



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**

SYD PEREIRA FARIA

**ANÁLISE DE DIFERENTES MISTURAS ENZIMÁTICAS DO FUNGO
Humicola grisea var. *thermoidea* NA HIDRÓLISE DA FRAÇÃO DE
HEMICELULOSE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

ORIENTADORA PROF^a. DR^a. FABRÍCIA PAULA DE FARIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Goiânia, agosto de 2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☒ Dissertação ☐ Tese

2. Nome completo do autor

Syd Pereira Faria

3. Título do trabalho

Análise de diferentes misturas enzimáticas do fungo *Humicola grisea var. thermoidea* na hidrólise da fração de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar.

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
 - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **SYD PEREIRA FARIA, Discente**, em 29/04/2021, às 10:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Fabricia Paula De Faria, Professor do Magistério Superior**, em

29/04/2021

SEI/UFG - 2034059 - Termo de Ciência e de Autorização (TECA)



29/04/2021, às 18:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2034059** e o código CRC **0970FD4F**.

Referência: Processo nº 23070.021544/2021-10

SEI nº 2034059



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**

SYD PEREIRA FARIA

**ANÁLISE DE DIFERENTES MISTURAS ENZIMÁTICAS DO FUNGO
Humicola grisea var. *thermoidea* NA HIDRÓLISE DA FRAÇÃO DE
HEMICELULOSE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

ORIENTADORA PROF^a. DR^a. FABRÍCIA PAULA DE FARIA

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular da Universidade
Federal de Goiás como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Biologia Celular e Molecular.

Goiânia, agosto de 2011

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Pereira Faria, Syd

ANÁLISE DE DIFERENTES MISTURAS ENZIMÁTICAS DO
FUNGO *Humicola grisea* var. *thermoidea* NA HIDRÓLISE DA FRAÇÃO
DE HEMICELULOSE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR [manuscrito]
/ Syd Pereira Faria. - 2011.

CIX, 109 f.: il.

Orientador: Prof. FABRÍCIA PAULA DE FARIA.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2011.

Bibliografia.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas,
lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Humicola grisea*. 2. Hidrólise enzimática. 3. Bagaço de cana-de-
açúcar. 4. Hemicelulases. 5. Celulases. I. PAULA DE FARIA,
FABRÍCIA, orient. II. Título.

CDU 57

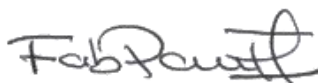


INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO
Nº 378

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO – Aos trinta e um dias do mês de agosto do ano de 2011 (31/08/2011), às 14h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profª. Dra. Fabrícia Paula de Faria ; Prof. Dr. Francis Julio Fagundes Lopes; Prof. Dr. Cirano José Ulhoa e, para sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no Mini-Auditório do Instituto de Ciências Biológicas IV, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“ANÁLISE DE DIFERENTES MISTURAS ENZIMÁTICAS DO FUNGO *Humicola grisea* var. *thermoidea* NA HIDRÓLISE DA FRAÇÃO DE HEMICELULOSE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.”** em nível de mestrado, de autoria de SYD PEREIRA FARIA, discente do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente da banca examinadora Profª. Dra. Fabrícia Paula de Faria que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida ao autor da dissertação que, em 40 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 572/2002 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia e procedidas às correções recomendadas, a Dissertação foi aprovada por unanimidade, considerando-se integralmente cumprido o requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM BIOLOGIA, na área de concentração em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretária do PPGB da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções. A

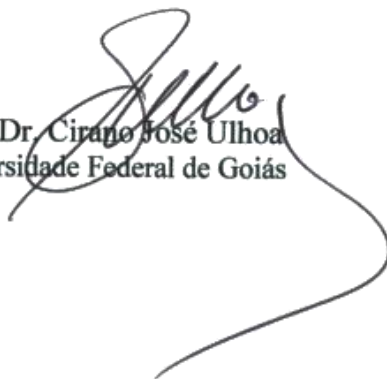
banca examinadora recomenda a publicação de artigo(s) científico (s) oriundo(s) dessa dissertação em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de procedidas as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17:00 horas a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado e para constar eu, Gleizilene Braz Pereira dos Santos, secretária do PPGB lavrei a presente Ata, que após lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.



Profª. Dra. Fabrícia Paula de Faria
Presidente da Banca
Universidade Federal de Goiás



Prof. Dr. Francis Julio Fagundes Lopes
Universidade Federal de Goiás



Prof. Dr. Cirano José Ulhoa
Universidade Federal de Goiás

Goiânia – 2011

Trabalho realizado nos Laboratórios de Biotecnologia de Fungos e de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Orientadora: Profa. Dra. Fabrícia Paula de Faria

Banca Examinadora:

Membros titulares:

Profa. Dra. Fabrícia Paula de Faria.

Prof. Dr. Francis Julio F. Lopes

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Suplentes:

Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho

Profa. Dra. Rosália Santos Amorim Jesuino

Que nunca me falte serenidade, para distinguir o que realmente é importante nessa pequena passagem chamada vida, e com isso, que meus atos reflitam positivamente para produção de um mundo melhor.

Dedico este trabalho a meu amado pai Jarso Lopes de Faria, a minha amada mãe Maria Pereira Faria, meus queridos irmãos Wankley, Wankleyde e Klewer, meus sobrinhos, que são meus filhos, minha querida irmãzinha Lorena, meus grandes amigos Alexandre, Walker, Jordivino, Gilberto, Tomil e Woshington, e a amada Carmen Andréa por sempre estarem ao meu lado apoiando com tanto amor e dedicação. A minhas queridas professoras Fabrícia e Rosália por todo apoio e carinho. Certamente esse mundo fica vazio sem a presença de vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos por sempre me apoiarem durante minha vida, em minhas escolhas permitindo que um dia eu chegasse neste ponto de minha vida.

Ao meus irmão, em especial a meu irmão Wankley e minha cunhada Maria Risoneide, e meus sobrinhos, que durante esses últimos anos me ofereceu suporte em todos os aspectos, obrigado por todo o carinho e compreensão nesse período.

Aos meus amigos, em especial, Alexandre, Walker e Woshington, que sempre estão presentes em todas as situações e com as mãos sempre estendidas para ajudar, como sempre digo, obrigado por me suportar.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fabrícia Paula de Faria, por ter me recebido como aluno e por todo apoio que sempre ofereceu nesses últimos anos, obrigado por ser, além de minha orientadora, ao qual tenho muito orgulho, ser também uma grande amiga, obrigado por toda compreensão que teve durante o passar destes anos, e que muitos ainda venham.

À Profa. Dra. Rosália Santos Amorim Jesuíno, pela imensidão de seu coração, por todas as horas que dedicou a estar me ouvindo, dedicando a correções de meus trabalhos, pelo carinho, me sinto muito honrado em ter estado junto a senhora.

Ao Wagner Rodrigues de Carvalho, que mais que um co-orientador ou colega de laboratório, se tornou um amigo, muitíssimo obrigado por toda ajuda, certamente sem você minhas dificuldades seriam maiores, obrigado por toda a ajuda meu amigo.

A todos do Laboratório de Biotecnologia de Fungos: Lorena, Guilhermar, Thiago, Ilítia, Byancarine, Dâmaris, Douglas, Isadora, Wesley, Matheus, Andrea, Thiago, Élvia e Ludmylla, obrigado pela amizade e todo o auxílio que me ofereceram, mas principalmente, obrigado pela amizade de todos vocês.

A Profa. Dra. Rita de Cássia Garcia Simão (Universidade Estadual do Oeste do Paraná e sua aluna Juliana Moço Corrêa, por ceder gentilmente a B-xilosidase para realização de meus experimentos, sendo uma peça fundamental em meus resultados.

Ao Prof. Dr. Francis Julio F. Lopes pelo auxílio durante realização de meus experimentos, por sempre estar a disposição quando necessitei.

Aos professores Dr. Cirano José Ulhoa, do laboratório de Enzimologia, e aos colegas Roberto, Valdirene, Saulo, Marcelo, Andrei, Fabyano, Rogério, Amanda Araújo, Amanda Rafaela, Vanessa, Patrícia e Cristina por sempre estarem de portas abertas para minhas necessidades, oferecendo suporte físico e teórico para meus experimentos.

Ao Prof. Dr. Elson Alves Costa e colegas Marcos Vinícios, Roberta e Pablinny do Laboratório de Farmacologia em Produtos Naturais (LFPN) ICB 2 (UFG), por todo auxílio, amizade e compreensão, tenho muito orgulho de ter conhecido vocês.

Ao Prof. Dr. Artur Mendes Bataus, e colegas Marcela Suriani, Lilian Carla, Ana Flávia, Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética – LBEG, ICB 2, por todo apoio técnico-científico, em especial a Lilian que sempre foi uma grande amiga, obrigado por tudo, ter me indicado durante minha chegada a UFG, e por sempre me receber com um grande sorriso e muito carinho.

Ao Professor Dr. Reginaldo Nassar Ferreira pelo suporte durante esses anos.

À Profa Dra. Kênia Silva Cunha e amigos Igor, Lays e Nilza do Laboratório de Genética Toxicológica, ICB 2, obrigado pela amizade e simpatia com que sempre me recebem, em especial a professora Kênia, por todo carinho e carisma que sempre me oferece e que em minha chegada me aceitou como seu aluno, me oferecendo uma carta de aceite, sem a senhora certamente minha entrada neste programa provavelmente seria adiada.

À Profa Dra. Silvana Petrofeza da Silva e amigos Lucas, Patrícia, Kamila, Marília e Elvira, pela boa vizinhança, sempre presente disponibilizando suporte técnico e me recebendo de portas abertas com muito carinho, pessoas como vocês tornaram mais felizes os meus dias.

Aos funcionários da secretaria Tizuko, Fernando Cesar, Maria Aparecida, Rafael Cortes, e Glazilene secretária dos Programas de Pós-Graduação em Biologia

Molecular e Celular/ Ecologia do ICB, UFG, por serem tão ágeis e amigos, obrig por tudo.

Às funcionárias da limpeza do ICB 2: Divina, Lurdes e Anésia, obrigado pela amizade e pelo excelente trabalho prestado na limpeza do nosso laboratório, permitindo que muitos de meus experimentos se realizassem com maior agilidade.

A Gisele, ao qual tenho enorme carinho, respeito e admiração, obrigado por me auxiliar a ser um pesquisador, servindo de inspiração como profissional e pessoa, pela paciência que sempre teve, principalmente no meu início no laboratório, por ter me ensinado o que é pesquisa, certamente, todas as palavras ficariam pequenas para te agradecer tudo que fez por mim, tenho enorme orgulho em te ter como amiga.

A amada Carmen Andréa por toda compreensão que sempre teve, por todo o apoio durante esses anos, obrigado por existir e transformar meus dias em dias mais agradáveis e suportáveis, obrigado por me inspirar como pessoa e ser fonte de tanta admiração em minha vida, algumas pessoas funcionam como elos de uma corrente em minha vida, e certamente você é uma delas. Obrigado por todo amor, que fez possível grande parte de minhas realizações e alegrias.

Enfim, a todos citados, e os que possivelmente acabei esquecendo, mas que fizeram parte dessa conquista. Um grande obrigado a todos, que por sinal, se transformaram em amigos.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iii
Lista de Abreviaturas	iv
Resumo	vi
Abstract	vi

INTRODUÇÃO

1

1. Biomassa	1
1.1. Resíduos Lignocelulósicos	2
1.2. Bagaço de cana-de-açúcar	3
2. Hemicelulose	3
2.1. Tipos de Hemicelulose	4
2.2. Xilana	6
3. Celulose	15
3.1. Propriedades Bioquímicas	17
3.2. Sistema Celulolítico	17
3.2.1. Endocelulases	18
4. FUNGOS FILAMENTOSOS	23
4.1. <i>Humicola grisea</i> var. <i>Thermoidea</i>	24
4.2. Produção de celulasas e xilanases	29
5. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE XILANASES	32
6. Hidrolise enzimática de substratos lignocelulósicos.....	35
6.1. Pre-tratamento	35
6.2. hidrólise enzimática.	36
2. OBJETIVO	39
2.1. Objetivos específicos:	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. MICRORGANISMOS UTILIZADOS	39
3.2. SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS	39
3.3. SOLUÇÕES	40
3.3.1. Soluções para a Determinação da Atividade Enzimática	40

3.3.2. Soluções para Eletroforese de Proteínas em Gel Desnaturante de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	42
3.3.3. Revelação das Proteínas por Coloração com Azul de Coomassie	43
3.3.4. Soluções para Preparo dos Meios de Cultura	43
3.3.5. Soluções para a Quantificação de Proteínas	44
3.3.6. Soluções para Realização dos Pré-tratamentos	45
3.4. Meios de Cultura.....	46
3.4.1. Meio Mínimo – MM (Pontecorvo <i>et al.</i> , 1953)	46
3.4.2. Meio Ágar Aveia – AA	46
3.4.3. Meio YPD	46
3.4.4. Meios BMGY-U/BMMY-U	47
3.4.5. Meio de Seleção – MGM	47
3.5. Substratos para Determinação das Atividades Enzimáticas.....	47
3.6. Marcador de Massa Molecular para Proteínas.....	48
3.7. β -xilosidase (XYNB2)	48
4. METODOLOGIA.....	48
4.1. Manutenção e Cultivo dos Fungos <i>H. grisea</i> e <i>P. pastoris</i>	48
4.2. Preparo dos Substratos Lignocelulósicos	49
4.3. Produção de Celulases e Xilanases pelo Fungo <i>H. grisea</i> Cultivado em FT e BCA	49
4.4. Produção das Enzimas Recombinantes pelos Transformantes de <i>P. pastoris</i>	50
4.5. Determinação das Atividades Xilanolítica e Celulolítica pelo Método dos Açúcares Redutores (MILLER, 1959).....	50
4.5.1. Dosagem da Atividade Xilanolítica	51
4.5.2. Dosagem da Atividade Celulolítica	51
4.5.3. Dosagem Protéica	53
4.5.4. Dosagem de Açúcar Redutor Total e Glicose	53
4.6. Eletroforese de Proteínas em Gel Desnaturante de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	53
4.6.1. Preparo das Amostras	54
4.6.2. Corrida Eletroforética	54
4.6.3. Coloração com <i>Coomassie Blue</i>	55

4.7. Pré-tratamento do BCA	55
4.7.1. Tratamento 1 (PENG <i>et al.</i> , 2009)	55
4.7.2. Tratamento 2 (Brienzo <i>et al.</i> , 2009)	56
4.7.3. Tratamento 3 (Saha <i>et al.</i> , 2009)	56
4.7.3. Tratamento 4 (Gorshova <i>et al.</i> , 1996)	57
4.8. Hidrólise Ácida do BCA para Análise do Teor de Celulose e Hemicelulose	57
4.9. Hidrólise Enzimática do BCA Pré-tratado.....	58
4.9.1. Reações de Hidrólise para Escolha da Mistura do sHg	59
4.9.2. Efeito da Suplementação do sHg com Diferentes Concentrações das Enzimas Recombinantes	59
4.9.3. Cinética Enzimática	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1. Produção de Xilanases e Celulases pelo Fungo <i>H. grisea</i>	64
5.2. Produção das Enzimas Recombinantes HXYN2r e CBH1.2r pela Levedura <i>P. pastoris</i>	65
5.3. Análise do Teor de Celulose e Hemicelulose das Amostras por Hidrólise Ácida67	
5.4. Experimentos de Pré-tratamento do BCA	68
5.4. Hidrólise Enzimática do BCA Pré-tratado.....	70
5.4.1. Escolha do Substrato para Hidrólise Enzimática	70
5.4.2. Reações de Hidrólise do BCAs para Escolha da Formulação do sHg	70
5.4.3. Efeito da Suplementação do sHg com as Enzimas Recombinantes	71
5.5. Cinética da Hidrólise Enzimática.....	75
6. CONCLUSÕES.....	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema da fibra de celulose: estrutura da fibrila e microfibrila destacando as regiões cristalina e amorfa. Fonte: COWLING (1963) (com modificação). 17
- Figura 2. Estrutura da celulose mostrando: a extremidade redutora e não redutora, a ligação das unidades de glicose por ligações glicosídicas β -1,4 e a celobiose formada pela união de duas unidades de glicose (adaptado de TIMÁR-BALÁZSKI & EASTOP, 1998). 17
- Figura 3. Representação esquemática da hidrólise das regiões cristalinas e amorfas da celulose..... 20
- Figura 4. Estrutura dos domínios das celobiohidrolases (domínio catalítico e CBD), unidos por uma região denominada de dobradiça ou hinge. As CBH I e II atuam respectivamente nas extremidades redutora e não redutora das fibras de celulose. Fonte: Harris, 1999. 21
- Figura 5. Perfil proteico dos sobrenadantes de cultura do fungo *H. grisea* cultivado em BCA e FT. MM: marcador de massa molecular: AMW Calibration Kit For SDS Eletroforesis (GE Healthcare);, 1: sHg/FPase-CMCase, 2: sHg/xilanase, 3. sHg/avicelase. 65
- Figura 6. Perfil proteico dos sobrenadantes de cultura dos transformantes (a) GS115/Hxyn2 e (b) GS115/cbh1.2 de *P. pastoris* cultivados sob indução com metanol. MM: marcador de massa molecular: AMW Calibration Kit For SDS Eletroforesis (GE Healthcare); 1. Sobrenadante de cultura contendo a enzima HXYN2r; 2. Sobrenadante de cultura contendo a enzima CBH1.2r. 66
- Figura 7. Gráfico de Pareto do efeito da suplementação do sHg+ com enzimas recombinantes. Valores do lado direito da linha tracejada são estatisticamente significativos (95 % de confiança). A influência da interação entre os parâmetros sobre o rendimento de hidrólise da xilana do BCAs é representada por BC, AB, AC..... 74
- Figura 8. Gráfico de superfície de resposta e curvas de contorno. 74

Figura 9. Cinética da hidrólise enzimática do BCA e o BCAsa.....	75
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Algumas características dos principais polissacarídeos da parede celular de plantas e as enzimas envolvidas na sua degradação (LIMA et al., 2001).	14
Tabela 2. Enzimas do Sistema Celulolítico do fungo <i>H. grisea</i>	27
Tabela 3. Enzimas do Sistema Xilanolítico do fungo <i>H. grisea</i>	29
Tabela 4. Preparo dos géis para SDS-PAGE.....	54
Tabela 5. Condições da hidrólise ácida: variação na concentração de H ₂ SO ₄ e tempo.	58
Tabela 6. Formulações enzimáticas utilizadas na hidrólise do BCA pré-tratado.....	61
Tabela 7. Concentrações das enzimas recombinantes utilizadas na hidrólise do BCA pré-tratado.	61
Tabela 8. Delineamento Composto Central Rotacional do experimento de hidrólise do BCA pré-tratado.	62
Tabela 9. Produção de enzimas pelo <i>H. grisea</i>	64
Tabela 10. Produção de enzimas pelos transformantes GS/Hxyn2 e GS115/cbh1.2 de <i>P. pastoris</i>	67
Tabela 11. Condições da hidrólise ácida da xilana <i>oat spelt</i>	68
Tabela 12. Análise do rendimento de recuperação de xilana nos experimentos de pré-tratamento.	69
Tabela 13. Reações de hidrólise do BCA com diferentes misturas de sHg.	71
Tabela 14. Experimentos do planejamento fatorial variando concentrações das enzimas recombinantes nas reações de hidrólise enzimática do BCASE.	73

LISTA DE ABREVIATURAS

Avicel - Celulose microcristalina

Avicelase - Atividade enzimática contra avicel

ART – Açúcar redutor total

AX – Arabinoxilana

BCA - Bagaço de cana-de-açúcar

BCAse - Bagaço de cana-de-açúcar pretratado com Steam Explosion

BSA - Soroalbumina bovina

CBH - Celobiohidrolase

CMC - Carboximetilcelulose

CMCase - Atividade enzimática contra CMC

Da - Dalton

DNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

FS – Fração sólida

FL – Fração Líquida

FS H – Fração sólida após a hidrólise

FL – Fração Líquida após a hidrólise

FC - Fonte de carbono

FN - Fonte de nitrogênio

FPase - Atividade enzimática contra papel de filtro

FPU - Unidades de papel de filtro

FT- Farelo de trigo

g - Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional

Kb – kilobase

L- Litro

kDa – Kilodalton

M - Molar

MES - Ácido N-morfolino etanolsulfônico

MM - Meio mínimo

min - Minutos

mM - Milimolar

p/v - Peso por volume

PA - Palha de arroz

pb - Pares de base

pH - Potencial de hidrogênio

pI - Ponto isoelétrico

q.s.p. - Quantidade suficiente para

rpm - Rotações por minuto

SDS - Sódio dodecil sulfato

SDS- PAGE - Gel desnaturante de poliacrilamida

SM - Sabugo de milho

TAX - Teor aproximado de xilana

TCA - Ácido Tricloroacético

TEMED - N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina

Tm - Temperatura de desnaturação

Tris - Tris-(hidroximetil)-aminometano

U - Unidade enzimática (quantidade de enzima capaz de formar 1 μ mol de produto por minuto nas condições do experimento)

V - Volts

v/v - Volume por volume

XG - Xiloglucana

XYL - Xilanase (endoxilanase)

YNB - Yeast Nitrogen Base

°C – Graus Celsius

μ g - Micrograma

μ l – Microlitro

RESUMO

A biomassa vegetal é constituída principalmente de celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é o polímero mais abundante e a xilana o principal componente hemicelulósico. A hidrólise enzimática é um importante passo para a bioconversão da fração celulósica e hemicelulósica de resíduos lignocelulósicos. Contudo, para a conversão da hemicelulose, o substrato deve passar por uma etapa de pré-tratamento que permite o desfibramento em nível microscópico da biomassa, separando a mesma em seus componentes principais (celulose, hemicelulose e lignina) ou afrouxando as fibras de seus componentes, facilitando a acessibilidade das enzimas a cadeia de hemicelulose. A conversão da celulose e da xilana à glicose e xilose pode ser realizada por um conjunto de enzimas produzidas por fungos e bactérias. O fungo termofílico *Humicola grisea* var *thermoidea* produz um eficiente complexo de enzimas celulolíticas (endoglicanases, celobiohidrolases e β -glicosidases) e xilanolíticas (endoxilanases e β -xilosidase) com alta termoestabilidade quando cultivado em diferentes substratos lignocelulósicos. O objetivo desse trabalho foi analisar a eficiência das enzimas produzidas pelo *H. grisea* na hidrólise da fração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar (BCA). O BCA utilizado nos ensaios de hidrólise foi submetido a pré-tratamentos alcalinos (Tratamento I, II e III) e explosão a vapor. O BCA pré-tratado foi, posteriormente hidrolisado com diferentes misturas enzimáticas utilizando sobrenadante de cultura do fungo *H. grisea* suplementado com as enzimas recombinantes endoxilanase (HXYN2r), celobiohidrolase (CBH1.2r) e β -xilosidase (XYNB2r). Os resultados demonstraram que o pré-tratamento mais adequado foi a explosão a vapor onde se obteve um rendimento de xilana de aproximadamente 78 %. A melhor formulação enzimática foi a mistura do sobrenadante de cultura do *H. grisea* (sHg) cultivado em farelo de trigo (FT) e BCA suplementado com HXYN2r (950 U), CBH1.2r (950 U) e XYNB2r (1,17 U).

Palavras-chave: *Humicola grisea*, Hidrólise enzimática, Bagaço de cana-de-açúcar, Hemicelulases, Cellulases.

ABSTRACT

The biomass consists mainly of cellulose, hemicellulose and lignin. Cellulose is the most abundant polymer xylan and the main component of hemicellulose. Enzymatic hydrolysis is an important step in the bioconversion of cellulose and hemicellulose fraction of lignocellulosic residues. However, for the conversion of the hemicellulose, the substrate must undergo a pretreatment step which allows the refining of biomass at the microscopic level, separating the same into its main components (cellulose, hemicellulose and lignin) or loosening the fibers of its components, facilitating the accessibility of enzymes to hemicellulose chain. The conversion of cellulose and xylan to glucose and xylose may be performed by a group of enzymes produced by bacteria and fungi. The thermophilic fungus *Humicola grisea* var *thermoidea* produces an efficient complex of cellulolytic enzymes (endoglucanases, cellobiohydrolases and β -glucosidase) and xylanolitics (endoxylanases and β -xylosidase) with high thermal stability when cultivated in different lignocellulosic substrates. The aim of this study was to analyze the efficiency of enzymes produced by *H.grisea* in the hydrolysis of the hemicellulose fraction of sugarcane bagasse (BCA). BCA assays used in the hydrolysis was subjected to alkaline pretreatment (Treatment I, II and III) and steam explosion. BCA pretreated was subsequently hydrolyzed with different enzyme mixtures using culture supernatant of the fungus *H. grisea* supplemented with recombinant enzymes endoxylanase (HXYN2r), cellobiohydrolase (CBH1.2r) and β -xylosidase (XYNB2r). The results showed that the pre-treatment was most suitable to steam explosion which revealed a yield of about 78% xylan. The best enzyme formulation was a mixture of the supernatant of culture of *H. grisea* (SHG) grown in wheat bran (WB) and BCA supplemented with HXYN2r (950 U), CBH1.2r (950 U) and XYNB2r (1.17 U).

Keywords: *Humicola grisea*, Enzymatic hydrolysis, Sugarcane bagasse, Hemicellulases, Cellulases.

INTRODUÇÃO

1. Biomassa

Biomassa é o nome dado a qualquer matéria orgânica, podendo ser de origem animal, vegetal, industrial e florestal. Grande parte é sintetizada no processo de fotossíntese, na conversão de dióxido de carbono atmosférico e água em açúcares, estes açúcares são comumente usados para síntese de matérias mais complexas, aos quais chamamos de biomassa vegetal. Contudo, no processo de produção de energia, considera-se biomassa todo material orgânico renovável que pode ser usado para produzir energia (MCKENDRY, 2001).

A crescente disponibilidade de biomassa, combinada com o crescente desenvolvimento tecnológico, permitindo sua utilização com baixos níveis de emissões de poluentes, a torna cada vez mais atraente para utilização no processo de produção de biocombustíveis. Biomassa pode ser queimada sem emitir grandes quantidades de óxidos de Nítricos (NO_x) e devido ao seu baixo teor de enxofre, as emissões de dióxido de enxofre (SO_2) também são baixas, especialmente em comparação com as emissões provindas da combustão do carvão. Além disso, sua utilização iria mobilizar recursos anteriormente incômodos ou prejudiciais ao ambiente: como resíduos agrícolas e da indústria madeireira (QUAAK et al. 1999).

Contudo, segundo a R. W. Beck (2003) há dois principais fatores a serem considerados na avaliação de combustíveis de biomassa:

- Fornecimento de combustível, incluindo as quantidades totais disponíveis, a estabilidade do fornecimento ou da geração do combustível e a competitividade nos mercados de combustível.
- Custo de recolhimento da biomassa, envolvendo o processamento e transporte.

Dentre os constituintes da biomassa os materiais Lignocelulósicos são os principais componentes, incluindo cerca de metade do material vegetal produzido pela fotossíntese (também chamado fotomassa) e representa a mais abundante fonte de recursos biológicos renováveis do solo. Estes são constituídos por três tipos de

polímeros, celulose, hemicelulose e lignina intimamente ligados por ligações químicas, forças não-covalente e por ligações covalentes cruzadas (PÉREZ et al., 2002).

1.1. Resíduos Lignocelulósicos

Os resíduos lignocelulósicos são formados por celulose (40-50%), hemicelulose (15-30%) e lignina (10-30%) (DEKKER, 1985), e uma pequena parte de minerais em uma estrutura complexa, o que dificulta sua degradação (GIRIO et al., 2010).

De acordo com a constituição do conteúdo lignocelulósico das plantas elas podem ser divididas em três grupos de acordo com sua taxonomia: softwoods (gimnospermas), hardwood (angiospermas) e plantas de ciclo anual (angiospermas herbáceas) (FAN, 1982).

Devido a crescente industrialização e demanda de alimentos, grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos têm sido geradas, constituídos principalmente de carboidratos estruturais, entre 2007 e 2008 cerca de 509 milhões de toneladas de trigo, 431 milhões de toneladas de arroz e 120 milhões de toneladas de algodão foram produzidas (USDA, 2009), com uma produção anual estimada de 1×10^{10} MT em todo o mundo (Sánchez e Cardona, 2008). Frente a essa grande quantidade de resíduos, e sabendo-se que a celulose e a hemicelulose, que representam cerca de dois terços da constituição destes resíduos, são os substratos para produção de etanol de segunda geração (GIRIO et al. 2010) estes se tornam atrativos economicamente.

Contudo a bioconversão destas diferentes matérias-primas lignocelulósicas, como resíduos florestais e agrícolas, ou resíduos lignocelulósicos dedicados à produção de etanol, oferece inúmeros benefícios, mas seu desenvolvimento ainda é dificultado devido a obstáculos econômicos e técnicos (Sánchez e Cardona, 2008). Neste contexto, alguns dos fatores mais importantes para reduzir o custo de produção de etanol são: utilização eficiente da matéria-prima para obtenção de um alto rendimento do etanol, alta produtividade e também a integração de processos, a fim de reduzir a demanda de energia (GALBE, ZACCHI, 2007; TOMÁS-PEJÓ et al., 2008).

A conversão microbiana da fração hemicelulose, tanto na forma monomérica como na forma oligomérica, é essencial para aumentar a produção de bioetanol a partir dos resíduos lignocelulosicos. Ao contrário da celulose, as hemiceluloses não são quimicamente homogêneas e diferentes tecnologias de hidrólise e vários pré-tratamentos biológicos e não biológicos estão disponíveis tanto para fracionamento quanto para solubilização da hemicelulose destes resíduos (GIRIO et al., 2010).

1.2. Bagaço de cana-de-açúcar

Nos últimos anos, houve uma tendência crescente para uma utilização eficiente de resíduos agroindustriais, inclusive o bagaço de cana-de-açúcar. Diversos produtos têm sido gerados com utilização do BCA como matéria-prima. Estes incluem geração de eletricidade, produção de polpa de papel, e produtos baseados em fermentação (PANDEY et al., 2000), como o bioetanol.

2. Hemicelulose

A hemicelulose, a celulose e a lignina são os principais constituintes poliméricos da parede celular das plantas (KULKARNI et al., 1999). A hemicelulose encontra-se em associação com a celulose na parede das células vegetais (TIMELL, 1967). É formada por heteropolissacarídeos contendo diferentes resíduos de carboidratos (D-xilose, D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose, L-ramnose, ácido D-galacturônico e ácido D-glucurônico) (JANES, 1969), sendo normalmente formada por dois a seis açúcares diferentes unidos na maioria por ligações do tipo β -1,4. As hemiceluloses são classificadas, de acordo com a identidade dos principais açúcares presentes, como glucanas, xilanas, mananas, galactanas e galacturanas (THOMPSON, 1983; BASTAWDE et al., 1992; COLLINS et al., 2005).

2.1. Tipos de Hemicelulose

A estrutura e composição de xilanas diferem dependendo da fonte de biomassa podendo observar maiores diferenças nas xilanas de gimnospermas, angiospermas e cereais (GIRIO, 2010). Porém, pode se observar diferenças nos tipos de hemiceluloses de acordo com as zonas climáticas, em madeiras de zonas temperadas observa a presença de uma maior quantidade de xilana e menos de glucomannanas e lignina do que madeiras de clima tropical (TIMELL, 1964).

2.1.1. Glucuroxilanas (GX)

São quantitativamente os principais polissacarídeos encontrados na estrutura de hemicelulose de espermatófitas, sendo mais abundante em dicotiledôneas podendo ser encontradas em menor quantidade em gramíneas (DE VRIES e VISSER, 2001). Podem conter em sua estrutura pequenas quantidades de glucuromananas (GM) apresentando uma cadeia principal de unidades de β -D-xilopiranosil unidas por ligações do tipo glicosídica β -(1,4). Algumas unidades de xilose são acetiladas no carbono 2 e 3, uma a cada dez moléculas apresentam um grupamento de ácido glucurônico unido por ligações α -(1,2) (ALÉN, 2000). As cadeias laterais de ácido glucurônico e galacturônico são mais resistentes a tratamentos ácidos e alcalinos respectivamente (PEREIRA et al., 2003).

2.1.2. Galactoglucomannanas (GGMs)

São quantitativamente os maiores constituintes da parede secundária das gimnospermas apresentando uma cadeia principal de unidades β -D-glucopiranosil e β -D-manopiranosil, unidos por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4) com parcial acetilação no carbono 2 e 3 (D'OVÍDIO et al., 2004; PEREIRA et al., 2003). Os grupamentos acetil representam cerca de 6% no conteúdo das GGMs (ALÉN, 2000).

Algumas GGMs são solúveis em água, contudo as que apresentam maior teor de galactose são insolúveis (TIMELL, 1967). GGMs podem ser removidas com tratamentos alcalinos, que provocam a desacetilação da estrutura e também promovem a despolimerização da molécula (WILLFÖR et al., 2003).

2.1.3. Arabinoglucuronoxylans (AGXs)

Principais constituintes de cereais e resíduos agrícolas, representam cerca de 5 a 10% em coníferas, sua cadeia principal é formada por unidades de xilose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4), 20% dos resíduos de xilose são substituídos no carbono 2 com 4-O-D-ácido glucurônico e cerca de 10 a 15% dos resíduos de arabinose estão geralmente ligados ao anel de xilose nos carbonos 2 ou 3 (TIMELL, 1965; WOODWARD, 1984; MONTGOMERY, SMITH, 1956; COUGHLAN et al., 1993).

Os graus de substituições dos resíduos de xilose são diferentes para gramíneas e grãos de cereais, no trigo a cada sete resíduos de xilose um é substituído por uma cadeia lateral de arabinose (PULS, SCHUSEIL, 1993).

2.1.4. Xiloglucanas (Xgs)

Xiloglucanas interagem com a estrutura da celulose através de pontes de hidrogênio, atuam como uma interface entre a celulose e outros polissacarídeos na parede celular primária das plantas, são quantitativamente predominante na parede celular primária das angiospermas, em maior quantidade em angiospermas, podendo ser encontradas em gramíneas, apresentam uma cadeia principal formada de resíduos de β -D-glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4) com cadeias laterais de resíduos de 1,6- α -xilose (De VRIES, VISSER, 2001; COUGHLAN et al., 1993; CARPITA, GIBEAUT, 1993).

2.1.5. Arabinoxilanas (AXs)

Arabinoxilanas são as principais constituintes da parede celular de grãos de cereais. AXs são semelhantes às xilanas de angiospermas, mas, a quantidade de L-arabinose é maior, apresentam uma cadeia linear de resíduos de D-xilopiranosose unidos por ligações do tipo β -(1,4), com substituições nas posições 2-O e / ou 3-O por ácido urônico (alfa-D-glicopiranosil) ou na posição 2-O por derivados de 4-O-metil (Brillouet et al, 1982;. Shibuya e Iwasaki, 1985). Grupos substituintes de O-acetil também podem ocorrer (ISHII, 1991; WENDE, FRY, 1997). Resíduos arabinofuranosil presentes na AX podem ser esterificados com resíduos de ácidos hidroxicinâmicos, por exemplo, ácido ferúlico e p-cumárico (WENDE, FRY, 1997). Dimerização dos compostos fenólicos esterificados podem provocar ligações inter e intra-molecular na molécula de xilana. As interações físicas e / ou covalentes com outros componentes da parede celular dificultam a extraibilidade da xilana. Em tecidos lignificados, a xilana se liga a lignina pela esterificação de ácidos urônicos presentes em suas cadeias laterais (EBRINGEROVÁ et al., 2005).

2.1.6. Complexos de heteroxilanas (CHXs)

Estão presentes principalmente em cereais, sementes, exudatos e mucilagens e são estruturalmente mais complexos (STEPHEN, 1983).

2.2. Xilana

A xilana é a principal hemicelulose presente na parede celular das plantas, sendo, após a celulose, o polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza (WHISTLER, RICHARDS, 1970), sendo responsável por aproximadamente um terço de todo carbono orgânico renovável na terra (PRADE, 1995). Esta é caracterizada como um heteropolissacarídeo formado por uma cadeia principal de resíduos de D-xilano piranosose unidos por ligações β -1,4, com ramificações nas posições 2 e 3 de resíduos de α -L-arabinofuranose, ácido glucurônico ou grupamento acetil (ASPINALL, 1959; COUGHLAN,

HAZLEWOOD, 1993). Apresentando ainda pequenas quantidades de ácido ferúlico e p-cumárico ligados aos seus resíduos de L-arabinose (KULKARNI et al., 1999; LI et al., 2000). Nas angiospermas é encontrada na forma de O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana – madeira dura (15-30%), nas gimnospermas na forma de arabino-4-O-acetilarabinoglucoxilana – madeira mole (7-10%) e nas gramíneas na forma de arabinoxilanas (COLLINS *et al.*, 2005).

Em plantas, a xilana é encontrada na interface entre a lignina e as fibras de celulose, formando ligações covalentes com a lignina e ligações de hidrogênio com as fibras de celulose (BIELY, 1985; JOSELEAU *et al.*, 1992), apresentando um papel importante na ligação das fibras e na integridade da parede celular (BEG et al., 2001).

Considerando o tipo de ramificação presente na cadeia central, as xilanas podem ser denominadas de arabinoxilanas, glucuronoxilanas, arabinoglucuronoxilanas e glucuronoarabinoxilana (DEKKER, 1989). Nas angiospermas (madeira dura ou "hardwood") a xilana representa de 15 a 30 % do peso seco da planta e encontra-se na forma de glucuronoxilana, nas gimnospermas (madeira mole ou "softwood") representa de 5 a 10 % da biomassa seca; nas gramíneas, cereais e madeira mole ou "softwood" encontra-se na forma de arabinoglucuronoxilana representando 5- 10 % da biomassa seca da planta; e são encontradas principalmente nos cereais na forma de arabinoxilanas representando 0,15 a 30 % da biomassa (Figura 3) (COLLINS *et al.*, 2005).

A cadeia principal da xilana apresenta diferentes substituintes em suas cadeias laterais, a estrutura da cadeia lateral varia de acordo com sua origem taxionômica (monocotiledoneas ou dicotiledoneas), e algumas destas apresentam oligossacarídeos conservados na extremidade redutora (SCHELLER et al., 2010).

2.2.1. Sistema Xilanolítico

Devido à heterogeneidade e complexidade da xilana, a sua completa hidrólise requer uma ampla variedade de enzimas agindo cooperativamente para convertê-la em unidades de xilose. As arabinofuranosidases hidrolisam o grupo terminal não redutor de arabinofuranose de arabinanas, arabinoxilanas e arabinogalactanas. As glucuronidases hidrolisam as ligações α -1,2-glicosídicas entre a xilose e o ácido glucurônico. A

completa hidrólise de glucuronoxilanas requer esterases para remover os grupos acetil e ácidos fenólicos. As esterases quebram as ligações da xilose com o ácido acético (acetil-xilana esterase), entre resíduos da cadeia de arabinose e ácido fenólico (ácido fenólico esterase) e resíduo da cadeia de arabinose como ácido cumárico (ácido cumárico esterase). As endoxilanases hidrolisam as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 dentro da cadeia da xilana produzindo xilo-oligossacarídeos, os quais são convertidos em xilose pela β -xilosidase em monômeros de xilose. Todas estas enzimas atuam cooperativamente para converter a xilana em unidades de xilose (PULS *et al.*, 1987; SUBRAMANIYAN, PREMA, 2002).

2.2.1.1. Endoxilanases

As endoxilanases formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da xilana. As características, o modo de ação da enzima e os produtos da hidrólise variam de acordo com sua origem, já que as endoxilanases podem ser produzidas em condições variadas por diferentes microrganismos, como fungos e bactérias (BASTAWDE, 1992). Estas enzimas foram reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) em 1961 e receberam o código enzimático de EC 3.2.1.8. O nome oficial é endo- β -1,4-xilanase e os seguintes sinônimos são comumente utilizados: xilanase, endoxilanase, β -1,4-D-xilana-xilanohidrolase, endo- β -1,4-D-xilanase, β -1,4-xilanase e β -xilanase (COLLINS *et al.*, 2005).

As informações disponíveis, na literatura, sobre as propriedades bioquímicas das endoxilanases são elucidadas predominantemente dos estudos com as endoxilanases bacterianas e fúngicas. Estas são enzimas monoméricas com massa molecular entre 8 e 145 kDa e apresentam, na sua maioria, atividade ótima em temperaturas entre 40 e 60°C, sendo que as enzimas fúngicas apresentam maior estabilidade; somente um pequeno número de endoxilanases microbianas apresenta atividade ótima em temperaturas acima de 80°C (DUSTERHOFT *et al.*, 1997; SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997). As endoxilanases fúngicas são usualmente estáveis em uma ampla faixa de pH (4 a 7); ponto isoelétrico pI variando de 3 a 10 (SUBRAMANYAN & PREMA, 2002).

As endoxilanases são classificadas juntamente com as glicosil-hidrolases em famílias de acordo com a similaridade da estrutura primária do domínio catalítico (HENRISSAT, BAIROCH, 1993). Como a estrutura primária é relacionada com a estrutura tridimensional e o mecanismo de ação da enzima, esta classificação reflete características estruturais e funcionais. Atualmente as endoxilanases são classificadas nas famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43. Os membros destas famílias diferem em suas propriedades físico-químicas, estruturais, modo de ação e especificidade ao substrato. As endoxilanases das famílias 10 e 11 são as mais estudadas até o momento, sendo que a família 11 é formada somente por xilanases verdadeiras, pois hidrolisam somente polímeros de xilose. As endoxilanases da família 10 constituem enzimas com altas massas moleculares (> 30 kDa) e baixo pI. As enzimas da família 11 são geralmente caracterizadas por pI alto e baixa massa molecular. Estas enzimas são mais ativas em xilo-oligossacarídeos de cadeias longas e apresentam fendas largas de ligação ao substrato (COLLINS *et al.*, 2005).

As endoxilanases podem ser consideradas como específicas quando hidrolisam somente as ligações β -1,4 dentro da cadeia principal de xilana ou não específicas quando hidrolisam ligações glicosídicas, cruzadas, do tipo β -1,4 de outros polímeros adjacentes como as da celulose microcristalina. As endoxilanases hidrolisam a xilana a xilo-oligossacarídeos e xilobiose (dímero de xilose), que é o substrato para a β -xilosidase. Algumas enzimas somente atuam na cadeia central de xilana (não ramificadoras), enquanto que outras hidrolisam as ramificações de arabinofuranose também (ramificadoras) (COUGHLAN, 1992).

2.2.1.3. β -xilosidases

As β -xilosidases são exoglicosidases que degrada pequenos xilo-oligossacarídeos liberando xilose, desempenham um papel importante no processo de inibição das endoxilanases. Além disso, apresenta-se como um fator limitante na hidrólise de xilana (YAN *et al.*, 2008). Portanto, a β -xilosidase se apresentam como uma enzima-chave no sistema xilanolítica com grande potencial nas aplicações biotecnológicas, especialmente na indústria de alimentos e papel (Sunna e Antranikian, 1997). Na hidrólise da xilana, as β -xilosidases clivam as ligações glicosídicas dos xilo-

oligossacarídeos liberando xilose, apresentando papel semelhante ao das β -glicosidases na hidrólise da celulose (SUNNA, ANTRANIKIAN, 1997).

Atualmente são classificadas em cinco famílias com base em suas semelhanças sequência de aminoácidos: 3, 39, 43, 52 e 54 das glicosil hidrolases, mas as enzimas fúngicas têm sido descritas até agora apenas para as famílias 3, 43 e 54 (Henrissat e Davies, 1997; Ito et al, 2003; Eneyskaya et al, 2007). β -xilosidases de uma variedade de microrganismos, como fungos e bactérias, têm sido descritas. Elas se encontram associadas à célula na maioria das bactérias e leveduras, mas encontram-se livre no meio de cultura de alguns fungos (RANSOM, WALTON, 1997; HAYASHI *et al.*, 2001; LAMA *et al.*, 2004; KATAPODIS *et al.*, 2006). Embora, muitas β -xilosidases de fungos mesofílicos têm sido estudadas, apenas algumas de fungos termofílicos foram purificadas e caracterizadas. Destas, incluem β -xilosidases do fungo termofílico *Humicola grisea*, *Scytalidium thermophilum*, e *Sporotrichum thermophile* (ALMEIDA *et al.*, 1995; LEMBO *et al.*, 2006; ZANOLO *et al.*, 2004; KATAPODIS *et al.*, 2006).

A maioria das β -xilosidases microbianas purificadas exibem massa molecular acima de 100 kDa, embora algumas exibem massas moleculares baixas. Muitas β -xilosidases fúngicas tem massas moleculares altas e podem ser monoméricas ou compostas por várias subunidades idênticas (ITO *et al.*, 2003; ENEYSKAYA *et al.*, 2007; ZANOLO *et al.*, 2004; KATAPODIS *et al.*, 2006; ENEYSKAYA *et al.*, 2007; LEMBO *et al.*, 2006).

2.2.1.4. Arabinofuranosidase (AF)

Estas enzimas são parte do sistema enzimático xilanolítico necessário para a completa hidrólise de heteroxilanas L-Arabinofuranosidase (α -L-arabinofuranosideo arabinofuranohidrolase, EC 3.2.1.55, AF) é uma enzima acessória envolvida na liberação de resíduos de L-arabinofuranose substituídos nas posições 2 e 3 dos resíduos de xilose da cadeia central de arabinoxilanas, arabinanas, arabinoglucuronoxilana e arabinogalactanas, α -L-arabinofuranosidases são produzidas por bactérias, incluindo actinomicetos, por fungos e por plantas (KAJI, 1984).

Tajana e colaboradores (1992) purificaram duas α -L-arabinosidases da cepa não-

esporulante *Streptomyces diastaticus* ET apresentando massas moleculares de 38 kDa (C1) e 60 kDa (C2) e pI de 8,8 e 8,3, respectivamente, com pH ótimo entre 4 e 7. As enzimas purificadas hidrolisaram p-nitrofenil α -L-arabinofuranosídeo e liberaram arabinose de arabinoxilana e de uma β -1,5-arabinana não ramificada. O cultivo da bactéria foi realizado por fermentação submersa na presença de diversos substratos como manitol, soja, xilana oat spelt, ou farelo de trigo (FT) para indução da produção de arabinofuranosidases. Dos substratos testados, o FT mostrou ser o melhor indutor de arabinofuranosidases.

2.2.1.5. α -Glucuronidase

α -Glucuronidase (EC 3.2.1) hidrolisa ligações do tipo α -1,2 entre os resíduos de ácido glucurônico e unidades de xilose. Esta enzima exibe atividade máxima somente na presença de pequenos substratos de glucuronoxilana. No entanto, sua especificidade ao substrato pode variar dependendo da fonte microbiana, e algumas glucuronidases são capazes de hidrolisar somente o polímero intacto, devido a presença de grupos acetil próximos aos substituintes de ácido glucurônico (TENKANEN, SIIKA-ABO, 2000).

2.2.1.6. Acetilxilana esterase

Acetilxilana esterase (EC 3.1.1.6) remove os grupos O-acetil das posições 2 e/ou 3 dos resíduos β -D-xilopirranose de acetilxilana. Esta enzima foi descoberta tardiamente, provavelmente, devido à extração alcalina usada frequentemente com xilanas altamente acetiladas. Acetilxilana esterase tem um papel muito importante na hidrólise da xilana, já que os grupos laterais acetil podem interferir com o modo de ação das enzimas que clivam a cadeia principal através de uma dificuldade estérica, assim a clivagem dos grupos acetil facilita a ação das endoxilanases (Figura 6) (BLUM *et al.*, 1999).

2.2.1.4. Sinergismo entre enzimas do sistema xilanolítico

No processo de biodegradação da hemicelulose observa-se uma similaridade em relação ao processo de biodegradação da celulose, porém, uma maior quantidade de enzimas são requeridas para a completa biodegradação da hemicelulose devido a sua heterogeneidade quando comparada com a celulose (MALHERBE, CLOETE, 2002). Exemplos sigérgicos são observados quando enzimas acessórias são utilizadas em conjunto com as enzimas que hidrolisam a cadeia principal da molécula de xilana, a clivagem das cadeias laterais presentes na estrutura da xilana facilita o acesso das endoxilanases a cadeia principal melhorando assim a produção de açúcares, sendo observada uma baixa afinidade das enzimas do tipo endo aos polisacarídeos, provavelmente isso seja resultado da interferência das cadeias laterais (COUGHLAN, 1992).

Contudo quando são utilizadas enzimas que desacetilam como pretratamento da xilana antes da exposição a xilanases e xilosidases se observa uma baixa liberação de açúcares. Sugerido que esta sequência de aplicação de enzimas afeta, não apenas a liberação de açúcares mas também influenciam na natureza dos oligômeros, dificultando uma futura degradação por enzimas (POUTANEN et al., 1991). O processo de desacetilação promove uma diminuição da solubilidade da xilana em água e também causa uma agregação intermolecular (TENKANEN, POUTANEN, 1992).

Algumas xilanases não mostram atividade sobre as cadeias laterais, sendo dependentes de enzimas acessórias para completa remoção das cadeias laterais da estrutura de xilana (SAHA, 2003). Entretanto algumas enzimas acessórias apresentam preferências a oligômeros e não a polímeros (SAHA, 2003). Altas liberações de açúcares tem sido observadas quando estas enzimas são utilizadas simultaneamente (POUTANEN et al., 1991). Durante a hidrólise, tem sido observado uma ação sigérgica entre as enzimas que degradam as cadeias laterais e as que clivam a cadeia principal na xilana, acetil xilana esterases liberam as cadeias laterais de ácido acético incrementando a acessibilidade a cadeia principal da xilana para o ataque das endoxilanases, tendo como produto da pequenos polímeros acetilados, que são substratos para as esterases (BEG et al., 2001).

As hemicelulases são frequentemente classificadas de acordo com seu substrato, endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8) clivam a cadeia principal da xilana gerando oligossacarídeos e 1,4- β -xilosidase (EC 3.2.1.37) liberam as unidades de xilose presentes nestes oligossacarídeos (Jeffries, 1994). Enzimas como xilana esterases, ferulico e p-coumarico esterases, α -1-arabinofuranosidases e α -4-O-methyl glucuronosidases, atuam sinergicamente para uma eficiente degradação da xilana. Para a degradação da O-acetyl-4-O-methylglucuronxilana, o tipo mais comum de hemicelulose, quatro tipos de enzimas são necessários: endo-1-4- β -xilanase (endoilânase), acetil esterase, α -glucuronidase e β -xylosidase. A **Tabela 1** mostra as enzimas que atuam na degradação de alguns tipos de polissacarídeos presentes nas paredes celulares de plantas.

Tabela 1. Algumas características dos principais polissacarídeos da parede celular de plantas e as enzimas envolvidas na sua degradação (LIMA et al., 2001).

Polissacarídeo	Principal resíduo da cadeia	Resíduos laterais	Enzimas
Manana	Manose	Galactose	Endo- β -mananase
Glucomanana	Manose Glicose	Galactose	Endo- β -mananase Endo- β -glicanase α -galactosidase
Galactomanana	Manose	Galactose	Endo- β -mananase α -galactosidase Exo- β -mananase
Xiloglicana	Glicose	Xilose Galactose Fucose Arabinose	Xiloglicana-endo- β -transglicosidase Xiloglicana-endo- β -glicanase β -galactosidase α -xilosidase β -glicosidase α -fucosidase
Galactana	Galactose	Arabinose	Exo-galactanase α -arabinosidase
Arabinoxilana	Xilose	Arabinose Ácido Glucurônico	β -xilosidase Endo- β -xilanase α -arabinosidase α -glucuronodase
β -glicana	Glicose		Lichenase β -(1,3)-(1,4)-glicosidase
Calose	Glicose		β -(1,3)-glicanase
Celulose	Glicose		Celulase Endo- β -(1,4)-glicanase

2.2.2. Propriedades Bioquímicas

As endoxilanases microbianas constituem-se em enzimas monoméricas com massa molecular entre 8 e 145 kDa. Usualmente, estas enzimas apresentam atividade ótima em temperaturas entre 40 e 60°C (mesofílicas), pH ótimo de 4 a 7 e ponto isoelétrico variando de 3 a 10 (KULKARNI *et al.*, 1999; SUBRAMANIYAN, PREMA, 2002). As endoxilanases fúngicas apresentam maior estabilidade, incluindo um pequeno número de enzimas com atividade ótima em temperaturas acima de 80°C (DUSTERHOFT *et al.*, 1997; SUNNA, ANTRANIKIAN, 1997). Entretanto, foram descritas endoxilanases ativas em temperaturas de 5 a 105°C (COLLINS *et al.*, 2002, 2003; KULKARNI *et al.*, 1999) e pH de 2 a 11 (FUSHINOBU *et al.*, 1998; KIMURA *et al.*, 2000; KULKARNI *et al.*, 1999).

A ocorrência de enzimas glicosiladas é um fenômeno comum entre as endoxilanases fúngicas (FUNAGUMA *et al.*, 1991; KULKARNI *et al.*, 1999) e entre algumas endoxilanases bacterianas como as de *Clostridium stercorarium* (BERENGER *et al.*, 1985), *Streptomyces sp* (MARUI *et al.*, 1985) e *Bacillus sp* (DEY *et al.*, 1992). A glicosilação implica na estabilização da estrutura da enzima bem como na sua atividade e termoestabilidade (KULKARNI *et al.*, 1999; MERIVUORI *et al.*, 1985). Os resíduos de carboidratos mais comumente encontrados nas endoxilanases glicosiladas são a manose, glicose e fucose (YOSHIOKA *et al.*, 1981).

3. Celulose

Um número variável de unidades de glicose (aproximadamente cem) forma fibrilas que se empacotam formando as microfibrilas de celulose. As fibrilas de celulose se conectam por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares e por forças de Van der Waals, formando microfibrilas rígidas e insolúveis. Estas microfibrilas se agrupam e formam fibras de alto grau de cristalinidade, sendo chamadas de regiões cristalinas, ou regiões menos compactas com um maior distanciamento entre as fibras, chamadas de

regiões amorfas (Figura 1). Além das regiões amorfas, as fibras de celulose apresentam irregularidades, falhas e microporos que aumentam a superfície de contato da celulose com outras moléculas como a água e enzimas (LYND *et al.*, 2002).

A celulose é um homopolissacarídeo linear composto por unidades de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas do tipo β -1,4. Cada resíduo de glicose tem uma orientação de 180° em relação ao resíduo adjacente, formando assim a celobiose, a subunidade repetitiva do polímero (Figura 1). A extremidade da cadeia de celulose em que se encontra um carbono anomérico livre é chamada de extremidade redutora, e a extremidade em que o carbono anomérico não está disponível é chamada de não redutora (SANDGREN *et al.*, 2005). Aproximadamente cem unidades de glicose formam microfibrilas que se empacotam ou se conectam por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e por forças de Van der Waals, formando fibras rígidas e insolúveis. As microfibrilas apresentam regiões onde as fibras se encontram ordenadas, apresentando alto grau de cristalinidade, denominada região cristalina e regiões onde as fibras estão mais distantes entre si, apresentando-se menos compactas, denominada de região amorfa (Figura 1). Além das regiões amorfas, as fibras de celulose apresentam irregularidades, falhas e microporos que aumentam a superfície de contato da celulose com outras moléculas como a água e enzimas (LYND *et al.*, 2002).

A extremidade da cadeia de celulose onde se encontra o carbono anomérico livre é chamada de extremidade redutora, e a extremidade em que o carbono anomérico não se encontra disponível é chamada de extremidade não redutora (Figura 2) (SANDGREN *et al.*, 2005).

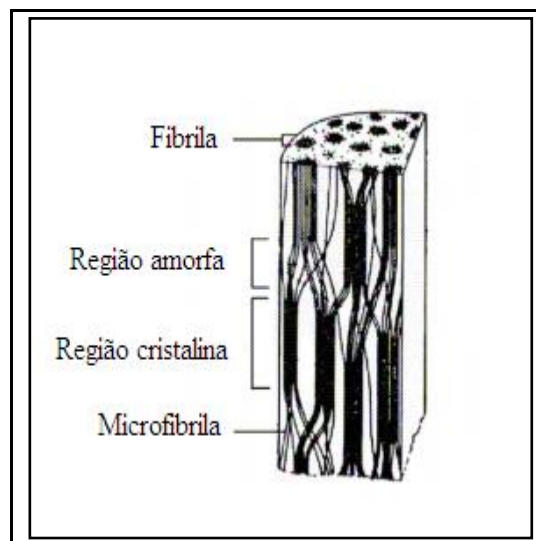


Figura 1. Esquema da fibra de celulose: estrutura da fibrila e microfibrila destacando as regiões cristalina e amorfa. Fonte: COWLING (1963) (com modificação).

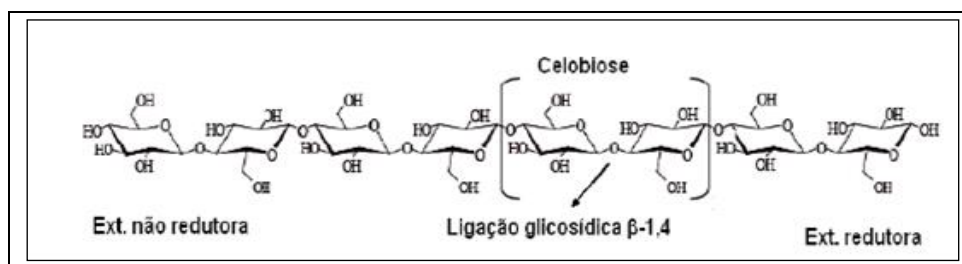


Figura 2. Estrutura da celulose mostrando: a extremidade redutora e não redutora, a ligação das unidades de glicose por ligações glicosídicas β -1,4 e a celobiose formada pela união de duas unidades de glicose (adaptado de TIMÁR-BALÁZSKI & EASTOP, 1998).

3.1. Propriedades Bioquímicas

3.2. Sistema Celulolítico

Diversos microrganismos, principalmente algumas eubactérias e fungos, encontrados em qualquer biota onde se acumulem resíduos de celulose, produzem enzimas capazes de degradar a lignocelulose. Poucos são, entretanto, os que produzem e secretam eficientemente um conjunto de enzimas capaz de degradar completamente a

celulose em glicose. Em vista disso, na natureza, microrganismos celulolíticos e não-celulolíticos co-existem, interagindo sinergisticamente para levar à bioconversão da celulose em glicose (BÉGUIN, AUBERT, 1994).

A produção e secreção de enzimas celulolíticas por fungos são bem superiores às das bactérias, podendo atingir mais de 20 g por litro de cultura em linhagens industriais (modificadas geneticamente) (KNOWLES *et al.*, 1987).

Em função deste potencial de produção e secreção, da sua versatilidade de cultivo em meios líquidos e sólidos, de alternativas diversas de manipulação genética e da variedade de seus produtos metabólicos, os fungos filamentosos tornaram-se microrganismos de preferência nas pesquisas visando à hidrólise enzimática da celulose em escala industrial. Em fungos, o sistema celulolítico compreende três classes de enzimas hidrolíticas: (i) endo- β -1,4-glicanases ou endoglicanases (EC 3.2.1.4), as quais clivam aleatoriamente as ligações do tipo β presentes na parte amorfa da celulose, gerando novas extremidades livres; (ii) as exo- β -1,4-glicanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.-; EC 3.2.1.91) que liberam celobiose das extremidades redutoras (CBH1) ou não-redutoras (CBHII), geralmente da parte cristalina da celulose e (iii) as β -glicosidades (EC 3.2.1.21) que hidrolisam pequenas cadeias de oligossacarídeos e celobiose à glicose (GILKES *et al.*, 1991) (Figura 3).

3.2.1. Endocelulases

As endoglicanases são encontradas em vários organismos, desde fungos e bactérias até protozoários, plantas, bactérias simbiontes de planta, nematódeos e cupim (TAKENAKA *et al.*, 1999; SUDA & GIOGINI, 2003; LAMA *et al.* 2004; BÉRA-MAILLET *et al.*, 2000; NAKASHIMA & AZUMA, 2000). Os fungos produzem uma variedade de endoglicanases o que garante ao microrganismo que as produz, atividade sobre diferentes substratos, sendo que algumas delas possuem atividade em xiloglucanas (SUDA & GIOGINI, 2003; LYND *et al.*, 2002). O fato das endoglicanases atuarem sobre xiloglucanas permite que estas enzimas hidrolisem hemicelose, ajudando a remover a barreira de lignina e permitindo melhor ação do sistema celulolítico sobre a celulose cristalina. (LYND *et al.*, 2002). Apesar da importância das endoglicanases na hidrólise da celulose, estas enzimas não representam as celulases mais produzidas por fungos, representam apenas 20%

do total de celulasas produzidas pelo fungo *T. reesei* (LYND *et al.*, 2002).

3.2.2. Celobiohidrolases

As celobiohidrolases (CBHs) já foram identificadas em diferentes gêneros de fungos como *Trichoderma*, *Humicola*, *Aspergillus* e outros (SCHÜLEIN, 1997). As CBHs são as principais enzimas do complexo celulolítico do fungo *Trichoderma reesei*; e são produzidas em maior quantidade do que as outras celulasas do complexo, sendo que a CBH I e a CBH II (EC 3.2.1; EC 3.2.1.91) representam 60% e 20% respectivamente do total de celulasas produzidas por esse fungo (WOOD, 1992). O processo de hidrólise enzimática da celulose pode ser vista na Figura 3.

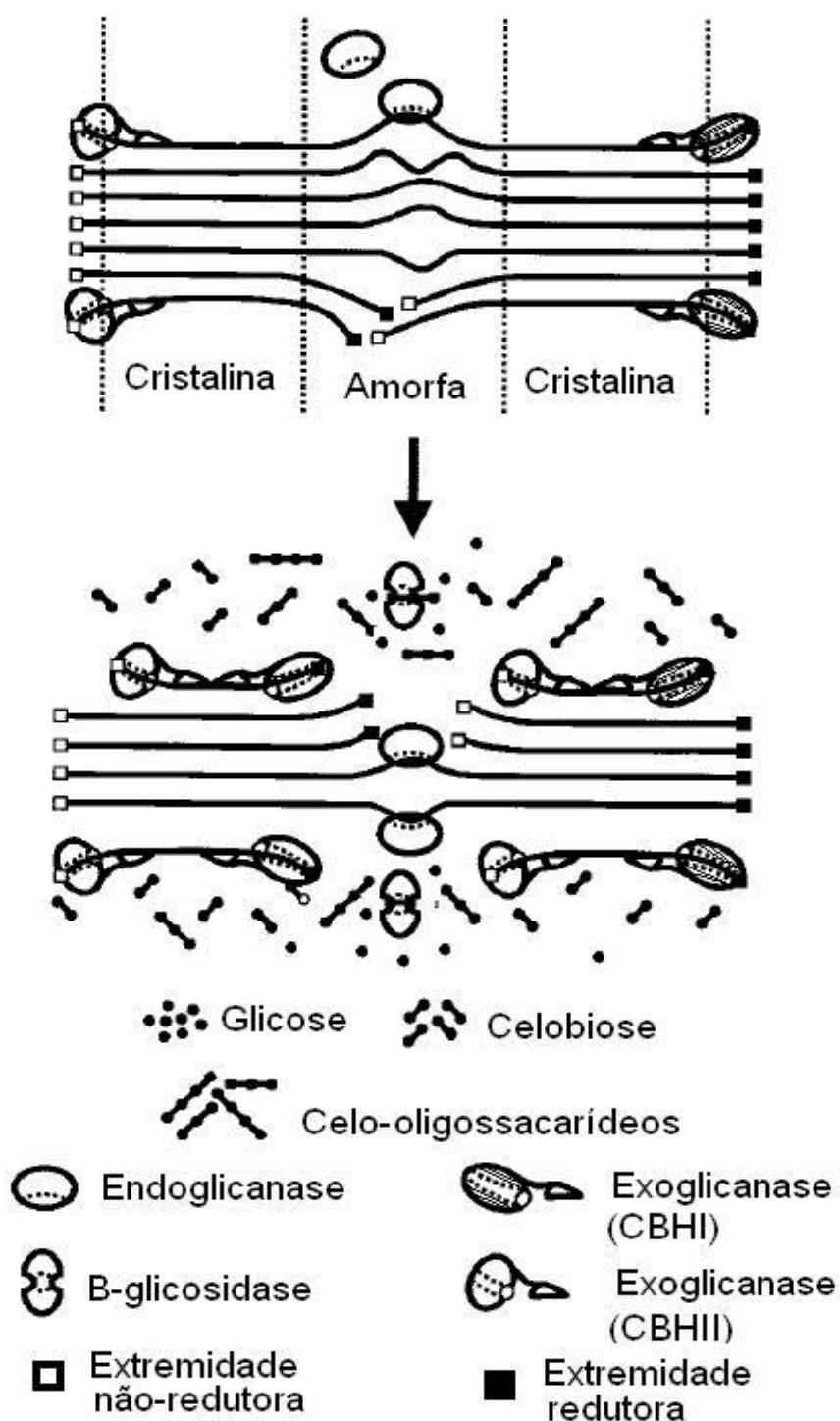


Figura 3. Representação esquemática da hidrólise das regiões cristalinas e amorfas da celulose.

As CBHs possuem um papel central na degradação da celulose insolúvel ou microcristalina, atuando nas extremidades redutoras (CHBI) e não redutoras do polímero de celulose (CBH II) Estas enzimas possuem um domínio de ligação ao substrato conectado ao domínio catalítico por uma dobradiça (Figura 4). Embora os domínios de ligação à

celulose não sejam essenciais para a atividade catalítica, eles modulam a atividade específica das enzimas em substratos celulolíticos solúveis e insolúveis. O domínio de ligação à celulose (CBD) se liga na celulose cristalina enfraquecendo as ligações de hidrogênio entre as microfibrilas, ajudando na separação das mesmas e na progressão da enzima. As enzimas que possuem o CBD apresentam melhor atividade sobre substratos insolúveis, principalmente sobre celulose cristalina, mas em substratos solúveis a falta do CBD não afeta a atividade enzimática. As CBHs atuam em sinergismo com as endoglicanases (EGLs) e os produtos de hidrólise são glicose e principalmente celobiose (TEERI, 1997; LYND *et al.*, 2002; HOU *et al.*, 2007).

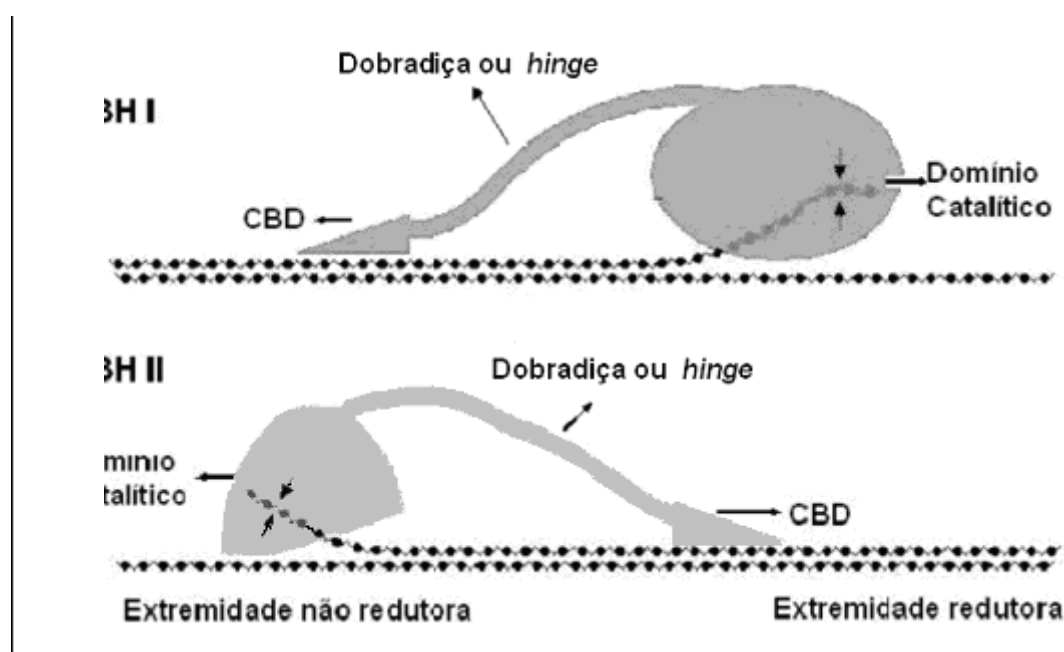


Figura 4. Estrutura dos domínios das celobiohidrolases (domínio catalítico e CBD), unidos por uma região denominada de dobradiça ou hinge. As CBH I e II atuam respectivamente nas extremidades redutora e não redutora das fibras de celulose. Fonte: Harris, 1999.

A massa molecular das celobiohidrolases varia entre 38 e 128 kDa, e de uma maneira geral, exceto pela termoestabilidade, as características moleculares das celobiohidrolases são similares para fungos termofílicos e mesofílicos (TAKASHIMA *et al.*, 1995; MAHESHWARI *et al.*, 2000; HAYASHIDA *et al.*, 1988). Em fungos termofílicos

apresentam temperatura ótima entre 50 e 75°C, sendo frequentemente estáveis na faixa entre 55 e 60°C. As celobiohidrolases do tipo CBH I do fungo *Humicola insolens* apresentam pH ótimo entre 5 e 6 e para as CBH II, o pH ótimo é de 9 (SCHÜLEIN, 1997).

3.2.3. β -glicosidasdes

Os estudos com BGLs têm sua origem na década de 50 por causa do seu envolvimento na conversão biológica da celulose (ZANOELO, *et al.*, 2004). O nome β -glicosidase é dado a diferentes tipos de enzimas capazes de hidrolisar ligações β -glicosídicas em dissacarídeos, oligossacarídeos e glicosídeos conjugados, sendo que a afinidade por um substrato específico depende da origem, da função fisiológica e da localização da enzima (WOODWARD, WISEMAN, 1992).

As BGLs constituem um grupo de enzimas hidrolíticas que podem ser encontradas tanto em eucariotos quanto em procariotos desde bactérias, fungos, plantas, animais e no próprio homem desempenhando funções diversas (WOODWARD, WISEMAN, 1982; KATAYEVA *et al.*, 1992). Nas plantas, as β -glicosidasdes atuam na hidrólise de precursores de hormônios, na degradação de componentes da parede celular em processos de amadurecimento de frutos, germinação de sementes e desenvolvimento de embriões, na emissão de aromas (fragrâncias) em flores, além de participarem no controle de movimentos foliares (DAIROT, 2007).

Em sinergismo com as outras enzimas do complexo celulolítico, as BGLs apresentam um papel essencial na hidrólise total da celulose convertendo celobiose em glicose e podem ser consideradas como limitantes para a hidrólise enzimática da celulose (BERGHEM & PETTERSSON, 1974).

3.2.4. sinergismo entre enzimas do sistema celulolítico

As enzimas do complexo celulolítico atacam o substrato de uma forma sinérgica. O sinergismo resulta em um aumento de eficiência pela ação de dois ou

mais componentes de um sistema quando comparado à ação de cada um deles isoladamente. No caso das celulasas, esse sinergismo faz com que a velocidade de formação de produtos solúveis aumente significativamente quando comparado à velocidade de ação isolada das enzimas (KLYOSOV, 1990). Esse sinergismo foi comprovado a partir de estudos de cada uma das enzimas, separadas e conjuntamente.

3.3. Lignina

A lignina é um polímero tridimensional, de estrutura não uniforme, composto de unidades fenil propano. A lignina é composta por nove unidades de carbono, derivadas do álcool cinamil substituído, que são cumaril, coniferil e álcool siringil. As ligninas são altamente ramificadas, não cristalinas, com estrutura e composição química variando de acordo com a fonte. As ligninas encontram-se associadas à hemicelulose e colaboram na resistência à deterioração natural dos lignocelulósicos (FENGEL & WEGENER, 1989).

4. FUNGOS FILAMENTOSOS

Fungos filamentosos podem ser encontrados em larga escala na natureza em diversas partes: no solo, nos vegetais, nos grãos, nos animais, e normalmente crescem na superfície destes materiais ou seres. Estes microrganismos apresentam morfologia complexa, exibindo diferentes formas estruturais durante seus ciclos de vida. Em geral, eles apresentam filamentos, as chamadas hifas, com paredes rijas, ricas em quitina, o mesmo material que reveste insetos como besouros. Essa estrutura vegetativa básica de crescimento consiste em um filamento tubular denominado hifa, originado da germinação de esporo reprodutivo. Com o crescimento da hifa, esta se ramifica repetidamente, formando uma massa de hifas denominada micélio (PAPAGIANNI, 2004).

Fungos têm capacidade de degradar inúmeras substâncias e esta capacidade está relacionada ao seu sistema enzimático inespecífico o qual é capaz de desestabilizar moléculas com grande estabilidade química, além do fato de lançarem as enzimas no substrato onde colonizam (PAPAGIANNI, 2004).

Conforme Lynd *et. al*, (2002) a utilização microbiana da celulose é responsável por um

dos maiores fluxos de matéria na biosfera. Fungos filamentosos ocupam papel fundamental na degradação dos biopolímeros de celulose e hemiceluloses sendo por isso, essenciais para a manutenção do ciclo do carbono. Entretanto, poucos são os microorganismos que produzem e secretam eficientemente um conjunto de enzimas capazes de degradar completamente a celulose e hemicelulose. Esse motivo explica, na natureza, a associação de microorganismos produtores de enzimas que interagem sinergisticamente para levar à bioconversão completa da celulose em glicose (BÉGUIN, AUBERT, 1994) ou da xilana em xilose (SUNNA, ANTRANIKIAN, 1997; SUBRAMANIYAN, PREMA, 2002).

Além do papel significativo desempenhado pelos fungos filamentosos na reciclagem de compostos orgânicos, estes microorganismos apresentam outras propriedades importantes, participando da produção de alimentos e produtos relacionados à saúde humana (HAJJAJ, *et al* 2000).

Atualmente vem crescendo o número de produtos comercialmente importantes produzidos por fungos. Muitos fungos filamentosos têm sido utilizados como ótimos produtores de inúmeras enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos e outros metabólitos comercialmente importantes. Estes microorganismos têm sido amplamente explorados na produção de proteínas homólogas e, mais recentemente, proteínas heterólogas, devido a alta capacidade de seus mecanismos de secreção de proteínas (SUTO & TOMITA, 2001).

Na produção industrial de enzimas, cultivos submersos são normalmente utilizados, devido à facilidade de manejo e controle do processo. Contudo, o acúmulo de produtos finais inibe o crescimento celular e a formação do produto desejado na maioria destes processos (DAIROT, 2007).

4.1. *Humicola grisea* var. *Thermoidea*

Dentre várias espécies de microorganismos capazes de produzir celulasas e xilanases e degradar substratos lignocelulolíticos destaca-se o fungo do gênero *Humicola*. Chaves em 1982, isolou de compostagem uma linhagem de fungo celulolítico que apresentou produção de celulasas em alta temperatura. Este fungo foi classificado como sendo *H. grisea* var. *thermoidea*. Vários trabalhos têm sido realizados no Brasil utilizando linhagens obtidas a partir desse isolado. O grande interesse dos pesquisadores por esse fungo é justificado

por sua capacidade em produzir um conjunto de enzimas termoestáveis como celulases, xilanases, β -glicosidases, β -xilosidases, amilases, trealases, entre outras (AZEVEDO *et al.*, 1990; PERALTA *et al.*, 1997; ARAÚJO *et al.*, 1993; MONTI *et al.*, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 1991; CARDELLO *et al.*, 1994; ALMEIDA *et al.*, 1995; DE PAULA *et al.*, 1998). O fungo *H. grisea* é aeróbico e termofílico moderado, cresce em temperaturas que podem variar de 20 a 50°C apresentando crescimento ótimo entre 40 e 42°C (DE PAULA, 1999).

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos com o fungo *H. grisea* com o objetivo de analisar a produção de enzimas por FL utilizando substratos lignocelulósicos como fonte de carbono (DE PAULA, 1999; POÇAS-FONSECA *et al.*, 2000; MELO, 2010).

Em trabalhos desenvolvidos por De Paula e colaboradores (1999 e 2003), o fungo *H. grisea* cultivado em substratos lignocelulósicos como BCA e BMS foi capaz de produzir um complexo de enzimas com alta atividade celulolítica. Dentre estas enzimas destacou-se uma proteína de aproximadamente 47 kDa, 451 resíduos de aminoácidos e pI 5,27, que representa a principal proteína secretada pelo fungo sob o cultivo em substratos lignocelulósicos. Análises de homologia de aminoácidos demonstraram que esta proteína corresponde ao produto do gene *cbh1.2*, sendo então chamada de CBH1.2 ou celobiohidrolase II (EC 3.2.1.91). No presente trabalho, esta proteína foi utilizada como marcador para análise do perfil de celulases presentes no sobrenadante de cultura do *H. grisea* (**Tabela 2**).

Em trabalho realizado por Azevedo e colaboradores (1990) identificaram dois genes de celobiohidrolases do fungo *H. grisea*, o primeiro foi descrito como uma celobiohidrolase *cbh1.1* e posteriormente o segundo gene foi analisado por Poças-Fonseca e colaboradores (1997) e descrito como o segundo gene de celobiohidrolase (*cbh1.2*) do fungo. O gene *cbh1.1* possui 3,5 kb e codifica uma celobiohidrolase (CBH1.1) com massa molecular de 55 kDa, sendo constituída de um domínio catalítico e um domínio de ligação à celulose (CBD), e apresenta 60% de identidade com um gene de celulase de *T. reesei*. O gene *cbh1.2* possui 5,0 kb e codifica uma celobiohidrolase (CBH1.2) com massa molecular de aproximadamente 47 kDa e constituída apenas pelo domínio catalítico (Tabela 3). Pela metodologia de RT-PCR foi analisada a regulação da expressão desses genes de celobiohidrolases, quando o fungo

foi cultivado em glicose, lactose, celobiose, glicerol, xilose, CMC, Avicel, papel de filtro, BCA ou a mistura de glicose/celulose com o objetivo de elucidar o provável mecanismo regulatório do sistema celulolítico do fungo *H. grisea*. O gene *cbh1.1* é expresso quando o fungo é cultivado em baixas concentrações (0,1%) de lactose e celobiose, mas não em alta concentração de celobiose (1,0%). Já o gene *cbh1.2* é expresso independentemente da fonte de carbono ou da concentração (POÇAS-FONSECA *et al.*, 2000). Portanto, através deste trabalho concluiu-se que o *cbh1.1* possui expressão indutiva, enquanto o gene *cbh1.2* possui expressão constitutiva.

Varias enzimas foram purificadas e caracterizadas do sobrenadante de cultura do fungo *H. grisea* cultivado em FT, celulose e avicel e alguns genes do mesmo fungo foram clonados e expressos em *A. orizae*, sendo seis endoglicanases com massas preditas de 24.2, 32.2, 42, 45, 46.5 e 58 kDa; seis β -glicosidases com massas moleculares de 49 kDa a 115 kDa e uma celobiohidrolase de 38,5 kDa. Estas enzimas apresentaram pH ótimo entre 5,0 a 7,0 temperatura ótima entre 50 a 70 °C e estabilidade por 10 min a 45 °C e por 20 h em uma faixa de pH de 5,0 a 9,4 a 4°C (TAKASHIMA *et al.*, 1996; 1997 e 1999) (**Tabela 2**).

Segundo Peralta e colaboradores (1997), o *H. grisea* foi cultivado em BCA e produziu dois principais componentes proteicos que exibiram atividades β -glicosidase (formas I e II). A forma I foi purificada e apresentou massa molecular de 55 kDa (SDS-PAGE e filtração em gel). A proteína apresentou temperatura ótima de 60 °C em pH 6,0. A atividade enzimática foi estável em 60 °C e exibiu meia vida de 30 min em 70°C (**Tabela 2**). Características bioquímicas de celulasas do *H. grisea* encontram-se sumarizadas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Enzimas do Sistema Celulolítico do fungo *H. grisea*.

Código	MM (kDa)	Temp. ótima (°C)	pH (ótimo)	Referência
EGL1	58	55-60	5,0	TAKASHIMA <i>et al.</i> , (1996)
EGL2	46,5	50-70	5,0-7,0	TAKASHIMA <i>et al.</i> , (1996)
EGL1	45	50-70	5,0-7,0	TAKASHIMA <i>et al.</i> , (1996)
EGL3	32,2	60	5,0	TAKASHIMA <i>et al.</i> , (1999)
EGL4	24,2	75	6,0	TAKASHIMA <i>et al.</i> , (1999)
CBH 1	67			TAKASHIMA <i>et al.</i> , (1996)
CBH1.1	55			AZEVEDO <i>et al.</i> , (1990)
CBH1.2	47			POÇAS-FONSECA (1997)
Exoglucanase	38,5	50-7,0	5,0-7,0	TAKASHIMA <i>et al.</i> , (1996)
BGL 1	115	50-70	5,0-7,0	TAKASHIMA <i>et al.</i> , (1996)
BGL2	94	50-70	5,0-7,0	TAKASHIMA <i>et al.</i> , (1996)
BGL3	94	50-70	5,0-7,0	TAKASHIMA <i>et al.</i> , (1996)
BGL6	77	50-70	5,0-7,0	TAKASHIMA <i>et al.</i> , (1996)
BGL4	54-57	50-70	5,0-7,0	TAKASHIMA <i>et al.</i> , (1996)
FORMA 1	55	60	6,0	PERALTA (1997)
BGL5	49	50-70	5,0-7,0	TAKASHIMA <i>et al.</i> , (1996)
BGL intracelular	45			TAKASHIMA <i>et al.</i> , (1996)

EGL: endoglicanase; CBH: celobiohidrolase; BGL: β -glicosidase

Rana e colaboradores (1995) purificaram e caracterizam duas endoxilanasas com massas moleculares de 95 (Xyl I) e 13 kDa (Xyl II) quando o fungo foi cultivado em meio líquido contendo palha de trigo como fonte de carbono (**Tabela 3**).

Monti e colaboradores (1991) purificaram e caracterizaram duas endoxilanasas extracelulares com massa molecular estimada em 23,0 e 25,5 kDa produzidas pelo fungo *H. grisea* cultivado em xilana “larchwood”. A endoxilanase de 25,5 kDa

apresentou-se como uma glicoproteína estável a 50°C por 30 min com uma meia vida de 20 min a 60°C, estabilidade entre 40 e 60°C, pH ótimo de 5,0, temperatura ótima de 70°C. A endoxilanase de 23,0 kDa apresentou termoestabilidade semelhante a de 25,5 kDa e atividade sobre xilana e celulose (**Tabela 3**) (MONTI, 2003).

Em trabalho realizado por Lucena-Neto e Ferreira-Filho (2004) observou-se que o fungo *H. grisea* secretou um complexo de enzimas xilanolíticas quando cultivado em meios sólidos e líquidos contendo, respectivamente, FT e engaço de bananeira - EB (suporte do cacho de banana) como substratos. Nesse trabalho foi estimada por SDS-PAGE uma nova xilanase de 29 kDa denominada de X2, obtida do meio sólido com FT. No processo de purificação foi observado a presença de pelo menos 5 picos com atividade xilanolíticas e a enzima purificada mostrou-se mais ativa numa faixa de pH de 4,5 a 6,5, temperatura ótima de 55 a 60 °C e reteve 50% de sua atividade após 5,5 h a 60°C (**Tabela 3**).

O gene *xyn1* do *H. grisea* foi isolado por Iikura e colaboradores (1997). Este gene codifica uma xilanase com 429 resíduos de aminoácidos e massa molecular predita de 47 kDa. A proteína XYN1 apresenta um domínio de ligação a celulose (CBD) e homologia com xilanases da família F/10. O gene *xyn1* foi expresso quando o fungo foi cultivado, por FL, na presença de xilana e celulose microcristalina (Avicel) e reprimido na presença de glicose (**Tabela 3**).

Em trabalho realizado por Lembo e colaboradores (2006), quando o *H. grisea* cresceu, por FL, no meio contendo xilana “oat spelt” como fonte de carbono produziu atividade de β -xilosidase. As enzimas purificadas apresentaram massas moleculares de 37 e 50 kDa por espectrometria de massa e SDS-PAGE respectivamente. As enzimas purificadas exibiram atividade máxima a 55°C e pH 6,5, sendo que em pH 8,8, retiveram 60% de sua atividade após 6 h de incubação a 50°C (**Tabela 3**).

Almeida e colaboradores (1995) purificaram a partir do sobrenadante de cultura do *H. grisea* uma β -xilosidase de 43 kDa, de pH ótimo de 6,0 e temperatura ótima de 50 °C (Tabela 4). As massas moleculares e a temperatura ótima e pH ótimo da maioria das xilanases do *H. grisea* podem ser vistas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Enzimas do Sistema Xilanalolítico do fungo *H. grisea*

Código	MM	Temp.	pH	Referência
	(kDa)	ótima (°C)	ótimo	
Xyl II	95			RANA <i>et al.</i> , (1995)
X3	61,8			MONTI <i>et al.</i> , (2003)
XYN1	47			IIKURA (1997)
				LUCENA-NETO &
X2	29	55-60	4,5-65	FERREIRA-FILHO (2004)
X2	25,5	70	5,0	MONTI <i>et al.</i> , (1991)
HXYN2	23	65	5,5	CARVALHO (2003)
HXYN2r	23	60	6,5	FARIA (2000 e 2002)
X1	23	40	5,0	MONTI <i>et al.</i> , (1991)
XYL1	13			RANA <i>et al.</i> , (1995)
BXL 1 e 2	37 e 50	55	7,5	LEMBO <i>et al.</i> , (2006)
BXL	43	50	6,0	ALMEIDA <i>et al.</i> , (1995)

X₁, X₂, X₃: xilanases; XYL I e II: endoxilanases; HXYN2: endoxilanase; HXYN2r: endoxilanase recombinante; BXL: β -xilosidase.

4.2. Produção de celulases e xilanases

Nos estudos realizados por Faria (2000) e Moraes e colaboradores (2002) foi descrito que o fungo *H. grisea* produziu um conjunto de enzimas com atividade

xilanólítica quando crescido em vários substratos como: bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, farelo de trigo, palha de cereal moída além de substratos menos complexos como a xilana “oat-spelt” e xilana “birch-wood”. Os resultados demonstraram que o bagaço de cana-de-açúcar foi o melhor indutor da produção das xilanases pelo fungo. As proteínas do sobrenadante de cultura foram analisadas quanto a atividade xilanólítica em gel pela metodologia de Zimograma, o sobrenadante de cultura apresentou um perfil proteico heterogêneo, com destaque para duas bandas com atividade de xilanase correspondentes às proteínas de 23 e 25 kDa. No sobrenadante de cultura do fungo cultivado na presença de glicose não se observou nenhuma banda de atividade.

Vários trabalhos foram realizados no grupo de pesquisa visando o entendimento das enzimas do sistema xilanólico e celulolítico do fungo *H. grisea*. Faria e colaboradores (2000, 2002) isolaram o gene que codifica a endoxilanase HXYN2. A expressão deste gene foi analisada por RT-PCR e foi observado que o gene foi expresso quando o fungo foi cultivado na presença de BCA e palha de cereal moída (BMS), e não expresso no cultivo em glicose. O gene *Hxyn2* foi expresso pela levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. A enzima recombinante apresentou massa molecular de 23 kDa, pI 8,0 e atividade contra xilana. A enzima HXYN2r foi purificada por Carvalho e colaboradores (2008) e apresentou pH e temperatura ideais de 6,5 e 60 °C. A enzima manteve 100% de sua atividade após 180 min de incubação, quando incubada a 60 °C. Em outro trabalho do grupo, Carvalho e colaboradores (2003) purificaram a xilanase de 23 kDa, a endoxilanase HXYN2r, confirmando a temperatura ótima de 65°C, pH ótimo de 5,5 e o pI de 6,1. No pH ótimo, manteve 80% da atividade inicial mesmo após 120 min de incubação (**Tabela 3**).

A enzima HXYN2r foi utilizada no presente trabalho como marcador xilanase nos géis desnaturantes de poliacrilamida, como ferramenta de análise para estimativa das massas do perfil proteico de sobrenadantes de cultura do *H. grisea* por SDS-PAGE e Zimograma.

Oliveira e colaboradores (2007), cultivaram o fungo *H. grisea* em diferentes substratos como SM, BCA e CMC nas concentrações iniciais de 1%. Os resultados obtidos no cultivo do *H. grisea*, com os substratos testados demonstraram que o SM foi

o melhor indutor de atividade celulolítica, apresentando picos de atividade de 0,01 U/mL de FPase após 144 h, 0,16 U/mL de CMCase após 120 h e 0,19 U/mL de Avicelase após 72 h. No sobrenadante de cultura do fungo observou-se por SDS-PAGE, a presença de duas principais proteínas, com massa molecular estimada de 47 e 66 kDa, as quais podem corresponder às celobiohidrolases CBH1.2 e a CBH1.1 do *H. grisea*. Com intuito de se obter maior concentração enzimática no sobrenadante de cultura, realizou-se a expressão heteróloga do cDNA da celobiohidrolase1.2 do *H. grisea* em *P. pastoris*. Os valores de atividade enzimática para FPase, CMCase e Avicelase obtidos pela levedura recombinante (CBH1.2r) foram respectivamente 5, 1,87 e 1,2 vezes maiores do que aqueles obtidos pelo fungo *H. grisea*. Vale ressaltar que esta enzima recombinante (CBH1.2r) de 47 kDa produzida pela *P. pastoris* foi utilizada como marcador da presença da celulase CBH1.2 no sobrenadante de cultura do *H. grisea*.

A partir dos resultados descritos por Faria (2000), Carvalho e colaboradores (2003 e 2008) e Oliveira e colaboradores (2007) concluiu-se que no cultivo do fungo *H. grisea* por FL, os melhores indutores da produção de celulases e xilanases foi o BCA e o SM.

Os substratos SM e PA têm sido descritos como bons indutores da produção de celulases e xilanases por diferentes fungos por FL (LENARTOVICZ *et al.*, 2003). Estes substratos ainda foram pouco explorados como indutores da produção de celulases e xilanases pelo fungo *H. grisea*. No trabalho de Oliveira e colaboradores (2007) foi analisada a indução da produção de celulases pelo *H. grisea* utilizando 1% de SM, BCA e CMC em meio não suplementado com fonte de nitrogênio, os resultados obtidos demonstram que o SM mostrou ser o melhor indutor. No presente trabalho foi proposta a análise da produção de xilanases e celulases pelo *H. grisea* em 1 e 2% de SM como fonte de carbono e em meio suplementado com de fontes de nitrogênio.

Melo (2009) produziu celulases e xilanases com o cultivo do fungo termofílico *H. Grisea*, onde as melhores condições para a produção de xilanases foi no cultivo em 3% de FT por 216 h; CMCases em 3% de BCA por 192 h; FPases em 3% de BCA por 192 h e avicelases em 3% de FT por 48h, observando ainda que o fungo *H.grisea* apresentou perfis protéicos diferentes quando cultivados em diferentes substratos, sendo que no cultivo do fungo na presença de BCA induziu a produção de uma maior numero de celulases e na presença de FT uma maior produção de xilanases.

5. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE XILANASES

O mercado global de enzimas industriais cresceu de um bilhão de Euros em 1995 para quase dois bilhões de Euros em 2001, e continua a crescer à medida que novas enzimas e aplicações são descobertas. As enzimas hidrolases que englobam as glicosil-hidrolases, como celulasas, amilases e hemicelulasas constituem aproximadamente 75% do mercado de enzimas industriais, sendo que as xilanases constituem a maior proporção de hemicelulasas comerciais (COLLINS *et al.*, 2005).

O uso industrial das xilanases começou nos anos 80 inicialmente na fabricação de rações e posteriormente na indústria alimentícia, têxtil e de papel e celulose. Atualmente países como Japão, Finlândia, Alemanha, Dinamarca, República Irlandesa, Canadá e Estados Unidos produzem industrialmente xilanases que são usadas em vários setores industriais (POLIZELI *et al.*, 2005).

A produção de ração animal é muito importante no agronegócio, com uma produção anual mundial que excede 600 milhões de toneladas, resultando em ganhos de mais de 50 bilhões de dólares. As xilanases são usadas nas rações juntamente com glicanases, pectinases, celulasas, proteases, amilases, fitases, galactosidades e lípases, e degradam a porção de arabinoxilana presente na ração, reduzindo a viscosidade do material bruto e aumentando a digestibilidade da ração (POLIZELI *et al.*, 2005).

As xilanases termoestáveis e com estabilidade em pH 5,0 são mais adequadas a esta aplicação já que a ração passa pelo processo de peletização (conduzido em temperaturas entre 70-95 °C) e devem ser estáveis às condições do trato digestivo dos animais (pH de aproximadamente 4,8 e temperatura de 40 °C) (COLLINS *et al.*, 2005; Chantasingh *et al.*, 2006).

A indústria de sucos e bebidas é responsável pela utilização de uma boa parte do mercado de enzimas. Na indústria de sucos, as xilanases em conjunto com as celulasas, as amilases e as pectinases reduzem a viscosidade da polpa de fruta, hidrolisando os polissacarídeos que interferem na clarificação do suco, e assim, levam à estabilização das polpas de fruta e ao aumento da recuperação de aromas, óleos essenciais, vitaminas,

sais minerais e corantes comestíveis. Na indústria de cerveja, as xilanases são usadas para hidrolisar a porção de arabinoxilana da bebida, reduzindo a viscosidade e a turbidez da cerveja (POLIZELI *et al.*, 2005).

Para a indústria têxtil, a xilanase pode ser utilizada nos processos de maceração do linho, da juta e do sisal e refinamento de polpas para a produção de tecidos como a viscose “rayon”. Nestes processos, as enzimas xilanolíticas são empregadas para facilitar a separação das fibras de celulose da matriz celular e a remoção da lignina. Para estes propósitos a xilanase deve ser livre de enzimas celulósicas. Em alguns processos, as fibras têxteis são extraídas de troncos macios que contêm uma menor quantidade de lignina, de forma que o tratamento enzimático já é suficiente para a recuperação das fibras de celulose sem a necessidade de nenhum processo adicional para o branqueamento da polpa (MILAGRES, PRADE, 1994).

Uma das principais aplicações da xilanase está no branqueamento da polpa da celulose. Atualmente, em vários países incluindo o Brasil, os processos químicos, utilizando dióxido de cloro e cloro, de branqueamento da polpa da celulose são preferencialmente usados. O efluente gerado não pode ser reciclado facilmente e contém grande quantidade de compostos organoclorados, os quais têm efeitos tóxicos e carcinogênicos. A aplicação das xilanases neste processo se deve ao fato da enzima hidrolisar a xilana e consequentemente facilitar a remoção da lignina que se encontra ligada a ela por ligações físicas e químicas. A utilização da xilanase no branqueamento pode reduzir em até 34% a quantidade de cloro utilizado nesta etapa e uma redução entre 15 -20% de organoclorados nos efluentes. As xilanases empregadas na indústria de papel e celulose devem apresentar atividade em altas temperaturas e em pHs alcalinos, e serem livres de celulase para preservarem as fibras da celulose (VIAKARI, 1991; VIAKARI *et al.*, 1994; PAICE *et al.*, 1988; POLIZELI *et al.*, 2005).

A xilanase em combinação com a celulase pode ser utilizada na reciclagem de papeis impressos por impressoras a laser. A celulase libera as fibras da matriz de celulose na qual a tinta está embebida, enquanto a xilanase cliva a cadeia de xilana, liberando a lignina do complexo carboidrato-lignina, liberando a tinta. A utilização dessas enzimas é responsável pela remoção de 62% da tinta. A utilização das enzimas reduz o uso de compostos químicos tais como: carbonato de sódio, hidróxido de sódio,

silicato de sódio, peróxido de hidrogênio, hipocloritos, agentes quelantes e surfactantes, que geram efluentes que necessitam de sistemas caros de tratamento de água (LEE *et al.*, 2007).

Outra aplicação das xilanases é na conversão de sub-produtos industriais e resíduos agroindustriais, tais como farelo de trigo e haste de algodão, em xilooligossacarídeos. Os xilooligossacarídeos são aditivos de alto valor em alimentos funcionais, utilizados para beneficiar o desenvolvimento seletivo de microrganismos da microbiota gastrointestinal, tais como o *Bifidobacterium spp.* Os efeitos benéficos desses microrganismos incluem: supressão da atividade e prevenção da proliferação de enterobactérias patogênicas e facilitação da digestão e absorção dos nutrientes (LIU *et al.*, 2006; AKPINAR *et al.*, 2007).

Outros processos que empregam as xilanases são: extração de café, formulação de detergentes e na produção de polissacarídeos com atividade farmacológica para o uso como agentes antimicrobianos e/ou anti-oxidantes (COLLINS *et al.*, 2005).

No processo de panificação uso de xilanases tem ação positiva no aumento do volume específico dos pães (16 %) e textura da massa (BASTOS, 2008).

Os produtos de hidrólise da xilana, como os resíduos de β -D- xilopiranosil, podem ser convertidos em combustíveis líquidos (etanol), solventes e doces de baixa caloria. Um primeiro passo é a deslignificação do material lignocelulósico, seguido da hidrólise realizada por hemicelulases, para produzir açúcares como as unidades β -D- xilopiranosil. Posteriormente esses produtos são fermentados por leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* e *Candida shehatae* para a produção de etanol ou xilitol. O xilitol é um poliálcool com poder adoçante comparável com a sacarose, utilizado como adoçante não cancerígeno recomendável para diabéticos e indivíduos obesos (POLIZELI *et al.*, 2005).

6. Hidrolise enzimática de substratos lignocelulósicos

6.1. Pre-tratamento

Para a conversão de celulose e hemicelulose a etanol o substrato deve passar por uma etapa de pré-tratamento que permite o desfibramento em nível microscópico da biomassa, ou seja, a destruição da matriz lignocelulósica, separando a mesma em seus componentes principais (celulose, hemicelulose e lignina), melhorando assim, a acessibilidade da biomassa às enzimas hidrolíticas e liberando a fração potencialmente fermentável. Na etapa de hidrólise enzimática os polissacarídeos presentes na biomassa são convertidos em açúcares simples (C_6 e C_5). A partir do tratamento da fração celulósica são obtidos monômeros de glicose, enquanto que a fração composta da hemicelulose é hidrolisada numa mistura de açúcares pentoses, entre as quais a xilose e a arabinose são seus componentes mais abundantes (CHANG, HOLTZAPPLE, 2000).

Imaginar um processo de pré-tratamento universal se torna difícil devido à natureza diversificada de matérias-primas de diferentes biomassas. Uma grande variedade de tecnologias diferentes pré-tratamento têm sido sugeridas durante as últimas décadas. Eles podem ser classificados em biológicos (Enzimáticos), físicos (Trituração e hidrotermólise), químicos (ácida, alcalina, solventes, ozônio) e físico-químicas (explosão a vapor, explosão com amônia), combinação desses métodos tem sido também estudada (Alvira et al., 2008; MOISER et al., 2005).

Uma variedade de técnicas de pré-tratamento tem sido desenvolvida para aumentar o acesso das enzimas às fibras da lignocelulose com o objetivo de fracionar, solubilizar, hidrolisar e separar os componentes da celulose, hemicelulose e lignina. Podem ser utilizadas as seguintes técnicas: físicas (trituração e hidrotermólise), químicas (ácida, alcalina, solventes, ozônio), físico-químicas (explosão a vapor, explosão com amônia) e biológicas, entre outras (MOISER et al., 2005).

6.2. hidrólise enzimática.

Atualmente, as pesquisas visando a hidrólise enzimática da fração de celulose dos resíduos lignocelulósicos tem se intensificado. Vários processos para a produção de etanol de segunda geração a partir de diferentes resíduos agrícolas têm sido propostos. Alguns trabalhos têm proposto o aproveitamento também da fração de hemicelulose dos resíduos agrícolas para a obtenção de um processo sustentável e economicamente viável (GIRIO *et al.*, 2010; LAWFORD, ROUSSEAU, 2003).

Para a conversão de celulose o substrato deve passar por uma etapa de pré-tratamento que permite o desfibramento em nível microscópico da biomassa, ou seja, a destruição da matriz lignocelulósica, separando a mesma em seus componentes principais (celulose, hemicelulose e lignina), melhorando assim, a acessibilidade da biomassa às enzimas hidrolíticas e liberando a fração potencialmente fermentável. Na etapa de hidrólise enzimática a celulose presente na biomassa é convertida em monômeros de glicose (CHANG & HOLTZAPPLE, 2000).

Uma variedade de técnicas de pré-tratamento tem sido desenvolvida para aumentar o acesso das enzimas às fibras da lignocelulose com o objetivo de fracionar, solubilizar, hidrolisar e separar os componentes da celulose, hemicelulose e lignina. Podem ser utilizadas as seguintes técnicas: físicas (trituração e hidrotermólise), químicas (ácida, alcalina, solventes, ozônio), físico-químicas (explosão a vapor, explosão com amônia) e biológicas, entre outras. Em cada opção a biomassa é reduzida em tamanho e sua estrutura física é aberta (MOISER *et al.*, 2005). Todos estes processos melhoram a digestibilidade enzimática da biomassa em certa medida (GRETHLEIN, 1991; KAAR *et al.*, 1998; SAHA *et al.*, 2005; MARTÍN *et al.*, 2007).

A maioria dos métodos empregados no pré-tratamento são efetivos no que diz respeito a abertura das fibras e aumento da acessibilidade do polímeros pelas enzimas, entretanto a recuperação da xilana é baixa, já que este polímero é facilmente degradado durante o pré-tratamento. Assim a hidrólise da fração de hemicelulose requer um protocolo de pré-tratamento que mantenha a integridade da fração de hemicelulose para posteriormente ser recuperada pela etapa de hidrólise enzimática.

Dentre os pré-tratamentos químicos se destacam aqueles que utilizam ácido diluído a altas temperaturas, entretanto este tratamento hidrolisa a hemicelulose em seus açúcares (xilose, arabinose e outros) (SUN & CHENG, 2002), havendo em alguns casos uma alta formação de furano (KLINKE *et al.*, 2004). Devido ao baixo uso de químicos e consumo de energia, o pré-tratamento por explosão a vapor (*steam explosion*) tem sido um método atrativo (GARCIA-APARICIO, 2006), neste método, importantes variáveis podem ser exploradas (tempo do pré-tratamento, a temperatura e o tamanho das partículas) (BROWNELL & SADDLER, 1984). Persson e colaboradores (2009) observaram um aumento de 25 % na recuperação de arabinoxilana de alta massa molecular após a explosão a vapor (190 °C, 15 a 20 min) quando impregnou a casca de cevada com NaOH (1 %) antes do pré-tratamento. Tem sido descrito que o uso de catalisadores durante a explosão a vapor resulta em aumento na recuperação dos açúcares derivados da hemicelulose e previne formação de furano e fenóis (BROWNELL & SADDLER, 1984; KLINKE *et al.*, 2004).

Em trabalho realizado por Saha & Cotta (2008) foi observado um aumento de 2,4 vezes no processo de sacarificação de casca de arroz quando este foi pré-tratado com hidróxido de cálcio, não sendo detectada a formação de furfural ou hidroximetilfurfural.

A hemicelulose apresenta uma composição mais complexa do que a celulose, pois não forma uma estrutura cristalina como a celulose, assim, este polímero é mais acessível a degradação enzimática. A completa biodegradação da hemicelulose requer um coquetel de enzimas como endoxilanasas, β -xilosidase e algumas exoxilanasas como α -L-arabinofuranosidase, α -glucuronidase, acetil xilana esterases, ácido fenólico esterases e ácido p-cumárico esterases, que são necessárias para a hidrólise da cadeia de xilana (revisto por SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

No mercado há uma grande variedade de complexos enzimáticos direcionados para a hidrólise da celulose, estes complexos comerciais geralmente apresentam várias atividades enzimáticas que variam de acordo com o resíduo a ser hidrolisado. Vários destes complexos apresentam uma associação de celulasas e xilanasas, uma vez que a degradação da xilana aumenta a acessibilidade das celulasas às fibras de celulose (BERLIN *et al.*, 2007; OHGREN *et al.*, 2007). A hidrólise da fração de celulose da

fibra de milho pré-tratada por explosão a vapor apresentou aumento no rendimento da hidrólise enzimática quando se utilizou uma mistura de enzimas comerciais com atividades de amilase, endoxilanase e celulase (HESPELL, 1996). As misturas enzimáticas apresentam atividades de xilanases, FPAses e CMCases (XIMENES *et al.*, 2007).

No trabalho realizado por Carapito e colaboradores (2009), três genes de *Fusarium graminearum* que codificam uma endoxilanase, uma β -xilosidase e uma arabinofuranosidase foram expressos na bactéria *Escherichia coli*. Misturas enzimáticas contendo as três enzimas recombinantes foram testadas na hidrólise da xilana obtida de aveia. Os melhores resultados foram obtidos com a mistura enzimática contendo as três enzimas, promovendo um aumento de 14 a 60 vezes na concentração de D-xilose, quando comparado com a utilização das enzimas isoladamente, demonstrando assim a importância da utilização das misturas reacionais com diferentes atividades enzimáticas.

2. OBJETIVO

O presente projeto tem como objetivo analisar a eficiência de diferentes misturas enzimáticas do fungo *H. grisea* na hidrólise enzimática do BCA pré-tratado com diferentes pré-tratamentos.

2.1. Objetivos específicos:

1. Produzir de enzimas pelo fungo *H. grisea* cultivado em BCA.
2. Produzir das enzimas recombinantes HXYN2r e CBH1.2r
3. Escolher uma melhor condição de Pré-tratamento para hidrólise do BCA
4. Formular misturas enzimáticas com diferentes perfis enzimáticos
5. Escolher a formulação enzimática mais eficaz para hidrólise enzimática do BCA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MICRORGANISMOS UTILIZADOS

A linhagem do fungo *H. grisea* utilizada no presente trabalho foi isolada de compostagem na Universidade Federal de Viçosa (MG) por Chaves (1982).

Os transformantes da levedura *P. pastoris* GS115-xyn2 (CARVALHO, 2007) e GS-115-cbh1.2 (OLIVEIRA, 2007) foram utilizados neste trabalho para a produção das enzimas recombinantes HXYN2 (HXYN2r) e CBH1.2 (CBH1.2r), segundo metodologia descrita por Carvalho e colaboradores (2007).

3.2. SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

Os seguintes substratos lignocelulósicos utilizados neste trabalho foram Bagaço de cana de açúcar (BCA), Bagaço de cana de açúcar explodido a vapor (BCAse) e farelo

de trigo (FT). A amostra de BCA foi cedida pelo Prof. Dr. Américo José dos Santos Reis, da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás. A amostra de BCAs_e foi cedida por Carlos Fernandes Chagas (Bioenzima, Ltda, Caruaru, Pernambuco).

3.3. SOLUÇÕES

As soluções foram preparadas com água bidestilada e quando necessário foram esterilizadas por autoclavação (120 °C, 1 atm, 20 min) ou filtração em membrana com poros de 0,2 µm (Millipore®). As soluções foram agrupadas de acordo com a metodologia na qual foram empregadas.

3.3.1. Soluções para a Determinação da Atividade Enzimática

3.3.1.1. Solução de Ácido Dinitrosalicílico – DNS

Ácido 3,5-Dinitrosalicílico	0,75 % (p/v)
NaOH	1,4 % (p/v)
Tartarato de Sódio e Potássio	21,6 % (p/v)
Fenol	0,54 % (v/v)
Metabissulfito de Sódio	0,58 % (p/v)

Inicialmente, o DNS e o NaOH foram dissolvidos em água bidestilada. Posteriormente adicionou-se o tartarato de sódio e potássio, o fenol aquecido a 50 °C e o metabissulfito de sódio. A solução final foi titulada com HCl 0,1 M utilizando fenolftaleína como indicador.

3.3.1.2. Tampão Citrato de Sódio 0,05 M pH 4,8

Ácido Cítrico	50 mM
---------------	-------

Citrato Trissódico	50 mM
--------------------	-------

3.3.1.3. Tampão Citrato de Sódio 0,05 M pH 6,0

Ácido Cítrico	50 mM
---------------	-------

Citrato Trisódico	50 mM
-------------------	-------

Uma solução foi adicionada na outra até atingir o pH desejável.

3.3.1.4. Solução de Xilana “oat spelt” 1 % (p/v)

A xilana “oat-spelt” foi dissolvida em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8 após aquecimento da solução em microondas durante 1 min, agitação manual e repouso durante 1 min. Este procedimento foi repetido três vezes e após, a solução foi submetida a centrifugação a 11.200 g durante 10 min. O sobrenadante foi estocado a -20 °C e utilizado para a dosagem da atividade enzimática.

3.3.1.5. Xilose - 4,2 mg/mL

Xilose	0,42 % (p/v)
--------	--------------

A solução foi preparada em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8.

3.3.1.6. Solução de Carboximetilcelulose (CMC)

CMC	4 % (p/v)
-----	-----------

A solução foi preparada em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8, sendo aquecida no microondas até solubilização completa do soluto

3.3.1.7. Solução de Avicel

Avicel	1,0 % (p/v)
--------	-------------

A solução foi preparada, no momento do uso, com água destilada sob agitação.

3.3.2. Soluções para Eletroforese de Proteínas em Gel Desnaturante de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

3.3.2.1. Acrilamida:Bis-acrilamida (39:1)

Acrilamida	39,0 % (p/v)
Bis-acrilamida	1,0 % (p/v)

A solução foi filtrada em papel de filtro e estocada ao abrigo da luz a 4 °C.

3.3.2.2. Ácido Tricloroacético (TCA) 100 % (p/v)

Um volume de 1 mL de água destilada foi adicionado a 50 g de ácido tricloroacético. Após todo o ácido ser dissolvido, adicionou-se água destilada suficiente para um volume final de 50 mL e a solução obtida foi estocada a 4°C.

3.3.2.3. Tampão de Amostra (2x)

Tris-HCl pH 6,8	0,2 M
SDS	4 % (v/v)
β -Mercaptoetanol	4 % (v/v)
Glicerol	4 % (v/v)
Azul de bromofenol	0,1 % (p/v)

3.3.2.4. Tampão de Corrida – Tris-Glicina (5x)

Trizma-base	1,51 % (p/v)
-------------	--------------

Glicina	7,2 % (p/v)
---------	-------------

No momento do uso, foi adicionado SDS para a concentração final de 0,1 % (p/v).

3.3.3. Revelação das Proteínas por Coloração com Azul de Coomassie

3.3.3.1. Solução Corante

Azul de Coomassie (R- 250)	0,1 % (p/v)
----------------------------	-------------

Metanol	45 % (p/v)
---------	------------

Ácido Acético Glacial	10 % (p/v)
-----------------------	------------

Água destilada (q.s.p)	
------------------------	--

3.3.3.2. Solução Descorante

Metanol	30 % (v/v)
---------	------------

Ácido Acético Glacial	7 % (v/v)
-----------------------	-----------

Água destilada (q.s.p)	
------------------------	--

3.3.4. Soluções para Preparo dos Meios de Cultura

3.3.4.1. Biotina 500x

Biotina	0,02 % (p/v)
---------	--------------

Água destilada (q.s.p)

3.3.4.2. Ampicilina

Ampicilina	100 µg/mL
------------	-----------

Água destilada (q.s.p)

3.3.4.3. Glicerol

Glicerol	10 % (v/v)
----------	------------

Água destilada

3.3.4.5. Metanol

Metanol	50 % (v/v)
---------	------------

Água destilada (q.s.p)

3.3.5. Soluções para a Quantificação de Proteínas

3.3.5.1. Reagente de Bradford

Azul de Coomassie	10 % (v/v)
-------------------	------------

Etanol 95 % (v/v)	5 % (v/v)
-------------------	-----------

Ácido Fosfórico	10 % (v/v)
-----------------	------------

Água destilada (q.s.p.)

3.3.5.2. Solução de Soroalbumina Bovina

Soro albumina Bovina (Sigma®)	100 µg/mL
NaOH	0,1 M

3.3.6. Soluções para Realização dos Pré-tratamentos

3.3.6.1. Solução de Clorofórmio Metanol

Clorofórmio	50 % (v/v)
Metanol	50 % (v/v)

3.3.6.2. NaOH 0,1 M

NaOH	0,1 M
NaBH ₄	1 mg/mL

3.3.6.3. NaOH 1 M

NaOH	1 M
NaBH ₄	1 mg/mL

3.3.6.4. NaOH 4 M

NaOH	4 M
NaBH ₄	1 mg/mL

3.4. Meios de Cultura

Os meios de cultura foram esterilizados por autoclavagem (120 °C, 1 atm, 20 min), a glicose foi autoclavada separadamente (20 min, 0,5 atm). As soluções de metanol, glicerol, biotina, ampicilina, foram esterilizadas por filtração em membrana com poros de 0,2 µm (Millipore®).

3.4.1. Meio Mínimo – MM (Pontecorvo *et al.*, 1953)

NaNO ₃	0,6 % (p/v)
KCl	0,05 % (p/v)
KH ₂ PO ₄	0,15 % (p/v)
ZnSO ₄	0,001 % (p/v)
FeSO ₄	0,001 % (p/v)
pH 6,8	

3.4.2. Meio Ágar Aveia – AA

Farinha de aveia infantil (Quaker)	4,0 % (p/v)
Ágar	1,5 % (p/v)

3.4.3. Meio YPD

Peptona caseína	2 % (p/v)
Extrato de levedura	1 % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)
Ampicilina	50 µg/mL

Ágar bacteriológico	2 % (p/v)
---------------------	-----------

3.4.4. Meios BMGY-U/BMMY-U

Uréia	1,34 % (p/v)
Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona	2 % (p/v)
Fosfato de potássio pH 5,0	100 mM
Biotina	4×10^{-5} % (p/v)
Glicerol/Metanol	1 % (p/v)
Ampicilina	50 µg/mL

3.4.5. Meio de Seleção – MGM

YNB sem aminoácidos (Invitrogen [®])	1,34 % (p/v)
Glicerol	1 % (p/v)
Biotina	4×10^{-5} % (p/v)

3.5. Substratos para Determinação das Atividades Enzimáticas

Na dosagem da atividade xilanolítica foi utilizada a xilana “oat-spelt” (xilana extraída de aveia - Sigma[®]). Na dosagem da atividade celulolítica foram utilizados os seguintes substratos: celulose micro-cristalina (CMC de baixa viscosidade – Sigma[®]), celulose semi-cristalina (Avicel - Sigmacell – Sigma[®]) e papel de filtro Whatman nº1.

3.6. Marcador de Massa Molecular para Proteínas

Foi utilizado o kit de calibração para eletroforese, de baixa massa molecular – Amersham™ AMW Calibration Kit For SDS Eletroforesis (GE Healthcare).

97,0 kDa – Fosforilase B – músculo de coelho

66,0 kDa – Soroalbumina bovina

45,0 kDa – Ovoalbumina – ovo branco

30,0 kDa – Anidrase carbônica – eritrócitos bovinos

20,1 kDa – Inibidor de tripsina - soja

14,4 kDa – α -Lactoalbumina – leite bovino

3.7. β -xilosidase (XYNB2)

A enzima recombinante XYNB2 (XYNB2r) da bactéria *Caulobacter crescentus* foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Rita de Cássia Garcia Simão (Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas - CCMF). A XYNB2r foi produzida pela *Escherichia coli* e apresentou pH ótimo 6,0 e temperatura ótima de 55 °C.

4. METODOLOGIA

4.1. Manutenção e Cultivo dos Fungos *H. grisea* e *P. pastoris*

O fungo *H. grisea* foi mantido em meio Ágar Aveia (AA) (3.4.2). Para a produção de esporos, o fungo foi semeado em meio AA, incubado por 4 dias a 42°C e

deixado à temperatura ambiente por mais 3 dias. Os esporos foram ressuspensos em solução salina 0,15 M e contados em câmara de Neubauer.

Para a preservação das células de *P. pastoris*, estas foram repicadas em meio YPD (3.4.3) sólido, incubadas por três dias a 30 °C e posteriormente mantidas a 4 °C. Para a seleção das células que mantêm o cassete de expressão integrado no genoma, a cada seis meses estas foram repicadas em meio MGM (3.4.5) e incubadas a 30 °C por três dias.

4.2. Preparo dos Substratos Lignocelulósicos

Os substratos BCA e FT foram lavados em água corrente por 5 min, mantidos submersos na água por 24 h. Para a secagem dos substratos estes foram mantidos a 50 °C por 3 h e posteriormente mantidos a 30 °C por 2 dias. O BCAsé foi seco a 30 °C por 2 dias.

Todos os substratos (BCA, BCAsé e FT) foram moídos em moinho de facas e peneirados em peneira de 20 mesh.

4.3. Produção de Celulases e Xilanases pelo Fungo *H. grisea* Cultivado em FT e BCA

Para a produção de enzimas, $3,5 \times 10^5$ esporos/mL do fungo foram inoculados em 200 mL de MM (3.4.1) acrescido de BCA ou FT na concentração final de 3 %. O cultivo foi realizado a 42 °C, sob agitação de 120 rpm por 48 e 192 h em FT e 216 h em BCA. O sobrenadante de cultura coletado foi analisado quanto à atividade celulolítica e xilanolítica pela metodologia do DNS (4.5.2) e quanto ao perfil de proteínas por SDS-PAGE (4.6).

4.4. Produção das Enzimas Recombinantes pelos Transformantes de *P. pastoris*

Para a produção da enzima HXYN2r e CBH1.2r em frasco, os transformantes foram inoculados em Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio BMGY-U (3.4.4), incubados a 30 °C sob constante agitação (180 rpm) até atingir a OD₆₀₀ de 20. As culturas foram precipitadas por centrifugação a 3.000 rpm por 15 min, lavadas com água destilada estéril, ressuspensas em água destilada estéril e inoculadas em Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio BMMY-U (3.4.4). As culturas foram incubadas a 30 °C sob constante agitação (180 rpm) durante 120 h. A cada 24 h adicionou-se 1 % de metanol ao meio de cultura e foram retiradas alíquotas para o monitoramento da produção das enzimas e para dosagem das atividades de xilanase e celulase pelo método de açúcares redutores – DNS (Miller, 1959). Após 120 e 96 h de cultivo, as culturas foram submetidas à centrifugação (3000 g, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante de cultura analisado quanto ao teor de proteínas (Bradford, 1976), dosagem da atividade xilanolítica (4.5) e perfil de proteínas em SDS-PAGE. As dosagens de xilanase e proteínas totais foram realizadas em triplicata. O sobrenadante de cultura foi armazenado a – 20 °C e utilizado com fonte de HXYN2r e CBH1.2r.

4.5. Determinação das Atividades Xilanolítica e Celulolítica pelo Método dos Açúcares Redutores (MILLER, 1959).

As atividades enzimáticas de xilanase, celulase total (FPase), endoglicanase (CMCase), exoglicanase (CBH), foram avaliadas segundo metodologia proposta por Miller (1959). A quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método do DNS e os substratos utilizados foram: xilana *oat spelt*, papel de filtro, CMC e avicel respectivamente. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como aquela que libera um μ mol do açúcar redutor correspondente por min nas condições do experimento. Os ensaios de atividade enzimática da primeira bateria de experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.1. Dosagem da Atividade Xilanolítica

Este ensaio foi realizado utilizando-se como substrato a solução de xilana “oat spelt” 1 % (p/v) (3.3.1.4). Adicionou-se 50 µL da amostra em 450 µL do substrato seguindo-se incubação a 50 °C por 5 min. A quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método do DNS, onde foi adicionado 750 µL de DNS (3.3.1.1), as amostras foram fervidas por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm. Os resultados foram expressos em unidades enzimáticas, definidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto sobre as condições do experimento. Para a determinação da atividade de xilanase pelo método de DNS, primeiramente foi realizada uma curva padrão de xilose nas concentrações de 0,3 a 4,2 mg/mL.

4.5.2. Dosagem da Atividade Celulolítica

4.5.2.1. FPase

Expressa a atividade de celulase total, utilizando papel de filtro Whatman nº 1 (1 cm x 6 cm – 50 mg) como substrato.

A atividade de FPase foi determinada homogeneizando-se 500 µL de amostra, 500 µL de tampão citrato pH 4.8 (3.3.1.2) e uma tira de papel de filtro (1x6 cm). A solução foi mantida a 50 °C por 1 h e, em seguida, a reação foi interrompida em banho de água fria. A quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método do DNS, onde foi adicionado 500 µL de DNS, as amostras foram fervidas por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm.

4.5.2.2. CMCase

Expressa a atividade de endoglicanase, utilizando CMC 1 % como substrato.

A atividade de CMCase foi determinada homogeneizando-se 250 μ L de amostra e 250 μ L da solução de CMC 4 % (3.3.1.6). A solução foi mantida a 50 °C por 1 h e em seguida, a reação foi interrompida em banho de água fria. A quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método do DNS, onde foi adicionado 500 μ L de DNS, as amostras foram fervidas por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm.

4.5.2.3. Avicelase

Expressa a atividade de exoglicanase, utilizando avicel 1 % como substrato.

A atividade de Avicelase foi determinada homogeneizando-se 250 μ L de amostra e 500 μ L da solução de Avicel 1 % (3.3.1.7). A solução foi mantida a 50 °C por 1 h sob agitação constante e, em seguida, a reação foi interrompida em banho de água fria. Em seguida, a solução foi submetida à centrifugação a 11.200 g durante 10 min a 4 °C. Para a quantificação do teor de açúcares redutores liberados, 250 μ L do sobrenadante foi homogeneizado com 700 μ L de DNS, as amostras foram fervidas por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm.

4.5.2.4. Curva Padrão

A curva padrão para os testes de FPase e CMCase foi estabelecida utilizando-se glicose nas concentrações de 1-20 μ moles/mL. A curva padrão para o teste de Avicelase foi estabelecida utilizando glicose nas concentrações de 0,15 a 1,5 mg/mL. As leituras foram plotadas em um gráfico (Absorbância X Concentração de glicose). Obtendo-se assim a equação da reta que foi utilizada nos cálculos de atividade enzimática.

4.5.3. Dosagem Protéica

A concentração de proteínas das amostras foi determinada por método colorimétrico conforme descrito por Bradford (1976). A curva de calibração padrão foi determinada utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA-Sigma®). Neste método, 100 µL de amostra foi homogeneizado com 1 mL de Reagente de Bradford e, após incubação a temperatura ambiente por 15 min, a quantidade de proteína foi determinada por leitura de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

4.5.4. Dosagem de Açúcar Redutor Total e Glicose

A quantificação do teor de açúcar redutor total (ART) foi ensaiada pelo método do DNS incubando 50 µL da amostra, 450 µL de tampão citrato de sódio (pH 4,8 50 mM) e 750 µL de DNS (3.3.1.1), a 100 °C por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm. Para a determinação do teor de ART, primeiramente foi realizada uma curva padrão de xilose nas concentrações de 0,3 a 4,2 mg/mL e de acordo com esta as absorbâncias foram convertidas em mg/mL de ART liberados.

O teor de glicose nas amostras foi determinado utilizando o kit de glicose oxidase (DOLES Reagentes®) seguindo as orientações do fabricante.

4.6. Eletroforese de Proteínas em Gel Desnaturante de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel desnaturante de poliacrilamida segundo o método descrito por Laemmli (1970).

4.6.1. Preparo das Amostras

As amostras (0,9 mL) a serem analisadas no gel de poliacrilamida (), foram incubadas com 0,1 mL de TCA (3.3.2.2) por 1 h a 4 °C em banho de gelo e água. Após a incubação, as amostras foram submetidas à centrifugação (11.200 g, 10 min a 4 °C), o precipitado foi lavado com acetona gelada, seco e ressuspenso em tampão de amostra 2x. As amostras foram mantidas a 100 °C por 5 min, para desnaturação, e posteriormente transferidas para banho de gelo.

4.6.2. Corrida Eletroforética

Os géis foram preparados conforme descrito a seguir:

Tabela 4. Preparo dos géis para SDS-PAGE.

Soluções	Concentrador 4 %	Separador 13 %
Acrilamida:Bis-acrilamida (39:1)	500 µL	4,1 mL
Tampão Tris-HCl pH 8,8	-	3,1 mL
Tampão Tris-HCl pH 6,8	630 µL	-
Água destilada	3, 80 mL	5,150 mL
SDS 10 %	50 µL	125 µL
Persulfato de amônia 10 %	50 µL	125 µL
TEMED	5 µL	5 µL

Para a corrida eletrofóretica, as amostras foram aplicadas em gel separador (13 %), tampão de corrida (1x) acrescido de 0,1 % de SDS com voltagem de 100 V, utilizando o sistema de eletroforese vertical.

4.6.3. Coloração com *Coomassie Blue*

Ao término da corrida eletroforética, as bandas protéicas presentes no gel foram visualizadas após incubação deste por 18 h, sob agitação, na solução corante preparada com *Coomassie Blue* (3.3.3.1), seguida pela descoloração incubando o gel por 30 min, sob agitação, na solução descorante (3.3.3.2).

4.7. Pré-tratamento do BCA

As reações de hidrólise enzimática foram realizadas utilizando BCA pré-tratado. Para a escolha do melhor protocolo de pré-tratamento o BCA foi submetido a cinco tipos de pré-tratamento: tratamento 1 (hidróxido de sódio), tratamentos 2, 3 e 4 (peróxido de hidrogênio) e tratamento 5 (*steam explosion*).

4.7.1. Tratamento 1 (PENG *et al.*, 2009)

O BCA foi inicialmente lavado com etanol 95 %, utilizando uma quantidade suficiente para imergir a amostra de BCA, deixando uma hora sob agitação em agitador magnético, após isso, foi filtrado a vácuo e a fração sólida coletada e seca a 45 °C por 24 h. Posteriormente o BCA (10 g) foi incubado com H₂O na proporção de 1:25 (g/mL) a 50 °C por 3 h a 150 rpm e posteriormente filtrado em bomba de vácuo. A fração sólida (FS) foi sucessivamente tratada com NaOH a 1 %, 3 %, 5 % e 8 % nas mesmas condições descritas anteriormente. A FS coletada após o tratamento com NaOH a 8 % foi lavada com água e seca a 60 °C. As frações líquidas (FLs) coletadas após cada tratamento foram unidas (FL), o pH ajustado para 5,5 com HCl 6M e concentrada, sob

circulação de ar a 30 °C, para aproximadamente 50 mL. A hemicelulose presente na FL concentrada foi precipitada com etanol a 15 % (v/v) à temperatura ambiente sob constante agitação. O precipitado recuperado após filtração a vácuo foi lavado com etanol 70 % e seco a temperatura ambiente. O filtrado obtido foi novamente concentrado, sob circulação de ar a 30 °C, para 30 mL e a hemicelulose precipitada com etanol 30 % e processada da mesma maneira descrita anteriormente. O filtrado obtido foi novamente concentrado para 20 mL e a hemicelulose precipitada com etanol 60 % e processada da mesma maneira descrita anteriormente. As frações de hemicelulose recuperadas após cada etapa de precipitação foram unidas e solubilizadas em 40 mL de H₂O.

4.7.2. Tratamento 2 (Brienzo *et al.*, 2009)

O BCA foi inicialmente lavado com etanol 95 %, utilizando uma quantidade suficiente para imergir a amostra de BCA, deixando uma hora sob agitação em agitador magnético, após isso, foi filtrado a vácuo e a fração sólida coletada e seca a 45 °C por 24 h. Posteriormente, o BCA foi incubado com EDTA 0,2 % (w/v) por 1 h a 90 °C para remoção de cátions, filtrado a vácuo e seco a temperatura ambiente por 24 h. Posteriormente, o BCA (10 g) foi incubado em peróxido de hidrogênio 6 % em um volume final de 200 mL, por 4 h a 20 °C, pH 11,6. Posteriormente, a amostra foi filtrada a vácuo. O pH da FL coletada foi ajustado para 6 com HCl 6M. A FL foi concentrada, sob circulação de ar a 45 °C, homogeneizada com etanol 95 % e mantida a -20 °C durante 16 h. A hemicelulose precipitada foi recuperada após centrifugação por 15 min a 10.000 rpm, lavada 4 vezes com etanol 70 %. O precipitado foi seco sob circulação de ar a 45 °C e ressuspenso em 40 mL de água.

4.7.3. Tratamento 3 (Saha *et al.*, 2009)

O BCA foi inicialmente incubado com EDTA 0,2 % (w/v) por 1 h a 90 °C para remoção de cátions, filtrado a vácuo e seco a temperatura ambiente por 24 h.

Posteriormente, o BCA (10 g) foi incubado em H₂O₂ 2.5 % (w/v), o pH ajustado para 11,5 com NaOH 6 M, e mantido sob agitação de 220 rpm por 24 h a 35 °C. Posteriormente a amostra foi filtrada a vácuo, a FS foi recuperada, seca a 45 °C por 24 h e ressuspensa em 40 mL de água. A FL foi coletada e estocada a -4 °C.

4.7.3. Tratamento 4 (GORSHOVA *et al.*, 1996)

Inicialmente, o BCA foi macerado em nitrogênio líquido, ressuspensa (50 g) em água deionizada e posteriormente submetido à centrifugação (14.000 rpm por 10 min). O precipitado foi lavado por mais duas vezes em água, uma em etanol 70 %, duas em solução de clorofórmio:metanol (3.3.6.1) e uma em acetona gelada. O precipitado obtido foi seco a temperatura ambiente e utilizado para a extração da fração de hemicelulose do BCA como descrito a seguir.

60 mg da amostra foi incubada em 20 mL de NaOH 0,1 M (3.3.6.2) e mantido sob agitação constante de 150 rpm por 2 h à temperatura ambiente. Posteriormente, a amostra foi submetida à centrifugação (20 min a 3.500 rpm) e o sobrenadante coletado. O precipitado foi incubado por mais duas vezes em NaOH 1 M (3.3.6.3) e 4 M (3.3.6.4) como descrito anteriormente. Ao final, os sobrenadantes coletados nas etapas de incubação foram unidos, dialisados contra água deionizada (24 h a 4 °C) e liofilizados (liofilizador mod. enterprise 1, Terroni[®]).

4.8. Hidrólise Ácida do BCA para Análise do Teor de Celulose e Hemicelulose

A hidrólise ácida do BCA consiste na incubação do BCA com ácido sulfúrico com o objetivo de hidrólise da fração de celulose e hemicelulose presente na amostra e a liberação dos respectivos monômeros. Os açúcares liberados são quantificados indicando o teor de celulose e hemicelulose presente na amostra. Para a estimativa do teor aproximado de xilana (TAX) nas amostras, os valores de xilose foram determinados subtraindo a concentração de glicose da concentração de ART (**TAX = ART – glicose**).

Para determinação da condição de hidrólise ácida mais adequada para análise de ART e glicose, foi realizado um experimento com 5 diferentes condições, variando o tempo e a concentração de H_2SO_4 , de acordo com a **Tabela 5**. A reação de hidrólise ácida dos ensaios de 1 a 4 foram realizadas incubando 300 mg de xilana *oat spelt* com 6 mL de ácido sulfúrico (1,5-3 %) por 1-2 h a 121 °C. A reação de hidrólise ácida do ensaio 5 foi realizada incubando 300 mg de xilana *oat spelt* com 6 mL de ácido sulfúrico 72 % por 7 min, após isso a concentração foi ajustada para 3 % adicionando-se água destilada e novamente incubada por 1 h a 121 °C. Os açúcares redutores totais (ART) liberados foram dosados por DNS (Miller, 1959) (4.5.4) e a glicose liberada foi dosada pelo kit glicose enzimática (4.5.4).

Tabela 5. Condições da hidrólise ácida: variação na concentração de H_2SO_4 e tempo.

Hidrólise ácida				
Substrato (300 mg)	Ensaio	% de H_2SO_4	Tempo (min)	Temperatura (°C)
Xilana <i>oat spelt</i>	1	1,5	120	121
Xilana <i>oat spelt</i>	2	2	120	121
Xilana <i>oat spelt</i>	3	2,5	120	121
Xilana <i>oat spelt</i>	4	3	60	121
Xilana <i>oat spelt</i>	5	-	120	121

4.9. Hidrólise Enzimática do BCA Pré-tratado

As reações de hidrólise enzimática da fração de hemicelulose do BCA foram realizadas utilizando o sobrenadante de cultura do fungo *H. grisea* (sHg) cultivado em BCA e FT (4.3) suplementado com as seguintes enzimas recombinantes: HXYN2r, CBH1.2r e BXYL.

As reações de hidrólise foram realizadas em Erlenmeyer de 125 mL contendo BCA pré-tratado com *steam explosion* (BCAse) a 2 %, enzimas do sHg, suplementado com enzimas recombinantes e tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5 para um volume final de 10 mL, a reação foi mantida a 50 °C por 48 h sob constante agitação de 120 rpm. Após esse período a amostra foi filtrada sob pressão em papel Whatmann n. 1 e o filtrado analisado quanto à concentração de ART (4.5.4) e glicose (4.5.4)

Para a determinação da concentração de xilose liberada nas reações de hidrólise enzimática, o valor de glicose foi subtraído do valor de ART. Para o cálculo do rendimento de hidrólise enzimática da fração de xilana residual no BCAse considerou-se os valores teóricos de 6 a 8 % (KOVACS *et al.*, 2009).

4.9.1. Reações de Hidrólise para Escolha da Mistura do sHg

Inicialmente as reações de hidrólise foram realizadas com o objetivo de escolher a melhor composição do sHg. Utilizou-se diferentes proporções do sHg cultivado em FT 48 h (atividade máxima de avicelase) (sHg/avicelase), FT 196 h (atividade máxima de xilanase) (sHg/xilanase), BCA 216 h (atividades máximas de FPAse e CMCase) (sHg/FPAse-CMCase) de acordo com a tabela 6. Para realizar esta análise foram utilizadas diferentes concentrações do sHg suplementado com as enzimas recombinantes. A melhor formulação do sHg foi analisada em reações de hidrólise contendo o BCA e xilana *oat spelt*.

4.9.2. Efeito da Suplementação do sHg com Diferentes Concentrações das Enzimas Recombinantes

O efeito da suplementação do sHg com o sobrenadante de cultura da *P. pastoris* contendo as enzimas recombinantes foi analisado por meio de uma bateria de experimentos de hidrólise enzimática com diferentes concentrações das enzimas HXYN2r, CBH1.2r e XYL2r utilizando do planejamento fatorial completo 2³,

incluindo 6 pontos axiais e 6 repetições no ponto central, totalizando 20 ensaios de acordo com a Tabela 8. Os valores das concentrações enzimáticas utilizadas para cada experimento podem ser observados na **Tabela 7**.

Tabela 6. Formulações enzimáticas utilizadas na hidrólise do BCA pré-tratado.

Volume das amostras enzimáticas (mL)						
Ensaio	sHg/xilanase	sHg/avicelase	sHg/FPase- CMCase	HXYN2r	CBH1.2r	XYNB2r
1	1	-	-	-	-	-
2	1	-	-	2,5	1,542	0,00156
3	0,5	0,5	-	2,5	1,542	0,00156
4	0,5	-	0,5	2,5	1,542	0,00156
5	0,5	0,25	0,25	2,5	1,542	0,00156
6	0,5	0,35	0,15	2,5	1,542	0,00156
7	0,5	0,15	0,35	2,5	1,542	0,00156

Tabela 7. Concentrações das enzimas recombinantes utilizadas na hidrólise do BCA pré-tratado.

Variáveis		-1,68	-1	0	+ 1	+ 1,68
HXYN2r	X1	361,37	600	950	1300	1538,63
CBH1.2r	X2	0,757	1,2	1,85	2,5	2,943
XYNB2r	X3	0,33	0,5	0,75	1	1,17

Tabela 8. Delineamento Composto Central Rotacional do experimento de hidrólise do BCA pré-tratado.

Ensaio	HXYN2r	CBH1.2r	XYNB2r
1	+	+	+
2	+	+	-
3	+	-	+
4	+	-	-
5	-	+	+
6	-	+	-
7	-	-	+
8	-	-	-
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

4.9.3. Cinética Enzimática

Com o objetivo de verificar a cinética do rendimento de hidrólise do BCA pré-tratado com a melhor formulação de enzimas, foram coletadas alíquotas a cada 6 h durante 48 h. Posteriormente as alíquotas foram analisadas quanto a concentração de ART e glicose (4.5.4).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção de Xilanases e Celulases pelo Fungo *H. grisea*

No trabalho desenvolvido por Melo (2010) a cinética de produção de xilanases e celulases pelo fungo *H. grisea* foi analisada no cultivo do fungo em BCA e FT. Os resultados demonstraram que as atividades máximas foram observadas após diferentes tempos de cultivo em BCA e FT a 3 %. Por análises de zimograma, observou-se que no sobrenadante de cultura contendo a atividade máxima de xilanase destacou-se uma xilanase de 23 kDa correspondente a endoxilanase HXYN2, enquanto que no sobrenadante de cultura contendo as atividades máximas de CMCase e FPase se destacou uma celulase de 47 kDa correspondente a celobiohidrolase CBH1.2. Um dado interessante nos resultados de Melo (2010) foi que o perfil de xilanases e celulases observado nos sobrenadantes de cultura em FT e BCA são diferentes.

No presente trabalho, o fungo *H. grisea* produziu celulases e xilanases quando cultivado na presença de FT e BCA na concentração de 3 %. De acordo com os resultados obtidos por Melo (2010) foram coletados os seguintes sobrenadantes de cultura: sHg/xilanases (192 h de cultivo em FT 3 %, contendo atividade máxima de xilanases em FT), sHg/FPase-CMCase (216 h em BCA 3 %, contendo as atividades máximas de CMCases e FPases em BCA) e sHg/avicelases (48 h em FT, contendo atividade máxima de avicelases em FT). As dosagens enzimáticas e o perfil protéico dos sobrenadantes de cultura coletados após estes períodos podem ser observados na **Tabela 9** e na Figura 5.

Tabela 9. Produção de enzimas pelo *H. grisea*.

Sobrenadante de cultura	Tempo (h)	Substrato	Atividade (U/mL)				Proteínas totais* (µg/mL)
			Xilanases	CMCases	FPases	Avicelases	
sHg/FPase-CMCase	216	BCA 3 %	19,000	2,150	0,12	0,08	2451,99
sHg/avicelases	48	FT 3 %	0,496	1,245	0,118	0,168	682,03
sHg/xilanases	192	FT 3 %	24,057	3,553	0,232	0,03	3674,20

* A dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (4.5.3).

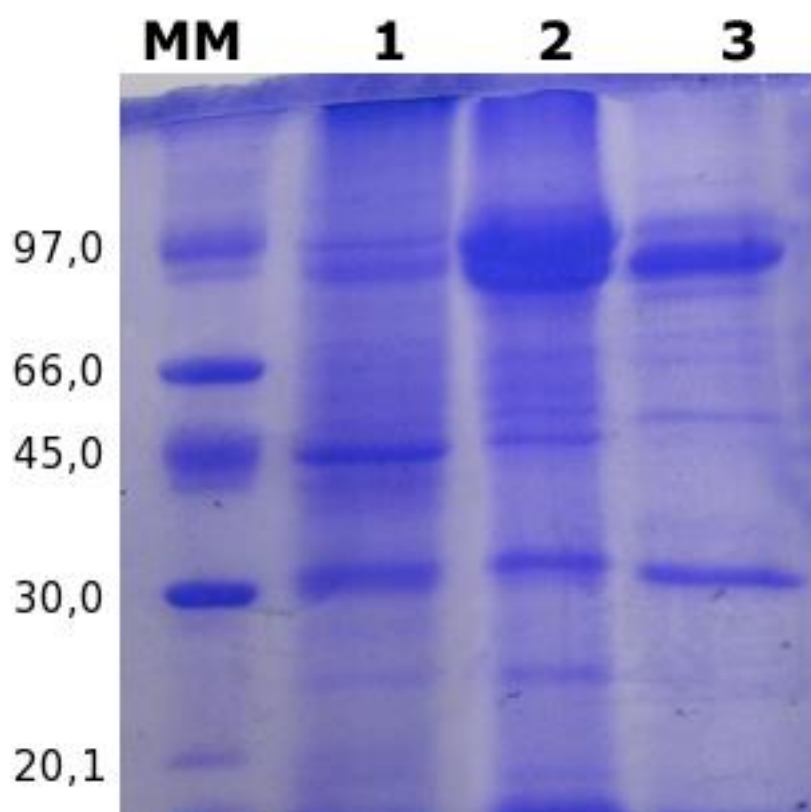


Figura 5. Perfil proteico dos sobrenadantes de cultura do fungo *H. grisea* cultivado em BCA e FT. MM: marcador de massa molecular: AMW Calibration Kit For SDS Eletroforesis (GE Healthcare);, 1: sHg/FPase-CMCCase, 2: sHg/xilanase, 3. sHg/avicelase.

5.2. Produção das Enzimas Recombinantes HXYN2r e CBH1.2r pela Levedura *P. pastoris*

As enzimas recombinantes HXYN2r (endoxilanase HXYN2) e CBH1.2r (celobiohidrolase CBH1.2) foram secretas pelos transformantes da levedura *P. pastoris* GS/HXYN2 e GS/CBH1.2. Estes transformantes foram cultivados sob indução com metanol nas condições descritas por Carvalho (2007) e Oliveira (2007) (4.4).

No trabalho de Carvalho (2007) foi realizada a cinética de produção de HXYN2r em frasco, e o resultado obtido indicou que a produção máxima da enzima ocorreu após

96 h de indução. No presente trabalho a produção da enzima HXYN2r foi realizada até 120 h onde se obteve 196 U/mL de xilanase (**Figura 6**) (**Tabela 8**).

No trabalho desenvolvido por Oliveira (2007), foi realizada a cinética de produção da enzima CBH1.2r. Os resultados demonstraram que o pico de produção da enzima CBH1.2r foi observado após 96 h de cultivo, atingindo a produção máxima de CMCase de 0,03 U/mL. No presente trabalho, o sobrenadante de cultura foi coletado após 96 h de indução e apresentou atividade de CMCase similar (**Figura 6**) (**Tabela 10**).

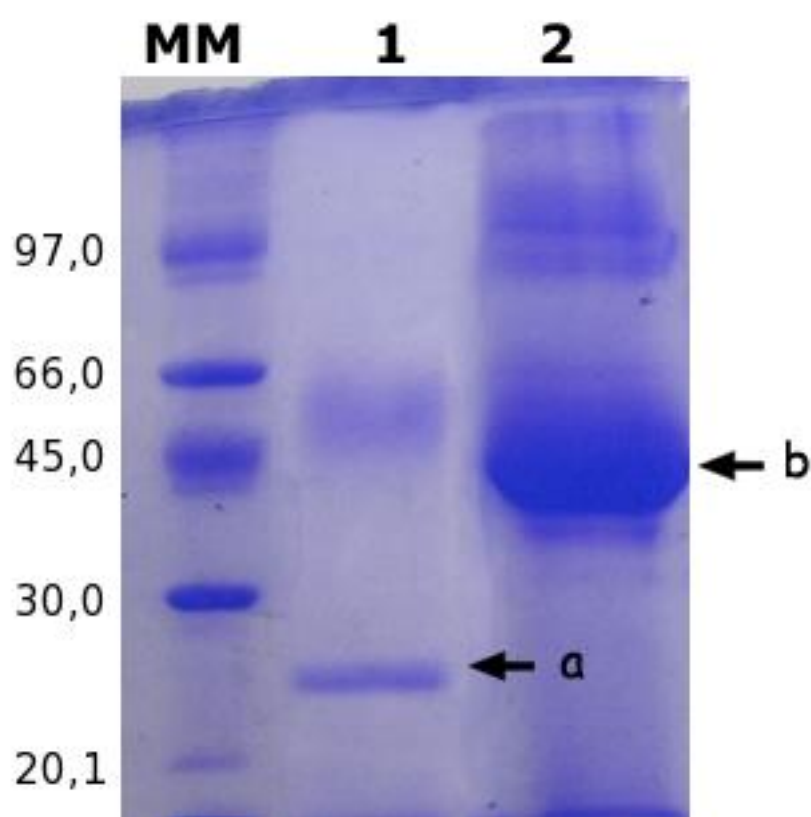


Figura 6. Perfil proteico dos sobrenadantes de cultura dos transformantes (a) GS115/Hxyn2 e (b) GS115/cbh1.2 de *P. pastoris* cultivados sob indução com metanol. MM: marcador de massa molecular: AMW Calibration Kit For SDS Eletroforesis (GE Healthcare); 1. Sobrenadante de cultura contendo a enzima HXYN2r; 2. Sobrenadante de cultura contendo a enzima CBH1.2r.

Tabela 10. Produção de enzimas pelos transformantes GS/Hxyn2 e GS115/cbh1.2 de *P. pastoris*.

Transformante	Tempo (h)	Enzima	Atividades (U/mL)				Proteínas totais (µg/mL)
			Xilanases	CMCases	FPases	Avicelases	
GS115/cbh1.2	96	CBH1.2r		0,094	0,22	0,64	3134,63
GS115/Hxyn2	120	HXYN2r	197,000	-	-	-	1675,33

5.3. Análise do Teor de Celulose e Hemicelulose das Amostras por Hidrólise Ácida

Os experimentos de pré-tratamento tiveram o objetivo de extrair a fração de hemicelulose do BCA. O rendimento destas extrações foi avaliado determinando o teor aproximado de xilana (TAX) residual das amostras por reações de hidrólise ácida. A hidrólise ácida tem sido descrita na literatura como um processo de fracionamento da hemicelulose em seus monômeros utilizando diversas concentrações de ácido, diferentes tempos de incubação, diversas taxas de sólido/líquido e várias temperaturas, atingindo conversões da fração de hemicelulose superior a 80 % (Lavarack *et al.*, 2002; Neureiter *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2010).

Com o intuito de padronizar a condição adequada de hidrólise ácida para avaliação do rendimento dos pré-tratamentos, através da quantificação do TAX (4.8) foram realizados 5 ensaios de hidrólise ácida da xilana *oat spelt* variando a concentração de H₂SO₄ (1,5 - 3 %) e o tempo de incubação (60 – 120 min). Após os experimentos de hidrólise pode-se observar que a melhor condição para realização da hidrólise ácida das frações sólidas (FS) coletadas nos pré-tratamentos foi o ensaio 4 onde 300 mg de xilana foi pré-incubada com H₂SO₄ 72 % por 7 min a 45 °C e posteriormente teve sua concentração diluída para se obter H₂SO₄ 3 % e incubada por 60 min a 121 °C, observando uma liberação de xilose de 86 % (258,126 mg). Porém, a melhor condição para realização da hidrólise ácida das frações líquidas (FL) foi o ensaio

nas seguintes condições: H₂SO₄ 3 % por 120 min a 121 °C, onde se obteve a conversão de xilana a xilose de 74,6 % ().

Tabela 11. Condições da hidrólise ácida da xilana *oat spelt*.

Substrato (300 mg)	Ensaio	% H ₂ SO ₄	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Xilose (mg)	Rendimento de xilana (%)
Xilana <i>oat spelt</i>	1	1,5	120	121	214,846	71,6
Xilana <i>oat spelt</i>	2	2	120	121	223,929	74,6
Xilana <i>oat spelt</i>	3	2,5	120	121	195,778	65,3
Xilana <i>oat spelt</i>	4	3	60	121	258,126	86,0
Xilana <i>oat spelt</i>	5	-	120	121	30,327	10,1

5.4. Experimentos de Pré-tratamento do BCA

A hemicelulose é um polímero constituído de diferentes polissacarídeos, porém, a intrínseca disposição de suas fibras no BCA e as ligações com as moléculas de lignina, dificulta sua conversão à xilose durante o processo de hidrólise enzimática, devido à dificuldade de acesso das enzimas a molécula de hemicelulose (EBRINGEROVA *et al.* 2000). Assim, a utilização de um pré-tratamento se torna necessária para obter eficiência na hidrólise enzimática da fração de hemicelulose. Vários pré-tratamentos são descritos como eficientes no processo de recuperação da fração de hemicelulose, atuando na quebra das ligações entre lignina e a hemicelulose, e outros permitem a abertura das fibras permitindo uma alta recuperação da fração de hemicelulose, superior a 80 %. Dentre os pré-tratamentos utilizados, os pré-tratamentos alcalinos (I a III) foram escolhidos por apresentarem alta taxa de recuperação da fração

de hemicelulose, o tratamento IV consiste em um processo de extração da xilana do BCA. Os rendimentos de recuperação da fração de hemicelulose em cada pré-tratamento podem ser observados na **Tabela 12**.

Tabela 12. Análise do rendimento de recuperação de xilana nos experimentos de pré-tratamento.

Tratamento	Ensaio	Glicose (mg)	ART (mg)	TAX (mg)	xilose Livre (mg)	Rendimento de xilana (%)
Tratamento I (FL H)	2	2,760	85,678	82,91 8	23,996	2,6
Tratamento I (FS H)	4	22,938	92,526	69,58 8	12,103	2,5
Tratamento II (FL H)	6	2,159	182,512	180,3 54	41,823	6,0
Tratamento II (FS H)	8	5,213	360,598	355,3 85	13,220	14,9
Tratamento III (FS H)	12	5,581	424,402	418,8 21	12,944	0,0
Tratamento III (FL H)	10	75,130	87,070	11,94 0	12,276	17,7
Tratamento IV	13	0,002	0,04	0,038	13,220	67

* A hidrólise foi realizada utilizando um 0,06 g de substrato. **FS H**: fração sólida após a hidrólise e **FL H**: fração líquida após a hidrólise.

É conhecido que a utilização de soluções alcalinas melhora a eficiência no processo de extração de hemiceluloses da parede secundária de células vegetais (JABASINGH *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2011; JU *et al.*, 2011). Entretanto, neste estudo, o processo de extração do Tratamento I, com utilização de sucessivos incubações do BCA com NaOH (1, 3, 5 e 8 %), mostrou uma baixa capacidade de recuperação da xilana, apresentando um rendimento de recuperação de xilana de 2,5 % na FS e 2,6 % na FL (**Tabela 12**).

Os tratamentos II, III e IV que empregaram peróxido de hidrogênio apresentaram os melhores resultados de recuperação da xilana do BCA. Os tratamentos

II e III apresentaram respectivamente rendimentos de 14,9 e 17,7 % de recuperação da xilana na FS e 6 e 0 % na FL, rendimentos inferiores aos descritos na literatura para tratamentos semelhantes (**Tabela 12**). Saha e colaboradores (2009) obtiveram rendimento de 86 % de recuperação de xilana de alta massa molecular de BCA. Brienzo e colaboradores (2009) obtiveram o rendimento de 95 % de recuperação de xilana de alta massa molecular de BCA. O tratamento IV apresentou o rendimento de 67 % (**Tabela 12**), contudo inferior ao encontrado na literatura acima de 90 % (SUN *et al.*, 2004; BRIENZO *et al.*, 2009)

5.4. Hidrólise Enzimática do BCA Pré-tratado

5.4.1. Escolha do Substrato para Hidrólise Enzimática

Os pré-tratamentos alcalinos (I-III) apresentaram baixos rendimentos de recuperação da xilana, o que impossibilitou o uso do BCA processado desta maneira. O BCA pré-tratado por *steam explosion* (BCAse) apresentou teor de xilana residual de aproximadamente 17 % após o pré-tratamento o que equivale à recuperação de 77 % do teor inicial de xilana antes do pré-tratamento. Diante destes resultados o BCAse foi escolhido como substrato nos experimentos de hidrólise enzimática.

5.4.2. Reações de Hidrólise do BCAse para Escolha da Formulação do sHg

As reações de hidrólise enzimática foram realizadas utilizando-se o sobrenadante de cultura do *H. grisea* (sHg) cultivado em BCA e FT: sHg/xilanases sHg/CMCase-FPase e sHg/avicelases (item 5.1). Com o objetivo de analisar qual a melhor proporção destes sobrenadantes para compor o sHg foram realizados os experimentos de hidrólise descritos na Tabela 6. As enzimas recombinantes foram adicionadas em concentrações fixas. As reações foram realizadas com BCAse a 2 %, 50 °C, pH 5,0, por 48 h.

Os resultados obtidos demonstram que os maiores rendimentos de hidrólise foram obtidos quando se utilizou os três sobrenadantes de cultura e a melhor proporção dos sobrenadantes de cultura foi 0,5:0,25:0,25 - sHg/xilanases:sHg/CMCase-FPases:sHg/avicelases (Tabela 13). O sobrenadante de cultura sHg contendo esta proporção foi denominado de sHg+.

Tabela 13. Reações de hidrólise do BCA com diferentes misturas de sHg.

Ensaio	Volume das enzimas (mL) *						TAX (g)	Rendimento hidrólise xilana %
	sHg/xilanase	sHg/avicelase	sHg/FPase-CMCase	HXYN2r	CBH1.2r	XYNB2r		
1	1	-	-	-	-	-	0,0015	4
2	0,5	-	-	2,5	1,54	0,03	0,0069	20
3	0,5	0,5	-	2,5	1,54	0,03	0,0085	25
4	0,5	-	0,5	2,5	1,54	0,03	0,0136	40
5	0,5	0,25	0,25	2,5	1,54	0,03	0,0181	53
6	0,5	0,35	0,15	2,5	1,54	0,03	0,0048	14
7	0,5	0,15	0,35	2,5	1,54	0,03	0,0066	19

* As misturas enzimáticas possuem as seguintes atividades: **sHg/xilanase** (Xilanases: 24.057 U/mL; CMCase: 3.553 U/mL; FPases: 0.232 U/mL e Avicelases: 0.03 U/mL); **sHg/avicelase** (Xilanases: 19 U/mL; CMCase: 2.15 U/mL; FPases: 0.12 U/mL e Avicelases: 0.080 U/mL); **sHg/FPase-CMCase** (Xilanases: 0.496 U/mL; CMCase: 1.245 U/mL; FPases: 0.118 U/mL e Avicelases: 0.168 U/mL); **CBH1.2r** (CMCase: 0.094 U/mL; FPases: 0.22 U/mL; Avicelases: 0.64 U/mL); **HXYN2r** (Xilanases: 197 U/mL) e **XYNB2r** (β-xilanases: 240 U/mL).

5.4.3. Efeito da Suplementação do sHg com as Enzimas Recombinantes

Com o objetivo de analisar o efeito da suplementação do sHg+ com as enzimas recombinantes, foram realizadas reações de hidrólise do BCASE com o sHg+ acrescido de diferentes concentrações de HXYN2r, CBH1.2r e XYNB2r. As reações foram realizadas com BCASE a 2 % a 50 °C, pH 5,0, por 48 h. Os experimentos foram

realizados de acordo com planejamento fatorial 2^3 e os resultados são apresentados na tabela 12. Conforme as condições utilizadas na hidrólise enzimática, o rendimento variou de 24 a 54 %. Os pontos centrais não apresentaram uma variação significativa entre 48 - 49 %, indicando uma boa reprodutibilidade do processo.

Pode-se verificar que a melhor formulação para suplementação do sHg com as enzimas recombinantes, onde o rendimento máximo de hidrólise encontrado foi de 53 %, foi com sHg suplementado com 950 U de HXYN2r, 1,8 U de CBH1.2r e 1,17 U de XYNB2r (Tabela 14).

De acordo com os resultados observados no gráfico de Pareto (Figura 7) nota-se claramente que a concentração da enzima XYNB2r exerceu efeito positivo moderado no processo de hidrólise, de forma que à medida que sua concentração era incrementada, a eficiência do processo aumentou. Contudo, apesar da fraca correlação entre CBH1.2r e HXYN2r como rendimento do processo de hidrólise, pode-se observar um fraco efeito negativo.

Os experimentos de hidrólise de acordo com experimento fatorial ofereceram resultados significativos para criação dos modelos a serem analisados, permitindo a criação de uma superfície de resposta para o rendimento da hidrólise do BCAs, podendo assim, delimitar as regiões de maior interesse, melhorando a eficiência, evitando o desperdício das enzimas. Pode-se observar através da superfície e curvas de contorno que a faixa ótima para suplementação do sHg+ com as enzimas recombinantes na hidrólise enzimática do BCA se encontra com a utilização das seguintes faixas de concentração enzimáticas: HXYN2r (600-1300 U), CBH1.2r (1,2-2,5 U) e XYNB2r (0,5-1 U) (Figura 8).

Tabela 14. Experimentos do planejamento fatorial variando concentrações das enzimas recombinantes nas reações de hidrólise enzimática do BCAs.

Ensaio	HXYN2r	CBH1.2r	XYNB2r	Rendimento (%)
1	+	+	+	44

2	+	+	-	32
3	+	-	+	47
4	+	-	-	32
5	-	+	+	46
6	-	+	-	39
7	-	-	+	49
8	-	-	-	24
9	-1,68	0	0	35
10	1,68	0	0	36
11	0	-1,68	0	39
12	0	1,68	0	31
13	0	0	-1,68	36
14	0	0	1,68	54
15	0	0	0	47
16	0	0	0	48
17	0	0	0	49
18	0	0	0	48
19	0	0	0	49
20	0	0	0	48

Gráfico de Pareto para Rendimento de Hidrólise (%)

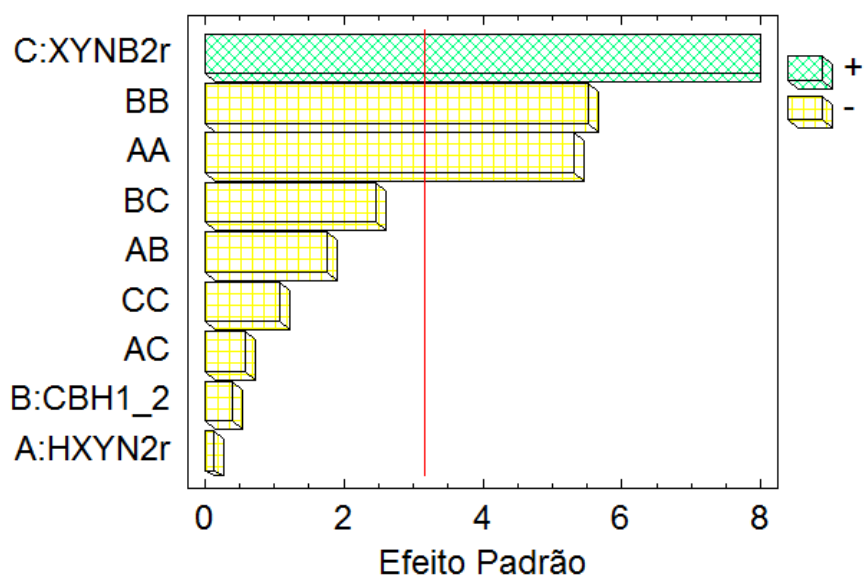


Figura 7. Gráfico de Pareto do efeito da suplementação do sHg⁺ com enzimas recombinantes. Valores do lado direito da linha tracejada são estatisticamente significativos (95 % de confiança). A influência da interação entre os parâmetros sobre o rendimento de hidrólise da xilana do BCAs é representada por BC, AB, AC.

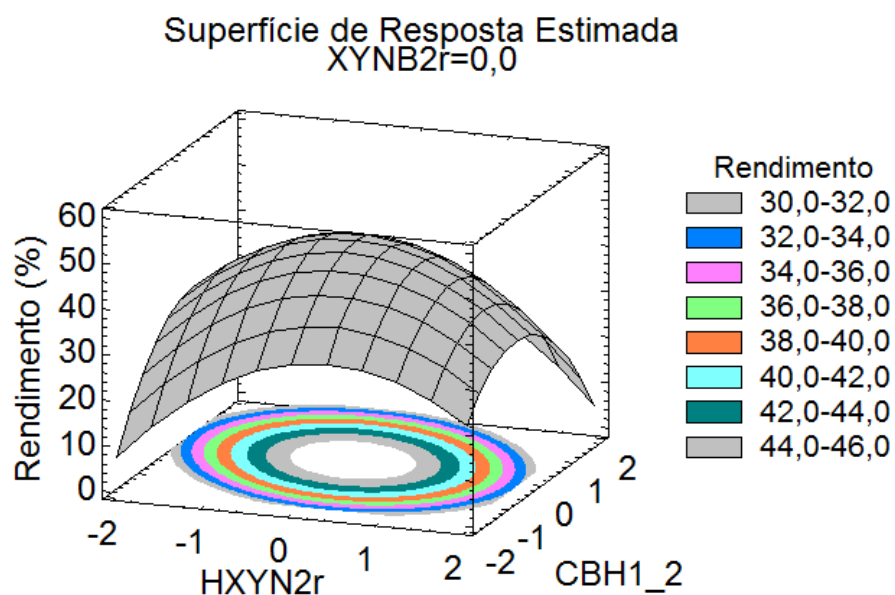


Figura 8. Gráfico de superfície de resposta e curvas de contorno.

5.5. Cinética da Hidrólise Enzimática

De acordo com observado no item anterior a formulação que apresentou melhor resultado na conversão da fração de hemicelulose do BCAs_e foi o ensaio 7 (Tabela 14), contudo, para verificar o comportamento deste complexo enzimático foi realizado um experimento de cinética.

O BCA e o BCAs_e foram submetidos a uma hidrólise enzimática de acordo com o melhor resultado onde avaliou-se a taxa de conversão dos substratos no decorrer de 48 h a 50 °C.

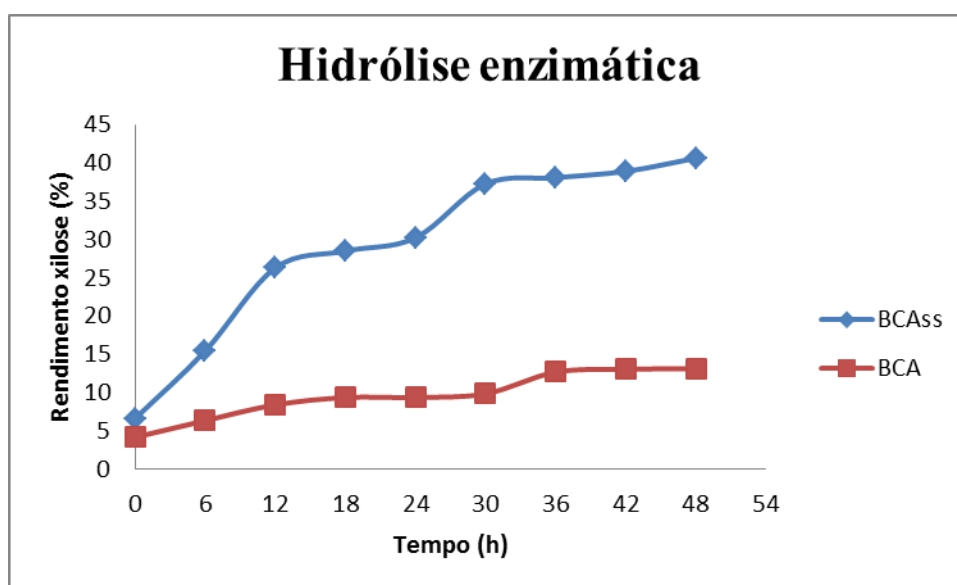


Figura 9. Cinética da hidrólise enzimática do BCA e o BCAs_e.

De acordo com a quantidade teórica de hemicelulose para o BCAs_e e o BCA, 17 e 24 % respectivamente, pode se observar uma taxa de conversão máxima da fração de hemicelulose de BCAs_e a seus monômeros de 45 % no período de 48 h, contudo, a partir de 18 h já se observou uma conversão superior a 35 %. No entanto, para o BCA, observou uma taxa de conversão inferior ao BCAs_e, sendo que a conversão máxima da fração de hemicelulose do BCA foi de 15 %, resultado este cerca de 3x menor que o encontrado para a mesma quantidade de BCAs_e (Figura 9).

6. CONCLUSÕES

- O fungo *H. grisea* secretou xilanases e celulases quando cultivado em BCA e FT;
- Os transformantes GS115/Hxyne e GS115/cbh1.2 da levedura *P. pastoris* secretaram as enzimas recombinantes HXYN2r e CBH1.2r quando cultivados sob indução com metanol;
- O pré-tratamento do BCA por explosão a vapor (BCAse) apresentou o melhor resultados de recuperação da xilana, 78 %, sendo o BCAse escolhido para os experimentos de hidrólise.
- A melhor formulação do sHg foi encontrada quando utilizado sobrenadantes de cultura cultivados em (FT) 48 h (sHg/avicelase), FT 196 h (sHg/xilanase), BCA 216 h (sHg/FPase-CMCase) nas proporções de 0,5:0,25:0,25 - sHg/xilanases:sHg/CMCase-FPases:sHg/avicelases;
- A suplementação do sHg com as enzimas recombinantes HXYN2r, CBH1.2 e XYNB2r se mostrou eficiente nos ensaios de hidrólise enzimática, aumentando a eficiência de 41 para 54 %, cerca de 13,5 %;
- A melhor suplementação com as enzimas recombinantes foi com a utilização de HXYN2r (950 U), CBH1.2r (950 U) e XYNB2r (1,17 U). Onde pôde se verificar que XYNB2r apresentou um efeito positivo significativo no processo de hidrolise enzimática do BCAse;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKPINAR O.; AK O.; KAVAS A.; BAKIR U.; YILMAZ L. **Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 5544–5551, 2007.
- ALÉN, R. **Structure and chemical composition of wood.** In: Stenius, P. (Ed.), Forest Products Chemistry. Fapet Oy, Helsinki, pp. 12–57, 2000.
- ALMEIDA, E. M.; POLIZELI, M.L.; JORGE, J. A; TERENCE, H.F. **Purification and biochemical characterization of β -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*.** FEMS Microbiology Letters, 130:171-176, 1995.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, M.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. **Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review.** Bioresource Technology, Vol. 101, 4851-4861, 2010.
- ARAÚJO, E.F.; BARROS, E.G.; CALDAS, R.A.; SILVA, D.O. **β -glycosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungus *Humicola* sp.** Biotechnology Letters, 5: 781-784, 1993.
- ASPINALL, G.O. **Structural chemistry of the hemicelluloses.** Advances in Carbohydrate Chemistry, 14:429-468, 1959.
- AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; ASTOFI, S. F.; RADFORD, A. **Cloning, sequencing and homologies of the cbh-1 (exoglycanase) gene of *Humicola grisea* var. *thermoidea*.** Journal of General Microbiology, 136: 2569-2576, 1990.
- BASTAWDE, K.B. **Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, 8: 353-368, 1992.
- BASTOS, F. M. **Expressão heteróloga do gene Hxyn2 do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* em *Pichia pastoris*: Produção e purificação da enzima HXYN2r e aplicação em testes de panificação.** 2008. TESE (MESTRADO), UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, GOIÂNIA-GO.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. **Microbial xylanases and their industrial applications: a review.** Applied Microbiology and Biotechnology, 56 (3–4), 326–338, 2001.
- BÉRA-MAILLET, C.; ARTHAUD, L.; ABAD, P.; ROSSO, M. **Biochemical characterization of MI-ENG1, a family 5 endoglucanase secreted by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*.** European Journal of Biochemistry, 267: 3255-3263, 2000.

- BERENGER, J. F.; FRIXON, C.; BIGLIARDI, J.; CREUZET, N. **Production, purification, and properties of thermostable xylanase from *Clostridium stercorearium***. Canadian Journal of Microbiology, 1985, 31:635-643, 10.1139/m85-120, 1985.
- BERGHEM, L. E. R.; PETTERSSON, L. G.; AXIO-FREDRIKSSON, U. **The Mechanism of Enzymatic Cellulose Degradation - Characterization and Enzymatic Properties of a p-1,4-Glucan Cellobiohydrolase from *Trichoderma viride***. European Journal of Biochemistry, 53: 55-62, 1975.
- BÉGUIN, P. **Molecular biology of cellulose degradation**. Annual Review Microbiology, 44: 219-248, 1990.
- BÉGUIN, P.; AUBERT, J. P. **The biological degradation of cellulose**. FEMS Microbiology Reviews, v. 13, pp. 25-58, 1994.
- BERLIN, A.; MAXIMENKO, V.; GILKES, N.; SADDLER, J. **Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis**. Biotechnology and Bioengineering, v. 97, p.287-296, 2007.
- BIELY, P.; MARKOVIK, O.; MISLOVICOVA, D. **Sensitive detection of endo-1,4- β -glycanases and endo-1,4- β -xylanases in gels**. Analytical Biochemistry, 144: 147, 1985.
- BLUM, D.L.; LI, X.L.; CHEN, H.; LJUNGDEHL, L.G. **Characterization of an acetyl xylan esterase from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2**. Applied and Environmental Microbiology, 65:3990–3995, 1999.
- BRADFORD, M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-glycine binding**. Analytical Biochemistry, 72: 248-254, 1976.
- BRIENZO M.; SIQUEIRA A. F.; MILAGRES A. M. F. **Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction**. Biochemical Engineering Journal, Volume 46, Issue 2, 1 October 2009, Pages 199-204, ISSN 1369-703X, DOI: 10.1016/j.bej.2009.05.012.
- BROWNELL, H. H.; SADDLER, J. N. **Steam explosion pretreatment for enzymatic hydrolysis**. Biotechnology & Bioengineering Symposium, 14:55–68, 1984.
- CARAPITO, R.; CARAPITO, C.; JELTSCH, J.; PHALIP, V. **Efficient hydrolysis of hemicellulose by a *Fusarium graminearum* xylanase blend produced at high levels in *Escherichia coli***. Bioresource Technology, 100, 845–850, 2009.
- CARDELLO, L.; TERENCEI, H.F.; JORGE, J.A. **A cytosolic trehalase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea***. Microbiology, 140:1671-1677, 1994.

- CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. **Structural models of primary-cell walls in flowering plants – consistency of molecular-structure with the physical-properties of the walls during growth.** *The Plant Journal*, 3 (1), 1–30, 1993.
- CARVALHO, W. R. **Produção e Purificação da Xilanase de 23 kDa do Fungo Termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea*.** Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química de Lorena-SP. 2003.
- CARVALHO, W. R.; BASTOS, F. M.; BORGES, R.A.; FARIA, F. P. **Biochemical characterization of recombinant HXYN2 purified from *Pichia pastoris* supernatant culture.** In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos (Sinaferm), Curitiba PR. 2007.
- CARVALHO, W. R. **Caracterização bioquímica da endoxilanase recombinante (hxyn2r) do fungo termofílico *humicola grisea* var. *thermoidea* e sua aplicação na sacarificação de resíduos agrícolas.** 2008. TESE (DOUTORADO), UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, GOIÂNIA-GO.
- CHANTASINGH, D.; POOTANAKIT, K.; CHAMPREDA, V.; KANOKRATANA, P.; EURWILAICHITR, L. **Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*.** *Protein expression and Purification*, 46: 143-149, 2006.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. **Xylanases, Xylanase families and extremophilic xylanases.** *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 5-23, 2005.
- COUGHLAN, M.P. **Towards an understanding of the mechanism of action of main chain-hydrolyzing xylanases.** In: *Xylans and xylanases*. (Visser, J.; Beldman, G.; Kusters-van Someren, M.A. & Voragen, A.G.J., eds.), pp. 111-139, Elsevier, Amsterdam, 1992.
- COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 17:259-289, 1993.
- COWLING, E.B. **Structural features of cellulose.** In: Reese, E.T. *Enzymic ydrolysis of Cellulose and Related Materials*. The Macmillan Company, New York, 1963.
- CHANG, V.; HOLTZAPPLE, M. **Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84–86, 5–37, 2000.
- CHAVES, V. M. G. **Algumas características fisiológicas e propriedades do complexo celulase de um fungo termófilo isolado de compostagem.** 1982. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa- MG.

- D'OVIDIO, R.; MATTEI, B.; ROBERTI, S.; BELLINCAMPI, D. **Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers.** Biochimica et Biophysica Acta, 1696:237–44, 2004.
- DAROIT, D. J. **Caracterização de uma B-Glicosidase de *Monascus purpureus*.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 2007.
- DE PAULA, E. H.; FARIA, F. P.; BARBOSA, C.D.; CORNÉLIO, I. N.; PEREIRA, L. R.; AZEVEDO, M. O. **Sacarificação de Compostos Lignocelulósicos pelo extrato enzimático do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*.** Anais da Enzitec, Rio de Janeiro, Brasil, 1998.
- DE PAULA, E. H.; POÇAS-FONSECA, M. J.; AZEVEDO, M. O. **The product of *Humicola grisea* var. *thermoidea* cbh1.2 gene is the major protein under induction by lignocellulosic residues.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, 19: 631-635, 2003.
- DE PAULA, E. H.; RAMOS, L. P.; AZEVEDO, M. O. **The potential of *Humicola grisea* var *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse.** Bioresource technology, 68: 35-41, 1999.
- DEKKER, R.F.H. **Biodegradation of the hetero-1,4-linked xylans.** ACS Symp. Ser. 399: 619-629, 1989.
- DE VRIES, R.P.; VISSER, J. **Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides.** Microbiology Molecular Biology, Rev. 65 (4), 497, 2001.
- DEY, D.; HINGE, J.; SHENDYE, A.; RAO, M. **Purification and properties of extracellular endoxylanases from alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp.** Canadian Journal of Microbiology, 38:436-442, 1992.
- DUSTERHOFT, E. M.; LINSEN, V. A. J. M.; VORAGEN, A. G. J.; BELDMAN, G. **Purification characterization and properties of two xylanases from *Humicola insolens*.** Enzyme and Microbial Technology, 20: 437, 1997.
- EBRINGEROVÁ, A.; HROMADKOVÁ, Z.; HEINZE, T. **Hemicellulose.** Advances in Polymer Science, 186, 1–67, 2005.
- EBRINGEROVÁ, A.; HEINZE, T. **Xylan and xylan derivatives biopolymers with valuable properties.** Macromolecular Rapid Communications, 21, 542–556, 2000.
- ENEYSKAYA, E. V.; IVANEN, D. R.; BOBROV, K. S.; ISAEVA-IVANOVA, L. S.;
- SHABALIN, K. A.; SAVELOEV, A. N.; GOULUBEV, A. M.; KULMINSKAYA, A. A. **Biochemical and kinetic analysis of the GH3 family β -xylosidase.** Environmental Microbiology, 63:1298-1306, 2007.

- FAN L. T.; YOUNG-HYUN L.; GHARPURAY M. M. **The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis.** Springer, 23, 3-540-11698-2, 1982.
- FARIA, F. P. **Clonagem, Caracterização e Expressão do gene de xilanase Hxyn2 do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*.** Tese (Doutorado) Universidade de Brasília-DF. 2000.
- FUNAGUMA T.; NAITO S.; MORITA M.; OKUMARA M.; SUGIURA M.; HARA A. **Purification and some properties of xylanase from *Penicillium herquei*, Banier and Sartory.** Agricultural and Biological Chemistry, 55: 1163-1165, 1991.
- FUSHINOBU, S.; ITO, K.; KONNO, M.; WAKAGI, T.; MATSUZAWA, H. **Crystallographic and mutational analyses of an extremely acidophilic and acid-stable xylanase: Biased distribution of acidic residues and importance of Asp 37 for catalysis at low pH.** Prot. Eng. 11, 1121 – 1128, 1998.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions.** Walter de Gruyter, ed., New York, USA. 1989.
- GALBE, M.; ZACCHI, G. **Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production.** Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 108, 41–65, 2007.
- GARCIA-APARICIO, M.P. **Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw.** Application Biochemical Biotechnology. 136-140, 353-365, 2007.
- GILKES, N.R.; HENRISSAT, B.; KILBURN, D.G.; MILLER, R.C.Jr.; WARREN, R.A.J. **Domains in microbial α -1-4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families.** Microbiological Reviews, 55: 303-315. 1991.
- GIRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-TUKASIK, R. **Hemicelluloses for fuel ethanol: A review.** Bioresource Technology 101 (2010) 4775–4800, 2010.
- GRETHLEIN, H. E.; CONVERSE, A.O. **Common aspects of acid prehydrolysis and steam explosion for pretreating wood.** Bioresource Technology 36 (1), 77–82, 1991.
- HAJJAJ, H. ; BLANC, P. ; GROUSSAC, E. ; URIBELARREA, J. ; GOMA, G. ; LOUBIERE, P. **Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation.** Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 27, p. 619-625, 2000.
- HARRIS, M. **The EU Cellulase Project.** (1999)
<<http://xray.bmc.uu.se/markh/cbh/index.html>>. Acesso em: 21/10/2011.

- HAYASHI, S.; OHNO, T.; ITO, M.; YOKOI, H. **Production and properties of the cell-associated β -xylosidase from *Aureobasidium*.** The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 26, 276–279, 2001.
- HAYASHIDA, S.; MO, K.; HOSODA, A. **Production and Characteristics of Avicel-Digesting and Non-Avicel-Digesting Cellobiohydrolases from *Aspergillus fucum*.** Applied and Environmental Microbiology, 54(6): 1523-1529, 1988.
- HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. **New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.** Journal of Biochemistry, 293: 781-788, 1993.
- HENRISSAT, B.; DAVIES, G. **Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases.** Current Opinion in Structural Biology, v. 7, p. 637-644, 1997.
- HESPELL, R. B. **Fermentation of xylan, corn fiber, or sugars to acetoin and butanediol by *Bacillus polymyxa* strains.** Current Microbiology, 32, 291–296, 1996.
- HOU, Y.; WANG, T.; LONG, H.; ZHU, H. **Cloning, Sequencing and Expression Analysis of the First Cellulase Gene Encoding Cellobiohydrolase 1 from a Coldadaptive *Penicillium chrysogenum* FS010.** Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 39(2): 101-107, 2007.
- IHKURA, H.; TAKASHIMA, S.; NAKAMURA, A.; MASAKI, H.; UOZUMI, T. **Cloning of a gene encoding a putative xylanase with a cellulose-binding domain from *Humicola grisea*.** Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 61.n° 9:1593-5, 1997.
- ITO, T.; YOKOYAMA, E.; SATO, H.; UJITA, M.; FUNAGUMA, T.; FURUKAWA, K.; HARA, A. **Xylosidases associated with the cell surface of *Penicillium herquei* IFO 4674.** Journal of Bioscience Bioengineering, 96:354–359, 2003.
- JABASINGH S. A.; C. NACHIYAR V. **Utilization of pretreated bagasse for the sustainable bioproduction of cellulase by *Aspergillus nidulans* MTCC344 using response surface methodology.** Industrial Crops and Products, Volume 34, Issue 3, November 2011, Pages 1564-1571, ISSN 0926-6690, DOI: 10.1016/j.indcrop.2011.05.017.
- JANES, R.L. **The chemistry of wood and fibers.** In: MacDonald, R.G. & Franklin, J.N. The Pulping of Wood. Mc Graw-Hill, New York, USA. 1969.
- Jeffries T W. **Biodegradation of lignin and hemicelluloses.** In: Ratledge C, editor. Biochemistry of microbial degradation. Dordrecht: Kluwer; p. 233 – 77, 1994.
- JOSELEAU, J. P.; COMTAT, J.; RUEL, K. **Chemical structure of xylans and their interactions in the plant cell walls.** In: Xylans and xylanases, Eds. Visser, J.;

- Beldman, G.; vanSomerén, M. A.K. & Voragen, A. G. J., Elsevier, Amsterdam, pp 1-15, 1992.
- JU, Y.; HUYNH, L.; KASIM, N. S.; GUO, T.; WANG, J.; FAZARY, A. E. **Analysis of soluble and insoluble fractions of alkali and subcritical water treated sugarcane bagasse.** Carbohydrate Polymers, Volume 83, Issue 2, 10 January 2011, Pages 591-599, ISSN 0144-8617, DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.08.022.
- KAAR, W. E.; HOLTZAPPLE, M.T. **Benefits from tween during enzymic hydrolysis of corn stover.** Biotechnology and Bioengineering, 9, 419–27, 1998.
- KAJI, A. **L-Arabinosidases.** Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry, 42:383-394, 1984.
- KATAPODIS, P.; NERINCKX, W.; CLAEYSSSENS, M.; CHISTAKOPOULOS, P. **Purification and characterization of a thermostable intracellular xylanase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*.** Process Biochem. 41, 2402–2409, 2006.
- KATAYEVA, I. A. et al. ***Clostridium thermocellum* β -glucosidases A and B: purification, properties, localization, and regulation of biosynthesis.** Enzyme and Microbial Technology. New York. 14: 407-412, 1992.
- KIMURA, T.; ITO, J.; KAWANO, A.; MAKINO, T.; KONDO, H.; KARITA, S.; SAKKA, K.; OHMIYA, K. **Purification, characterization and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium* sp. 40.** Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 64, 1230 – 1237, 2000.
- KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. **Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass.** Applied Microbiology and Biotechnology, 66,10-26, 2004.
- KLYOSOV, A. **Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation.** Biochemistry 29: 10577-10858, 1990.
- KNOWLES, J.; LEHTOVAARA, P.; TEERI, T. **Cellulose families and their genes.** Trends Biotechnol. 5: 255-261, 1987.
- KOVACS, K.; MACRELLI S.; SZAKACS G.; ZACCHI G. **Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house.** Biotechnology for Biofuels, 2, 14, 2009.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. **Molecular and biotechnological aspects of xylanases.** FEMS Microbiology Reviews, 23: 411-456, 1999.
- LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, 227: 680-685, 1970.

- LAMA, L.; CALANDRELLI, V.; GAMBACORTA, A.; NICOLAUS, B. **Purification and characterization of thermostable xylanase and β -xylosidase by thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*.** Research in Microbiology. 155: 283–289, 2004.
- LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D. **Cellulosic fuel ethanol-alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis*.** Applied Biochemistry and Biotechnology, 105, 457–69, 2003.
- LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. **The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products.** Biomass and Bioenergy, Volume 23, Issue 5, November 2002, Pages 367-380, ISSN 0961-9534, DOI: 10.1016/S0961-9534(02)00066-1.
- LENARTOVICZ, V.; DE SOUZA, C. G. M.; MOREIRA, R. M. P. **Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable bxylosidase by *Aspergillus fumigatus*.** Process Biochemistry, v.38, p.1775-1780, 2003.
- LEE, J. **Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol.** Journal of Biotechnology. 56 (1), 1–24, 1997.
- LEMBO, T.; AZEVEDO, M.O.; BLOCH JR. C.; FERREIRA-FILHO, E.X. **Purification and partial characteri zation of a new b-xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*.** World Journal Microbiology Biotechnology. 22: 475–479, 2006.
- LI, K.C.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J.S.; ERIKSSON, K. E. L. **Relationships between activities of xylanases and xylan structures.** Enzyme Microb. Technol. 27 (1–2), 89–94, 2000.
- LIMA, D. U.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A.; MOLLE, F. D.; BUCKERIDGE, M. S. **Patterns of expression of cell wall related genes in sugar cane.** Genetics and Molecular Biology 24 (1-4): 191-198, 2001.
- LIU, M. Q.; WENG, X. Y.; SUN, J. Y. **Expression of recombinant *Aspergillus niger* xylanase A in *Pichia pastoris* and its action on xylan.** Protein Expression and Purification, 48: 292-299, 2006.
- LUCENA-NETO, S.A. & FERREIRA-FILH O, E.X. **Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea* var *thermoidea*.** Brazilian Journal of Microbiology, 35:86-90, 2004.
- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. **Microbial Cellulose. Utilization: Fundamentals and Biotechnology.** Microbiology and Molecular Biology reviews, 66: 506-577, 2002.
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M.K. **Thermophilic fungi: their physiology and enzymes.** Microbiology Molecular Biology. Rev., 64: 461-488, 2000.

- MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. **Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications.** ReViews Environ Sci Bio/Technol, 1:105–14, 2002.
- MARTÍN, C.; MARCET, M.; ALMAZÁN, O.; JONSSON, L. J. **Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors.** Bioresource Technology, 98: 1767–1773, 2007.
- Marui, M.; Nakanishi, K.; Yasui, T. **Purification and properties of three types of xylanases induced by methyl 8-xyloside from *Streptomyces* sp.** Agricultural and Biological Chemistry. 49, 3399-3407, 1985.
- MCKENDRY, P. **Energy production from biomass (part 1): overview of biomass.** Elsevier, volume: 83, Issue: 1, 2001.
- MELO, G. R. **Produção de celulases e xilanases pelo fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* em diferentes substratos lignocelulósicos.** 2010. TESE (MESTRADO), UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, GOIÂNIA-GO.
- MERIVUORI, H.; SANDS, J. A; MONTENECOURT, B. S. **Effects of tunicamycin on secretion and enzymatic activities of cellulase from *Trichoderma reesei*.** Applied Microbiology and Biotechnology 23, 60-66, 1985.
- MILAGRES, A. M. F.; PRADE, R. A. **Production of xylanases from *Penicillium janthinellum* and its use in the recovery of cellulosic textile fibers.** Enzyme and Microbial Technology, 16:627-632, 1994.
- MILLER, G. L. **Use of dinitrossalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars.** Analytical Chemistry, 31: 426-428. 1959.
- MOISER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.** Bioresource Technology, 96, 673–686, 2005.
- MONTGOMERY, R.; SMITH, F. **A review of carbohydrates of wheat and other cereal grains.** Agricultural and Food Chemistry. 4, 716-720, 1956.
- MONTI, R.; TERENCEI, H.F.; JORGE, J.A. **Purification of an extracellular xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*.** Canadian Journal of Microbiology, 37: 675-681, 1991.
- MONTI, R.; CARDELLO, L.; CUSTÓDIO, M.F.; GOULART, A.J.; SAYAMA, A.H.; CONTIERO, J. **Production and Purification of an endo- 1,4β- xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* by electroelution.** Brazilian Journal of Microbiology, 34:124-128, 2003.

- MORAES, W. P.; FARIA, F. P. & AZEVEDO, M. O. **Produção de Enzimas Xilanolíticas pelo Fungo Termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* em diferentes Substratos**. 5º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. p.121, 2002.
- NAKASHIMA, K.; AZUMA, J. **Distribution and Properties of Endo- β -1,4-glucanase from a Lower Termite, *Coptotermes formosanus* (Shiraki)**. Bioscience Biotechnology & Biochemistry 67 (7): 1500-1506, 2000.
- NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; Braun, R. **Dilute acid hydrolysis of sugar cane bagasse at varying conditions**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 77-79, p.133-142, 2002.
- 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, 146: 291-295, 1997.
- PEREIRA, H.; GRAÇA, J.; RODRIGUES, J.C. **Wood chemistry in relation to quality**. In: Barnett, J.R., Jeronimidis, G. (Eds.), Wood Quality and Its Biological Basis. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 53–86, 2003.
- PRADE, R. A. **Xylanases: from biology to biotechnology**. Biotechnol. Gen. Engin. Rev. v. 13, pp. 101-131, 1995.
- RANA, B. K.; JOHRI, B. N.; THAKUR, I. S. **Formation and activities of xylan-hydrolyzing enzymes of *Humicola grisea* var. *thermoidea***. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 12: 12-15, 1995.
- OHGREN, K.; BURR, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. **Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover**. Bioresource Technology, 98, 2503-2510, 2007.
- OLIVEIRA, A.R.; XIMENES, E.A.; FELIX, C.R. **Amylolytic activity of *Humicola* sp.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, 63: 409-414, 1991.
- OLIVEIRA, G. S. **Expressão heteróloga do gene celobiohidrolase (cbh1.2) do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* em *Pichia pastoris***. 2007. 92f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. 2007.
- PAICE, M. G.; BERNIER, R.; JURASEK, L. **Viscosity-enhancing bleaching of hardwood Kraft pulp with xylanase from a cloned gene**. Biotechnology and Bioengineering, 32: 235-239, 1988.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. **Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse**. Bioresource Technology, Volume 74, Issue 1, August 2000, Pages 69–80, 2000.

- PAPAGIANNI, M. **Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes.** Biotechnology Advances, Oxford, v. 22, p. 189-259, 2004.
- PEREIRA, H.; GRAÇA, J.; RODRIGUES, J. C. **Wood chemistry in relation to quality.** In: Barnett, J.R., Jeronimidis, G. (Eds.), Wood Quality and Its Biological Basis. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 53–86, 2003.
- PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE-A-RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. **Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview.** Int Microbiol: 5:53–63, 2002.
- PERSSON, T.; DINH, E.; JÖNSSON, A. S. **Improvement of arabinoxylan isolation from barley husks.** Food and bioproducts processing, 87, 228–233, 2009.
- POÇAS-FONSECA, M. J.; LIMA, B. D.; BRIGIDO, M. M.; SILVA-PEREIRA, I.; FELIPE, M. A.; AZEVEDO, M.O. ***Hemicola grisea* var. *thermoidea* cbh1.2: A new gene in the family of cellobiohydrolases is expressed and encodes a cellulose-binding domain-less enzyme.** The Journal of General and Applied Microbiology, 43(2), 115-120, 1997.
- POÇAS-FONSECA, M.J.; SILVA-PEREIRA, I.; ROCHA, B.B.; AZEVEDO, M .O. **Substrate-dependente differential expression of *Hemicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase genes.** Canadian Journal of Microbiology, 46: 749-752, 2000.
- POLIZELI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. **Xylanases from fungi: properties and industrial applications.** Applied Microbiology and Biotechnology, 67: 577-591, 2005.
- Poutanen, K.; Tenkanen, M.; Korte, H.; Puls, J. **Accessory enzymes involved in the hydrolysis of xylans.** In "Enzymes in Biomass Conversion", Leatham, G. and Himmel, M., eds. ACS Symp.Ser. 460, Washington 1991, pp. 426-436, 1991.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.; HEMMONS, L.H.; MCDONALD; BUFTON, W. J. **The Genetics of *Aspergillus nidulans*.** Advances in Genetics, 5:141-238, 1953.
- PULS, J.; SCHUSEIL, J. **Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis.** in Hemicellulose and Hemicellulases. pp.1-28. M. P. Coughlan and G. Hazlewood (Eds). Portland Press Ltd, NC, U.S.A. 1993.
- QUAAK, P.; KNOEF, H.; STASSEN, H. **Energy from biomass.** World Bank technical paper no. 422. Energy series, 1999.
- RANSOM, R.F.; WALTON, J.D., **Purification and characterization of extracellular β - xylosidase and α -arabinosidase from the plant pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*.** Carbohydrate Res. 297, 357–364, 1997.

- R.W. BECK, Inc. **Review of Biomass Fuels and Technologies**. Yakima County Public. Works Solid Waste Division, 2003.
- ROMERO, I.; RUIZ, E.; CASTRO, E.; MOYA, M. **Acid hydrolysis of olive tree biomass**. Chemical Engineering Research and Design, Volume 88, Issues 5-6, May-June 2010, Pages 633-640, ISSN 0263-8762, DOI: 10.1016/j.cherd.2009.10.007.
- SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. **Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks**. Bioresource Technology 99, 5270-5295, 2008.
- SAHA, B.C. **Hemicellulose bioconversion**. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30, 279-291, 2003.
- SAHA, B. C.; COTTA, M. A. **Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol**. Biomass And Bioenergy, 32, 971 – 977, 2008.
- SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. **Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol**. Process Biochemistry, 40, 693–700, 2005.
- SAHA B. C.; COTTA M. A. **Comparison of pretreatment strategies for enzymatic saccharification and fermentation of barley straw to ethanol**. New Biotechnology, Volume 27, Issue 1, Special issue on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology: number 3, 28 February 2010, Pages 10-16, ISSN 1871-6784, DOI: 10.1016/j.nbt.2009.10.005.
- SANDGREN, M.; SAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. **Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes**. Progress in Biophysics & Molecular Biology, 89: 246-291, 2005.
- SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. **Hemicelluloses**. The Annual Review of Plant Biology. 61:263–89, 2010.
- SCHÜLEIN, M. **Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens***. Journal of Biotechnology, 57: 71-81, 1997.
- STEPHEN, A.M. **Other plant polysaccharides**. In: Aspinall, G.O. (Ed.), The Polysaccharides. Academic Press, New York, pp. 97–194, 1983.
- SUBRAMANIYAN, S. & PREMA, P. **Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application**. Critical Reviews in Biotechnology, 22(1):33-64, 2002.
- SUDA, C. N. K.; GIORGINI, J. F. **Multiple forms of endo-1,4- β -glucanases in the endosperm of *Euphorbia heterophylla* L.** Journal of Experimental Botany, 54 n.390: 2045-2052, 2003.

- SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN R, C.; SU, Y. Q. **Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses.** Carbohydrate Polymers, Volume 56, Issue 2, 4 June 2004, Pages 195-204, ISSN 0144-8617, DOI: 10.1016/j.carbpol.2004.02.002.
- SUN, Y.; CHENG, J. **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.** Bioresource Technology, 83, 1–11, 2002.
- SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. **Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria.** Critical Reviews in Biotechnology, 17: 39-67, 1997.
- SUTO, M.; TOMITA, F. **Induction and Catabolite Repression Mechanisms of Cellulase in Fungi.** Journal of Bioscience and Bioengineering, 92: 305-311, 2001.
- TAJANA, E.; FIECHTER, A.; ZIMMERMANN, W. **Purification and characterization of two α -L-arabinofuranosidases from *Streptomyces diastaticus*.** Application Environment Microbiology 58: 1447–1450, 1992.
- TAKASHIMA, S.; NAKAMURA, A.; HIDAKA, M.; MASAKI, H.; TAKESHI, U. **Cloning, sequencin, and expression of the cellulase genes of *Humicola grisea* var *thermoidea*.** Journal of Biotechnology, 50: 137-147, 1996.
- Takashima, S.; Nakamura, A.; Masaki, H.; Uozumi T. **Cloning, sequencing, and expression of a thermostable cellulase gene of *Humicola grisea*.** Bioscience Biotechnology & Biochemistry. 1997 Feb;61(2):245-50. PubMed PMID: 9058960.
- TAKASHIMA, S.; NAKAMURA, A.; HIDAKA, M.; MASAKI, H.; UOZOMI, T. **Molecular Cloning and Expression of Novel Fungal β -Glucosidase Genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*.** Journal of Biochemistry. 125, 728 – 736, 1999.
- TAKENAKA, A.; COLIN, G. D.; KUDO, H.; ITABASHI, H.; CHENG, K. **Molecular cloning, expression, and characterization of an endo- β -1,4-glucanase cDNA from *Epidinium caudatum*.** The Journal of General and Applied Microbiology, 45: 57-61, 1999.
- TEERI, T.T. **Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of Cellobiohydrolases.** Trends Biotechnology. 15:160–7, 1997.
- Tenkanen, M.; Poutanen, K. **Significance of esterases in the degradation of xylans.** In: Visser, J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M.-A. and Voragen, A.G.J., eds., Progr. Biotechnol Vol 7: Xylans and Xylanases, Elsevier Science Publishers, London 1992, pp. 203-212, 1992.

- TENKANEN. M.; SIIKA-AHO, M. **An alpha-glucuronidase of *Schizophyllum commune* acting on polymeric xylan.** Journal of Biotechnology 78(2):149–16, 2000.
- THOMPSON, N.S. **HEMICELLULOSE as a biomass resource.** In: SOLTES, J. Wood and Agricultural Residues; research on use for feed, fuels and chemicals. New York, Academic Press, p. 101-119, 1983.
- TÍMAR-BALÁZSKY, A.; EASTOP, D. **Chemical Principles of Textile Conservation.** Butterworth Heinemann, Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1998.
- Timell, T.E. **Wood hemicelluloses.** Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry, 20, 409–483, 1965.
- Timell, T. E. **Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses.** Wood Science Technology, 1:45-70. 1967.
- TIMELL, T.E. **Wood hemicelluloses. Part 1. Advances in Carbohydrate Chemistry.** W.W. Pigman and M.L. Wolfrom (Eds.), Academic Press, New York, NY. 19:247–302, 1964.
- TOMÁS-PEJÓ, E.; OLIVA, J. M.; BALLESTEROS, M.; OLSSON, L. **Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains.** Biotechnology Bioengineering . 100 (6), 1122–1131, 2008.
- USDA. **World Agricultural Production (2009).**
- < <http://www.fas.usda.gov/wap/circular/2003/03-02/tables.html>>. Acesso em: 02/08/2010.
- VIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. **Xylanases in bleaching: from an idea to the industry.** FEMS Microbiology Reviews, 13: 335-350, 1994.
- VIKARI, L. **Pulp and the environment.** Paperi ja P uu- Paper and Timber, 73:384-389, 1991.
- XIMENES, E. A.; DIEN, B. S.; LADISCH, M. R.; MOSIER, N, COTTA, M. A.; LI X. **Enzyme Production by Industrially Relevant Fungi Cultured on Coproduct From Corn Dry Grind Ethanol Plants.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 137-140, n. 1-12, 2007.
- WHISTLER, R.L.; RICHARDS, E.L. **Hemicelluloses.** In: The Carbohydrates. pp. 447-469. Vol. 2a. Pigman, W. & Horton, D., Eds., Academic Press, New York, 1970.
- WOODWARD, J. **Xylanases: functions, properties and applications.** Top. Enzyme and Fermentation Biotechnology, 8: 9-30, 1984.
- WOODWARD, J.; WISEMAN, A. **Fungal and other α -D-glucosidases their properties and applications.** Enzyme Microb. Technol. 4: 73-79, 1982.

- WILLFÖR, S.; SJOHOLMA; LAINEB, R.; ROSLUNDC, C. M.; HEMMINGA, J.; HOLMBOMA B. **Characterisation of water-soluble galactoglucomannans from Norway spruce wood and thermomechanical pulp.** Carbohydrate Polymers 52 (2003) 175–187.
- WOOD, T.M. **Fungal cellulases.** Biochemical Society Transactions, 20: 46-53, 1992.
- YAN, Q.J.; WANG, L.; JIANG, Z.Q.; YANG, S.Q.; ZHU, H.F.; LI, L.T. **A xylose-tolerant β -xylosidase from *Paecilomyces thermophila* : characterization and its co-action with the endogenous xylanase.** Bioresource Technology, 99, 5402–5410, 2008.
- ZANOELO, F.F.; POLIZELI, M.L.; JORGE, J.A. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 31, 170–176, 2004.
- ZHAO X.; PENG F.; CHENG K.; LIU D. **Enhancement of the enzymatic digestibility of sugarcane bagasse by alkali-peracetic acid pretreatment.** Enzyme and Microbial Technology, Volume 44, Issue 1, 6 January 2009, Pages 17-23, ISSN 0141-0229, DOI: 10.1016/j.enzmictec.2008.07.011.