (2010) Chloroplast-derived enzyme cocktails hydrolyse lignocellulosic biomass and release fermentable sugars. *Plant Biotechnol J* **8**, 332–350.
- Wang, L., Zhang, Y. and Gao, P. (2008) A novel function for the cellulose binding module of cellobiohydrolase I. *Sci China, Ser C Life Sci* **51**, 620–629.
- Wang, D., Sun, J., Yu, H.L., Li, C.X., Bao, J. and Xu, J.H. (2012) Maximum saccharification of cellulose complex by an enzyme cocktail supplemented with cellulase from newly isolated *Aspergillus fumigatus* ECU0811. *Appl Biochem Biotechnol* **166**, 176–186.
- Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B. and Ladisch, M. (2010) Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme Microb Technol* **46**, 170–176.
- Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B. and Ladisch, M. (2011) Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme Microb Technol* **48**, 54–60.

- Xuebing, Z., Zhang, L. and Liu, D. (2012) Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioprod Biorefin* **6**, 246–256.
- Yegin, S. and Dekker, P. (2013) Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy Sci Technol* **93**, 565–594.
- Zhou, J., Wang, Y.H., Chu, J., Luo, L.Z., Zhuang, Y.P. and Zhang, S.L. (2009) Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. *Biores Technol* **100**, 819–825.

CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS PARA O ESTABELECIMENTO DE CONSÓRCIOS ENZIMÁTICOS PARA HIDRÓLISE DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

1. INTRODUÇÃO

A segurança energética e ambiental são duas questões importantes que impulsionaram a demanda por fontes de energia alternativas e ecológicas (Zabed *et al.*, 2017). Por essa questão, a biomassa lignocelulósica passou a ser alvo de pesquisas devido à sua abundância, facilidade de acesso e baixo custo (Zhang *et al.*, 2018)

Nesse cenário, o Brasil apresenta vantagens devido às suas características favoráveis de solo, água, relevo e clima. Isso propicia o plantio de inúmeras culturas com alta produtividade, tais como a cana-de-açúcar, milho, soja (Pereira *et al.*, 2012), conseqüentemente, gerando enormes quantidades de resíduos. A soja (*Glycine max*) e o milho (*Zea mays*) são os principais grãos produzidos no país. Os dois produtos correspondem a quase 90% do que é produzido em termos de grãos (CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento, 2017). Além disso, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com safra de 633,26 milhões de toneladas para 2017/2018 e safra estimada para 2018/2019 com redução de 2,8% (CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento, 2018).

Os resíduos lignocelulósicos são considerados uma grande fonte de carboidratos para a produção de biocombustíveis e químicos diversos (Manfredi *et al.*, 2018). Além do mais, os resíduos lignocelulósicos também podem ser aplicados na produção de enzimas microbianas, sendo fonte de carbono para os cultivos. Esta é uma forma de minimizar os custos deste processo que ainda é bastante oneroso. A opção de integrar a fabricação de enzimas no processo de produção, utilizando biomassa lignocelulósica como fonte de carbono, é extremamente promissora. A principal vantagem é a diminuição do custo, visto que a fonte de carbono (por exemplo, glicose) será substituída por um substrato economicamente viável (biomassa) (Silva, Vaz e Filho, 2017).

Para a produção de biocombustíveis e químicos diversos, é necessário a desconstrução da biomassa lignocelulósica, que pode ocorrer através da hidrólise enzimática (Manfredi *et al.*, 2018). As enzimas podem ser produzidas por microorganismos (bactérias anaeróbicas e aeróbicas, actinomicetos, fungos), plantas e animais. Dentre os citados acima, os fungos filamentosos são os preferidos na produção de enzimas, pois são capazes de produzir uma considerável diversidade de enzimas. Atualmente, a maioria dos coquetéis comerciais são produzidos por espécies de *Trichoderma* e *Aspergillus*. É incessante a busca por coquetéis enzimáticos capazes de atuar como biocatalisadores, desconstruindo a biomassa lignocelulósica e transformando-a em produtos de maior valor agregado (Reyes-Sosa *et al.*, 2017, Raghuwanshi *et al.*, 2014).

Diante desta necessidade de produção de enzimas, novas fontes têm sido prospectadas e estudadas (Maitan-Alfenas, Visser e Guimarães, 2015). Para isso, se faz necessário a realização de *screening* enzimático para testar a viabilidade de aplicação biotecnológica das enzimas prospectadas.

Um coquetel enzimático deve ser predominantemente termoestável, visto que a falta de estabilidade térmica pode limitar a aplicação desses coquetéis. Além disso, este deve ter em sua composição um número mínimo de diferentes enzimas, nas menores concentrações possíveis e em proporções ótimas. Para isso, é necessário conhecimento detalhado da ação sinérgica de cada enzima que compõe o consórcio enzimático, para que a conversão da biomassa alvo seja mais eficiente do que a aplicação individual destas enzimas (Pengilly *et al.*, 2015, Silva, Vaz e Filho, 2017). Ademais, fatores físico-químicos tais como temperatura, pH, presença de íons e compostos fenólicos podem afetar diretamente o desempenho do coquetel enzimático.

O desenvolvimento de coquetéis a partir de fungos aplicados comercialmente ou não, como *Aspergillus terreus*, *Acrophialophora nainiana*, *Aspergillus tamarii* e *Trichoderma reesei* e o uso de biomassa lignocelulósica para a produção de enzimas e bioprodutos é uma estratégia econômica viável para a montagem racional de coquetéis enzimáticos com capacidade de degradar diferentes biomassas.

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo geral:

O objetivo deste trabalho foi selecionar diferentes substratos para atuasse como fonte de carbono para a produção de consórcio enzimático, a partir de diferentes espécies fúngicas.

2.2. Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito de pH, temperatura e termoestabilidade nas atividades enzimáticas dos extratos brutos;
- Elaborar misturas racionais por meio de ferramentas estatísticas para o desenvolvimento de um coquetel enzimático para a degradação de bagaço de cana-de-açúcar;
- Avaliar o efeito de íons e compostos fenólicos sobre os coquetéis enzimáticos;
- Avaliar os coquetéis enzimáticos na hidrólise de outros substratos lignocelulósicos, além do bagaço de cana de açúcar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

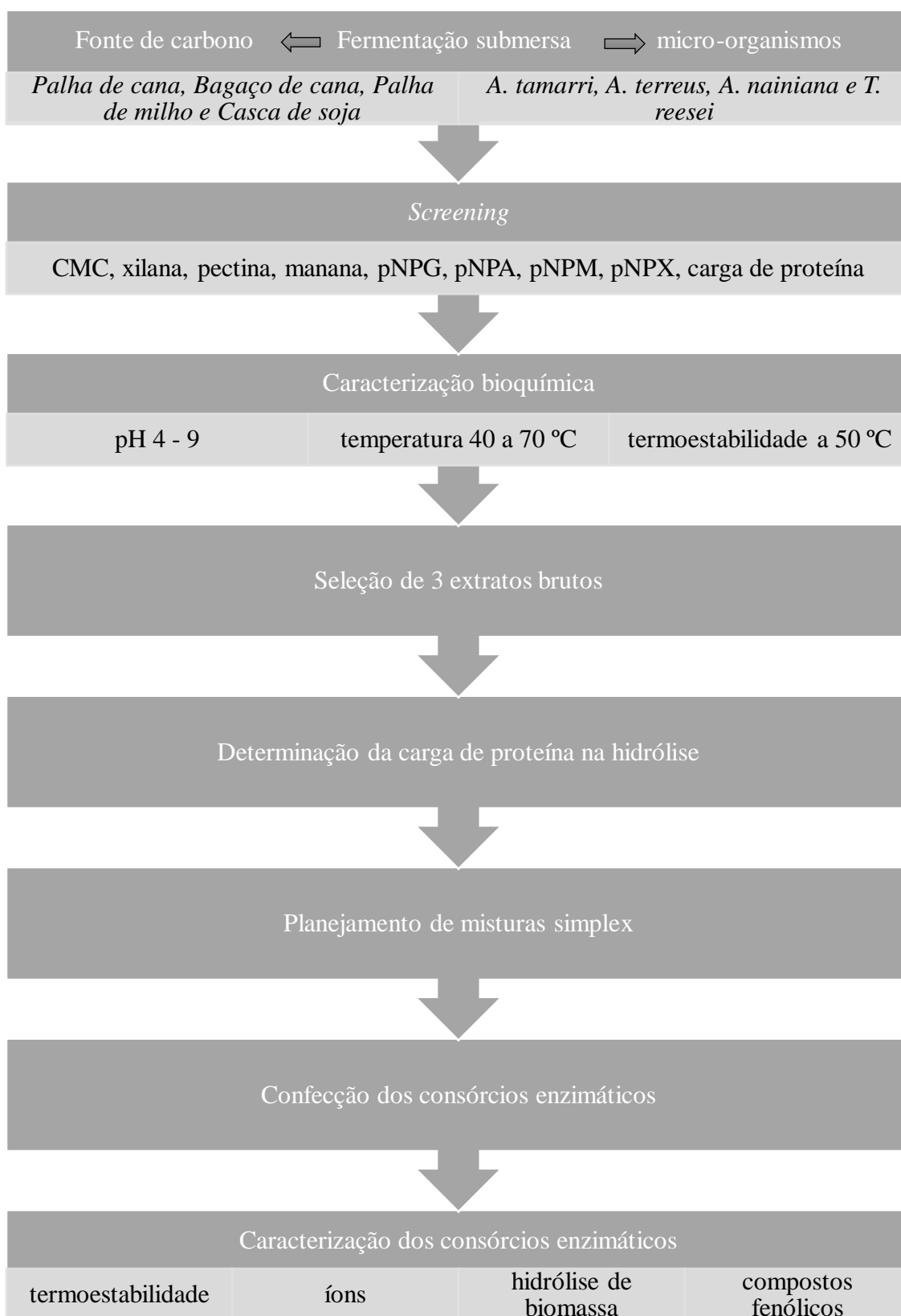


Figura 2.1. Desenho experimental da metodologia utilizada para determinação dos consórcios enzimáticos

3.1 Resíduos lignocelulósicos

Os resíduos utilizados neste trabalho (palha de cana, bagaço de cana, casca de soja e palha de milho) fazem parte da coleção de biomassas do laboratório de Enzimologia da UnB e foram armazenados em caixas de isopor à temperatura ambiente. Os resíduos foram pré-tratados em autoclave por 2 horas a 121 °C, lavados, secos em estufa a 55 °C, triturados em moinho de facas e armazenados em sacos plásticos para estudos posteriores.

3.2 Manutenção e cultivo dos micro-organismos

Os micro-organismos utilizados foram *Acrophialophora nainiana*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus tamaris* e *Trichoderma reesei*. Estes micro-organismos pertencem à micoteca do laboratório de Enzimologia da UnB e foram mantidos em criotubos, contendo glicerol 18% (v/v) e armazenados em ultrafreezer a -80 °C.

A micoteca tem autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético nº 010237/2015-1, além de estar depositada no banco de micro-organismos para controle de patógenos e plantas daninhas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e registrada no Centro Mundial de Dados para Micro-organismos (WDCM), sob o código MCPPW 1128.

Os fungos *A. nainiana*, *A. tamaris* e *T. reesei* foram mantidos em meio sólido de batata-dextrose-ágar (BDA), enquanto que *A. terreus* foi mantido em meio de aveia 1%. Os fungos foram crescidos por 7 dias a 28 °C, exceto *A. nainiana* que foi crescido a 40 °C.

A linhagem *A. tamaris* BLU37, utilizado neste trabalho, foi originalmente isolado da compostagem natural da indústria têxtil. Utilizaram-se regiões de DNA ribossomal de espaçador transcrito interno (rDNA ITS), juntamente com genes de β -tubulina e calmodulina, como marcadores moleculares conservados para identificar o fungo no nível da espécie (Monclaro *et al.*, 2016).

O fungo *A. terreus* foi isolado da compostagem natural de resíduos de uma indústria de beneficiamento de algodão, no pólo têxtil da região do Vale do Itajaí, Gaspar - SC. Sua identificação morfológica foi realizada pelo Prof. Dr. Luís Roberto Batista, do Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG. A identificação molecular da cepa foi feita pela Prof^a. Dra. Nádia Skorupa Parachin, do

Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília (UnB) (Moreira, 2013).

O *T. reesei* foi isolado de madeira em decomposição no cerrado brasileiro e identificado com base na subunidade ribossomal 18S rRNA, amplificando as regiões do ITS 1 e ITS 4, sendo todo o trabalho de identificação realizado pelo Fundação André Tosello – Campinas, São Paulo - Brasil.

O fungo *A. nainiana* foi morfológicamente identificado pela Profa. Wilma Rose Coelho Ribeiro, do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília.

3.3 Fermentação submersa

Os fungos *A. nainiana*, *A. terreus*, *A. tamarii* e *T. reesei* foram submetidos, separadamente, à fermentação submersa, na qual foram utilizadas quatro fontes de carbono distintas: palha de cana, palha de milho, casca de soja e bagaço de cana.

O cultivo em meio líquido foi feito em Erlenmeyer de 250 mL, com volume final de 75 mL, contendo 1% de fonte de carbono, 1% de solução de esporos ($1 \times 10^6 - 10^8$) e meio líquido suplementado (m/v), conforme apresentado na tabela 2.1. Todos os meios foram autoclavados a 121 °C por 30 min. Os cultivos foram realizados em triplicatas.

Tabela 2.1. Composição do meio de cultura mínimo usado para crescimento dos fungos

KH ₂ PO ₄	0,7%,
K ₂ HPO ₄	0,2%
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,05%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1%
Extrato de levedura	0,06%

O inóculo foi obtido por meio da raspagem dos esporos das placas de Petri. Em seguida, foram dispersos em 50 mL de solução salina 0,9% com 3 mL de tween 80 a 1%, previamente autoclavados. A contagem de esporos foi realizada em câmara *Neubauer* ao microscópico óptico.

Os cultivos em meio líquido de *T. reesei*, *A. terreus* e *A. tamarii* foram realizados a 28 °C sob agitação constante de 120 rpm em agitador rotatório por 7 dias. O cultivo de *A. nainiana* foi realizado a 40 °C, sob agitação constante de 120 rpm em agitador rotatório por 7 dias. Após o cultivo, o meio de cultura foi filtrado em funil do tipo *Büchner* com

papel de filtro, adicionado azida sódica (NaN_3) a 1% e armazenado em câmara fria a 4 °C. O filtrado foi denominado extrato bruto e usado como fonte de holocelulases.

3.4 Ensaios enzimáticos

3.4.1 Determinação das atividades de CMCase, xilanase, pectinase e mananase

A determinação das atividades de CMCase, xilanase, pectinase e mananase foi feita pela incubação de 5 uL de extrato bruto com 10 uL de substratos (carboximetilcelulose, xilana de aveia, pectina de fruta cítrica e galactomanana, respectivamente na concentração de 1%) a 50 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 30 µL ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) na mistura de reação e posterior incubação a 97 °C por 10 minutos, seguido de diluição com 150 µL de água, conforme descrito por Miller (1959) e adaptado por Vale (2012). As leituras de absorvância foram realizadas a 540 nm.

3.4.2. Determinação da atividade de avicelase

A determinação da atividade de avicelase foi realizada em tubos de ensaios, contendo 50 µL de extrato bruto e 50 µL de avicel (celulose microcristalina) a 1%, e incubados a 50 °C por 30 minutos em banho-maria sob agitação (Ghose, 1987). A reação foi interrompida com a adição de 30 µL ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) na mistura de reação e posterior incubação a 97 °C por 10 minutos, seguido de diluição com 150 µL de água, conforme descrito Miller (1959). As leituras de absorvância foram realizadas a 540 nm.

3.4.3. Determinação da atividade de FPase

A determinação da atividade de Fpase foi realizada conforme Ghose (1987). Foram adicionados 250 µL de enzima, 25 mg de papel whatman nº 1, 500 µL de tampão acetato de sódio a 50 mM, pH 4,8, em tubos de ensaios e incubados a 50 °C por 30 min em banho-maria. A reação foi interrompida com a adição de 30 µL ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) na mistura de reação, seguido de incubação a 97 °C por 10 minutos, com

posterior diluição usando 150 μL de água, conforme descrito por Miller (1959). As leituras de absorvância foram realizadas a 540 nm.

3.4.4. Determinação das atividades de β -xilosidase, β -glicosidase, β -manosidase e α -arabinofuranosidase

As atividades de β -xilosidase, β -glicosidase, β -manosidase e α -arabinofuranosidase foram determinadas empregando-se substratos sintéticos (pNPX, pNPG, pNP-man e pNPA, respectivamente), conforme Wood e Bhat (1988). O ensaio foi realizado em microplaca com 5 μL de enzima, 25 μL de substrato (concentração final de 5 mM preparado em tampão acetato de sódio pH 4,8) e 45 μL de tampão acetato de sódio pH 4,8 a 100 mM, incubados por 30 min a 50 °C. A reação foi interrompida pela adição de 100 μL carbonato de sódio. As leituras de absorvância foram realizadas a 430 nm.

Uma unidade de enzima foi definido como sendo a quantidade de enzima que libera 1 mg de açúcar redutor por 1 minuto de reação. As atividades enzimáticas foram expressas como μmol de produto formado por minuto (UI) e por mL de solução enzimática. As curvas-padrões foram determinadas com seus respectivos padrões (D-xilose, ácido D-galacturônico, D-glicose e D-manose no intervalo de concentração de 0,2 - 1,2 mg/mL e pNP variando de 0,016 a 0,2 $\mu\text{mol/mL}$). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As leituras foram realizadas em leitor de placa SpectraMax M2e, Molecular DevicesCo., EUA.

Para o branco da enzima, o substrato foi substituído por água destilada. Em contrapartida, para o branco do substrato a enzima foi substituída por água destilada.

3.5. Dosagem de glicose

A glicose liberada durante a hidrólise foi estimada pelo método da glicose-oxidase (Trinder, 1969), usando o kit da Doles reagente. O ensaio de determinação de glicose foi realizado em tubo de ensaio contendo 10 μL da amostra e 1 mL do reagente de cor, incubados por 5 min a 37 °C. As leituras de absorvância foram realizadas a 510 nm em leitor de placa (SpectraMax M2e, Molecular DevicesCo., EUA).

3.6. Dosagem de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA-Sigma) como padrão. Um volume de 160 μL de amostra foi adicionado a 40 μL do reagente de Bradford. Realizou-se a leitura de absorbância das amostras a 595 nm em leitor de placa (SpectraMax M2e, Molecular DevicesCo., EUA).

3.7. Efeito da temperatura e pH

Para determinação dos efeitos de pH na atividade enzimática, os extratos brutos foram incubados a 50 °C, numa faixa de pH variando entre 3,0 – 9,0 com intervalo de pH de 0,5. Os seguintes tampões foram usados: acetato de sódio (pH 3,0 – 6,0), fosfato de sódio (6,0 – 7,0) e tris-HCl (7,0 – 9,0). Todos os tampões foram usados na concentração de 50 mM.

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi avaliado no intervalo de temperatura de 30 a 80 °C ($\Delta = 10$ °C). A determinação das atividades enzimáticas foi realizada conforme descrito no item 3.4, deste capítulo.

3.8. Determinação da Termoestabilidade

Para avaliação da termoestabilidade das atividades enzimáticas dos extratos brutos, as amostras foram incubadas em banho-maria a 50 °C e alíquotas foram retiradas nos intervalos de tempo para quantificação da atividade residual. Os ensaios enzimáticos foram realizados conforme o item 3.4.

3.9. Hidrólise enzimática

Para os experimentos de hidrólise enzimática, as condições usadas foram: agitação de 120 rpm, 50 °C e tampão acetato de sódio, pH 5,0 a 50 mM. Foram usados Erlenmeyers de 125 mL, 1% de fonte de carbono (bagaço de cana, palha de cana, casca de soja, palha de milho ou LCC - Lignin carbohydrate Complex) e a carga de proteína foi de 2 mg por grama de biomassa. Todos os experimentos de hidrólise foram realizados em

triplicata. Alíquotas foram retiradas em intervalos regulares de tempo e analisadas com relação a liberação de açúcares redutores totais pelo método de DNS (Miller, 1959) e a glicose produzida conforme o item 3.5.

3.10. Determinação da carga de proteína para hidrólise enzimática

Foram realizadas hidrólises de bagaço de cana de açúcar (1%) com carga de 0,5; 1; 2; 4 e 8 mg de proteína por grama de biomassa, com três extratos brutos selecionados. Alíquotas foram retiradas em intervalos regulares de tempo e analisadas com relação a liberação de açúcares redutores totais pelo método de DNS (Miller, 1959), e a glicose produzida conforme o item 3.5.

3.11. Planejamento de mistura para hidrólise enzimática

A tabela 2.2 descreve a estratégia de planejamento simplex das misturas para estabelecimento de consórcios enzimáticos.

Tabela 2.2. Planejamento de misturas para a hidrólise enzimática.

Mistura	CSTR	PCAT	BCAT
1	100%	-	-
2	-	100%	-
3	-	-	100%
4	50%	50%	-
5	-	50%	50%
6	50%	-	50%
7	33,3%	33,3%	33,3%
8	-	-	-

CSTR: *T. reesei* cultivado em casca de soja, PCAT: *A. terreus* cultivado em palha de cana e BCAT: *A. terreus* cultivado em bagaço de cana.

O programa Design Expert 10 foi utilizado para o planejamento de misturas e, mediante os resultados obtidos neste experimento, uma segunda rodada de planejamento simplex foi elaborada para novos pontos de misturas para a otimização da hidrólise enzimática. Os novos pontos são descritos na tabela 2.3.

Tabela 2.3. Planejamento de misturas para a segunda rodada de hidrólise enzimática.

Mistura	CSTR	PCAT	BCAT
1	33%	33%	33%
2	50%	15%	35%
3	65%	10%	25%
4	45%	10%	45%
5	60%	5%	35%
6	20%	75%	5%
7	30%	60%	10%
8	50%	-----	50%

CSTR: *T. reesei* cultivado em casca de soja, PCAT: *A. terreus* cultivado em palha de cana e BCAT: *A. terreus* cultivado em bagaço de cana.

3.12. Efeito dos compostos fenólicos

O efeito dos compostos fenólicos nas atividades enzimáticas foi avaliado utilizando os seguintes reagentes: vanilina e ácido tânico (dissolvidos em água), ácido 4-hidroxibenzóico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico e ácido cinâmico (dissolvidos em etanol 50%). As amostras enzimáticas foram pré-incubadas com os compostos fenólicos na concentração de 1 mg/mL, em temperatura ambiente (± 28 °C) por 20 min e 48h a 50 °C. Em seguida, foram realizados microensaios enzimáticos para a determinação de atividade conforme descrito no item 3.4.1. Os resultados foram expressos em atividade relativa. Como controle, os fenóis foram substituídos por água ou etanol 50%. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.13. Efeito de íons metálicos e EDTA

A influência dos íons metálicos e EDTA na atividade enzimática foi avaliada pela pré-incubação das amostras enzimáticas por 20 min a temperatura ambiente (± 28 °C) na presença de diversos compostos em concentrações finais de 1 e 10 mM. Os íons utilizados foram: CaCl₂, CoCl₂, CuSO₄, FeCl₃, FeSO₄, KCl, MgCl₂, MgSO₄, NaCl, ZnSO₄ e EDTA. Foram realizados microensaios enzimáticos para a determinação da atividade enzimática conforme item 3.4.1. Os resultados foram expressos em atividade relativa. Como controle, os íons foram substituídos por água destilada

3.14. Verificação do efeito de sinergismo

Os consórcios 1, 4 e 6 foram avaliados com relação ao seu efeito sinérgico. Portanto, a hidrólise foi realizada em bagaço de cana-de-açúcar seguindo as condições descritas no item 3.9, com dosagem final de 2 mg de proteína por grama de biomassa.

O grau de sinergismo foi calculado de acordo com a equação 1 apresentada abaixo, para comparar a atividade do consórcio enzimático com a soma das atividades dos extratos brutos individualmente (Méndez Arias *et al.*, 2016).

$$\text{Sinergismo: } \frac{\text{Rendimento (consórcio enzimático)} \sum 2 \text{ mg/g}}{\text{Rendimento dos extratos brutos (CSTR) + (PCAT) + (BCAT) } \sum 2 \text{ mg/g}} \quad \text{Eq. (1)}$$

3.15. Hidrólise enzimática em diversos substratos com consórcios enzimáticos e extratos brutos

Os substratos lignocelulósicos hidrolisados foram palha de cana, casca de soja, palha de milho e LCC (*Lignin Carbohydrate Complex*). Os extratos brutos utilizados na hidrólise foram CSTR – (*T. reesei* cultivado em casca de soja), PCAT – (*A. terreus* cultivado em palha de cana) e BCAT – (*A. terreus* cultivado em bagaço de cana). Os consórcios enzimáticos utilizados foram 1, 4 e 6. As hidrólises enzimáticas foram realizadas seguindo as condições descritas no item 3.9 com dosagem de 2 mg de proteína por grama de biomassa.

3.16. Caracterização dos substratos lignocelulósicos

3.16.1. Análise bromatológica

Os substratos lignocelulósicos (bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana, palha de milho e casca de soja) foram submetidos a processo de remoção de extrativos, utilizando o extrator de Soxhlet. As biomassas foram lavadas primeiro em água e depois em etanol 95%, cada lavagem com duração de 24 h. Depois foram secas a 65 °C, e submetidas a hidrólise com ácido sulfúrico. Foram primeiramente hidrolisadas com ácido sulfúrico

72% (m/m) a 30 °C por 1 hora. Em seguida, o ácido foi diluído para concentração final de 4% (m/m) e todo o material foi autoclavado por 2 h a 121 °C. O material foi filtrado e a parte sólida foi utilizada para quantificação de lignina ácido-insolúvel (65 °C) e teor de cinzas (575 °C). A fração de lignina ácido-solúvel foi determinada por espectrofotometria (Sluiter, Amie et al., 2008). Os carboidratos solubilizados durante a hidrólise ácida foram quantificados por cromatografia líquida de troca aniônica de alto desempenho acoplada ao detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) em um sistema de cromatografia Dionex ICS3000 Ion Chromatography DC System (Dionex Co., Sunnyvale, CA, EUA), utilizando coluna e pré-coluna CarboPac PA-1. As corridas cromatográficas foram realizadas a 20 °C com fluxo de 0,2 mL/min. As amostras foram eluídas com gradiente linear de 15 – 22 mM de NaOH (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) durante 30 minutos. A coluna foi lavada com 200 mM NaOH por 5 minutos seguido de uma etapa de reequilíbrio com 15 mM NaOH por 15 minutos durante as injeções sucessivas. Xilose, arabinose, glicose, galactose e manose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), com concentração variando de 1.25 – 60.0 µg/mL, foram utilizados como padrões na construção da curva de calibração (Silva, 2018).

3.16.2. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada com o objetivo de visualizar as estruturais das biomassas (palha de cana, bagaço de cana, casca de soja e palha de milho, preparadas conforme o item 3.1 deste capítulo). As amostras foram submetidas à secagem a 65 °C, metalizadas em equipamento *Sputter Coater SCD 050* (Balzers, Alemanha) e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura modelo JMS 7001F (JEOL, Japão) utilizando voltagem de 15 kV.

3.17. Análise estatística

As análises estatísticas utilizadas para se comprovar a diferença entre os pontos de hidrólise e os tratamentos foram feitas através do software *Statistic 10*, os dados foram submetidos à ANOVA com *post-hoc* teste LSD Fisher com nível de significância de 0,05%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. *Screening* dos extratos brutos enzimáticos

A primeira etapa deste trabalho consistiu em realizar um *screening* das atividades enzimáticas dos extratos brutos provenientes do cultivo em fermentação submersa por 7 dias com os seguintes fungos: *A. terreus*, *A. nainiana*, *T. reesei*, *A. tamarii*, em diferentes substratos (Palha de cana, Bagaço de cana, Casca de soja e Palha de milho). Foram obtidos 16 extratos brutos, os quais foram denominados primeiramente pela fonte de carbono, PC - Palha de cana, BC - Bagaço de cana, CS - Casca de soja e PM - Palha de milho, seguido do fungo, AT – *A. terreus*, AN – *A. nainiana*, TR – *T. reesei* e AO – *A. tamarii*.

Após o término do cultivo, os extratos brutos foram filtrados e quantificados com relação a proteínas e às seguintes atividades enzimáticas: CMCase, xilanase, pectinase, mananase, avicelase, Fpase, arabinofuranosidase, β -xilosidase, β -mananase e β -glicosidase.

Os resultados seguem expressos em atividade específica (UI/mg) e proteínas (ug/mL) (tabela 2.4 e 2.5).

O *screening* enzimático foi realizado visando uma avaliação completa dos perfis enzimáticos dos extratos brutos. Ao usar diferentes biomassas lignocelulósicas como substratos foi possível induzir atividades holocelulolíticas distintas, pois cada fonte de carbono apresenta uma constituição bromatológica particular. Por exemplo, a palha de cana apresentou maior proporção de celbiose em relação aos demais substratos, enquanto que a maior proporção de glicose foi observada na palha de milho. O item 4.11 discute a constituição bromatológica dos substratos lignocelulósicos usados nesse estudo. Estudos com *T. reesei* descrevem que o proteoma analisado sob diferentes condições, a quantidade e os tipos de proteínas secretadas são alterados devido a fonte de carbono para crescimento do fungo (Stappler *et al.*, 2017).

É necessário explorar substratos de baixo custo para a produção de enzimas e, os agro-resíduos representam uma opção para tal objetivo (Ahmed *et al.*, 2016). Neste trabalho, optou-se por fazer a indução das enzimas com fontes de carbono lignocelulósicas, visando a produção de um coquetel enzimático de baixo custo. Além dos resíduos lignocelulósicos utilizados neste trabalho (bagaço e palha de cana, casca de

soja e palha milho), outros trabalhos testaram como fonte de carbono o farelo de arroz, palha de trigo, caule de banana, resíduos de eucalipto, casca de laranja, maçã, entre outros, e diferentes enzimas foram secretadas, demonstrando o potencial dos micro-organismos em secretar diferentes enzimas quando cultivados em diferentes fontes de carbono lignocelulósicas (Anwar, Gulfranz e Irshad, 2014).

A atividade mais expressiva de pectinase ocorreu quando *T. reesei* foi cultivado em casca de soja (8,6 UI/mg). Para Gomes (2017), a maior atividade de pectinase foi observada quando *Clonostachys byssicola* foi cultivado em casca de soja, também foi utilizado sabugo de milho, engaço de bananeira e bagaço de cana-de-açúcar. Segundo Schirmer-Michel *et al.* (2008), 30% da casca de soja é constituída de pectina, o que induz a produção de pectinases. As outras fontes de carbono também induziram alta atividade de pectinase em *T. reesei*, demonstrando que este fungo apresenta potencial para produção desta enzima (7,9; 7,6 e 7,2 UI/mg em bagaço de cana, palha de milho e palha de cana, respectivamente), conforme dados mostrados na tabela 2.4.

Dentre os quatro fungos avaliados, as maiores atividades de xilanase e CMCCase foram observadas nos extratos brutos produzidos por *A. terreus*, em todos os substratos, conforme também demonstrado na tabela 2.4. Além disso, a maior produção das duas enzimas ocorreu quando o *A. terreus* foi cultivado em bagaço de cana (17,5 UI/mg para xilanase e 7,7 UI/mg para CMCCase), seguido de palha de milho, palha de cana e casca de soja (13,5; 13,5 e 9,0 UI/mg para xilanase e para 6,7; 5,3 e 3,6 UI/mg para CMCCase nesta ordem). A elevada produção de xilanases de *A. terreus* cultivado em casca de soja e bagaço de cana estão de acordo com os dados previamente descritos por Moreira (2013). No trabalho de Moreira (2013), *A. terreus* foi cultivado em bagaço de cana, casca de soja e “piolho de algodão” (resíduo proveniente do descaroçamento do algodão). A maior atividade volumétrica xilanolítica foi obtida quando o fungo foi cultivado em casca de soja e a maior atividade de CMCCase foi obtida quando cultivado em bagaço de cana.

No trabalho de Siqueira (2010), as atividades de CMCCase e xilanase do *A. terreus* cultivado em bagaço de cana com as mesmas condições deste trabalho apresentaram atividade de CMCCase 7,3 UI/mg levemente inferior ao encontrado neste trabalho e a atividade de xilanase foi de 55 UI/mg, superior ao encontrado nesta tese.

Tabela 2.4. Atividades enzimáticas específicas (UI/mg) dos extratos brutos.

Fungos	Fonte de carbono	Pectinase	Mananase	Xilanase	CMCase	Avicelase	FPase
<i>A. terreus</i>	Palha de cana	2,51 ± 0,04	1,25 ± 0,27	13,51 ± 0,29	5,25 ± 0,46	0,58 ± 0,06	1,67 ± 0,10
	Casca de soja	4,79 ± 0,19	2,01 ± 0,05	8,97 ± 0,37	3,56 ± 0,05	0,29 ± 0,06	1,09 ± 0,18
	Palha de milho	0,00	1,44 ± 0,21	13,54 ± 0,85	6,67 ± 0,10	1,10 ± 0,00	3,75 ± 0,16
	Bagaço de cana	0,00	0,00	17,51 ± 0,12	7,70 ± 0,33	0,61 ± 0,16	3,92 ± 0,16
<i>A. tamaritii</i>	Palha de cana	2,34 ± 0,16	2,52 ± 0,33	7,43 ± 0,19	2,46 ± 0,58	0,26 ± 0,09	1,55 ± 0,39
	Casca de soja	2,88 ± 0,18	4,72 ± 0,06	4,50 ± 0,29	1,51 ± 0,04	0,18 ± 0,02	1,35 ± 0,14
	Palha de milho	1,30 ± 0,09	0,72 ± 0,16	4,45 ± 0,23	1,20 ± 0,16	0,10 ± 0,02	0,90 ± 0,13
	Bagaço de cana	0,88 ± 0,36	0,00	6,43 ± 0,09	2,12 ± 0,14	0,20 ± 0,08	1,29 ± 0,16
<i>A. nainiana</i>	Palha de cana	1,49 ± 0,37	1,06 ± 0,25	5,53 ± 0,39	2,12 ± 0,39	0,37 ± 0,06	1,33 ± 0,02
	Casca de soja	1,66 ± 0,09	3,41 ± 0,48	7,80 ± 0,42	3,33 ± 0,07	0,33 ± 0,08	1,89 ± 0,11
	Palha de milho	0,00	0,00	4,63 ± 0,30	2,02 ± 0,23	0,19 ± 0,06	0,97 ± 0,04
	Bagaço de cana	0,00	0,00	5,85 ± 0,17	2,78 ± 0,40	0,24 ± 0,02	1,42 ± 0,20
<i>T. reesei</i>	Palha de cana	7,16 ± 0,52	3,10 ± 0,04	3,89 ± 0,04	1,77 ± 0,01	0,38 ± 0,05	1,68 ± 0,06
	Casca de soja	8,58 ± 0,42	3,41 ± 0,11	4,12 ± 0,17	1,69 ± 0,13	0,47 ± 0,04	2,00 ± 0,09
	Palha de milho	7,58 ± 0,63	3,20 ± 0,28	4,13 ± 0,28	1,70 ± 0,01	0,48 ± 0,02	2,00 ± 0,15
	Bagaço de cana	7,91 ± 0,74	3,71 ± 0,26	6,13 ± 0,55	2,32 ± 0,11	0,40 ± 0,05	2,54 ± 0,09

A produção de celulases tem sido descrita em muitas espécies de *Aspergillus*. *A. terreus* tem sido reportado como produtor de celulases (Sohail, Ahmad e Khan, 2016, Mirzaakhmedov *et al.*, 2007, Gao *et al.*, 2007). Assim, além de se destacar na atividade de CMCase, também se destacou nas atividades de avicelase, FPase (tabela 2.4) e β -glicosidase (tabela 2.5). As atividades mais significativas de FPase e β -glicosidase foram produzidas por *A. terreus* quando cultivado em bagaço de cana (3,9 UI/mg) e palha de cana (3,6 UI/mg), respectivamente. No trabalho de Siqueira (2010), a atividade de Fpase e avicelase de *A. terreus*, quando cultivado em bagaço de cana, foi de 5,2 UI/mg e 0,16 UI/mg, respectivamente.

Apesar do bagaço e palha de cana conterem níveis significativos de lignina comparado com a casca de soja e palha de milho (item 4.11), esse fator parece não ter influenciado a produção de enzimas, uma vez que as maiores atividades de holocelulases foram encontradas no bagaço de cana.

Sohail, Ahmad e Khan (2016) também exploram o potencial de *A. terreus* MS105 na produção de celulases por meio do cultivo em bagaço de cana, sabugo de milho e grama, tanto por fermentação em estado sólido (SSF) quanto por fermentação submersa (Smf). Os meios de cultivo (SSF - SmF) influenciaram as respostas, assim como a fonte de carbono. A maior atividade de endoglicanase ($\pm 0,55$ UI/mL) foi obtida quando *A. terreus* foi cultivado em bagaço de cana de açúcar (SSF), assim como observado neste trabalho e no trabalho de Moreira (2013). Para a atividade de β -glicosidase, os maiores resultados foram obtidos por fermentação submersa quando cultivado em sabugo de milho e grama (Sohail, Ahmad e Khan, 2016). Fica evidente que o *A. terreus* tem potencial em produzir celulases em diferentes substratos lignocelulósicos.

A maior atividade de mananase foi obtida quando o fungo *A. tamarii* foi cultivado em casca de soja (4,7 UI/mg), seguido de *T. reesei* em bagaço de cana (3,7 UI/mg) (tabela 2.4). Para Costa (2017), a casca de soja é uma fonte de carbono indutora de mananase, em virtude da grande quantidade de manana presente na estrutura do resíduo. Cabe ressaltar que dentre os resíduos analisados a casca de soja foi a única a apresentar manose em sua composição, resultado apresentado no item 4.11.

Tabela 2.5. Atividades enzimáticas específicas (UI/mg) dos extratos brutos e quantificação de proteínas totais.

Fungos	Fonte de carbono	pNPGase	pNPase	pNPMase	pNPXase	Bradford
<i>A. terreus</i>	Palha de cana	3,64 ± 0,09	1,51 ± 0,12	0,00	0,83 ± 0,02	0,05 ± 0,00
	Casca de soja	1,94 ± 0,12	2,69 ± 0,04	0,00	0,76 ± 0,05	0,08 ± 0,00
	Palha de milho	1,85 ± 0,08	1,16 ± 0,04	0,00	0,41 ± 0,04	0,04 ± 0,00
	Bagaço de cana	1,51 ± 0,05	0,40 ± 0,09	0,00	0,33 ± 0,01	0,03 ± 0,00
<i>A. tamaritii</i>	Palha de cana	0,73 ± 0,10	0,41 ± 0,01	0,00	0,20 ± 0,01	0,09 ± 0,00
	Casca de soja	1,65 ± 0,16	0,80 ± 0,01	0,00	0,10 ± 0,01	0,16 ± 0,00
	Palha de milho	0,44 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,00	0,25 ± 0,01	0,16 ± 0,00
	Bagaço de cana	0,54 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,00	0,18 ± 0,01	0,09 ± 0,00
<i>A. nainiana</i>	Palha de cana	0,48 ± 0,03	0,04 ± 0,03	0,00	0,03 ± 0,03	0,08 ± 0,00
	Casca de soja	0,71 ± 0,05	0,03 ± 0,02	0,00	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,00
	Palha de milho	0,41 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,00	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,00
	Bagaço de cana	0,83 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,00	0,12 ± 0,02	0,07 ± 0,00
<i>T. reesei</i>	Palha de cana	1,70 ± 0,06	3,00 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,23 ± 0,00	0,20 ± 0,01
	Casca de soja	1,73 ± 0,01	3,19 ± 0,07	0,20 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,20 ± 0,01
	Palha de milho	1,74 ± 0,09	3,34 ± 0,02	0,00	0,18 ± 0,02	0,21 ± 0,00
	Bagaço de cana	2,23 ± 0,13	2,54 ± 0,09	0,04 ± 0,02	0,28 ± 0,03	0,12 ± 0,00

pNPGase: β -glicosidase; pNPase: arabinofuranosidase; pNPMase: β -manosidase; pNPXase: β -xilosidase

Com relação à atividade de β -xilosidase, a maior atividade foi também observada nos extratos brutos produzidos por *A. terreus* (tabela 2.5). Os substratos que induziram maiores atividades dessa enzima por *A. terreus* foram a palha de cana, seguido de casca de soja, palha de milho e, por último, bagaço de cana. Trabalho como o de Chakrabarti e Ranu (1995) relata o potencial do *A. terreus* em produzir β -xilosidase (12,9 UI/mg no extrato bruto).

Pode-se observar na tabela 2.5 que o fungo *T. reesei* apresentou as maiores atividades de β -manosidase e arabinofuranosidase. Esses resultados, somados à alta atividade de pectinase, demonstra o potencial do *T. reesei* em secretar altos níveis de diferentes enzimas. Peciulyte *et al.* (2014), ao analisarem o sobrenadante do cultivo de *T. reesei* encontraram celulases, hemicelulases, outras glicosil hidrolases, ligninases, enzimas da família AA9, swolenina, entre outras.

Cabe ressaltar que a produção industrial de enzimas celulolíticas é predominantemente realizada por *T. reesei*. Olsson *et al.* (2003) usaram celulose e polpa de beterraba como fonte de carbono para a produção de enzimas e descreveram que a esporulação, a produção de proteínas e a atividade enzimática foram dependentes da natureza do substrato. Os autores verificaram ainda que as atividades de endoglicanase e endoxilanase foram produzidas ao longo do cultivo (141 h), enquanto a atividade de arabinosidase só pode ser mensurada a partir de 34 h de cultivo. Em contrapartida, a atividade de pectinase oscilou ao longo do cultivo.

Avaliando-se as atividades específicas dos extratos brutos estatisticamente (ANOVA), cabe ressaltar que o extrato bruto de *T. reesei* cultivado em casca de soja apresentou as maiores atividades de pectinase e β -manosidase ($p < 0,05$). O extrato de *A. terreus* cultivado em bagaço de cana apresentou as maiores atividades de xilanase, CMCase e avicelase, exceto a atividade de FPase que não diferiu de *A. terreus* cultivado em palha de milho. *A. terreus* cultivado em palha de cana apresentou as maiores atividades de β -xilosidase e β -glicosidase apresentando $p < 0,05$.

O intuito deste trabalho era produção de consórcio enzimático mediante combinação dos extratos brutos, assim, o *screening* serviu de ferramenta para escolher os extratos brutos que apresentavam melhor desempenho de atividade. Um exemplo conhecido da importância do *screening* enzimático está na formulação de coquetéis enzimáticos utilizando extratos brutos de *T. reesei*, um micro-organismo muito utilizado para a produção de enzimas hidrolíticas. Entretanto, *T. reesei* apresenta baixa atividade de β -glicosidase (Juhász, Egyházi e Réczey, 2005). A suplementação dessa enzima em

coquetéis enzimáticos é uma estratégia adotada para compensar a baixa atividade (Ma e Ruan, 2015; Xiao *et al.*, 2004). Assim o que se almejou foi escolher extratos brutos que possam ser complementares entre si e capazes de atuar sinergicamente na hidrólise enzimática.

Como demonstrado pelos resultados, nota-se que o uso de resíduos agrícolas como fonte de carbono pode influenciar a produção de enzimas. Essa estratégia se mostrou eficaz para o estabelecimento de consórcios enzimáticos, uma vez que o perfil enzimático foi diferente entre os extratos brutos. Entretanto, para a produção de enzimas em larga escala, a compreensão e controle de parâmetros, como a natureza do substrato lignocelulósico, o pH do meio, a disponibilidade de nutrientes, a temperatura de fermentação, entre outras, são essenciais (Singhania *et al.*, 2010).

Aliados aos resíduos lignocelulósicos, esses parâmetros também são fontes para a prospecção de novas enzimas (Maitan-Alfenas, Visser e Guimarães, 2015). A prospecção de novas enzimas é extremamente importante, não somente para a busca por enzimas mais eficientes, como também para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na degradação dos polímeros que constituem a parede celular vegetal (Gomes, 2017). Nesse sentido, os micro-organismos utilizados (*A. nainiana*, *A. terreus*, *A. tamaritii* e *T. reesei*) foram isolados de diferentes locais e resíduos.

4.2. Estudo do efeito do pH, temperatura e termoestabilidade na atividade enzimática dos extratos brutos.

A temperatura, assim como o pH e a estabilidade térmica das enzimas são fatores importantes a serem caracterizados, uma vez que podem afetar positiva ou negativamente o desempenho das enzimas. Desta forma, visando a possível aplicação industrial dos extratos brutos, estes parâmetros também foram avaliados.

As atividades de xilanase e CMCase dos extratos brutos provenientes dos cultivos em diferentes fontes de carbono foram testados quanto ao pH e à temperatura (tabela 2.6). A termoestabilidade de CMCase está demonstrada na tabela 2.7.

Com relação à atividade de xilanase, observou-se maior atividade entre os pHs 4,5 e 6,0, e 60 °C para todos os extratos brutos avaliados. O extrato bruto de *T. reesei* apresentou maior atividade no intervalo de 40-60 °C.

Tabela 2.6. Caracterização físico-química das atividades de CMCase e xilanase presentes nos extratos brutos avaliados.

Fungos	Fonte de carbono	Xilanase		CMCase	
		pH	Temperatura (°C)	pH	Temperatura (°C)
<i>A. terreus</i>	Palha de cana	4,5	60	4,0	40 – 50
	Casca de soja	4,5	60	4,0 - 4,5	40 – 60
	Palha de milho	5,5	60	4,0	40 – 60
	Bagaço de cana	4,5	60	4,0 - 4,5	40 – 50
<i>A. tamarii</i>	Palha de cana	4,5	50	4,0	40 – 50
	Casca de soja	4,5	60	4,0	40
	Palha de milho	5,5	60	4,0	40 – 50
	Bagaço de cana	4,5	60	4,0	50
<i>A. nainiana</i>	Palha de cana	5,5	60	4,0	50
	Casca de soja	5,5	60	4,0	50 – 60
	Palha de milho	5,0	60	5,5	50
	Bagaço de cana	6,0	60	4,5 - 5,5	50
<i>T. reesei</i>	Palha de cana	5,0	40 – 60	4,0	50
	Casca de soja	6,0	40 – 60	5,0	50
	Palha de milho	5,5/6,0	40 – 60	4,0	50
	Bagaço de cana	4,5	40 – 60	4,0 - 4,5	50

A atividade de CMCase variou de 40 a 60 °C em todos os extratos brutos avaliados, e o pH variou de 4,0 a 5,5. Grande parte das celulases apresentam atividade ótima com temperatura variando entre 45-55 °C e pH entre 4,0 - 5,0 (Galbe e Zacchi, 2002; Talebnia, Karakashev e Angelidaki, 2010).

Enzimas naturalmente termoestáveis são desejáveis do ponto de vista industrial, assim não há necessidade de investir no engenheiramento para estabilizar as enzimas em temperaturas mais altas (Asial *et al.*, 2013). Todos os extratos brutos apresentaram termoestabilidade acima de 72 h para a atividade de CMCase a 50 °C, o que evidencia o potencial biotecnológico dos extratos brutos caracterizados neste trabalho. Com 72 h de incubação nenhum dos extratos brutos atingiu o tempo de meia vida (tabela 2.7).

Tabela 2.7 Termoestabilidade dos extratos brutos com relação a atividade de CMCase (UI/mL).

Fungos	Fonte de carbono	1h	DP	24h	DP	72h	DP	168h	DP
<i>A. terreus</i>	Palha de cana	0,261	0,010	0,257	0,010	0,262	0,024	0,261	0,025
	Casca de soja	0,277	0,006	0,267	0,021	0,252	0,028	0,274	0,015
	Palha de milho	0,246	0,003	0,243	0,008	0,278	0,009	0,258	0,023
	Bagaço de cana	0,225	0,023	0,228	0,018	0,206	0,034	0,232	0,029
<i>A. tamarii</i>	Palha de cana	0,165	0,029	0,140	0,008	0,129	0,007	0,127	0,085
	Casca de soja	0,274	0,015	0,229	0,029	0,180	0,014	0,136	0,038
	Palha de milho	0,154	0,031	0,142	0,003	0,145	0,010	0,094	0,024
	Bagaço de cana	0,168	0,016	0,141	0,003	0,131	0,029	0,124	0,011
<i>A. nainiana</i>	Palha de cana	0,129	0,012	0,096	0,000	0,102	0,010	0,108	0,010
	Casca de soja	0,199	0,021	0,176	0,004	0,173	0,008	0,151	0,055
	Palha de milho	0,154	0,014	0,160	0,006	0,140	0,007	0,107	0,021
	Bagaço de cana	0,176	0,008	0,149	0,005	0,166	0,024	0,158	0,013
<i>T. reesei</i>	Palha de cana	0,348	0,002	0,281	0,045	0,280	0,010	0,227	0,024
	Casca de soja	0,345	0,027	0,311	0,012	0,319	0,014	0,216	0,025
	Palha de milho	0,354	0,001	0,348	0,027	0,253	0,020	0,286	0,013
	Bagaço de cana	0,284	0,014	0,256	0,012	0,189	0,028	0,221	0,011

DP: desvio-padrão

Mediante os resultados apresentados anteriormente, relativos ao *screening* enzimático dos extratos brutos, bem como as caracterizações de pH, temperatura e termoestabilidade, dentre os 16 extratos brutos, 3 extratos brutos foram selecionados para a formulação do consórcio enzimático. Os extratos selecionados apresentaram características físico-químicas desejáveis para aplicações industriais, como elevada termoestabilidade (maior que 72 horas), atividade em altas temperaturas e pHs ácidos, além de apresentar as mais altas atividades avaliadas no *screening* enzimático. Os extratos brutos selecionados foram CSTR - *T. reesei* cultivado na casca de soja, PCAT - *A. terreus* cultivado na palha de cana e BCAT - *A. terreus* cultivado no bagaço de cana. As figuras 2.2, 2.3 e 2.4 apresentam detalhadamente os parâmetros físico-químicos do efeito da temperatura e do pH, além da termoestabilidade dos extratos brutos selecionados.

Conforme mostrado na figura 2.2 as maiores atividades de pectinase e de CMCase dos extratos brutos foram a 50 °C. Para Jaramillo (2014), a maior atividade para a pectinase do extrato bruto de *A. oryzae* foi a 40 °C.

Com relação a atividade de xilanase, observa-se uma maior atividade a 60 °C para todos os extratos brutos, o que vem ao encontro do resultado obtido por Solórzano Lemos *et al.*, (2000), no qual a máxima atividade de xilanase produzida pelo extrato bruto de *A. awamori* foi a 60 °C. Siqueira (2010) ressalta que os melhores resultados do efeito da temperatura para xilanase produzida por algumas espécies de fungos filamentosos estão na faixa entre 40 °C e 60 °C, o que condiz com os resultados deste trabalho.

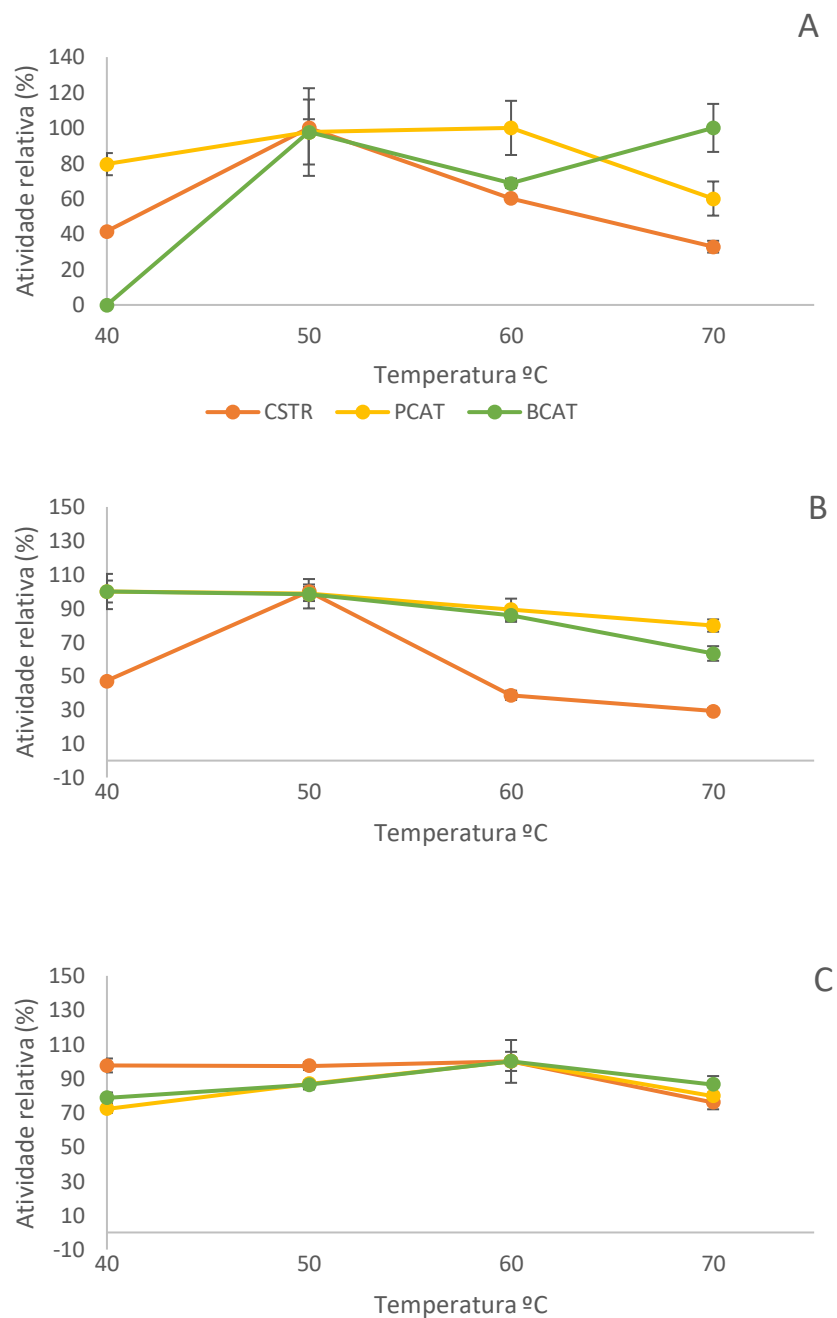


Figura 2.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática dos extratos brutos. A: atividade de pectinase, B: atividade de CMCase e C: atividade de xilanase — CSTR (*T. reesei* em casca de soja), — PCAT (*A. terreus* em palha de cana) e — BCAT (*A. terreus* em bagaço de cana).

O efeito do pH na atividade enzimática é uma importante ferramenta para avaliar os perfis de atuação dos extratos enzimáticos. Os extratos brutos selecionados mostraram-se estáveis em uma ampla faixa de pHs, com maiores atividades em pHs ácidos (figura

2.3). Outros pesquisadores relataram atividade máxima de CMCase de extratos brutos em pH ácido, como, por exemplo, em *Penicillium funiculosum* e *A. fumigatus* (Castro *et al.*, 2010, Lima *et al.*, 2005). Entretanto, *Penicillium* sp. TG2 apresentou maior atividade em pH 7,0. (Jung *et al.*, 2015).

Assim como descrito no trabalho de Meryandini (2017), a xilanase (do extrato bruto de *Streptomyces*) apresentou alta atividade entre os pH 5,0 e 6,0. Para Yopi e Meryandini (2017) o *Paenibacillus* sp. apresentou a maior atividade de xilanase em pH 5,0.

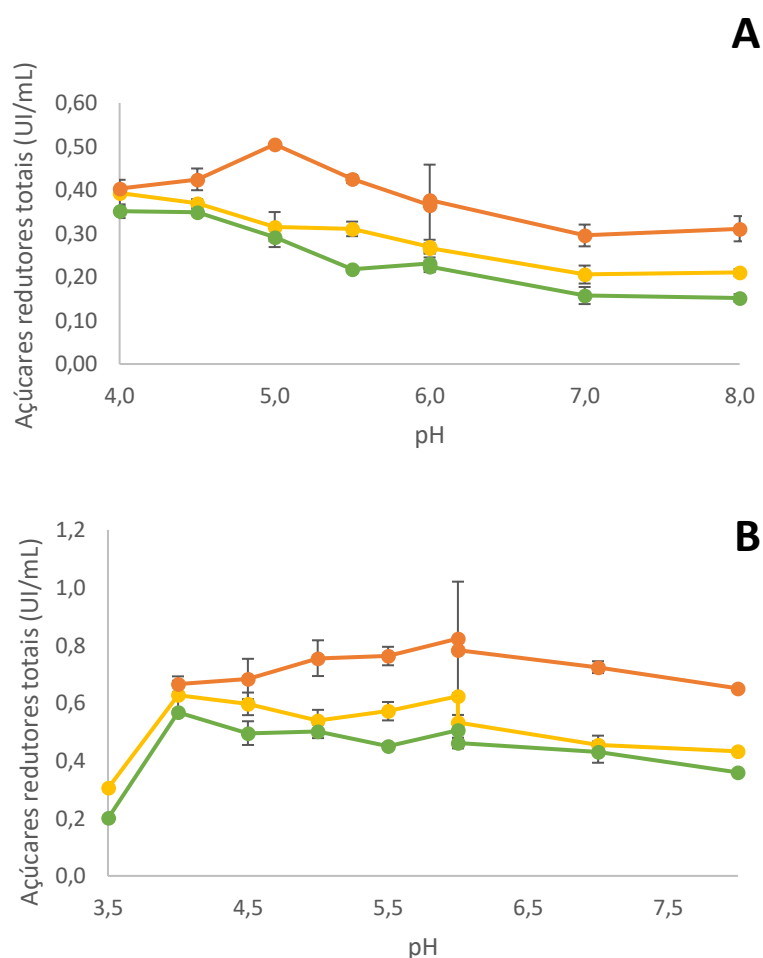


Figura 2.3. Efeito do pH na atividade dos extratos brutos. A: Atividade de CMCase e B: atividade de xilanase. —●— CSTR (*T. reesei* em casca de soja), —■— PCAT (*A. terreus* em palha de cana) e —●— BCAT (*A. terreus* em bagaço de cana).

As CMCase dos extratos brutos selecionados foram termoestáveis, com tempo de meia vida superior às 72 h (fig. 2.4). Com 72 h de incubação, os extratos brutos de CSTR e PCAT perderam 8% da atividade relativa, enquanto que o BCAT apresentou 100% da atividade relativa. A termoestabilidade dos extratos brutos foi avaliada por mais tempo no item 4.6 e superou o tempo de meia vida encontrado por Sciuto (2015) de 7 dias para atividade de CMCase de *Penicillium fellutanum* cultivado em casca de soja.

Ran *et al.*, (2012) relatam o quanto a temperatura pode influenciar a eficiência enzimática. Nesse trabalho, quando aumentaram de 30 para 50 °C houve aumento da eficiência da hidrólise. No entanto, com o aumento para 60 °C, as enzimas apresentaram uma diminuição da atividade, seguido de desnaturação.

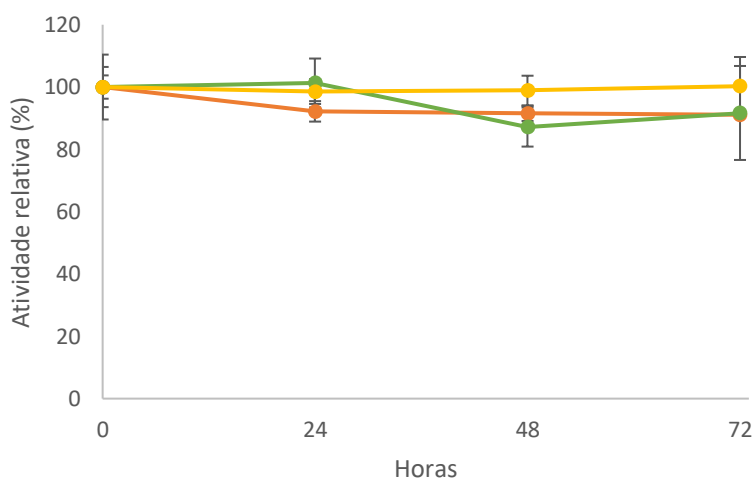


Figura 2.4 Termoestabilidade da atividade de CMCase dos extratos brutos — CSTR (*T. reesei* em casca de soja), — PCAT (*A. terreus* em palha de cana) e — BCAT (*A. terreus* em bagaço de cana).

O foco deste trabalho era escolher extratos brutos que juntos pudessem estabelecer consórcios enzimáticos, com vista a aplicação na hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica. Os resultados obtidos pelas enzimas no efeito de pH e temperatura condizem com os parâmetros de pH e temperatura relatados na literatura para a hidrólise enzimática. Na literatura encontramos vários trabalhos como os de Bussamra, Freitas e Costa (2015) e Hu, Arantes e Saddler (2011) que realizaram a hidrólise a 50 °C, usando pH 4.8 e pH 5.0, respectivamente, assim como o de Ma e Ruan (2015), que atingiram maiores rendimentos de produção de glicose e xilose a 50 °C e pH 5,0 e ressaltam que determinados valores de pH e temperatura podem levar a inativação das enzimas.

Baseado nos resultados experimentais e na literatura, as condições de hidrólise foram definidas em pH 5,0 a 50 °C e ciente que o tempo de hidrólise pode ser superior a 72 h.

4.3. Determinação da carga de proteínas

Normalmente as preparações enzimáticas são desenvolvidas com base em carga de proteína (mg/g de substrato) ou atividade de Fpase (Viikari, Vehmaanperä e Koivula, 2012). Neste trabalho optou-se por adotar a carga de proteína (mg/g de biomassa), uma vez que uma grande variedade de enzimas é requerida para atuarem sinergicamente na desconstrução da biomassa lignocelulósica como um todo.

Visando-se determinar a carga de proteína empregada na elaboração do consórcio enzimático, realizou-se uma hidrólise de bagaço de cana de açúcar com diferentes cargas de proteínas, conforme mostrado na figura 2.5.

Conforme pode-se observar, quanto maior a carga de proteína, maior foi a liberação de açúcares redutores totais. Ao avaliar as hidrólises de todos os extratos brutos com 48 h, as cargas de 0,5 e 1 mg não diferem estatisticamente na hidrólise realizada pelo extrato bruto de *A. terreus*, cultivado em palha de cana. Por sua vez, na hidrólise realizada pelo extrato bruto de *A. terreus* cultivado em bagaço de cana, as dosagens de 1 e 2 mg não apresentam diferenças. Entretanto, na hidrólise realizada pelo *T. reesei* cultivado em casca de soja, todas as dosagens diferem entre si (ANOVA $p < 0,05$).

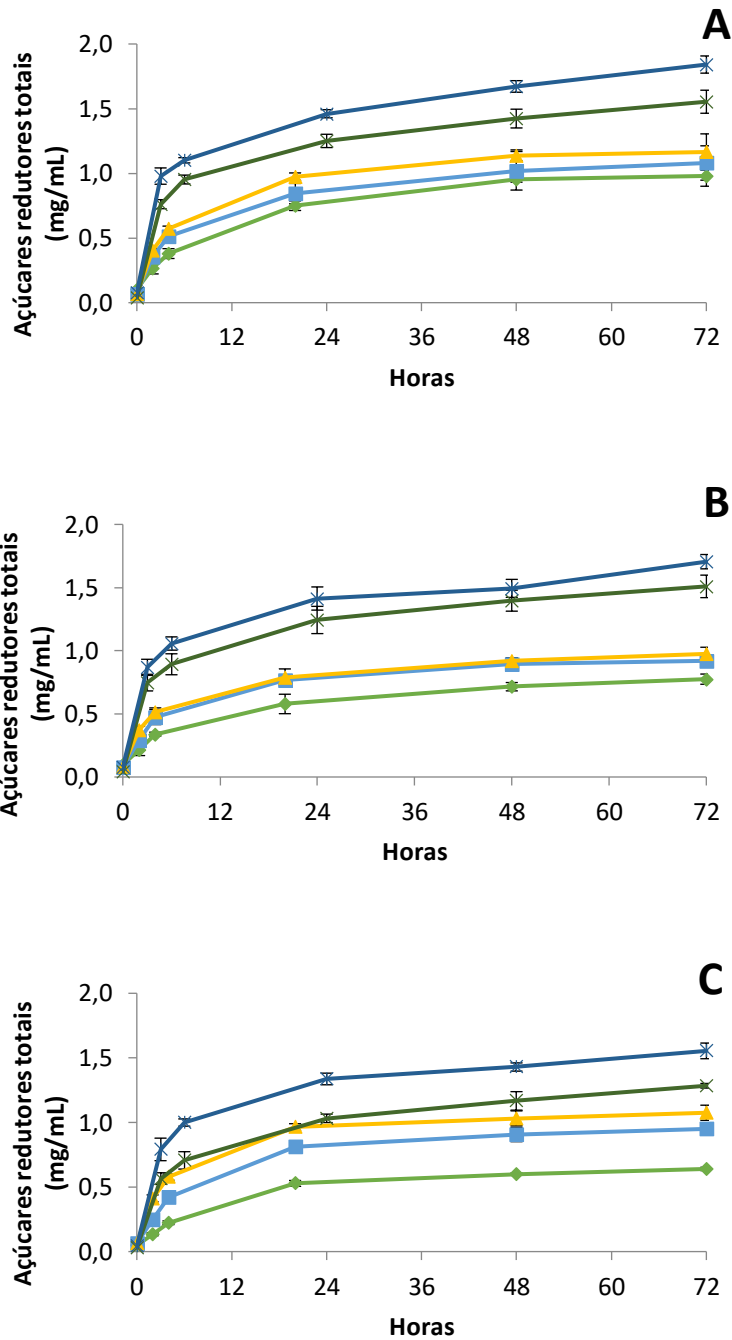


Figura 2.5. Liberação de açúcares redutores totais em função das diferentes cargas de proteínas (\blacklozenge 0,5 \blacksquare 1 \blacktriangle 2 \blackcross 4 \blackast 8 mg/grama de biomassa) usadas durante hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar com os extratos brutos. A: *A. terreus* cultivado em palha de cana, B: *A. terreus* cultivado em bagaço de cana e C: *T. reesei* cultivado em casca de soja.

Como já mencionado ao longo da tese, o *T. reesei* é utilizado como modelo de hidrólise enzimática em muitos trabalhos. Se avaliarmos a liberação de ART (açúcares redutores totais) pelo extrato bruto de *T. reesei* com relação a carga de enzima, notaremos que ao dobrar a carga de 2 mg para 4 mg a liberação de ART aumentou em 13% (48 h). Ao dobrar a carga de 4 mg para 8 mg o aumento da liberação de ART foi de 22%. Seria justificado o uso de uma carga enzimática maior se a liberação de ART fosse proporcional ao aumento da carga, o que não foi o perfil observado.

Dessa forma, a carga de proteína padronizada para este trabalho foi de 2 mg de proteína/grama de biomassa. Por se tratarem de micro-organismos selvagens, estes apresentam uma baixa expressão de proteínas, o que limitaria uma produção em grande escala, e na literatura encontra-se trabalhos que aplicaram a mesma carga de proteína. E com 2 mg foi possível avaliar o desenvolvimento da hidrólise na presença dos extratos brutos.

Jia *et al.* (2015) também utilizaram em seu trabalho a carga de 2 mg de proteína por grama de biomassa na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar com uma endoglicanase (*Thermobifida fusca*) e duas endoxilanasas (*Clostridium thermocellum* e *T. fusca*). Por outro lado, Agrawal *et al.*, (2015) observaram que o aumento da carga de proteínas aumentava o rendimento da hidrólise, até a carga de 15 mg/g de biomassa. A partir dessa concentração, o aumento da carga de proteína não refletiu em um aumento da taxa de hidrólise, mostrando uma saturação da reação. Foi constatado então que a sacarificação máxima (mais de 85%) foi conseguida com cargas variando entre 10-15 mg de proteína/g de biomassa.

A adoção de teste de dosagem enzimática é extremamente importante para a indústria, pois é interessante a utilização de cargas de enzimas relativamente baixas, mas capazes de conseguir uma hidrólise rápida e com alto rendimento (Hu, Arantes e Saddler, 2011).

4.4. Planejamento do consórcio enzimático

Após definidas as condições de hidrólise e a carga de proteína a ser utilizada, os três extratos brutos selecionados (CSTR, BCAT e PCAT) foram utilizados na produção do consórcio enzimático. Para isso, foi adotado o planejamento de misturas simplex.

Assim, os extratos brutos foram avaliados isoladamente (100%), em combinações binárias (50%) e misturando os 3 extratos brutos (33%). A figura 2.6 mostra a liberação de açúcares redutores totais e também a liberação de glicose, na hidrólise de bagaço de cana de açúcar pelos consórcios enzimáticos e pelos extratos brutos.

Observa-se que ocorre uma tendência de estabilização na liberação de glicose a partir de 72 h, entretanto, com relação à liberação de ART, nota-se uma estabilização entre 48 e 72 h, depois a liberação de ART volta a aumentar. Na ausência de enzima, (linha 8 - branco), não há liberação de glicose ou açúcares redutores totais.

A maior liberação de glicose foi obtida pelo extrato bruto de *A. terreus* cultivado em palha de cana (100% PCAT), seguido do consórcio 5 (50% PCAT, 50% BCAT) e do consórcio 4 (50% CSTR e 50% PCAT). Em ambos os consórcios, há presença do *A. terreus* cultivado em palha de cana que, no *screening* enzimático, foi o que apresentou atividade mais elevada de β -glicosidase (item 4.1). Em termos de liberação de açúcares redutores totais, as maiores liberações ocorreram usando o consórcio enzimático 4, seguido do extrato bruto de *A. terreus* cultivado em palha de cana (100% PCAT).

O teste de ANOVA demonstrou que há diferença significativa entre os diferentes tempos analisados durante a hidrólise ($P = 0,000$). Pelo teste pareado de Fisher, nota-se que há diferença entre o tempo de 48 horas e os demais tempos avaliados. O tempo de 48 horas foi definido como o tempo ideal para hidrólise. Dessa forma é possível obter uma elevada liberação de açúcares redutores totais com um tempo relativamente curto, o que acarretará em menores custos no processo total.

O tempo usualmente descrito na literatura para a hidrólise enzimática varia entre 48 a 72 horas. Normalmente, o tempo máximo é de 72 horas, pois os rendimentos subsequentes não compensam o maior tempo de hidrólise. Bussamra, Freitas e Costa (2015) e Buaban *et al.*, (2010), na hidrólise de bagaço de cana, e Agrawal *et al.*, (2015), na hidrólise de palha de trigo, executaram hidrólises enzimáticas por 72 horas. No trabalho de Pengilly *et al.*, (2015), com de 72 h de hidrólise e carga enzimática mínima, foi possível converter 80% da biomassa em glicose.

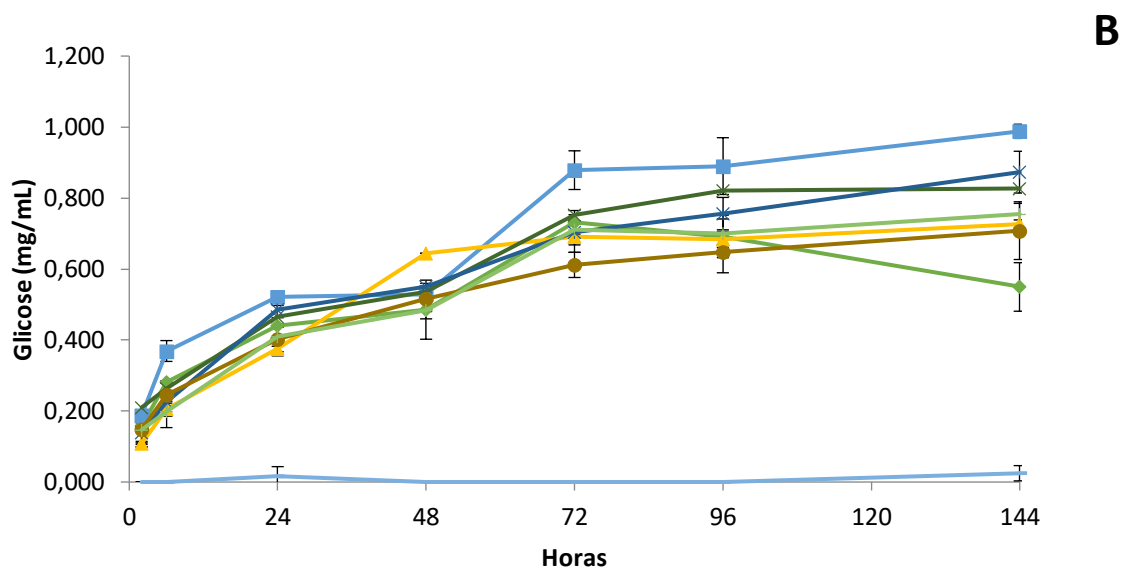
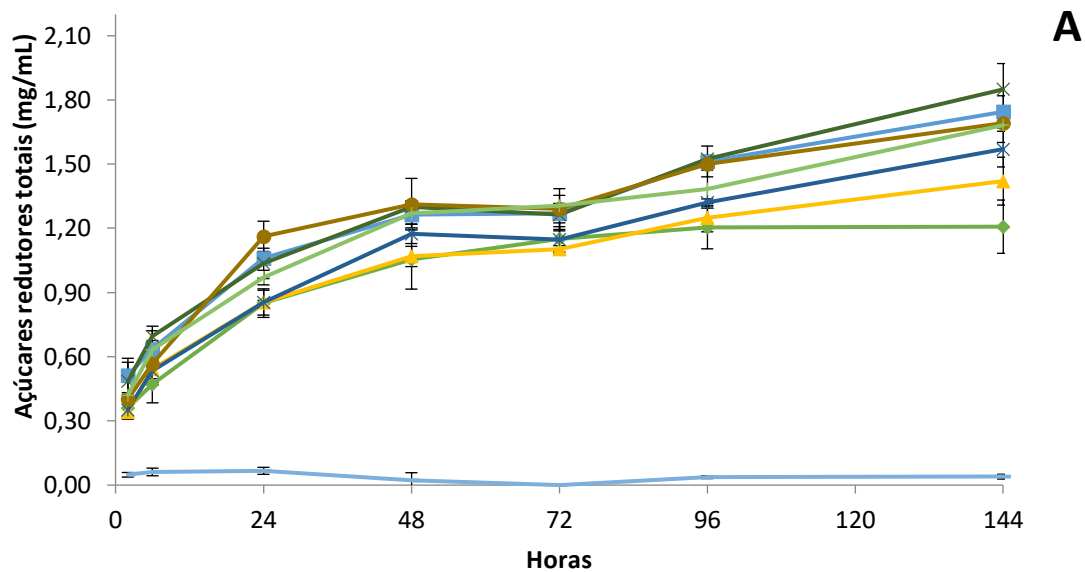


Figura 2.6 Liberação de açúcares redutores totais (A) e glicose (B) dos consórcios enzimáticos durante a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. (—◆ 100% de CSTR; —■ 100% de PCAT; —▲ 100% de BCAT; —× 50% de CSTR e 50% de PCAT; —✱ 50% de PCAT e 50% de BCAT; —● 50% de CSTR e 50% de BCAT; —◆ 0,33% de CSTR, 0,33% de BCAT e 0,33% de PCAT e — controle).

A figura 2.7 mostra a superfície de resposta gerada pela hidrólise com 144 h de incubação. É possível observar uma coloração mais vermelha na parte inferior do lado esquerdo do triângulo, que demonstra maior liberação de glicose (fig. A), e na parte central, entre os pontos 4, 2, 7 e 6, para açúcares redutores totais (fig. B).

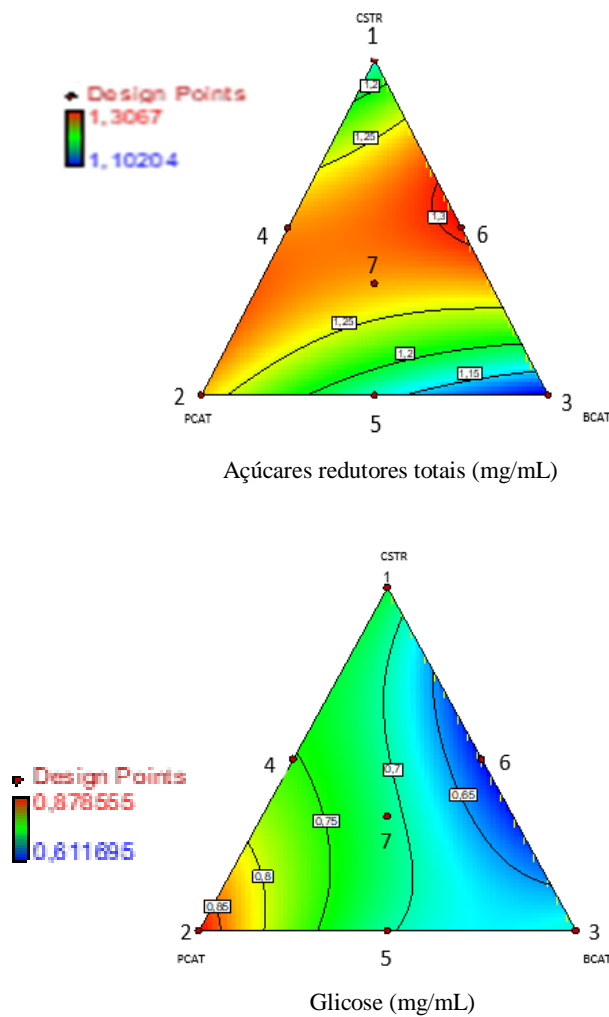


Figura 2.7. Superfície de resposta do planejamento de misturas simplex referente ao resultado da hidrólise enzimática em bagaço de cana-de-açúcar após 48 horas de incubação. A – açúcares redutores totais e B - glicose.

O desenvolvimento dos consórcios fora baseado nos resultados a partir da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, substrato complexo, uma vez que ensaios

enzimáticos em substratos puros podem não correlacionar com o real potencial hidrolítico das enzimas. Assim, analisar o desempenho dos consórcios durante a hidrólise permite uma melhor compreensão da capacidade das enzimas em promover a hidrólise em substratos complexos (Banerjee *et al.*, 2010, Chundawat, Balan e Dale, 2008).

4.5. Novas combinações enzimáticas

Baseado nos resultados observados na superfície de resposta gerada pela hidrólise do item 4.4 (Fig 2.7), novos pontos foram demarcados nas regiões que apresentaram as maiores liberações de açúcares redutores totais, afim de avaliar novas combinações que tivessem potencial para elevada liberação de açúcares na hidrólise do bagaço de cana de açúcar.

Os pontos propostos para a obtenção de maior liberação de ART — utilizando a combinação dos extratos brutos de *T. reesei* cultivado em casca de soja, *A. terreus* cultivado em palha de cana e *A. terreus* cultivado em bagaço de cana — são demonstrados na figura 2.8.

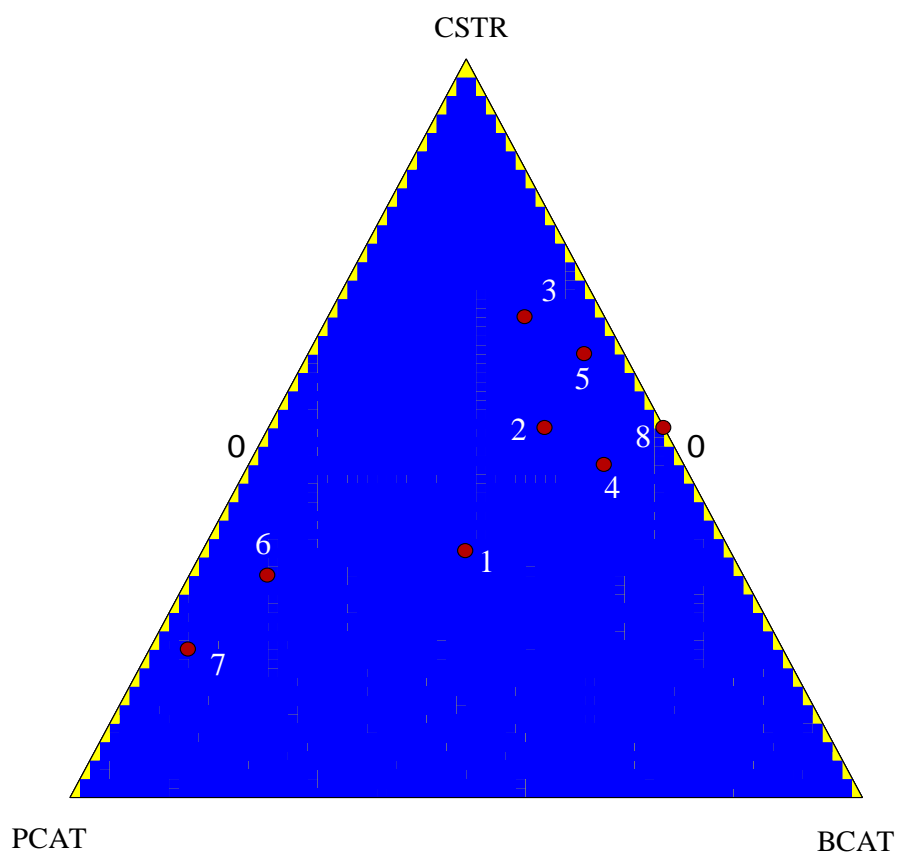


Figura 2.8. Pontos propostos para a segunda rodada de hidrólise para definição dos melhores consórcios enzimáticos. (Ponto 1 – 33,3% de CSTR, 33,3% de PCAT e 33,3% de BCAT; Ponto 2 50% de CSTR, 15% de PCAT e 35% de BCAT; Ponto 3 – 65% de CSTR, 10% de PCAT e 25% de BCAT; Ponto 4 – 45% de CSTR, 10% de PCAT e 45% de BCAT; Ponto 5 – 60% de CSTR, 5% de PCAT e 35% de BCAT; Ponto 6 – 20% de CSTR, 75% de PCAT e 5% de BCAT; Ponto 7 – 30% de CSTR, 60% de PCAT e 10% de BCAT e Ponto 8 – 50% de CSTR e 50% de BCAT).

Uma nova hidrólise foi realizada usando essas novas combinações entre os extratos brutos e os resultados estão demonstrados na figura 2.9.

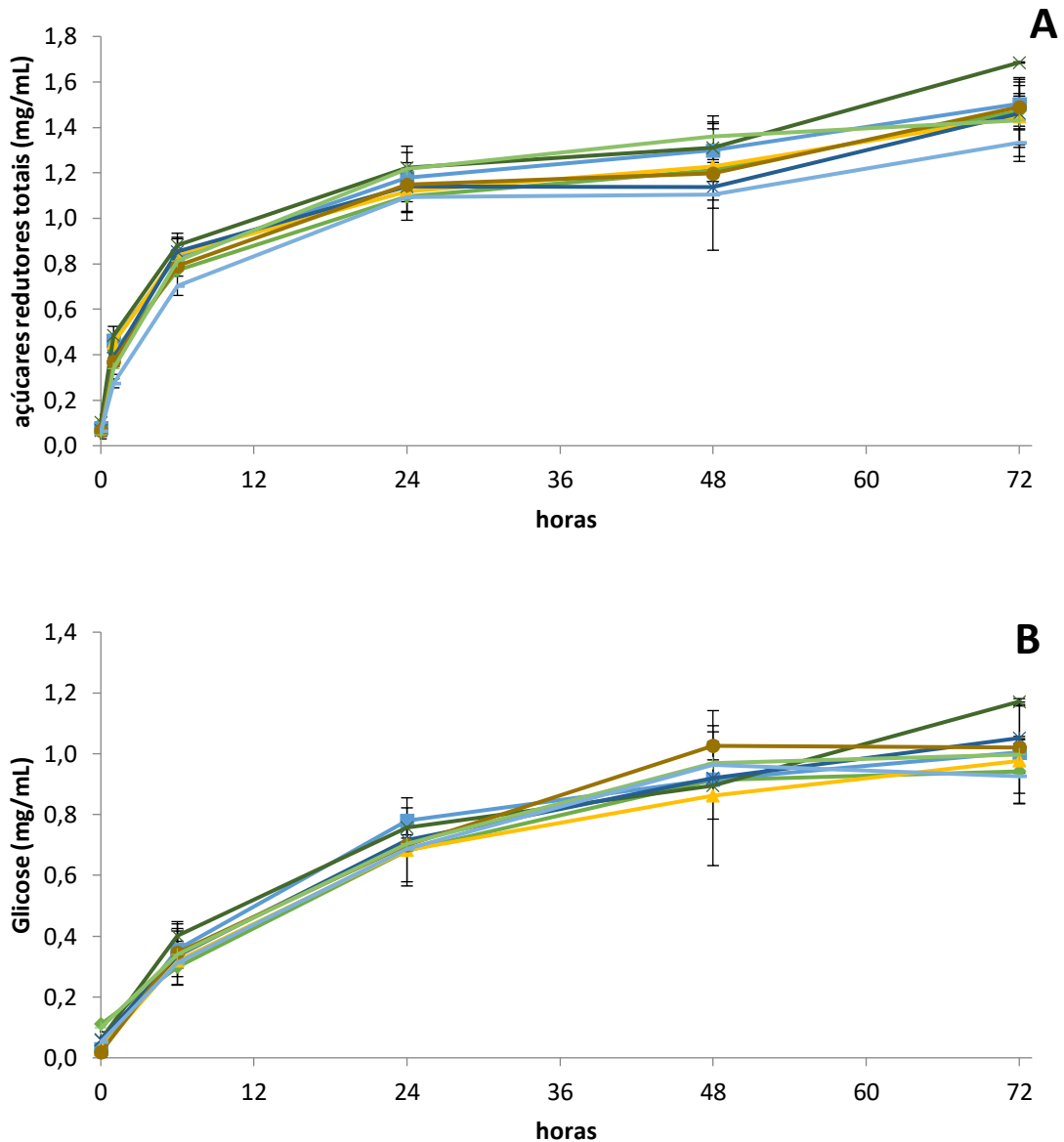


Figura 2.9. Segunda rodada de hidrólise enzimática em bagaço de cana-de-açúcar. A: liberação de açúcares redutores totais e B: liberação de glicose (Ponto 1 \blacklozenge 33,3% de CSTR, 33,3% de PCAT e 33,3% de BCAT; Ponto 2 \blacksquare 50% de CSTR, 15% de PCAT e 35% de BCAT; Ponto 3 \blacktriangle 65% de CSTR, 10% de PCAT e 25% de BCAT; Ponto 4 \blacktimes 45% de CSTR, 10% de PCAT e 45% de BCAT; Ponto 5 \blackstar 60% de CSTR, 5% de PCAT e 35% de BCAT; Ponto 6 \blacklozenge 20% de CSTR, 75% de PCAT e 5% de BCAT; Ponto 7 \blacktriangle 30% de CSTR, 60% de PCAT e 10% de BCAT e Ponto 8 \blacklozenge 50% de CSTR e 50% de BCAT).

Com 72 h o consórcio 4 diferiu de todos os demais (ANOVA $p < 0,05$) apresentando o maior pico de liberação de ART.

Para a liberação de glicose, os tempos de 48 e 72 h não diferem entre si, tanto que é notável a estabilização na liberação de glicose nesse período. A maior liberação de glicose foi obtida pelo consórcio 4 com 72 h de incubação. Assim, o consórcio 4 se destacou na liberação de ART e glicose na hidrólise de bagaço de cana.

Três consórcios enzimáticos foram selecionados para uma posterior avaliação. Um consórcio eficiente precisa ser capaz de promover a hidrólise em diferentes resíduos lignocelulósicos e não apenas em bagaço de cana. Dessa forma, além do consórcio 4 (45% de CSTR e de BCAT e 10% de PCAT), outros dois consórcios foram selecionados. Esses foram selecionados baseados nas proporções que continham de cada extrato bruto apresentando proporções equidistantes, haja vista que não apresentavam diferença na liberação de ART e glicose na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. Assim foi selecionado o consórcio 1 (33% de cada extrato bruto) e o consórcio 6 (75% do extrato bruto de *A. terreus* cultivado em palha de cana, 25% de *T. reesei* cultivado em casca de soja e 5% de *A. terreus* em bagaço de cana).

Diversos autores trabalham no desenvolvimento de coquetéis a partir de extratos brutos, cada um adotando uma metodologia diferente. Méndez Arias *et al.* (2016), com o planejamento de misturas, chegaram a proporção ótima de 15% de *T. harzianum* IOC 3844, 50% de *P. funiculosus* ATCC 11797 e 35% de *A. niger* ATCC 1004 para a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, atingindo um rendimento de 91% após 48 h de hidrólise. Já o coquetel de Shimokawa *et al.* (2013), para a hidrólise de polpa de madeira de coníferas da família Cupressaceae (*sugi pulp*), a proporção ótima foi de 25% de *A. tubingenis* e 75% de *T. reesei* e após fermentação e sacarificação simultânea o rendimento de etanol foi 76% após 72 h de hidrólise. Entretanto, os coquetéis estabelecidos pelos autores não foram avaliados na hidrólise de outras biomassas lignocelulósicas, diferente do proposto para os consórcios estabelecidos neste trabalho.

Antes da aplicação dos consórcios selecionados na hidrólise de diferentes biomassas, tanto os extratos brutos quanto os consórcios foram avaliados quanto a termoestabilidade e efeito de íons e compostos fenólicos, além do grau de sinergismo.

4.6. Termoestabilidade dos consórcios e extratos brutos

A termoestabilidade dos extratos brutos e consórcios enzimáticos são apresentados na figura 2.10.

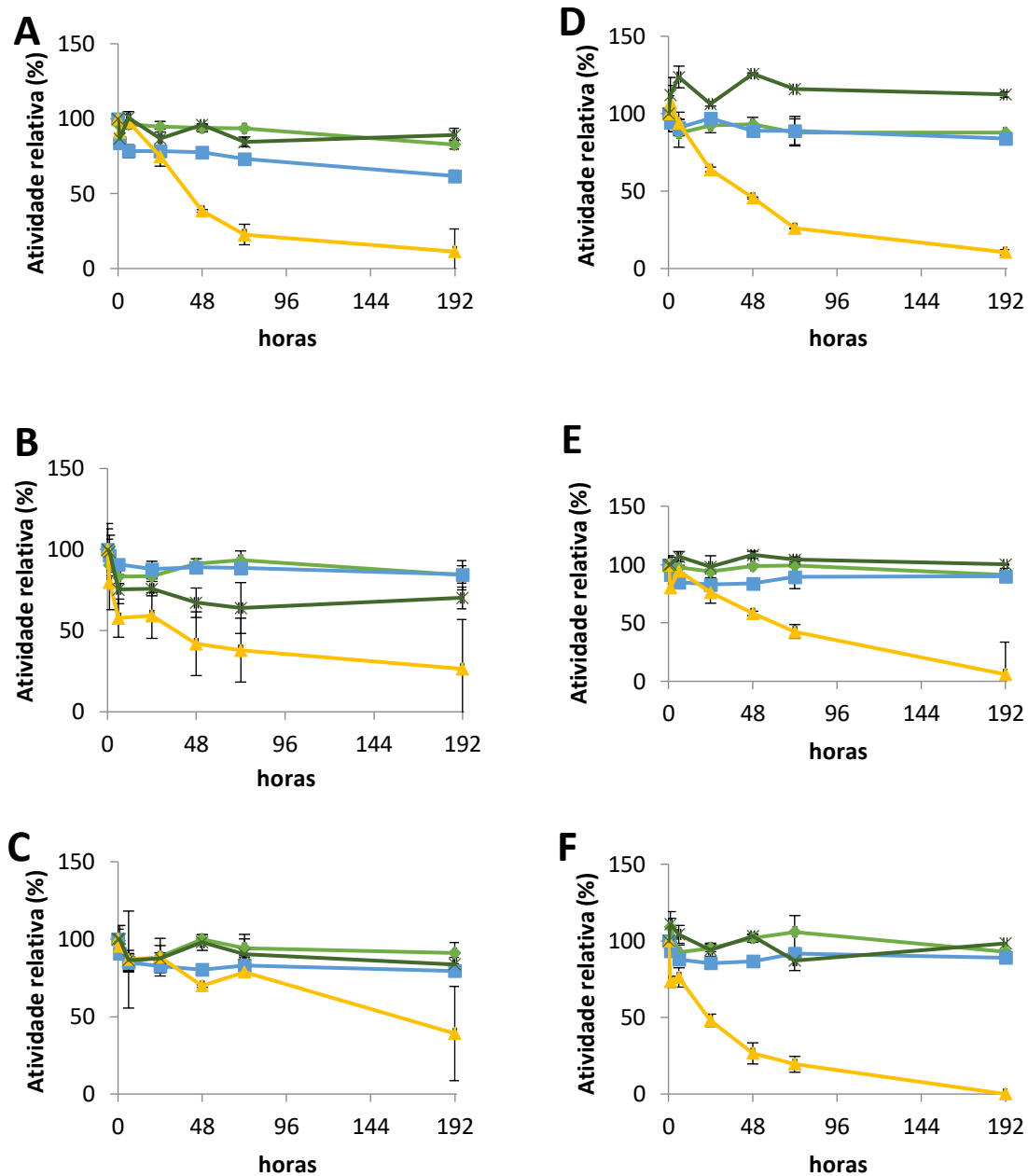


Figura 2.10. Termoestabilidade a 50 °C dos extratos brutos. Figura A: CSTR (*T. reesei* em casca de soja), figura B: PCAT (*A. terreus* em palha de cana) e figura C: BCAT (*A. terreus* em bagaço de cana) e consórcios enzimáticos obtidos da mistura de CSTR:PCAT:BCAT, sendo consórcio 1 (0,33:0,33:0,33) figura D; consórcio 4 (0,45: 0,1: 0,45) figura E e consórcio 6 (0,2: 0,75: 0,05) figura F. —◆— atividade de CMCase, —■— Atividade de xilanase, —▲— atividade de pectinase e —*— atividade de mananase.

Na avaliação da termoestabilidade, comparando os consórcios enzimáticos e os extratos brutos, os consórcios enzimáticos apresentaram termoestabilidade mais elevada

do que os extratos brutos isoladamente. Tal fato pode ser devido à uma maior estabilidade pelas interações entre os diferentes extratos brutos.

Os consórcios demonstraram alta termoestabilidade (maior que 192 horas) para as atividades de CMCase, xilanase e mananase. A maior perda de atividade de CMCase e xilanase ocorreu no extrato bruto de *T. reesei* cultivado em casca de soja. Dentre as atividades avaliadas, a pectinase foi a menos termoestável (menor que 48 horas) (figura 2.10).

Enzimas termoestáveis têm sido identificadas a partir de cultivos de microorganismos em temperaturas mais baixas, o que vem ao encontro dos resultados obtidos, onde os cultivos foram realizados a ± 28 °C e as enzimas secretadas pelos microrganismos apresentaram termoestabilidade a 50 °C. Entre as razões fundamentais para escolher as enzimas termoestáveis estão a possibilidade do uso em processos que usam temperaturas mais elevadas, além de maior tolerância a solventes orgânicos e risco reduzido de contaminação (Turner, Mamo e Karlsson, 2007).

4.7. Efeito dos compostos fenólicos

Os métodos de pré-tratamento comumente geram inibidores que afetam a atividade enzimática devido à degradação da lignina. Entre os subprodutos de degradação da lignina, encontram-se furanos, furfurais, ácidos carboxílico, levulínico e acético, e compostos fenólicos (Canilha *et al.*, 2012, Cunha *et al.*, 2016; Palmqvist e Hahn-Hagerdal, 2000). Estes mesmos inibidores podem também ser gerados pela hidrólise enzimática. Estes compostos fenólicos podem alterar a conformação da proteína, afetando a atividade enzimática, ou ainda o crescimento microbiano. Os ácidos ferúlico e *p*-cumárico podem fazer parte da constituição da xilana, sugerindo que a hidrólise da xilana também libere compostos que afetem negativamente a atividade dessa enzima. Embora os mecanismos exatos de inibição não sejam totalmente compreendidos, é fato que a presença dos compostos fenólicos prejudica a atuação das enzimas (Ázar *et al.*, 2018). Dessa maneira, é importante que consórcios enzimáticos sejam resistentes aos compostos fenólicos.

As tabelas 2.8, 2.9, 2.10 e 2.11 mostram os efeitos de compostos fenólicos na atividade enzimática dos extratos brutos CSTR, PCAT e BCAT, e consórcios enzimáticos 1, 4 e 6. O efeito de inibição foi medido imediatamente após a incubação das enzimas com os compostos fenólicos (Ximenes *et al.*, 2011). Quando não foi observada inibição

das enzimas dos extratos brutos e consórcios enzimáticos pelos compostos fenólicos, estes foram incubados novamente por um período de 48 horas para se observar o efeito de desativação ao longo do tempo.

Tabela 2.8. Efeito dos compostos fenólicos na atividade de CMCase dos extratos brutos e consórcios enzimáticos

	Atividade de CMCase (%)											
	CSTR		PCAT		BCAT		Consórcio 1		Consórcio 4		Consórcio 6	
	20 min	48h	20 min	48h	20 min	48h	20 min	48h	20 min	48h	20 min	48h
Controle	100±6,5		100±4,1		100±12		100±7,7		100±3,2		100±3,43	
Vanilina	71,7±14,3	Nr	92,4±6,1	78,8±4,6	90,09±1,8	85,3±4,4	80,4±1,0	72,6±7,3	90,5±1,6	81,0±3,17	86,3±0,9	66,2±7,9
A. tânico	101,0±5,9	77,5±5,3	88,5±6,4	80,7±3,7	89,24±5,7	70,2±4,3	83,9±2,3	67,5±1,9	85,9±6,3	85,9±1,25	94,8±2,9	74,9±5,1
A. cinâmico	84,6±3,9	Nr	95,7±1,7	33,3±6,0	96,69±8,7	34,6±2,7	85,2±6,0	17,0±4,5	77,7±5,6	26,1±6,34	92,4±0,5	36,5±4,2
A. cumárico	87,8±4,4	22,4±4,7	106±5,0	38,8±0,7	92,84±1,0	41,7±4,4	79,8±2,3	18,7±3,0	78,2±2,0	27,3±2,89	93,5±3,7	57,9±19,3
A. ferúlico	77,9±1,8	Nr	68,2±14	nr	84,89±7,8	29,5±4,0	70,6±2,1	16,0±0,8	72,8±0,8	23,3±5,21	75,0±2,5	26,4±3,8
A. 4-hidroxi-benzoico	75,8±1,0	Nr	69,0±5,2	Nr	88,69±6,9	31,9±1,3	68,4±3,9	22,9±3,3	81,5±1,8	33,8±4,25	84,2±4,1	26,9±1,4

CSTR: *T. reesei* cultivado em casca de soja; PCAT: *A. terreus* cultivado em palha de cana; BCAT: *A. terreus* cultivado em bagaço de cana; consórcio 1 (0,33 CSTR:0,33 PCAT:0,33 BCAT); consórcio 4 (0,45 CSTR: 0,1 PCAT: 0,45 BCAT); consórcio 6 (0,2 CSTR: 0,75 PCAT: 0,05 BCAT); NR: não-realizado.

Tabela 2.9. Efeito dos compostos fenólicos na atividade de xilanase dos extratos brutos e consórcios enzimáticos

	Atividade de xilanase (%)											
	CSTR		PCAT		BCAT		Consórcio 1		Consórcio 4		Consórcio 6	
	0h	48h	0h	48h	0h	48h	0h	48h	0h	48h	0h	48h
Controle	100±3,8		100±0,4		100±3,3		100±1,9		100±2,7		100±2,4	
Vanilina	78,2±3,0	Nr	86,0±1,8	87,4±3,1	90,7±0,9	103±6,0	86,5±1,6	93,8 ±4,4	83,6±3,4	nr	84,8±1,4	70,1±5,6
A. Tânico	80,1±0,8	89,5±1,0	87,6±1,9	85,6±7,2	90,0±0,7	72,9±6,1	82,4±0,0	Nr	86,6±2,5	98,4±1,2	90,2±3,6	83,4±7,1
A. Cinâmico	75,3±2,5	nr	79,1±0,6	26,2±1,7	84,9±1,6	Nr	82,6±0,9	14,8 ±2,5	78,9±1,0	17,2±6,8	73,8±5,2	25,1±2,1
A. Cumárico	78,5±2,5	4,7±0,2	84,8±1,5	21,5±0,6	88,3±1,1	4,7±2,3	82,2±5,7	Nr	80,7±1,4	8,9±1,5	81,6±0,0	9,1±2,2
A. Ferúlico	73,6±0,6	Nr	77,6±1,8	nr	75,6±2,2	Nr	77,6±0,2	7,0 ±2,9	75,3±2,7	15,2±2,0	67,2±4,1	25,6±5,8
A. 4-hidroxi-benzóico	75,8±1,7	Nr	84,8±2,6	19,8±5,9	86,1±1,3	14,5±3,1	80,6±2,3	16,2 ±2,2	78,4±2,3	25,4±12,7	79,8±0,1	28,8±4,4

CSTR: *T. reesei* cultivado em casca de soja; PCAT: *A. terreus* cultivado em palha de cana; BCAT: *A. terreus* cultivado em bagaço de cana; consórcio 1 (0,33 CSTR:0,33 PCAT:0,33 BCAT); consórcio 4 (0,45 CSTR: 0,1 PCAT: 0,45 BCAT); consórcio 6 (0,2 CSTR: 0,75 PCAT: 0,05 BCAT); NR: não-realizado.

Tabela 2.10. Efeito dos compostos fenólicos na atividade de pectinase dos extratos brutos e consórcios enzimáticos

	Atividade de pectinase (%)											
	CSTR		PCAT		BCAT		Consórcio 1		Consórcio 4		Consórcio 6	
	0h	48h	0h	48h	0h	48h	0h	48h	0h	48h	0h	48h
Controle	100 ± 1,5		100 ± 2,3		100 ± 34,53		100 ± 1,3		100 ± 1,1		100 ± 5,98	
Vanilina	32,3 ± 0,7	Nr	87,25 ± 7,6	nr	288,8 ± 35	56 ± 7,0	43,72 ± 1,7	nr	45,2 ± 1,0	nr	47,60 ± 1,46	Nr
Ac. Tânico	34,6 ± 1,0	Nr	108,7 ± 0,8	nr	185,9 ± 9,8	0	43,47 ± 0,4	nr	44,6 ± 0,2	nr	49,10 ± 5,43	Nr
Ac. Cinâmico	36,6 ± 0,7	Nr	178,1 ± 3,5	0	111 ± 14,5	0	39,91 ± 0,4	nr	39,4 ± 0,5	nr	39,61 ± 0,72	Nr
Ac. Cumárico	36,4 ± 0,7	Nr	62,09 ± 11	nr	281,57 ± 9,1	0	41,54 ± 0,3	nr	38,6 ± 1,9	nr	44,13 ± 0,95	Nr
Ac. Ferúlico	38,8 ± 1,0	Nr	64,09 ± 2,6	nr	213,5 ± 8,43	0	39,46 ± 0,9	nr	42,0 ± 0,4	nr	44,54 ± 0,41	Nr
Ac. 4-hidroxi-benzóico	36,6 ± 1,3	Nr	55,11 ± 9,8	nr	119,1 ± 11,7	0	40,10 ± 0,5	nr	36,7 ± 0,2	nr	39,23 ± 1,96	Nr

CSTR: *T. reesei* cultivado em casca de soja; PCAT: *A. terreus* cultivado em palha de cana; BCAT: *A. terreus* cultivado em bagaço de cana; consórcio 1 (0,33 CSTR:0,33 PCAT:0,33 BCAT); consórcio 4 (0,45 CSTR: 0,1 PCAT: 0,45 BCAT); consórcio 6 (0,2 CSTR: 0,75 PCAT: 0,05 BCAT); NR: não-realizado.

Tabela 2.11. Efeito dos compostos fenólicos na atividade de mananase dos extratos brutos e consórcios enzimáticos

	Atividade de mananase (%)											
	CSTR		PCAT		BCAT		Consórcio 1		Consórcio 4		Consórcio 6	
	0h	48h	0h	48h	0h	48h	0h	48h	0h	48h	0h	48h
Controle	100±0,4		100±9,8		100±3,9		100±2,47		100±5,1		100±4,55	
Vanilina	49,0±3,1	Nr	97,02±5,9	nr	100,8±4,6	87±1,3	78,2±2,68	Nr	86,8±3,3	49,7±7,3	72,59±3,49	Nr
A. Tânico	78,4±7,2	Nr	89,47±10	nr	96,47±8,5	0	100,09±3	94,8±7	80,2±3,0	nr	70,39±5,32	Nr
A. Cinâmico	52,3±2,1	Nr	227,4±8,5	0	83,98±8,7	Nr	82,96±8,2	nr	78,6±1,1	nr	69,17±4,66	Nr
A. Cumárico	58,9±1,6	Nr	91,30±6,1	nr	88,67±5,2	0	89,23±6,0	0	76,4±0,8	nr	68,18±3,38	Nr
A. Ferúlico	53,6±1,0	Nr	76,60±8,2	nr	70,16±9,4	0	76,08±6,2	nr	78,4±1,2	nr	70,57±3,36	Nr
A. 4-hidroxi-benzóico	48,6±2,9	Nr	119,98±9,2	0	50,17±14	0	86,37±8,6	nr	71,6±3,6	nr	77,77±3,86	Nr

CSTR: *T. reesei* cultivado em casca de soja; PCAT: *A. terreus* cultivado em palha de cana; BCAT: *A. terreus* cultivado em bagaço de cana; consórcio 1 (0,33 CSTR:0,33 PCAT:0,33 BCAT); consórcio 4 (0,45 CSTR: 0,1 PCAT: 0,45 BCAT); consórcio 6 (0,2 CSTR: 0,75 PCAT: 0,05 BCAT); NR: não-realizado.

A tabela 2.8 mostra a atividade de CMCase na presença dos compostos fenólicos. Os consórcios e extratos brutos mostraram-se altamente resistentes aos compostos avaliados. A maior perda de atividade, assim como a maior ativação, se deu pela incubação do extrato bruto de *A. terreus* cultivado em palha de cana na presença do ácido ferúlico e ácido cumárico, respectivamente (queda de atividade de 31,75% e aumento de 6% na atividade relativa). No trabalho de Zheng *et al.*, (2017), tanto o ácido ferúlico como o ácido cumárico inibiram a atividade de celulase total do extrato bruto de *T. reesei*. Dentre os fenóis testados, o ácido tânico foi o que causou maior inibição e até mesmo desativação nas atividades celulolíticas dos coquetéis Spezyme CP (celulases de *T. reesei*) e Novozyme 188 (β -glicosidase de *A. niger*), avaliados no trabalho de Ximenes *et al.*, (2011). Ao contrário do que foi observado neste trabalho, no qual mesmo após 48 h de incubação na presença do ácido tânico, a atividade relativa de CMCase variou entre 67,5 a 85,9% (consórcio 1 e 4 respectivamente).

No trabalho de Ázar *et al.*, (2018) foi avaliada a combinação dos extratos brutos de *Chrysosporthe cubensis*: *P. pinophilum* (1:1) comparado com *T. reesei* e *A. niger* na presença dos compostos fenólicos na atividade celulolítica. A combinação dos extratos brutos resultou em maior resistência aos compostos fenólicos do que as cepas de *T. reesei* e *A. niger*, utilizadas como controle (Ázar *et al.*, 2018). Entretanto, não foram avaliados os extratos brutos de *C. cubensis* e *P. pinophilum* individualmente na presença dos compostos fenólicos como realizados neste trabalho.

As atividades de xilanases também foram avaliadas na presença de compostos fenólicos (tabela 2.9). O extrato bruto de BCAT, mesmo após 48 h de incubação com vanilina, apresentou uma atividade relativa em torno de 100%. Observou-se um aumento na atividade relativa, comparando os tempos de 0 h e 48 h, quando o consórcio 4 foi incubado com ácido tânico (86% para 98%) e quando o consórcio 1 foi incubado com vanilina (86% para 93%). Em alguns trabalhos foi possível verificar o aumento da atividade enzimática na presença de compostos fenólicos. Tal fato ocorreu no trabalho de Monclaro *et al.*, (2016) que revelou um aumento da atividade da xilanase purificada de *A. tamaritii* quando incubada por 30 minutos com ácido ferúlico.

Uma xilanase (Xyl T1) purificada de *A. terreus* foi inibida em maior ou menor grau por compostos fenólicos. O ácido cinâmico e a vanilina desativaram completamente a enzima após 72 h de incubação, enquanto que o ácido 4-hidroxibenzóico inibiu cerca de 40% da sua atividade inicial. Nesse mesmo trabalho, outra xilanase purificada (Xyl

T2) mostrou uma grande resistência aos compostos fenólicos (ácido cumárico, cinâmico, hidroxibenzóico, tânico e vanilina) (Moreira *et al.*, 2013).

A tabela 2.10 mostra a atividade de pectinase na presença dos compostos fenólicos. O extrato bruto de CSTR, assim como os consórcios enzimáticos 1, 4 e 6, tiveram suas atividades fortemente inibidas na presença de todos os compostos fenólicos avaliados (mais que 50%). Apenas os extratos brutos de BCAT e PCAT tiveram baixo grau de inibição pelos compostos fenólicos. Diferente do observado no trabalho de Jaramillo (2014), a atividade da pectinase parcialmente purificada de *A. oryzae* apresentou inibição na presença de ácido tânico e vanilina. Entretanto, os ácidos 4-Hidroxibenzóico, cinâmico e ferúlico ativaram a enzima.

A tabela 2.11 mostra a atividade de mananase na presença dos compostos fenólicos. O ácido tânico não afetou a atividade de mananase do consórcio 1, enquanto que, no trabalho de Costa (2017), a presença do ácido tânico no extrato bruto concentrado de *C. byssicola* inibiu mais de 30% da atividade relativa. Nesse mesmo trabalho, as maiores inibições foram observadas quando o extrato bruto concentrado foi incubado com o ácido-p-cumárico e o ácido cinâmico (com uma redução de 42 e 44% da atividade de mananase, respectivamente). Entre os extratos brutos e consórcios enzimáticos avaliados nesta tese, as maiores inibições na presença destes ácidos (ácido-p-cumárico e o ácido cinâmico) se deram no extrato bruto de *T. reesei* cultivado em casca de soja.

Nota-se que os compostos fenólicos podem ter diferentes efeitos na atividade enzimática, não apenas inibindo, mas também tendo um efeito ativador. Isso está condicionado à natureza dos compostos usados, na concentração desses e da estrutura da enzima. Os consórcios tiveram inibição máxima na presença de todos os compostos fenólicos de 31, 29 e 33% para as atividades de CMC_{case}, xilanase e mananase, respectivamente.

Alguns estudos têm mostrado uma diminuição dos efeitos negativos causados pelos compostos fenólicos com o uso de lacase (Schroyen *et al.*, 2015). E polímeros, tais como polietilenoglicol 4000 e polivinilpirrolidona, podem prevenir esta inibição devido à sua capacidade de adsorverem quimicamente os compostos fenólicos (González-bautista *et al.*, 2017).

4.8. Efeito de íons e EDTA

Na natureza, as enzimas que degradam a biomassa (por exemplo, celulases e hemicelulases) provavelmente estão em contato com vários íons metálicos. Alguns íons metálicos podem estar presentes nos processos enzimáticos, microbianos ou abióticos (Tejirian e Xu, 2010).

A ativação e inibição de enzimas por íons e compostos químicos constitui uma ferramenta de grande importância para caracterização química e o entendimento do modo de ação das enzimas (Jaramillo, 2014).

A figura 2.11 mostra a atividade de CMCase na presença de íons. A atividade de CMCase tolerou a presença dos íons em ambas concentrações, principalmente os consórcios enzimáticos. Dentre os íons, o cloreto de cobalto foi o que mais elevou a atividade das CMCases, especialmente a 10 mM.

Para a endoglicanase GH12 de *A. terreus* (AtGH12), que foi clonada e expressa na linhagem A773 de *A. nidulans*, os íons Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} e EDTA inibiram em maior e menor grau a atividade da enzima, enquanto K^+ , Cs^+ e Mg^{2+} aumentam a atividade da enzima, todos na concentração a 10 mM, exceto o EDTA a 50 mM (Segato *et al.*, 2017). Nesta tese os íons Cu^{2+} e Fe^{2+} também foram os responsáveis por inibir CMCase, e o K^+ não se destacou como um ativador. Entretanto, no trabalho de Sohail, Ahmad e Khan (2016) K^+ , assim como o Mg^{2+} e Ca^{2+} , ativaram a endoglicanase do extrato bruto de *A. terreus*.

A inibição gerada pelos íons Cu^{2+} e Fe^{2+} era esperada, uma vez que é relatado na literatura que íons metálicos divalentes, na maioria das vezes Cu^{2+} e Fe^{2+} , exercem forte inibição em enzimas celulolíticas, como celobiohidrolases, endoglicanases e β -glicosidases e afirmam que o efeito inibitório pode ser atribuído a mudança conformacional da proteína ou substituição de um cofator nativo (Tejirian e Xu, 2010).

A figura 2.12 mostra o efeito dos íons na atividade de xilanase. As xilanases toleram a presença de íons em ambas as concentrações (1 e 10 mM). O íon KCl a 10 mM foi o que mais afetou a atividade da xilanase, o que significou para os extratos brutos uma perda em mais que 50% da atividade, enquanto que para os consórcios a atividade relativa permaneceu acima de 50% na presença deste íon.

No trabalho de Kamat *et al.* (2013), os íons metálicos (10 mM) Mn^{2+} , Co^{2+} , Ag^{2+} e Cu^{2+} aumentaram a atividade da xilanase do extrato bruto de *A. terreus*. Os íons Mn^{2+} e Ag^{2+} não foram avaliados nesta tese e os íons metálicos Cu^{2+} e Co^{2+} não alteraram a

atividade de xilanase dos extratos brutos e consórcio enzimáticos, ou seja, a atividade relativa foi mantida na faixa de 100%.

Na presença de íons, as atividades de pectinase dos extratos brutos e consórcios enzimáticos foram negativamente afetadas principalmente a 10 mM, conforme figura 2.13. A presença dos íons na concentração de 1 mM elevou a atividade de pectinase do consórcio 1 na presença de todos os íons.

Os íons com concentração de 1 mM foram testados no trabalho de Mei *et al.* (2013), a atividade pectinase não foi alterada na presença de Ca^{2+} , sendo parcialmente inibida por Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} ou Hg^{2+} , e completamente inibida por Co^{2+} . Segundo os autores, o Ca^{2+} , na maioria das vezes, inibe a atividade de pectinase. Nesta tese a presença do Ca^{2+} inibiu, como também não alterou a atividade de pectinase. Essa diferença nos resultados pode ter sido causada pela diferença na sequência dos aminoácidos da pectinase.

A figura 2.14 demonstra o efeito na atividade de mananase dos extratos brutos e consórcios enzimáticos na presença dos íons. O consórcio enzimático 1 foi o que sofreu menor variação de atividade na presença de todos os íons e apresentou uma maior atividade na concentração de 10 mM dos íons. Na presença de CaCl_2 , a mananase do extrato bruto de PCAT chegou a 173% de atividade relativa.

No trabalho de Costa (2017), na concentração de 10 mM os íons Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} e o agente quelante EDTA inibiram fortemente a atividade mananase do extrato bruto concentrado e da fração semi-purificada de mananase. Na presença dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} (10 mM), o extrato bruto de *T. reesei* cultivado em casca de soja foi o mais afetado negativamente.

Os cofatores são íons inorgânicos que podem estar firmemente ligados às proteínas, aumentando sua atividade (Jaramillo, 2014). Os íons metálicos podem ser ativadores ou inibidores, uma vez que existem universalmente nos habitats da microbiota. Por exemplo, os íons Ag(I) , Hg(II) e Pb(II) podem inibir enzimas, incluindo as celulasas. Por sua vez, os íons Ca(II) , Zn(II) , Fe(II) , Mn(II) e Cu(II) podem ser cofatores estruturais e funcionais (Tejirian e Xu, 2010).

Uma forma de obter estes cofatores estruturais e funcionais consiste em utilizar substratos que possuam esses nutrientes, evitando, assim, a necessidade de adição. Ahmed *et al.* (2016) citam as vantagens de utilizar molokhia (*Corchorus olitorius*) como fonte de carbono para a produção de enzimas, pois é capaz de fornecer Fe^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} e K^+ necessários sem adição externa.

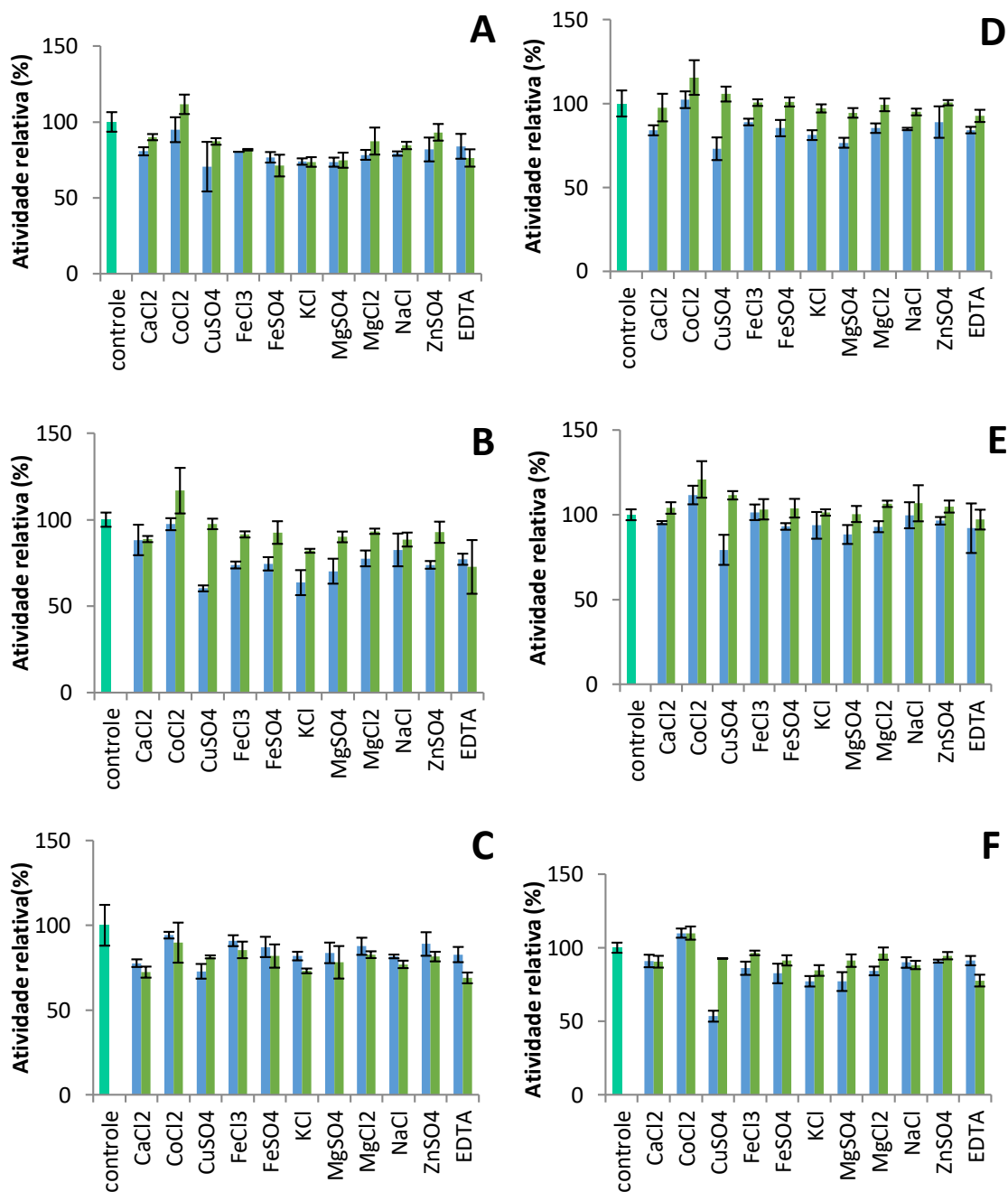


Figura 2.11. Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade de mananase. Figura A: CSTR (*T. reesei* em casca de soja), figura B: PCAT (*A. terreus* em palha de cana) e figura C: BCAT (*A. terreus* em bagaço de cana) e figura D: consórcio 1 (0,33:0,33:0,33 – CSTR:PCAT:BCAT); figura E: consórcio 4 (0,45:0,10: 0,45 – CSTR:PCAT:BCAT) e figura F: consórcio 6 (0,2:0,75:0,05 – CSTR:PCAT:BCAT). ■ 1 mM e ■ 10 mM.

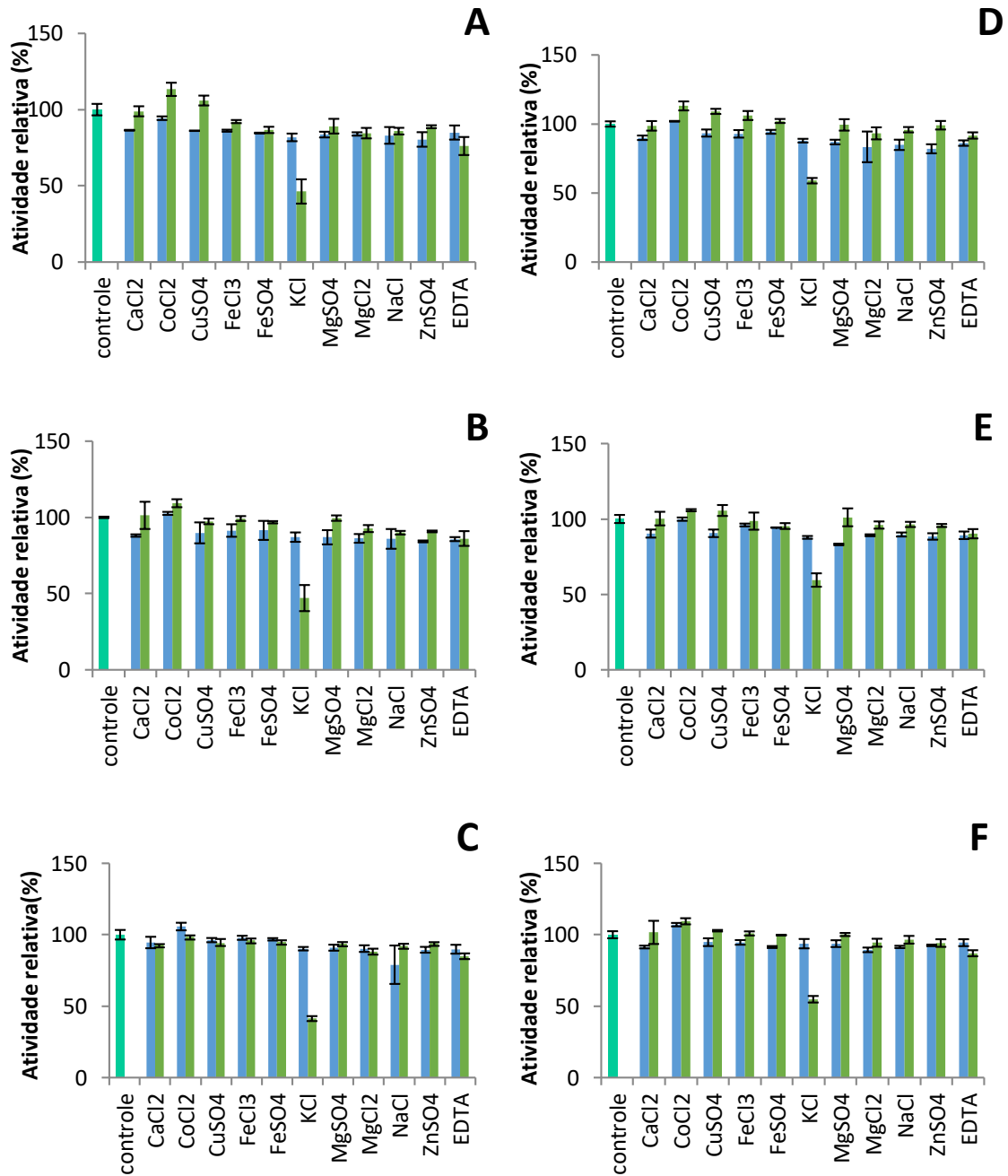


Figura 2.12. Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade de mananase. Figura A: CSTR (*T. reesei* em casca de soja), figura B: PCAT (*A. terreus* em palha de cana) e figura C: BCAT (*A. terreus* em bagaço de cana) e figura D: consórcio 1 (0,33:0,33:0,33 – CSTR:PCAT:BCAT); figura E: consórcio 4 (0,45:0,10: 0,45 – CSTR:PCAT:BCAT) e figura F: consórcio 6 (0,2:0,75:0,05 – CSTR:PCAT:BCAT). ■ 1 mM e ■ 10 mM.

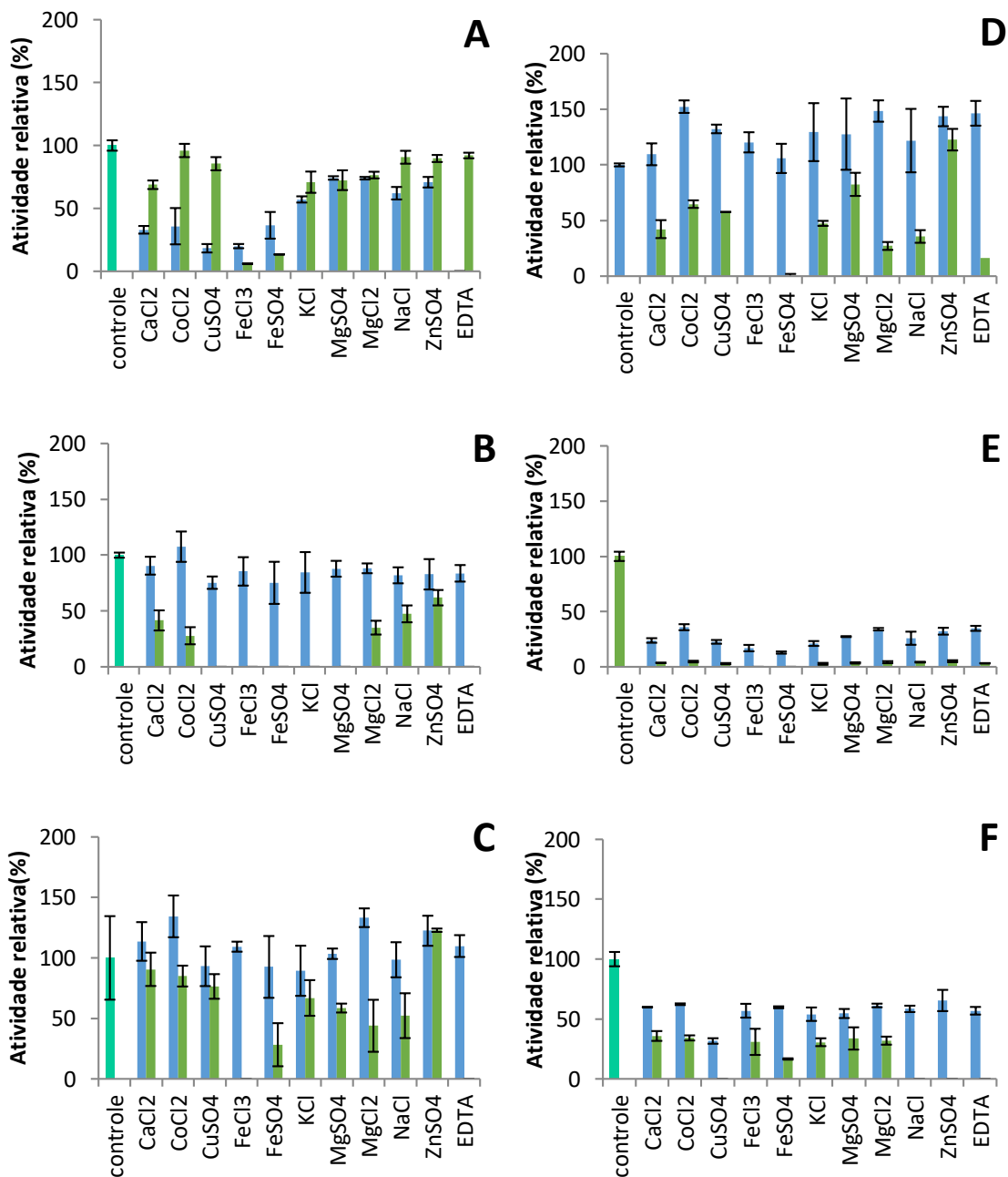


Figura 2.13. Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade de mananase. Figura A: CSTR (*T. reesei* em casca de soja), figura B: PCAT (*A. terreus* em palha de cana) e figura C: BCAT (*A. terreus* em bagaço de cana) e figura D: consórcio 1 (0,33:0,33:0,33 – CSTR:PCAT:BCAT); figura E: consórcio 4 (0,45:0,10: 0,45 – CSTR:PCAT:BCAT) e figura F: consórcio 6 (0,2:0,75:0,05 – CSTR:PCAT:BCAT). ■ 1 mM e ■ 10 mM.

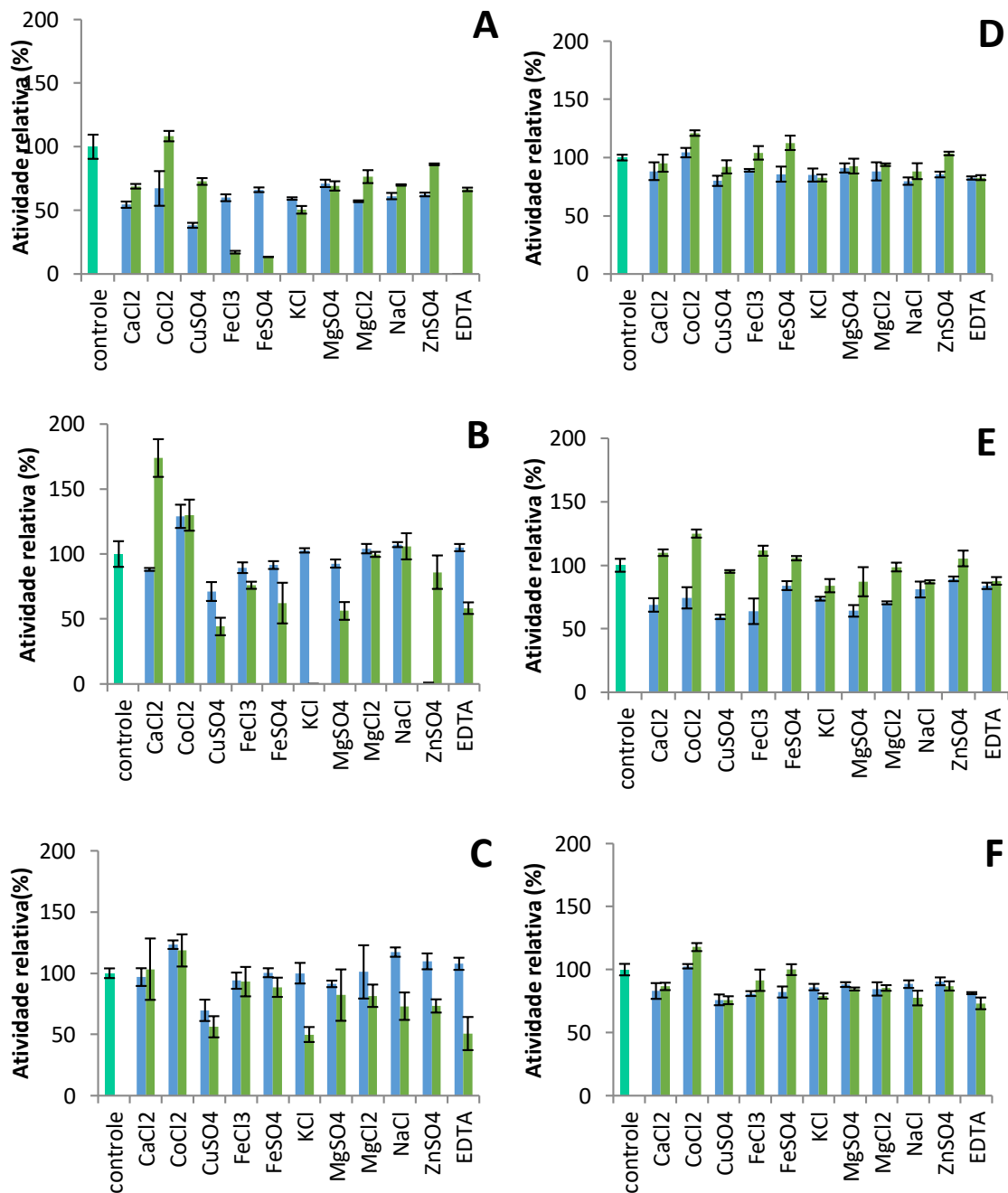


Figura 2.14. Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade de mananase. Figura A: CSTR (*T. reesei* em casca de soja), figura B: PCAT (*A. terreus* em palha de cana) e figura C: BCAT (*A. terreus* em bagaço de cana) e figura D: consórcio 1 (0,33:0,33:0,33 – CSTR:PCAT:BCAT); figura E: consórcio 4 (0,45:0,10: 0,45 – CSTR:PCAT:BCAT) e figura F: consórcio 6 (0,2:0,75:0,05 – CSTR:PCAT:BCAT). ■ 1 mM e ■ 10 mM.

4.9. Estudos de sinergismo dos consórcios e extratos brutos.

Os três consórcios enzimáticos foram avaliados quanto ao grau de sinergismo, conforme descrito na equação do item 3.14. Não foi constatada a presença de sinergismo, conforme exposto na figura 2.15, a soma da liberação de açúcares redutores totais e glicose, quando cada extrato bruto atuou separadamente, todos na mesma quantidade que deram origem ao consórcio, foi inferior a obtida pelos consórcios enzimáticos.

Todavia, em termos de liberação de glicose e ART, observa-se um efeito aditivo para ART com 1 h em todos os consórcios enzimáticos. Para a glicose, este efeito foi observado apenas com 6 h no consórcio 6. Acredita-se que nos momentos iniciais o nível de cooperação entre as enzimas seja maior. Dessa forma, o grau de sinergia diminui nos estágios finais de hidrólise, devido ao fato de que os locais de ligações tornam-se mais disponíveis ao longo do tempo. Isso exige um menor grau de cooperação entre as enzimas e, portanto, um menor grau de sinergismo (Malgas *et al.*, 2017).

É importante avaliar o efeito sinérgico quando se trabalha com combinações e suplementações enzimáticas. Trabalhos em que se observa efeito sinérgico usualmente combinam enzimas puras ou suplementam coquetéis com enzimas purificadas. Ao trabalhar com extratos brutos existe uma maior dificuldade de atingir um efeito sinérgico. Muitos trabalhos descrevem o fato de não conseguirem sinergismo ou a dificuldade de atingir tal efeito. Por exemplo, Li *et al.*, (2014) observaram que a adição de pectinase ao coquetel comercial (Celluclast 1.5 L e Novozym 188) não resultava em efeito sinérgico. Entretanto, com a adição de xilanase ao coquetel comercial, foi observado efeito sinérgico na hidrólise de bagaço de cana. Outro exemplo de combinação que não resultou em efeito sinérgico ocorreu no trabalho de Maeda *et al.* (2011). A combinação do coquetel comercial multifect com os extratos brutos de *T. harzianum* ou *P. funiculosum* não resultou em sinergismo.

Fang *et al.* (2013) trabalharam com extrato bruto de *T. reesei* e *A. niger*, na combinação 5:1, que não apresentou vantagens sobre a monocultura de *T. reesei* com 24 horas, tanto que não surgiu efeito sinérgico entre os dois micro-organismos. Muitos fatores afetam o sinergismo que ocorre entre as enzimas, tais como as proporções e cargas enzimáticas, as características do substrato, a quantidade de substrato, tempo de hidrólise, entre outros (Malgas *et al.*, 2017).

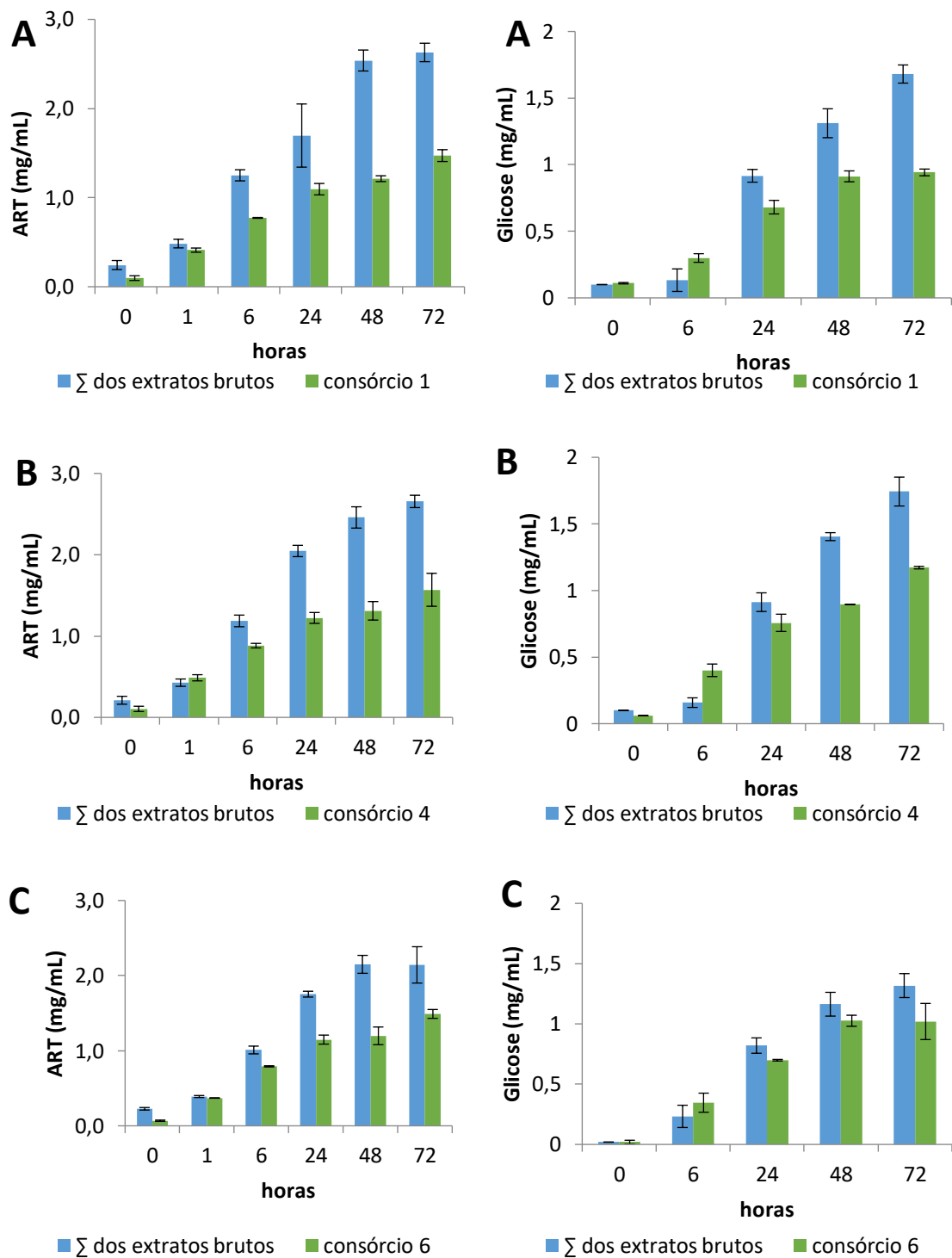


Figura 2.15. Avaliação do sinergismo em termos de liberação de açúcares redutores totais (esquerda) e glicose (direita) na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. Consórcios enzimáticos obtidos da mistura de CSTR:PCAT:BCAT, sendo consórcio 1 (0,33:0,33:0,33) – figura A, consórcio 4 (0,45: 0,1: 0,45) – figura B, e consórcio 6 (0,2: 0,75: 0,05) – figura C.

Entretanto, Visser *et al.* (2013) pontuam que a combinação de enzimas individuais e extratos brutos mostra-se como estratégia promissora que pode derivar em efeito sinérgico e melhorar a eficiência da hidrólise.

Mesmo que os consórcios não tenham apresentado efeito sinérgico, cabe ressaltar que a maior liberação de ART pelos extratos brutos foi obtida pelo consórcio de *A. terreus* cultivado em palha de cana (1,27 mg/mL – hidrólise do planejamento de misturas simplex, item 4.4, hidrólise com 2 mg/g de proteína com 72 h), que é 33% inferior a maior liberação obtida pelo consórcio 4 nas mesmas condições de hidrólise (item 4.5 – Novas combinações enzimáticas). Além do mais, os consórcios enzimáticos foram mais termoestáveis e resistentes a compostos fenólicos do que os extratos brutos.

4.10. Aplicação dos consórcios e extratos brutos na hidrólise de biomassas lignocelulósicas

É importante que o consórcio enzimático seja capaz de hidrolisar diferentes biomassas. Para isso, foram realizadas hidrólises enzimáticas de diferentes materiais lignocelulósicos, que incluíram a casca de soja (figura 2.16), palha de cana (figura 2.17), palha de milho (figura 2.18) e *lignin carbohydrate content* (LCC), um resíduo da indústria de papel e celulose, rico em compostos fenólicos (figura 2.19).

Muitos trabalhos focam o uso da casca de soja para a produção de etanol e outros produtos como xilitol (Schirmer-Michel *et al.*, 2008). Segundo Cassales *et al.* (2011), a soja é uma das principais culturas globais e a casca apresenta basicamente celulose, hemicelulose (xilose e arabinose) e uma pequena porção de lignina, além de apresentar uma estrutura porosa que favorece uma superfície de contato para a atuação enzimática (item 4.11), fatores que podem ter favorecido a hidrólise enzimática com relação ao bagaço e a palha de cana-de-açúcar.

Na hidrólise da casca de soja, as maiores liberações de açúcares redutores totais (Fig 2.16) foram obtidos pelos consórcios 1, 4 e 6, e pelo extrato bruto do *T. reesei* cultivado em casca de soja. E, com relação à liberação de glicose, os melhores resultados foram obtidos pelo CSTR, seguido dos consórcios 1 (0,33:0,33:0,33 – CSTR:PCAT:BCAT), 4 (0,45:0,10: 0,45 – CSTR:PCAT:BCAT) e 6 (0,2:0,75:0,05 – CSTR:PCAT:BCAT).

Com 48 h de hidrólise não há diferença estatística na liberação de ART pelo consórcio 4 e o extrato bruto de *T. reesei* cultivado em casca de soja, entretanto, na liberação de glicose, o CSTR difere dos demais ao apresentar maior liberação ($p < 0,05$).

O cultivo de micro-organismos num dado substrato lignocelulósico pode resultar em um arsenal enzimático especificamente adequado para a hidrólise desse material (Silva e Filho, 2017). Na hidrólise em casca de soja, foi possível observar esse comportamento, uma vez que as maiores liberações foram obtidas pelo *T. reesei* que foi cultivado em casca de soja e pelos consórcios enzimáticos 4, 1 e 6, que contém 45%; 33% e 20%, respectivamente, do extrato bruto de *T. reesei* cultivado em casca de soja.

Lau *et al.*, (2012) comprovam essa afinidade que o micro-organismo tem de produzir enzimas com potencial hidrolítico para degradar o substrato em que foi cultivada. As enzimas de *T. reesei* RUT-C30 cultivadas em palha de milho liberaram 2,5 e 7 vezes mais glicose e xilose da palha de milho, respectivamente, do que quando o fungo foi cultivado em meio com lactose.

Da mesma forma, o extrato bruto concentrado de *C. byssicola* cultivado em casca de soja foi capaz de liberar no mínimo 5 vezes mais ART na hidrólise de casca de soja do que na hidrólise de bagaço de cana (Sciuto, 2015).

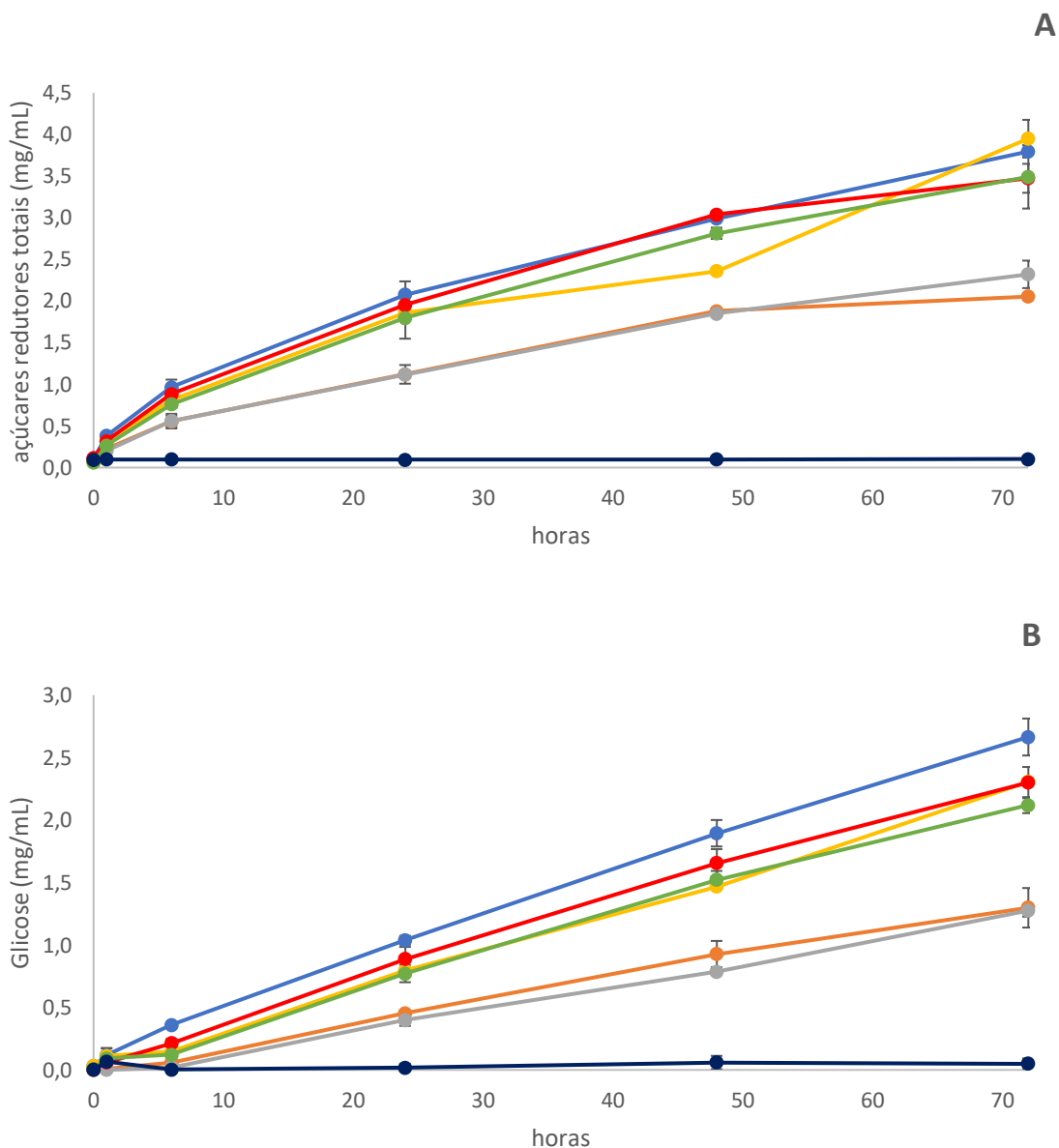


Figura 2.16. Hidrólise de casca de soja. A – Açúcares redutores totais e B – glicose. Usando os extratos brutos (—■— *T. reesei* em casca de soja, —■— *A. terreus* em palha de cana e —■— *A. terreus* em bagaço de cana) e os consórcios enzimáticos obtidos da mistura de CSTR:PCAT:BCAT (—■— consórcio 1 - 0,33:0,33:0,33; —■— consórcio 4 - 0,45: 0,1: 0,45 e —■— consórcio 6 - 0,2: 0,75: 0,05) e —■— branco.

A palha de cana-de-açúcar foi hidrolisada por 72 horas e os resultados estão apresentados na figura 2.17.

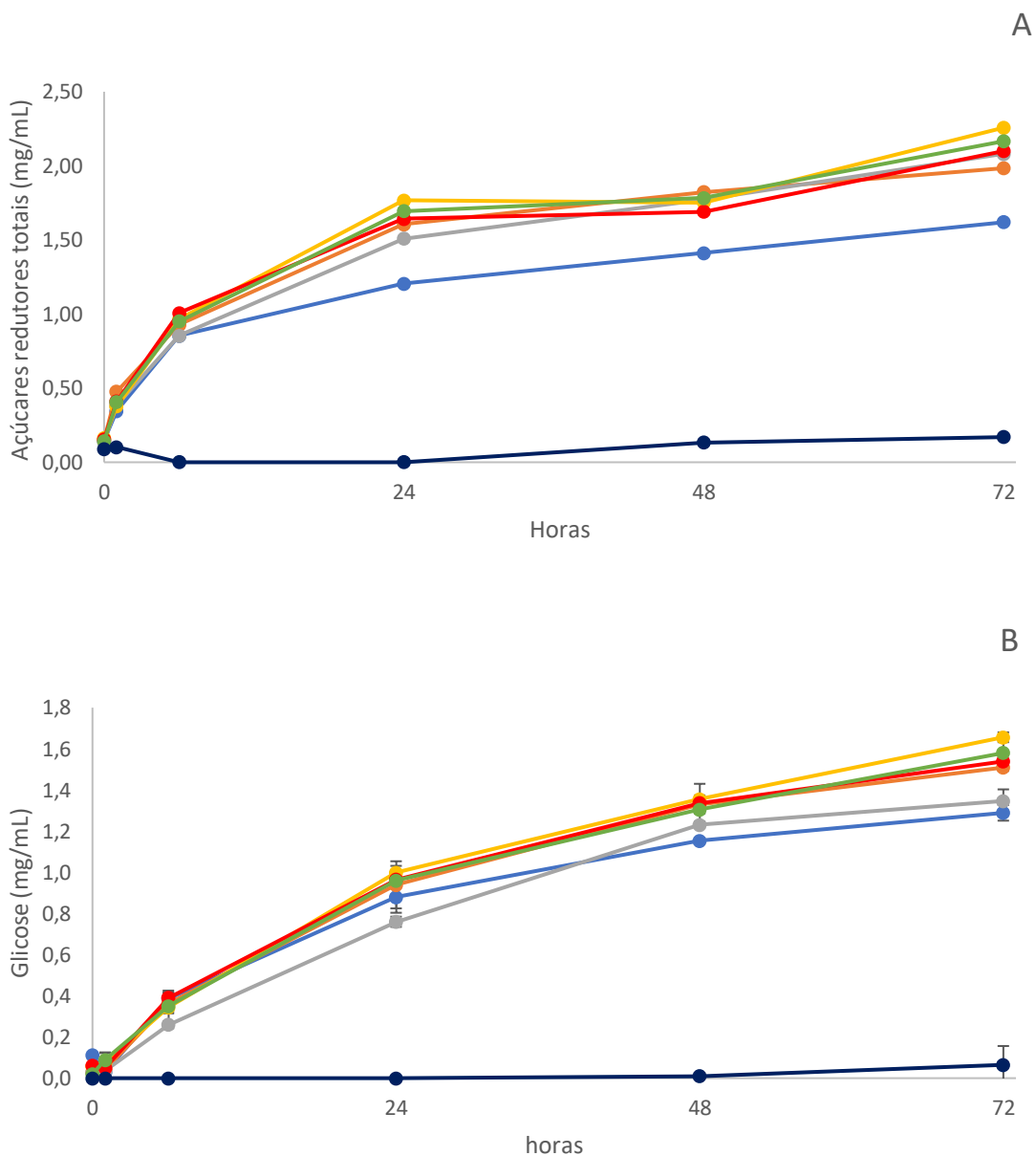


Figura 2.17 Hidrólise de palha de cana. A – Açúcares redutores totais e B – glicose. Usando os extratos brutos (—■— *T. reesei* em casca de soja, —■— *A. terreus* em palha de cana e —■— *A. terreus* em bagaço de cana) e os consórcios enzimáticos obtidos da mistura de CSTR:PCAT:BCAT (—■— consórcio 1 - 0,33:0,33:0,33; —■— consórcio 4 - 0,45: 0,1: 0,45 e —■— consórcio 6 - 0,2: 0,75: 0,05) e —■— branco.

Na hidrólise da palha de cana (Fig. 2.17) as maiores liberações de glicose e açúcares redutores totais foram obtidas pelos consórcios 1, 6 e 4 com 72 horas de hidrólise, entretanto os consórcios 1 e 6 não apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,05$), tanto na liberação de ART (2,26 e 2,17 mg/mL, respectivamente), como de

glicose (1,7 e 1,6 mg/mL, nesta ordem). Com 72 h de hidrólise, a menor liberação de ART foi obtida pelo *T. reesei* cultivado em casca de soja (1,62 mg/mL). E em termos de liberação de glicose pelo *A. terreus* cultivado em bagaço de cana e *T. reesei* cultivado em casca de soja, ambos liberaram 1,3 mg/mL. Dessa forma, ficou claro que os consórcios apresentaram melhores resultados quando comparados aos extratos brutos.

Dentre os substratos analisados, a palha de cana foi a que apresentou menor liberação de ART e glicose. Esse resultado pode estar associado ao fato de que o resíduo apresentou maior teor de lignina, conforme resultado apresentado no item 4.11. A presença da lignina pode afetar a hidrólise enzimática. A lignina pode afetar de duas formas: pela adsorção não produtiva e pela hidrofobicidade, reduzindo a superfície acessível às enzimas (Zheng *et al.*, 2009).

Outra questão é que, durante a hidrólise enzimática, os compostos fenólicos também são liberados, a partir da lignina presente na estrutura da biomassa lignocelulósica, o que limita a atuação enzimática (González-Bautista *et al.*, 2017). Ou seja, além da presença da lignina dificultar a atuação das enzimas, a liberação dos compostos fenólicos pela presença da lignina pode inibir a ação das enzimas.

Devido a presença de lignina (22%), os autores Oliveira *et al.* (2013) usaram explosão a vapor seguido de deslignificação alcalina como método de pré-tratamento da palha de cana e a 180 °C foi possível solubilizar 86,7% da lignina. Com a deslignificação foi possível aumentar a conversão de 58,8% para 85,1%. Investir em métodos de pré-tratamento pode ser a solução para usar biomassas com alto teor de lignina, como a palha de cana, e, assim, aumentar a liberação de ART.

Os resultados da hidrólise pelos consórcios e extratos brutos em palha de milho são apresentados na figura 2.18.

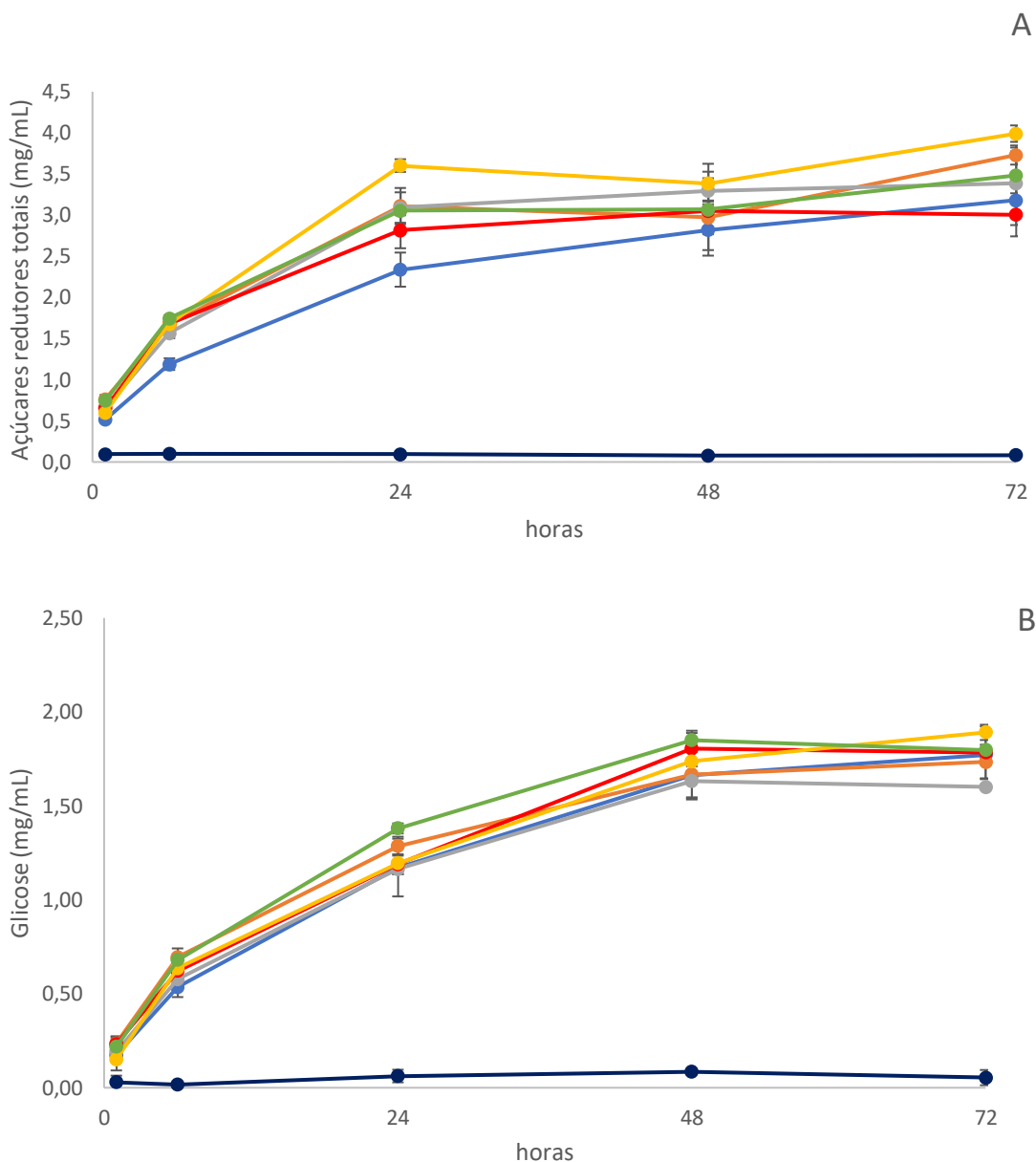


Figura 2.18. Hidrólise em palha de milho. A – Açúcares redutores totais e B – glicose. Usando os extratos brutos (—■— *T. reesei* em casca de soja, —■— *A. terreus* em palha de cana e —■— *A. terreus* em bagaço de cana) e os consórcios enzimáticos obtidos da mistura de CSTR:PCAT:BCAT (—■— consórcio 1 - 0,33:0,33:0,33; —■— consórcio 4 - 0,45: 0,1: 0,45 e —■— consórcio 6 - 0,2: 0,75: 0,05) e —■— branco.

Pelo teste estatístico, não há diferença estatística entre os tempos de 48 e 72 horas para a liberação de ART e glicose. Na hidrólise de palha de milho (Fig. 2.18), a maior liberação de açúcares redutores totais foi obtido pelo consórcio 1 (4,0 mg/mL), entretanto não apresenta diferença estatística do extrato bruto PCAT (3,7 mg/mL), para a liberação de glicose foi obtida pelos consórcios 1 (1,89 mg/mL), 6 (1,80 mg/mL) e 4 (1,79 mg/mL),

respectivamente, no entanto, não há diferença estatística entre eles. A menor liberação de glicose foi obtida pelo extrato bruto do *A. terreus* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar (1,6 mg/mL), com 72 h de hidrólise.

Zhou *et al.* (2009) desenvolveram um coquetel enzimático com auxílio de um planejamento de misturas, similar ao modelo adotado neste trabalho, voltado somente para hidrólise de palha de milho pré-tratado por explosão a vapor. O coquetel final dos autores continha Cel7A (19.8%), Cel6A (37.5%), Cel6B (4.7%), Cel7B (17.7%), Cel12A (15.2%), Cel61A (2.3%) e β -glicosidase (2.8%) (enzima purificada de *T. viride*). O consórcio 1, desenvolvido neste trabalho, contém 33% de cada extrato bruto, sendo *A. terreus* o responsável pelas mais altas atividades celulolíticas. Cabe salientar que o principal componente da palha de milho é a celulose (Wang *et al.*, 2014) o que corrobora com os resultados apresentados no item 4.11, a palha de milho foi dentre os resíduos avaliados o que apresentou maior quantidade de glicose.

No trabalho de Gu e Bao (2015) os autores avaliaram se o tamanho das partículas moídas de palha de milho (1.42, 0.69, 0.34 e 0.21 mm) afetariam os rendimentos da hidrólise enzimática e observaram que o rendimento de hidrólise enzimática foi similar para todos os tamanhos de partículas (24.69, 23.96, 25.34 e 26.97 %, respectivamente) e acreditam, ainda, que esse fato pode ter relação com os poros presentes na palha de milho. Os poros na palha de milho utilizada neste trabalho podem ser visualizados no item 4.11.

Na figura 2.19 é apresentado os resultados da hidrólise enzimática em LCC pelos consórcios e extratos brutos. São inúmeras as evidências de que o complexo lignina-carboidrato (LCCs) consiste na união da lignina e polissacarídeo por ligações covalentes, sendo que mais de 50% da lignina está ligada covalentemente aos carboidratos. Esse complexo dificulta a completa deslignificação, o que por sua vez limita muitas aplicações industriais, como por exemplo, restringindo a separação da lignina do carboidrato durante a polpação química e dificultando a hidrólise enzimática eficiente da biomassa para a produção de bioetanol (Deshpande *et al.*, 2018, You *et al.*, 2015).

O LCC utilizado neste trabalho é um resíduo da indústria de papel e celulose proveniente de eucalipto. Na hidrólise de LCC, o extrato bruto de *T. reesei* cultivado na casca de soja foi o que liberou mais açúcares redutores totais (3,49 mg/mL) e glicose (2,14 mg/mL) após 72h de hidrólise, diferindo dos demais. Com 72 h não há diferença estatística entre os consórcios 4 e 1 e para glicose entre os consórcios 4, 6 e 1 ($p < 0,05$).

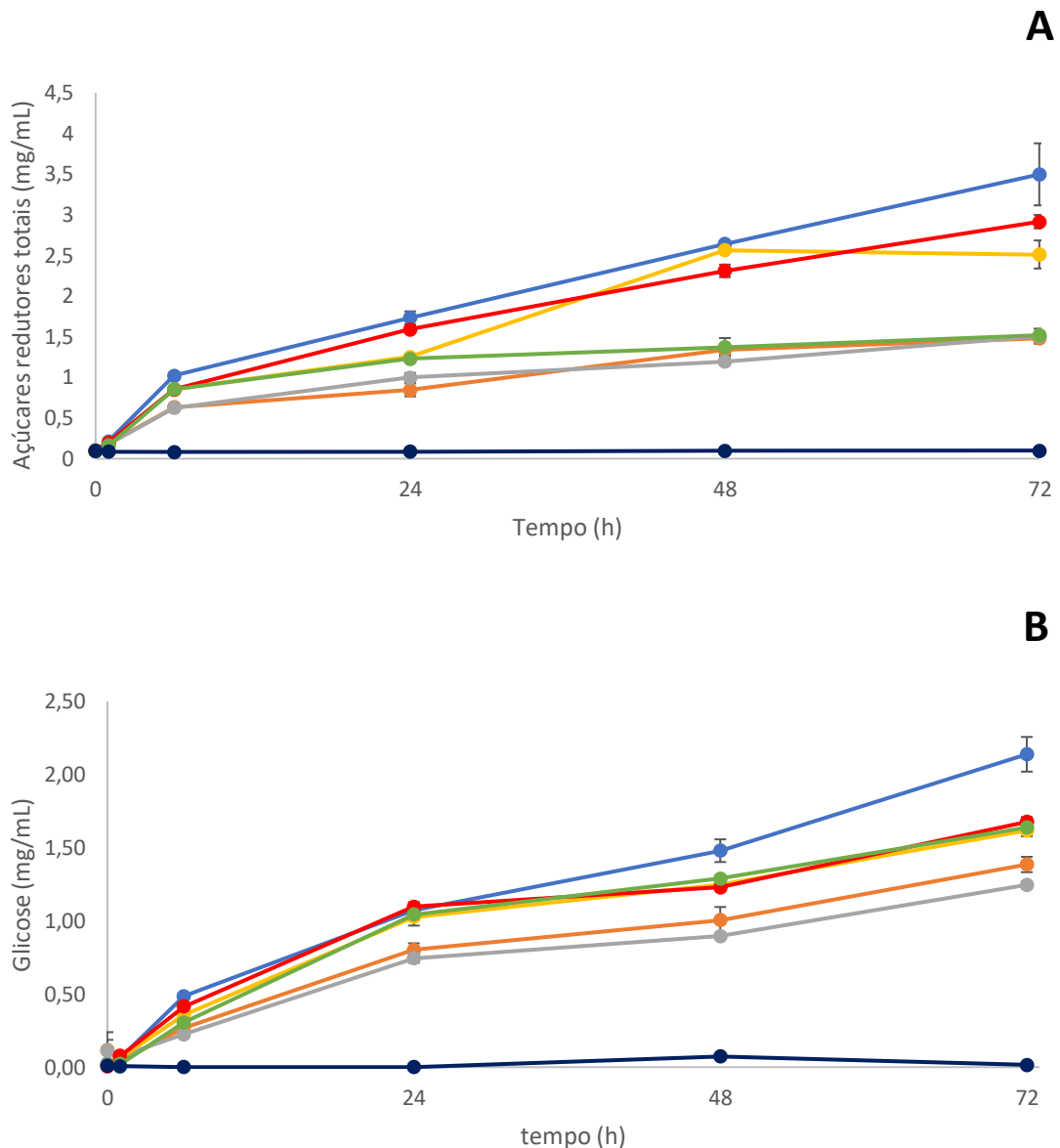


Figura 2.19. Hidrólise em LCC – complexo lignina-carboidrato. A – Açúcares redutores totais e B – glicose. Usando os extratos brutos (■ *T. reesei* em casca de soja, ■ *A. terreus* em palha de cana e ■ *A. terreus* em bagaço de cana) e os consórcios enzimáticos obtidos da mistura de CSTR:PCAT:BCAT (■ consórcio 1 - 0,33:0,33:0,33; ■ consórcio 4 - 0,45: 0,1: 0,45 e ■ consórcio 6 - 0,2: 0,75: 0,05) e ■ branco.

A figura 2.20 mostra a degradação dos LCCs pelo extrato bruto de *T. reesei* cultivado em casca de soja (A) e pelo consórcio 4 (B), comparados ao controle (C). Nota-se a degradação do substrato por ambos os tratamentos enzimáticos. Como previamente discutido, os LCCs apresentam alto teor de compostos fenólicos, pela presença da lignina,

de forma que esse resultado evidencia o potencial biotecnológico dos extratos brutos e consórcios avaliados, uma vez que estes são capazes de resistir à inibição dos fenóis presentes no LCC.

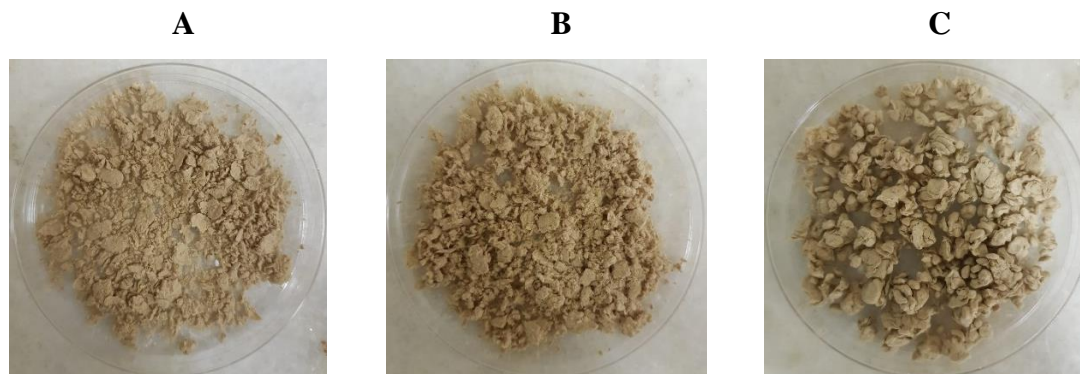


Figura 2.20. Degradação do LCC após as 72h de hidrólise. A – Extrato bruto de *T. reesei* cultivado em casa de soja, B consórcio 4 e C controle – branco.

4.11. Caracterização dos substratos lignocelulósicos

A composição química dos resíduos lignocelulósicos deve ser analisada, uma vez que podem influenciar na produção de enzimas quando utilizadas como fonte de carbono e até mesmo na hidrólise enzimática.

Diante disso, os resíduos lignocelulósicos utilizados neste trabalho foram analisados. A tabela 2.12 apresenta os resultados da análise bromatológica dos substratos lignocelulósicos.

Elucidar a composição química das biomassas lignocelulósicas pode ser o fator chave para promover a produção de enzimas em agroresíduos a partir dos micro-organismos e maximizar as taxas de hidrólise. Os fatores relacionados com o substrato, que podem afetar significativamente as taxas de hidrólise, incluem alterações na cristalinidade, grau de polimerização, alteração ou redução dos locais de ligação, estrutura heterogênea (Shi *et al.*, 2017).

Tabela 2.12. Análise bromatológica das biomassas (%).

	umidade	extraíveis	cinzas	lignina total	Carboidratos
Casca de soja	4,0%	15,30%	4,00%	4,59%	72,1%
Palha de cana	6,0%	9,30%	1,83%	23,36%	59,5%
Palha de milho	6,6%	5,30%	4,00%	8,44%	75,7%
Bagaço de cana	5,3%	8,60%	6,33%	21,27%	58,5%

A presença da lignina confere um caráter hidrofóbico à matriz da parede celular, reforçando a rigidez e a resistência mecânica da parede e dificultando consideravelmente sua degradação (Zhong e Ye, 2014). A palha de cana e bagaço de cana foram os resíduos que apresentaram maior quantidade de lignina (23,36 e 21,27%, respectivamente). Isso vem ao encontro do resultado obtido na hidrólise de palha de cana (item 4.11), sendo que esse foi o resíduo que obteve menor liberação de ART. A palha e o bagaço continham 59,5 e 58,5% de carboidratos, nessa sequência. No trabalho de Ávila, Forte e Goldbeck (2018), ao avaliarem a composição química do bagaço e da palha de cana, encontraram 21,83% de lignina e 69,26% de carboidratos para a palha de cana e 23,85% e 74,6% de lignina e carboidrato, respectivamente, para o bagaço de cana.

No trabalho de Méndez Arias *et al.* (2016) e Gomes (2017), o percentual de lignina foi de 19,2% e 23,03% e de carboidratos (celulose + hemicelulose) foi de 59,9% e 67,12%, respectivamente, no bagaço de cana, resultado similar ao encontro neste trabalho. Para Bussamra, Freitas e Costa (2015), o bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente apresentou uma maior quantidade de lignina (29,88% de lignina) e a quantidade de cinzas foi próxima ao resultado encontrado nesta pesquisa (6,2%).

A maior quantidade de extraíveis (15%) foi encontrado na casca de soja, em contrapartida foi a biomassa que apresentou menor quantidade de lignina (4,5%). A pequena quantidade de lignina encontrada na casca de soja torna esse substrato menos recalcitrante (Costa, 2017). No trabalho de Mielenz, Bardsley e Wyman (2009), o percentual de lignina relatado na casca de soja foi de 2,8%. O percentual de lignina para casca de soja relatado na literatura varia de 1 a 4% e de extraíveis de 9 a 11% (Liu e Li, 2017).

Segundo Mielenz, Bardsley e Wyman (2009), a composição da palha de milho pode variar de 51 a 75% para carboidrato e de 4 a 8% para cinzas. Esses valores coincidem com os valores encontrados neste trabalho.

Os carboidratos foram analisados por HPLC e os açúcares são mostrados na figura 2.21.

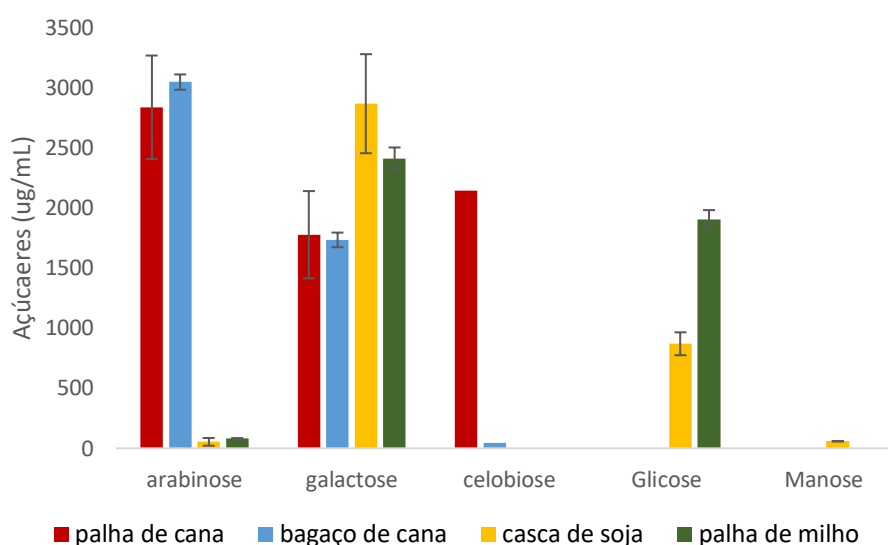


Figura 2.21. Caracterização da biomassa quanto a composição de açúcares estruturais por cromatografia líquida de alta eficiência ■ Palha de cana ■ bagaço de cana ■ casca de soja ■ palha de milho

Dentre os resíduos analisados, a palha de milho foi o resíduo que apresentou maior teor de glicose. A palha de milho é considerada um substrato que apresenta grande quantidade de celulose, por isso era esperado alta quantidade de glicose. Glicose, galactose, manose, xilose e arabinose são os principais monossacarídeos da palha de milho (Wang *et al.*, 2014).

A galactose estava presente em todas as biomassas, sendo que o bagaço de cana e palha de cana foram os que apresentaram maior quantidade de arabinose e a palha de cana a que mais apresentou celobiose. Segundo Sun *et al.* (2004), na hemicelulose do bagaço de cana de açúcar encontra-se arabinose, além de galactose, glicose, xilose e manose.

A manose foi detectada apenas na casca de soja. Devido ao teor de manana encontrado na casca de soja, esse substrato mostrou-se ideal para indução de mananase (Costa, 2017). A maior atividade de mananase neste trabalho foi obtida quando o fungo *A. tamaritii* foi cultivado em casca de soja (item 4.1).

Nas figuras a seguir (figuras 2.22, 2.23, 2.24 e 2.25) são apresentados os cromatogramas de cada biomassa preparados de acordo com o item 3.1 deste capítulo em conjunto com as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 50 X e 250 X.

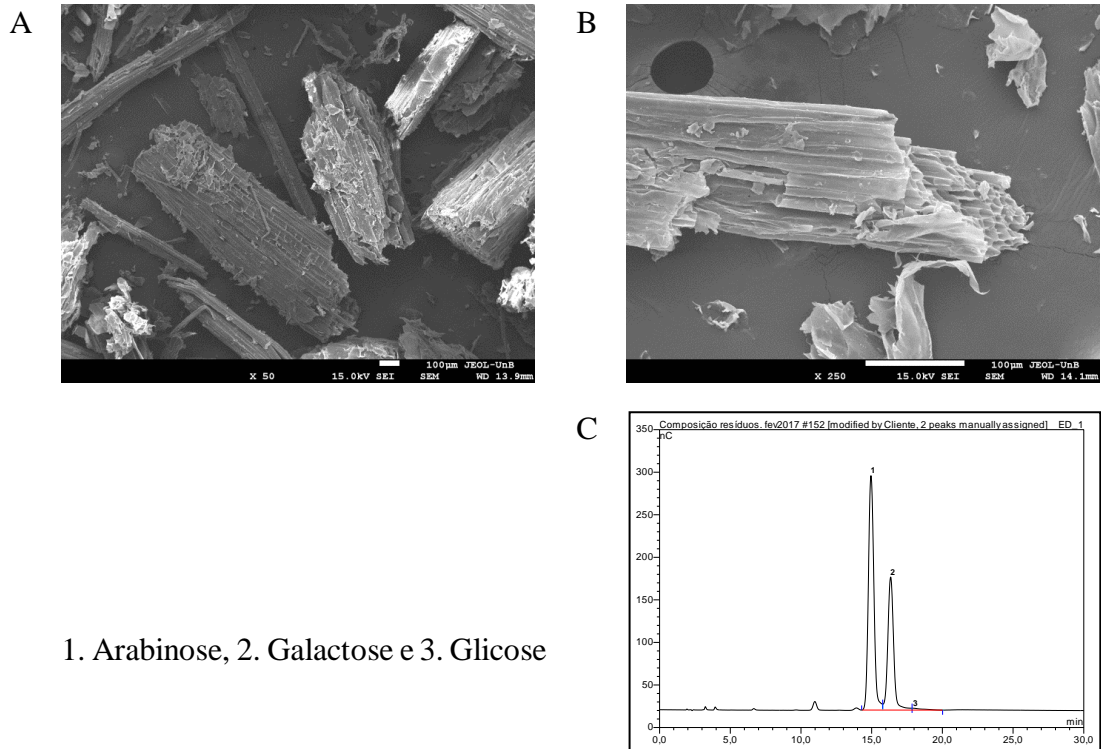


Figura 2.22. A e B - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de bagaço de cana. C - cromatograma de bagaço de cana-de-açúcar obtido por HPLC.

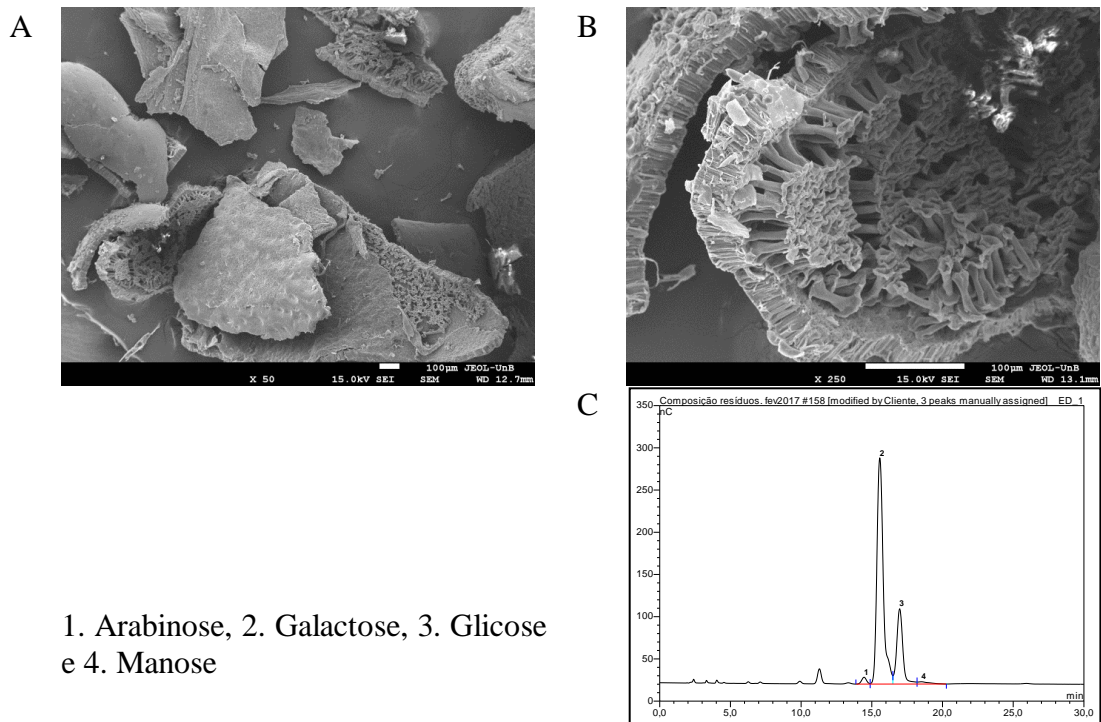


Figura 2.23. A e B - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de casca de soja. C - cromatograma a de casca de soja obtido por HPLC.

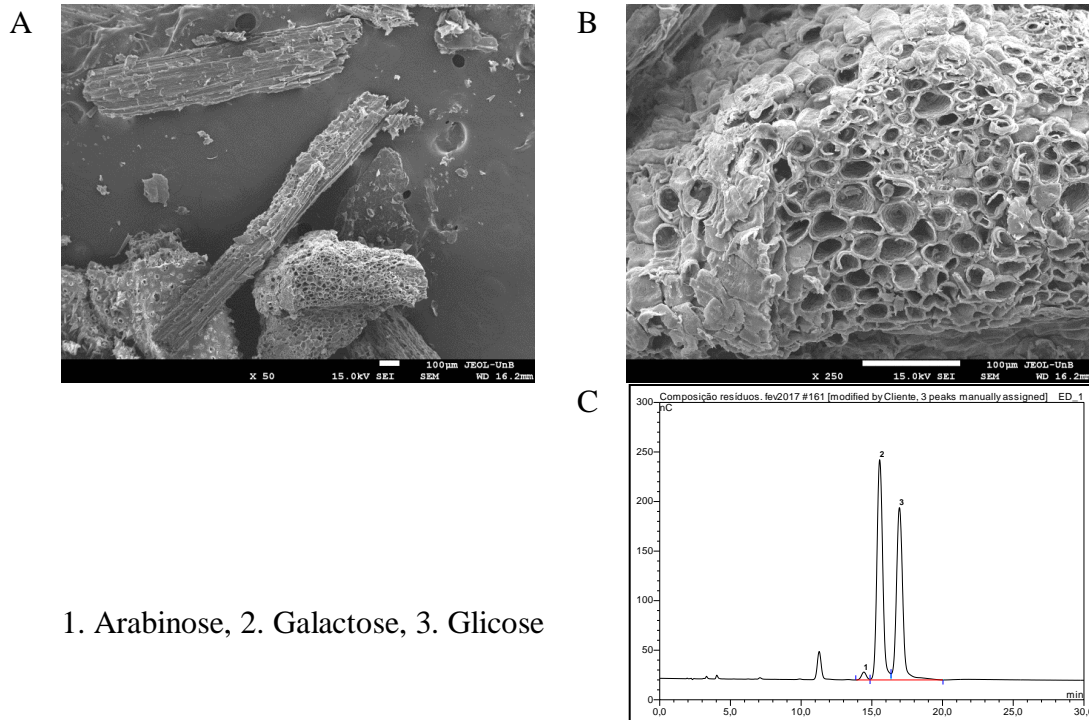


Figura 2.24. A e B - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de Palha de milho. C - Cromatograma de palha de milho obtido por HPLC.

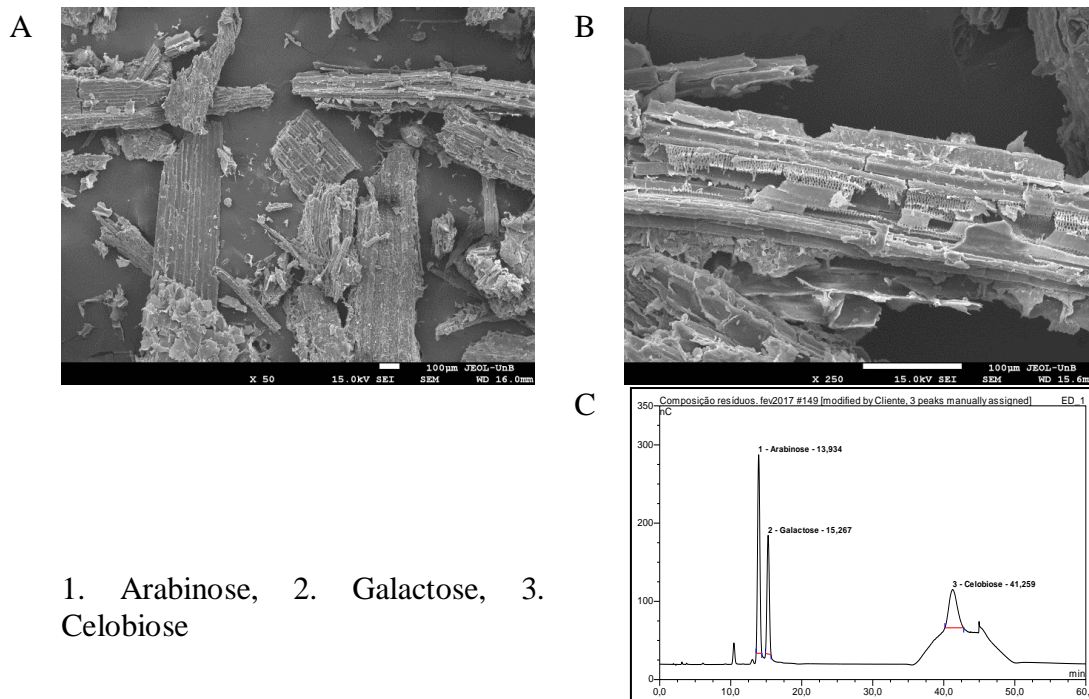


Figura 2.25. A e B - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de palha de cana-de-açúcar. C - Cromatograma de palha de cana-de-açúcar obtido por HPLC.

Os experimentos de análise bromatológica e microscopia eletrônica de varredura foram realizados com a mesma amostra, na qual apenas foi realizado um pré-tratamento em autoclave por 2 horas, seguido de secagem e moagem. Gnanasambandam e Proctor (1997) avaliaram por MEV se o aquecimento da casca de soja a 400 °C alteraria a morfologia e chegaram à conclusão que o aquecimento da casca de soja não é capaz de alterar a morfologia em relação à casca de soja não tratada. Assim, acredita-se que o pré-tratamento utilizado neste trabalho não foi capaz de alterar a morfologia da biomassa.

Pelas micrografias de MEV, é possível visualizar “poros” na casca de soja e palha de milho, o que, conseqüentemente, aumenta a superfície de contato para a atuação das enzimas, associado ao fato de a casca de soja apresentar o menor teor de lignina seguido da palha de milho, porque estes foram os dois substratos que tiveram maior liberação de ART durante a hidrólise enzimática apresentada no tópico 4.10.

Gu e Bao (2014) ressaltam a presença de poros na palha de milho ao apresentarem uma micrografia similar à obtida neste trabalho, e discutem que isso fornece uma evidência de uma maior área de superfície interna do poro do que na superfície externa.

A palha e bagaço de cana apresentam uma superfície com fissuras paralelas, extrativos e outros depósitos em sua superfície, assim como relatado por Chandel, Anjos e Singh (2015).

Conforme Sperandio (2018), é importante ressaltar uma limitação da técnica de microscopia de varredura ao analisar materiais considerados de maiores dimensões para um microscópio de resolução tão poderosa. Cada suporte que é inserido no microscópio só pode ser carregado com uma pequena quantidade de material sólido (biomassa), devido ao grande tamanho deste. Devido a isso, as amostras analisadas não necessariamente são uma reflexão total do que está ocorrendo, pois, as mesmas representam uma minúscula fração do todo.

5. CONCLUSÃO

Vários fatores foram analisados, e os extratos brutos que apresentaram os melhores desempenhos foram selecionados para a confecção de coquetel enzimático.

Trichoderma reesei cultivado em casca de soja (CSTR), *Aspergillus terreus* cultivado em palha (PCAT) e *A. terreus* cultivado em bagaço de cana (BCAT) foram selecionados para a produção de consórcios enzimáticos. Os melhores consórcios enzimáticos elaborados (CSTR:PCAT:BCAT) foram o consórcio 1 (0,33:0,33:0,33), o consórcio 4 (0,45:0,1:0,45) e o consórcio 6 (0,2:0,75:0,05).

Os consórcios apresentaram maior termoestabilidade do que os extratos brutos, da mesma forma que hidrolisaram de forma eficiente as diferentes biomassas, quando comparadas com os extratos brutos.

Os consórcios foram resistentes na presença de compostos fenólicos, e a vanilina e o ácido tânico foram os compostos fenólicos que menos afetaram a atividade enzimática, mesmo depois de 48 h de incubação.

As enzimas dos consórcios apresentaram maior tolerância na presença de íons (1 e 10 mM de concentração) do que os extratos brutos e, em alguns casos, houve um aumento da atividade enzimática quando comparado com os extratos brutos.

O MEV serviu como um instrumento para visualizar as biomassas utilizadas no cultivo dos micro-organismos e hidrólise enzimática. Foi possível observar poros na palha de milho e casca de soja, o que aumenta a superfície de contato para as enzimas. E esses substratos foram os que apresentaram menor teor de lignina na composição bromatológica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, R.; SATLEWAL, A.; GAUR, R.; MATHUR, A.; KUMAR, R.; GUPTA, R. P.; TULI, D. K. Pilot scale pretreatment of wheat straw and comparative evaluation of commercial enzyme preparations for biomass saccharification and fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 102, p. 54–61, 2015.

AHMED, S. A.; SALEH, S. A. A.; MOSTAFA, F. A.; ABD EL ATY, A. A.; AMMAR, H. A. M. Characterization and valuable applications of xylanase from endophytic fungus *Aspergillus terreus* KP900973 isolated from *Corchorus olitorius*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 134–144, 2016.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 163–173, 2014.

ASIAL, I.; CHENG, Y. X.; ENGMAN, H.; DOLLHOPF, M.; WU, B.; NORDLUND, P.; CORNVIK, T. Engineering protein thermostability using a generic activity-independent biophysical screen inside the cell. **Nature Communications**, v. 4, p. 1–8, 2013.

ÁVILA, P. F.; FORTE, M. B. S.; GOLDBECK, R. Evaluation of the chemical composition of a mixture of sugarcane bagasse and straw after different pretreatments and their effects on commercial enzyme combinations for the production of fermentable sugars. **Biomass and Bioenergy**, v. 116, n. 80, p. 180–188, 2018.

ÁZAR, R. I. S. L.; MORGAN, T.; SANTOS, A. C. F. DOS; XIMENES, E. DE A.; LADISCH, M. R.; GUIMARÃES, V. M. Deactivation and activation of lignocellulose degrading enzymes in the presence of laccase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 109, p. 25–30, 2018.

BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J. S.; BORRUSCH, M. S.; ASLAM, N.; WALTON, J. D. Synthetic enzyme mixtures for biomass deconstruction: Production and optimization of a core set. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, n. 5, p. 707–720, 2010.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BUABAN, B.; INOUE, H.; YANO, S.; TANAPONGPIPAT, S.; RUANGLEK, V.; CHAMPREDA, V.; PICHYANGKURA, R.; RENGPIPAT, S.; EURWILAICHITR, L. Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 1, p. 18–25, 2010.

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

CANILHA, L.; CHANDEL, A. .; MILESSI, T. S. .; ANTUNES, F. A. .; FREITAS, W. L. .; FELIPE, M. G. .; SILVA, S. . Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and**

Biotechnology, v. 2012, p. 15 pages, 2012.

CASSALES, A.; SOUZA-CRUZ, P. B. DE; RECH, R.; ZÁCHIA AYUB, M. A. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4675–4683, 2011.

CASTRO, A. M.; CARVALHO, M. L. DE A. DE; LEITE, S. G. F.; PEREIRA JR, N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: Production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 151–158, 2010.

CHAKRABARTI, S. K.; RANU, R. S. Characterization of a β -xylosidase from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2). **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 117–120, 1995.

CHANDEL, A. K.; ANJOS, V.; SINGH, O. Ultra-structural mapping of sugarcane bagasse after oxalic acid fiber expansion (OAFEX) and ethanol production by *Candida shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 4, p. 1–15, 2015.

CHUNDAWAT, S. P. S.; BALAN, V.; DALE, B. E. High-Throughput Microplate Technique for Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. v. 99, n. 6, p. 1281–1294, 2008.

CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. **Monitoramento agrícola- Safra 2015/2016**, v. 3, n. 9, p. 1–174, 2016.

____. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. 2018.

COSTA, D. A. L. Caracterização parcial de mananases produzidas por *Clonostachys blyssicola* cultivado em casca de soja. **Dissertação (Mestrado), Universidade de Brasília**, p. 1–85, 2017.

CUNHA, F. M.; VASCONCELLOS, V. M.; FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. On-Site Production of Enzymatic Cocktails Using a Non-conventional Fermentation Method with Agro-Industrial Residues as Renewable Feedstocks. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 2, p. 517–526, 2017.

DESHPANDE, R.; GIUMMARELLA, N.; HENRIKSSON, G.; GERMGÅRD, U.; SUNDVALL, L.; GRUNDBERG, H.; LAWOKO, M. The reactivity of lignin carbohydrate complex (LCC) during manufacture of dissolving sulfite pulp from softwood. **Industrial Crops & Products**, v. 115, p. 315–322, 2018.

FANG, H.; ZHAO, C.; SONG, X. Y.; CHEN, M.; CHANG, Z.; CHU, J. Enhanced cellulolytic enzyme production by the synergism between *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02 and by the addition of surfactants. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 2, p. 390–398, 2013.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 618–628, 2002.

GAO, J.; HAIBO, A.; AE, W.; XI, Y.; DAHENG, A.; AE, Z.; HAN, S. Purification and characterization of a novel endo-b-1,4-glucanase from the thermoacidophilic *Aspergillus terreus*. 2007.

- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.
- GNANASAMBANDAM, R.; PROCTOR, A. Soy Hull as an Adsorbent Source in Processing Soy Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 6, p. 685–692, 1997.
- GOMES, H. A. DA R. Revelando o potencial de *Clonostachys byssicola* em produzir enzimas holocelulolíticas. **Tese (doutorado) Universidade de Brasília**, p. 1–214, 2017.
- GONZÁLEZ-BAUTISTA, E.; SANTANA-MORALES, J. C.; RÍOS-FRÁNQUEZ, F. J.; POGGI-VARALDO, H. M.; RAMOS-VALDIVIA, A. C.; CRISTIANI-URBINA, E.; PONCE-NOYOLA, T. Phenolic compounds inhibit cellulase and xylanase activities of *Cellulomonas flavigena* PR-22 during saccharification of sugarcane bagasse. **Fuel**, v. 196, p. 32–35, 2017.
- GU, H.; BAO, J. Analysis of particle size reduction on overall surface area and enzymatic hydrolysis yield of corn stover. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 1, p. 149–154, 2015.
- HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 36, 2011.
- JARAMILLO, P. M. D. Produção, Caracterização e Aplicação Biotecnológica de Pectinases produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* cultivado em casca de maracujá-amarelo. **Tese (doutorado) Universidade de Brasília**, 2014.
- JIA, L.; GONÇALVES, G. A. L.; TAKASUGI, Y.; MORI, Y.; NODA, S.; TANAKA, T.; ICHINOSE, H.; KAMIYA, N. Effect of pretreatment methods on the synergism of cellulase and xylanase during the hydrolysis of bagasse. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 158–164, 2015.
- JUHÁSZ, T.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. β -Glucosidase Production by *Trichoderma reesei*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, n. 1–3, p. 0243–0254, 2005.
- JUNG, Y. R.; PARK, J. M.; HEO, S.-Y. Y.; HONG, W.-K. K.; LEE, S.-M. M.; OH, B.-R. R.; PARK, S.-M. M.; SEO, J.-W. W.; KIM, C. H. Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. **Renewable Energy**, v. 76, p. 66–71, 2015.
- KAMAT, S.; KHOT, M.; ZINJARDE, S.; RAVIKUMAR, A.; GADE, W. N. Coupled production of single cell oil as biodiesel feedstock, xylitol and xylanase from sugarcane bagasse in a biorefinery concept using fungi from the tropical mangrove wetlands. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 246–253, 2013.
- LAU, M. W.; BALS, B. D.; CHUNDAWAT, S. P. S.; JIN, M.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; JONES, A. D.; DALE, B. E. An integrated paradigm for cellulosic biorefineries: utilization of lignocellulosic biomass as self-sufficient feedstocks for fuel, food precursors and saccharolytic enzyme production. **Energy & Environmental Science**, v. 5, n. 5, p. 7100, 2012.
- LI, J.; ZHOU, P.; LIU, H.; XIONG, C.; LIN, J.; XIAO, W.; GONG, Y.; LIU, Z. Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 155, p.

258–265, 2014.

LIMA, A. L. G. DE; NASCIMENTO, R. P. DO; BON, E. P. DA S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 272–277, 2005.

LIU, H.; LI, H. Application and Conversion of Soybean Hulls - The Basis of Yield, Biomass and Productivity. *In: Intech*. Minobu Kasai: [s.n.]. p. 111–132.

MA, K.; RUAN, Z. Production of a lignocellulolytic enzyme system for simultaneous bio-delignification and saccharification of corn stover employing co-culture of fungi. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 586–593, 2015.

MAEDA, R. N.; SERPA, V. I.; ROCHA, V. A. L.; MESQUITA, R. A. A.; ANNA, L. M. M. S.; CASTRO, A. M. H. DE; DRIEMEIER, C. E.; PEREIRA, N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1196–1201, 2011.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; GUIMARÃES, V. RIA M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, n. 1, p. 44–49, 2015.

MALGAS, S.; THORESEN, M.; DYK, J. S. VAN; PLETSCHE, B. I. Time dependence of enzyme synergism during the degradation of model and natural lignocellulosic substrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 103, p. 1–11, 2017.

MANFREDI, A. P.; BALLESTEROS, I.; SÁEZ, F.; INÉS, N.; MARTÍNEZ, M. A.; NEGRO, M. J. Integral process assessment of sugarcane agricultural crop residues conversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 260, p. 241–247, 2018.

MEI, Y.; CHEN, Y.; ZHAI, R.; LIU, Y. Cloning, purification and biochemical properties of a thermostable pectinase from *Bacillus halodurans* M29. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 94, p. 77–81, 2013.

MÉNDEZ ARIAS, J.; MODESTO, L. F. A.; POLIKARPOV, I.; PEREIRA, N. Design of an enzyme cocktail consisting of different fungal platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse: Optimization and synergism studies. **Biotechnology Progress**, 2016.

MERYANDINI, A. Characterization of Xylanase from *Streptomyces* spp. Strain C1-3. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 14, n. 3, p. 115–118, 2017.

MIELENZ, J. R.; BARDSLEY, J. S.; WYMAN, C. E. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3532–3539, 2009.

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

MIRZAAKHMEDOV, S. Y.; ZIYAVITDINOV, Z. F.; AKHMEDOVA, Z. R.; SALIEV, A. B.; RUZMETOVA, D. T.; ASHUROV, K. B.; FESSAS, D.; IAMETTI, S. Isolation, purification, and enzymatic activity of cellulase components of the fungus *Aspergillus terreus*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, n. 5, p. 594–597, 2007.

MONCLARO, A.; AQUINO, E.; FARIA, R.; RICART, C.; FREITAS, S.;

MIDORIKAWA, G.; MILLER, R.; MICHELIN, M.; POLIZELI, M.; FILHO, E. Characterization of multiple xylanase forms from *Aspergillus tamarii* resistant to phenolic compounds. **Mycosphere**, v. 7, p. 1554–1567, 2016.

MOREIRA, L. R. D. S. Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus*: Caracterização, degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos. **Tese (doutorado) Universidade de Brasília**, p. 1–272, 2013.

MOREIRA, L. R. D. S.; CARVALHO CAMPOS, M. DE; SIQUEIRA, P. H. V. M. DE; SILVA, L. P.; RICART, C. A. O.; MARTINS, P. A.; QUEIROZ, R. M. L.; FILHO, E. X. F. Two β -xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 46–52, 2013.

OLIVEIRA, F. M. V.; PINHEIRO, I. O.; SOUTO-MAIOR, A. M.; MARTIN, C.; GONÇALVES, A. R.; ROCHA, G. J. M. Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 168–173, 2013.

OLSSON, L.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; HANSEN, K. P.; PALMQVIST, E. A. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 5, p. 612–619, 2003.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource technology**, v. 74, p. 25–33, 2000.

PECIULYTE, A.; ANASONTZIS, G. E.; KARLSTRÖM, K.; LARSSON, P. T.; OLSSON, L. Morphology and enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 are affected by the physical and structural characteristics of cellulosic substrates. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 64–72, 2014.

PENGILLY, C.; GARCÍA-APARICIO, M. P. P.; DIEDERICKS, D.; BRIENZO, M.; GÖRGENS, J. F. F. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated sweet sorghum bagasse by combinations of cellulase and endo-xylanase. **Fuel**, v. 154, p. 352–360, 2015.

PEREIRA, P.; MARTHA, G. B.; SANTANA, C. A.; ALVES, E. The development of Brazilian agriculture: future technological challenges and opportunities. **Agriculture & Food Security**, v. 1, n. 4, p. 1–12, 2012.

RAGHUWANSHI, S.; DESWAL, D.; KARP, M.; KUHAD, R. C. Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. **Fuel**, v. 124, p. 183–189, 2014.

RAN, Y.; WANG, Y. Z.; LIAO, Q.; ZHU, X.; CHEN, R.; LEE, D. J.; WANG, Y. M. Effects of operation conditions on enzymatic hydrolysis of high-solid rice straw. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 18, p. 13660–13666, 2012.

REYES-SOSA, F. M.; MORALES, M. L.; GÓMEZ, A. I. P.; CRESPO, N. V.; ZAMORANO, L. S.; MARTÍN, J. R.; HEREDIA, F. P. M.; GARCÍA, B. D. Management of enzyme diversity in high-performance cellulolytic cocktails. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 156, p. 1–10, 2017.

- SCHIRMER-MICHEL, Â. C.; FLÔRES, S. H.; HERTZ, P. F.; MATOS, G. S.; AYUB, M. A. Z. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 2898–2904, 2008.
- SCHROYEN, M.; VERVAEREN, H.; VANDEPITTE, H.; HULLE, S. W. H. VAN; RAES, K. Effect of enzymatic pretreatment of various lignocellulosic substrates on production of phenolic compounds and biomethane potential. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 696–702, 2015.
- SCIUTO, D. LO. Produção de holocelulases por *Clonostachys byssicola* cultivado em casca de soja - purificação parcial e caracterização de uma endoglicanase. **Dissertação (Mestrado), Universidade de Brasília**, 2015.
- SEGATO, F.; DIAS, B.; BERTO, G. L.; OLIVEIRA, D. M. DE; SOUZA, F. H. M. DE; CITADINI, A. P.; MURAKAMI, M. T.; DAMÁSIO, A. R. L.; SQUINA, F. M.; POLIKARPOV, I. Cloning, heterologous expression and biochemical characterization of a non-specific endoglucanase family 12 from *Aspergillus terreus* NIH2624. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1865, n. 4, p. 395–403., 2017.
- SHI, J.; WU, D.; ZHANG, L.; SIMMONS, B. A.; SINGH, S.; YANG, B.; WYMAN, C. E. Dynamic Changes of Substrate Reactivity and Enzyme Adsorption on Partially Hydrolyzed Cellulose. **Biotechnol. Bioeng**, v. 114, p. 503–515, 2017.
- SHIMOKAWA, T.; SHIBUYA, H.; IKEDA, T.; MAGARA, K.; SHINAGAWA, S.; SHINAGAWA, H.; NOJIRI, M.; OHARA, S. Ethanol production from sugi pulp under simultaneous saccharification and fermentation using a cocktail enzyme of *T. reesei* and *A. tubingensis* produced by solid-state fermentation. **Journal of Wood Science**, v. 59, p. 171–178, 2013.
- SILVA, C. DE O. G. Tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar como ferramenta para aumentar a produção de holocelulases por *Aspergillus niger*. **Tese (doutorado) Universidade de Brasília**, 2018.
- SILVA, C. DE O. G.; FILHO, E. X. F. A Review of Holocellulase Production Using Pretreated Lignocellulosic Substrates. **BioEnergy Research**, v. 10, n. 2, p. 592–602, 2017.
- SILVA, C. O. G.; VAZ, R. P.; FILHO, E. X. F. Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 12, p. 277–289, 2017.
- SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541–549, 2010.
- SIQUEIRA, F. G. Resíduos Agroindustriais com Potencial para a Produção de Holocelulases de Origem Fúngica e Aplicações Biotecnológicas de Hidrolases. **Tese (doutorado) Universidade de Brasília**, p. 277, 2010.
- SOHAIL, M.; AHMAD, A.; KHAN, S. A. Production of cellulase from *Aspergillus terreus* MS105 on crude and commercially purified substrates. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2016.

- SOLÓRZANO LEMOS, J. L.; BON, E. P. S.; EBOLE SANTANA, M. D. F.; PEREIRA, N. Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 206–211, 2000.
- SPERANDIO, G. B. Estudos dos perfis enzimáticos de *Trichoderma reesei* RUT-C30 e 9414 em co-culturas com fungos do gênero *Aspergillus* e *Phanerochaete*. **Dissertação (Mestrado), Universidade de Brasília**, p. 1–83, 2018.
- STAPPLER, E.; WALTON, J. D.; BEIER, S.; SCHMOLL, M. Abundance of secreted proteins of *Trichoderma reesei* is regulated by light of different intensities. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2586, p. 1–14, 2017.
- SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN, R. C.; SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 195–204, 2004.
- TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4744–4753, 2010.
- TEJIRIAN, A.; XU, F. Inhibition of cellulase-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 23, p. 7673–7682, 2010.
- TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **Journal of clinical pathology**, v. 22, n. 2, p. 158–61, 1969.
- TURNER, P.; MAMO, G.; KARLSSON, E. N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 9, p. 1–23, 2007.
- VALE, L. H. F. DO. Regulação da produção de enzimas celulolíticas por fungos em resposta a efetores metabólico. **Tese (doutorado) Universidade de Brasília**, 2012.
- VIKARI, L.; VEHMAANPERÄ, J.; KOIVULA, A. Lignocellulosic ethanol: From science to industry. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 13–24, nov. 2012.
- VISSER, E. M.; FALKOSKI, D. L.; ALMEIDA, M. N. DE; MAITAN-ALFENAS, G. P.; GUIMARÃES, V. M. Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 587–594, 2013.
- WANG, J. S.; STEINBERGER, Y.; WANG, X. Y.; HU, L.; CHEN, X.; XIE, G. H. Variations of chemical composition in corn stover used for biorefining. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 8, n. 6, p. 633–640, 2014.
- WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Biomass Part A: Cellulose and Hemicellulose. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 87–112, 1988.
- XIAO, Z.; ZHANG, X.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 113–116, p. 1115–1126, 2004.
- XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 1, p. 54–60, 2011.

- YOPI, K.; MERYANDINI, A. Characterization of Xylanase activity produced by *Paenibacillus* sp. XJ18 from TNBD Jambi, Indonesia. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 22, n. 1, p. 20–26, 2017.
- YOU, T.; ZHANG, L.; ZHOU, S.; XU, F. Structural elucidation of lignin – carbohydrate complex (LCC) preparations and lignin from *Arundo donax* Linn. **Industrial Crops & Products**, v. 71, p. 65–74, 2015.
- ZABED, H.; SAHU, J. N. N.; SUELY, A.; BOYCE, A. N. N.; FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 475–501, 2017.
- ZHANG, H.; LYU, G.; ZHANG, A.; LI, X.; XIE, J. Effects of ferric chloride pretreatment and surfactants on the sugar production from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 93–101, 2018.
- ZHENG, W.; ZHENG, Q.; XUE, Y.; HU, J.; GAO, M.-T. Influence of rice straw polyphenols on cellulase production by *Trichoderma reesei*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 20, n. 20, p. 1–8, 2017.
- ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R.; JENKINS, B. M. Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 6, p. 1558–1569, 2009.
- ZHONG, R.; YE, Z. Secondary Cell Walls : Biosynthesis, Patterned Deposition and Transcriptional Regulation. **Planta and cell psysiology**, v. 56, n. 2, p. 195–214, 2014.
- ZHOU, J.; WANG, Y. H.; CHU, J.; LUO, L. Z.; ZHUANG, Y. P.; ZHANG, S. L. Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 819–825, 2009.

SUPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DO CONSÓRCIO ENZIMÁTICO PARA HIDRÓLISE DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o conceito de *economia linear* começou a entrar em declínio dando espaço para a *economia circular* (EC). O modelo linear de economia enérgica é baseado principalmente no uso de recursos fósseis, hoje considerado insustentável. Por outro lado, o modelo de economia circular dá ênfase à abordagem de “reduzir-reutilizar-reciclar”, fechando o ciclo de vida do produto (Giacobbe *et al.*, 2018), além de propor a mitigação dos impactos ambientais.

Uma das matérias-primas empregadas na economia circular são os resíduos lignocelulósicos. A indústria baseada em lignocelulose – também conhecida como biorrefinaria lignocelulósica – tem potencial para tornar-se cada vez mais importante na sociedade como complemento e até mesmo como alternativa à atual indústria do petróleo (Fillat *et al.*, 2017).

A quebra eficiente dos polímeros da biomassa lignocelulósica em moléculas simples é a principal dificuldade tecnológica que limita a produção de biocombustíveis e produtos químicos derivados da biomassa. Na natureza, a degradação da biomassa vegetal é alcançada pela ação de uma ampla gama de enzimas microbianas (Davidi *et al.*, 2016). Atuando individualmente são incapazes de degradar totalmente a biomassa, sendo necessária a ação simultânea e sinérgica de diferentes enzimas especializadas (Santos *et al.*, 2017, Reyes-Sosa *et al.*, 2017).

Dentre as principais enzimas relacionadas à degradação de biomassa, encontram-se as celulasas – endoglicanases e exoglicanases com ou sem módulo de ligação a carboidrato (CBM), várias hemicelulasas e as ligninasas. Um coquetel enzimático deve conter, além das enzimas citadas anteriormente, enzimas e proteínas acessórias, tais como as monoxigenases de polissacarídeos (LPMOs), glicosidasas, swoleninas, lacases, peroxidases, galactanasas, liases e pectinasas (Gupta *et al.*, 2016).

A formação de coquetel enzimático é um dos melhores métodos para melhorar a eficiência da conversão da biomassa em biocombustíveis e outros produtos (Thomas, Parameswaran e Pandey, 2016). As formas usadas para a otimização de coquetéis podem incluir suplementação com enzimas não hidrolíticas, surfactantes ou outros produtos químicos, ou mesmo suplementação com uma enzima específica, visando hidrolisar um determinado substrato. A obtenção de um coquetel otimizado por qualquer um dos métodos pontuados acima pode levar à redução dos custos da hidrólise enzimática da lignocelulose (Lopes, Filho e Moreira, 2018).

Proteínas com atividades hidrolíticas e não hidrolíticas podem ser usadas na suplementação de coquetéis, como por exemplo β -glicosidase, lacase e expansina. A β -glicosidase converte celobiose em glicose e a carência dessa enzima pode levar ao acúmulo de celobiose, o que pode causar inibição de outras enzimas do complexo celulolítico (Singhania *et al.*, 2013). As lacases são enzimas ligninolíticas que podem oxidar compostos fenólicos com uma redução concomitante de oxigênio a água. Apresentam ampla especificidade de substrato e desempenham um papel importante nos processos de degradação e modificação de lignina. Desta forma, são capazes de possibilitar o aumento no rendimento da hidrólise (Giacobbe *et al.*, 2018).

As expansinas, inicialmente isoladas de plantas, são proteínas não catalíticas que, por meio de um mecanismo ainda pouco descrito, auxiliam na degradação da celulose. Elas são capazes de afrouxar a parede celular por meio do enfraquecimento da ligação de hidrogênio entre os polissacarídeos, e, assim, facilitar a quebra da celulose por enzimas específicas (Gupta *et al.*, 2016, Mcqueen-mason e Cosgrove, 1994).

O emprego de surfactantes tem sido promissor, especialmente surfactantes não-iônicos. Seu uso após o pré-tratamento da biomassa é necessário para melhorar a hidrólise enzimática e/ou reduzir a quantidade de enzima necessária para obter a mesma conversão (Qing, Yang e Wyman, 2010, Agrawal *et al.*, 2016). A melhoria da conversão com o uso de surfactante pode ser explicada pela capacidade de prevenir a desnaturação, aumentar as interações entre substratos e enzimas, reduzir a adsorção não-produtiva das enzimas, além de alterar a estrutura do substrato tornando-o mais acessível às enzimas (Qing, Yang e Wyman, 2010, Chen *et al.*, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Otimização do consórcio 4 (0,45 CSTR: 0,1 PCAT: 0,45 BCAT) com proteínas acessórias, surfactantes e aditivos químicos para a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.

2.2. Objetivos específicos

- Semi-purificar uma β -glicosidase de *Humicola grisea* para suplementação do consórcio 4;
- Avaliar o efeito da adição de lacase, expansina, tween 80 e triptofano;
- Combinar o consórcio 4 com os coquetéis comerciais – celluclast e cellic ctec2;
- Comparar o consórcio otimizado com coquetéis comerciais – celluclast e cellic ctec 2.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 3.1. Detalhamento dos experimentos

	Suplementado	Validado em micro-escala
CONSÓRCIO 4	<i>β-glicosidase</i> <i>Tween 80</i> <i>Expansina</i> <i>Lacase</i> <i>Tween 80 e lacase</i> <i>Triptofano</i>	1 mL e 50 mL
	Suplementado	Comparado
CONSÓRCIO 4 LT	<i>Expansina</i> <i>Coquetéis comerciais</i>	<i>Coquetéis comerciais</i>

Consórcio 4: 0,45 de *T. reesei* cultivado em casca de soja; 0,1 de *A. terreus* cultivado em palha de cana; 0,45 de *A. terreus* cultivado em bagaço de cana; consórcio 4 LT: consórcio 4 suplementado com 0,5% de tween 80 e 8 mg/g de lacase.

3.1 Semi purificação de β-glicosidase para suplementação do consórcio enzimático

O fungo *Humícola grisea* var. *thermoidea* foi crescido em meio com aveia 2% a 40°C em estufa por 7 dias e, após esse período, foi cultivado em bagaço de cana em meio mínimo (item 3.3 do Capítulo 2) por mais 7 dias sob agitação. O extrato bruto foi filtrado em papel de filtro *whatman* nº 1 e caracterizado com relação à atividade enzimática de β-glicosidase, conforme descrito no item 3.4.4 do Capítulo 2 desta tese.

O extrato bruto foi submetido à ultrafiltração em membrana de 50 kDa e concentrado 10 vezes. A enzima de interesse ficou retida no concentrado, 2% de volume de coluna foi então aplicado na coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100 (1,5 x 45 cm). O conteúdo coletado em cada fração foi de 4,5 mL, com fluxo de 5 mL/15 min, sendo eluído em tampão acetato de sódio pH 5,0 a 50 mM.

Nas frações coletadas além da atividade de β-glicosidase foram avaliadas as atividades de CMCase, xilanase, pectinase e mananase conforme o item 3.4.1 do Capítulo 2. A detecção de proteína foi feita por leitura de absorbância a 280 nm.

As frações cromatográficas que apresentaram maior atividade de β -glicosidase foram reunidas, liofilizadas e ressuspendidas em tampão acetato pH 5,0 a 50 mM.

A atividade de β -glicosidase (CBU) foi medida seguindo o protocolo de Ghose, (1987). O consórcio enzimático foi suplementado com a adição de 1 CBU, da fração semipurificada de β -glicosidase e a hidrólise foi realizada conforme descrita no item 3.9 do Capítulo 2.

A suplementação foi combinada de três formas: 1º) na forma simultânea, o consórcio e a β -glicosidase foram adicionados simultaneamente no tempo 0 h; 2º) na forma sequencial, as primeiras 48h ocorreram na presença do consórcio 4 e após esse tempo, a β -glicosidase foi adicionada; 3º) na forma consecutiva, a β -glicosidase foi adicionada no tempo de 48h, após desnaturação do consórcio enzimático. O tempo de hidrólise em todas as situações foi de 72 h.

3.2. Validação da hidrólise enzimática em microescala

Os microensaios de hidrólise em microtubos ocorreram de forma semelhante à descrita no item 3.9 do Capítulo 2, entretanto, com redução na proporção de 1:50. Desta forma, foram utilizados microtubos (*Eppendorf*) de 1,5 mL, com volume final de 1,0 mL. O experimento foi realizado em Vortemp a 50°C e 950 rpm. As amostras foram retiradas por “sacrifícios” nos tempos de 1, 6, 24, 48 e 72 h.

As análises estatísticas utilizadas para se comprovar a diferença na hidrólise entre os tempos avaliados foram realizadas por meio do software *Minitab* 18. Os dados foram submetidos à ANOVA *One way* e post-hoc teste LSD Fisher com 0,05% de intervalo de confiança. Os experimentos foram feitos em triplicatas.

A partir da validação, todas as próximas hidrólises enzimáticas foram realizadas em microescala, a 50°C, 950 rpm, pH 5,0 (tampão acetato de sódio a 50 mM), 2% de carga de proteína e 1% de fonte de carbono.

3.3. Suplementação do consórcio 4 com adição de surfactante – tween 80

Foi realizada a hidrólise do bagaço de cana com o consórcio 4 por meio da adição simultânea de tween 80 nas concentrações de 0,5, 1 e 2% v/v. A hidrólise foi realizada conforme o item 3.2.

3.4. Suplementação do consórcio 4 com expansina

A expansina utilizada neste trabalho foi proveniente de bagaço de cana-de-açúcar e foi clonada em *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). A expansina foi gentilmente cedida pela profa. Dr. Fabrícia Paula de Faria da Universidade Federal de Goiás.

Para a análise da atividade funcional da expansina, foi usado papel de filtro *whatman* nº 1 como substrato. Em um microtubo foi adicionado \pm 25 mg de papel *whatman* nº 1, tampão acetato de sódio pH 5,0 a 50 mM e dosagens de 0,5, 1 e 2 mg de expansina por grama de substrato. A dosagem de proteína foi realizada conforme o item 3.6 do Capítulo 2. O material foi mantido a 50 °C, após o período de incubação (6, 24, 48 e 72 horas), o sobrenadante foi descartado e na superfície do papel de filtro foi realizado ensaio de atividade de FPase usando o consórcio 4. O ensaio de FPase foi realizado conforme item 3.4.3 do Capítulo 2 e as atividades de CMCase, xilanase, pectinase e mananase, seguindo o item 3.4.1 do Capítulo 2.

Uma hidrólise foi realizada em bagaço de cana-de-açúcar de maneira simultânea (consórcio mais expansina), usando diferentes cargas de expansina para avaliar o tempo e cargas ideais de incubação. Foi realizada hidrólise com cargas de 0,5, 1 e 2 mg de expansina por grama de biomassa por 24 e 48 h, além de 2, 4 e 8 mg por 72 h.

Definida a dosagem de expansina, a hidrólise em bagaço de cana-de-açúcar foi realizada conforme o item 3.2 deste capítulo. Três estratégias de suplementação foram utilizadas: (1) de forma simultânea, o consórcio 4 e a expansina foram adicionados simultaneamente no tempo 0 h, esta hidrólise permaneceu por 72 h; (2) de forma sequencial, a expansina foi mantida com o substrato por 48 h e após este período o consórcio 4 foi adicionado (3) de forma consecutiva, após 48 h de hidrólise do substrato apenas na presença da expansina, o microtubo foi mantido a 97°C por 5 minutos, para desnaturação da expansina e o consórcio 4 foi adicionado. No caso das hidrólises sequencial e consecutiva, estas permaneceram por 120 h de incubação.

3.5. Suplementação do consórcio 4 com lacase

A lacase utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo Dr. Felix Siqueira da Embrapa Agroenergia. O fungo *Pleurotus ostreatus*, código CC389 (Coleção de Microorganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias da Embrapa Agroenergia) foi cultivado em fibra de coco verde e algodão por 30 dias a 28°C por

fermentação em estado sólido com umidade de 65%. Para a extração das enzimas foi utilizado 30 g do material diluído em 100 mL de solução triton 0,1%, e mantidos em agitação por 24 h (250 rpm 5°C) e posteriormente filtrado e centrifugado (10600 g, 15 minutos). Atividade (ABTS) foi de 783,7 UI/mL.

Seguindo o item 3.4.1 do Capítulo 2, foram realizados ensaios de atividades de CMCase, xilanase, pectinase e mananase.

Para a suplementação do consórcio com a lacase, foi realizada uma hidrólise prévia para determinar a carga ótima de enzima. Para isso, o consórcio foi incubado na presença da lacase (simultaneamente) com cargas de 2, 4 e 8 mg/g de biomassa por 24 h.

Após a determinação da carga ótima de lacase, foi realizada a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, na qual três estratégias de suplementação foram utilizadas: (1) de forma simultânea, o consórcio 4 e a lacase foram adicionadas simultaneamente no tempo 0h, esta hidrólise permaneceu por 72 h; (2) de forma sequencial, a lacase foi mantida com o substrato por 24 h e após este período o consórcio 4 foi adicionado; (3) de forma consecutiva, após 24 h de hidrólise do substrato apenas na presença da lacase, o microtubo foi mantido a 97°C por 5 minutos e o consórcio 4 foi adicionado. As hidrólises sequencial e consecutiva tiveram duração de 96 h. A hidrólise foi realizada conforme o item 3.2 deste capítulo.

3.6. Suplementação concomitante do consórcio 4 com tween 80 e lacase

O bagaço de cana-de-açúcar foi hidrolisado pelo consórcio 4, suplementado com lacase e tween. Foi adotado o modelo simultâneo de hidrólise. Esta hidrólise teve duração de 96 h e foi realizada conforme o item 3.2, deste capítulo. A combinação do consórcio 4 com lacase e tween foi denominada consórcio 4 LT.

3.7. Suplementação do consórcio 4 com triptofano

O consórcio 4 foi suplementado simultaneamente com triptofano a 10 ou 20mM na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. A hidrólise foi realizada conforme metodologia do item 3.2 e teve duração de 72 h.

3.8. Suplementação do consórcio com tween, lacase e expansina

O bagaço de cana-de-açúcar foi hidrolisado por meio da combinação do consórcio 4 LT com expansina. Três estratégias de suplementação foram utilizadas: (1) de forma simultânea, o consórcio 4 LT e a expansina foram adicionadas simultaneamente no tempo 0 h, esta hidrólise teve duração de 72 h; (2) de forma sequencial, a expansina foi mantida com o substrato por 48 h e após este período o consórcio 4LT foi adicionado (3) de forma consecutiva, após 48 h de hidrólise do substrato apenas na presença da expansina, o microtubo foi mantido a 97°C por 5 minutos, para desnaturação da expansina, e o consórcio 4LT foi adicionado. No caso das hidrólises sequencial e consecutiva estas tiveram duração de 120 h. A hidrólise foi realizada conforme o item 3.2. A combinação do consórcio 4 com expansina, lacase e tween foi denominada consórcio 4 ELT.

3.9. Suplementação do consórcio 4LT com coquetéis comerciais

O bagaço de cana-de-açúcar foi hidrolisado a partir da combinação simultânea do consórcio 4 LT com os coquetéis comerciais (cellic ctec2 ou celluclast – novozymes) e da combinação entre os coquetéis comerciais (cellic ctec2 e celluclast – novozymes).

A hidrólise foi realizada com carga final de 4 mg/g, sendo 2 mg/g advindos de cada combinação. A hidrólise teve duração de 72 h e foi realizada conforme o item 3.2.

3.10. Comparação dos consórcios com os coquetéis comerciais

Os consórcios 4 LT (consórcio 4 com lacase e tween) e 4 ELT (consórcio 4 com lacase, tween e expansina) desenvolvidos durante o trabalho foram comparados com os coquetéis comerciais – celluclast e cellic ctec2 – na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar por 72 h conforme o item 3.2, deste capítulo.

3.11. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada com o objetivo de visualizar as mudanças estruturais na superfície das biomassas com 48 h de hidrólise. As amostras foram submetidas à secagem a 65°C, metalizadas em equipamento Sputter Coater SCD 050 (Balzers, Alemanha) e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura modelo JMS 7001F (JEOL, Japão) utilizando-se voltagem de 15 kV, de acordo com protocolo adaptado de Li et al. (2014).

3.12. Análise dos carboidratos das biomassas hidrolisadas via HPLC

As amostras obtidas a partir dos experimentos de hidrólises foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência de troca aniônica, acoplada a um detector de amperometria pulsada (HPAE-PAD), por meio do sistema Dionex ICS 3000 DC Ion Chromatography com utilização de pré-coluna CarboPac Guard e coluna CarboPac PA-100 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA). Foram injetados 10 µL de amostra com o auto sampler AS40 (Dionex), com o fluxo de 15 mL/min. As amostras foram eluídas em solução de hidróxido de sódio (0,1 M) e solução de acetato de sódio (0,5 M). Os dados obtidos foram analisados pelo software *Chromeleon 6.8 SR8* (Dionex). A curva de calibração para a quantificação dos oligossacarídeos foi feita a partir de várias soluções com os diferentes monossacarídeos e oligossacarídeos (glicose, celobiose, celotriose, celopentaose, celohexose, xilose, xilobiose, xilotriose, xilopentaose, xilohexaose, manose, manobiose, manotriose, manotetraose, manopentose e monohexose) com concentração final de 1 mg/mL. Posteriormente, foi feito um mix contendo todos monossacarídeos e oligossacarídeos com concentrações distintas (variando de 0,0025-0,005 mg/mL).

3.13. Análise estatística

As análises estatísticas utilizadas para se comprovar a diferença entre os pontos de hidrólise e os tratamentos foram feitas com o software *Statistic 10*. Os dados foram submetidos à ANOVA com *post-hoc* teste LSD Fisher com nível de significância de 0,05%.

4. RESULTADO E DISCUSSÕES

4.1. Semi-purificação de β -glicosidase para suplementação do consórcio enzimático

O fungo termofílico *H. grisea* var. *thermoidea* é caracterizado como um fungo aeróbico que sobrevive em temperaturas que variam de 20 a 50 °C, apresentando crescimento ótimo entre 40 e 42 °C. É capaz de secretar várias enzimas termoestáveis como celulases, β -glicosidases, xilanases, β -xilosidases e feroluil esterases (Cintra, 2016). Dentre elas, este fungo é reconhecido por produzir altos índices de β -glicosidase (Polizeli, Jorge e Terenzi, 1996). No trabalho de Peralta *et al.*, (1997), o *H. grisea* var. *thermoidea* também crescido em bagaço de cana produziu duas formas de β -glicosidase mais ativas a 50 e 60 °C e pH 6,0.

A carência de β -glicosidase em um coquetel enzimático pode levar ao acúmulo de celobiose, causando inibição de outras enzimas do complexo celulolítico, como endoglicanase e celobiohidrolase (Singhania *et al.*, 2013). A eficiência da hidrólise enzimática depende tanto das características de enzimas individuais como da proporção dessas enzimas em um coquetel multienzimático. Assim foi avaliada a suplementação do consórcio com β -glicosidase proveniente de *H. grisea*.

O *H. grisea* cultivado em bagaço de cana por 7 dias apresentou atividade volumétrica de β -glicosidase de 0,36 UI/mL e atividade específica de 3,63 mg/mL.

A ultrafiltração foi realizada em membrana de corte de 50 kDa. Na literatura trabalhos relatam β -glicosidases purificadas com massa molecular acima de 50 kDa (Peralta *et al.*, 1997; Filho, 1996). Após a ultrafiltração, o concentrado apresentou atividade de 1,11 UI/mL e não foi detectada atividade de β -glicosidase no ultrafiltrado.

O concentrado foi aplicado na coluna Sephacryl S-100 que resultou no perfil cromatográfico, mostrados na Figura 3.1. As maiores atividades de β -glicosidase foram encontradas nas frações 38, 39 e 40 com atividade média de 0,61 UI/mL. Entretanto, nestas frações também foram encontradas atividades de CMCase, xilanase, pectinase e mananase.

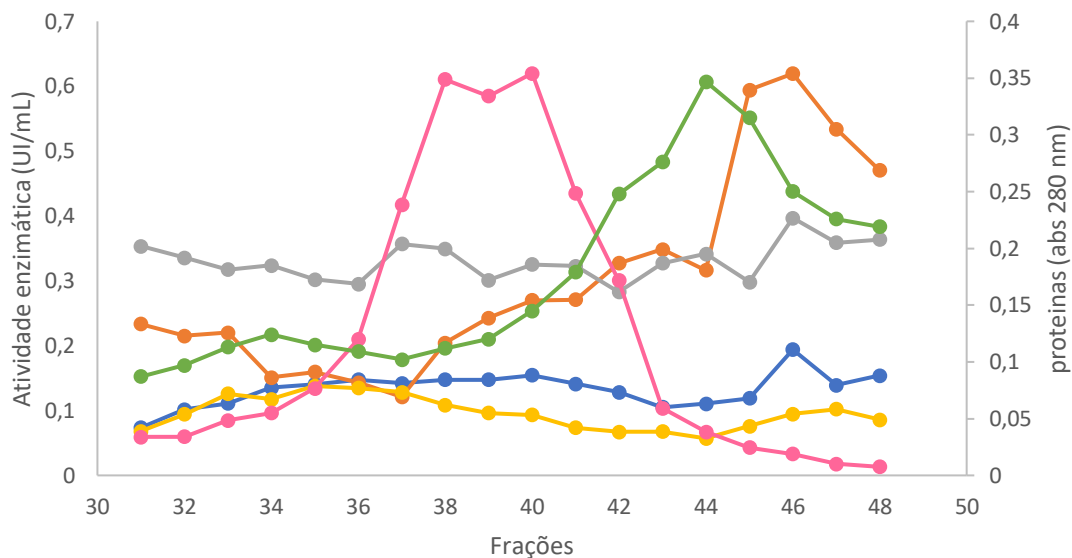


Figura 3.1. Perfil cromatográfico da semi-purificação do extrato bruto de *H. grisea* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar aplicado na coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100. Foi aplicada amostra proteica com 2 % de volume de coluna eluído com tampão acetato de sódio pH 5,0 a 50 mM, e fluxo de 0,33 mL/min. —●— CMCCase, —●— xilanase, —●— pectinase, —●— mananase, —●— β-glicosidase —●— proteínas a 280 nm.

Várias corridas cromatográficas foram realizadas e as frações com os maiores picos de atividade foram reunidas para a suplementação do consórcio 4 na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. As frações quando reunidas apresentaram 0,13 CBU/mL, desta forma, foi necessária a liofilização das frações para que fosse possível realizar a hidrólise com suplementação de 1 CBU/mL.

Os resultados da hidrólise de bagaço de cana na presença do consórcio 4 com a suplementação de β-glicosidase semi-purificada de *H. grisea* estão apresentados na Figura 3.2.

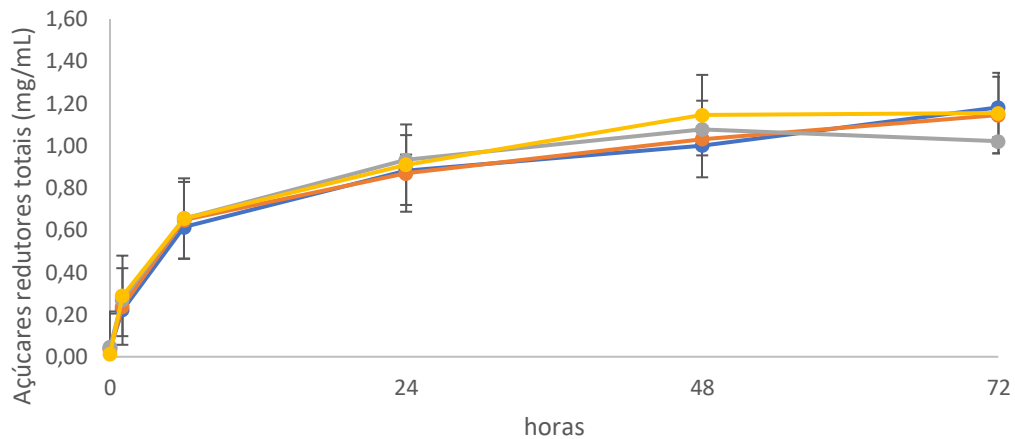
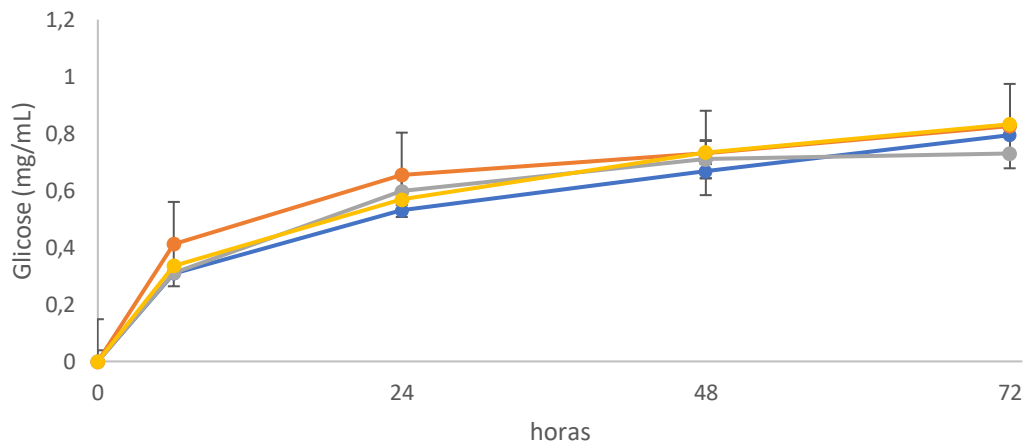
A**B**

Figura 3.2. Hidrólise enzimática de bagaço de cana de açúcar na presença do consórcio 4 (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT) suplementado com 1 CBU de β -glicosidase semi purificado de *H. grisea*. A – açúcares redutores totais e B – glicose. —●— consórcio 4, —●— adição simultâneo, —●— adição sequencial e —●— adição consecutiva.

Conforme podemos avaliar, a adição de 1 CBU/mL de β -glicosidase no consórcio 4 não aumentou a liberação de açúcares redutores totais, nem a liberação de glicose. Duas hipóteses podem ser levantadas: a primeira é que o consórcio não carece de suplementação de atividade de β -glicosidase; a segunda é que a dosagem de 1 CBU/mL é uma carga relativamente baixa para elevar o desempenho do consórcio. Dos 16 extratos brutos caracterizados inicialmente (Capítulo 2) o que apresentou a maior atividade de β -glicosidase foi o *A. terreus* quando cultivado em palha de cana. A atividade específica

apresentada por este extrato bruto é a mesma apresentada pelo *H. grisea*. Vale ressaltar que o consórcio 4 contém 10% de extrato bruto do *A. terreus* em palha de cana.

Rabelo (2010) usou uma carga de 1,0 CBU/g combinado com 3,5 FPU/g para a hidrólise de bagaço pré-tratado. Shi, Xiang e Li (2015) usaram 10 CBU/g na hidrólise de palha de milho (Ruiyang, China) e afirmam que usaram em excesso com a intenção de evitar o acúmulo de celobiose. No trabalho de Rueda (2010), utilizando 30 FPU/g e 25 CBU/g de celulose foi possível obter um rendimento de hidrólise de 97,1%. Mesmo quando baixaram a dose para 25,85 FPU/g e 7,33 CBU/g de celulose o rendimento manteve-se acima de 95%.

Entretanto, a quantidade de β -glicosidade necessária tende a variar de acordo com o tipo de biomassa e pré-tratamento. No trabalho de Xiao *et al.*, (2004) ao hidrolisar *softwood* usaram uma carga de 64 CBU/g de celulose de Novozyme 188. Por sua vez, na hidrólise enzimática de sorgo, Salvi *et al.*, (2010) utilizaram uma carga de 80 CBU/g de celulose ao utilizar o também coquetel Novozyme 188.

Vale salientar que o coquetel comercial novozymes 188 é o que apresenta maior atividade de β -glicosidase (Hu, Arantes e Saddler, 2011) sendo frequentemente utilizado em trabalhos. Segundo Shi *et al.*, (2017) a atividade de β -glicosidade deste coquetel é de aproximadamente 665 CBU/mL, ou seja, muito superior a quantidade de CBU do extrato semi-purificado neste trabalho de *H. grisea*.

4.2 Validação da hidrólise enzimática em microescala

Para o estudo de aperfeiçoamento de coquetéis enzimáticos, é interessante trabalhar com microescala, pois assim menor quantidade de material é usado. O objetivo desse experimento foi validar a hidrólise em menor escala. Os resultados obtidos podem ser comparados na Figura 3.3.

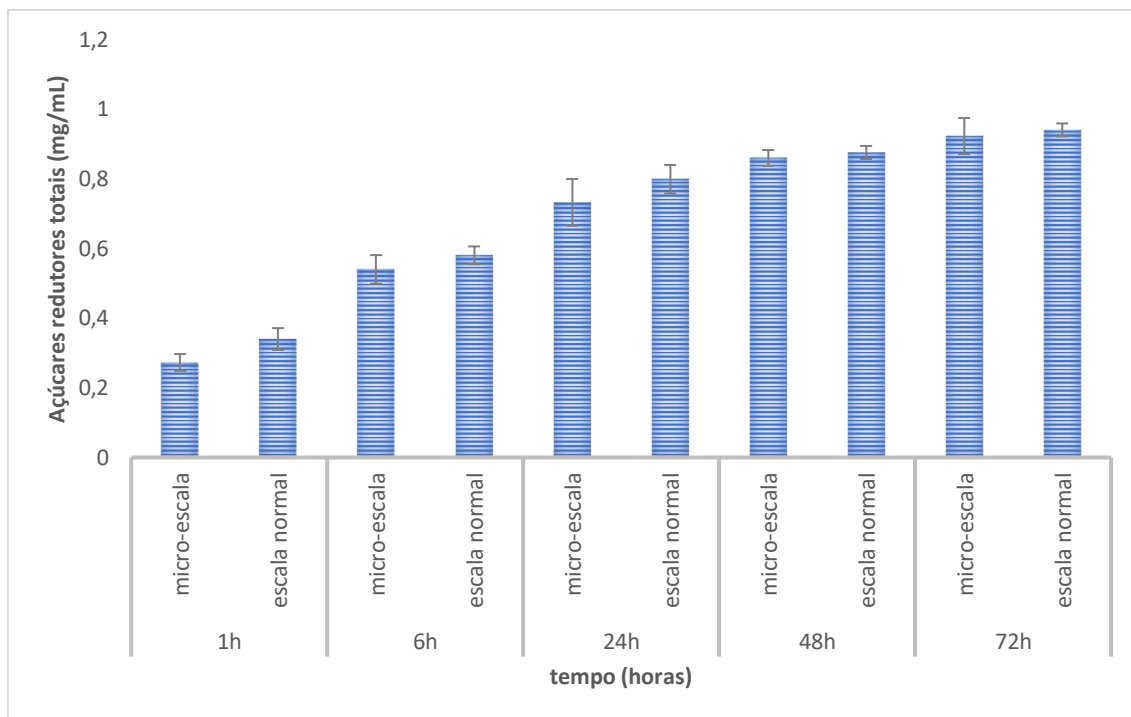


Figura 3.3. Liberação de açúcares redutores totais na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar realizada em duas escalas com o consórcio 4 (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT). Microescala – 1 mL e escala normal – 50 mL.

As ferramentas estatísticas são importantes ferramentas para projetar e validar coquetéis (Lopes, Filho e Moreira, 2018). Neste caso, a estatística foi aplicada para validar a utilização de um menor volume na hidrólise e reprodutibilidade. A hidrólise foi realizada com o consórcio 4 em duas escalas diferentes (microescala com volume final de 1,0 mL e escala normal com volume final de 50 mL). Pelo teste de ANOVA *one way* ficou evidente que não há diferença estatística nos tempos de 6, 24, 48 e 72 h, os valores de *p* ficaram acima de 0,05 (nível de significância de 0,053 para 6 h, 0,073 para 24 h, 0,169 para 48 h e 0,416 para 72 h). No tempo de 1 h de hidrólise há diferença ($p=0,001$) entre os modelos adotados, a diferença pode ser explicada por uma falha de execução do experimento, pois o *shaker* (50 mL) levou mais tempo para atingir a temperatura de 50 °C do que o *vortemp* (1 mL), sendo que os experimentos foram preparados simultaneamente.

Bussamra, Freitas e Costa (2015) realizaram estratégia equivalente à do presente trabalho. Reduziram a escala de hidrólise enzimática de 50 mL para 1,5mL e validaram o experimento por teste estatístico.

Berlin *et al.* (2005) realizaram a hidrólise enzimática de polpa e folhas de álamo amarelo em duas escalas (microplaca e balão volumétrico), usando dois tipos de extratos brutos (*Penicillium sp.* e *Trichoderma sp.*) e em ambas estratégias demonstraram resultados semelhantes. Os autores ressaltam a capacidade do microensaio em distinguir entre as preparações enzimáticas (*Penicillium sp.* e *Trichoderma sp.*) que apresentam habilidades hidrolíticas diferentes.

Suwannarangsee *et al.* (2012) realizaram experimento em microescala usando a mesma proporção e as mesmas condições aplicadas neste presente trabalho (tubos de 1,5 ml, volume total de reação de 1 mL, contendo 1% (m/v) biomassa) mas neste caso o material hidrolisado foi palha de arroz.

A microescala torna-se uma estratégia interessante para minimizar custos e maximizar os resultados. Esse tipo de experimento permite supor que em uma aplicação comercial (larga escala) os resultados tendem a se reproduzir. Assim, Souza (2016) verificou o aumento do volume, comparando a hidrólise em Erlenmeyer (50 mL) e reator (3 litros) notou-se claramente que ambos os ensaios de hidrólise apresentaram perfis similares, principalmente nas primeiras 48 h e com 72 h de hidrólise a diferença de conversão foi de no máximo 5%.

Dessa forma, todas as hidrólises enzimáticas deste trabalho foram realizadas em microescala.

4.3. Suplementação do consórcio com adição de surfactante – tween 80

Surfactantes, tais como tween, tem propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas que podem diminuir a tensão superficial e ajudar a remover compostos hidrofóbicos (Cao e Aita, 2013). Dessa forma, a conversão da biomassa na presença do surfactante pode ser explicada pela redução da adsorção não produtiva da enzima na lignina (Eriksson, Börjesson e Tjerneld 2002).

Os resultados da suplementação com tween do consórcio 4 na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar são apresentados na Figura 3.4.

Independente da concentração do tween 80 adicionada, foi possível elevar a liberação de açúcares redutores totais e glicose na faixa de 20 a 25% na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.

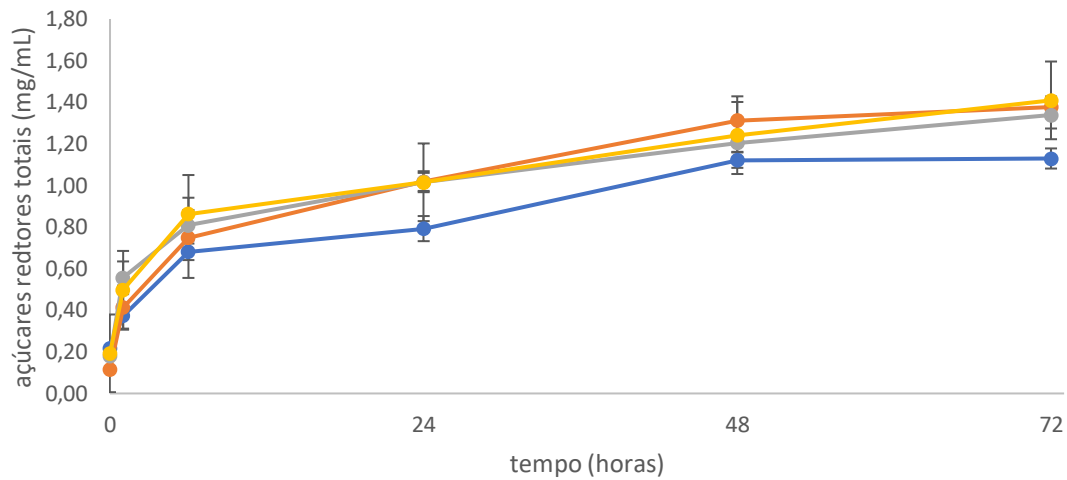
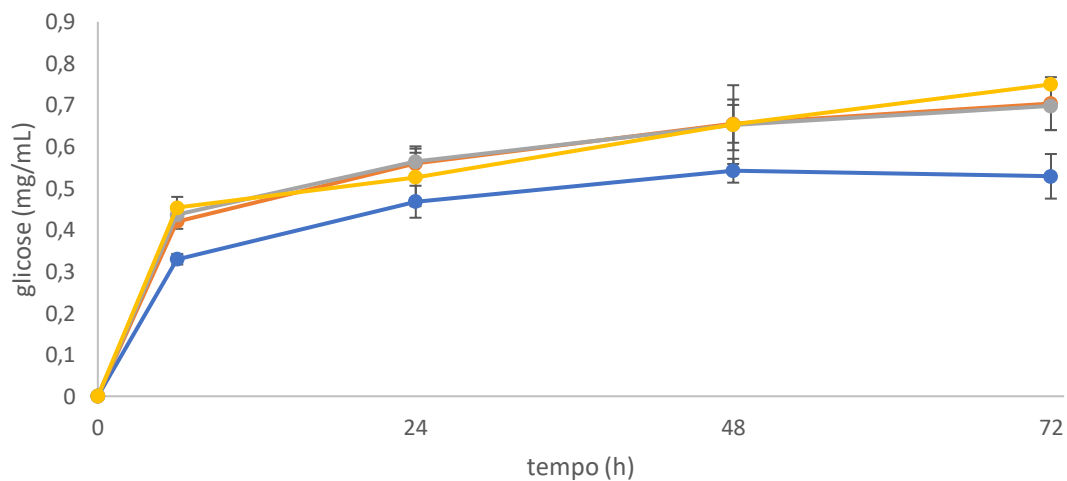
A**B**

Figura 3.4. Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar com o consórcio 4 (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT) suplementando com tween 80. ● consórcio 4, ● consórcio 4 + 0,5% de tween 80, ● consórcio 4 + 1% de tween 80 ● consórcio 4 + 2% de tween 80. A – açúcares redutores totais, B- glicose.

Com 72 horas o consórcio 4 difere do consórcio 4 suplementado com tween em todas as concentrações. Entretanto não há diferença estatística entre as dosagens utilizadas (0,5, 1 e 2%) tanto na liberação de açúcares redutores totais como de glicose. Desta forma, a adição de 0,5% de tween 80 na hidrólise se torna promissora, pois foi capaz de elevar a liberação de ART ($\pm 22\%$) e glicose ($\pm 34\%$) na hidrólise mesmo com uma baixa dosagem de tween. Os surfactantes podem auxiliar na redução da recalcitrância

da biomassa, pois são capazes de reduzir o teor de lignina, o que conseqüentemente leva a uma redução da carga de enzima e melhora a liberação de açúcares durante a etapa de hidrólise. Além de ser um composto não tóxico e de baixo custo (Li e Zheng, 2017).

Dentre os principais surfactantes empregados na literatura, estão o tween 80, tween 20, PEG 600 e Triton X (Yu *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2018, Chen *et al.*, 2018). Agrawal *et al.* (2016) listaram e testaram 21 tipos distintos de surfactantes, que incluíram tween, PEG, DEC, TEG, polialquilenol glicol, entre outros. Quase todos os surfactantes utilizados melhoraram a sacarificação de palha de trigo, embora com níveis diferentes. O melhor resultado para os autores foi quando utilizado o UCON 50 HB 660 (éter butílico de polialquilenol glicol). A conclusão obtida Agrawal *et al.* (2016) foi que a suplementação com surfactante é uma estratégia eficaz para alcançar maior rendimento de sacarificação, o que corrobora com os resultados obtidos nesta tese.

Para López *et al.* (2013), a adição de tween 80 a 1% ativou em até 50% as atividades de exoamilase e endoamilase. Zhang *et al.* (2018) mostraram que com a adição de tween 80 foi possível melhorar a hidrólise enzimática, reduzir o tempo e a dosagem de celulases na hidrólise. Segundo os autores, com a adição de tween 80 foi possível obter a mesma liberação de glicose, porém com redução de 50% da dosagem enzimática após 24h de hidrólise. Assim como no trabalho citado, é possível reduzir a carga do consórcio 4 ao adicionar o tween 80 na hidrólise enzimática e obter a mesma liberação de açúcares.

É interessante avaliar a adição de tween para cada biomassa, uma vez que há relatos na literatura que, dependendo do tipo da biomassa, o aumento nos rendimentos de hidrólise não foram observados. Para Yu *et al.* (2013), o tween 80 foi adicionado à hidrólise enzimática de avicel e polpas lignocelulósicas (Polpa de *hardwood* branqueada e liquor verde de *hardwood* pré-tratada). Na hidrólise de avicel houve um aumento da degradação com a adição de tween 80, o que não foi alcançado na hidrólise das polpas lignocelulósicas.

Li *et al.* (2015) investigaram a influência de aditivos, como BSA, PEG 6000 e Tween 80 na hidrólise enzimática de brotos de bambu e bambu maduros, indicando que os aditivos apresentaram capacidade em reduzir a dosagem de celulase. Mas ressaltam que a suplementação de xilanase (1 mg/g MS) na hidrólise de bambu foi mais eficiente que a adição dos referidos aditivos na produção de glicose e xilose.

A hidrólise enzimática de celulose do tipo *solka floc* não tratada foi potencializada na presença de tween (20 ou 80) nas primeiras 24 h de hidrólise. Entretanto, após 48 h o rendimento de glicose foi similar ao controle (sem adição de tween 20 e 80). Neste mesmo

trabalho, houve um pequeno aumento no rendimento de glicose (5-10%) na hidrólise da palha de milho pré-tratada LHW (*liquid hot water*) e em *switchgrass* na presença de qualquer um desses surfactantes (Siqueira, 2010).

Os surfactantes também podem ser utilizados no pré-tratamento da biomassa. O uso de tween-80, ácido dodecilbenzeno sulfônico e polietilenoglicol 4000 foi utilizado no pré-tratamento de milho. Dentre os surfactantes analisados, o tween 80 foi o mais promissor, conseguindo aumentar a remoção da lignina e reduzir as ligações não produtivas das enzimas na superfície da biomassa.

4.4. Suplementação do consórcio com expansina

A expansina atua de maneira não-hidrolítica na quebra da biomassa, podendo cooperar sinergicamente com as celulasas e assim melhorar a eficiência da hidrólise (Liu, Ma e Zhang, 2015). A expansina foi originalmente isolada de plantas, sendo responsável pelo afrouxamento e expansão da parede celular durante o crescimento da planta (Jin *et al.*, 2013).

Inicialmente, foi realizado um *screening* com o extrato da expansina, e nenhuma atividade de CMCase, xilanase, pectinase e mananase foi detectada. O efeito das diferentes cargas de expansina sobre papel de filtro apresenta-se na Figura 3.5. A partir de 24h de incubação foi possível observar a degradação do substrato (tempos adicionais não mostrados). Pode-se observar também que o efeito da degradação da fibra de papel foi proporcional à carga de expansina usada. A expansina pode romper a estrutura do papel de filtro e diminuir a cristalinidade da celulose (Kubicek e Kubicek, 2016). Entretanto, ao realizar ensaio similar com a incubação da expansina em papel de filtro, para detectar a atividade funcional da expansina, Costa (2016) em seu trabalho afirma que não foi possível observar diferença visual entre os testes, resultado diferente do observado neste trabalho.

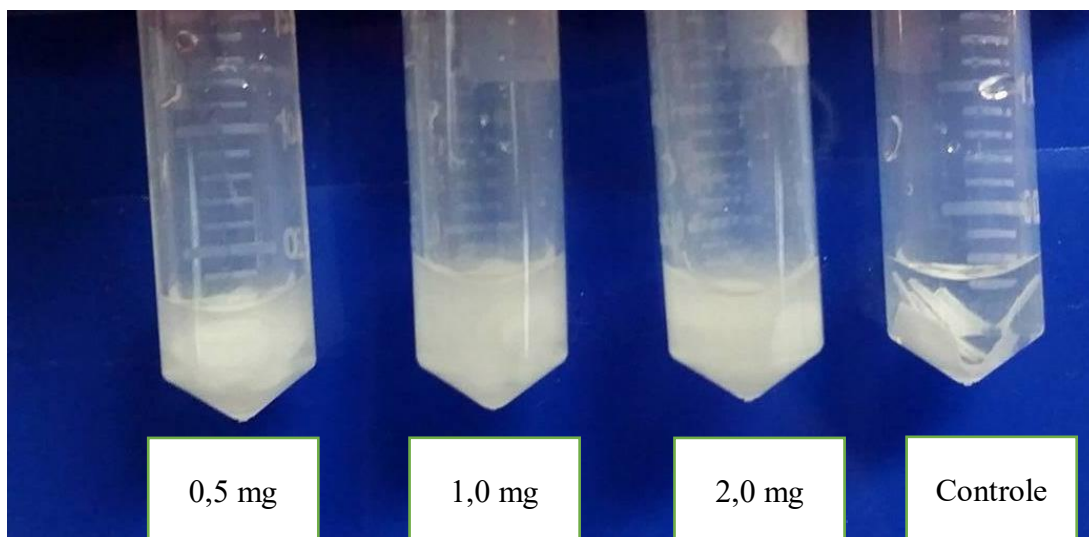


Figura 3.5. Incubação por 24 h do extrato de expansina em diferentes dosagens com papel whatman n°1.

Após a incubação da expansina com papel de filtro por 6, 24, 48 e 72 h, o sobrenadante foi descartado e realizou-se o protocolo para a determinação de atividade de FPase. Conforme pode ser observado na Figura 3.6, as maiores liberações de ART foram obtidas pela incubação do papel de filtro com expansina por 24 h com dosagens de 2 mg e 0,5 mg por 72 h, respectivamente. Entretanto, a deterioração do papel gerou interferentes nas leituras de absorção óptica pelo método de DNS, o que pode ter causado um falso-positivo para a liberação de açúcares redutores totais.

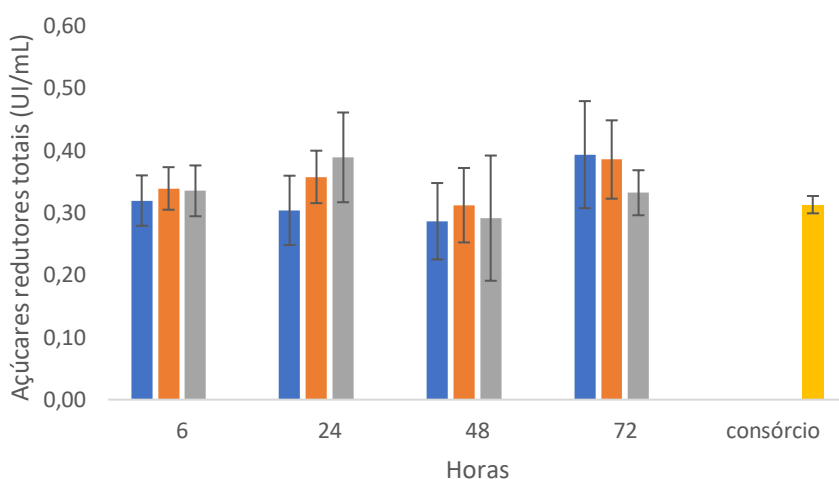


Figura 3.6. Ensaio de FPase após incubação do extrato de expansina com papel whatman n° 1. — 0,5 mg — 1 mg — 2 mg — controle.

Segundo Sun *et al.*, (2015), algumas atividades de enzimas/proteínas acessórias não podem ser medidas pelo ensaio de FPase. Essa afirmação vem de encontro com o resultado observado. Foi visualmente notado que a expansina consegue romper as fibras do papel, mas não foi observado um resultado de maior liberação de açúcares durante o ensaio de FPase.

Como os resultados da expansina em papel de filtro mostraram-se inconclusivos, um novo teste foi realizado, desta vez utilizando bagaço de cana-de-açúcar. A hidrólise foi realizada de forma simultânea. Para 24 e 48 h de hidrólise, foram usadas dosagens de 0,5, 1 e 2 mg/g. Estes resultados não foram satisfatórios, pois não foi possível verificar uma queda na liberação de ART com o aumento da dosagem, assim, realizou-se um novo teste, desta vez por 72 h com cargas de 2, 4 e 8 mg/g de expansina. A Figura 3.7 apresenta os resultados.

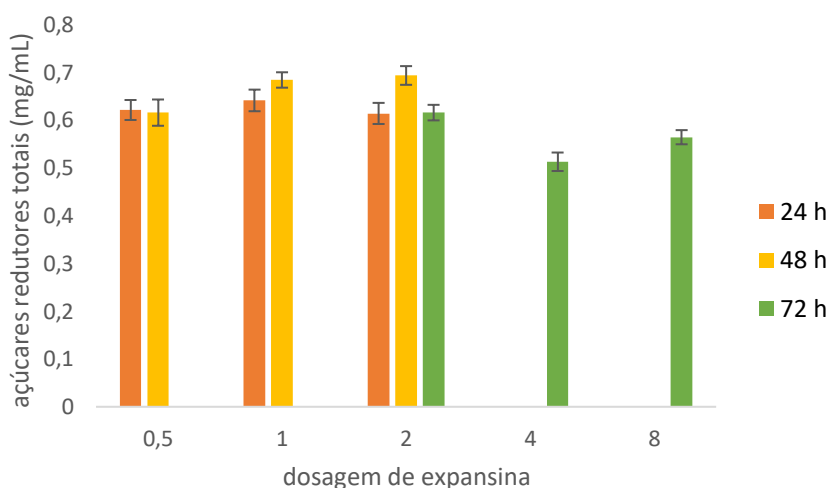


Figura 3.7. Teste de dosagens de expansina na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. ■ 24 horas, ■ 48 horas e ■ 72 horas.

Neste trabalho, cargas acima de 2 mg/g não resultaram em uma maior liberação de ART, desta forma, adotou-se como padrão 2 mg/g de expansina por 48 h. A próxima etapa consistiu em realizar uma hidrólise em bagaço de cana com suplementação do consórcio 4 com a expansina, adotando 3 estratégias (simultânea, sequencial e consecutiva), conforme apresentado na Figura 3.8.

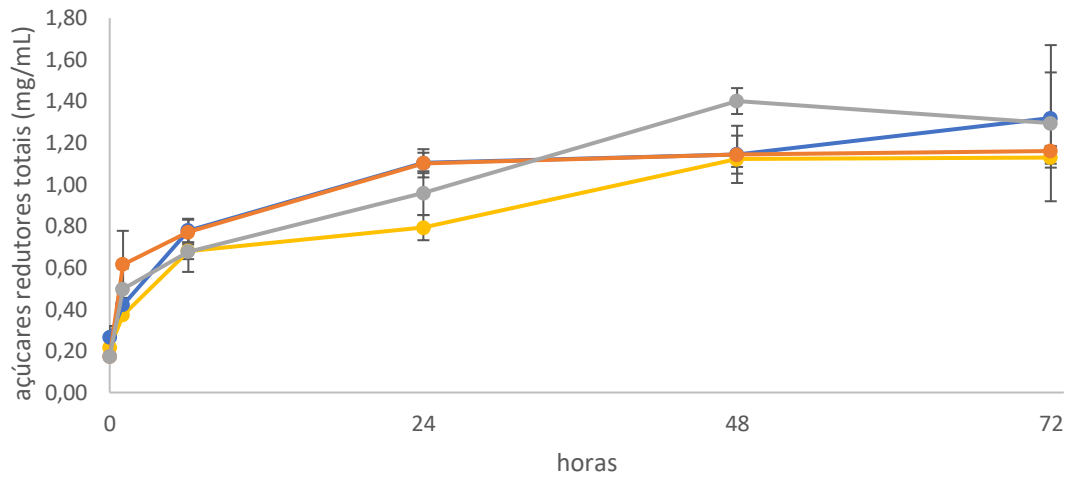
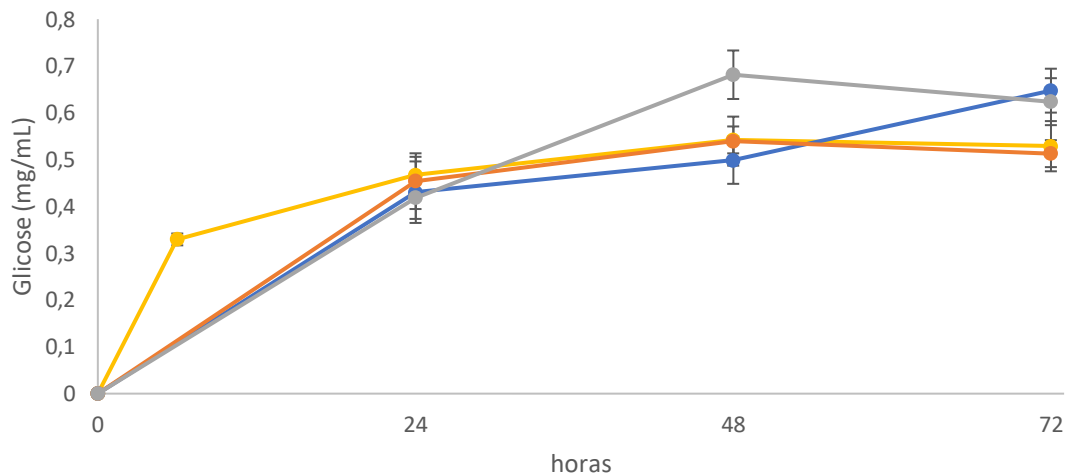
A**B**

Figura 3.8. Hidrólise em bagaço de cana de açúcar com o consórcio 4 (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT) suplementado com expansina — consórcio 4, — adição simultânea, — adição sequencial e — adição consecutiva. A: liberação de açúcares redutores, B: liberação de glicose.

Yan *et al.* (2012) adotaram uma estratégia semelhante, adicionaram a expansina BsEXLX1 em concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 μg na hidrólise de forma simultânea e sequencial com 0,1 FPU/g de celulose. A atividade sinérgica aumentou até a carga 300 μg de BsEXLX1, porém, com concentrações maiores (400 e 500 μg), a

atividade diminuiu. A hidrólise também foi mantida por 48h, mas realizada em palha de milho.

Como dito anteriormente, no modelo simultâneo, a expansina e o consórcio 4 foram adicionados juntos, ou seja, no tempo de 0 h de hidrólise. Nas adições sequencial e consecutiva, a expansina ficou por 48 h nas condições da hidrólise apenas na presença do bagaço de cana-de-açúcar, atuando como um pré-tratamento, para posterior adição do consórcio 4, que atuou por 72 h. A diferença foi que no consecutivo após o tempo de 48h, a expansina foi desnaturada.

Com 48 h de hidrólise, a adição consecutiva se diferencia das demais tanto em liberação de ART como de glicose. Vale ressaltar que com 48 h a adição consecutiva apresenta uma vantagem de 25% com relação ao consórcio 4 para a liberação de ART e glicose.

Com 72 h de hidrólise não há diferença na liberação de açúcares redutores totais ($p > 0,05$) entre o consórcio 4 e os modelos adotados de suplementação com expansina. Na liberação de glicose há diferença estatística, entretanto não há diferença entre as adições consecutiva (0,62 mg/mL) e simultânea (0,61 mg/mL).

Yan *et al.* (2012) relataram um aumento na liberação de glicose quando a celulose foi pré-tratada com uma expansina, BsXLX1, seguida de hidrólise com celulasas, em comparação à quando as duas enzimas foram adicionadas simultaneamente. A adição inicial da expansina BsXLX1 foi capaz de romper a estrutura cristalina da celulose, aumentando assim a acessibilidade das celulasas ao seu substrato, conduzindo a uma hidrólise mais eficiente. Segundo os autores, a adição simultânea de ambas as enzimas sugere uma competição por sítios de ligação. Algo similar pode ter acontecido neste trabalho, assim a adição consecutiva, onde a expansina foi desnaturada para a adição do consórcio 4, favoreceu a liberação de ART conseguindo se destacar entre os demais com 48 h de hidrólise. Vale lembrar que na hidrólise em papel *whatman* foi nítida a capacidade da expansina em romper as fibras do papel, algo similar pode ter acontecido no bagaço de cana.

Porém, neste experimento cabe avaliar a liberação de ART por hora de hidrólise, uma vez que nas adições consecutiva e sequencial houve uma pré-incubação da expansina por 48 h. A adição consecutiva apesar de ter liberado maior quantidade de ART em 48 h (1,40 mg/mL), o tempo total de toda a hidrólise foi de 96 h devido à pré-incubação com a expansina (48 h). Se calcularmos a liberação de açúcares redutores totais considerando o tempo de 96 h, a quantidade de ART liberada por hora foi de 0,014 mg/mL. Ao passo

que o consórcio 4 e adição simultânea liberam 1,12 e 1,14 mg/mL em 48 h, o que representa aproximadamente 0,023 mg/mL/h. Assim, levando em consideração o tempo de pré-incubação, não há vantagens da adição de expansina frente ao consórcio 4, nos moldes avaliados neste trabalho.

Santos *et al.* (2017) em seu trabalho relatam que a combinação de enzimas com a expansina pode melhorar a degradação enzimática de substratos complexos. A combinação de 41,4% de Celluclast, 37% BCC 199 e 21,6% de expansina produziu 769 mg de açúcar por grama de biomassa usando 2,82 FPU/g de enzimas

4.5. Suplementação do consórcio com lacase

Lacases são enzimas ligninolíticas que desempenham um papel importante nos processos de degradação e modificação da lignina, oferecendo a possibilidade de aumentar o rendimento da hidrólise e fermentação devido à alteração da hidrofobicidade e porosidade da lignina (Giacobbe *et al.*, 2018). Várias lacases fúngicas e bacterianas tem sido usadas na desintoxicação e/ou deslignificação de inúmeras biomassas lignocelulósicas, pré-tratadas ou não pré-tratadas, sozinhas ou na presença de um mediador (Fillat *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, a aplicação de lacase na indústria ganhou considerável atenção. A lacase mostrou-se eficaz na degradação da lignina de fibras da indústria de papel e celulose, bem como em estudos laboratoriais de degradação de lignina sintetizada (Chen *et al.*, 2012).

O extrato bruto da lacase utilizada neste estudo apresentou atividades de 0,089, 0,076 e 0,154 UI/mL para CMCase, xilanase e pectinase, respectivamente. Não foi detectada atividade de mananase. Inicialmente foi feito um teste para determinar a dosagem ótima de lacase a ser adicionada no consórcio 4 por um período de 24 h com dosagens de 2, 4 e 8 mg/g na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. A adição da lacase ao consórcio 4 foi de forma simultânea (sim), conforme resultado apresentado na figura 3.9.

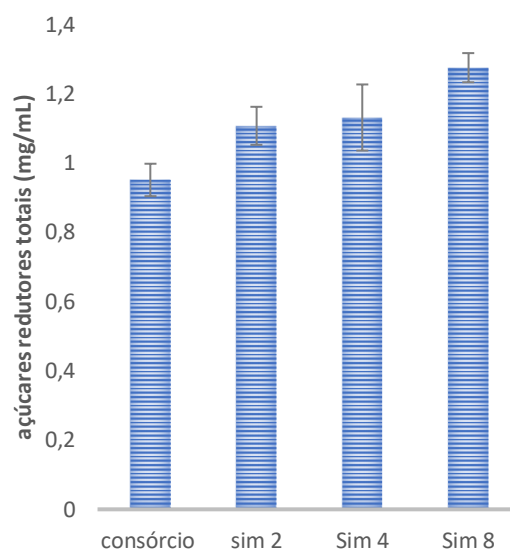


Figura 3.9. Efeito da adição de lacase no consórcio 4 (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT) na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar com dosagens de 2, 4 e 8 mg/g de biomassa. Sim: forma de adição simultânea.

O consórcio sem adição de lacase liberou 0,95 mg/mL de ART, enquanto que quando consórcio 4 foi suplementado com 8 mg/g de lacase (sim 8) liberou 1,27 mg/mL, com um aumento de 33% na liberação de ART. Foi realizada uma ANOVA que demonstrou que não há diferença estatística na adição de lacase ao consórcio quando adicionada uma carga de 2 e 4 mg (sim 2 e sim 4). O consórcio 4 com adição de 8 mg de lacase por grama de biomassa se difere do controle e dos demais tratamentos ($p < 0,05$ por teste pareado de Fisher). Por isso optou-se em adicionar 8 mg/g de lacase ao consórcio 4.

É importante avaliar a carga de lacase a ser adicionada na hidrólise enzimática, uma vez que o excesso pode levar a um efeito de inibição. Assim como foi relatado no trabalho de Raj e Krishnan (2018), a adição de lacase a 50 U/g e 400 U/g não diferiu do controle (celulase sem adição de lacase), mas, quando usada a carga de 200 U/g simultaneamente com celulases, esta combinação apresentou diferença entre os demais, sendo considerada a carga ótima.

Todavia, no trabalho de Galbe e Zacchi (2002), a lacase foi usada para tratar o pré-hidrolisado após o pré-tratamento antes da hidrólise enzimática de *spruce*. Verificou-se que esta forma de tratamento era um método muito específico de desintoxicação, uma vez que diminuía a quantidade de compostos polifenólicos em mais de 90%. Entretanto para Rocha-martín *et al.* (2018), o pré-tratamento com lacase na hidrólise da palha de

cana e palha de milho levou a uma redução da conversão da biomassa em glicose. Nesse caso, a glicose liberada foi de 67,7 para 39,2 g/Kg para palha de cana e de 69 para 53,5 g/Kg para palha de milho. Mediante estes resultados os autores afirmam que uso de lacase na desintoxicação de materiais lignocelulósicos pré-tratados não foi viável, pois a aplicação de lacase antes e durante a hidrólise enzimática levou a uma menor conversão de glicose. Os autores visualizaram um efeito negativo tanto quando a lacase foi adicionada simultaneamente ao coquetel, como quando a lacase foi inativada para posterior adição do coquetel.

Para testar o uso da lacase como pré-tratamento adotamos a estratégia de adicionar a lacase primeiro por 24 h a 50 °C como forma de pré-tratamento antes da adição do consórcio 4. Desta forma, uma hidrólise foi realizada com adição de lacase por métodos simultâneo, sequencial e consecutivo na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar (Figura 3.10).

Percebe-se que a adição da lacase melhorou a liberação de açúcares redutores totais. A liberação de ART da adição consecutiva com 72h foi de 1,40 mg/mL, considerando as primeiras 24 h somente com lacase, seguido de desnaturação e adição do consórcio 4 mais 48h, o que representou um aumento de 53% na liberação de ART comparado com consórcio 4 com 72 h hidrólise (0,91 mg/mL).

A lacase não foi capaz de liberar açúcares redutores, pois, ao longo das 96 h de hidrólise, o branco (bagaço + lacase) manteve-se constante (0,41 mg/mL). Verificou-se um efeito sinérgico ao adicionar a lacase ao consórcio enzimático, pois a soma da liberação de ART do consórcio 4 somado à liberação de ART do branco com 72h de hidrólise ($0,91 + 0,41 = 1,32$ mg/mL) é inferior ao encontrado na adição simultâneo (1,48 mg/mL). Isso representa um aumento de 12 % na liberação de açúcares redutores totais.

As análises estatísticas (ANOVA e *post-hoc* teste de Fisher) mostraram que após 72h de hidrólise, os tratamentos com lacase, nas três modalidades de adição (simultâneo, sequencial e consecutivo) diferem do controle com relação à liberação de açúcares redutores totais ($p < 0,05$).

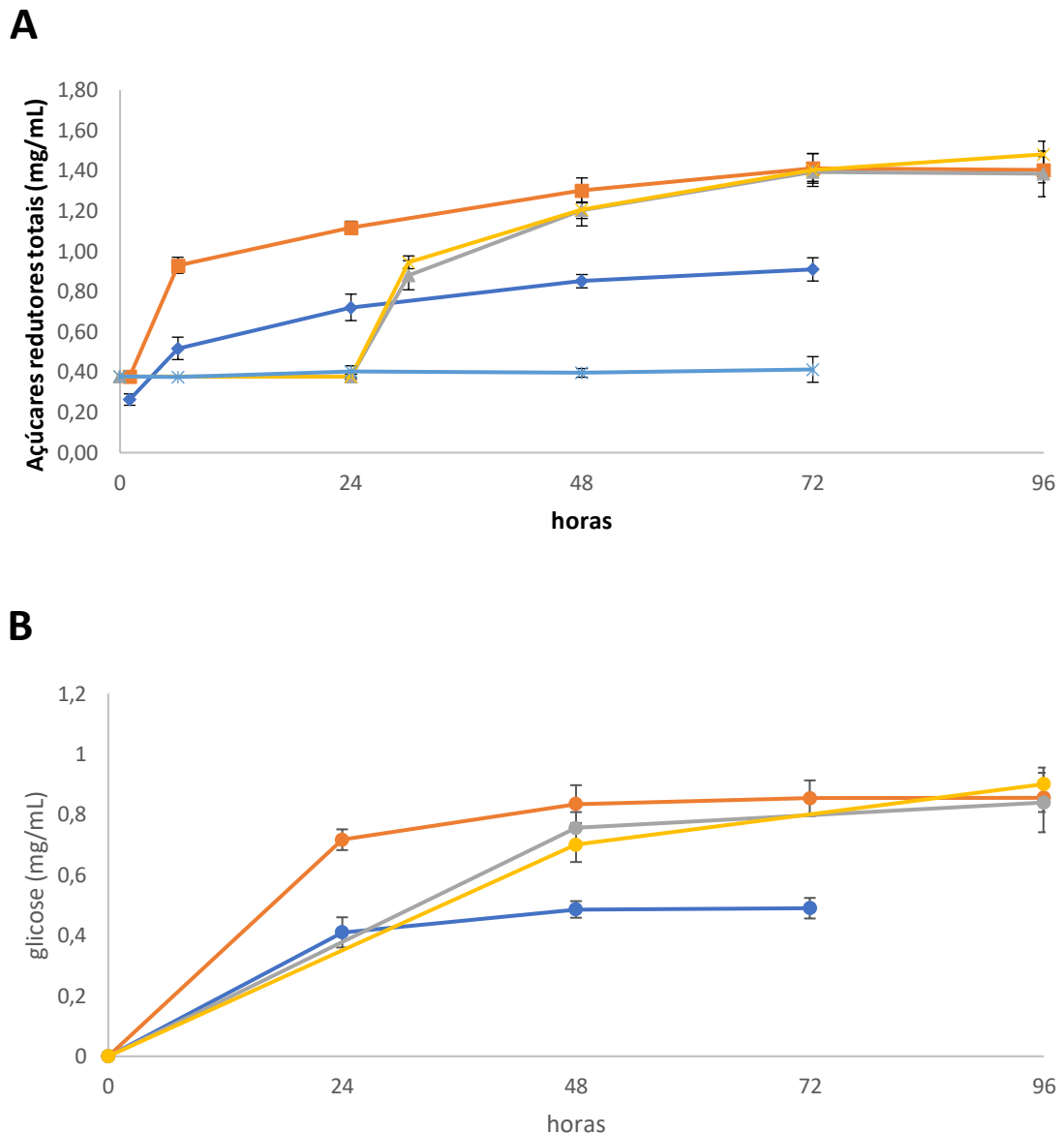


Figura 3.10. Hidrólise em bagaço de cana de açúcar com o consórcio 4 (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT) com a adição de lacase. A – açúcares redutores totais e B – glicose. —●— consórcio 4, —●— adição simultâneo, —●— adição sequencial, —●— adição consecutivo e —*— lacase.

No trabalho de Siqueira (2010), a suplementação com lacase (40 UI/g) em coquetéis comerciais (Spezyme CP – 15 FPU/g e Novozymes 188 40 CBU/g) beneficiou a hidrólise de palha de milho na liberação de glicose em 20% com 48 h, porém não apresentou vantagem na liberação de glicose de *solka flocc* e *switsgrass*.

Foi avaliado o efeito da modificação da lignina pela lacase na hidrólise de *spruce* e cana do reino (Moilanen *et al.*, 2011). As biomassas foram pré-tratadas com lacase e

depois hidrolisadas com celulasas comerciais. A modificação causada pela lacase na lignina melhorou o rendimento da hidrólise de *spruce* em 12%. Mas surpreendentemente teve um efeito adverso sobre a cana do reino, reduzindo o rendimento da hidrólise em 17%. Os autores estudaram as propriedades de ligação das celulasas na lignina usando lignina isolada. O tratamento com lacase reduziu a ligação das enzimas na lignina de *spruce*, enquanto que com cana do reino, a quantidade de enzimas ligadas à lignina aumentou após o tratamento com lacase. Os autores concluíram que a compreensão das reações da lacase sobre a lignina ajudará a controlar a ligação inespecífica das celulasas em substratos lignocelulósicos (Moilanen *et al.*, 2011).

Assim como na hidrólise de *spruce*, no trabalho de Moilanen *et al.* (2011), a presença da lacase proporcionou um aumento na liberação de ART e glicose na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. Cabe ressaltar que foi independente da forma adicionada da lacase, o que torna o modelo simultâneo (consórcio mais lacase) interessante, pois é menos trabalhoso e conseqüentemente apresenta menor risco de contaminação.

4.6. Suplementação do consórcio com lacase e tween

Após os experimentos individuais de suplementação com lacase e tween, estes foram adicionados em conjunto ao consórcio. Foi comparada a performance do consórcio 4, o consórcio 4 com lacase, o consórcio 4 com tween 80 e a combinação do consórcio 4 com tween e lacase, este último denominado consórcio 4 LT, conforme Figura 3.11. Nota-se que a combinação consórcio com lacase (consórcio + lacase) e consórcio com lacase e tween (consórcio 4LT) apresentaram os melhores desempenhos na liberação de glicose e ART na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.

Na liberação de ART com 72 h, todos os experimentos apresentaram diferenças entre si ($p < 0,05$). O consórcio 4 LT elevou a liberação de açúcares redutores totais em 46% com 72h e 56% com 96 h quando comparado com o consórcio 4.

Em termos de liberação de glicose com 72 h, não houve diferença estatística entre o consórcio com lacase e o consórcio 4 LT. A liberação de glicose do consórcio 4 LT foi 58% superior à liberação de glicose obtida pelo consórcio 4.

No trabalho de Siqueira (2010), o uso de lacase e polietilenoglicol 4000 (surfactante) juntamente com enzimas comerciais na hidrólise enzimática da palha de milho após o pré-tratamento (*Liquid hot water - LHW*) apresentou um aumento de 20% quando comparado com a mesma condição sem a presença destes aditivos.

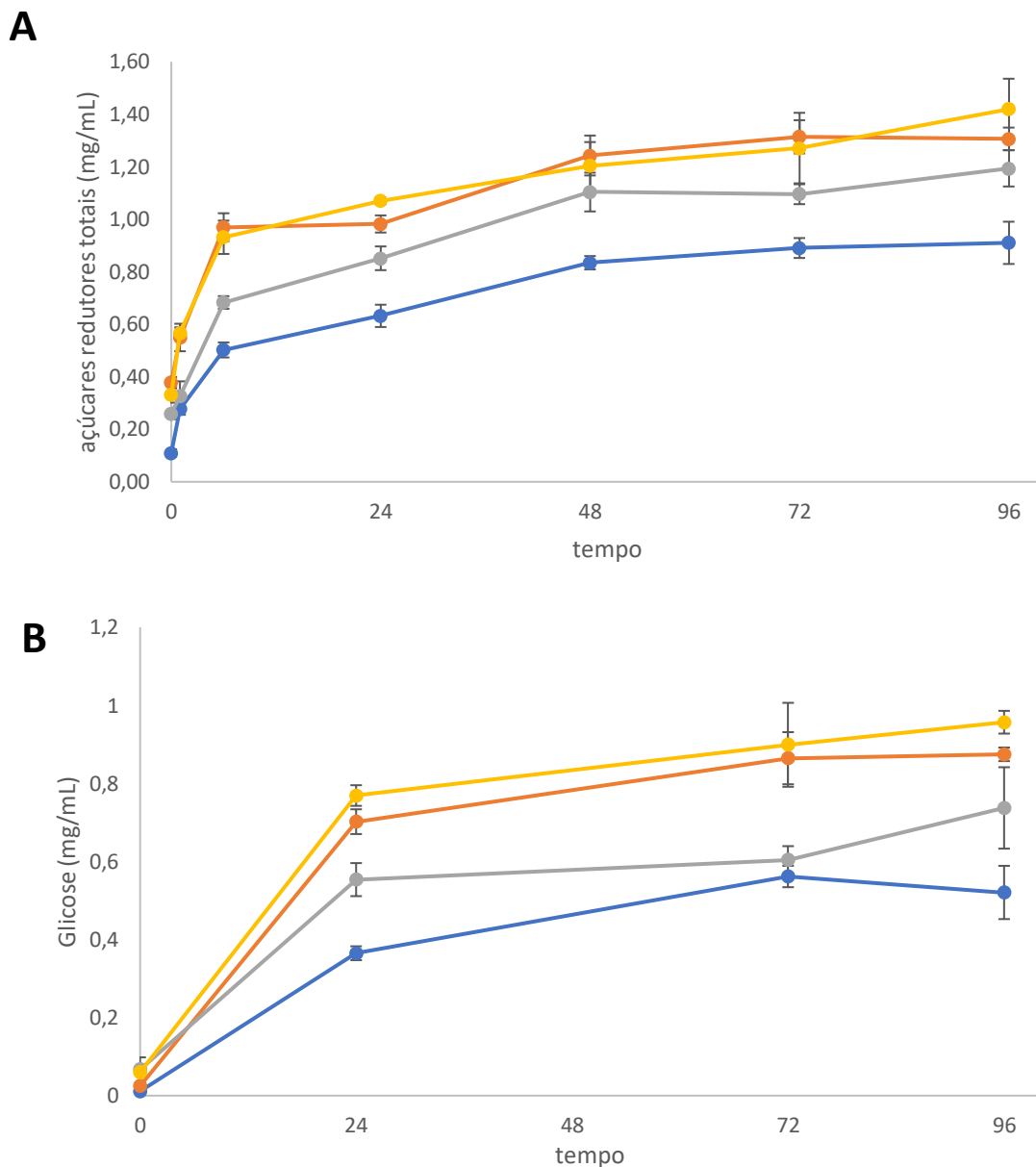


Figura 3.11. Hidrólise em bagaço de cana-de-açúcar com a adição de lacase e tween ao consórcio 4 (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT). A – açúcares redutores totais e B – glicose. —●— consórcio 4, —●— consórcio 4 + lacase, —●— consórcio 4 + tween, —●— consórcio 4 LT.

4.7. Suplementação do consórcio 4 LT com triptofano

O triptofano é um aminoácido específico presente em domínios de CBMs, assim como a tirosina. São capazes de promover a adsorção de celulasas na celulose, bem como na lignina. O aminoácido presente em um domínio é responsável pelo grau de

hidrofobicidade. O triptofano com seu anel indol é capaz de aumentar ainda mais a hidrofobicidade do domínio (Johan, Engqvist e Tjerneld, 2007).

O consórcio 4 LT (consórcio 4 com lacase e tween) foi suplementado simultaneamente com triptofano a 10 e 20 mM, conforme apresentado na Figura 3.12.

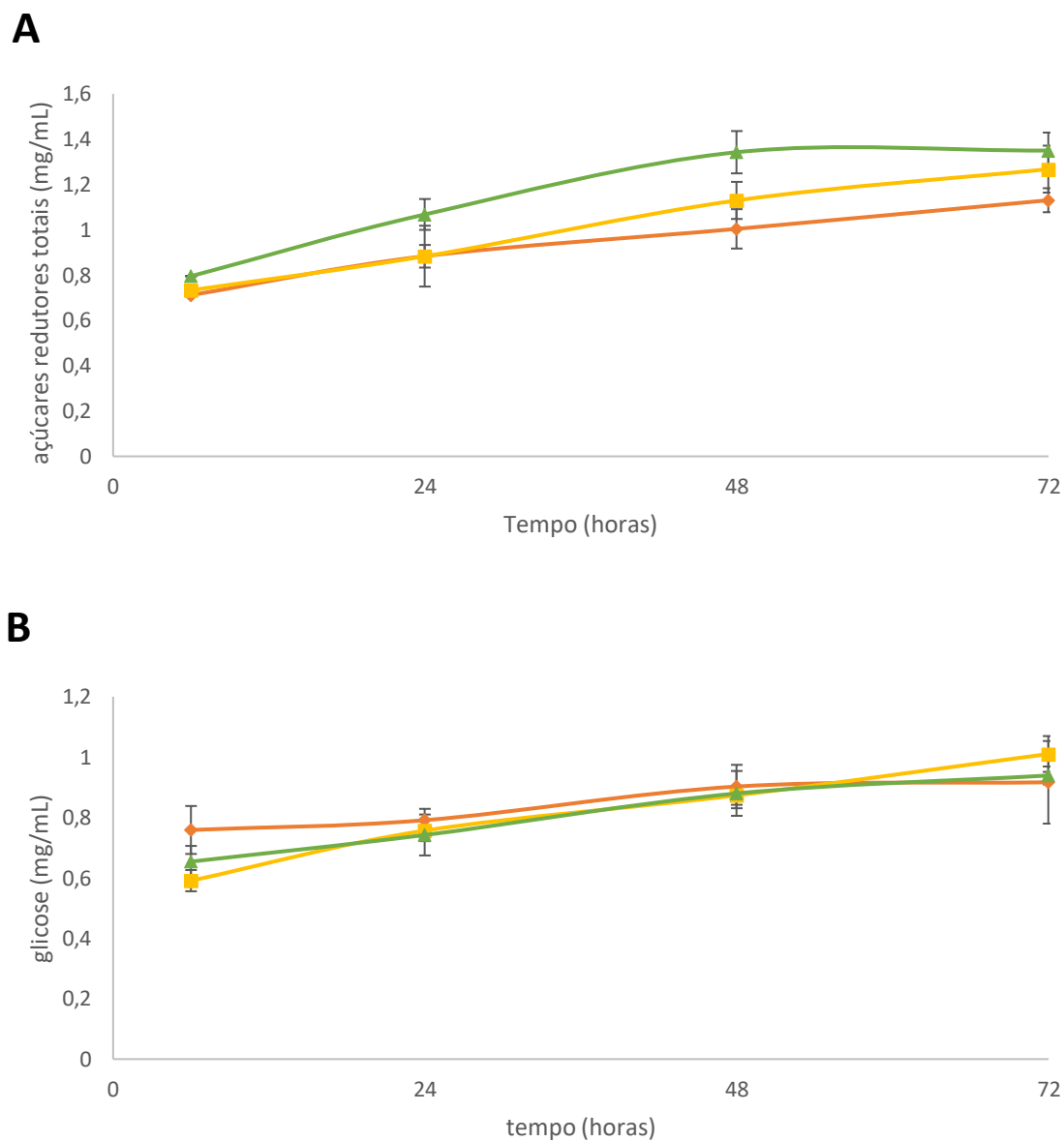


Figura 3.12. Hidrólise em bagaço de cana-de-açúcar com a adição de triptofano ao consórcio 4 LT (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT com tween 80 e lacase). A – açúcares redutores totais e B – glicose. —◆— consórcio 4 LT —■— Consórcio 4 LT + 10 mM de triptofano —▲— Consórcio 4 LT + 20 mM de triptofano.

Podemos observar que, a combinação do triptofano ao consórcio 4 não apresentou vantagem na liberação de glicose, pois não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$) com 24, 48 e 72h de hidrólise para a liberação de glicose. Entretanto, com 48 e 72 h para liberação de ART houve diferença estatística entre o consórcio 4 LT e o consórcio 4 LT suplementado com triptofano a 20 mM. A presença do triptofano a 20 mM elevou a liberação de ART em 34 e 20% com relação ao consórcio 4 LT (sem adição de triptofano – controle) no tempo de 48 e 72 horas, respectivamente. Nestes tempos de 48 e 72 h o consórcio 4 LT 10 mM não apresentou diferença estatística entre os demais (consórcios 4 LT e 4 LT a 20 mM). Cabe ressaltar que o triptofano é hidrofóbico (Pereira *et al.*, 2012, Najmudin *et al.*, 2006), o que faz acreditar que possa ter interferido nas leituras de absorbância dos ensaios de liberação de açúcares redutores, ocasionando um resultado falso-positivo. No trabalho de Teixeira *et al.* (2012) foi descrito que misturas contendo 20 mM de triptofano superestimou em 76% os resultados pelo ensaio de DNS. Portanto, não podemos afirmar se houve de fato um aumento da liberação de açúcares por causa do triptofano ou se os resultados foram fruto de uma interferência.

4.8. Suplementação do consórcio 4 LT com expansina

Nesta etapa, foi realizada uma combinação entre o consórcio 4 LT (consórcio 4 com lacase e tween) e expansina na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. Para isso três estratégias foram utilizadas. Na estratégia simultânea, a expansina foi adicionada com o consórcio 4 LT. Nas estratégias sequencial e consecutiva, a expansina foi adicionada primeiro, com a intenção de atuar como um pré-tratamento biológico por 48 h e após esse tempo, o consórcio 4 LT foi adicionado. Na estratégia consecutiva a expansina foi desnaturada para posterior adição do consórcio 4 LT. Os resultados estão na Figura 3.13.

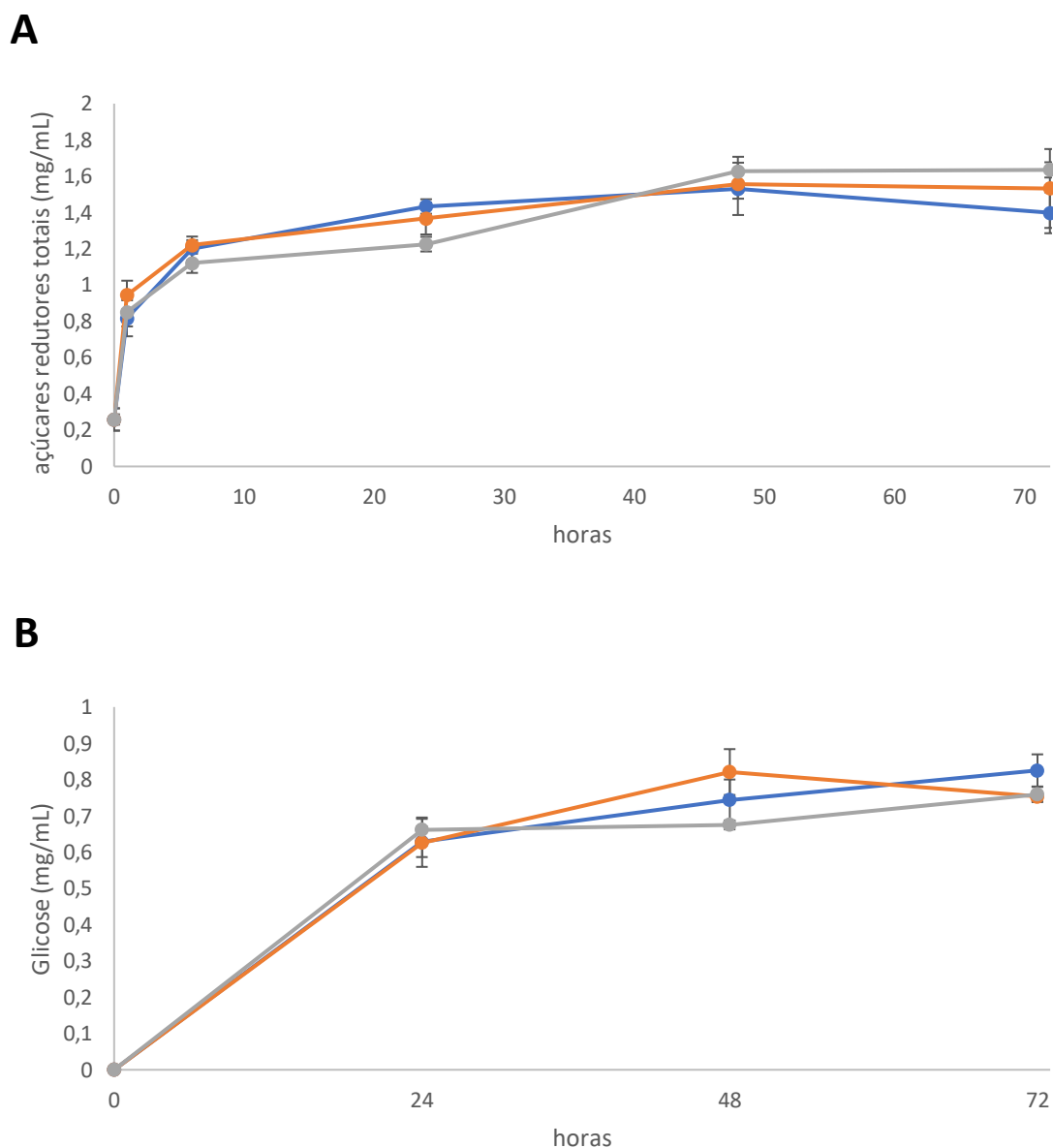


Figura 3.13. Hidrólise enzimática em bagaço de cana-de-açúcar com o consórcio 4 LT 4 LT (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT com tween 80 e lacase) com suplementação de expansina. A – açúcares redutores totais e B – glicose. —●— adição simultâneo, —■— adição sequencial, —▲— adição consecutivo.

O objetivo da adição da expansina era afrouxar as fibras da celulose e facilitar o acesso do consórcio 4 LT, por sua vez, a lacase atuaria sobre a lignina da biomassa e/ou na oxidação de compostos fenólicos (Galbe e Zacchi, 2002).

O valor de p ($>0,05$) não foi significativo para liberação de açúcares redutores totais com 72 h de hidrólise entre as combinações, mas o valor de p ($<0,05$) foi

significativo para a liberação de glicose com 72h entre os tratamentos. Neste tempo a maior liberação de glicose ocorreu na adição simultânea (0,82 mg/mL). Cabe ressaltar que as adições consecutiva e sequencial não diferiram entre si.

A suplementação de um coquetel enzimático com enzimas acessórias pode contribuir significativamente para sua eficácia e melhorar a liberação de açúcares (Sun *et al.*, 2015). Entretanto, a presença da expansina não foi capaz de elevar a liberação de açúcares da hidrólise.

4.9. Combinação do consórcio 4 LT com coquetéis comerciais

O consórcio 4 LT foi combinado com os coquetéis comerciais da Novozyme (celluclast e cellic ctec2), e também foi realizada uma combinação entre os coquetéis comerciais na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar (Fig. 3.14).

Neste experimento o que mais chama a atenção é a menor liberação de glicose e ART observada a partir da combinação dos coquetéis comerciais cellic ctec2 com celluclast, principalmente se comparado à liberação de glicose e ART obtida pela suplementação do consórcio 4 LT com os coquetéis comerciais (cellic ctec2 e celluclast).

A combinação do consórcio 4 LT com o cellic ctec 2 liberou aproximadamente 79 e 70% mais ART e glicose do que a combinação cellic ctec2 com celluclast com 72h de hidrólise. E quando o consórcio 4 LT foi combinado com o celluclast, este liberou 35 e 20% mais ART e glicose do que a combinação cellic ctec2 com celluclast com 72h.

Houve um efeito aditivo na liberação de açúcares redutores totais na combinação do consórcio 4 LT com o celluclast com 72 h de hidrólise. Todas as combinações com 72 h se diferem entre si em termos de liberação de açúcares redutores e glicose ($p < 0,05$).

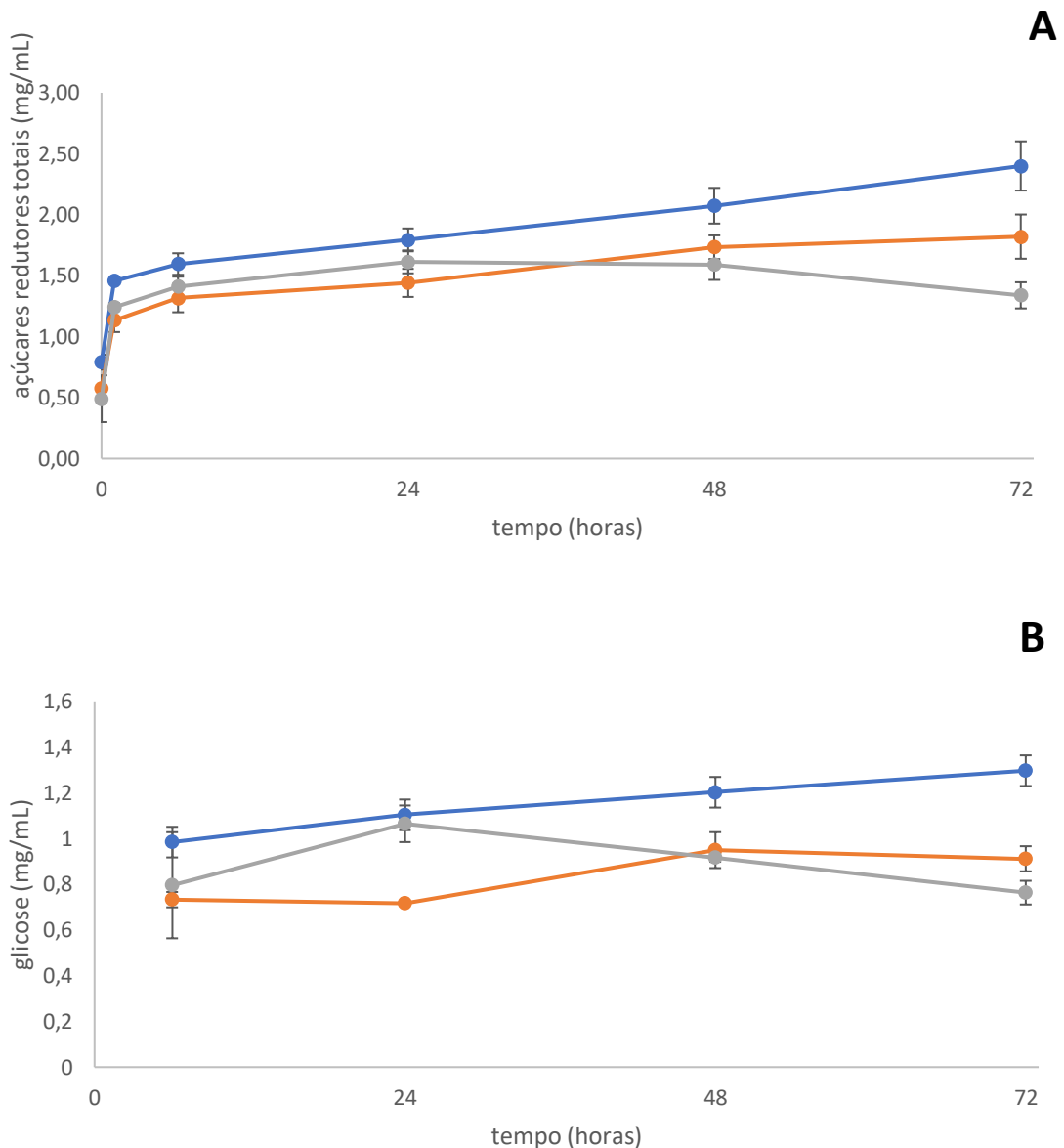


Figura 3.14. Hidrólise enzimática em bagaço de cana com suplementação de coquetéis comerciais. A – açúcares redutores totais e B – glicose. —●— consórcio 4 LT (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT com tween 80 e lacase) + celluclast, —●— consórcio 4 LT (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT com tween 80 e lacase) + celluclast, —●— celluclast + celluclast.

A combinação de coquetéis comerciais já foi estudada e apresentou resultados positivos. Trabalhos anteriores mostraram a forte cooperação sinérgica entre uma mistura comercial de celulase (Novozymes Celluclast 1,5 L) e uma mistura comercial de xilanase (Genencor Multifect Xylanase) durante a hidrólise de palha de milho. Este sinergismo

resultou em uma redução de 7 vezes na carga de celulase necessária para atingir um grau semelhante de hidrólise (Hu, Arantes e Saddler, 2011). Diferente do comportamento observado neste trabalho, cabe ressaltar que o cellic ctec2 e celluclast são coquetéis celulolíticos, a combinação entre eles pode ter causado um excesso de atividade celulolítica, o que pode resultar em um *feedback* negativo. Em altas cargas enzimáticas, as enzimas podem começar a competir pelos mesmos sítios de ligação, levando a uma redução na liberação de açúcares (Van Dyk e Pletschke, 2012).

A suplementação de coquetéis comerciais com enzimas de atividades hidrolíticas podem elevar a taxa de conversão da biomassa. No trabalho de Thomas, Parameswaran e Pandey (2016), a hidrólise enzimática em palha de arroz foi realizada com um coquetel comercial de celulasas (Zytex, Índia) e β -glicosidase (previamente produzida), quando suplementado com xilanase (*Aspergillus* sp.), houve produção 574,8 mg/g de açúcares redutores totais em comparação aos 430,2 mg/g de açúcares pelo coquetel sem xilanase.

No trabalho de Wang *et al.*, (2012) a capacidade do coquetel comercial celulolítico Spezyme CP (Genencor) foi significativamente melhorada para degradar a palha de milho pré-tratada por explosão de vapor com a suplementação de 1,21 FPU/g de *A. fumigatus* (AFCel). A conversão de glicose foi aumentada em 25,6%.

No caso de Vintilã *et al.* (2009), o melhor rendimento de hidrólise de celulose (79%) foi obtido com o coquetel formado por extrato bruto de celulasas de *T. viride* CMIT3.5 combinado com Novozyme 188.

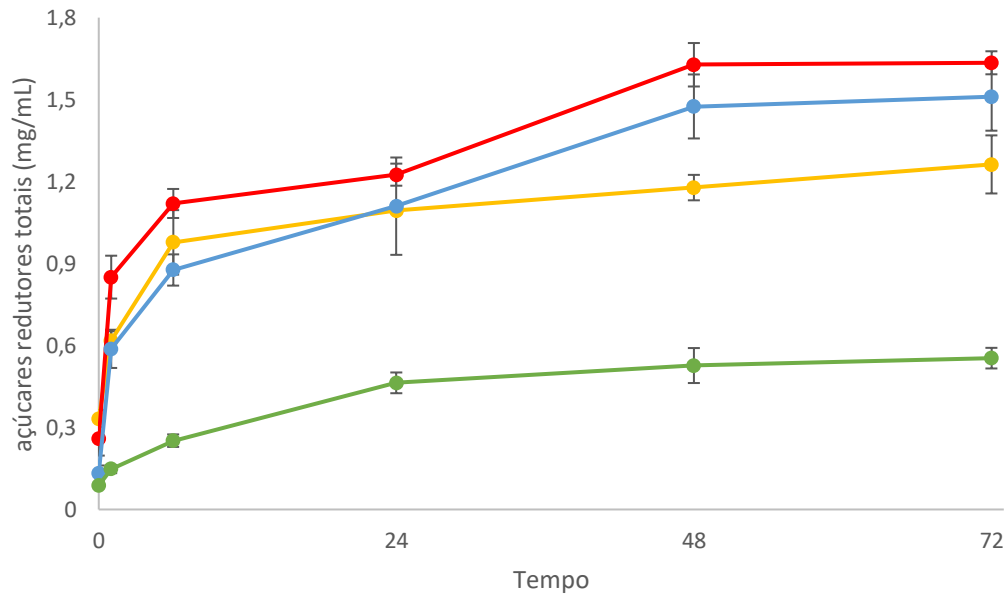
4.10. Comparação do consórcio com coquetéis comerciais

É de suma importância que o consórcio otimizado seja comparado com coquetéis comerciais. O consórcio 4 LT (consórcio 4 com lacase e tween) e o consórcio 4 ELT (consórcio, lacase, tween e expasina – modelo consecutivo) foram comparados com coquetéis comerciais (celluclast e cellic ctec2). Os resultados estão apresentados na Figura 3.15.

Os consórcios 4 LT e 4 ELT foram melhores na liberação de glicose e ART do que o coquetel comercial celluclast. Os consórcios 4 ELT e 4 LT liberaram 211% e 123% mais ART do que o celluclast com 48 h de hidrólise. Na liberação de glicose com 48 horas, os consórcios 4 ELT e 4 LT liberaram, respectivamente 76 e 136 % mais glicose do que celluclast. A maior liberação de ART e glicose pelos consórcios frente ao coquetel comercial celluclast pode ser também confirmada pelas micrografias expostas no item

4.11 onde as fibras do bagaço estão mais íntegras quando hidrolisado com o celluclast do que com os consórcios.

A



B

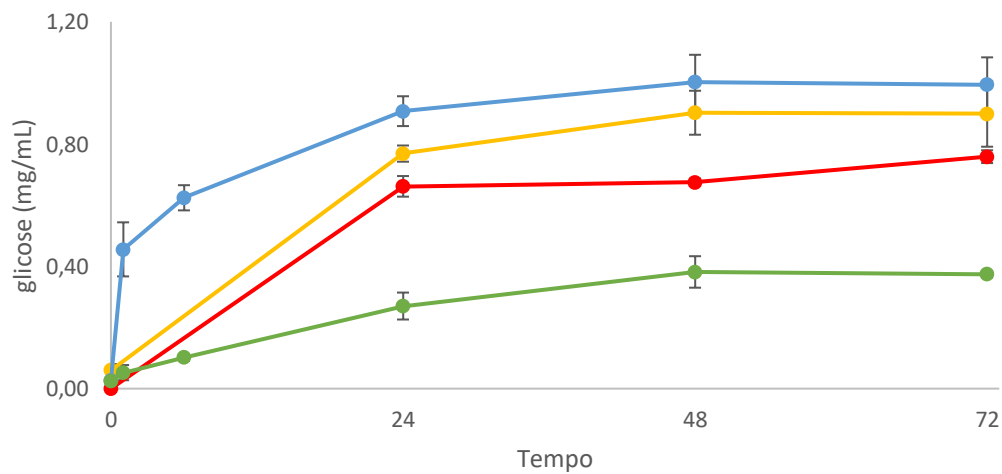


Figura 3.15. Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. A – açúcares redutores totais e B – glicose. —●— consórcio 4 LT (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT com tween 80 e lacase) —●— consórcio 4 ELT (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT com tween 80 e lacase e adição consecutiva de expansina —●— Cellic ctec2, —■— celluclast.

Apesar do consórcio 4 ELT liberar mais ART do que o coquetel comercial cellic ctec2, o mesmo apresentou uma liberação de glicose inferior ao cellic ctec2 e ao consórcio 4 LT. É possível que a combinação lacase e expansina tenha inibido a atividade da β -glicosidase. Fillat *et al.*, (2017) descrevem em seu trabalho que a atividade de β -glicosidase foi inibida pela atuação da lacase. Possivelmente a presença da lacase com a expansina pode ter inibido a atuação da β -glicosidase.

O cellic ctec2 liberou em termos de açúcares redutores totais e glicose aproximadamente 20% e 10% mais que o consórcio 4 LT, respectivamente. O que não é uma diferença tão significativa quando comparado com o desempenho dos consórcios frente ao coquetel comercial celluclast. Vale considerar que o cellic ctec2 pertence a uma geração superior ao celluclast, assim é possível perceber pelos resultados da hidrólise neste trabalho o melhoramento dos coquetéis comerciais.

Com 24h de hidrólise, não há diferença estatística ($p < 0,05$) entre o consórcio 4 ELT, consórcio 4 LT e cellic ctec2, mas, com 6, 48 e 72h todos são diferentes entre si.

O rendimento da hidrólise (%) está relacionada com a eficiência enzimática, enquanto que a concentração de açúcares liberado ao longo do tempo de hidrólise determina quão viável é o processo (Bussamra, Freitas e Costa, 2015). Nesse sentido, se avaliarmos a liberação de ART por hora tomando como base o tempo de 6 h a liberação de ART alcançada pelos coquetéis comerciais foram de 0,041 mg/mL/h para o celluclast e 0,145 mg/mL/h para o cellic ctec2, o consórcio 4 LT atingiu 0,161 mg/mL/h e o consórcio 4 ELT obteve 0,198 mg/mL/h, maior liberação entre os demais. A maior liberação de ART nas primeiras 6 h na hidrólise de bagaço de cana ocorreu na hidrólise realizada pelos consórcios 4 LT e 4 ELT. Entretanto, o consórcio 4 ELT atuou por 48 h antes da adição do consórcio 4 LT apenas na presença da expansina.

Para Rodrigues *et al.* (2015), o maior rendimento da hidrólise em palha de trigo foi encontrado quando celluclast foi suplementado β -glicosidase. Desta forma, conseguiram elevar o rendimento da hidrólise em 29% (52% sem β -glicosidase e 81% com β -glicosidase). Entretanto, apesar da suplementação, o cellic foi capaz de promover uma hidrólise mais eficiente (>98%). Assim, já era esperado que o cellic ctec2 apresentasse um resultado superior ao celluclast neste trabalho, uma vez que o cellic ctec2 é considerado um coquetel de segunda geração comparado com o cellic.

Em um trabalho realizado por Bussamra, Freitas e Costa (2015), o coquetel otimizado desenvolvido pelos pesquisadores conseguiu converter 72% da celulose presente em bagaço de cana-de-açúcar, enquanto que o celluclast converteu apenas 49%.

Para Sun *et al.* (2015) é evidente que a melhoria do Ctec (ctec1, 2 e 3) não foi alcançada apenas aumentando a expressão das proteínas, mas também pela mistura e combinação de várias enzimas, como enzimas acessórias, e, assim, foi capaz de fortalecer a cooperação sinérgica durante a hidrólise lignocelulósica. Estudos mostraram que proteínas não-hidrolíticas, tais como os como CBMs, expansinas e LPMOs aumentam significativamente a atividade de enzimas hidrolíticas (Malgas *et al.*, 2017). A baixa atuação do celluclast, como podemos observar neste trabalho, segundo Hu, Arantes e Saddler (2011) e Siqueira (2015) é devido à falta de enzimas acessórias, como hemicelulases que pode comprometer a hidrólise de substratos ricos em xilana (Hu, Arantes e Saddler, 2011; Siqueira, 2015).

O trabalho de Gomes, Gama e Domingues (2018) sugere que, quanto maior a concentração de substrato utilizado, maior o desempenho dos coquetéis comerciais como o celluclast, cellic e accelerase ao hidrolisar lodo de papel reciclado. Já é conhecido por Rodrigues *et al.* (2015) que as enzimas encontradas no Cellic e Celluclast apresentam um comportamento diferente com relação à distribuição sólido-líquido. Não foi o foco deste trabalho avaliar a concentração de substrato na hidrólise.

4.11 Avaliação das hidrólises por MEV

As biomassas após hidrólise foram avaliadas por MEV conforme as Figuras 3.16 a 3.24. Foram analisados os bagaços hidrolisados apenas com tampão, expansina, lacase e lacase com tween. Além dos bagaços hidrolisados com o consórcio 4, o consórcio 4 com expansina, o consórcio 4 LT e os coquetéis comerciais cellic ctec2 e celluclast.

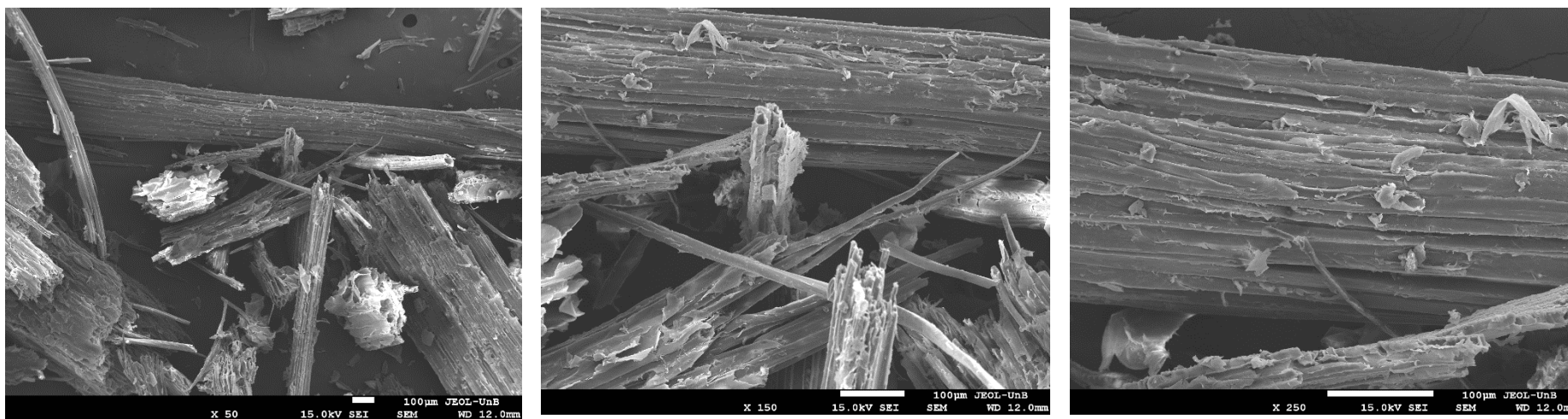


Figura 3.16. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado apenas com tampão – sem adição de enzimas – controle.

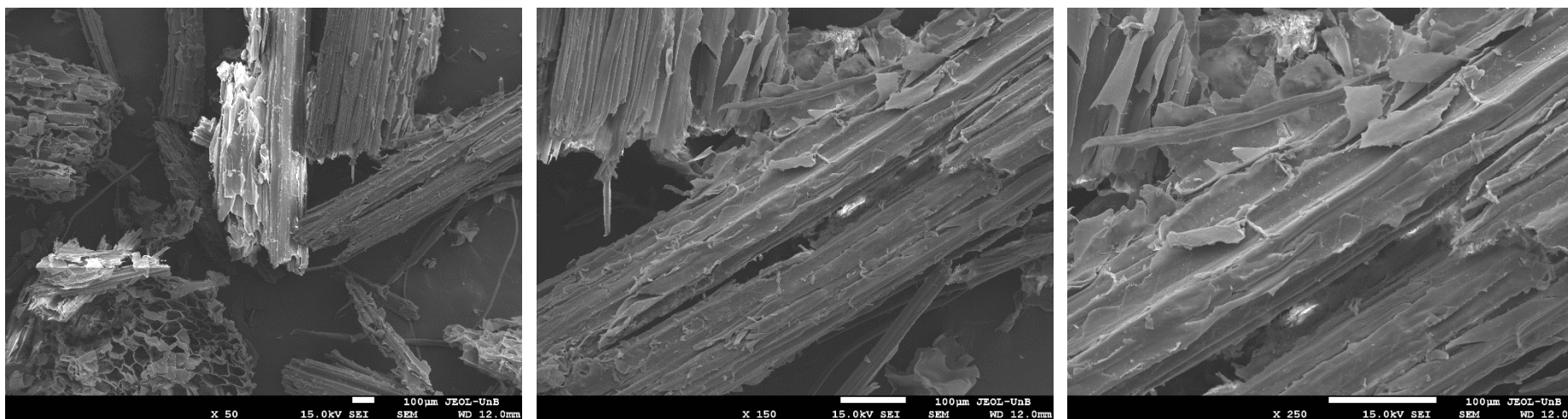


Figura 3.17. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado apenas com lacase.

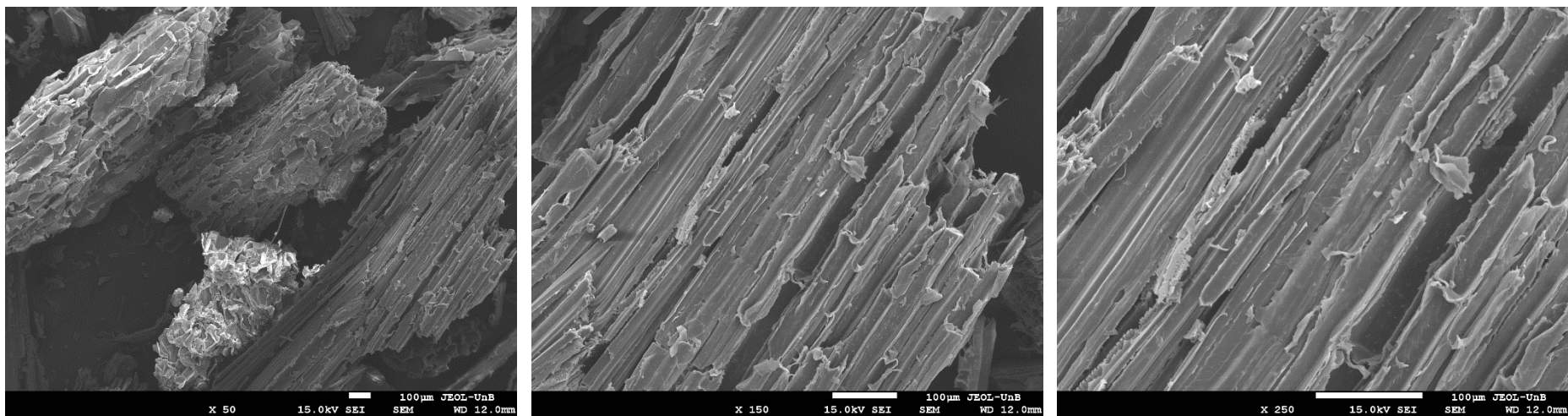


Figura 3.18. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado apenas com expansina.

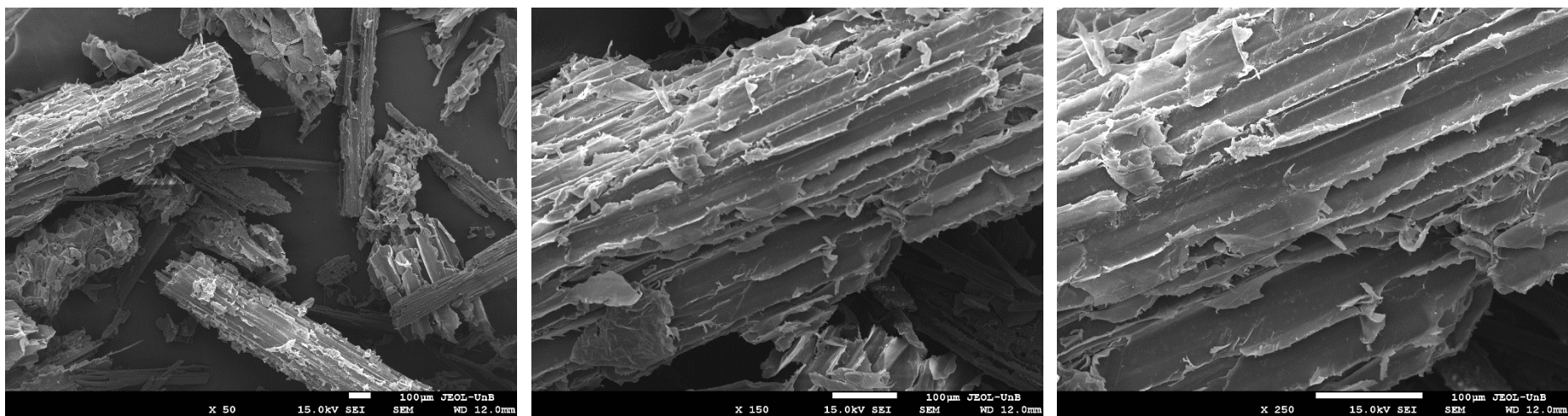


Figura 3.19. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado apenas com lacase e tween.

Embora estudos tenham sugerido que os surfactantes, assim como o uso de enzimas acessórias, aditivos químicos entre outros possam melhorar a hidrólise enzimática, ainda são necessários mais esforços para entender o mecanismo de ação dos surfactantes durante a sacarificação. Imagens realizadas por MEV entre outras técnicas, como por exemplo, difração de raios X (DRX) e análise termogravimétrica (TG) poderão auxiliar na elucidação destes mecanismos (Zhang *et al.*, 2018).

As micrografias evidenciam uma mudança estrutural na superfície das fibras do bagaço de cana-de-açúcar pela atuação das enzimas (lacase e expansina) e surfactante (tween) (Figuras 3.17, 3.18, 3.19 e 3.20). O substrato apresenta aspecto irregular pela atuação da expansina, lacase, e lacase com tween no bagaço de cana-de-açúcar com relação ao bagaço sem adição de nenhuma fonte de enzima ou aditivo. É possível observar principalmente na presença da lacase com tween que as fibras da biomassa tornaram-se mais abertas e expostas (Fig. 3.19), o que favoreceu uma maior superfície de contato e possivelmente beneficiou a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. Trabalhos como o de Qiu e Chen (2012), Kim *et al.* (2009) e Santos *et al.* (2017) exploram o uso microscopia eletrônica de varredura para avaliar os efeitos da lacase, expansina e swollenina.

Para Qiu e Chen (2012), o uso da lacase (*Sclerotium* sp) em palha de trigo explodida a vapor foi avaliada pela associação de MEV e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Os resultados indicaram que a lignina foi oxidada pela lacase, contribuindo para o desprendimento do complexo lignina-carboidrato e, conseqüentemente, levando ao aumento da hidrólise da celulose. No trabalho de Kim *et al.* (2009), as micrografias da incubação de papel de filtro com expansina e com solução de ureia 8 M produziram o mesmo efeito, houve uma diminuição da resistência com relação ao controle, o qual apresentou estrutura mais densa, sobreposta e interligada. Santos *et al.* (2017) mostraram que a swollenina recombinante de *T. harzianum* foi capaz de criar uma superfície áspera e amorfa em avicel com relação ao controle, o qual manteve uma superfície lisa. Os autores reforçam que a disruptura da fibra é a principal característica que torna a swollenina como um aditivo para conversão de biomassa enzimática. Portanto, essa disruptura da fibra é possível ser observada neste trabalho com as imagens de MEV.

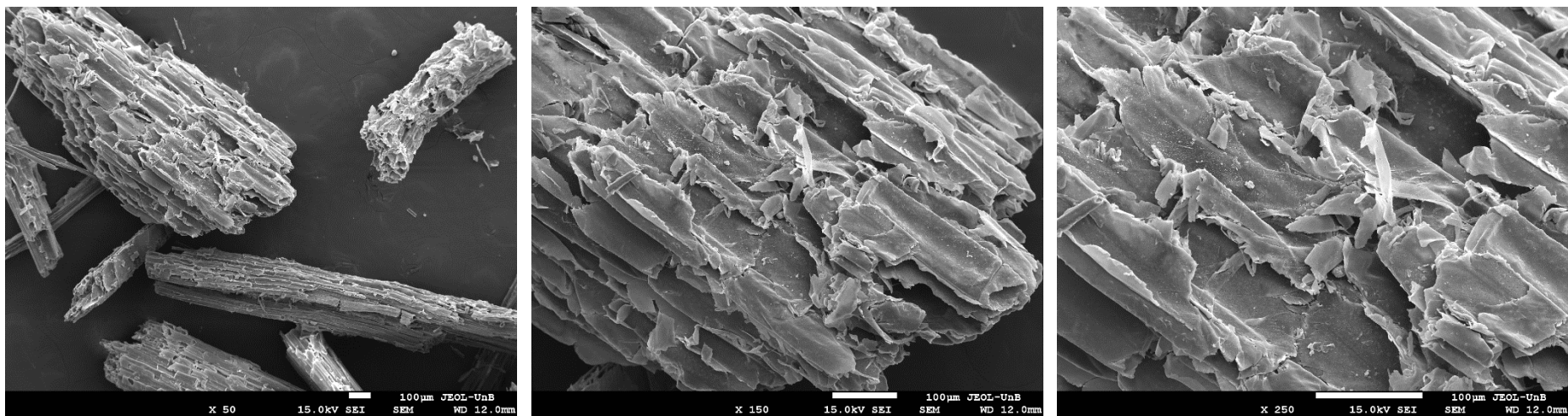


Figura 3.20. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o consórcio 4 (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT) (48h).

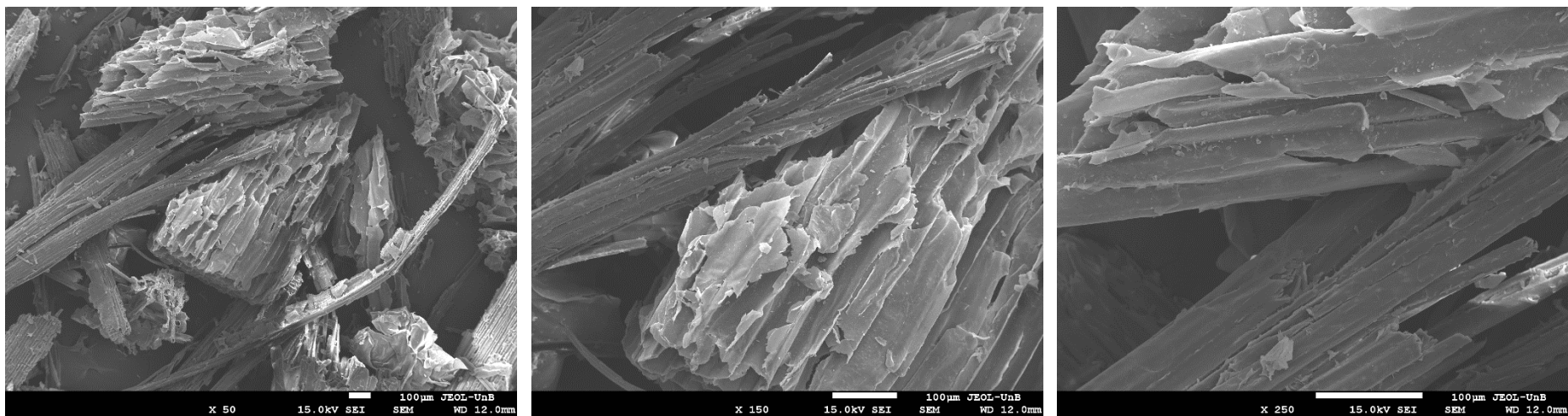


Figura 3.21. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o consórcio 4 (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT) suplementado com expansina (simultaneamente) (48h).

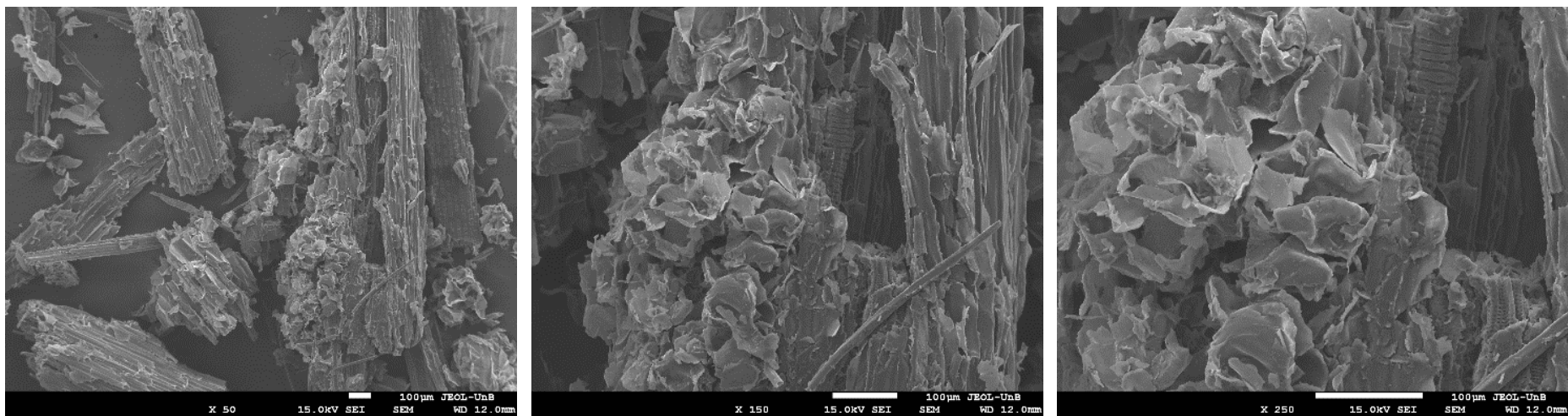


Figura 3.22. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o consórcio 4 LT (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT com tween 80 e lacase) (48h).

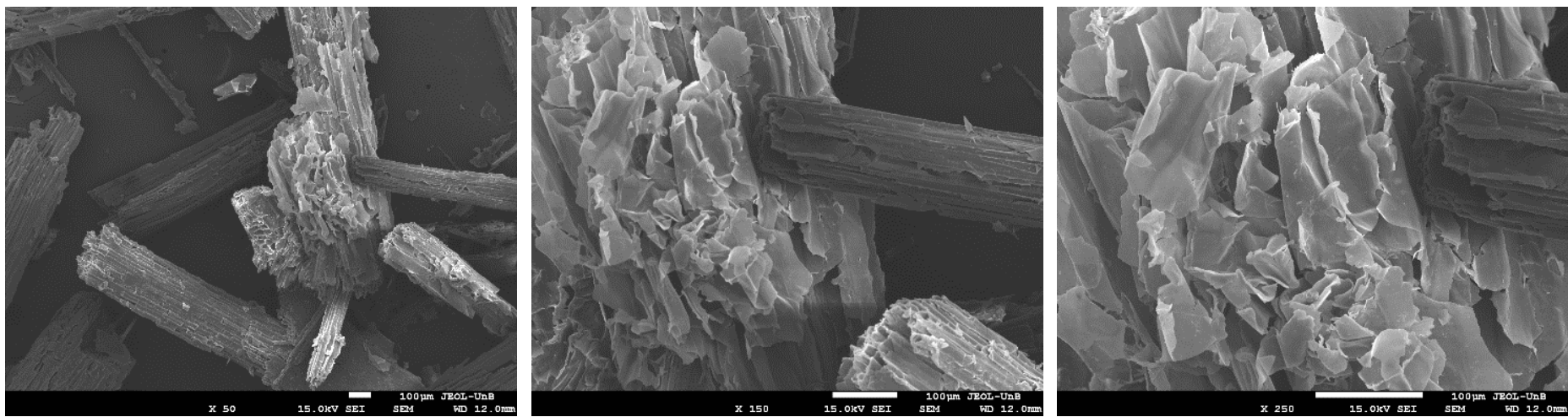


Figura 3.23. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o coquetel comercial cellic ctec2 (48h).

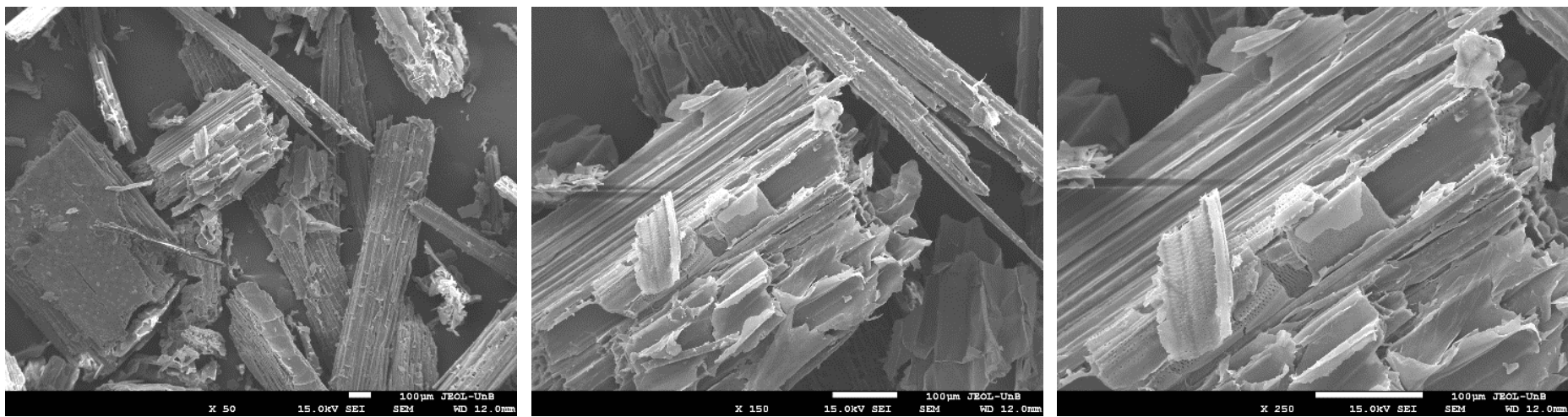


Figura 3.24. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o coquetel comercial celluclast (48h).

Quando os consórcios/enzimas/coquetéis foram adicionados à biomassa foi possível avaliar, por meio de MEV, a ação sinérgica das enzimas hidrolíticas que faz com que partes da superfície da biomassa sejam removidas, formando fissuras e cavidades, aumentando a área de superfície total e a facilitando a acessibilidade das enzimas (Ang *et al.*, 2015).

As micrografias do bagaço quando hidrolisado com o consórcio 4 LT (Fig. 3.22) e com o coquetel comercial cellic ctec2 (Fig. 3.23) apresentaram uma superfície totalmente desconstruída e fragmentada, diferente da micrografia quando bagaço foi hidrolisado na presença do celluclast (Figura 3.24). Vale lembrar que o celluclast apresentou um desempenho de hidrólise inferior ao consórcio 4 LT na liberação de açúcares redutores totais. Desta forma, era esperado que as fibras do bagaço hidrolisado com o celluclast apresentassem uma estrutura mais íntegra.

As imagens de MEV no trabalho de Cripwell *et al.* (2015) permitiram avaliar mudanças significativas que ocorreram na estrutura do farelo de trigo ao longo do tempo da hidrólise enzimática. No início do experimento, a estrutura do farelo de trigo ainda estava intacta com uma superfície áspera, após 44 h era visível algumas alterações e no final do experimento com 72 horas os danos haviam aumentado, o que beneficiou a atuação das amilases.

4.12 Análise dos carboidratos das biomassas hidrolisadas via HPLC

Com o tempo de 48 h de hidrólise os consórcios 4, 4 com expansina (simultâneo), 4 LT, cellic ctec2 e o celluclast foram avaliados por HPLC na hidrólise de bagaço de cana, conforme Figuras 3.25 a 3.29

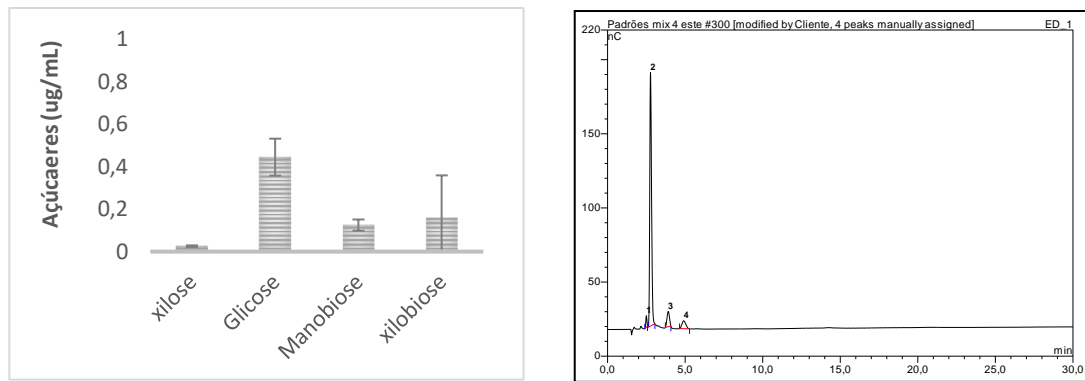


Figura 3.25. Monossacarídeos e oligossacarídeos e respectivo cromatograma da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o consórcio 4 (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT).

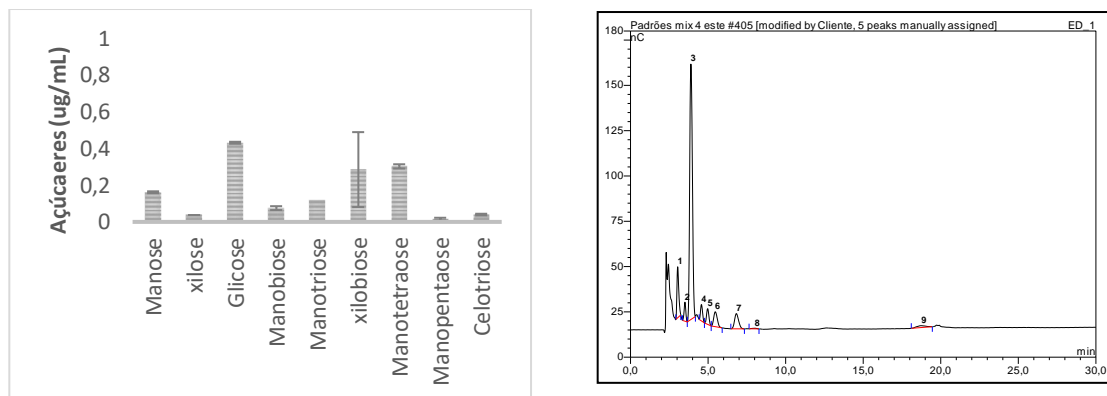


Figura 3.26. Monossacarídeos e oligossacarídeos e respectivo cromatograma da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o consórcio 4 (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT) suplementado com expansina (simultaneamente).

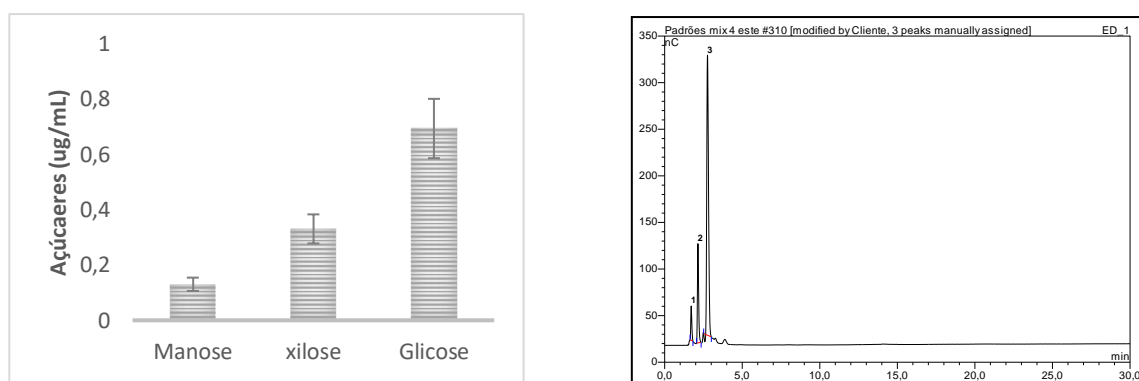


Figura 3.27. Monossacarídeos e oligossacarídeos e respectivo cromatograma da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o consórcio 4 LT (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT com tween 80 e lacase).

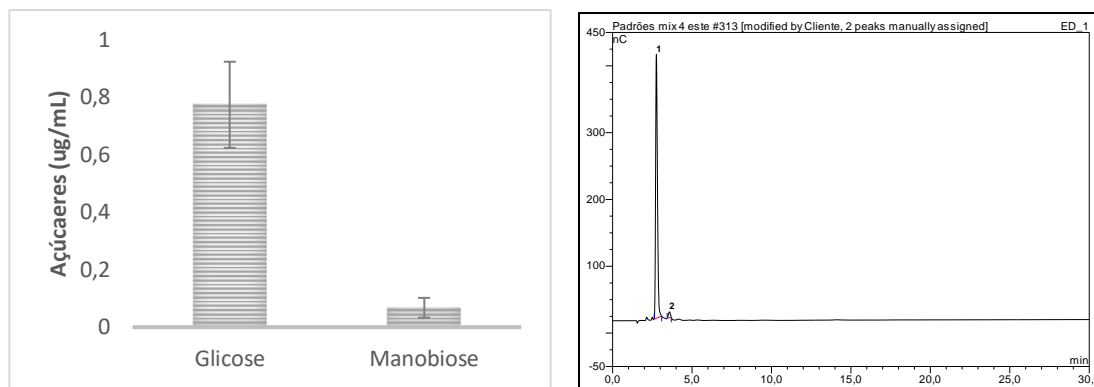


Figura 3.28. Monossacarídeos e oligossacarídeos e respectivo cromatograma da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o coquetel comercial cellic ctec2.

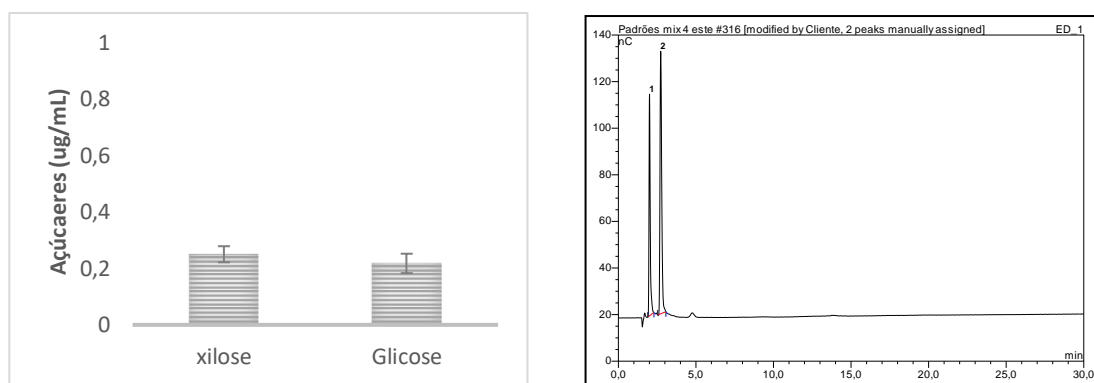


Figura 3.29. Monossacarídeos e oligossacarídeos e respectivo cromatograma da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com o coquetel comercial celluclast.

As análises em HPLC foram feitas quando a hidrólise atingiu o tempo de 48 h. O consórcio 4 (sem nenhuma suplementação) liberou xilose, glicose, manobiose e xilobiose (Fig. 3.25). Quando o consórcio 4 foi suplementado simultaneamente com expansina, este liberou manose, xilose, glicose, manobiose, manotriose, xilobiose, manotetraose, manopentaose e celotriose (Fig. 3.26). Por sua vez quando o consórcio 4 foi suplementado com tween e lacase (consórcio 4 LT) foram liberados manose, xilose e glicose (Fig. 3.27). Por sua vez, o cellic ctec2 liberou glicose e manobiose e o celluclast liberou xilose e glicose (Figuras. 3.28 e 3.29).

Ao comparar o consórcio 4 LT com o consórcio 4 é possível verificar que a adição de lacase e tween proporcionou a conversão de oligossacarídeos (manobiose e xilobiose) em monossacarídeos, desta forma, houve aumento da produção de glicose e xilose e quantificação de manose. A presença de monossacarídeos como produto final da hidrólise

comprova que o consórcio 4 LT é um consórcio enzimático holocelulolítico eficiente. O cellic ctec2 é uma mistura comercial de celulases (Jung *et al.*, 2015), desta forma, como esperado o principal produto liberado foi glicose. Entretanto, o cellic ctec2 liberou aproximadamente 11% mais glicose do que o consórcio 4 LT, valor compatível com o encontrado (10%) ao determinar a glicose com o kit de glicose oxidase.

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados pode se concluir que a adição concomitante de lacase e tween ao consórcio 4 favoreceu maior liberação de glicose e açúcares redutores totais quando comparado com o consórcio 4 e entre as outras formas de adição avaliadas, que incluíram β -glicosidase, triptofano e expansina.

A composição otimizada (consórcio 4 LT) apresentou uma liberação de ART e glicose próxima da obtida pela ação do coquetel comercial Cellic CTec2, e maior que a obtida pelo coquetel Celluclast.

O microensaio foi reprodutível, tornando-se uma ferramenta para minimizar o volume de hidrólise e conseqüentemente a carga de enzima. Desta forma, apresentou resultados confiáveis.

A abordagem de otimização relatada neste estudo poderá ser aplicada para otimizar consórcios enzimáticos para degradação de substratos lignocelulósicos visando à indústria de bioprocessos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, R.; SATLEWAL, A.; KAPOOR, M.; MONDAL, S.; BASU, B. Investigating the Enzyme-Lignin Binding With Surfactants for Improved Saccharification of Pilot Scale Pretreated Wheat Straw. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 411–418, 2016.
- ANG, S. K.; ADIBAH, Y.; ABD-AZIZ, S.; MADIHAH, M. S. Potential Uses of Xylanase-Rich Lignocellulolytic Enzymes Cocktail for Oil Palm Trunk (OPT) Degradation and Lignocellulosic Ethanol Production. **Energy and Fuels**, v. 29, n. 8, p. 5103–5116, 2015.
- BERLIN, A.; BURA, R.; KANG, K.-Y.; GILKES, N.; SADDLER, J. A Rapid Microassay to Evaluate Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Substrates. **Interscience**, v. 95, n. 5, p. 880–886, 2005.
- BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; COSTA, A. C. DA. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 173–181, 2015.
- CAO, S.; AITA, G. M. Enzymatic hydrolysis and ethanol yields of combined surfactant and dilute ammonia treated sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 357–364, 2013.
- CHEN, Q.; MARSHALL, M. N.; GEIB, S. M.; TIEN, M.; RICHARD, T. L. Effects of laccase on lignin depolymerization and enzymatic hydrolysis of ensiled corn stover. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 186–192, 2012.
- CHEN, Y.; ZHOU, Y.; QIN, Y.; LIU, D.; ZHAO, X. Evaluation of the action of Tween 20 non-ionic surfactant during enzymatic hydrolysis of lignocellulose: Pretreatment, hydrolysis conditions and lignin structure. **Bioresource Technology**, v. 269, p. 329–338, 2018.
- CINTRA, L. C. Produção de hemicelulases recombinantes e aplicação na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. **Tese (doutorado) Universidade de Brasília**, p. 1–185, 2016.
- COSTA, I. G. DE O. Clonagem e expressão de uma β -expansina de cana-de-açúcar na levedura *Pichia pastoris*. **Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás**, p. 1–98, 2016.
- CRIPWELL, R.; FAVARO, L.; ROSE, S. H.; BASAGLIA, M.; CAGNIN, L.; CASELLA, S.; ZYL, W. VAN. Utilisation of wheat bran as a substrate for bioethanol production using recombinant cellulases and amylolytic yeast. **Applied Energy**, v. 160, p. 610–617, 2015.
- DAVIDI, L.; MORAÏS, S.; ARTZI, L.; KNOP, D.; HADAR, Y.; ARFI, Y.; BAYER, E. A. Toward combined delignification and saccharification of wheat straw by a laccase-containing designer cellulosome. v. 113, n. 39, p. 1–6, 2016.
- DYK, J. S. VAN; PLETSCHEKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458–1480, 2012.

- ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 353–364, 2002.
- FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a β -glucosidase from solid-state cultures of *Humicola grisea* var. thermoidea. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1–5, 1996.
- FILLAT, U.; MORENO, A. D.; IBARRA, D.; TOMÁS-PEJO, E. Laccases as a potential tool for the efficient conversion of lignocellulosic biomass: A Review. **Fermentation**, v. 3(2), n. 17, p. 1–30, 2017.
- GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 618–628, 2002.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.
- GIACOBBE, S.; PEZZELLA, C.; LETTERA, V.; SANNIA, G.; PISCITELLI, A. Laccase pretreatment for agrofood wastes valorization. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 59–65, 2018.
- GOMES, D.; GAMA, M.; DOMINGUES, L. Determinants on an efficient cellulase recycling process for the production of bioethanol from recycled paper sludge under high solid loadings. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 111, p. 1–12, 2018.
- GUPTA, V. K.; KUBICEK, C. P.; BERRIN, J. G.; WILSON, D. W.; COUTURIER, M.; BERLIN, A.; FILHO, E. X. F.; EZEJI, T. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 7, p. 633–645, 2016.
- HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 36, 2011.
- JIN, H.; JUNG, I.; KIM, J. F.; CHOI, I.; HEON, K. An expansin from the marine bacterium *Hahella chejuensis* acts synergistically with xylanase and enhances xylan hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 516–519, 2013.
- JOHAN, B.; ENGQVIST, M.; TJERNELD, F. Effect of poly (ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 186–195, 2007.
- JUNG, Y. R.; PARK, J. M.; HEO, S.-Y.; HONG, W.-K.; LEE, S.-M.; OH, B.-R.; PARK, S.-M.; SEO, J.-W.; KIM, C. H. Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. **Renewable Energy**, v. 76, p. 66–71, 2015.
- KIM, E. S.; LEE, H. J.; BANG, W.; CHOI, I.; KIM, K. H. Functional Characterization of a Bacterial Expansin From *Bacillus subtilis* for Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1342–1353, 2009.
- KUBICEK, C. P.; KUBICEK, E. M. Enzymatic deconstruction of plant biomass by fungal enzymes. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 35, p. 51–57, 2016.
- LI, K.; WANG, X.; WANG, J.; ZHANG, J. Benefits from additives and xylanase during

- enzymatic hydrolysis of bamboo shoot and mature bamboo. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 424–431, 2015.
- LI, X.; ZHENG, Y. Lignin-enzyme interaction: Mechanism, mitigation approach, modeling, and research prospects. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 4, p. 466–489, 2017.
- LIU, X.; MA, Y.; ZHANG, M. Research advances in expansins and expansion-like proteins involved in lignocellulose degradation. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 8, p. 1541–1551, 2015.
- LOPES, A. M.; FILHO, E. X. F.; MOREIRA, L. R. S. An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, p. 632–645, 2018.
- LÓPEZ, J. A.; LÁZARO, C. D. C.; CASTILHO, L. D. R.; FREIRE, D. M. G.; CASTRO, A. M. H. DE. Characterization of multienzyme solutions produced by solid-state fermentation of babassu cake, for use in cold hydrolysis of raw biomass. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p. 231–239, 2013.
- MALGAS, S.; THORESEN, M.; DYK, J. S. VAN; PLETSCHE, B. I. Time dependence of enzyme synergism during the degradation of model and natural lignocellulosic substrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 103, p. 1–11, 2017.
- MCQUEEN-MASON, S.; COSGROVE, D. J. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. **Plant Biology**, v. 91, p. 6574–6578, 1994.
- MOILANEN, U.; KELLOCK, M.; GALKIN, S.; VIKARI, L. The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 6–7, p. 492–498, 2011.
- NAJMUDIN, S.; GUERREIRO, C. I. P. D.; CARVALHO, A. L.; PRATES, J. A. M.; CORREIA, M. A. S.; ALVES, V. D.; FERREIRA, L. M. A.; ROMÃO, M. J.; GILBERT, H. J.; BOLAM, D. N.; FONTES, C. M. G. A. Xyloglucan is recognized by carbohydrate-binding modules that interact with β -glucan chains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 13, p. 8815–8828, 2006.
- PERALTA, R. M.; KADOWAKI, M. K.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. A highly thermostable β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*: purification and biochemical characterization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 146, p. 291–295, 1997.
- PEREIRA, M. R.; MAESTER, T. C.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. M. Bioenergia: Desenvolvimento, Pesquisa e Inovação. **Cultura Acadêmica**, p. 1–1072, 2012.
- POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F. Effect of carbon source on the β -glucosidase system of the thermophilic fungus *Humicola grisea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 297–299, 1996.
- QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C. E. Impact of surfactants on pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 5941–5951, 2010.
- QIU, W.; CHEN, H. Enhanced the enzymatic hydrolysis efficiency of wheat straw after combined steam explosion and laccase pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 8–12, 2012.

RABELO, S. C. Avaliação E Otimização De Pré-Tratamentos E Hidrólise Enzimática Do Bagaço De Cana-De-Açúcar Para a Produção De Etanol De Segunda Geração. **Tese (doutorado), Universidade Estadual de Campinas**, p. 414, 2010.

RAJ, K.; KRISHNAN, C. High sugar yields from sugarcane (*Saccharum officinarum*) bagasse using low-temperature aqueous ammonia pretreatment and laccase-mediator assisted enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 673–683, 2018.

REYES-SOSA, F. M.; MORALES, M. L.; GÓMEZ, A. I. P.; CRESPO, N. V.; ZAMORANO, L. S.; MARTÍN, J. R.; HEREDIA, F. P. M.; GARCÍA, B. D. Management of enzyme diversity in high-performance cellulolytic cocktails. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 156, p. 1–10, 2017.

ROCHA-MARTÍN, J.; MARTÍNEZ-BERNAL, C.; ZAMORANO, L. S.; REYES-SOSA, F. M.; GARCÍA, B. D. Inhibition of enzymatic hydrolysis of pretreated corn stover and sugar cane straw by laccases. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 88–91, 2018.

RODRIGUES, A. C.; HAVEN, M. Ø.; LINDEDAM, J.; FELBY, C.; GAMA, M. Celluclast and Cellic® CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid-liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 79, n. 80, p. 70–77, 2015.

RUEDA, S. M. G. Extração e Hidrólise Enzimática da Hemicelulose do Bagaço de Cana-de-açúcar. **Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas**, p. 1–130, 2010.

SALVI, D. A.; AITA, G. M.; ROBERT, D.; BAZAN, V. Dilute ammonia pretreatment of sorghum and its effectiveness on enzyme hydrolysis and ethanol fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1–8, p. 67–74, 2010.

SANTOS, C. A.; FERREIRA-FILHO, J. A.; O'DONOVAN, A.; GUPTA, V. K.; TUOHY, M. G.; SOUZA, A. P. Production of a recombinant swollenin from *Trichoderma harzianum* in *Escherichia coli* and its potential synergistic role in biomass degradation. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 83, p. 1–11, 2017.

SHI, F.; XIANG, H.; LI, Y. Combined pretreatment using ozonolysis and ball milling to improve enzymatic saccharification of corn straw. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 444–451, 2015.

SHI, J.; WU, D.; ZHANG, L.; SIMMONS, B. A.; SINGH, S.; YANG, B.; WYMAN, C. E. Dynamic Changes of Substrate Reactivity and Enzyme Adsorption on Partially Hydrolyzed Cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 3, p. 503–515, 2017.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SUKUMARAN, R. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Role and significance of β -glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500–507, 2013.

SIQUEIRA, F. G. Resíduos Agroindustriais com Potencial para a Produção de Holocelulases de Origem Fúngica e Aplicações Biotecnológicas de Hidrolases. **Tese (doutorado) Universidade de Brasília**, p. 277, 2010.

SIQUEIRA, G. A. Efeito da lignina de bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados na hidrólise enzimática da celulose. **Tese de doutorado, Universidade de São Paulo**, p.

141, 2015.

SOUZA, R. B. A. DE. Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar. **Tese de doutorado-UFSCar, São Carlos-SP**, p. 124, 2016.

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

SUWANNARANGSEE, S.; BUNTERNGSOOK, B.; ARNTHONG, J.; PAEMANEE, A.; THAMCHAIPENET, A.; EURWILAICHITR, L.; LAOSIRIPOJANA, N.; CHAMPREDA, V. Optimisation of synergistic biomass-degrading enzyme systems for efficient rice straw hydrolysis using an experimental mixture design. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 252–261, 2012.

TEIXEIRA, R. S. S.; SILVA, A. S. A. DA; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; SILVA BON, E. P. DA. Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydase activity measurements. **Carbohydrate Research**, v. 363, p. 33–37, 2012.

THOMAS, L.; PARAMESWARAN, B.; PANDEY, A. Hydrolysis of pretreated rice straw by an enzyme cocktail comprising acidic xylanase from *Aspergillus* sp. for bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 98, p. 9–15, 2016.

VINTILĂ, T.; DRAGOMIRESCU, M.; VINTILĂ, C.; CROITORIU, V. Hydrolysis of Lignocellulose from Agriculture Using Crude Extract from *T. viride* Cultures. **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies**, v. 66, n. 1:2, p. 447–451, 2009.

WANG, D.; SUN, J.; YU, H. L.; LI, C. X.; BAO, J.; XU, J. H. Maximum Saccharification of Cellulose Complex by an Enzyme Cocktail Supplemented with Cellulase from Newly Isolated *Aspergillus fumigatus* ECU0811. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 1, p. 176–186, 2012.

XIAO, Z.; ZHANG, X.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 113–116, p. 1115–1126, 2004.

YAN, Z.; MING-XIONG, H.; BO, W.; QI-CHUN, H.; QING, L.; JIAN, Z. Recombinant EXLX1 from *Bacillus subtilis* for enhancing enzymatic hydrolysis of corn stover with low cellulase loadings. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 50, p. 11126–11131, 2012.

YU, Z.; JAMEEL, H.; CHANG, H. MIN; PHILIPS, R.; PARK, S. Quantification of bound and free enzymes during enzymatic hydrolysis and their reactivities on cellulose and lignocellulose. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 369–377, 2013.

ZHANG, H.; FAN, M.; LI, X.; ZHANG, A.; XIE, J. Enhancing enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by ferric chloride catalyzed organosolv pretreatment and Tween 80. **Bioresource Technology**, v. 258, p. 295–301, 2018.

ZHANG, H.; LYU, G.; ZHANG, A.; LI, X.; XIE, J. Effects of ferric chloride pretreatment and surfactants on the sugar production from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 93–101, 2018.

EFEITO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS NA QUALIDADE DA SILAGEM DE MILHO

1. INTRODUÇÃO

A adoção da silagem como estratégia alimentar é cada vez mais empregada em sistemas intensivos de produção de carne e leite, uma vez que permite a armazenagem de grandes quantidades de alimento volumoso para fornecimento aos animais, sendo a silagem de milho um dos alimentos conservados mais utilizados na produção animal (Figueiredo *et al.*, 2018).

A silagem de milho fornece 50 a 100% a mais de energia digestível por hectare que qualquer outra forrageira. Entretanto, o valor nutritivo da silagem de milho pode variar conforme o híbrido, a densidade de cultivo, as condições de crescimento, a maturidade e a umidade no momento da colheita, o tamanho de partícula e as condições de ensilagem (Velho *et al.*, 2007). Para melhorar a qualidade da silagem, aditivos e inoculantes veem sendo utilizados no processo. Os resultados obtidos nos estudos estão mais relacionados com a preservação e fermentação da silagem e as respostas no desempenho animal (Mazza Rodrigues *et al.*, 2002).

Os aditivos biológicos e inoculantes bacterianos são compostos por bactérias ácido-láticas, adicionados ou não de enzimas (celulases, amilases e hemicelulases) e, segundo Coan *et al.* (2005) o princípio básico de atuação destes produtos consiste no aumento da disponibilidade de açúcares simples, via complexo enzimático, para que as bactérias tenham acesso a esses açúcares, incrementando, dessa forma, a produção de ácido lático e promovendo a queda brusca do pH.

De acordo com Beauchemin *et al.* (2003) apesar dos avanços da pesquisa, a digestibilidade das forragens continua a limitar a ingestão de energia disponível para os ruminantes. Desta forma, a adição de enzimas fibrolíticas exógenas tem sido alvo de estudos na nutrição de ruminantes. As enzimas fibrolíticas podem potencializar a degradação dos polissacarídeos estruturais juntamente com as enzimas produzidas pelos micro-organismos do rúmen.

O aproveitamento de alimentos fibrosos pelos ruminantes está relacionado à síntese e secreção de enzimas pelos micro-organismos do rúmen, os quais promovem a hidrólise da parede celular das plantas (Fagundes *et al.*, 2008). Uma vez que esta conversão tem sido pouco eficiente, a adição de enzimas fibrolíticas é um caminho para promover a hidrólise parcial da parede celular da planta durante o processo de preservação da planta na forma de silagem (Lelis, 2012). A aplicação de enzimas fibrolíticas na forrageira no momento da ensilagem pode melhorar o valor nutricional, eliminar fatores antinutricionais, fornecer enzimas digestivas suplementares, como proteases, amilases e glicanases (Kuhad, Gupta e Singh, 2011). Adicionalmente, a ação das enzimas fibrolíticas favorece o crescimento das bactérias desejáveis, devido à maior liberação de carboidratos solúveis, resultando em melhoria no processo de fermentação e, conseqüentemente, na qualidade da silagem produzida.

Dentre os efeitos da utilização de enzimas fibrolíticas, como as celulasas e hemicelulasas, em silagens Nadeau *et al.* (2000) citam a redução da concentração dos carboidratos estruturais. Outros autores também mencionam melhora na preservação do material ensilado e elevação na quantidade de açúcares solúveis e da degradabilidade ruminal (Hristov e McAllister, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação de coquetéis contendo enzimas fibrolíticas exógenas sobre a qualidade da silagem de milho.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros de qualidade da silagem de milho pH e composição bromatológica, mediante inoculação com o coquetel (consórcio 4 desenvolvido no capítulo 2 desta tese - 45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT) ou com os coquetéis comerciais Celluclast[®] e Cellic[®] CTec2;
- Determinar a população de bactérias ácido-láticas presentes nas silagens;
- Visualizar as mudanças estruturais na superfície das fibras das silagens mediante utilização de microscopia eletrônica de varredura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria-prima

A matéria-prima utilizada na ensilagem foi a cultura de milho, o qual foi colhido aos 120 dias, com 35% de matéria seca. O corte da planta inteira foi realizado manualmente a 20 cm da superfície do solo e o material picado para tamanho médio de partícula de 10 mm em ensiladeira acoplada ao trator.

3.2. Inoculantes fibrolíticos

Os aditivos utilizados foram o Coquetel Enzimático 4, descrito no capítulo II, e os coquetéis comerciais Celluclast[®] e Cellic[®] CTec2, ambos produzidos pela Novozymes. Os coquetéis enzimáticos foram aplicados na dosagem de 7,8 mg de proteína por quilograma de biomassa, exceto o coquetel Cellic[®] CTec2 que também foi utilizado na dosagem de 50x maior, ou seja, 390 mg de proteína por quilograma de material ensilado

3.3. Ensilagem

O material picado foi dividido em cinco partes, sendo que uma parte foi pulverizada com água destilada e as demais com os coquetéis avaliados, constituindo os tratamentos Controle, Coquetel 1x, Celluclast[®] 1x, Cellic[®] CTec2 1x e Cellic[®] CTec2 50x. Logo após a aspersão o material foi ensilado em mini silos experimentais de PVC com diâmetro de 10cm, altura de 40 cm e capacidade de cerca de 2,3 kg. Com intuito de coletar o efluente produzido durante o processo de fermentação o cilindro foi preparado com uma tela plástica e recipiente coletor na parte inferior.

Foram colhidas duas amostras da biomassa *in natura* para caracterizar o material no momento da ensilagem. Após serem numerados e pesados procedeu-se o enchimento dos mini silos de forma manual, com auxílio de bastão de madeira, até atingir densidade aproximada de 600 kg/m³. Em seguida os mesmos foram fechados com tampas contendo válvula tipo “Bunsen”, lacrados com cola quente e fita adesiva, pesados e armazenados em sala com temperatura ambiente (Figura 4.1).



Figura 4.1. Mini silos armazenados

3.4. Coleta, processamento e análises laboratoriais

Passados 120 dias do fechamento os mini silos foram pesados, abertos e, após eliminação de cerca de 5 cm da parte superior e da parte inferior, a parte central foi homogeneizada em saco plástico e foram coletadas amostras para posterior análise laboratorial.

Na ocasião da abertura foi quantificado o volume de efluente produzido e uma amostra de 25 g da silagem foi processada, por um minuto, em liquidificador industrial juntamente com 225 mL de água destilada para determinação do pH, de acordo com método proposto por Kung Jr. (1996).

O material foi seco até atingir peso constante em estufa de circulação forçada a 65°C e moído em moinho de facas em peneira com crivos de 1 mm. Posteriormente, foram realizadas as análises bromatológicas no Laboratório do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP usando o método NIRS – espectrofotometria de infravermelho proximal.

Para contagem de bactérias ácido-láticas realizou-se diluição seriada usando o meio MRS (Man-Rogosa-Sharpe), com plaqueamento de 1mL em placas Petrifilm (AC, 3M®) com diluições 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} realizados em triplicata. Em seguida, as placas foram

alocadas em jarra de cultivo de micro-organismos contendo disco gerador de anaerobiose (Anaerobac, Probac). A jarra foi mantida em estufa a 30°C e a contagem da população foi realizada 48±4h após a incubação. Os resultados obtidos foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada com o objetivo de visualizar as mudanças estruturais na superfície das fibras da silagem. As amostras de silagem foram secas a 65°C, metalizadas em equipamento Sputter Coater SCD 050 (Balzers, Alemanha) e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura modelo JMS 7001F (JEOL, Japão) utilizando voltagem de 15 kV, de acordo com protocolo adaptado de Li et al. (2014).

As silagens foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições, sendo os dados médios apresentados de forma descritiva.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o processo de ensilagem, grande quantidade de oxigênio é produzida dentro do silo, o que resulta no aumento da sobrevivência de micro-organismos indesejáveis, como bactérias aeróbias e fungos, que competem com as bactérias ácido-láticas (BAL) pelos carboidratos solúveis, prejudicando a redução do pH e a preservação da silagem. Como o oxigênio é um fator indesejável para se obter silagem de alta qualidade, a compressão da forragem na ensilagem é necessária para reduzir a quantidade de oxigênio e, conseqüentemente, melhorar a qualidade final da silagem. A alta densidade de silagem promove a eliminação de oxigênio e assegura condições anaeróbicas dentro do silo (Anésio *et al.*, 2017).

Desta forma, quanto maior for a compactação, maior será a densidade (em kg de MS/m³) do silo, o que, além de melhor aproveitamento da capacidade do silo resultará em redução de perdas. No presente estudo a quantidade de material ensilado em cada mini silo apresentou pouca variação entre os tratamentos (Figura 4.2), sendo obtida média de 2.180 g (\pm 54g), o que resultou em densidade média das silagens de 570 kg/m³, valor adequado e dentro da faixa de 550 a 650 kg/m³ recomendados por Paziani e Campos (2015) para silagem de milho.

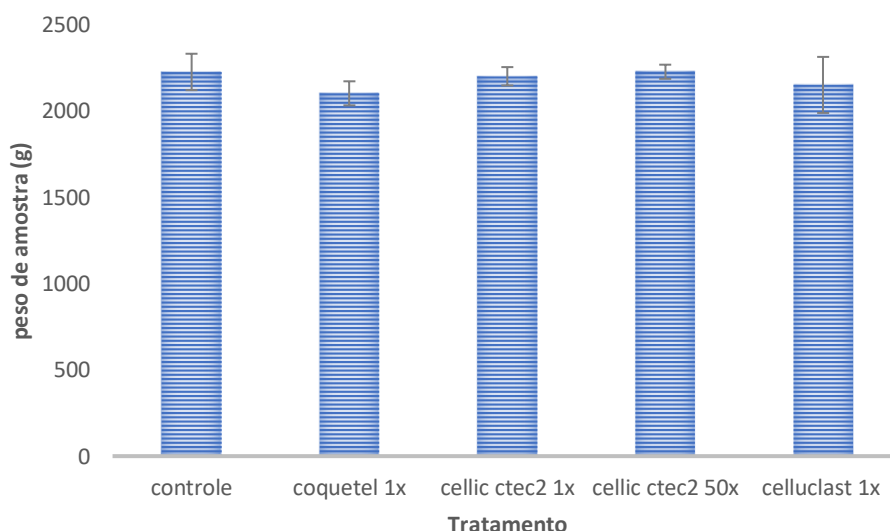


Figura 4.2. Peso médio dos mini silos logo após a ensilagem.

Controle: silagem sem adição de enzimas fibrolíticas; coquetel: consórcio 4 (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT); cellic ctec2 e celluclast: coquetéis comerciais; 1x e 50x: dosagem de enzima fibrolítica.

Sucu *et al.*, (2016) ressalta que as silagens mais compactadas (612 kg/m^3) são mais estáveis do que as silagens menos compactadas (577 kg/m^3). Estes resultados reconfirmam os achados por Velho *et al.*, (2007) que realizaram um trabalho testando a densidade de 500 e 600 kg/m^3 e chegaram à conclusão que quanto maior a densidade de compactação melhor a conservação dos glicídios solúveis e menor as alterações dos carboidratos estruturais e menor proteólise na silagem de milho.

De acordo com França *et al.* (2011) silagens caracterizadas como de boa qualidade devem apresentar pH na faixa de 4,2, o que evita a proteólise e a consequente produção de ácido butírico. No presente trabalho os valores médios de pH das silagens foram de 4,41; 4,37; 4,37; 4,34 e 4,37 para os tratamentos controle, coquetel 1x, Cellic[®] CTec2 1x, Cellic[®] CTec2 50x e Celluclast[®] 1x; respectivamente (Figura 4.3). Embora os valores de pH não tenham variado entre os tratamentos, esses estão acima do recomendado, provavelmente devido ao fato de que o material foi ensilado com elevado teor de matéria seca (MS=35%), mesmo este estando dentro da faixa 30 a 37% considerada por Nussio (1991) como ideal para obtenção de silagens de boa qualidade. Além do pH, o teor de matéria seca influencia a intensidade do processo de fermentação da silagem. O menor teor de umidade, associado à maior tensão osmótica, decorrente da concentração de nutrientes, inibe o surgimento de fermentações indesejáveis, causadas por bactérias clostrídicas, sem prejudicar a fermentação láctica. (Rodrigo *et al.*, 2004).

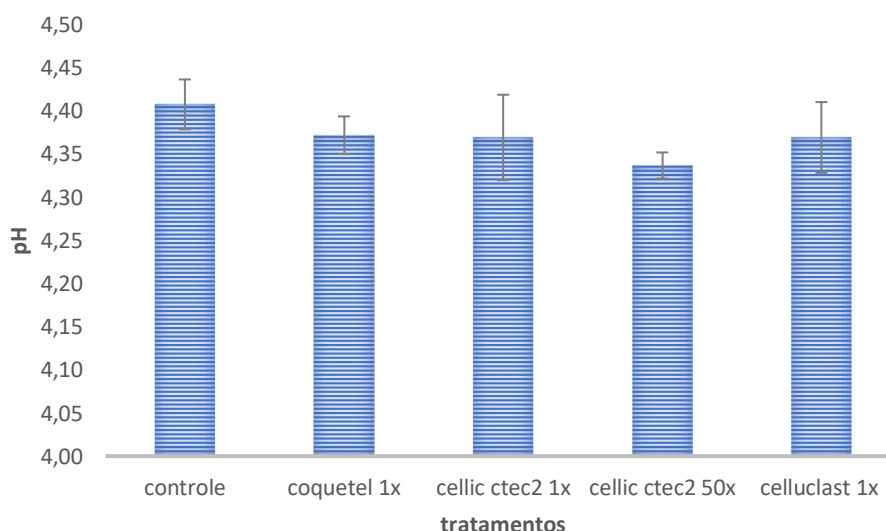


Figura 4.3. Valor do pH da silagem no momento da abertura dos mini silos.

Controle: silagem sem adição de enzimas fibrolíticas; coquetel: consórcio 4 (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT); cellic ctec2 e celluclast: coquetéis comerciais; 1x e 50x: dosagem de enzima fibrolítica.

Segundo Cherney e Cherney (2003) o pH ainda permanece como um bom indicador da qualidade de fermentação em silagens com baixo teor de MS e não sendo adequado para silagens com alto teor de MS. Adicionalmente, Jobim *et al.* (2007) afirmam que silagens de materiais com baixo teor de umidade invariavelmente apresentam valores de pH elevados, acima de 4,2.

Apesar de ser um importante parâmetro para inferir a qualidade do processo de ensilagem, Yasuoka *et al.* (2015) apontam que o pH não deve ser utilizado como critério exclusivo na avaliação da fermentação, pois seu efeito inibidor de micro-organismos depende da velocidade de declínio da concentração iônica e do teor de umidade do material ensilado. De acordo com Valeriano *et al.* (2009), a rápida redução no pH da silagem diminui a degradação de proteínas no silo por inativação de proteases das plantas, explicando a baixa redução de proteína bruta da silagem, como também inibe o desenvolvimento de micro-organismos anaeróbios indesejáveis, tais como enterobactérias e clostrídios.

A produção de efluente também é influenciada por fatores como teor de MS da cultura ensilada, além do tipo de silo, grau de compactação e processamento físico da forragem (Haigh, 1999). O efluente (ou lixiviado) pode ser produzido tipicamente quando a cultura ensilada possui um alto teor de umidade. A umidade excessiva representa risco de perda de nutrientes e pode gerar dano ao meio ambiente, pois o efluente apresenta alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), é rico em nutrientes solúveis, nitrogênio (N), fósforo (P) e apresenta pH baixo, variando de 3,5 a 5 (Gebrehanna *et al.*, 2014). No presente estudo não foi verificada produção de efluente nas silagens do tratamento controle. Já o material tratado com os coquetéis enzimáticos apresentaram produção de efluente nas quantidades médias de 36,5 mL; 122 mL; 94 mL e 224 mL para os tratamentos coquetel 1x (n=2), Cellic[®] CTec2 1x (n=4), Cellic[®] CTec2 50x (n=4) e Celluclast[®] 1x (n=3); respectivamente. Nota-se aumento na produção de efluente dos tratamentos contendo os coquetéis comerciais em relação ao coquetel 4. Além disso, o aumento da dosagem do coquetel Cellic[®] CTec2 em 50 vezes aumentou 2,38 vezes a produção de efluente em relação ao tratamento Cellic[®] CTec2 1x.

Os resultados da composição bromatológica das silagens são apresentados na Tabela 4.1. Em relação ao tratamento controle verifica-se a manutenção do teor de matéria seca e elevação no teor de proteína bruta, sendo esta última para a silagem tratada com o coquetel Celluclast[®].

A manutenção do teor de matéria seca em relação ao tratamento controle é um indicativo de que não ocorreram perdas durante o processo de fermentação. Em relação ao teor de proteína das silagens os valores observados no presente estudo são ótimos, pois estão próximos ao limite superior esperado, uma vez que valores aceitáveis estão abaixo de 10% da proteína bruta total (Pereira, 2013). No trabalho de Rodrigues *et al.* (2002) o teor de proteína bruta foi de 9,4% para o tratamento controle e 9,8 para o tratamento contendo adição de inoculante.

O aumento no teor de proteína em relação ao controle, fato também verificado por Lara (2013) em silagens de milho que receberam enzimas fibrolíticas, indica que houve redução da proteólise na fase fermentativa no material ensilado que recebeu os coquetéis enzimáticos. No presente estudo este fato é evidenciado no tratamento Celluclast[®] 1x, o qual apresentou o maior teor de proteína bruta (10%) e o menor valor de N-NH₃, composto produzido a partir da degradação da proteína verdadeira pela ação enzimática.

Em relação à fração fibrosa, verifica-se aumento nos teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina e redução na concentração de carboidratos não fibrosos (Tabela 4.1) quando se avalia as silagens que receberam coquetel enzimático em relação ao tratamento controle.

Tabela 4.1 – Teor de matéria seca e composição bromatológica (%/MS) da silagem de milho tratada com enzima fibrolítica exógena por NIRS.

Item ¹	Tratamento				
	Controle	Coquetel 1x	Cellic [®] CTec2 1x	Cellic [®] CTec2 50x	Celluclast [®] 1x
Matéria seca	90,2	90,6	90,4	89,9	89,5
Proteína bruta	9,1	9,3	9,5	9,3	10,0
FDN	40,8	41,5	44,2	43,3	44,7
FDA	25,8	26,8	27,8	26,8	27,0
Lignina	3,5	4,0	4,1	4,5	4,0
CHO's	1,3	1,8	1,0	0,9	1,9
NDT	65	64	63	63	64
N-NH ₃	0,51	0,54	0,57	0,56	0,47
Ácido lático	6,64	7,23	6,93	6,77	6,71
Ácido acético	1,79	0,76	1,41	1,32	1,90

¹FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; CHO's: carboidratos solúveis em água; NDT: nutrientes digestíveis total; N-NH₃: nitrogênio amoniacal. Controle: silagem sem adição de enzimas fibrolíticas; coquetel: consórcio 4 (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT); cellic ctec2 e celluclast: coquetéis comerciais; 1x e 50x: dosagem de enzima fibrolítica.

Os valores considerados ideais para FDN devem ficar entre 45 e 52% da MS. Neste trabalho a FDN variou entre 40,8 do controle a 44,7% do tratamento com Celluclast[®] 1x, sendo que os maiores valores são observados nos tratamentos que receberam os coquetéis comerciais (Tabela 4.1). Valores abaixo de 45% podem estar relacionado a quantidade de grãos presentes. Como os grãos têm pouca fibra, valores baixos de FDN indicam, geralmente, silagens com maior quantidade de grãos, enquanto que valores maiores de FDN indicam menores quantidades de grãos e/ou que a silagem pode ter sido colhida acima do ponto ideal (Valadares Filho *et al.*, 2002).

Segundo Valadares Filho *et al.* (2002) a concentração de FDA na silagem de milho deve estar em torno de 30%, valores acima do citado podem ser considerados altos, podendo prejudicar a digestibilidade da silagem produzida. As percentagens de FDA obtidas no presente ensaio variaram de 25,8 (controle) a 27,8% (Cellic[®] CTec2 1x).

O aumento observado na fração fibrosa e no teor de lignina é apontado por Lara (2013) como decorrente do efeito de diluição, uma vez que essas frações são expressas em termos percentuais.

Neste trabalho os valores de nutrientes digestíveis totais (NDT), que indicam a soma das frações digestíveis do alimento, variaram de 63 a 65% e, estão dentro do esperado para silagens de milho encontrados na literatura. No trabalho de Rodrigues *et al.* (2002) os valores de NDT variaram de 65,07 a 65,14%.

Quando a concentração de carboidratos solúveis em água (CHO's) é adequada que a umidade não seja excessiva, as bactérias produtoras de ácido láctico (homofermentativas) proliferam ao invés das bactérias heterofermentantes e clostrídios, de modo que o ácido láctico se acumula em vez de ácido butírico (Dean *et al.*, 2005). As maiores concentrações de CHO'S foram observadas nos tratamentos Celluclast[®] 1x (1,9% MS) e coquetel 1x (1,8% MS), o que representa aumento de 46 e 38% com relação ao tratamento controle (1,3% MS).

A elevada produção de ácido acético é indício da atuação de enterobactérias, que ocorrem durante os estágios iniciais da fermentação da silagem, competindo com as bactérias ácido-láticas por nutrientes (Coan *et al.*, 2005). O menor índice de ácido acético foi observado na silagem que foi tratada com o coquetel 1x (0,76%). O maior nível de ácido acético foi encontrado no tratamento com Celluclast[®] 1x (1,9%). No trabalho de Li *et al.* (2016) o nível de ácido acético variou entre 1,13 a 2,31% entre os tratamentos.

Segundo Li *et al.* (2016) uma ensilagem de boa qualidade deve apresentar taxas de N-NH₃ inferior a 10% do N total. No trabalho de Domingues *et al.* (2012) a taxa de N-

NH₃ variaram entre 0,14 e 0,21% ao analisarem 23 tratamentos. Neste trabalho dentre os tratamentos com coquetéis enzimáticos a variação foi de 0,47 (Celluclast[®] 1x) a 0,57% (Cellic[®] CTec2 1x) de N-NH₃.

A presença de bactérias ácido-láticas (BAL) é de suma importância para a silagem, pois, são responsáveis pelo processo fermentativo, pois quanto mais rápido for a produção de ácido lático, mais rápida será a queda do pH e menores os riscos de contaminação causada pelo crescimento de micro-organismos deterioradores (Li *et al.*, 2016). No presente estudo a contagem de bactérias ácido-láticas na silagem, feita na diluição de 10⁻⁵, demonstrou que o tratamento Cellic[®] CTec2 1x apresentou maior quantidade de bactérias ácido-láticas e que o tratamento Celluclast[®] 1x apresentou a menor quantidade (figura 4.4).

Variação na contagem de bactérias ácido-láticas tem sido reportada no limite de detecção de 10¹ a 10⁵ UFG g⁻¹ para alfafa, até 10⁶ em gramíneas e 10⁷ em milho e sorgo (Silva *et al.*, 2011; Pahlow *et al.*, 2003).

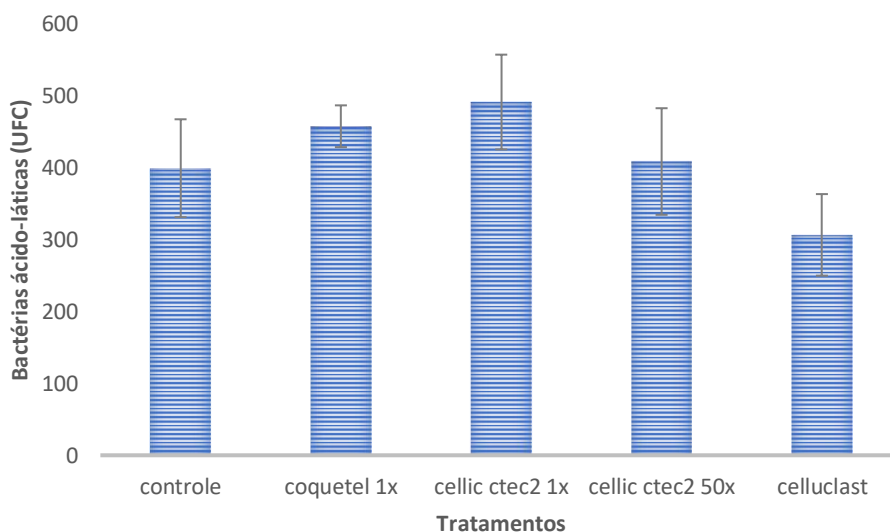


Figura 4.4. Contagem de bactérias ácido láticas na silagem de milho.

Controle: silagem sem adição de enzimas fibrolíticas; coquetel: consórcio 4 (45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT); cellic ctec2 e celluclast: coquetéis comerciais; 1x e 50x: dosagem de enzima fibrolítica.

As BAL podem ser classificadas em homofermentativas e heterofermentativas (Bruno e Carvalho, 2009). As BAL homofermentativas são utilizadas no intuito de melhorar o processo fermentativo da silagem por meio do aumento na concentração de ácido lático, o que diminui o nitrogênio amoniacal e as perdas de MS. Já as BAL

heterofermentativas promovem melhorias principalmente após a abertura do silo, aumentando a estabilidade aeróbica da silagem, pela inibição do crescimento de fungos e leveduras. Assim, muitos dos trabalhos recomendam, quando inoculados BAL, que seja feita a combinação entre os dois grupos (Silva *et al.*, 2011).

Como afirmam Martins, Vieira e Teresinha (2008) a microscopia eletrônica de varredura (MEV) constitui um complemento nos estudos de nutrição animal, pois, permite visualizar a degradação da biomassa durante e após o ensilamento (Muck *et al.*, 2018) ou a degradação do volumoso no rúmex do animal (Grenet e Barry, 1991; José *et al.*, 1999). Segundo Cysneiros *et al.* (2006) a adição de enzimas fibrolíticas degradariam parcialmente os componentes da parede celular, fornecendo às bactérias maior quantidade de substrato fermentável.

No trabalho de Harbers e Thouvenelle (1980) a microscopia eletrônica de varredura permitiu avaliar os efeitos da ensilagem e da degradação ruminal em silagem de folhas e caules de milho e sorgo. Os autores perceberam que as bactérias foram mais ativas na superfície adaxial do que na abaxial de milho e sorgo durante a ensilagem.

Ao se analisar as imagens da microscopia eletrônica de varredura (Figuras 4.5 a 4.10) observa-se que o material *in natura* e o tratamento controle foram os que apresentaram porções mais íntegras. Por sua vez a silagem que recebeu o coquetel comercial Cellic® CTec2 1x apresentou porções mais danificadas.

Moon e Henk (1980) e Martins, Vieira e Teresinha (2008) avaliaram o efeito do tempo ao longo do ensilamento por MEV. Para Moon e Henk (1980) com 4 dias de fermentação foi possível observar bactérias ácido-láticas na superfície e em altas concentrações, próximas aos estômatos e ao longo do interior do mesófilo. Para Martins, Vieira e Teresinha (2008) com 12 h de fermentação foi possível visualizar a colonização da parede celular e ausência de digestão dos tecidos, e não foi verificada alteração entre a adição e não adição de enzimas fibrolíticas na silagem de palha de arroz, entretanto, com 24 horas foi possível verificar maior população bacteriana associada ao tecido e há indícios da remoção da parede primária com digestão da parede secundária.

Para que fosse observada ruptura e digestão da parede celular de palha de cevada pela adição de enzimas fibrolíticas por MEV se fizeram necessárias altas concentrações de enzimas fibrolíticas (McAllister *et al.*, 2001).

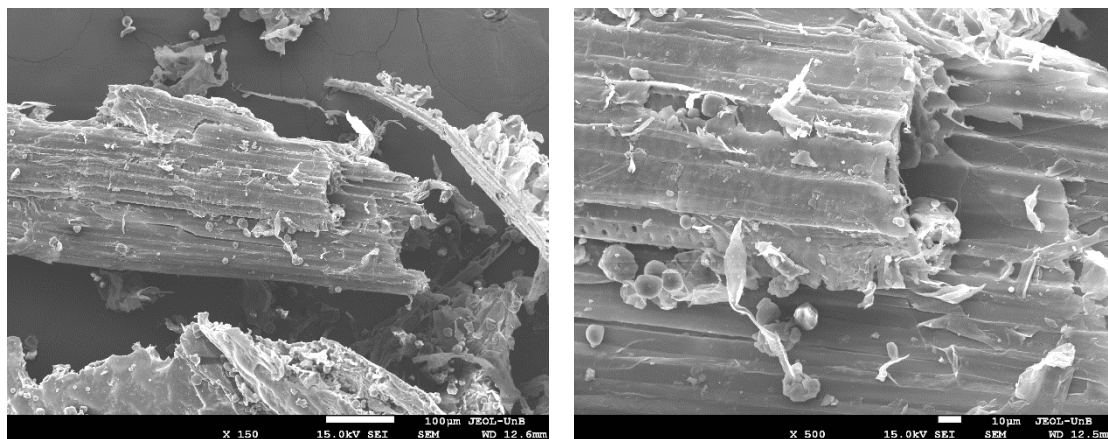


Figura 4.5. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do milho *in natura* triturado e não ensilado.

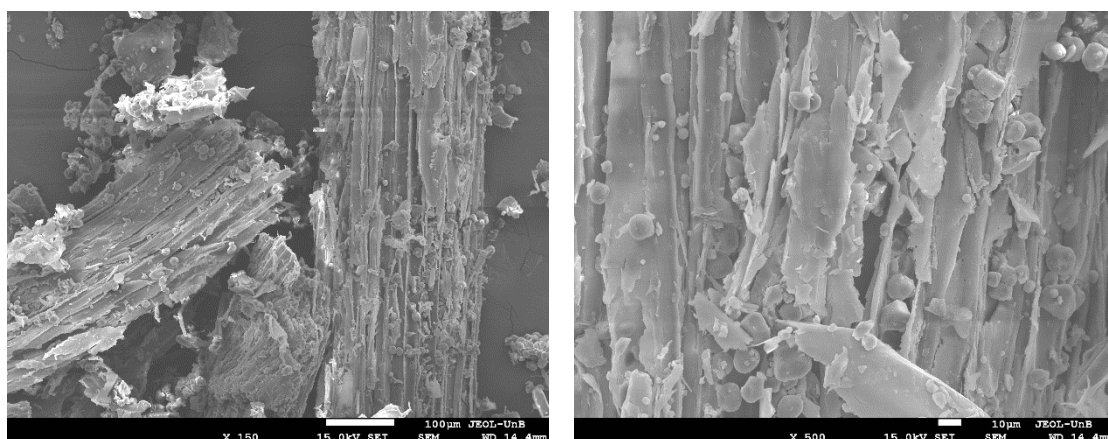


Figura 4.6. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura da silagem de milho do tratamento controle (sem aditivo enzimático) após 120 dias ensilado.

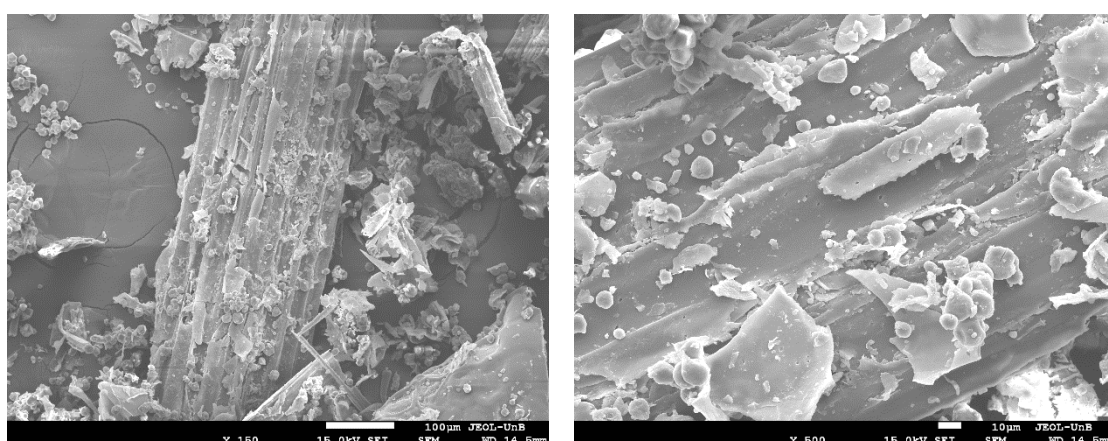


Figura 4.7. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura da silagem de milho tratada com o Coquetel 1x (consórcio 4 - 45% CSTR: 10% PCAT: 45% BCAT) após 120 dias ensilado.

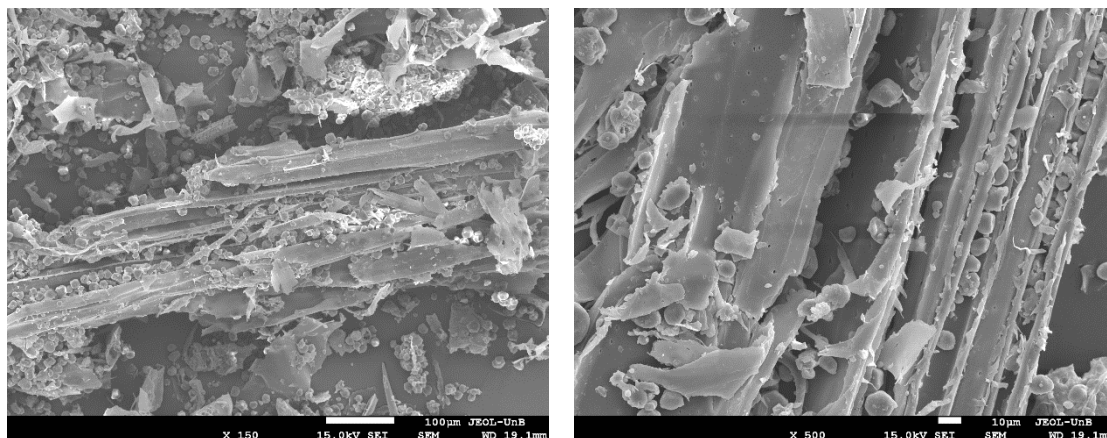


Figura 4.8. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura da silagem de milho tradada com Cellic® CTec2 1x após 120 dias ensilado.

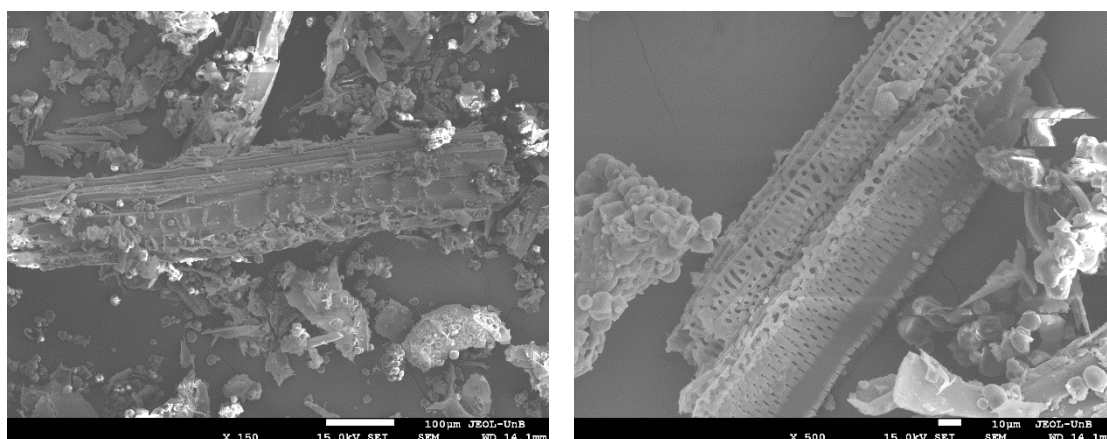


Figura 4.9. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura da silagem de milho tradada com Cellic® CTec2 50x após 120 dias ensilado.

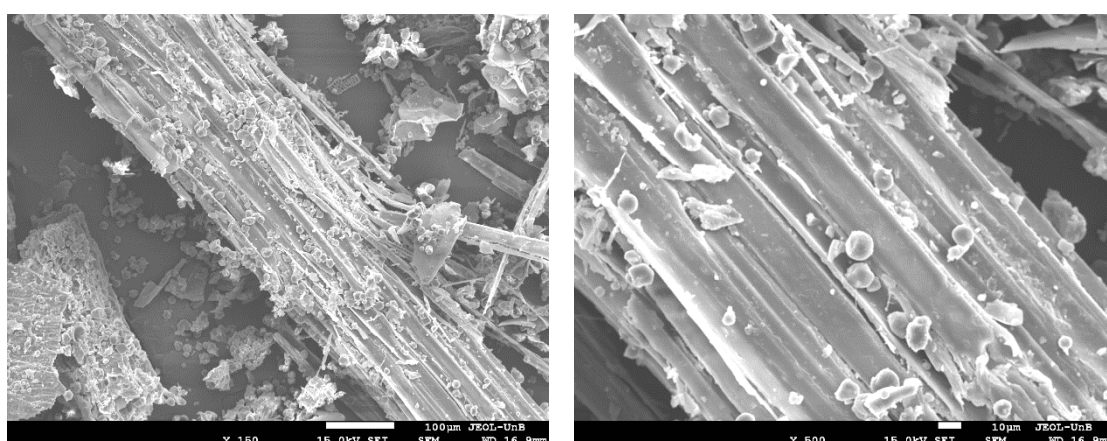


Figura 4.10. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura da silagem de milho tradada com Celluclast® 1x após 120 dias ensilado.

5. CONCLUSÃO

O uso de aditivos enzimáticos na silagem de milho resultou em aumento da fração proteica e fibrosa. A silagem que recebeu o coquetel 1 x apresentou a maior produção de ácido-lático, maior teor de carboidratos solúveis em água e menor concentração de ácido acético com relação ao controle.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANÉSIO, A. H. C.; SANTOS, M. V.; SILVA, L. D.; SILVEIRA, R. R.; BRAZ, T. G. S.; PEREIRA, R. C. Effects of ensiling density on chemical and microbiological characteristics of sorghum silage. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 26, p. 65–69, 2017.

BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATO, D.; MORGAVI, D. P.; YANG, W. Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve animal feed utilisation by ruminants. **Journal Animal of Science**, v. 81., p. 37-47, 2003.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. Microbiota Láctica de Queijos Artesanais. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, 2009.

CHERNEY, J.H.; CHERNEY, D.J.R. Assessing Silage Quality. In: Buxton et al. **Silage Science and Technology**. Madison, Wisconsin, p.141-198, 2003.

COAN, R. M.; VIEIRA, P. F. DE; SILVEIRA, R. N. DA; REIS, R. A.; MALHEIROS, E. B.; PEDREIRA, M. D. S. Inoculante enzimático-bacteriano, composição química e parâmetros fermentativos das silagens dos capins tanzânia e mombaça. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 416–424, 2005.

CYSNEIROS, C. DOS S. S.; FRANCO, G. L. F.; ULHOA, C. J.; DIOGO, J. M. DA S.; RAMOS, A. KARDEC B. Efeito de enzimas fibrolíticas sobre a composição bromatológica de silagens de capins tropicais. **Ciência animal brasileira**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2006.

DEAN, D. B.; ADESOGAN, A. T.; KRUEGER, N.; LITTELL, R. C. Effect of Fibrolytic Enzymes on the Fermentation Characteristics, Aerobic Stability, and Digestibility of Bermudagrass Silage. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 3, p. 994–1003, 2005.

DOMINGUES, A. N.; ABREU, J. G. DE; CABRAL, L. DA S.; GALATI, R. L.; OLIVEIRA, M. A. DE; REIS, R. H. P. DOS. Nutrition value of silage from corn hybrids in the State of Mato Grosso, Brazil. **Acta Scientiarum.**, v. 34, n. 2, p. 117–122, 2012.

FAGUNDES, N. S.; CAIRES, C. M.; FAGUNDES, N. S.; BENEDETTI, E. Enzimas na alimentação de ruminantes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 1, p. 498–503, 2008.

FIGUEIREDO, R. R.; PAULA, A.; SOUZA, S.; MADEIRA, A.; FRANÇA, S.; FERREIRA, I. C.; GUIMARÃES, E. C. Composição química da silagem de milho com

aditivos. **PUBVET**, v. 12, n. 9, p. 1–6, 2018.

FRANÇA, A. F. DE S.; OLIVEIRA, R. DE P.; RODRIGUES, J. A. S.; MIYAGI, E. S.; SILVA, A. G.; PERON, H. J. M. C.; ABREU, J. B. R.; BASTOS, D. DE C. Características Fermentativas Da Silagem De Híbridos De Sorgo Sob Doses De Nitrogênio. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 3, p. 383–391, 2011.

GEBREHANNA, M. M.; GORDON, R. J.; MADANI, A.; VANDERZAAG, A. C.; WOOD, J. D. Silage effluent management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 143, p. 113–122, 2014.

GRENET, E.; BARRY, P. Microbial Degradation of Normal Maize and bm3 Maize in the Rumen Observed by Scanning Electron Microscopy. **Journal of the Science of foof and agriculture**, v. 54, n. 2, p. 199–210, 1991.

HAIGH, P. M. Effluent production from grass silages treated with additives and made in large-scale bunker silos. **Grass and Forage Science**, v. 54, p. 208–218, 1999.

HARBERS, L. H.; THOUVENELLE, M. L. Digestion of corn and sorghum silage observed by scanning eletron microscopy. **Journal of animal science**, v. 50, n. 3, p. 514–526, 1980.

HRISTOV, A.N., McALLISTER, T.A. Effect of inoculants on wholecrop barley silage fermentation and dry matter disappearance in situ. **Journal of Animal Science**, v.80, p.510-516. 2002.

JOBIM, C. C.; NUSSIO, L. G.; REIS, R. A.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 101–119, 2007.

JOSÉ, C.; ALVES, F.; RODELLA, R. A.; CARLOS, F. Anatomia Quantitativa e Degradação *in vitro* de Tecidos em Cultivares de Capim- Elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 2, p. 223–229, 1999.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme research**, v. 2011, p. 280696, 2011.

KUNG Jr., L. Preparation of silage water extracts for chemical analyses. **Standard operating procedure** - 6.ed. Newark: University of Delaware, Ruminant Nutrition Laboratory, 1996.

- LARA, E. C. Produção e avaliação de enzimas fibrolíticas exógenas na silagem de milho. **Dissertação de Mestrado, Unesp**, p. 73, 2013.
- LELIS, A. T. Aplicação de extratos enzimáticos fúngicos na ensilagem do milho. **Dissertação de Mestrado, Unesp**, p. 62, 2012.
- LI, X.; XU, W.; YANG, J.; ZHAO, H.; PAN, C.; DING, X. Effects of applying lactic acid bacteria to the fermentation on a mixture of corn steep liquor and air-dried rice straw. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 229–233, 2016.
- MAGALHÃES, K. A. Tabelas Brasileiras de composição de alimentos, determinação e estimativa do valor energético de alimentos para bovinos. **Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa**, p. 1–263, 2007.
- MARTINS, A. D. S.; VIEIRA, P. D. F.; TERESINHA, T. Degradação ruminal da silagem de milho e da palha de arroz utilizando enzimas fibrolíticas exógenas. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 30, n. 4, p. 435–442, 2008.
- MAZZA RODRIGUES, P. H.; SENATORE, A. L.; TAVARES DE ANDRADE, S. J.; MARTINS RUZANTE, J.; SOUSA LUCCHI, C. DE; RIBEIRO DE LIMA, F. Efeitos da Adição de Inoculantes Microbianos sobre a Composição Bromatológica e Perfil Fermentativo da Silagem de Sorgo Produzida em Silos Experimentais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 6, p. 2373–2379, 2002.
- McALLISTER, T.A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M.R.; PARTRIDGE, G.G. (Ed.). *Enzymes in farm animal nutrition*. Oxon: Cab International, 2001. p. 273-297.
- MOON, N. J.; HENK, W. G. Progression of Epiphytic Microflora in Wheat and Alfalfa Silages as Observed by Scanning Electron Microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 1122–1129, 1980.
- MUCK, R. E.; NADEAU, E. M. G.; McALLISTER, T. A.; SANTOS, M. C.; JR, L. K. Silage review : Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science Vol.**, v. 101, n. 5, p. 3980–4000, 2018.
- NADEAU, E.M.; BUXTO, D.R.; RUSSELL, J.R. et al. Enzyme, bacterial inoculant, and formic acid effects on silage composition of orchardgrass and alfafa. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1487-1502. 2000.

NUSSIO, L.G. Cultura do milho para produção de silagem de alto valor alimentício. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, Piracicaba. Anais. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, p.58-168, 1991.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S.J.W.H.O.; SPOELSTRA, S.F. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; HARRISON, J.H. (Ed.). Silage science and technology. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p.31-93.

PAZIANI, S. F.; CAMPOS, F. P. Silagem de milho: ponto ideal de colheita e suas implicações. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 12, n. 1, jan-jun 2015.

PEREIRA, B. M. Avaliação da qualidade da silagem de híbridos de milho (*zea mays*. L.) cultivados no Distrito Federal. **Trabalho de conclusão de curso da Universidade de Brasília**, p. 20, 2013.

RODRIGO, J.; ROSA, P.; HENRIQUE, J.; RESTLE, J.; LUIZ, L.; BRONDANI, I. L.; CELESTINO, D.; FILHO, A.; FREITAS, A. K. DE. Avaliação do Comportamento Agrônômico da Planta e Valor Nutritivo da Silagem de Diferentes Híbridos de Milho (*Zea mays*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 2, p. 302–312, 2004.

SILVA, T. C. DA; SILVA, M. V. B.; FERREIRA, E. G.; PEREIRA, O. G.; FERREIRA, C. L. DE L. F. Papel da fermentação láctica na produção de silagem. **PUBVET**, v. 5, n. 1, p. 1–17, 2011.

SUCU, E.; KALKAN, H.; CANBOLAT, O.; FILYA, I. Effects of ensiling density on nutritive value of maize and sorghum silages. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 10, p. 596–603, 2016.

VALADARES FILHO, S.C.; ROCHA JUNIOR, V. Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos. Viçosa: UFV, DZO, DPI, p. 297, 2002.

VALERIANO, A. R.; PINTO, J. C.; ÁVILA, CARLA LUIZA DA SILVA EVANGELISTA, A. R.; TAVARES, V. B.; SCHWAN, R. F. Efeito da adição de *Lactobacillus* sp. na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 6, p. 1009–1017, 2009.

VELHO, J. P.; ROBERTO, P.; MÜHLBACH, F.; NÖRNBERG, J. L.; MARIA, I.; VELHO, P. H.; CRISTINA, T.; GENRO, M.; KESSLER, J. D. Composição bromatológica de silagens de milho produzidas com diferentes densidades de compactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, p. 1532–1538, 2007.

YASUOKA J.I.; MEIRELLES, P.R.L.; SILVA, M.G.B.; GRANUZZO, J.T.; SILVA, M.
P. Efeito da inclusão de polpa cítrica na ensilagem de capim-xaraés. **Boletim de
Indústria Animal (Online)**, v. 72, p. 298-303, 2015.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objeto de estudo principal dessa tese foi o desenvolvimento de um consórcio enzimático otimizado para a degradação de biomassa lignocelulósica e de baixo custo ao utilizar micro-organismos selvagens cultivados em fontes de carbono lignocelulósica

No capítulo 1 foi apresentada uma revisão bibliográfica atualizada sobre coquetéis enzimáticos.

No capítulo 2, de 16 extratos brutos obtidos a partir de fungos filamentosos cultivados em diferentes fontes de carbono, 3 extratos brutos apresentaram potencial em produtor enzimas holocelulolíticas com características físico-químicas desejáveis para o desenvolvimento de consórcios enzimáticos. Os extratos brutos de *T. reesei* cultivado em casca de soja, *A. terreus* cultivado em bagaço de cana e o *A. terreus* cultivado em palha de cana, foram combinados com apoio de um planejamento de misturas. Os consórcios (CSTR:PCAT:BCAT); 1 (0,33:0,33:0,33), 4 (0,45:0,1:0,45) e 6 (0,2:0,75:0,05) foram caracterizados e avaliados. A partir desta avaliação o consórcio 4 foi selecionado para as etapas seguintes de suplementação e aplicação.

No capítulo 3, consistiu em otimizar o consórcio enzimático 4 com o emprego de surfactantes, aditivos químicos, enzimas hidrolíticas e acessórias. Obteve maiores resultados de liberação de ART e glicose na hidrólise de bagaço de cana de açúcar quando foi adicionado tween 80 e lacase, apresentado maior liberação de açúcares que o coquetel comercial celluclast. Tanto as enzimas principais quanto os aditivos trabalharam de forma coordenada e sinérgica para obter tal efeito. Nesta etapa a redução de escala e reprodutibilidade do experimento de hidrólise foi validada.

No capítulo 4, o consórcio 4 foi aplicado silagem de milho como um aditivo fibrolítico exógeno. A aplicação de aditivos enzimáticos na silagem representa um ramo em potencial crescimento. As enzimas são vantajosas na conservação de forragens melhorando os padrões de fermentação, e apresenta vantagens principalmente em silagens de gramíneas onde o teor de carboidratos solúveis é limitado.

Este trabalho mostrou o potencial para desenvolver consórcios enzimáticos eficiente. Demonstrou-se então que, o consórcio enzimático pode ser aproveitado no contexto de conversão enzimática em uma biorrefinaria e em processos agropecuários.

PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito da lacase nas atividades enzimáticas do consórcio 4;
- Avaliar o efeito da expansina nas atividades enzimáticas do consórcio 4;
- Aplicar o consórcio 4 LT na hidrólise de diferentes biomassas;
- Utilizar técnicas de pré-tratamento nas biomassas a serem hidrolisadas;
- Aplicar o consórcio 4 LT na silagem de capim;
- Patentear o consórcio 4 LT;
- Identificar as proteínas do consórcio 4 LT a partir da excisão das bandas dos géis e identificá-las por espectrometria de massas (LC-MS/MS);
- Realizar MEV dos substratos em diferentes tempos de hidrólise para visualizar as mudanças que ocorrem na estrutura da biomassa ao longo do tempo de hidrólise enzimática.